



## **Sécurité et bénéfices des phyto-estrogènes apportés par l'alimentation - Recommandations**

---

**mars 2005**

**Coordination scientifique et rédactionnelle**  
Isabelle Berta-Vanrullen

**Appui à la documentation**  
Carine Saul

**Coordination éditoriale**  
Carole Thomann

## Sommaire général

---

<b>Composition du groupe de travail</b> .....	<b>4</b>
<b>Introduction générale</b> .....	<b>5</b>
<b>Méthodologie générale pour la sélection des articles scientifiques</b> .....	<b>9</b>
<b>Répertoire des phyto-estrogènes</b> .....	<b>13</b>
<b>Techniques d'analyse des phyto-estrogènes</b> .....	<b>35</b>
<b>Estimation des apports en phyto-estrogènes dans la population française</b> .....	<b>49</b>
<b>Biodisponibilité des phyto-estrogènes</b> .....	<b>79</b>
<b>Sécurité des phyto-estrogènes</b> .....	<b>101</b>
<b>Mécanismes moléculaires et cellulaires des estrogènes et des phyto-estrogènes</b> .....	<b>141</b>
<b>Effets physiopathologiques des phyto-estrogènes</b> .....	<b>169</b>
<b>Phyto-estrogènes et préparations pour nourrissons et préparations de suite à base de protéines de soja</b> .....	<b>171</b>
<b>Effets des phyto-estrogènes sur la fonction thyroïdienne</b> .....	<b>179</b>
<b>Effets des phyto-estrogènes sur l'immunité</b> .....	<b>187</b>
<b>Effets hormonaux des phyto-estrogènes</b> .....	<b>199</b>
<b>Effets des phyto-estrogènes sur l'ostéoporose</b> .....	<b>221</b>
<b>Effets des phyto-estrogènes sur le système nerveux central, les fonctions cérébrales et cognitives</b> .....	<b>251</b>
<b>Effets des phyto-estrogènes sur les cancers</b> .....	<b>263</b>
<b>Effets des phyto-estrogènes sur les maladies cardio-vasculaires</b> .....	<b>307</b>
<b>Conclusion générale</b> .....	<b>349</b>
<b>Ensemble des points clés et recommandations pour les phyto-estrogènes de l'alimentation</b> .....	<b>355</b>
<b>Annexes</b> .....	<b>371</b>
<b>Annexe 1 : Les tests de détection des effets estrogéniques</b>	
<b>Annexe 2 : Données de composition des aliments en isoflavones (daïdzéine et génistéine) et d'estimation des apports de ces substances, en France</b>	
<b>Annexe 3 : Le traitement hormonal substitutif</b>	
<b>Annexe 4 : Données réglementaires</b>	
<b>Annexe 5 : L'épissage différentiel (ou alternatif) des récepteurs <math>\alpha</math> et <math>\beta</math> aux estrogènes : les variants possibles</b>	
<b>Annexe 6 : Masses moléculaires relatives des différentes formes de certains phyto-estrogènes</b>	

## Composition du groupe de travail

---

### ◆ Experts auprès de l'Afssa

#### **Membres du Comité d'experts spécialisé « Nutrition Humaine »**

**Dr Mariette GERBER (Présidente du Groupe de travail)**- INSERM-CRLC – Montpellier

Dr. (PhD) Claude Louis LEGER – Université – Montpellier

Pr. Anne-Marie MARIOTTE - UFR de Pharmacie - Grenoble

Pr. Daniel RIEU – UFR Médecine – Université Montpellier I - Montpellier

#### **Membres du Comité d'experts spécialisé « Contaminants et Résidus physico-chimiques »**

Dr. (PhD) Jacques TULLIEZ - INRA – Toulouse

#### **Membres du Comité d'experts spécialisé « Biotechnologies »**

Joël GUILLEMAIN - Université François Rabelais -Tours

#### **Experts hors comités de l'Afssa**

Pr. Catherine BÉNNÉTAU PÉLISSÉRO - ENITA - Bordeaux

Dr. (PhD) Marie-Chantal CANIVENC-LAVIER - INRA - Dijon

Dr. (PhD) Véronique COXAM - INRA – Clermont-Ferrand

Pr. Thierry MAUDELONDE PUPH –INSERM – CHU Montpellier

Pr. Michel PUGEAT – INSERM- Hôpital Neuro-cardio – Lyon

Sonia TENAILLEAU – DGS - Paris

Marina TOUILLAUD – INSERM - Villejuif

### ◆ Scientifiques de l'Afssa

Dr. Nawel (PhD) BEMRAH AOUACHRIA

Dr. Jean-Louis BERTA

Isabelle BERTA VANRULLEN

Marine OSEREDCZUK

Alexandra TARD

### ◆ Experts auprès de l'Afssaps

Pr. Charles CAULIN – Hôpital Lariboisière - PARIS

### ◆ Scientifique de l'Afssaps

Dr. Nathalie DUMARCET

*Nous remercions Carine SAUL BERTOLON (Afssa) pour l'appui documentaire réalisé, Guillaume COUSYN (DGCCRF) pour sa participation aux annexes réglementaires, et enfin Muriel COIPEL (Afssa - UENRN), pour son appui constant dans les différentes phases de ce travail.*

## Introduction générale

Le terme de « phyto-estrogènes » regroupe plusieurs molécules issues du monde végétal, de structures différentes mais présentant une similarité avec la structure de l'estradiol, et capables de se lier aux récepteurs des estrogènes (une définition est donnée dans le chapitre « Répertoire »). La notion de substances naturelles ayant un effet de type estrogénique est apparue dès 1940, avec l'identification de troubles de la reproduction et de la lactation dans des troupeaux ovins australiens (dite « maladie du trèfle »). Aujourd'hui, de nombreuses substances se réclament de cette appellation.

Les phyto-estrogènes sont apparus dans des compléments alimentaires sur le marché de la Communauté européenne avant 1997; à ce titre, ils ne relèvent pas du règlement 97/248/CE relatif aux nouveaux aliments et nouveaux ingrédients. En France, ces compléments se multiplient depuis la ré-évaluation du traitement hormonal substitutif de la ménopause. En outre, certains des phyto-estrogènes sont présents dans des aliments traditionnellement consommés en occident (par exemple les fruits contiennent des lignanes) ou non (le soja qui contient des isoflavones). Ces substances sont également présentes dans les préparations à base de protéines de soja destinées aux nourrissons et aux enfants en bas âge.

Les phyto-estrogènes sont associés à une image ambiguë, liée tant à l'étude de leurs effets délétères (notamment par leur appartenance au grand groupe des « perturbateurs endocriniens »), que de leurs effets bénéfiques (notamment par les observations d'épidémiologie écologique en Asie sur les bouffées de chaleur et le cancer). Enfin, de nombreuses recherches scientifiques sur les phyto-estrogènes sont orientées en référence à leur similarité structurale avec l'estradiol, et à la similarité des effets qui pourraient exister entre eux. Le parallélisme exact des effets de l'estradiol et des phyto-estrogènes doit toutefois être questionné.

### Saisine & auto-saisine Saisine

L'Afssa a été saisie sur le risque et le bénéfice des phyto-estrogènes (saisine n° 2002-SA-0231) par la direction de la consommation, de la concurrence et de la répression des fraudes (Dgccrf). Le texte de cette saisine est reproduit ci-dessous.

**Direction générale de la concurrence  
de la consommation et de la répression des fraudes**

**NOTE pour  
Monsieur le Directeur Général de l'Agence  
Française de la Sécurité Sanitaires des Aliments  
27-31 avenue du Général Leclerc  
94701 MAISONS-ALFORT Cedex**

Objet : Saisine de l'AFSSA relative à l'emploi d'isoflavones de soja dans les compléments alimentaires.

Certains Etats membres de l'Union européenne ont rapporté que les compléments alimentaires contenant des isoflavones de soja disposaient d'un historique de consommation significative dans la Communauté européenne de sorte que ces produits ne peuvent pas être considérés comme relevant du règlement (CE) n° 258/97 relatif aux nouveaux aliments et nouveaux ingrédients, et peuvent en conséquence être commercialisés librement dans l'Union européenne.

Les résultats d'enquêtes menées par la DGCCRF sur les compléments alimentaires ont permis de mettre en évidence :

1/ l'existence de nombreux compléments alimentaires contenant des isoflavones, principalement extraits de soja, mais également d'autres sources, telles que les haricots, les fèves, le trèfle rouge, ainsi que d'autres phyto-estrogènes extraits entre autre de la sauge, du yam ou de la cimicifuga.

2/ La diversité de ces produits, tant d'un point de vue :

- quantitatif : des extraits contenant 0,1 % et 40 % d'isoflavones totaux ont été signalés,
- que qualitatif : de nombreuses formes d'isoflavones existent, les plus fréquemment majoritaires étant les formes aglycones (daïdzéine, génistéine, glycétéine), dont dérivent les formes glucosides (daïdzine, génistine et glycétine) auxquelles il convient d'ajouter les esters de glucosides (acétylglucoside, malonyglucoside) et succinylglucoside).

Sur ces deux aspects, l'examen des données recueillies laisse supposer que la différence de composition entre les divers types d'extraits disponibles pourrait être fonction de la variété de soja utilisée, des conditions culturales -notamment climatiques-, mais également de la méthode d'extraction employée (extraction hydro-alcoolique, suivie d'un passage sur résine, d'une recristallisation ou d'une hydrolyse enzymatique, extraction par ultrafiltration avec ou sans recristallisation, etc...).

Concernant les doses quotidiennes d'isoflavones recommandées sur l'étiquetage des produits disponibles, la moyenne est d'environ 30-40 mg/jour, et dépasse rarement 80 mg/jour.

Les études récemment publiées concernant les effets secondaires de certains traitements hormonaux de la ménopause pourraient induire un engouement accru des consommateurs pour les phyto-estrogènes. En effet, les compléments alimentaires contenant des isoflavones sont généralement présentés comme permettant de réduire les troubles liés à la ménopause, principalement les bouffées de chaleur, ainsi que les risques d'ostéoporose. Des effets bénéfiques sur l'hypercholestérolémie sont également revendiqués.

Dans ce contexte, il me paraît souhaitable que dans un premier temps, l'AFSSA évalue le risque sanitaire que peut présenter pour le consommateur la consommation répétée, et/ou à long terme, des compléments alimentaires contenant des isoflavones de soja, ces derniers étant majoritairement présents sur le marché. Cette étude pourrait également donner lieu à l'identification de spécifications précises pour ces produits.

Enfin, je souhaite également recueillir l'avis de l'AFSSA sur la véracité des allégations mentionnées ci-dessus.

## **Auto-saisine**

Par ailleurs, le Comité d'experts spécialisé « Nutrition humaine » de l'Afssa s'est auto-saisi sur le risque pour la santé que pourrait présenter pour les nourrissons et les enfants, la consommation de préparations infantiles à base de protéines de soja ou de jus de soja (tonyu) du fait de leur composition en phyto-estrogènes.

## **Analyse de la mission et méthodologie de travail du Groupe « phyto-estrogènes »**

Un groupe de travail a été mis en place pour répondre à l'ensemble de ces questions.

D'un point de vue réglementaire, les aliments et les compléments alimentaires contenant des phyto-estrogènes relèvent de la réglementation générale des denrées alimentaires. Toutefois, les compléments contenant ces substances occupent une position frontière entre aliment et médicament (i) par la perception probable qu'en ont une partie des consommateurs, (ii) par des effets à la limite du préventif et du thérapeutique, et (iii) par la prescription qu'en font certains thérapeutes. En conséquence, l'Afssaps a été étroitement associée à la réflexion.

L'analyse de la saisine et de l'auto-saisine par le groupe de travail a conduit à l'identification des points suivants pour évaluer la sécurité et le bénéfice des phyto-estrogènes.

Tout d'abord, il est apparu nécessaire de définir la notion de phyto-estrogènes en se référant aux travaux internationaux menés dans le domaine, puis d'identifier les molécules répondant à ces critères. Les critères retenus, les molécules et leurs sources végétales répondant à ces critères, sont listés dans le chapitre « répertoire des phyto-estrogènes ». Les techniques d'analyse sont exposées et évaluées dans le chapitre suivant.

L'analyse de la situation en termes de sécurité et de bénéfice pour la santé nécessite de se référer aux apports en phyto-estrogènes observés dans la population. Dans le chapitre « estimation des apports », une table de composition en phyto-estrogènes des aliments consommés en France a donc été initiée. Couplée à l'enquête INCA 1, elle a ensuite permis d'estimer les apports dans la population française. Ces données ont enfin été comparées aux apports dans d'autres populations, notamment les populations asiatiques.

La biodisponibilité et la sécurité des phyto-estrogènes ont ensuite été analysées. La biodisponibilité doit être prise en considération tant du point de vue de la démonstration d'un effet bénéfique sur l'organisme, que de celui de leur innocuité. Quant au chapitre « sécurité », son objectif a été l'analyse des études cherchant à mettre en évidence un effet toxique sur l'organisme, afin de pouvoir proposer une limite d'apport maximale journalière en ces substances.

Avant d'aborder les effets des phyto-estrogènes sur l'organisme, leurs mécanismes d'action ont été revus. Leurs effets génomiques et non génomiques sont décrits.

Enfin, les différents effets de ces substances chez l'Homme ont été analysés : effets sur le nourrisson, effets sur la thyroïde, sur l'immunité, effets hormonaux (dont les effets sur les troubles liés à la ménopause), effets sur l'ostéoporose, sur le système nerveux central et les fonctions cérébrales et cognitives, sur les cancers, et enfin sur les maladies cardiovasculaires. Pour les chapitres consacrés aux effets des phyto-estrogènes, le plan situe toujours la problématique de l'état ou de la pathologie, avant de s'intéresser aux effets eux-mêmes.

Les différents chapitres font parfois référence les uns aux autres pour dresser avec un minimum de répétitions une image de la situation. Des points clés et des recommandations pour la recherche, pour la santé publique, et pour l'information du consommateur, sont donnés à la fin de chaque chapitre.

Il faut noter que la présence majoritaire des isoflavones sur le marché des phyto-estrogènes et le fait que la bibliographie scientifique sur l'ensemble des sujets traités concerne essentiellement ces molécules, ont conduit à documenter les effets des isoflavones de façon plus complète que les effets des autres phyto-estrogènes répertoriés.

Enfin, en l'absence d'études complètes conduites par un laboratoire, comme cela peut être le cas dans le domaine du médicament, et regroupant l'ensemble des données scientifiques justifiant l'innocuité et l'intérêt pour la santé des phyto-estrogènes, le groupe de travail a procédé à une analyse de la littérature scientifique disponible complétée par l'audition d'experts extérieurs au groupe de travail et de syndicats des industries de l'agro-alimentaires et d'industriels du secteur (la liste des auditions est présentée ci-dessous). Cette absence d'étude complète a pour conséquence certaines limites dans les conclusions, certains points non documentés notamment par la littérature scientifique restant obscurs.

#### **Experts extérieurs au groupe de travail auditionnés**

- Pr. Ian ROWLAND, Northern Ireland Centre for food and health, University of Ulster, Royaume-Uni
- Dr. Jacques AUGER, Hôpital Cochin, Paris, France
- Dr. Bérangère ARNAL-SCHNEBELEN, Bordeaux, France

#### **Liste des syndicats et industries de l'agro-alimentaires auditionnés**

- Alliance 7 pour les Aliments de l'enfance et de la Diététique
- Sojaxa
- SYNADIET
- Archer Daniels Midland Company
- Arkopharma
- Nutrition et santé
- Tournay technologie
- Triballat Noyal





# Méthodologie générale pour la sélection des articles scientifiques

---

La caractéristique principale de la méthodologie de sélection des études suivie dans le rapport a été la référence quasi-systématique aux articles originaux et non aux revues de données. Certains articles communément cités par les revues scientifiques ou les industriels du secteur n'ont pas été retenus et les raisons de leur rejet sur le plan méthodologique sont expliquées le cas échéant.

Les critères de sélection communs aux études épidémiologiques et cliniques analysées dans le rapport sont décrits ci-dessous. Par ailleurs, une méthodologie d'analyse de la bibliographie est décrite au cours des différents chapitres, lorsqu'il existe des aspects spécifiques à chaque effet et notamment pour les modèles expérimentaux *in vivo* et *in vitro*.

## II- Les études épidémiologiques

### II-1 Les différents types d'études

Il existe différents types d'études épidémiologiques. Succinctement, on distingue l'épidémiologie descriptive qui vise à connaître l'état de santé ou de maladie d'une population, de l'épidémiologie analytique qui recherche des causes de la maladie (Sasco et Riboli).

**Les études analytiques** incluent :

- les études transversales ou de corrélation écologiques.  
Elles se caractérisent par la détermination simultanée à la fois de l'exposition et de la maladie, il y a perte préjudiciable de la séquence temporelle.
- Les études cas témoin.  
Elles utilisent comme point de départ le statut des personnes ayant développé la maladie à étudier : ce sont les cas. Ils vont être comparés à des témoins, qui sont des sujets n'ayant pas développé la maladie. Dans le domaine spécifique de l'évaluation de l'association entre alimentation et cancer, ces études ont apporté des informations solides au cours des années passées même si aujourd'hui la complexité des questions posées et la valeur parfois réduite du risque attendu favorisent l'approche prospective.
- Les études prospectives de cohorte.  
Les études prospectives de cohorte présentent l'avantage sur les études cas témoins d'évaluer l'exposition avant l'apparition de la maladie, évitant le biais de mémoire et respectant le délai nécessaire à l'apparition de la maladie. En revanche, l'absence de randomisation introduit un biais dans ce type d'étude.

**Les études d'intervention** : ce sont des études quasi-expérimentales. A partir d'une population d'étude, le tirage au sort permet de constituer deux groupes comparables dont l'un sera exposé et l'autre pas. Les sujets sont ensuite suivis de façon prospective dans le temps afin de savoir qui va ou ne va pas développer la pathologie qui est l'objet de l'étude. Une difficulté apparaît dans la conduite de ces études chez l'Homme, en particulier en ce qui concerne l'étude des cancers : c'est l'absence de marqueurs de risque conservant leurs pertinence aux différents stades de la cancérogenèse.

### II- 2 Critères d'appréciation des résultats des études épidémiologiques

La revue des études épidémiologiques peut-être un outil aussi performant que les méta-analyses si elle est réalisée dans des conditions rigoureuses. C'est ce qui a été fait par divers groupes de travail, dont les conclusions sont reconnues et validées (COMA, 1998, CNERNA, 1996, World Cancer Research Fund 1997, White Book 2000). Ces conclusions conduisent à répondre à quatre des critères de Hill (1965) et permettent d'évaluer l'existence d'une relation de cause à effet, notamment entre un cancer et un facteur de risque. Ces critères sont les suivants :

- constance de l'association (= résultats comparables dans une grande majorité des études réalisées)
- force de l'association (= valeur de risque relatif)
- relation dose à effet (test de tendance)
- temporalité (existe-t-il un temps suffisant entre l'exposition et l'incidence du cancer ?)
- plausibilité biologique (existence d'une hypothèse mécanistique satisfaisante)
- études expérimentales (dont les résultats sont en accord avec les observations humaines).

Répondre aux critères de Hill permet d'évaluer le niveau de certitude de la relation entre un cancer et un facteur considéré. On dira que :

- la relation est convaincante si la majorité des critères sont remplis avec notamment une quasi-totalité d'études montrant des résultats comparables, et on peut émettre une recommandation de santé publique.
- la relation est dite probable si quelques études sont négatives mais la plupart des autres critères sont remplis, on peut aussi émettre une recommandation de santé publique.
- la relation est seulement possible si seulement quelques critères sont remplis (ex: 50 % des études dont la majorité avec dose-effet, + plausibilité biologique...).
- pas de relation si la majorité des critères sont absents.
- le niveau de preuves est dit insuffisant quand il existe trop peu d'études.

Les critères de sélection des études d'épidémiologie analytiques, utilisés dans des groupes de travail précédents (The White book 2000, Gerber 2001, Gerber 2002) ont été les suivants :

- Effectif de l'échantillon : le chiffre retenu dépend du type d'étude, cas-témoins ou cohorte, de la mesure de l'exposition, (questionnaire ou biomarqueur,) et de la fréquence du cancer considéré. Par exemple, pour le cancer du sein, avec une mesure de l'exposition par questionnaire, 50 à 100 cas dans une étude de cohorte seront jugés recevables (biomarqueurs et questionnaire, respectivement) alors que 500 cas et 500 témoins, seront requis pour une étude cas-témoin par questionnaire et une centaine de cas et de témoins, par biomarqueurs. Pour des cancers moins fréquents, des chiffres plus faibles sont acceptés dans les études cas-témoins.
- Qualité du questionnaire : il devrait comporter une évaluation complète de l'apport alimentaire de façon à pouvoir rechercher l'indépendance des variables considérées. D'une façon générale, on considère qu'un questionnaire alimentaire de fréquence de consommation doit comporter au moins une centaine de questions. Ce questionnaire doit être validé par des méthodes de référence. Il faut noter que ces critères ont été rarement atteints dans le cas des phyto-estrogènes.
- Analyse statistique : L'analyse du risque relatif (HR) dans les cohortes ou du risque relatif estimé (OR) dans les études cas-témoins doit être accompagnée des intervalles de confiance à 95% (IC), et si possible d'un test de tendance. Les ajustements sur les facteurs de confusion établis (ex : risque classiques du cancer du sein) ou sur l'apport calorique doivent être réalisés. L'analyse porte sur les aliments ou groupe d'aliments présentant des similarités de composition, ou spécifiquement sur les microconstituants. Dans ce dernier cas la qualité de la base de données concernant la composition des aliments est déterminante. Dans le cas des phyto-estrogènes, les tables de composition incluant des données analytiques sont rares et le plus souvent incomplètes.

### III- Les études cliniques et les essais thérapeutiques

**Les études cliniques** ressemblent par leur méthodologie aux études d'interventions, mais (i) portent sur des effectifs plus limités (inférieurs à 50 en général), (ii) explorent un plus grand nombre de critères de jugement.

**Les essais thérapeutiques** : ils sont suivis pour démontrer l'effet d'un traitement thérapeutique et sont structurés selon les règles principales énumérées ci-dessous :

- définition claire des populations à traiter ;
- étude comparative – randomisée dans l'extrême majorité des cas en groupes parallèles afin de prendre en compte les aléas de l'évolution spontanée des symptômes ;
- étude contre placebo afin de minimiser la subjectivité de l'évaluation des patientes et des investigateurs ;
- définition *a priori* du nombre de sujets à inclure (en fonction des risques et de la différence attendue) ;
- qualité de la randomisation de la réalisation du suivi ; respect des bonnes pratiques cliniques ; très faible nombre de perdus de vue afin de permettre l'interprétation des résultats ;
- analyse statistique portant sur la différence concernant le critère principal d'évaluation antérieurement défini, réalisée à la fin prévue de l'essai, pour tous les patients inclus ; la différence est significative si  $p < 0,05$ , lorsqu'une seule analyse est faite (en cas d'analyses multiples le  $p$  devra être ajusté) ;
- interprétation clinique de la différence observée (bénéfice thérapeutique) si la différence est statistiquement significative.

---

#### Références bibliographiques

- COMA. (1998) Nutritional aspects of the development of cancer. Report of the Working Group on Diet and Cancer of the Committee on Medical Aspect of Food and Nutrition Policy . The Stationary Office UK.
- Gerber, M. (2001) [Protective vegetal micronutrients and microcomponents for breast cancer]. Bull Cancer, 88, pp.943-53.
- Gerber, M., Boutron-Ruault, M.C., Hercberg, S., Riboli, E., et al. (2002) [Food and cancer: state of the art about the protective effect of fruits and vegetables]. Bull Cancer, 89, pp.293-312.
- Hill, A.B. (1965) The Environment and Disease: Association or Causation? Proc R Soc Med, 58, pp.295-300.
- Sasco, A., Riboli, E. (1996) Introduction aux méthodes d'épidémiologie nutritionnelle. IN: Riboli, E., DEcloitre, F.Collet-Ribbing, C. ed. Alimentation et cancer. Paris, Tec et Doc. 81-97.
- White Book, x. (2000) The antioxidants in tomatoes and tomato products and their health benefits. European Network FAIR CT 97 32 33. Avignon, Amiton.
- World Cancer Research Fund (1997) Food, nutrition, and the prevention of cancer: a global perspective



# Répertoire des phyto-estrogènes

Anne-Marie Mariotte

L'objectif de ce chapitre est d'apporter une réponse à la première étape de la saisine, soit l'identification des phyto-estrogènes de l'alimentation (y compris les compléments alimentaires) et des plantes qui en sont source. La notion de phyto-estrogène s'inscrit dans une double définition structurale et fonctionnelle. Dans le contexte de la saisine, notre approche est toutefois fonctionnelle avant d'être structurale. Une telle recherche doit tenir compte à la fois des molécules « phares » proposées actuellement au consommateur, essentiellement dans les compléments alimentaires, mais aussi des plantes traditionnellement réputées pour cet effet. Enfin, les molécules et les plantes qui émergent dans la littérature scientifique et qui pourraient ainsi faire l'objet de commercialisations prochaines ont également été recherchées. Dans les dix dernières années, plus de 300 substances naturelles et 600 plantes ont été décrites comme se liant aux récepteurs des estrogènes. Notre démarche a inclus une étape de recensement suivie d'une étape de sélection des molécules et des plantes, fondée sur la démonstration de leur activité estrogénique. Ce recensement prend une dimension spécifique dans le domaine des plantes, car la réputation (emploi traditionnel) de leur effet est un déterminant essentiel, qui prend place avec les éléments démonstratifs (au sens expérimental) dans l'évaluation de ces produits (Agence Française de sécurité sanitaire 2003). La mémoire de cette réputation doit donc être conservée. Toutefois, les phyto-estrogènes échappent souvent à cette notion d'usage historique car les plantes et molécules auxquelles la littérature associe aujourd'hui un potentiel effet de type estrogène, sont essentiellement issues d'analyses de screening *in vitro* menées en réponse à l'intérêt soudain et grandissant pour cette classe de composés.

De façon générale, la démarche d'évaluation suivie dans ce rapport est avant tout fondée sur la démonstration expérimentale des effets. Pour cela, des critères de sélection à la fois cohérents avec les approches internationales en cours et la spécificité de l'évaluation requise, ont été établis et utilisés. Le contexte de la saisine est celui de la santé publique et conduit donc à une approche dirigée sur les effets observés chez l'Homme. Toutefois, les critères de sélection des phyto-estrogènes élaborés par les diverses instances scientifiques sont nécessairement relatifs à la toxicité de ces produits et il ne serait donc pas éthique de démontrer leur activité chez l'Homme. Le principe essentiel de ces critères réside donc dans la démonstration d'un effet *in vivo*. Bien que non suffisante, la démonstration d'un effet *in vitro* est également considérée, lorsque les doses utilisées sont cohérentes avec les taux circulants de ces substances. Enfin, la constitution de ce répertoire n'exclut pas que des molécules et des plantes non retenues ici puissent avoir des propriétés estrogéniques mais dans l'état actuel de la littérature, il n'existe pas de données expérimentales satisfaisant à nos critères. La démonstration de leurs propriétés estrogéniques reste donc à faire par les industriels qui souhaiteraient les mettre sur le marché.

## I - Notions structurales

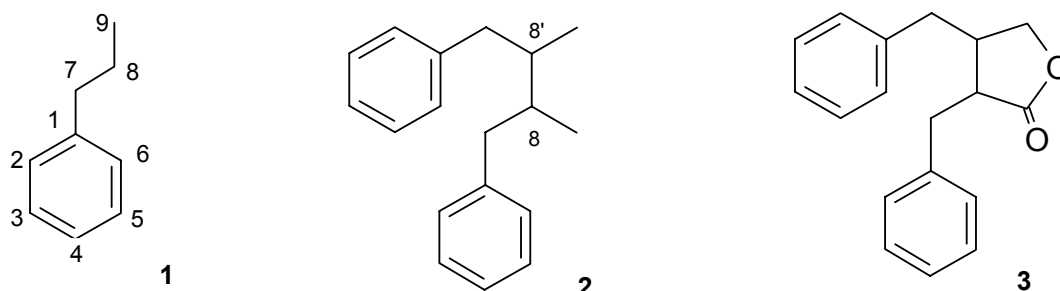
De façon générale les phyto-estrogènes décrits dans la littérature présentent une similitude structurale plus ou moins grande avec l'estradiol. Ils appartiennent aux classes des isoflavonoïdes, des coumestanes, des flavonoïdes, des stilbénes, des lignanes ou entérolignanes, et l'ensemble de ces substances fait partie du vaste ensemble des polyphénols. Toutes ces substances possèdent un ou plusieurs cycles aromatiques, porteur d'au moins un groupe hydroxyle libre ou engagé dans une autre fonction éther, ester, hétéroside. Enfin elles ne contiennent jamais d'atomes d'azote. Bruneton (1999) estime que pour mieux cerner les limites du groupe, il faut faire intervenir un critère biosynthétique<sup>1</sup>. La voie la plus courante est celle du shikimate. Elle conduit aux acides cinnamiques, acides benzoïques, lignanes, coumarines, etc. L'autre voie part de l'acétate et conduit à des composés tels que chromones, isocoumarines, quinones, orcinol, etc. Enfin une voie mixte shikimate et acétate,

<sup>1</sup> Critère biosynthétique : voies de synthèse dans les produits biologiques

permet l'élaboration des flavonoïdes, des isoflavonoïdes, des stilbènes, etc... Nous constatons que pour l'essentiel, les phyto-estrogènes proviennent d'une origine mixte acétate et shikimate.

**Les lignanes** suivent un schéma biosynthétique issu de la seule voie du shikimate. Ils sont formés par la condensation d'unités phényl propaniques (**1**). Les plus simples sont des dibenzyl butanes avec une liaison 8-8' (**2**) tels que entérodiol et sécoisolaricirésinol qui peuvent par cyclisation engendrer des butyro lactones (**3**) comme l'entérolactone et le matairesinol.

#### Structure de base des lignanes



**Les stilbènes** peuvent être libres ou glycosylés, ils sont aussi appelés stilbènoïdes pour souligner leur parenté biologique avec les flavonoïdes. Ils possèdent deux cycles benzéniques reliés par un pont éthène (**4**) ou éthane (**5**).

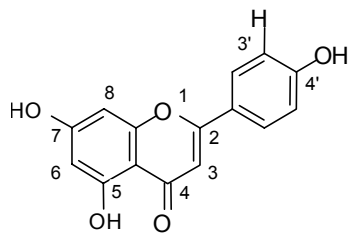
#### Structure de base des stilbènes



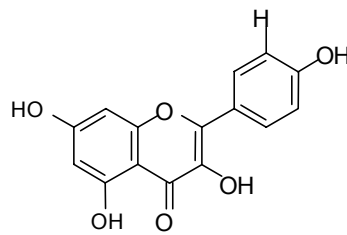
**Les flavonoïdes** possèdent une structure de base de 2-phénylchromane, alors que les isoflavonoïdes dérivent d'une structure de 3-phénylchromane.

A l'intérieur de ces deux groupes, des classes différentes apparaissent selon le degré d'oxydation du noyau pyranique. On retrouvera des phyto-estrogènes dans les classes des flavanones, des chalcones (figure 1), ainsi que dans celles des isoflavones, isoflavanes, et des coumestanes (figure 2).

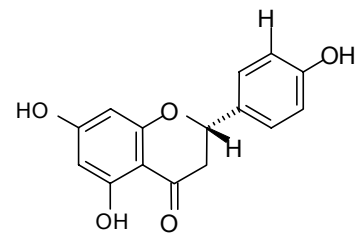
**Figure 1 : Les différentes classes de flavonoïdes (Bruneton 1999)**



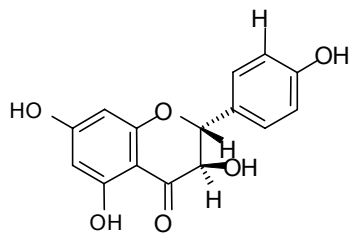
Flavone  
Apigénine



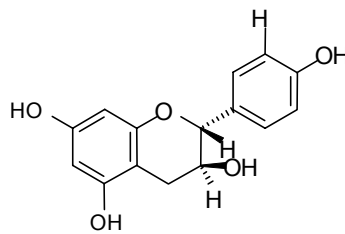
Flavonol  
Kaempférol



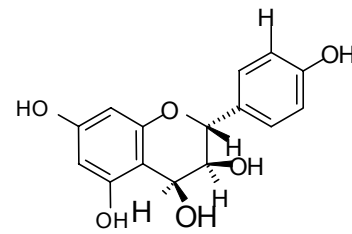
Flavanone  
Naringénine



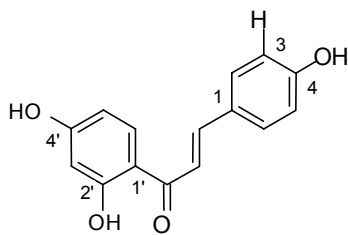
Dihydroflavanol  
Dihydrokaempférol



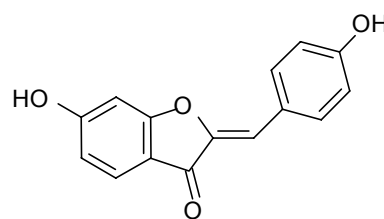
Flavan-3-ol  
Afzéléchol



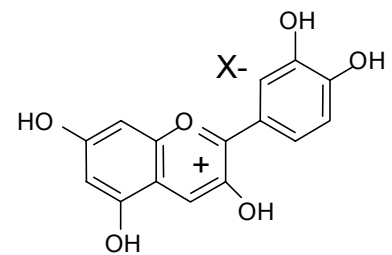
Flavan-3,4-diols  
Leucopélargonidol



Chalcone  
Isoliquiritigénine

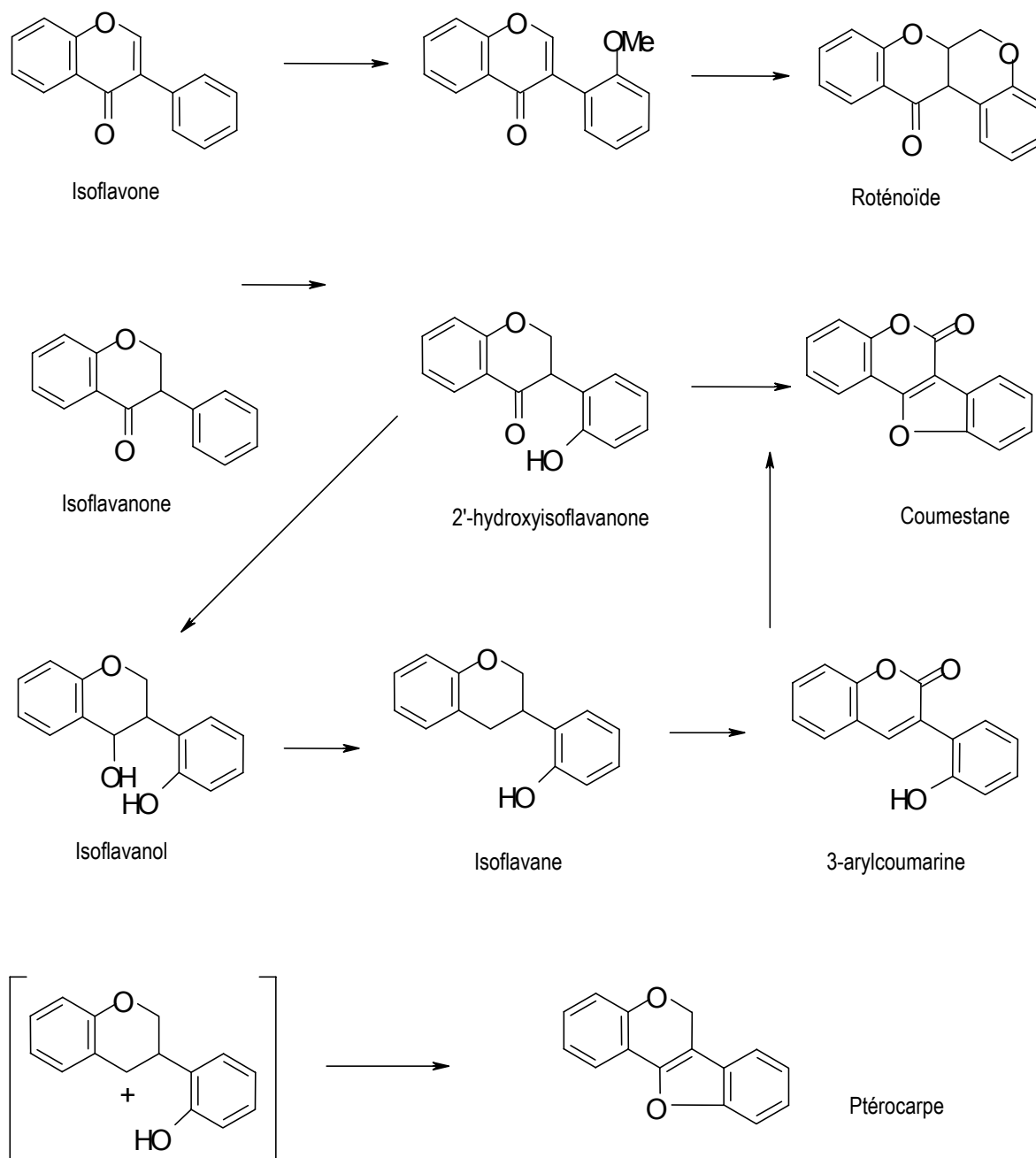


Aurone  
Hispidol



Anthocyanidol  
Cyanidol

Figure 2 : Les différentes classes d'isoflavonoïdes (Bruneton 1999)



## II- Situation des phyto-estrogènes parmi les estrogènes apportés par l'alimentation.

Diverses catégories de substances ayant un pouvoir estrogénique peuvent être absorbées *via* l'alimentation. Cos (2003) regroupe ainsi sous le vocable « estrogènes de l'alimentation » les produits naturels (stéroïdes ovariens, phyto-estrogènes et myco-estrogènes) et les contaminants de synthèse (estrogènes médicaments et xénostrogène ; DDT, PCB). Dans le contexte de la saignée, l'objet de la présente évaluation est restreinte aux produits naturels qui ne sont pas des contaminants (naturels ou de synthèse), ce qui exclut les stéroïdes ovariens, les myco-estrogènes et les contaminants de synthèse. Enfin il n'est pas exclu que d'autres phytoconstituants puissent mimer l'action de stéroïdes autres que les estrogènes, comme la progestérone, les minéralocorticoïdes, et les glucocorticoïdes.



### III - Critères de sélection d'une molécule ou d'une plante pour ses propriétés estrogéniques

Pour établir ce répertoire, nous avons adopté les critères de sélection suivants.

Les phyto-estrogènes sont des substances présentes naturellement dans les plantes ou issues du métabolisme dans l'organisme d'un précurseur végétal. Ces substances présentent une activité estrogénique démontrée *in vivo* (utéroprolifération, cornification vaginale), selon les tests retenus par l'OCDE (OCDE, 2002 ; annexe 1), et *in vitro* dans la condition suivante : les doses auxquelles des effets comparables à ceux de l'estradiol sont observés lors des tests *in vitro* doivent être de l'ordre des taux circulants de phyto-estrogènes observés lors des apports alimentaires traditionnels (voir chapitre « biodisponibilité »). L'échelle suivante est ainsi appliquée :

1. les modèles *in vitro* utilisant des concentrations de l'ordre de 1000 fois plus fortes que celles de l'estradiol sont acceptables.
2. en revanche, quand les molécules sont utilisées à des concentrations d'un ordre de grandeur 10 000 fois plus fortes, les modèles expérimentaux sont exclus car les conditions ne sont alors plus physiologiques.

Selon les tissus ou les cellules considérées, les phyto-estrogènes peuvent aussi présenter un effet anti-estrogénique et/ou une activité indépendante du récepteur des estrogènes, induisant des effets génomiques et non génomiques (voir chapitre « Mécanisme »).

On considère dans ce rapport les composés répondant à cette définition présents dans les aliments, ceux éventuellement issus des plantes de la pharmacopée européenne et d'autres plantes dont la littérature scientifique permet de conclure que leurs propriétés répondent à cette définition.

### IV – Méthodologie

Les données bibliographiques retenues pour l'élaboration de ce chapitre proviennent de l'analyse de banques de données : Index Medicus (Pub.Med <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi>) SciFinder Scholar 2004 (CAS American Chemical Society ). A partir des articles de revues, des thèses, une recherche orientée vers les plantes et les molécules a été faite. Il est important de souligner qu'à ce stade, de très nombreux travaux font état d'un effet *in vitro* agoniste des récepteurs estrogéniques alors que les effets *in vivo* (utéroprolifération, cornification vaginale ) sont peu recherchés, ou /et négatifs.

### V - Répertoire des molécules et des plantes possédant un effet estrogénique

Le répertoire constitué au sens de la définition et des critères de sélection ci-dessus, est présenté en 2 tableaux listant respectivement :

- les molécules possédant un effet estrogénique au sens de la définition et des critères de sélection ci-dessus (tableau 1).
- les plantes :
  - o dont un (des) extrait (s) particulier (s) possèdent un effet estrogénique au sens des critères de sélection ci-dessus (tableau 2 a).
  - o qui bénéficient d'un usage traditionnel pour des propriétés estrogéniques ou fréquemment citées dans la littérature pour cet effet mais qui n'ont pas démontré cet effet par les tests retenus selon nos critères (tableau 2 b).

Les effets estrogéniques (agoniste, antagoniste, autre) rapportés pour ces molécules ou ces plantes sont également indiqués dans ces tableaux. Enfin, un dernier tableau récapitule l'origine végétale des molécules retenues.

#### V – 1 Répertoire des molécules possédant une activité estrogénique

En application de la saisine et des critères de sélection établis, certaines molécules communément classées dans les phyto-estrogènes ou actuellement discutées pour cette propriété ne sont pas retenues dans ce répertoire, c'est le cas de certains terpènes et de quinones. Ainsi, parmi les terpènes, les stérols (bêta sitostérol ), les alcools triterpéniques (bétuline), les acides triterpéniques (acide glycyrrhétinique), les hétérosides triterpéniques du type des ginsénosides, et parmi les quinones, les hydroxy-anthraquinones (émodyne) ne

sont pas répertoriés, car ils n'ont pas fait la preuve d'une activité estrogénique *in vivo*. Nous avons également éliminé de notre répertoire l'apigénine (flavone), la liquiritigénine (flavanone), des chalcones (xanthohumol, licochalcone, isoliquiritigénine), et le glabrene (isoflavène) qui, à notre connaissance, n'ont pas non plus démontré leurs propriétés estrogéniques *in vivo* au sens où nous l'avons défini.

- **Dans la classe des isoflavonoïdes :**

Les isoflavones (daïdzéine et génistéine) sont les composés les plus étudiés. Leurs structures sont proches de celle de l'estradiol, un système plan qui inclut un noyau aromatique substitué en para, par un hydroxyle situé à 12Å d'un autre hydroxyle. Les isoflavones peuvent exister sous forme d'aglycones, mais le plus souvent dans les plantes elles se présentent à l'état de glycosides. Dans le tractus gastro-intestinal, la daïdzéine est métabolisée en dihydrodaïdzéine puis en équol, métabolite hautement estrogénique. Le O-déméthyl angolensine (ODMA) est un autre métabolite de la daïdzéine. Quant à elle, la génistéine est métabolisée en dihydrogénistéine, puis en 6'-hydroxy O-déméthyl angolensine, pour donner le p-éthyl phénol et le tri hydroxy-benzène.

La génistéine a une plus grande affinité pour les récepteurs estrogéniques  $\beta$  que la daïdzéine ( $IC_{50}$  0,018 $\mu$ M versus  $IC_{50}$  1,2 $\mu$ M), la biochanine A ( $IC_{50}$  4,1 $\mu$ M) et la formononétine ( $IC_{50}$  60 $\mu$ M). Pour mémoire, l'affinité du 17  $\beta$ - estradiol mesuré par l' $IC_{50}$  est de 0,0024 $\mu$ M. La génistéine est la seule à présenter des effets non génomiques (inhibiteur des protéine kinases et des topo-isomérases).

Dans la classe des isoflavanes (qui ne diffèrent des isoflavones que par le degré d'oxydation et de saturation du cycle central), il faut noter la glabridine, qui est un constituant de différentes espèces de réglisse et qui répond aux critères que nous avons retenus. L'effet utéro-trophique sur le rat à la dose de 200  $\mu$ g/animal est le même que celui du 17  $\beta$ -estradiol administré à raison de 5 $\mu$ g/animal.

- **Dans la classe des flavanones :**

C'est surtout la 8-prenyl-naringénine (présente dans le houblon et la bière) qui est étudiée. A la dose de 30mg/Kg poids corporel chez le rat pendant 14 jours, l'augmentation de l'utérus est la même que celle obtenue avec 0.01mg/Kg d'estradiol.

Dans cette classe, il faut également citer la naringénine, qui est parfois citée dans la littérature mais qui n'est pas retenue dans ce répertoire puisque son effet n'est pas actuellement démontré selon nos critères.

- **Dans la classe des coumestanes :**

Cette classe de composés polyphénoliques bien que proche des coumarines, est rattachée sur le plan biosynthétique aux isoflavonoïdes. Souvent dans les plantes, les coumestanes sont des phyto-alexines qui apparaissent lors d'une attaque fongique ou bactérienne. Ils sont moins communs que les isoflavonoïdes. Le coumestrol et le 4-méthoxycoumestrol se lient aux récepteurs des estrogènes et montrent une activité utéro-trophique.

En outre, le coumestrol est le plus actif des phyto-estrogènes : si l'activité utéro-trophique de l'estradiol chez la souris est de 100, celle du coumestrol est de 0.16, et celle de la génistéine 0.005 (Ibarreta 2001).

- **Dans la classe des lignanes :**

Les entérolignanes dérivent du métabolisme des lignanes sous l'effet de la flore intestinale de l'organisme. Les entérolignanes peuvent exister sous forme d'oligomères et de dimères, en tant qu'aglycones ou hétérosides. Les lignanes les plus connus sont le séco-isolarici-résinol et le mataïrésinol. Ils sont métabolisés par la flore intestinale en entérodiol et entérolactone qui eux seuls répondent à la définition des phyto-estrogènes. Ainsi, les essais portant sur l'activité estrogénique sont-ils faits après métabolisation des lignanes. On peut également noter que d'autres précurseurs d'entéro-lactones ont été identifiés (voir tableau 3).

- **Dans la classe des stilbènes :**

La source la plus importante est le *trans* resvératrol que l'on retrouve dans la peau de raisin et dans le vin. Certains auteurs, tel Gehm (1997), le présentent comme agoniste des récepteurs estrogéniques, d'autres, comme Turner (1999), le considèrent plutôt comme un antagoniste. Enfin, Bower (2000) rapporte à la fois un effet agoniste et antagoniste. *In vitro*, son effet est 7000 fois plus faible que celui de l'estradiol. Toutefois, cette molécule n'est pas incluse dans notre répertoire car elle n'a pas d'effet utéro-trophique (Turner 1999).

Le répertoire des molécules retenues pour leur effet estrogénique selon notre analyse est présenté dans le tableau 1.

## **V – 2 Répertoire des plantes possédant une activité estrogénique**

De très nombreuses plantes sont citées pour un effet estrogénique. Dès 1954, Bradbury et White détectent l'activité estrogénique de 53 plantes. En 1975 plus de 300 plantes sont décrites par Farnsworth. En réalité, l'intérêt pour les plantes dites estrogéniques n'a fait qu'augmenter et ce sont aujourd'hui plus de 600 plantes qui sont répertoriées. De ce nombre, seules quelques dizaines contiennent suffisamment de phyto-estrogènes biodisponibles. C'est surtout dans l'alimentation qu'on les retrouve, dans les fruits, les légumes, les graines, les épices (voir chapitre « Estimation des apports»). On répertorie également des plantes non alimentaires, traditionnellement ou nouvellement utilisées pour une activité estrogénique.

Les plantes ayant fait la démonstration de leurs propriétés estrogéniques selon les critères établis ci-dessus sont le soja (graines), le trèfle (feuilles), la luzerne (feuilles), le houblon (cônes), le kudzu (*Pueraria lobata*) (feuilles et racine), la réglisse (racine), le lin (graine) et le fenouil (fruits). Ces plantes sont répertoriées dans le tableau 2a, ce sont celles que nous retenons dans ce répertoire. Toutefois, il convient ici de souligner que l'attribution de propriétés à une plante s'accompagne toujours de plusieurs restrictions, récemment développées dans un rapport de l'AFSSA (Agence Française de sécurité sanitaire 2003). Brièvement, les propriétés d'une plante ne sont généralement attribuables qu'à certaines espèces, certains organes, et certains extraits de la plante considérée. Dans ces conditions, l'attribution d'une activité estrogénique aux plantes listées ci-dessus peut uniquement être considérée comme une première étape de screening pour la reconnaissance à un produit fini contenant un extrait particulier de cette plante, d'une propriété estrogénique.

D'autres plantes, souvent citées dans la littérature ou bénéficiant d'une utilisation traditionnelle, appellent les commentaires suivants.

- La sauge officinale (*Salvia officinalis* L.), bien que retrouvée dans tous les répertoires de plantes à phyto-estrogènes, n'a pas fait preuve de son activité.
- Des plantes asiatiques telles que la racine d'angélique chinoise (*Angelica sinensis* Oliv.), les *Polygonum multiflorum* Thunb. et *P. cuspidatum* Sieb. Zucc., le ginseng.
- *Panax ginseng* CA. Meyer devront prouver leur intérêt par des études *in vivo*.
- Le gattilier (*Vitex agnus castus* L.), dont les fruits ont la réputation d'anaphrodisiaque depuis le Moyen-Age, est traditionnellement utilisé pour le traitement du syndrome prémenstruel ; il faut noter que son action serait plutôt du type agoniste des récepteurs de la progestérone et qu'il est souvent classé comme plante possédant une activité de type progestagène.
- Le Cimicifuga (*Actaea racemosa* L. ou *Cimicifuga racemosa* L. Nutt.) : l'extrait hydro-alcoolique de la racine est commercialisé dans différents pays pour le traitement des troubles climériques de la ménopause. Les principaux constituants sont des glycosides triterpéniques de type cycloartane, (actéine, cimicifugoside...) ainsi que des esters d'acides phénols (acide fukinolique, acide cimicifugique...). Les isoflavones, biochanine et formononétine n'ont pas été retrouvées. Les auteurs ne sont pas d'accord sur l'effet estrogénique ou anti-estrogénique du Cimicifuga. Il semblerait que cette plante soit un agoniste partiel des récepteurs de la sérotonine (Burdette 2003). Les nombreux essais cliniques publiés présentent des résultats discordants.

- Enfin le yam ou igname (*Dioscorea villosa*). Cette plante n'est pas à classer dans les phyto-estrogènes ni dans les plantes à effet de type progestérone. La racine de yam, originaire du Mexique, contient de la diosgénine, une saponine stéroïdique qui sert à l'hémisynthèse des corticoïdes stéroïdiens et des oestro-progestatifs. Si par voie chimique la diosgénine peut se transformer en progestérone ou en DHEA (dehydroépiandrostérone) les scientifiques doutent que par voie orale ou locale, elle puisse se transformer en ces deux composés. Par contre elle posséderait un effet anti-oxydant (Araghiniknaam, 1996).

Ces plantes sont répertoriées dans le tableau 2b dans l'attente de la démonstration expérimentale de leurs propriétés estrogéniques. Elles ne sont pas retenues dans notre répertoire.

## V-2 Les molécules estrogéniques et leurs sources (tableau 3)

Les plantes qui contiennent des isoflavones font partie le plus souvent de la famille des Fabacées et plus particulièrement de la sous-famille des Papillonacées. On connaît environ 70 aglycones et 40 glycosides. Ce sont surtout les graines et les fruits secs qui en contiennent. Le soja et ses produits dérivés est le plus employé (voir la table de composition des aliments en isoflavones dans le chapitre « Estimation des apports »). Toutefois, dans les fleurs femelles du houblon, que l'on appelle des cônes, sont présents un grand nombre de polyphénols estrogéniques : isoflavones, chalcones, flavones prénylées. Ces composés sont retrouvés dans la bière. Les isoflavones sont également identifiées dans les graines de la grenade à côté de l'oestrone, qui est également présente dans les noyaux de datte. Enfin, la racine de kudzu (*Pueraria lobata*), originaire du Sud-Est asiatique, est particulièrement riche en puéararine, un C-glucoside de daidzeine.

Les lignanes dont les métabolites (enterolignanes) sont les phyto-estrogènes peuvent se trouver sous une forme libre ou glycosylée. Ils sont présents dans de nombreux fruits, légumes, dans le thé et le café. Ce sont les graines qui constituent la source privilégiée, en particulier la graine de lin et les céréales complètes.

Les principales sources de coumestanes sont les parties aériennes de la luzerne et du trèfle.

Différentes espèces de réglisse contiennent des stilbènes, des chalcones, des flavanones prénylées, des isoflavanes de type glabridine responsables de l'effet estrogénique des extraits de racine. Les saponines triterpéniques comme la glycyrrhizine. Seraient quant à elles responsables d'hypertension par interférence avec le métabolisme du cortisol. Dans les espèces à stilbènes, on classe le raisin et les vins rouges. La rhubarbe, les espèces de *Polygonum* (*multiflorum* et *cuspidatum*) contiennent également dans leurs racines des stilbènes mais aussi des anthraquinones que Matsuda (2001) considère comme un nouveau type de phyto-estrogènes.

De la même façon, Chan (2002) propose que les hétérosides triterpéniques tétracycliques du ginseng soient un nouveau type de phyto-estrogène, ce qui à notre avis n'est pas prouvé *in vivo*.

## Conclusion

Finalement le nombre de molécules et de plantes qui ont fait preuve d'un effet estrogénique selon nos critères est assez limité. Il existe sur le marché des plantes dites estrogéniques qui ne le sont pas selon notre définition. Il est toutefois possible que l'effet annoncé passe par d'autres mécanismes, qui doivent dans ce cas être démontrés. En définitive, le répertoire ici réalisé regroupe les substances végétales ayant démontré leur activité estrogénique *in vivo* selon les tests de l'OCDE. Des plantes ayant fait la démonstration de cette activité selon ces mêmes tests (sous certaines conditions d'extraction) sont également répertoriées. Les chapitres suivants étudient, lorsque les données sont disponibles, le lien entre ces substances (et parfois certaines plantes, notamment le soja) et plusieurs états physiologiques et pathologiques. Il appartient aux industriels qui souhaiteraient utiliser des substances et des extraits de plantes pour lesquels les données ne sont pas disponibles ou sont insuffisantes, de faire la démonstration de leur activité estrogénique et de leurs effets sur l'organisme.

## Points clés et recommandations

### Points clés

- ❖ La notion de phyto-estrogènes qui est retenue dans ce répertoire est avant tout fonctionnelle. L'activité estrogénique doit être démontrée *in vivo* (utéroprolifération et cornification vaginale) et aussi *in vitro* pour des concentrations acceptables (de l'ordre de 1000 fois celles de l'estradiol, et jamais supérieures à 10 000).
- ❖ Les phyto-estrogènes appartiennent à la classe des polyphénols. Les molécules retenues selon nos critères sont des isoflavones, isoflavanes, coumestanes, flavanones, chalcones, stilbènes et entérolignanes (dont les précurseurs sont des lignanes).
- ❖ Le répertoire des plantes retient celles dont un ou des extraits particuliers possèdent un effet estrogénique au sens des critères de sélection définis.
- ❖ Les plantes réputées estrogéniques, qui n'ont pas démontré cet effet sont également citées pour mémoire.
- ❖ Finalement, une vingtaine de molécules ont été retenues ainsi qu'une dizaine de plantes qui en sont une source significative.

### Recommandations

#### 1 - Recommandations à visée de connaissance et de recherche.

- ❖ La démonstration des propriétés estrogéniques *in vitro* doit être confirmée par des tests *in vivo* pour les molécules et les plantes non retenues dans ce rapport :
  - les molécules polyphénoliques de type flavones, flavanones, chalcones...
  - les molécules telles que stilbènes, anthraquinones, terpènes, phytostérols, ...
  - les plantes et extraits traditionnellement réputés pour une activité estrogénique
- ❖ La recherche des mécanismes d'action doit être poursuivie ainsi que l'identification des principes actifs.

#### 2- Recommandations de Santé Publique

- ❖ Les extraits non traditionnels devront faire preuve d'une absence de toxicité.

#### 3- Recommandations à visée d'information du consommateur.

- ❖ Il devra être très clairement indiqué le nom scientifique des plantes, les parties utilisées, et la teneur en phyto-estrogènes, en précisant le type et la forme (glycosylée, aglycone).
- ❖ Une standardisation des extraits permettra au consommateur de comparer les produits entre eux.

### **Légende des tableaux :**

Dans les tableaux 1 et 2 :

*in vitro* + signifie que la molécule ou l'extrait de plante a une affinité pour les récepteurs estrogéniques, prouvée par des tests *in vitro*

*in vivo* + signifie que la molécule ou l'extrait de plante testé chez l'animal induit une augmentation du poids de l'utérus et /ou une cornification du vagin

*in vivo* - signifie que la molécule ou l'extrait de plante testé chez l'animal n'a pas d'effet sur l'utérus ou le vagin.

### **Présentation des figures :**

Page 16, la représentation choisie est celle classiquement utilisée en chimie.

Page 30, la représentation des isoflavones met l'accent sur l'analogie de structure avec le  $17\beta$ -estradiol.

### Tableau 1 : Molécules ayant démontré leur activité estrogénique selon nos critères

Remarque : (i) la classe chimique à laquelle appartient la molécule répondant aux critères de sélection est indiquée en gras ; (ii) certaines des molécules peuvent aussi présenter un effet anti-estrogénique

Molécules	Tests	Effet	Références
<b>Isoflavones</b> Génistéine Daidzeine Glycitéine Biochanine A Formononétine	<i>In vitro</i> + <i>In vivo</i> +	Agoniste ou Antagoniste Selon les doses	Breinholt 1998, Cassidy 1999, Coldham, 2001, Dixon-Shanies 1999, Ibarreta 2001, Kinjo 2004, Le Bail 1998, Liu 2001, Murkies 1998, Whitten 1998, Coldham 2001
<b>Isoflavane</b> Glabridine Equol	<i>In vitro</i> + <i>In vivo</i> +	Agoniste	Tamir 2001, Tamir 2000, Tang 1980
<b>Coumestanes</b> Coumestrol 4' OCH3 coumestrol	<i>In vitro</i> + <i>In vivo</i> +	Agoniste	Cassidy 1999, Ibarreta 2001, Kurzer 1997
<b>Flavanone</b> 8-prényl naringénine	<i>In vitro</i> + <i>In vivo</i> +	Agoniste	Coldham 2001, Kitaoka 1998, Milligan 2000, Myamoto 1998
<b>Chalcone</b> Phlorétine	<i>In vitro</i> + <i>In vivo</i> +	Inhibiteur gonadotrophines	Lerner 1963
<b>Entérolignanes</b> entérodol, entérofurane entérolactone Remarque : les précurseurs de ces entérolignanes sont : le seco-isolaricirésinol, le matairésinol, le laricirésinol , et l'isolaricirésinol	<i>In vitro</i> + <i>In vivo</i> +	Agoniste	Heinonen 2001, Liggins 2000, Meagher 1999, Mellanen 1996, Orcheson 1998, Wang 2002

**Tableau 2a : Plantes ayant démontré leur activité estrogénique selon nos critères**

Plantes	Tests	Effets	Références
Fenouil <i>Foeniculum vulgare</i> Mill	<i>In vivo</i> +	Agoniste	Malini 1995, Albert-Puleo 1980
Houblon <i>Humulus lupulus</i> L.	<i>In vitro</i> + <i>In vivo</i> +	Agoniste	Coldham 2001, Dixon-Shanies 1999, Klein 2003, Lui 2001, Milligan 1999, Milligan 2000, Zava 1998
Kudzu <i>Pueraria lobata</i> L.	<i>In vitro</i> + <i>In vivo</i> +	Agoniste	Boué 2003, Hee-Yun 2003, Xiaou 2002
Lin <i>Linum usitatissimum</i> L.	<i>In vitro</i> + <i>In vivo</i> +	Agoniste	Kurzer 1997, Lampe 2003 ; Orcheson 1998
Luzerne ou Alfafa <i>Medicago sativa</i> L.	<i>In vitro</i> + <i>In vivo</i> +	Agoniste	Kurzer 1997, Liu 2001, Zava 1998
Réglisse <i>Glycyrrhiza glabra</i> L.	<i>In vitro</i> ER+ <i>In vitro</i> PR + <i>In vivo</i> +	Agoniste  Inhibiteur tyrosinase	Hayashi, 2003 ; Liu 2001 , Maggiolini 2002 , Nerya 2003 , Rafi 2000 , Tamir 2001 , Zava 1998
Soja <i>Glycine max</i> L. Merrill	<i>In vitro</i> + <i>In vivo</i> +	Agoniste	Klein 2003 , Zava 1998, Baird 1995
Trèfle <i>Trifolium pratense</i> L.	<i>In vitro</i> + <i>In vivo</i> +	Agoniste	Burdette 2002 , Dornstauder, 2003, Klein 2003 , Liu et al, 2001 ; Milligan 1999 , Zava 1998



**Tableau 2b : Plantes bénéficiant d'un usage historique pour des propriétés estrogéniques ou fréquemment citées dans la littérature pour cet effet mais n'ayant pas démontré leur activité estrogénique selon nos critères**

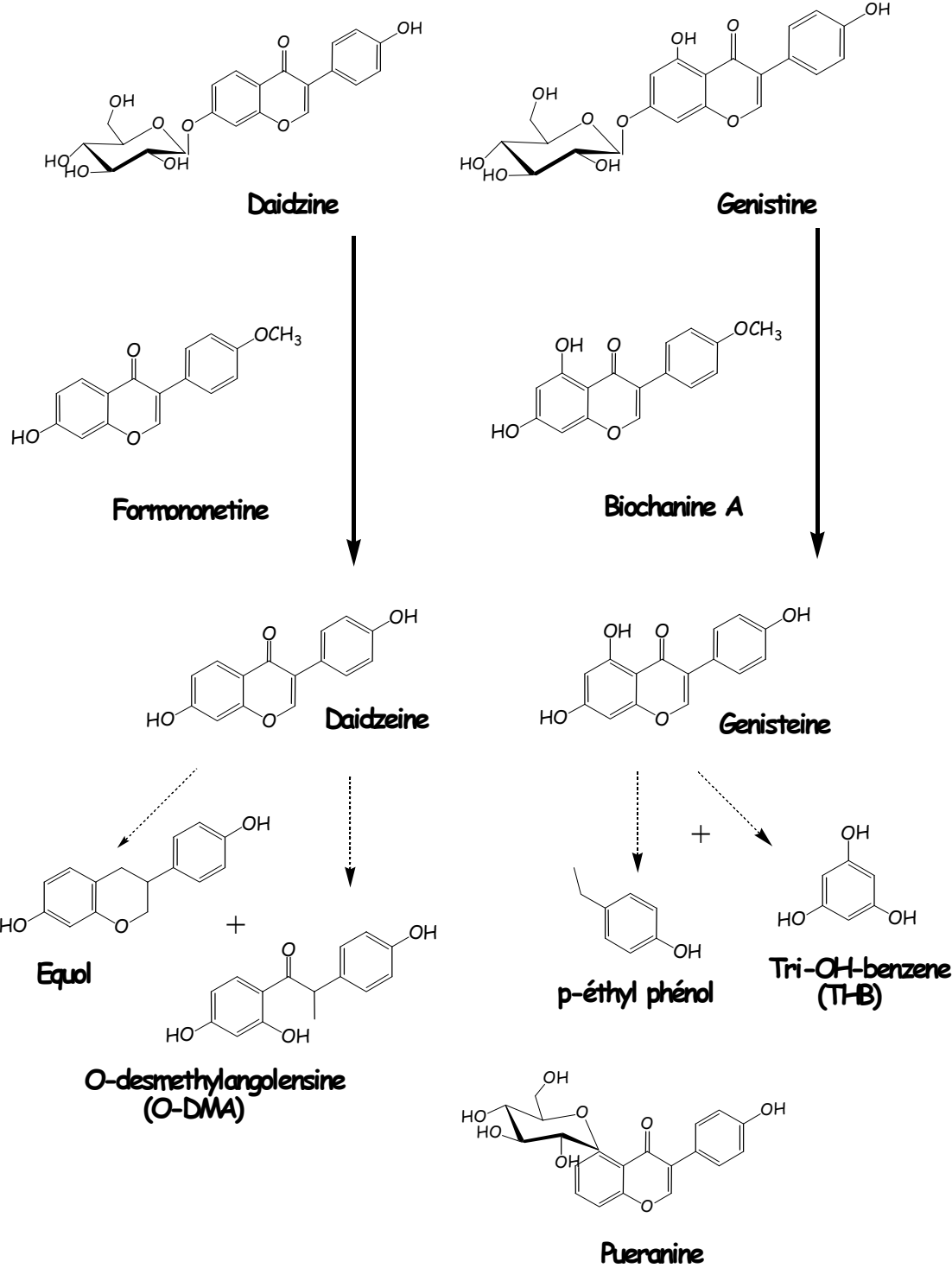
Remarque : certaines des plantes peuvent présenter un effet anti-estrogénique

Angélique <i>Angelica sinensis</i> Oliv.	<i>In vitro</i> +	?	Dixon-Shanies 1999 , Liu 2001, Milligan 1999, Zava 1998
Cimicifuga <i>Cimicifuga racemosa</i> L.Nutt ou <i>Actea racemosa</i> L.	<i>In vitro</i> -  <i>In vivo</i> -	Non Estrogénique SERM ? Antioestrogénique ? Antagoniste sérotonine	Burdette 2003, Jarry 2003 ; Klein 2003, Liu 2001, Wuttke, 2003 ; Zava 1998
Gattilier <i>Vitex agnus castus</i> L.	<i>In vitro</i> - <i>In vitro</i> +	?	Jarry 200 b, Klein 2003, Liu 2001
Ginseng <i>Panax ginseng</i> CA Meyer	Ginsenosides  <i>In vitro</i> + <i>In vivo</i> +/-	?	Chan 2002 , Lee 2003, Punnonen 1980
<i>Polygonum multiflorum</i> Thunb <i>Polygonum cuspidatum</i> Sieb.Zucc.	<i>In vitro</i> +	?	Cornwell 2004, Klein 2003
Sauge officinale <i>Salvia officinalis</i> L. Sauge d'Espagne <i>Salvia lavandulaefolia</i> Vahl.	<i>In vitro</i> +/-	Agoniste Non prouvé  Antagoniste dopamine	De Leo 1998, Perrey 2001 , Perry 2001

**Tableau 3 : Les molécules estrogéniques et leurs sources**

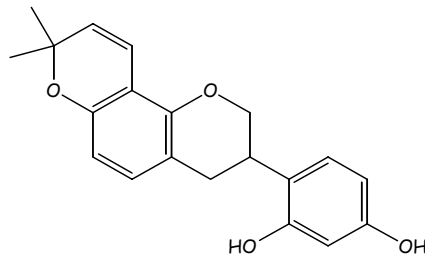
Molécule	Plante source de la molécule	Références
<b>Isoflavonoïdes</b> Génistéine - dadzéine - biochanine A Formononétine – glycitéine  7 O-glucosides et 7 O-glucosides acylés de génistéine - dadzéine - biochanine A formononétine – glycitéine  8C-glucoside dadzéine = puerarine	Soja et dérivés Haricot - pois - pois chiche - lentilles - arachide - orge - seigle - noix Trèfle rouge - kudzu - houblon Thé - iris Astragalus	Bénnetau-Pelissero 2001, Boué 2003, Coldham 2001, Cornwell 2004, Cos 2003, Davis 1999, Duncan 2003, Fletcher 2003, Hee-Yun 2003, Committee on Toxicity of Chemicals in Food 2003 Iberreta 2001, Oerter-Klein 2003, Kurger 1997, Mazur 1998, Moneam 1988, Ososki 2003, Price 1985, Tham 1998, Xiaou 2002, Toda 1998
<b>Isoflavanes - isoflavènes</b> Glabridine Glabrène	Réglisse	Tamir 2000, Tamir 2001
<b>Flavanones</b> Naringénine - 8-prénylnaringénine 6, (1-1) diméthylallyl naringénine Isoxanthohumol Liquiritigénine	Houblon   Réglisse	Kitoaka 1998, Miyamoto 1998, Milligan 1999, Nerya 2002, Nomura 2002
<b>Chalcones</b> Isoliquiritigénine Xanthohumol	Réglisse Houblon	Maggiolini 2002, Milligan 2000
<b>Coumestanes</b> Coumestrol 4-méthoxy coumestrol	Alfalfa (luzerne) Pousses de soja ( <i>Vigna radiata</i> ) Trèfle Epinards	Cos, 2003, Cornwell 2004, Davis 1999, Kurzer 1997, Ososki 2003
<b>Lignanes</b> Matarésinol Sécoisolaricirésinol Pinorésinol Synrigarésinol Arctigénine Sésamine	Graines de lin - tournesol - seigle - sésame - céréales entières –courge . Fruits (cerises - pommes - poires) Légumes (carotte - fenouil - oignon - ail - céleri) Thé - café Sapin - pin – bouleau	Cornwell 2004, Cos 2003, Meagher 1996, Mellanen 1998, Orcheson 1998, Duncan 2003, Heinonen 2001, Osoki 1997, Slavin 1997, Tham 1998, Ibarreta 2001, Lampe 2003, Mazur 1998
<b>Oestrone</b>	Noyau de datte Graine de grenade	Cos 2003, Ososki 2003, Miksicek 1993, Moneam 1988, Van Elswijk 2004
<b>Stilbènes</b> Rhaponticine Isorhapontine Picéatanol	Rhubarbe Polygonum sp.	Cos 2003, Cornwell 2003, Gehm 1997, Kageura, 2001, Turner 1999, Klinge 2003, Matsuda 2001

# Isoflavones et métabolites

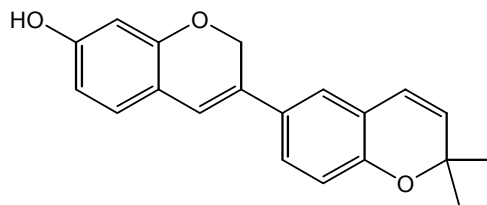


## Isoflavanes et isoflavènes

**Glabridine**  
(isoflavane)

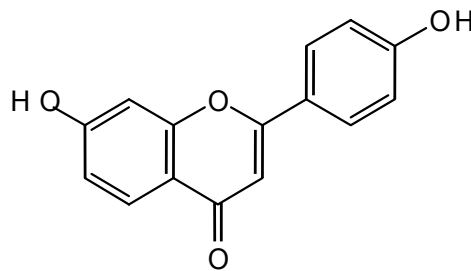


**Glabrene**  
(isoflavène)

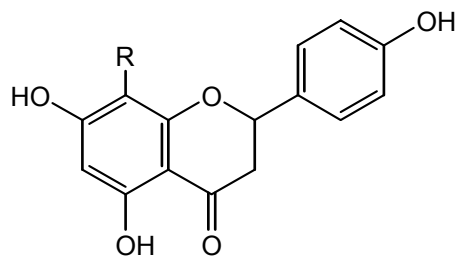


## Flavanones

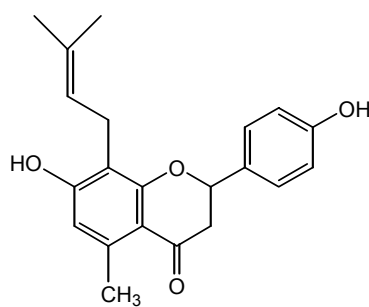
**Liquiritigénine**



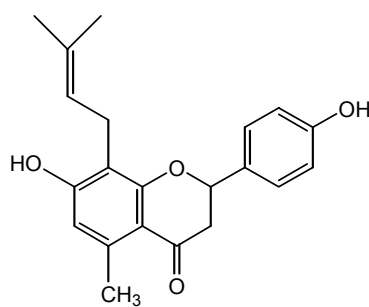
**Naringénine R=H**



**8-prényl naringénine**  
R= prényle

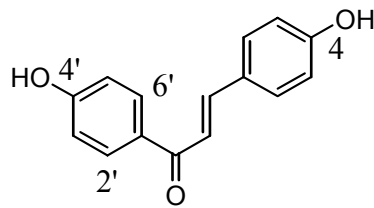


**Isoxanthohumol**

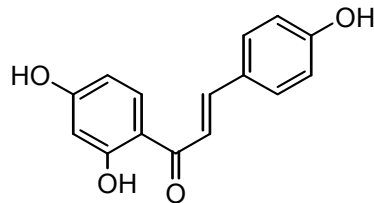


## Chalcones

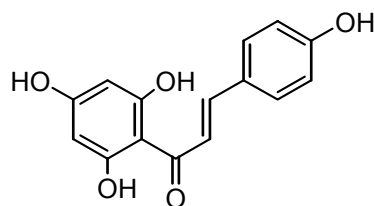
4'-4 dihydroxy chalcone



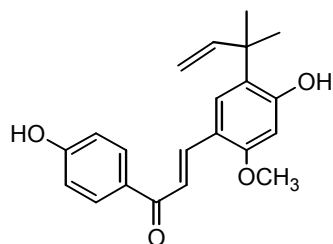
Isoliquiritigénine



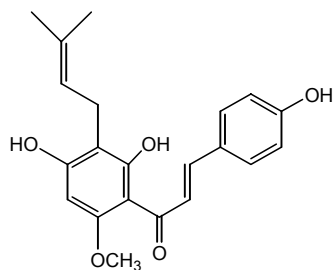
Phlorétine



Lichoalcone A

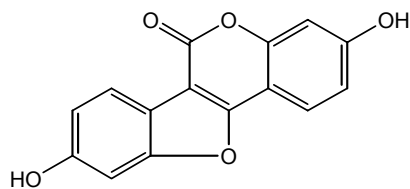


Xanthohumol

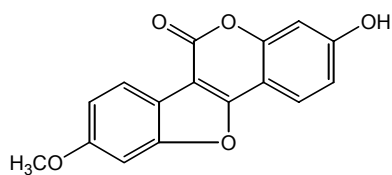


## Coumestanes

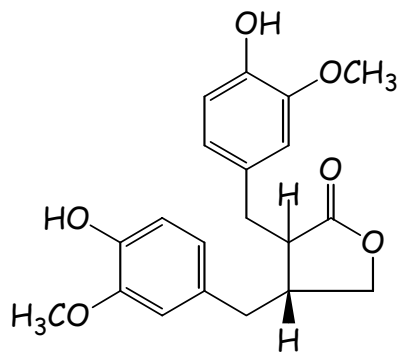
Coumestrol



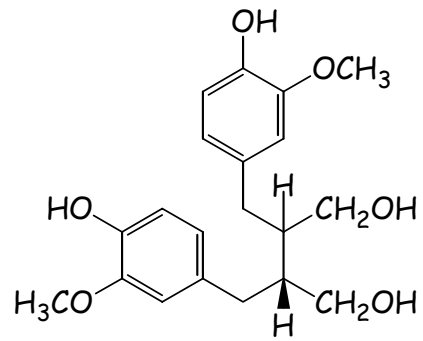
4' o-méthoxy coumestrol



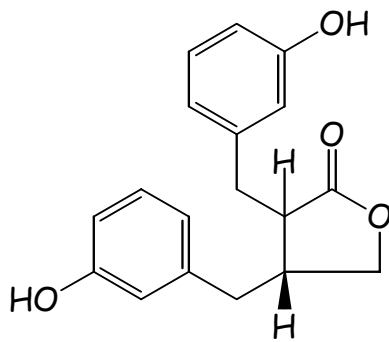
## Lignanes et entérolignanes



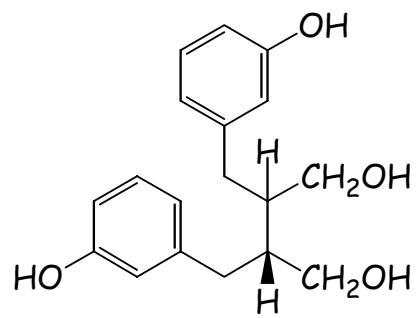
Matairesinol



Secoisolaricirésinol



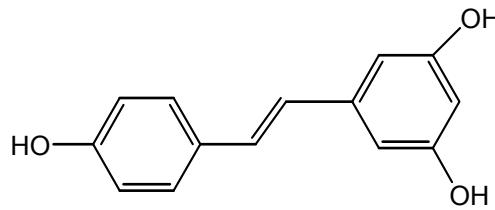
Entérolactone



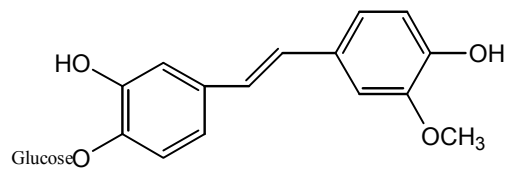
Entérodiol

## Stilbènes

Trans-resvératrol



Isorhapontine



- Agence Française de sécurité sanitaire (2003) Démarche d'évaluation de la sécurité, de l'intérêt et de l'allégation des denrées alimentaires à base de plantes. Maisons-Alfort, AFSSA.
- Albert-Puleo, M. (1980) Fennel and anise as estrogenic agents. *J Ethnopharmacol*, 2, pp.337-44.
- Araghiniknam, M., Chung, S., Nelson-White, T., Eskelson, C., et al. (1996) Antioxidant activity of dioscorea and dehydroepiandrosterone (DHEA) in older humans. *Life Sci*, 59, pp.PL147-57.
- Baird, D.D., Umbach, D.M., Lansdell, L., Hughes, C.L., et al. (1995) Dietary intervention study to assess estrogenicity of dietary soy among postmenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab*, 80, pp.1685-90.
- Bennetau-Pelissero, C. (2001) Les phyto-estrogènes dans notre vie quotidienne. *Phytothérapie*, 13, pp.3-10.
- Bhat, K.P., Lantvit, D., Christov, K., Mehta, R.G., et al. (2001) Estrogenic and antiestrogenic properties of resveratrol in mammary tumor models. *Cancer Res*, 61, pp.7456-63.
- Boue, S.M., Wiese, T.E., Nehls, S., Burow, M.E., et al. (2003) Evaluation of the estrogenic effects of legume extracts containing phytoestrogens. *J Agric Food Chem*, 51, pp.2193-9.
- Bowers, J.L., Tyulmenkov, V.V., Jernigan, S.C., Klinge, C.M. (2000) Resveratrol acts as a mixed agonist/antagonist for estrogen receptors alpha and beta. *Endocrinology*, 141, pp.3657-67.
- Bradbury, R.B., White, D.E. (1954) Estrogens and related substances in plants. *Vitam Horm*, 12, pp.207-33.
- Breinholt, V., Larsen, J.C. (1998) Detection of weak estrogenic flavonoids using a recombinant yeast strain and a modified MCF7 cell proliferation assay. *Chem Res Toxicol*, 11, pp.622-9.
- Bruneton, J., Hatton, C.K. (1999) Pharmacognosy, phytochemistry, medicinal plants. Paris, Tec et Doc.
- Burdette, J.E., Liu, J., Chen, S.N., Fabricant, D.S., et al. (2003) Black cohosh acts as a mixed competitive ligand and partial agonist of the serotonin receptor. *J Agric Food Chem*, 51, pp.5661-70.
- Burdette, J.E., Liu, J., Lantvit, D., Lim, E., et al. (2002) *Trifolium pratense* (red clover) exhibits estrogenic effects in vivo in ovariectomized Sprague-Dawley rats. *J Nutr*, 132, pp.27-30.
- Cassidy, A. (1999) Potential tissue selectivity of dietary phytoestrogens and estrogens. *Curr Opin Lipidol*, 10, pp.47-52.
- Chan, R.Y., Chen, W.F., Dong, A., Guo, D., et al. (2002) Estrogen-like activity of ginsenoside Rg1 derived from *Panax notoginseng*. *J Clin Endocrinol Metab*, 87, pp.3691-5.
- Coldham, N.G., Sauer, M.J. (2001) Identification, quantitation and biological activity of phytoestrogens in a dietary supplement for breast enhancement. *Food Chem Toxicol*, 39, pp.1211-24.
- Collins, B.M., McLachlan, J.A., Arnold, S.F. (1997) The estrogenic and antiestrogenic activities of phytochemicals with the human estrogen receptor expressed in yeast. *Steroids*, 62, pp.365-72.
- Committee on Toxicity of Chemicals in Food, Consumer Products and Environment (2003) Phytoestrogens and health. London, FSA.
- Cornwell, T., Cohick, W., Raskin, I. (2004) Dietary phytoestrogens and health. *Phytochemistry*, 65, pp.995-1016.
- Cos, P., De Bruyne, T., Apers, S., Vanden Berghe, D., et al. (2003) Phytoestrogens: recent developments. *Planta Med*, 69, pp.589-99.
- Davis, S.R., Dalais, F.S., Simpson, E.R., Murkies, A.L. (1999) Phytoestrogens in health and disease. *Recent Prog Horm Res*, 54, pp.185-210; discussion 210-1.
- De Leo, V., Lazetta, D., Cazzavacca, R. (1998) Trattamento dei disturbi neurovegetativi della donna in menopausa con un preparato fitoterapico. *Minerva Ginecol*, 50, pp.207-11.
- Diel, P., Smolnikar, K., Michna, H. (1999) In vitro test systems for the evaluation of the estrogenic activity of natural products. *Planta Med*, 65, pp.197-203.
- Dixon-Shanies, D., Shaikh, N. (1999) Growth inhibition of human breast cancer cells by herbs and phytoestrogens. *Oncol Rep*, 6, pp.1383-7.
- Dornstauder, E., Jisa, E., Unterrieder, I., Krenn, L., Kubelka, W., et al. (2001) Estrogenic activity of two standardised red clover extracts (Menoflavon) intended for large scale use in hormone replacement therapy. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 78, pp.67-75.
- Duncan, A.M., Phipps, W.R., Kurzer, M.S. (2003) Phyto-oestrogens. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, 17, pp.253-71.
- Farnsworth, N.R., Bingel, A.S., Cordell, G.A., Crane, F.A., et al. (1975) Potential value of plants as sources of new antifertility agents II. *J Pharm Sci*, 64, pp.717-54.
- Fitzpatrick, L.A. (2003) Alternatives to estrogen. *Med Clin North Am*, 87, pp.1091-113, x.
- Fletcher, R.J. (2003) Food sources of phyto-oestrogens and their precursors in Europe. *Br J Nutr*, 89 Suppl 1, pp.S39-43.
- Gehm, B.D., McAndrews, J.M., Chien, P.Y., Jameson, J.L. (1997) Resveratrol, a polyphenolic compound found in grapes and wine, is an agonist for the estrogen receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94, pp.14138-43.
- Hayashi, H., Hattori, S., Inoue, K., Khodzimatov, O., et al. (2003) Field survey of *Glycyrrhiza* plants in Central Asia (3). Chemical characterization of *G. glabra* collected in Uzbekistan. *Chem. Pharm. Bull*, 51, pp.1338-1340.
- Hee-Yun, K., Jin-Hwan, H., Dong-Sul, K. (2003) Isoflavone content and estrogen activity in arrowroot *Puerariae Radix*. *Food Science and Biotechnology*, 12, pp.29-35.
- Heinonen, S., Nurmi, T., Liukkonen, K., Poutanen, K., et al. (2001) In vitro metabolism of plant lignans: new precursors of mammalian lignans enterolactone and enterodiol. *J Agric Food Chem*, 49, pp.3178-86.

- Hu, J.Y., Aizawa, T. (2003) Quantitative structure-activity relationships for estrogen receptor binding affinity of phenolic chemicals. *Water Res*, 37, 1213-22.
- Hutchins, A.M., Lampe, J.W., Martini, M.C., Campbell, D.R., et al. (1995) Vegetables, fruits, and legumes: effect on urinary isoflavonoid phytoestrogen and lignan excretion. *J Am Diet Assoc*, 95, 769-74.
- Ibarreta, D., Daxenberger, A., Meyer, H.H. (2001) Possible health impact of phytoestrogens and xenoestrogens in food. *Apmis*, 109, 161-84.
- Jarry, H., Metten, M., Spengler, B., Christoffel, V., et al. (2003a) In vitro effects of the *Cimicifuga racemosa* extract BNO 1055. *Maturitas*, 44 Suppl 1, S31-8.
- Jarry, H., Spengler, B., Porzel, A., Schmidt, J., et al. (2003b) Evidence for estrogen receptor beta-selective activity of *Vitex agnus-castus* and isolated flavones. *Planta Med*, 69, 945-7.
- Kageura, T., Matsuda, H., Morikawa, T., Toguchida, I., et al. (2001) Inhibitors from rhubarb on lipopolysaccharide-induced nitric oxide production in macrophages: structural requirements of stilbenes for the activity. *Bioorg Med Chem*, 9, 1887-93.
- Kinjo, J., Tsuchihashi, R., Morito, K., Hirose, T., et al. (2004) Interactions of phytoestrogens with estrogen receptors alpha and beta (III). Estrogenic activities of soy isoflavone aglycones and their metabolites isolated from human urine. *Biol Pharm Bull*, 27, 185-8.
- Kitaoka, M., Kadokawa, H., Sugano, M., Ichikawa, K., et al. (1998) Prenylflavonoids: a new class of non-steroidal phytoestrogen (Part 1). Isolation of 8-isopentenylnaringenin and an initial study on its structure-activity relationship. *Planta Med*, 64, 511-5.
- Klinge, C.M., Risinger, K.E., Watts, M.B., Beck, V., et al. (2003) Estrogenic activity in white and red wine extracts. *J Agric Food Chem*, 51, 1850-7.
- Kurzer, M.S., Xu, X. (1997) Dietary phytoestrogens. *Annu Rev Nutr*, 17, 353-81.
- Lampe, J.W. (2003) Isoflavonoid and lignan phytoestrogens as dietary biomarkers. *J Nutr*, 133 Suppl 3, 956S-964S.
- Latonnelle, K., Le Menn, F., Kaushik, S.J., Bennetau-Pelissero, C. (2002) Effects of dietary phytoestrogens in vivo and in vitro in rainbow trout and Siberian sturgeon: interests and limits of the in vitro studies of interspecies differences. *Gen Comp Endocrinol*, 126, 39-51.
- Le Bail, J.C., Varnat, F., Nicolas, J.C., Habrioux, G. (1998) Estrogenic and antiproliferative activities on MCF-7 human breast cancer cells by flavonoids. *Cancer Lett*, 130, 209-16.
- Lee, Y., Jin, Y., Lim, W., Ji, S., et al. (2003) A ginsenoside-Rh1, a component of ginseng saponin, activates estrogen receptor in human breast carcinoma MCF-7 cells. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 84, 463-8.
- Lerner, L.J., Turkheimer, A.R., Borman, A. (1963) Phloretin, a Weak Estrogen and Estrogen Antagonist. *Proc Soc Exp Biol Med*, 114, 115-7.
- Liggins, J., Grimwood, R., Bingham, S.A. (2000) Extraction and quantification of lignan phytoestrogens in food and human samples. *Anal Biochem*, 287, 102-9.
- Liu, J., Burdette, J.E., Xu, H., Gu, C., et al. (2001) Evaluation of estrogenic activity of plant extracts for the potential treatment of menopausal symptoms. *J Agric Food Chem*, 49, 2472-9.
- Maggiolini, M., Statti, G., Vivacqua, A., Gabriele, S., et al. (2002) Estrogenic and antiproliferative activities of isoliquiritigenin in MCF7 breast cancer cells. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 82, 315-22.
- Malini, T., Vanithakumari, G., Megala, N., Anusya, S., et al. (1985) Effect of *Foeniculum vulgare* Mill. seed extract on the genital organs of male and female rats. *Indian J Physiol Pharmacol*, 29, 21-6.
- Matsuda, H., Shimoda, H., Morikawa, T., Yoshikawa, M. (2001) Phytoestrogens from the roots of *Polygonum cuspidatum* (Polygonaceae): structure-requirement of hydroxyanthraquinones for estrogenic activity. *Bioorg Med Chem Lett*, 11, 1839-42.
- Mazur, W.M., Wahala, K., Rasku, S., Salakka, A., et al. (1998) Lignan and isoflavonoid concentrations in tea and coffee. *Br J Nutr*, 79, 37-45.
- McCann, S.E., Moysich, K.B., Freudenheim, J.L., Ambrosone, C.B., et al. (2002) The risk of breast cancer associated with dietary lignans differs by CYP17 genotype in women. *J Nutr*, 132, 3036-41.
- Meagher, L.P., Beecher, G.R., Flanagan, V.P., Li, B.W. (1999) Isolation and characterization of the lignans, isolariciresinol and pinoresinol, in flaxseed meal. *J Agric Food Chem*, 47, 3173-80.
- Mellanen, P., Petanen, T., Lehtimäki, J., Makela, S., et al. (1996) Wood-derived estrogens: studies in vitro with breast cancer cell lines and in vivo in trout. *Toxicol Appl Pharmacol*, 136, 381-8.
- Miksicek, R.J. (1993) Commonly occurring plant flavonoids have estrogenic activity. *Mol Pharmacol*, 44, 37-43.
- Milligan, S.R., Kalita, J.C., Heyerick, A., Rong, H., et al. (1999) Identification of a potent phytoestrogen in hops (*Humulus lupulus* L.) and beer. *J Clin Endocrinol Metab*, 84, 2249-52.
- Milligan, S.R., Kalita, J.C., Pocock, V., Van De Kauter, V., et al. (2000) The endocrine activities of 8-prenylnaringenin and related hop (*Humulus lupulus* L.) flavonoids. *J Clin Endocrinol Metab*, 85, 4912-5.
- Miyamoto, M., Matsushita, Y., Kiyokawa, A., Fukuda, C., et al. (1998) Prenylflavonoids: a new class of non-steroidal phytoestrogen (Part 2). Estrogenic effects of 8-isopentenylnaringenin on bone metabolism. *Planta Med*, 64, 516-9.
- Moneam, N.M., el Sharaky, A.S., Badreldin, M.M. (1988) Oestrogen content of pomegranate seeds. *J Chromatogr*, 438, 438-42.
- Murkies, A.L., Wilcox, G., Davis, S.R. (1998) Clinical review 92: Phytoestrogens. *J Clin Endocrinol Metab*, 83, 297-303.
- Nerya, O., Vaya, J., Musa, R., Izrael, S., et al. (2003) Glabrene and isoliquiritigenin as tyrosinase inhibitors from licorice roots. *J Agric Food Chem*, 51, 1201-7.
- Nomura, T., Fukui, T., Akiyama, T. (2002) Chemistry of phenolic compounds of licorice (*Glycyrrhiza* sp) and their estrogenic and cytotoxic activities. *Pure. Appl. Chem.*, 74, 1199-206.



- Oerter Klein, K., Janfaza, M., Wong, J.A.Chang, R.J. (2003) Estrogen bioactivity in fo-ti and other herbs used for their estrogen-like effects as determined by a recombinant cell bioassay. *J Clin Endocrinol Metab*, 88, 4077-9.
- Orcheson, L.J., Rickard, S.E., Seidl, M.M.Thompson, L.U. (1998) Flaxseed and its mammalian lignan precursor cause a lengthening or cessation of estrous cycling in rats. *Cancer Lett*, 125, 69-76.
- Osofski, A.L.Kennelly, E.J. (2003) Phytoestrogens: a review of the present state of research. *Phytother Res*, 17, 845-69.
- Perrey, F. (2001) La sauge officinale oestrogène-like. *Phytothérapie*, 13, 25-7.
- Perry, N.S., Houghton, P.J., Sampson, J., Theobald, A.E., et al. (2001) In-vitro activity of *S. lavandulaefolia* (Spanish sage) relevant to treatment of Alzheimer's disease. *J Pharm Pharmacol*, 53, 1347-56.
- Piersen, C.E. (2003) Phytoestrogens in botanical dietary supplements: implications for cancer. *Integr Cancer Ther*, 2, 120-38.
- Price, K.R.Fenwick, G.R. (1985) Naturally occurring oestrogens in foods--a review. *Food Addit Contam*, 2, 73-106.
- Punnonen, R.Lukola, A. (1980) Oestrogen-like effect of ginseng. *Br Med J*, 281, 1110.
- Rafi, M.M., Rosen, R.T., Vassil, A., Ho, C.T., et al. (2000) Modulation of bcl-2 and cytotoxicity by licochalcone-A, a novel estrogenic flavonoid. *Anticancer Res*, 20, 2653-8.
- Ruh, M.F., Zacharewski, T., Connor, K., Howell, J., et al. (1995) Naringenin: a weakly estrogenic bioflavonoid that exhibits antiestrogenic activity. *Biochem Pharmacol*, 50, 1485-93.
- Scarlata, S.Miksicek, R. (1995) Binding properties of coumestrol to expressed human estrogen receptor. *Mol Cell Endocrinol*, 115, 65-72.
- Setchell, K.D.Lydeking-Olsen, E. (2003) Dietary phytoestrogens and their effect on bone: evidence from in vitro and in vivo, human observational, and dietary intervention studies. *Am J Clin Nutr*, 78, 593S-609S.
- Slavin, J., Jacobs, D.Marquart, L. (1997) Whole-grain consumption and chronic disease: protective mechanisms. *Nutr Cancer*, 27, 14-21.
- So, F.V., Guthrie, N., Chambers, A.F.Carroll, K.K. (1997) Inhibition of proliferation of estrogen receptor-positive MCF-7 human breast cancer cells by flavonoids in the presence and absence of excess estrogen. *Cancer Lett*, 112, 127-33.
- Tang, B.Y., Adams, N.R., (1980) Effect of equol on estrogen receptors and on synthesis of DNA and protein in the immature rat uterus. *J. Endocrinol*, 85, 291-7.
- Tamir, S., Eizenberg, M., Somjen, D., Izrael, S., et al. (2001) Estrogen-like activity of glabrene and other constituents isolated from licorice root. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 78, 291-8.
- Tamir, S., Eizenberg, M., Somjen, D., Stern, N., et al. (2000) Estrogenic and antiproliferative properties of glabridin from licorice in human breast cancer cells. *Cancer Res*, 60, 5704-9.
- Tham, D.M., Gardner, C.D.Haskell, W.L. (1998) Clinical review 97: Potential health benefits of dietary phytoestrogens: a review of the clinical, epidemiological, and mechanistic evidence. *J Clin Endocrinol Metab*, 83, 2223-35.
- Toda, S. (1998) Inhibitory effects of isoflavones in roots of *Astragalus membranaceus* BUNGE on lipid peroxidation by reactive oxygen species. *Phytother Res*, 12, 59-61.
- Turner, R.T., Evans, G.L., Zhang, M., Maran, A., et al. (1999) Is resveratrol an estrogen agonist in growing rats? *Endocrinology*, 140, 50-4.
- Van Elswijk, D.A., Schobel, U.P.Lansky, E.P. (2003) Rapid dereplication of estrogenic compounds in pomegranate using on-line biochemical detection coupled to mass spectrometry. *Phytochemistry*, 65, 233-41.
- Vastano, B.C., Chen, Y., Zhu, N., Ho, C.T., et al. (2000) Isolation and identification of stilbenes in two varieties of *Polygonum cuspidatum*. *J Agric Food Chem*, 48, 253-6.
- Wang, L.Q. (2002) Mammalian phytoestrogens: enterodiol and enterolactone. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 777, 289-309.
- Whitten, P.L.Naftolin, F. (1998) Reproductive actions of phytoestrogens. *Baillieres Clin Endocrinol Metab*, 12, 667-90.
- Whitten, P.L.Patisaul, H.B. (2001) Cross-species and interassay comparisons of phytoestrogen action. *Environ Health Perspect*, 109 Suppl 1, 5-20.
- Wuttke, W., Seidlova-Wuttke, D.Gorkow, C. (2003) The Cimicifuga preparation BNO 1055 vs. conjugated estrogens in a double-blind placebo-controlled study: effects on menopause symptoms and bone markers. *Maturitas*, 44 Suppl 1, S67-77.
- Xiaou, X., Zhe, J.Yulin, W. (2002) Effects of the extract of gegen (dried root of *Pueraria lobata* or *pueraria thompsonii*) on vagina, uterus and hormones in the pituitary-sex gland axis in the ovariectomized rats. *Beijing Zhongyiao Daxue Xuebao*, 25, 28-30.
- Yoshikawa, M., Uemura, T., Shimoda, H., Kishi, A., et al. (2000) Medicinal foodstuffs. XVIII. Phytoestrogens from the aerial part of *Petroselinum crispum* Mill. (Parsley) and structures of 6"-acetylapiin and a new monoterpene glycoside, petroside. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*, 48, 1039-44.
- Zava, D.T., Blen, M.Duwe, G. (1997) Estrogenic activity of natural and synthetic estrogens in human breast cancer cells in culture. *Environ Health Perspect*, 105 Suppl 3, 637-45.
- Zava, D.T., Dollbaum, C.M.Blen, M. (1998) Estrogen and progestin bioactivity of foods, herbs, and spices. *Proc Soc Exp Biol Med*, 217, 369-78.
- Zava, D.T.Duwe, G. (1997) Estrogenic and antiproliferative properties of genistein and other flavonoids in human breast cancer cells in vitro. *Nutr Cancer*, 27, 31-40.
- Zhang, L., Khan, I.A., Willett, K.L.Foran, C.M. (2003) In vivo Effects of Black Cohosh and Genistein on Estrogenic Activity and Lipid Peroxidation in Japanese Medaka (*Oryzias latipes*). *J Herb Pharmacother*, 3, 33-50.
- Zierau, O., Gester, S., Schwab, P., Metz, P., et al. (2002) Estrogenic activity of the phytoestrogens naringenin, 6-(1,1-dimethylallyl)naringenin and 8-prenylnaringenin. *Planta Med*, 68, 449-51.



# Techniques d'analyse des phyto-estrogènes

*Jacques Tulliez, Catherine Bennetau-Pelissero*

Sous le vocable "technique d'analyse" on entend habituellement aussi bien les techniques permettant la séparation et la quantification des molécules, que celles susceptibles d'aboutir à la confirmation de la structure de ces molécules ou à l'identification de nouveaux composés. Ces étapes sont précédées de la préparation des extraits à analyser. Tous les phyto-estrogènes sont de poids moléculaire peu élevé, se caractérisent par une faible solubilité dans l'eau, et par le fait qu'ils présentent tous des fonctions alcool. En outre, dans les matrices végétales où a lieu leur biosynthèse, les phyto-estrogènes sont généralement présents sous des formes différentes de celles sous lesquelles ils existent dans l'organisme animal ou humain. Par ailleurs, certains des phyto-estrogènes (les lignanes) ne sont pas présents initialement dans les matrices végétales mais sont formés par déméthylation de précurseurs dans le tractus digestif des mammifères qui les consomment. De ce fait, les analyses dans les végétaux ou les aliments requièrent des composés de référence différents de ceux que l'on utilise pour les analyses dans les tissus ou les fluides biologiques (figure 1). Seront envisagées successivement les techniques chromatographiques, puis l'utilisation de l'électrophorèse capillaire ; suivies d'un aperçu des techniques plus spécialement destinées à caractériser des mélanges dans des matrices complexes et des techniques immunologiques les plus récemment développées. Une conclusion fera le point sur les intérêts et limites de toutes ces techniques.

## I- Méthodologie

Tous les articles cités rapportent des travaux originaux, généralement novateurs et comportant notamment tous les éléments indispensables au jugement de la qualité du travail cité (données techniques, courbes d'étalonnage, spectres etc...). Cette étude bibliographique a été grandement facilitée par l'excellent travail de Wang (2002).

## II- Préliminaire aux techniques d'analyses : la préparation des extraits

Il ne faut pas perdre de vue qu'avant de mettre en œuvre les techniques analytiques, il convient d'obtenir l'extrait dont on veut connaître la composition tant sur le plan qualitatif que quantitatif. A partir d'aliments ou d'échantillons biologiques, l'extraction des phyto-estrogènes est réalisée au moyen de mélanges de solvants (méthanol/eau, acétonitrile /eau) et cela soit directement, soit après hydrolyse enzymatique (ou chlorhydrique) selon que l'on veut analyser les formes glycosylées ou les aglycones. L'extrait brut est ensuite soumis à divers procédés de purification faisant intervenir soit des partages liquide-liquide soit l'extraction en phase solide. L'utilisation de standards internes (en général des phyto-estrogènes marqués au deutérium ou au carbone 13, ou des composés de structure et propriétés voisines) permet d'estimer les taux de récupération à l'issue de l'ensemble du processus extraction-purification. Dans les articles de revue de Reinli et Block (1996) et de Hoikkala (2003) sont rassemblées de nombreuses conditions de préparation d'extraits de phyto-estrogènes réalisés à partir d'aliments et de matrices biologiques respectivement.

## III- Les techniques chromatographiques

### III-1 Chromatographie sur couche mince (TLC)

Ces techniques anciennes sont d'une très faible sensibilité mais ont permis d'identifier les isoflavones dans des sources végétales très riches en isoflavones, comme certaines espèces de trèfle. Les solvants de migration utilisés sur des couches de silice étaient en général des mélanges, acétonitrile – eau ou dichlorométhane – méthanol. Ces techniques ont permis, chez des animaux exposés à des doses considérables d'isoflavones, d'analyser ces composés dans le plasma. Toutefois la sensibilité de cette technique ne dépasse pas le  $\mu\text{M}$ .

### **III-2 Chromatographie liquide haute performance (HPLC)**

Développée essentiellement dans les années 1980, la chromatographie liquide haute performance permet une séparation plus fine des constituants d'un mélange. Elle s'opère sur des colonnes de silice greffée (chromatographie en phase inverse) et de porosité faible nécessitant le développement des étapes de purification des extraits pour éviter le colmatage des colonnes. Les méthodes actuellement utilisées pour séparer les phytoestrogènes mettent en œuvre généralement des colonnes de type C18 et les phases mobiles employées sont classiquement des mélanges d'acétonitrile et/ou de méthanol avec de l'eau contenant un peu d'acide. Les analyses sont effectuées en utilisant des gradients, ce qui permet d'affiner la séparation des différentes entités chimiques présentes dans les extraits. La revue de Merken (2000) constitue une bonne compilation des différentes procédures analytiques mises en œuvre pour la séparation par HPLC des isoflavones et de différentes familles de flavonoïdes.

Quel que soit le résultat de la séparation obtenue, il n'en reste pas moins que la sensibilité de la technique réside essentiellement dans la méthode de détection mise en œuvre en sortie de colonne.

#### **III-2-1 Détection UV à une longueur d'onde fixe**

Ce type de détection est le plus simple et le plus anciennement développé. Il présente toutefois la sensibilité la plus faible : de l'ordre de 300 nM dans le meilleur des cas (cf. Tableaux 1 et 2). Compte tenu que les phyto-estrogènes et bien souvent leurs métabolites renferment au moins un noyau aromatique, l'absorption sera mesurée entre 250 et 270 nm. La calibration des systèmes à l'aide de composés de référence permet de doser assez précisément les composés présents mais du fait du manque de spécificité dû à l'utilisation d'une longueur d'onde unique à laquelle une ou plusieurs substances pouvant co-éluer au même temps de rétention sont susceptibles de donner un signal, ce mode de détection est peu spécifique.

#### **III-2-2 Détection à barrette de diodes (DAD)**

Cette technique, développée dans les années 1990, est également une détection UV mais grâce au détecteur à barrette de diodes, c'est le spectre d'absorbance complet du composé qui est enregistré. Ce spectre est spécifique d'un composé donné et permet donc une meilleure identification des molécules. La comparaison du spectre du produit standard avec celui du produit analysé permet de s'assurer de l'absence de substance interférant avec la mesure.

La sensibilité de cette technique est meilleure que celle obtenue en UV simple longueur d'onde, mais est au mieux de l'ordre de 5 nM.

#### **III-2-3 Détection fluorimétrique**

Ce mode de détection ne s'adresse qu'aux substances naturellement fluorescentes. Le choix des longueurs d'onde d'excitation et d'émission se fait à partir de l'analyse des spectres d'absorption et d'émission des substances que l'on cherche à doser, et il est possible de programmer des changements desdites longueurs d'onde au cours du gradient d'élution de façon à optimiser la sensibilité pour chacune des molécules d'intérêt.

La sensibilité est meilleure qu'en détection UV, puisqu'elle est de l'ordre du dixième du nM.

#### **III-2-4 Détection électrochimique (CAD)**

Cette technique est désignée en anglais sous les termes « Coulometric Aray Détection ». Plus sensible que les précédentes, elle est tout à fait indiquée pour les phyto-estrogènes puisqu'elle permet de détecter des molécules électro-chimiquement actives comme les polyphénols. Il s'agit, au niveau du détecteur, de générer une différence de potentiel donnée et d'observer l'intensité de courant induite par le passage d'une molécule dans ce champ. Pour augmenter la spécificité de l'analyse on peut grâce au CAD travailler simultanément à plusieurs voltages différents, obtenant ainsi un spectre d'intensité plus caractéristique d'un composé précis.

Avec ce type d'analyse, il est possible d'atteindre une sensibilité de l'ordre du dixième de nM (voir tableau 2), ce qui est particulièrement intéressant pour la recherche des isoflavones et des lignanes dans les fluides biologiques. La sélectivité est également très bonne puisqu'il est possible de repérer les produits susceptibles de co-éluer en jouant sur les voltages et donc les profils d'oxydo-réduction. Toutefois, la limite réside dans le fait qu'il est nécessaire d'utiliser des solvants ultra purs et de procéder à des purifications extrêmement poussées lorsqu'on veut rechercher des traces d'analytes, ce qui est généralement le cas lorsque l'on analyse le plasma d'individus ayant un régime alimentaire de type occidental.

### **III-2-5 Spectrométrie de masse (couplage LC-MS)**

La spectrométrie de masse utilisée comme moyen de détection en sortie de colonne de chromatographie liquide a été développée à partir des années 1980.

Le principe général consiste à bombarder les molécules qui sortent de la colonne chromatographique avec un faisceau de particules de plus ou moins grande énergie. De ce bombardement résulte une fragmentation partielle voire totale des molécules, les fragments étant alors triés en fonction de leur masse moléculaire au cours de la traversée d'un champ magnétique. Au cours des vingt dernières années l'évolution de la spectrométrie de masse a été spectaculaire, et on est passé du traditionnel impact électronique et de l'ionisation chimique aux sources electro-spray, à l'ionisation chimique à pression atmosphérique, aux trappes d'ions et aux spectromètres en tandem.

Sélectivité et sensibilité sont à mettre au crédit de cette technique qui permet d'analyser et de caractériser au cours d'une seule analyse chromatographique toutes les formes des isoflavones du soja (aglycones, glycosides et glycosides estérifiés).

Si cette technique permet d'atteindre des niveaux de détection allant jusqu'à 0,01 nM, il est nécessaire là encore, comme pour toute technique d'analyse de traces, de procéder à une purification extrêmement poussée des extraits. Par ailleurs, le coût du matériel et la nécessité de disposer de personnel hautement qualifié peuvent constituer un frein au développement de son utilisation.

### **III-3 Chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS)**

Cette technique mise au point dans les années 1970 a connu de larges développements depuis vingt ans, qui vont tous vers une augmentation de la sensibilité de détection. Les éléments généraux formulés quant à la détection dans le paragraphe précédent restent vrais. Il faut toutefois noter quelques spécificités liées à l'utilisation de la chromatographie en phase gazeuse. Pour être analysées, les molécules injectées dans le chromatographe doivent pouvoir être volatilisées. Il est donc impossible d'analyser non seulement les phytoestrogènes sous forme de conjugués, qu'il s'agisse des formes glycosylées présentes dans les végétaux ou des formes glucuronidées circulant chez l'Homme ou les animaux, mais également d'analyser les formes aglycones du fait de leur nature hydrophobe. En conséquence, il faudra mettre en œuvre des procédés d'hydrolyse chimique et/ou enzymatique pour libérer les aglycones, qui seront ensuite rendus volatilisables par les techniques de dérivation.

Toutes ces manipulations préalables à l'analyse proprement dite sont susceptibles d'introduire des biais dans les quantifications ultérieures en occasionnant la perte de matériel. Pour pallier ces problèmes, on utilise en général des composés deutériés ou marqués au carbone 13 qui ont les mêmes propriétés physico-chimiques que la molécule native que l'on souhaite quantifier mais, du fait de leur marquage, sont aisément repérables sur un spectre de masse. Ces difficultés n'empêchent pas pour autant les analyses, et de nombreuses publications font état de dosages d'isoflavones par cette méthode (Wang 2002 et publications citées), dont la sensibilité est d'autant plus grande qu'on s'adresse à des échantillons simples, et peut descendre jusqu'au dixième de nM (voir tableau 2).

## **IV- L' électrophorèse capillaire**

Cette technique est plus récente que celles impliquant la chromatographie. Le principe consiste à utiliser les propriétés de mobilité électrophorétique de composés chargés au sein d'un champ électrique appliqué aux bornes d'un capillaire de faible diamètre (50 à 100 µm de diamètre interne). Elle offre l'avantage d'une séparation rapide et hautement résolutive à partir d'échantillons de faibles volumes (de l'ordre du nanolitre). Il existe deux types d'électrophorèse capillaire : l'électrophorèse capillaire de zone (CZE) et la chromatographie électrocinétique micellaire (MEKC). En CZE, toutes les molécules neutres sont éluées en même temps alors que les composés chargés sont sélectivement retenus en fonction de leur charge. Pour les polyphénols qui sont des acides faibles, on travaille à pH basique, en général en tampon borate, de manière à créer des complexes moléculaires chargés au niveau des fonctions hydroxyles. La nature des tampons utilisés influe sur la migration des phytoestrogènes dans les capillaires. En MEKC, on travaille en tampon contenant du SDS qui, en homogénéisant la charge des molécules, permet d'analyser tous les composés y compris les composés neutres. Les composés d'un mélange se répartissent entre les micelles de SDS et le tampon, ce qui accroît la sélectivité de la séparation. A ces techniques séparatives, sont associés les mêmes types de détecteurs que ceux utilisés en sortie d'HPLC

### **IV-1 Détection UV et UV à barrette de diodes**

Le principe est le même que celui décrit pour l'HPLC. Les limites de détection sont du même ordre de grandeur avec une sensibilité autour de 10 µM pour une détection à longueur d'onde fixe. L'utilisation d'un détecteur à barrette de diodes permet d'améliorer la sensibilité et bien sûr de disposer des caractéristiques spectrales des composés. Les travaux de Mellenthin et Galensa (1999) comparant la CZE et l'HPLC ont montré que la limite de détection est plus élevée en CZE qu'en HPLC (400 à 2000 nM en CZE contre 40 à 120 nM en HPLC). Cela tient au fait que les volumes injectés sont en général 1000 fois plus faibles et que les trajets optiques sont très différents (50µm contre 1 cm) .

### **IV-2 Détection en fluorescence**

La détection en fluorescence peut être couplée à l'électrophorèse capillaire bien que ces techniques soient complexes et peu utilisées pour les phyto-oestrogènes. Beekman et al (1999) ont analysé des échantillons de trèfle rouge en MEKC en caractérisant la fluorescence des composés induite par un laser (275 nm). Grâce à un détecteur de type « Diode Array » ils ont pu enregistrer les spectres d'émission en fluorescence. Cette technique très particulière n'est pas d'une grande sensibilité puisque sa limite de détection est de l'ordre de 100 à 400 nM. En revanche, elle permet d'obtenir en ligne les spectres d'émission en fluorescence des composés pour identification future. Comme précédemment mentionnée, cette technique ne peut s'appliquer à des composés non fluorescents.

### **IV-3 Détection électrochimique**

La détection électrochimique a été adaptée à l'électrophorèse capillaire mais les champs électriques élevés appliqués aux bornes des capillaires peuvent perturber la détection. L'utilisation de ces techniques est anecdotique, et les limites de détection ne sont pas très intéressantes puisqu'elles sont de l'ordre de la centaine de nM.

### **IV-4 Spectrométrie de Masse**

Même si la spectrométrie de masse est sans doute bien adaptée à la détection en sortie d'électrophorèse capillaire, elle a été très peu utilisée pour les phytoestrogènes. La sensibilité peut être considérablement améliorée par le suivi d'ions sélectionnés. Dans ces conditions la limite de détection atteint 1 µM (voir tableau 2).

## **V- Les méthodes analytiques non quantitatives**

### **V-1 Spectroscopie UV et IR**

Si ces techniques, qui ne sont pas récentes sont peu sélectives lorsqu'elles ne sont pas couplées aux méthodes chromatographiques, elles peuvent être utiles pour obtenir une estimation grossière de l'importance de la fraction polyphénolique dans des matrices complexes, à partir de l'analyse multi-variée des données. Les spectroscopies UV, proche infra-rouge et moyen infra-rouge ont été utilisées pour analyser rapidement les polyphénols de différents vins ainsi que des sauces de soja à des fins de classification.

### **V-2 Maldi-Tof-MS**

Il s'agit de la désorption/ionisation laser assistée par matrice, couplée à la spectrométrie de masse à temps de vol. Le produit à analyser est, préalablement à l'analyse, co-cristallisé avec un acide organique sous forme d'une pastille. Cette pastille est ensuite placée dans l'analyseur où elle est irradiée par des impulsions laser, et l'apport d'énergie induit le processus de désorption. Cette technique ne permet pas de mesurer des concentrations mais plutôt d'analyser une composition en tenant compte de l'importance relative des quantités des différents fragments retrouvés après bombardement. Cette technique a été utilisée pour analyser le profil d'isoflavones dans des échantillons de soja avant et après transformation. Elle permet ainsi de déterminer les changements induits par les procédés de transformation et notamment pour les isoflavones, les proportions des formes glycosylées et des formes glycosylées estérifiées (acétyl-, malonyl-).

## **VI- Les méthodes de quantification immunologiques**

Ces méthodes utilisent la faculté d'un anticorps spécifique de reconnaître son antigène. Elles sont le plus souvent d'une grande spécificité et d'une grande sensibilité et ne requièrent pas forcément d'appareillages lourds quand on évite d'utiliser des radio-éléments. Simples à mettre en œuvre, elles ne nécessitent pas de connaissances poussées en chimie, et permettent des analyses en routine d'un grand nombre d'échantillons (jusqu'à plusieurs centaines par jour pour les radio-immunodosages). Toutefois, elles présentent un inconvénient majeur par rapport aux techniques chromatographiques du fait qu'avec un anticorps bien spécifique on ne peut détecter qu'un seul composé et que l'obtention d'un tel anticorps spécifique d'une petite molécule est complexe, nécessite de faire appel à des spécialistes en synthèse organique et implique de vérifier l'absence de réactions croisées avec des molécules de structure voisine. Enfin, l'utilisation de la spécificité de la réaction anticorps - antigène permet de s'affranchir d'un grand nombre d'étapes de purification des extraits qui étaient nécessaires pour la mise en œuvre des méthodes précédentes. Il est même possible de travailler sur des mélanges complexes au sein desquels l'anticorps sera capable de reconnaître spécifiquement son antigène.

### **VI-1 Les radio-Immunodosages (RIA)**

Le principe général est un dosage par compétition. On présente à l'anticorps deux types de molécules : une molécule native et une molécule radio-marquée au tritium, à  $^{125}\text{I}$  ou au  $^{14}\text{C}$  généralement pour les polyphénols. Dans tous les tubes d'une série, la quantité d'anticorps est la même ainsi que la quantité de molécule marquée. Seule la quantité de molécule native change. Cette quantité est soit connue (dans les tubes recevant la gamme de concentration de référence) soit inconnue dans les échantillons à doser. Il va alors s'opérer une compétition entre molécules natives et marquées pour l'anticorps. Plus la concentration en molécule native est importante, plus cette dernière se lie à l'anticorps. Moins la concentration en molécule native est importante, moins elle se lie à l'anticorps et plus ce dernier se lie à la molécule marquée. On sépare ensuite les complexes anticorps-antigènes et molécules libres par centrifugation et on compte la radioactivité dans le culot. La gamme de référence permet d'associer une intensité radioactive à une concentration en molécule native. On obtient alors une courbe standard qui est confrontée à l'intensité de la radioactivité des échantillons

inconnus. On détermine ainsi la quantité de molécule native dans ces échantillons. La limite de détection de ce type de dosage est très grande puisqu'elle permet de descendre à des niveaux de l'ordre du nM. Toutefois la manipulation de la radioactivité est fastidieuse et coûteuse. Elle nécessite la mise en place de système de suivi des opérateurs, et de gestion des déchets.

### **VI-2 Méthodes immuno-enzymatiques**

Le principe de base de ces méthodes qui peuvent être déclinées en différentes variantes (ELISA, EIA, technique dite « sandwich ») repose comme précédemment sur le principe d'une compétition entre une molécule native et une molécule marquée ou immobilisée pour un anticorps spécifique. Les variantes se caractérisent par diverses façons d'immobiliser les molécules marquées avant quantification. Le marquage est cette fois de type enzymatique et non plus radioactif. La molécule marquée est en fait couplée à une enzyme dont la présence est ensuite révélée par l'addition d'un substrat qui change de couleur en présence de cette enzyme. Les dosages ne se font plus en tubes mais plus généralement sur des plaques de microtitration. Pour une bonne quantification on mènera en parallèle sur une plaque une gamme étalon et des échantillons. Les avantages de cette technique est qu'elle est simple, rapide et peu coûteuse. Ces techniques sont largement utilisées dans les laboratoires d'analyse médicale ou agroalimentaire, et si leur sensibilité est moins bonne qu'en RIA elle est tout de même de l'ordre de la dizaine de nM.

### **VI-3 Méthodes en immunofluorescence**

Plus récentes que les précédentes elles sont toujours basées sur le même principe mais cette fois elles utilisent un marquage par une molécule fluorescente particulièrement choisie pour l'intensité de son émission après une excitation à une longueur d'onde donnée. Cette émission, qui peut être détectée en utilisant des filtres spéciaux, permet la détection de très faibles quantités de molécule marquée ce qui permet d'obtenir une sensibilité plus grande qu'en immuno-enzymologie. Avec ces méthodes on atteint les sensibilités des RIA, soit le nM. Toutefois ces techniques sont plus lourdes et les appareillages à mettre en œuvre plus onéreux.

### **Conclusion**

Les différentes techniques inventoriées dans ce chapitre présentent toutes des points positifs et des points négatifs (cf. tableaux 1 et 2). Si les plus utilisées aujourd'hui sont les techniques chromatographiques, le choix du mode de détection s'avère déterminant et doit être réfléchi en fonction de ce qui est recherché et du type de matrice sur laquelle l'analyse est effectuée. L'HPLC couplée à un détecteur UV (de préférence à barrette de diodes) convient pour analyser les phyto-estrogènes présents dans les graines de soja ou le trèfle rouge compte tenu des concentrations qui y sont généralement trouvées, et la technique permet de quantifier les formes aglycones comme les formes glycosylées. En revanche, dès lors qu'il s'agit d'effectuer des dosages à partir d'autres types de végétaux, d'aliments, ou d'échantillons biologiques (plasma, tissus), seules la détection électrochimique ou la spectrométrie de masse permettront d'atteindre des niveaux de sensibilité suffisants.

Si ces techniques permettent d'analyser simultanément une famille de composés, ou un ensemble de molécules, pour peu que la méthode ait été préalablement optimisée et la calibration réalisée, l'obtention de l'échantillon "prêt à analyser" nécessite toute une série de manipulations longues et souvent délicates se traduisant par des pertes au cours du processus. De plus, elles font appel à du matériel sophistiqué et onéreux.

Les méthodes immunologiques, même si elles sont développées à chaque fois pour une entité chimique particulière, présentent des avantages certains du fait qu'elles sont très sensibles, peu onéreuses (du moins une fois l'anticorps obtenu) et sont susceptibles d'être automatisées permettant ainsi de faire de l'analyse à haut débit. Il s'agit là d'un point important pour pouvoir envisager d'aborder efficacement le suivi de l'exposition de l'homme à certains phyto-estrogènes via son alimentation.



Si on dispose aujourd'hui d'un éventail important de techniques d'analyse des phyto-estrogènes dans les aliments, les tissus et les fluides biologiques, il est clair que chaque laboratoire met en œuvre sa technique propre, tant pour les étapes d'extraction et de purification que pour les méthodes de séparation et de quantification. L'absence de méthode de référence, dûment validée, qui serait mise en œuvre par les laboratoires effectuant des analyses de contrôle, se fait cruellement sentir. Les résultats d'une analyse circulaire effectuée en 2001 (Verbruggen, 2001) et compilée dans Bennetau (2003) et concernant les isoflavones (cf. tableau 3), sont éloquents et indiquent bien le réel besoin d'un minimum d'harmonisation dans les procédures opératoires. Il conviendrait également de définir si l'accent doit être mis sur le développement de méthodes destinées à quantifier les formes conjuguées et aglycones des phyto-estrogènes dans les aliments, ou l'optimisation des conditions d'hydrolyse des conjugués permettant de limiter l'analyse finale aux aglycones qui sont les formes biologiquement actives (cas des isoflavones) ou leurs précurseurs (cas des entérolignanes).

## Points clés et recommandations

### Points clés

- ❖ Si les principales techniques de chimie analytique sont susceptibles d'être appliquées aux phyto-estrogènes, le choix doit être fonction du but recherché. La détection dans l'UV (avec ou sans barrette de diodes) en sortie d'HPLC convient parfaitement pour l'analyse des produits à base de soja. La sensibilité de la détection électrochimique permet d'analyser aglycones, glucuronides et sulfates de phyto-estrogènes dans les fluides biologiques. La spectrométrie de masse associée à la chromatographie liquide ou gazeuse est particulièrement adaptée à la mise en évidence et à l'identification de nouvelles structures. Enfin, le faible coût et la sensibilité des techniques immunologiques permettent d'envisager des analyses à haut débit.
- ❖ Pour la quantification, la technique la plus utilisée à ce jour est l'HPLC-MS malgré un coût élevé et une utilisation en routine délicate. La GC-MS a également fait ses preuves et les méthodes immunologiques se développent progressivement.
- ❖ Les techniques chromatographiques permettent la quantification de plusieurs composés à la fois alors que les techniques immunologiques sont spécifiques d'un seul composé.
- ❖ La préparation des échantillons avant dosage est une étape clé. Elle peut influencer le résultat qualitatif et quantitatif concernant la composition des mélanges en molécules glycosylées (formes acétylées, malonylées, glucosylées). Les formes potentiellement actives sont les formes aglycones.

### Recommandations

#### **1 - Recommandations à visée de connaissance et de recherche**

Il s'avère nécessaire :

- De standardiser les méthodes d'analyses et les méthodes de préparations des échantillons. En outre, il faudrait développer des méthodes d'analyses simples, rapides, fiables, sensibles et peu onéreuses pour permettre leur utilisation systématique dans les études cliniques.
- De favoriser le développement des méthodes sensibles de dosage des entérolignanes dans les fluides biologiques.

#### **2 - Recommandations de santé publique**

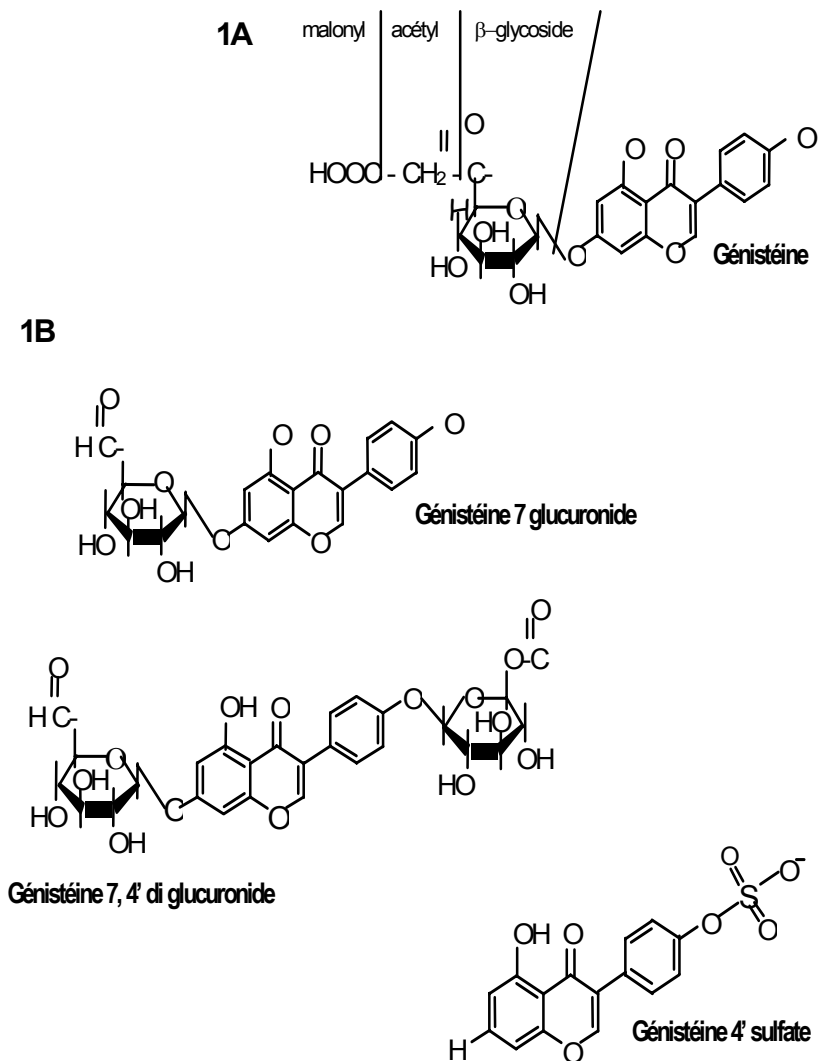
Dans les préparations alimentaires, le dosage des isoflavones doit être exprimé en équivalents aglycones, compte-tenu de l'instabilité des formes glycosylées et du fait que ce sont les aglycones qui franchissent la barrière intestinale. Ceci permettrait de mieux appréhender l'exposition de l'Homme.

Pour l'évaluation scientifique des produits, il sera nécessaire de mentionner l'origine des données portées sur les préparations (nom ou n° d'accréditation du laboratoire d'analyse, méthode employée).

#### **3 - Recommandations à visée d'information du consommateur**

L'étiquetage doit préciser la teneur en phyto-estrogènes, exprimée en équivalents aglycones pour les isoflavones.

**Figure 1 : Différentes formes d'isoflavones présentes dans les aliments (1A) et dans les fluides biologiques (1B)**



**Tableau 1. Comparaison des différentes techniques d'analyse des phyto-estrogènes**

Techniques	Sensibilité	Spécificité	Avantages	Inconvénients
GC-MS	50 fmol	Haute	Haute résolution Idéale pour les échantillons inconnus	Préparation des échantillons complexes
HPLC				
- UV et DAD	2 pmol	Modérée & meilleure avec DAD	Bonne pour les aliments et les conjugués	Sensibilité faible
- Fluorescence	200 fmol	Bonne	Sensible	Limitée aux produits fluorescents Pas pour les produits inconnus
- ED et Array	20 fmol	Meilleure avec array	Bon pour les fluides biologiques	Résolution limitée
- MS	1-500 fmol	Haute	Sensible	
CE				
- UV (DAD)	50 fmol	Modérée & meilleure avec DAD	Haute séparation & résolution	Echantillons de faibles volumes et très concentrés
- Fluorescence	1-5 fmol	Modérée	Sensible	Limitée aux produits fluorescents Spécificité limitée
- ED	1-2 fmol	Modérée	Sensible	Interface difficile et résolution faible
- MS	100 amol	Haute	Sensible	
UV et IR spectroscopie	NA	B Assez bonne	Echantillons de grande taille	Manque de spécificité
MALDI-MS	100 fmol	Haute	Echantillons de grande taille	Pas de quantification
Immunodosages	1-100 fmol	Bonne	Echantillons de grande taille	Réactions croisées.

**Tableau 2 : Techniques, limites de détection et articles de référence**

Technique/composés	Limites de détection				Ref.
<b>GC-MS</b>					
	pmol	nM	Ng/ml	ppm	
- Lignanes & isoflavones plasmatiques		0,1			Adlercreutz 1991
- Lignanes & isoflavones fécaux		1-4			Adlercreutz 1995
- 8-Prénylnaringénine			5		Tekel 1999
- Isoflavones coumestrol & lignanes alimentaires				0,02	Mazur 1996
<b>HPLC-UV</b>					
- Isoflavones	7,4	370	100	2	Wang 1990
<b>HPLC DAD</b>					
- Daidzéine	0,11 – 1,1	5,5 – 54,3	1,3 – 13,8		Franke 1994, Franke 1998
- Génistéine	0,18 – 0,5	8,8 – 26,6	2,4 – 9,9		Franke 1994, Franke 1998
- Formononétine	0,15	7,3	2,0		Franke 1994
- Biochanine A	0,26	13,0	3,7		Franke 1994
- Equol	3,3	164,2	39,7		Franke 1998
- O-Desméthylangolensine	1,0	50,2	13,0		Franke 1998
- Coumestrol	1,3	67,4	18,1		Franke 1998
<b>HPLC Fluorescence</b>					
- Coumestrol				0,5	
- Quercétine	10	0,5	0,15		Hollman 1996
- Kaempférol	4	0,2	0,05		
<b>HPLC-ED</b>					
- Génistéine	0,02 – 0,2	0,19 - 37	0,05 – 10		Setchell 1987, Gamache 1998, Kitada 1986
- Daidzéine	0,04 – 0,32	0,39 – 15,8	0,10 – 4,0		Setchell 1987, Gamache 1998, Kitada 1986, Franke 1996
- Coumestrol	0,06 – 0,12	0,56 – 4,9	0,15 - 1,3		Setchell 1987, Gamache 1998
- Equol	0,03 – 0,59	2,5 – 29,7	- 7,2		Gamache 1998, Franke 1996, Nurmi 1999
- O-Desméthylangolensine	0,03 – 1,7	3,3 – 85,2	0,9 – 21,8		Nurmi 1999, Franke 1996
- Daidzine	0,04 – 0,07	1,6 – 7,3	0,9 - 21,8		Gamache 1998, Nurmi 1999
- Génistéine	0,09	9,3	4,0		Nurmi 1999
- Entérodol	0,02 – 0,11	1,9 - 4,4	0,6 - 1,3		Gamache 1998
- Entérolactone	0,02	2,1 - 4,9	0,6 – 1,3		Gamache 1998, Nurmi 1999
<b>HPLC-MS</b>					
- Daidzéine			0,025 -	- 0,2	Satterfield (2001), Barnes (1998)
- Génistéine			0,0027 -	- 0,7	Satterfield (2001) Barnes (1998)
- Isoflavones	0,3	15	3,9		Holder (1999)

**Tableau 2 (suite) : Techniques, limites de détection et articles de référence**

Technique/composés	Limites de détection				Ref.
<b>CE-UV(DAD)</b>					
- Génistéine	0,015-0,049	1480-4900	400-1330		Wang 1998
- Daidzéine	0,048-0,55	4800-5500	1220-1400		Wang 1998
- Biochanine A	0,048	4800	1370		Wang 1998
- Puerarine	0,040	3990	1660		Wang 1998
- Daidzine	0,043	4255	1770		Wang 1998
<b>CE-FL</b>					
- Isoflavones	0,001	100-400	27-108		Beekman 1999
<b>CE-ED</b>					
Daidzéine	0,001-0,0012	190-241	748-948		Chen 2001
Quercétine	0,0011	225	745		Chen 2001
Puérarine	0,0017	344	826		Chen 2001
<b>CE-MS</b>					
- Isoflavones	0,0001	6	22,2		Aramendia 1995
<b>Spectre IR et UV</b>					
	NA	NA	NA	NA	
<b>MALDI</b>					
Isoflavones	NA	NA	NA	NA	Wang 2000
<b>Immunodosages</b>					
<b>RIA (<sup>3</sup>H)</b>					
- Formononétine	0,7 -	1,4 -	0,38 - 4	- 0,05	Wang 1994, Wang 1998
<b>RIA (<sup>125</sup>I)</b>					
- Daidzéine	0,0016-0,008	0,016-0,08	0,004-0,002		Lapcik 1997, Lapcik 1998
- Génistéine	0,0044-0,015	0,044-0,15	0,012-0,004		Lapcik 1998a, Lapcik 1998b
<b>ELISA</b>					
- Genistéine	1,85-	185			Kohen 1999, Le Houérou 2000, Bennetau 2003
- Daidzéine					Le Houérou 2000
- Equol					Bennetau 2000
- Biochanine A					Le Houérou 2000, Bennetau 2000
- Formononétine					Le Houérou 2000, Bennetau 2000
<b>ImmunoFluoroassay</b>					
- Entérolactone	0,007	0,35	0,1		Adlercreutz 1998
- Daidzéine	0,007-0,02	0,35-2,0	0,089-0,5		Kohen 1998
- Génistéine	0,011	0,55	0,015		Uehara 2000
- Daidzine	0,006	0,6	0,25		Kohen 1998

**Tableau 3. Comparaison des résultats de dosages de 6 échantillons de soja par 22 laboratoires différents répartis dans le monde. Les méthodes sont à chaque fois différentes et les analyses ont été faites en aveugle dans le cadre de l'«International Acacis ring test» (Verbruggen, 2001)**

Numéro des Laboratoires	Génistéine		Daidzéine		Génistéine		Daidzéine		Génistéine		Daidzéine	
	Echantillons 1-2		Echantillons 1-2		Echantillons 3-4		Echantillons 3-4		Echantillons 5-6		Echantillons 5-6	
<b>1</b>	5,59	6,59	6,59	7,26	14,87	8,45	31,34	31,46	178,13	181,20	128,83	129,17
<b>2</b>	3,66	4,05			13,67	6,70	30,60	26,03	158,48	148,29	116,16	108,49
<b>3</b>	0,54	0,80	6,94	7,09	14,20	7,51	40,28	42,06	166,54	166,22	146,69	163,78
<b>4</b>	0,21	0,15	4,61	4,61	8,55	104,72	23,50	98,25	134,18	4,65	125,51	23,16
<b>5</b>	2,14	3,04	3,55	3,34	16,48	16,48	17,61	18,31	160,90	165,64	95,59	97,96
<b>6</b>	0,29	0,17	1,96	1,84	4,47	2,33	9,46	8,59	31,47	31,02	39,90	39,96
<b>7</b>	1,08	1,29	6,75	7,53	11,64	8,80	27,14	30,77	164,05	164,24	115,57	116,20
<b>8</b>	0,88	1,24	6,38	7,13	14,34	8,72	29,07	32,09	31,49	29,63	65,10	61,44
<b>9</b>	2,14	2,87	6,76	7,20	15,04	12,85	31,53	44,20	224,67	211,49	171,82	164,14
<b>10</b>	1,53	2,25	7,62	8,85	14,20	10,92	33,64	43,46	98,16	68,88	103,28	100,05
<b>11</b>	2,05	3,08	4,88	6,31	20,84	15,61	27,40	29,02	59,26	60,75	59,43	63,33
<b>13</b>	0,79	0,68	5,60	6,15	10,44	5,87	27,17	30,76	114,37	109,27	105,74	102,87
<b>15</b>	0,80	1,11	6,80	7,42	9,81	9,07	31,92	34,24	139,25	143,15	122,35	123,61
<b>16</b>	0,27	0,19	5,50	5,32	12,80	5,73	29,56	27,49	164,73	165,38	129,56	128,93
<b>17</b>	1,86	2,33	5,88	5,77	18,66	17,03	26,03	23,67	183,72	177,15	143,55	138,82
<b>18</b>	2,47	2,38	4,94	5,52	22,88	14,91	24,26	27,68	63,10	65,25	82,13	82,11
<b>19</b>	1,38	1,44	12,34	11,34	9,17	10,56	43,18	47,94	17,12	28,84	24,69	22,29
<b>20</b>	1,39	2,27	8,11	10,17	15,91	12,14	30,79	34,70	58,15	63,36	57,04	61,11
<b>21</b>	4,99	5,48			22,92	6,39	26,63	28,43	121,40	115,10	103,30	90,73
<b>22</b>	6,55	8,35	9,40	9,50	42,16	41,35	62,70	60,93				
<b>23</b>	0,44	0,31	5,74	5,90	7,77	5,86	12,78	12,16	11,26	11,23	14,17	17,53
<b>24</b>	1,21	1,20	6,11	5,69	13,15	10,93	24,41	30,58	58,48	55,71	59,05	59,15
Nombre de laboratoires	22	22	20	20	22	22	22	22	21	21	21	21
Moyenne	1,92	2,33	6,32	6,70	15,18	15,59	29,14	34,67	111,38	103,16	95,69	90,23

Dans une même colonne se trouvent les résultats des analyses d'un même échantillon par les différents laboratoires

- Adlercreutz, H., Fotsis, T., Bannwart, C., Wahala, K., et al. (1991) Isotope dilution gas chromatographic-mass spectrometric method for the determination of lignans and isoflavonoids in human urine, including identification of genistein. *Clin Chim Acta*, 199, pp.263-78.
- Adlercreutz, H., Fotsis, T., Kurzer, M.S., Wahala, K., et al. (1995) Isotope dilution gas chromatographic-mass spectrometric method for the determination of unconjugated lignans and isoflavonoids in human feces, with preliminary results in omnivorous and vegetarian women. *Anal Biochem*, 225, pp.101-8.
- Adlercreutz, H., Wang, G.J., Lapcik, O., Hampl, R., et al. (1998) Time-resolved fluoroimmunoassay for plasma enterolactone. *Anal Biochem*, 265, pp.208-15.
- Barnes, K.A., Smith, R.A., Williams, K., Damant, A.P., et al. (1998) A microbore high performance liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry method for the determination of the phytoestrogens genistein and daidzein in comminuted baby foods and soya flour. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 12, pp.130-8.
- Beck, A.B. (1964) The oestrogenic isoflavones of subterranean clover. *Austr J Agric Res*, 15, pp.223-30.
- Bennetau-Pelissero, C., Le Houerou, C., Lamothe, V., Le Menn, F., et al. (2000) Synthesis of haptens and conjugates for ELISAs of phytoestrogens. Development of the immunological tests. *J Agric Food Chem*, 48, pp.305-11.
- Chen, G., Zhang, J., Jiannong, Y. (2001) Determination of puerarin, daidzein and rutin in *Pueraria lobata* (Wild.) Ohwi by capillary electrophoresis with electrochemical detection. *J Chromatogr A*, 923, pp.255-62.
- Franke, A.A., Custer, L.J. (1994) High-performance liquid chromatographic assay of isoflavonoids and coumestrol from human urine. *J Chromatogr B Biomed Appl*, 662, pp.47-60.
- Franke, A.A., Custer, L.J. (1996) Daidzein and genistein concentrations in human milk after soy consumption. *Clin Chem*, 42, pp.955-64.
- Franke, A.A., Custer, L.J., Wang, W., Shi, C.Y. (1998) HPLC analysis of isoflavonoids and other phenolic agents from foods and from human fluids. *Proc Soc Exp Biol Med*, 217, pp.263-73.
- Gamache, P.H., Acworth, I.N. (1998) Analysis of phytoestrogens and polyphenols in plasma, tissue, and urine using HPLC with coulometric array detection. *Proc Soc Exp Biol Med*, 217, pp.274-80.
- Holder, C.L., Churchwell, M.I., Doerge, D.R. (1999) Quantification of soy isoflavones, genistein and daidzein, and conjugates in rat blood using LC/ES-MS. *J Agric Food Chem*, 47, pp.3764-70.
- Kitada, Y., Ueda, Y., Yamamoto, M., Ishikawa, M., et al. (1986) Determination of isoflavones in soy bean by high-performance liquid chromatography with amperometric detection. *J Chromatogr*, 366, pp.403-6.
- Kohen, F., Gayer, B., Amir-Zaltsman, Y., Ben-Hur, H., et al. (1999) A nonisotopic enzyme-based immunoassay for assessing human exposure to genistein. *Nutr Cancer*, 35, pp.96-103.
- Kohen, F., Lichter, S., Gayer, B., DeBoever, J., et al. (1998) The measurement of the isoflavone daidzein by time resolved fluorescent immunoassay: a method for assessment of dietary soya exposure. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 64, pp.217-22.
- Lapcik, O., Hampl, R., al-Maharik, N., Salakka, A., et al. (1997) A novel radioimmunoassay for daidzein. *Steroids*, 62, pp.315-20.
- Lapcik, O., Hampl, R., Hill, M., Wahala, K., et al. (1998) Radioimmunoassay of free genistein in human serum. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 64, pp.261-8.
- Lapcik, O., Hill, M., Hampl, R., Wahala, K., et al. (1998) Identification of isoflavonoids in beer. *Steroids*, 63, pp.14-20.
- Le Houerou, C., Bennetau, B., Pelissero, C., Arnal Schbenel, B., et al. (2000) Synthesis of novel hapten-protein conjugates for production of highly specific antibodies to formononetin, daidzein and genistein. *Tetrahedron*, 56, pp.295-301.
- Mazur, W., Fotsis, T., Wahala, K., Ojala, S., et al. (1996) Isotope dilution gas chromatographic-mass spectrometric method for the determination of isoflavonoids, coumestrol, and lignans in food samples. *Anal Biochem*, 233, pp.169-80.
- Nurmi, T., Adlercreutz, H. (1999) Sensitive high-performance liquid chromatographic method for profiling phytoestrogens using coulometric electrode array detection: application to plasma analysis. *Anal Biochem*, 274, pp.110-7.
- Satterfield, M., Black, D.M., Brodbelt, J.S. (2001) Detection of the isoflavone aglycones genistein and daidzein in urine using solid-phase microextraction-high-performance liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*, 759, pp.33-41.
- Setchell, K.D., Welsh, M.B., Lim, C.K. (1987) High-performance liquid chromatographic analysis of phytoestrogens in soy protein preparations with ultraviolet, electrochemical and thermospray mass spectrometric detection. *J Chromatogr*, 386, pp.315-23.
- Tekel, J., Daeseleire, E., Heeremans, A., van Peteghem, C. (1999) Development of a simple method for the determination of genistein, daidzein, biochanin A, and formononetin (biochanin B) in human urine. *J Agric Food Chem*, 47, pp.3489-94.
- Uehara, M., Lapcik, O., Hampl, R., Al-Maharik, N., et al. (2000) Rapid analysis of phytoestrogens in human urine by time-resolved fluoroimmunoassay. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 72, pp.273-82.
- Verbruggen, M. A., van Rooijen J. J. M. (2001). Analysis of isoflavones – results of a ring test. "4th International Symposium on the role of soy in preventing and treating chronic disease, November 4-7, 2001, in San Diego, California, USA.
- Wang, C.C., Prasain, J.K., Barnes, S. (2002) Review of the methods used in the determination of phytoestrogens. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 777, pp.3-28.
- Wang, C.Y., Huang, H.Y., Kuo, K.L., Hsieh, Y.Z. (1998) Analysis of *Puerariae radix* and its medicinal preparations by capillary electrophoresis. *J Chromatogr A*, 802, pp.225-31.
- Wang, J., Sporns, P. (2000) MALDI-TOF MS analysis of isoflavones in soy products. *J Agric Food Chem*, 48, pp.5887-92.
- Wang, T., Tanaka, Y., Han ZCheng, J. (1994) Radioimmunoassay for quantitative analysis of formononetin in blood plasma and rumen fluid of wethers fed red clover. *J Agric Food Chem*, 42, pp.1584-7.
- Wang, W. (1998) Radioimmunoassay determination of formononetin in murine plasma and mammary glandular tissue. *Proc Soc Exp Biol Med*, 217, pp.281-7.





# Estimation des apports en phyto-estrogènes dans la population française

*Isabelle Berta-Vanrullen, Marine Oseredczuk, Nawel Bemrah-Aouachria, Marina Touillaud, Alexandra Tard, Mariette Gerber*

L'estimation des apports alimentaires en phyto-estrogènes est essentielle pour l'évaluation, aussi bien sur le plan de la sécurité que celui du bénéfice éventuel de ces substances. Dans l'idéal, en terme de sécurité, la connaissance de l'exposition de la population à ces substances permet de situer les apports par l'alimentation actuelle par rapport aux doses auxquelles des effets indésirables pourraient être observés. De même, en terme de bénéfice, cette estimation permet de comparer les apports aux doses auxquelles des effets favorables peuvent être observés. Dès lors, il est également envisageable de positionner des gammes de concentrations qui ont un sens au regard de la définition réglementaire des compléments alimentaires, c'est à dire les « denrées alimentaires dont le but est de compléter le régime alimentaire normal et qui constituent une source concentrée de nutriments ou d'autres substances ayant un effet nutritionnel ou physiologique seuls ou combinés, commercialisés sous forme de doses, à savoir les formes de présentation telles que les gélules, les pastilles, ... destinées à être prises en unités mesurées de faible (directive 2002/46/CE).

L'estimation de ces apports nécessite de disposer de deux types de données : données de composition des aliments d'une part et données de consommation de ces aliments d'autre part. Enfin, pour avoir un sens, cette estimation doit dans la mesure du possible être réalisée sur la population cible de l'analyse de risque, soit la population française dans notre cas. Malheureusement, la faible disponibilité actuelle de ces données constitue une limite majeure à cette estimation. En terme de composition des aliments, il n'existait pas de table pré-établie adaptée à la situation française : un axe majeur de ce rapport aura donc été d'initier la réalisation d'une telle table. Sur le plan des consommations, une première approche fondamentale a pu être entreprise pour estimer les apports en se fondant sur l'enquête de consommation alimentaire INCA 99 (CREDOC-AFSSA-DGAL, 2000), représentative de la population française. Cette enquête nous a permis d'accéder d'une part aux apports en isoflavones (daïdzéine et génistéine) dans la population générale non consommatrice de soja, et d'autre part aux apports chez les individus qui consomment spécifiquement des produits à base de soja. Toutefois, des travaux sont encore nécessaires pour préciser les apports en phyto-estrogènes dans ce sous-groupe de populations, dont les comportements alimentaires particuliers favorisent la consommation de l'une des sources majeures en phyto-estrogènes. Enfin, les consommateurs de compléments alimentaires constituent un autre groupe particulier de population du fait de leur exposition plus élevée à ces substances, mais là encore, peu de données permettent d'estimer leurs apports réels.

La réalisation d'une table de composition en phyto-estrogènes adaptée aux aliments consommés en France est un projet de grande envergure initié ici. On s'attardera donc ci-dessous et dans l'annexe 2a, sur la méthodologie suivie, les limites de la table dans son état actuel et les questions que sa réalisation ont soulevées. Les apports individuels en phyto-estrogènes (génistéine et daïdzéine) dans la population française seront ensuite estimés à partir de cette table de composition et de l'enquête de consommation alimentaire INCA 99 (CREDOC-AFSSA-DGAL, 2000). Enfin, ces apports seront discutés au regard de points de référence tels que la situation dans d'autres pays (asiatiques ou européens), l'évolution en France des données de vente des produits à base de soja, et les teneurs des compléments alimentaires en phyto-estrogènes.

## **I - Table de composition des aliments en phyto-estrogènes des aliments consommés en France (Oseredczuk 2004)**

Parmi les molécules appartenant à la classe des isoflavones, on peut citer entre autres la génistéine, la daïdzéine, la glycitéine, la biochanine A (précurseur de la génistéine) ou la formononéine (précurseur de la daïdzéine). Le chapitre « Répertoire des molécules » en

donne une liste plus complète et montre leurs éventuelles relations. Toutefois, les données disponibles dans la littérature permettent d'établir une table de composition uniquement pour deux isoflavones, la génistéine et la daïdzéine. Quelques données générales de la littérature peuvent être citées au sujet des lignanes, elles sont précisées plus loin dans ce chapitre. Enfin, pour les autres phyto-estrogènes, des travaux supplémentaires sont nécessaires.

Avant la mise en place de ce groupe de travail, la table de composition des aliments gérée par le Ciqual (Centre Informatique sur la Qualité des Aliments de l'AFSSA) ne contenait pas de données relatives aux phyto-estrogènes, il a donc été décidé de les emprunter à deux sources bibliographiques majeures : la base de données créée lors de l'action concertée européenne VENUS (Vegetal Estrogens in Nutrition and the Skeleton) décrite par Kiely (2003) et une étude américaine de Horn-Ross (2000a). L'adéquation de ces données à la situation française a été vérifiée. Elles ont éventuellement été adaptées, par exemple en remplaçant des données de composition manquantes par des données obtenues à partir de calculs, ou en utilisant une base de recettes des aliments développée par l'OCA. Enfin, la table de composition a été structurée en référence à la liste des 895 aliments de l'enquête de consommation INCA 99 (CREDOC-AFSSA-DGAL 2000).

Au stade actuel des données, le travail effectué n'a pas pour prétention de produire une table de composition française de référence en isoflavones, il permettra de fournir les premiers éléments pour l'évaluation et d'identifier quels efforts seront à produire en vue de l'obtention d'une telle table.

## **I- 1 Méthodes**

### **I-1-1 Sélection de la forme chimique des isoflavones à inclure dans la table de composition**

Un choix s'impose quant à la forme sous laquelle les isoflavones doivent être exprimées dans la table. En effet, dans les aliments, les isoflavones existent sous forme libre, aglycone (daïdzéine, génistéine, glycitéine) ou bien sous forme de 7-O-glucosides, 6-O-glucosides, 6-O-acétylglucosides ou 6-O-malonylglucosides. En l'état actuel des connaissances (pour des raisons analytiques principalement), il n'est pas possible de connaître les teneurs des aliments en chacun des glucosides existants. Il existe en outre davantage de données sur les teneurs en équivalents aglycones dans les aliments. Les teneurs en génistéine et daïdzéine de la table ici réalisée seront données en équivalents aglycones (voir annexe 2a pour d'avantage de précisions).

### **I-1-2 Sélection des données de composition de la littérature**

La première source de données est la base construite dans le cadre de l'action concertée européenne VENUS (Food and Agroindustrial Research project CT-98-4456) (Branca 2003). Il s'agit d'une revue de la littérature scientifique parue avant juin 2000 qui prend en compte 33 sources de données à partir de 1982. Parmi celles-ci, on retrouve celles qui ont servi à la constitution des bases de données United States Department of Agriculture (USDA 2002) sur les isoflavones et IFR NOTIS PLUS de l'Institute of Food Research (Royaume-Uni). La base de données VENUS a été créée pour servir de point de départ à la constitution de bases spécifiques pour quatre pays d'Europe : l'Irlande, l'Italie, les Pays-Bas et le Royaume-Uni. Elle comporte aussi un certain nombre de teneurs en coumestrol (un composé de la famille des coumestanes) et en précurseurs des lignanes (secoisolaricirésinol et matairésinol). La base VENUS indique le nom de l'aliment tel qu'il a été cité par l'auteur de la publication originale et la méthode d'analyse utilisée. Des informations synthétiques sur la préparation des échantillons, l'emploi de standards internes et l'application de contrôle qualité sont données.

La deuxième source de données utilisée pour construire la table française est celle de P. Horn-Ross (2000a). Elle donne les teneurs en génistéine et daïdzéine (parmi d'autres phyto-estrogènes) de 112 aliments ou groupes d'aliments déterminées par HPLC couplée à la

spectrométrie de masse. L'intérêt de cette base est de présenter des résultats analytiques originaux et non une compilation de données antérieures. Toutefois, les aliments qui ont été analysés ont été choisis d'après les consommations de 118 femmes californiennes volontaires (21 afro-américaines, 39 blanches et 58 femmes d'origine mexicaine). Les choix alimentaires de ces personnes sont déterminés entre autres par leurs appartenances culturelles et par l'offre de produits en Californie, or celles-ci diffèrent vraisemblablement de celles des Français. En outre, un même aliment industriel peut être cuisiné selon des recettes différentes d'un pays à l'autre. L'emprunt de données étrangères (qu'elles proviennent de l'article de Horn-Ross ou de la base VENUS) pour constituer une table de composition française a donc été fait avec précaution.

Notons que Pillow (1999) ont effectué leur propre compilation de données bibliographiques. Leur base de données donne des teneurs moyennes des aliments en isoflavones, flavonoïdes, phytostérols, bore et lignanes, mais les valeurs analytiques originales utilisées ne sont pas citées. Or certaines sources utilisées par les auteurs ont déjà été répertoriées dans la base de données VENUS. Les données déterminées par l'équipe de Pillow ont donc été exclues du recueil de données pour éviter de sur-représenter les sources de données communes aux deux bases.

### **I-1-3 Détermination de données de composition par assimilation, par calcul**

Assurément, il ne sera pas possible d'attribuer à chacun des 895 aliments consommés dans l'enquête INCA une teneur en chacun des 2 constituants choisis pour figurer dans la base. Pour éviter de faire des sous-estimations lors d'un calcul d'apport, il est alors préférable, de remplacer les valeurs manquantes par des valeurs logiques. Les équipes des quatre pays qui ont utilisé la banque de données VENUS pour élaborer leur propre base nationale de composition des aliments en isoflavones ont ainsi « emprunté », « converti »<sup>2</sup> ou calculé d'après les recettes des données de composition. Les calculs faits dans le cadre de ce travail s'appuieront sur des recettes moyennes déterminées par l'OCA à l'aide de listes d'ingrédients mentionnées sur les étiquetages et de recettes ménagères. L'utilisation de recettes est d'ailleurs fréquente dans le domaine des tables de composition (Greenfield 2003). Par contre, les quantités d'ingrédients de ces recettes moyennes correspondent à des quantités mises en œuvre et non aux quantités présentes dans le produit fini. Idéalement, lorsque l'aliment composé est cuit, il faudrait connaître le rendement en masse après la cuisson (principalement lié aux transferts d'eau) et le coefficient de rétention du constituant pour le mode de cuisson considéré.

### **I-1-4 Estimation de l'effet de la cuisson**

Les rendements en masse à la cuisson sont relativement bien connus (Greenfield 2003) Selon les cas, ils peuvent conduire à une concentration ou à une dilution plus ou moins forte d'un constituant dans un aliment. La sensibilité du constituant à la cuisson devrait également être prise en compte dans les calculs : des tables de coefficients de rendement ont été déterminées pour certaines vitamines et certains minéraux dans différentes matrices et pour différents protocoles de cuisson (Bergström 1994 ; Bognar 2002), mais de telles informations ne sont pas encore disponibles pour les phyto-estrogènes. Plusieurs études ont cependant été réalisées sur l'effet des procédés de cuisson et de transformation sur les isoflavones. (Coward 1998) ont mis en évidence une conversion des 6-O-malonylglucosides conjugués en  $\beta$ -glucosides conjugués, mais pas de perte du contenu total en isoflavones pour une cuisson au four ou une friture à 190°C de protéines végétales texturées, ou bien lors de la cuisson au four de cookies à base de farine de soja. Anderson (1995) observent eux aussi

---

<sup>2</sup> On peut emprunter une donnée de composition provenant d'un aliment proche. On peut aussi faire des calculs en ayant posé des hypothèses : par exemple, on peut considérer que la teneur en phyto-estrogènes d'un aliment sec peut être calculée à partir de la teneur en phyto-estrogène pour 100g du même aliment à l'état frais.

que les dérivés malonyl sont peu présents dans les graines de soja rôties et supposent que la cuisson les dégrade. Dans le tofu, la réduction de teneur en isoflavones est selon eux imputable au procédé aqueux de fabrication de ce produit. Toutefois, les auteurs concluent que les procédés de transformation (hormis ceux qui comprennent une extraction alcoolique) n'éliminent pas complètement les isoflavones. A l'opposé, plusieurs études tendent à prouver que les isoflavones seraient sensibles à certains modes de cuisson : Singletary (2000) ont étudié l'effet de l'extrusion sur les isoflavones et ont conclu que sur la farine de maïs et les protéines de soja extrudées entre 110 et 150°C, les pertes moyennes en isoflavones totales s'établissaient entre 22 et 26%. Grün (2001) ont cuit à l'eau du tofu entre 80° et 100°C, pendant 10 à 40 minutes. Ils ont observé une perte significative en isoflavones totales, d'autant plus importante que la durée et la température de cuisson étaient grandes (les pertes les plus importantes relevées étant de l'ordre de 30%). Simonne (2000) ont étudié la rétention des isoflavones dans du soja immature du cultivar Hutcheson et ont trouvé des rétentions moyennes des isoflavones totales de 46% lors de la cuisson à l'eau et 53% lors de la congélation. Il semble donc que certains modes de cuisson conduisent à une perte d'isoflavones, mais celle-ci est encore difficilement estimable lors des cuissons ménagères. Il a été considéré dans notre travail que les phyto-estrogènes n'étaient pas dégradés à la cuisson, les transferts d'eau conduisant à une dilution ou à une concentration de ces composés ont par contre été pris en compte dans la mesure du possible.

## **I – 2 Table de composition en génistéine et daïdzéine**

La table de composition est en annexe 2.

### **I-2-1 Lecture de la table de composition**

Dans la table, les aliments sont classés par ordre alphabétique de leur catégorie puis de leur désignation. Les teneurs en génistéine et daïdzéine sont données en µg/100g d'aliment. Le même aliment peut être cité plusieurs fois dans la table parce qu'il appartient à plusieurs catégories distinctes (par exemple le café noir est cité dans les catégories « Café » et « Boissons chaudes »). La mention « tr » pour « traces » a été employée lorsque les documents utilisés pour constituer la table de composition employaient eux-même ce terme ou bien lorsque, faute de valeurs trouvées dans les deux études utilisées pour constituer la table de composition, des articles scientifiques suggéraient la possibilité de présence de phyto-estrogènes dans ces aliments. Des valeurs nulles ont été attribuées à des aliments appartenant à des catégories dans lesquelles l'absence de phyto-estrogènes est consensuelle : les viandes et les poissons sans ingrédient ajouté susceptible de contenir des phyto-estrogènes. Des valeurs manquantes apparaissent lorsque les deux études utilisées ne donnaient pas d'information sur l'aliment en question, ou bien lorsque la similarité des aliments cités dans l'une ou l'autre de ces études avec les aliments consommés en France était incertaine (c'est le cas du pain, par exemple). Enfin, rappelons que le choix des aliments inclus dans cette table a été déterminé par les consommations alimentaires telles qu'elles ont été observées dans l'enquête INCA (895 aliments répertoriés). Ainsi, des aliments qui pourraient présenter un intérêt du fait de leur teneur remarquable en isoflavones pourraient ne pas figurer dans cette table de composition s'ils n'ont pas été consommés par les participants de l'enquête INCA (CREDOC-AFSSA-DGAL, 2000).

### **I-2-2 Commentaire des teneurs en isoflavones par catégories d'aliments**

Les phyto-estrogènes sont évidemment avant tout présents dans les produits végétaux, leur présence dans les produits animaux résultant soit de l'alimentation végétale de l'animal, soit de l'ajout d'un ingrédient à base de soja dans la recette. Si l'on s'intéresse aux produits végétaux, il faut alors séparer le cas du soja et de ses produits dérivés, qui contiennent les plus fortes concentrations en isoflavones, des autres végétaux. La teneur dans les végétaux autres que le soja est en général relativement faible (de l'ordre de quelques microgrammes) mais elle peut monter dans certains cas à quelques dizaines, voire quelques centaines de microgrammes. L'analyse de la teneur des aliments en isoflavones est détaillée ci-dessous.

### I-2-3 Soja et produits dérivés

On entend ici par « soja » le soja jaune ou *Glycine max* et non les germes de haricots mungo *Phaseolus aureus*. Ces aliments sont ceux qui contiennent le plus d'isoflavones. Le tableau 1, constitué d'après les données compilées pour quelques aliments, montre que les teneurs en isoflavones totales de ces produits sont très variables.

**Tableau 1. variabilité des teneurs en isoflavones du tofu, du tonyu et des desserts au soja**

Aliment		Génistéine ( $\mu\text{g}/100\text{gd'aliment}$ )	Daïdzéine ( $\mu\text{g}/100\text{gd'aliment}$ )
Tofu	minimum	738	0
	maximum	39250	25800
	moyenne	14770	10316
	écart-type	8924	6285
	nombre de données	36	35
Tonyu	minimum	100	100
	maximum	9200	13030
	moyenne	3730	3402
	écart-type	3210	3073
	nombre de données	28	28
Desserts soja	minimum	4200	2200
	maximum	29800	30900
	moyenne	17475	17300
	écart-type	11573	12424
	nombre de données	4	4

En ce qui concerne les tonyus et produits dérivés, la variabilité des teneurs observées peut avoir de multiples causes. Sous le nom « tonyu », on peut trouver des produits à base de graines de soja et d'autres faits à partir d'isolats de protéines de soja, dont les teneurs en isoflavones totales seraient environ deux fois moins élevées que celles des premiers. Parmi les tonyus réalisés à base de graines directement, dans certains cas la fraction insoluble « okara » n'est pas éliminée, ce qui peut affecter la teneur en isoflavones totales. La variabilité des teneurs de la graine de soja en isoflavones peut également expliquer la variabilité des teneurs en isoflavones dans les tonyus. Cette teneur des graines de soja en isoflavones totales peut varier du simple au double selon le cultivar et selon la date à laquelle les graines sont semées (Aussenac 1998, Lee 2003). L'étude de Lee a aussi montré des variations, moins importantes toutefois, liées au lieu de culture et à la durée de stockage. Enfin, la fertilisation des sols en potassium, est considérée par Vyn (2002) comme un facteur permettant l'augmentation de la teneur des graines de soja en isoflavones. Ces facteurs (et peut-être d'autres non cités ici) expliquent la forte variabilité des teneurs en isoflavones des aliments à base de graines de soja. Ainsi, Setchell (2003) ont observé des variations du contenu total en isoflavones allant jusqu'à un facteur cinq sur des tonyus commerciaux de marques différentes. Pour une même marque, achetée à plusieurs reprises sur une période de 6 mois, la variation des teneurs en isoflavones totales varie jusqu'à 60%. Le tableau 1 ne fait pas mention de la « crème » de soja, produit qui peut remplacer la crème issue du lait, car c'est un produit récemment développé pour lequel on ne dispose que de peu de données. Signalons simplement que des dosages réalisés sur de la crèmes de soja échantillonnée en France rapportent des concentrations de 70,08  $\mu\text{g}/\text{l}$  de génistéine et 63,16  $\mu\text{g}/\text{l}$  de daïdzéine (Benneteau-Pelissero 2003).

### I-2-4 Légumes, légumineuses et fruits

Les légumes, les légumineuses (autres que le soja) et les fruits sont en dehors du soja les aliments qui contiennent les plus fortes concentrations en isoflavones. Ces teneurs restent toutefois basses.

Les teneurs des **légumes** en isoflavones sont de l'ordre de quelques microgrammes pour 100g, la tomate par exemple contient 3,3µg/100g de génistéine et pas de daïdzéine. Certains légumes se distinguent toutefois par des teneurs plus élevées : les asperges cuites contiennent 28,9µg de daïdzéine pour 100g, les haricots verts jusqu'à 25,5µg de génistéine /100g et 9,5µg daïdzéine pour 100g (selon le mode de cuisson appliqué, il peut contenir plus ou moins d'isoflavones), et les brocolis 14,8µg de daïdzéine pour 100g. Les teneurs en génistéine et daïdzéine des entrées et plats composés dans lesquels ces légumes sont utilisés ont été calculées d'après des recettes en utilisant les teneurs indiquées dans la table.

Les teneurs en génistéine et daïdzéine des **légumineuses** sont mieux connues que celles des autres légumes. Par conséquent, il n'existe quasiment pas de valeurs manquantes dans la table pour cette catégorie d'aliments. Les germes de haricots mungo sont particulièrement riches en isoflavones (314µg de génistéine /100g et 173µg de daïdzéine /100g) et les pois chiches contiennent au moins 10 fois plus d'isoflavones (24,1µg de daïdzéine /100g) que n'importe quelle autre légumineuse cuite (les haricots rouges cuits par exemple contiennent 9,2µg de génistéine /100g et 13µg de daïdzéine /100g ; les lentilles cuites 3,3µg de génistéine /100g et 1,8µg de daïdzéine /100g). Liggins (2000) ont analysé plus d'une centaine de légumes et légumineuses. Les haricots (dont les haricots mungo) et les pois apparaissent comme les aliments de ces catégories les plus riches en isoflavones, ce qu'on retrouve dans les données plus complètes compilées dans la banque de données VENUS.

Les **fruits** (tout comme les légumes) contiennent en général moins de 5 µg de génistéine ou de daïdzéine /100g. Les groseilles et les pamplemousses font exception avec d'une part 178µg de génistéine et 46,1µg de daïdzéine pour 100g, et d'autre part 27,1µg de génistéine /100g et 35,6µg de génistéine /100g. Les **fruits secs** contiennent généralement plus de génistéine que les fruits frais correspondants (ce qu'on explique par une concentration des isoflavones due à la perte d'eau). En particulier, les raisins secs contiennent 62.3µg de génistéine /100g et 29.5µg de daïdzéine /100g.

### **I-2-5 Graines oléagineuses**

Les cacahuètes contiennent entre 15 et 30µg de daïdzéine ou de génistéine /100g. La teneur en génistéine des noisettes est également de cet ordre mais les autres graines oléagineuses contiennent seulement quelques microgrammes de ces molécules pour 100g.

### **I-2-6 Produits céréaliers**

Mazur (1998) indique dans une revue de ses études que les céréales comme le blé, le riz, le maïs, l'orge et l'avoine ainsi que leurs produits dérivés ne contiennent pas d'isoflavones ou alors seulement à l'état de traces. D'après les données compilées, la farine de blé « blanche » ne contiendrait ni daïdzéine, ni génistéine. En revanche, la farine de blé « complète » contiendrait 2,4µg de daïdzéine pour 100g et 14,6µg de génistéine pour 100g. Par ailleurs, une certaine quantité de farine de légumineuses peut-être incorporée lors de la fabrication de produits à base de farine céréaliers. Le nombre de données disponibles sur les farines et les produits céréaliers est trop limité pour déterminer une valeur moyenne représentative qui puisse être incluse dans la table de composition : il serait utile de pallier ce manque pour éviter de sous-estimer les apports en isoflavones, car même si les teneurs en isoflavones de ces farines et produits céréaliers semblent faibles (de l'ordre de la dizaine de microgrammes pour 100g), ils sont fortement consommés. Par exemple, d'après l'enquête Inca, la consommation de pains et biscottes atteint 122,6g/jour/personne chez les adultes, 77g/jour/personne pour les viennoiseries, biscuits et pâtisseries, 36,1g/jour/personne pour les pâtes alimentaires, et enfin 20,8g/jour/personne pour le riz et la semoule.

#### **I-2-6-1 Pain et biscottes**

On peut trouver dans la banque de données VENUS des données sur les teneurs en isoflavones des pains : selon le type de pains, elles varient entre 130 et 1100µg de daïdzéine/100g et entre 150 et 450µg/100g pour la génistéine. A l'évidence d'après ce qui précède, une telle teneur en isoflavones ne peut pas être due aux farines de blé. L'utilisation

de farine de soja dans les pains analysés peut par contre l'expliquer. Peut-on comparer les teneurs en farine de soja des pains en France et celle des autres pays ? Il est en effet possible que les pains de tradition française fabriqués en boulangerie contiennent des isoflavones apportées par la farine de soja et par la farine de fèves (voir annexe 2a). De même, un relevé effectué entre 1996 et 1998 par l'OCA met en évidence l'utilisation, à cette époque, de farine de soja dans des pains de mie industriels de marques connues et dans des produits de marques distributeurs. Des analyses sur les types de farines vendus pour la panification en France, et sur la teneur actuelle en isoflavones des pains industriels sont nécessaires pour établir des certitudes (voir annexe 2a).

#### **1-2-6-2 Céréales pour petit déjeuner**

Les données compilées indiquent que certaines céréales pour petit déjeuner pourraient contenir jusqu'à 68,6µg de génistéine /100g et 53,7µg de daïdzéine / 100g, alors que dans d'autres produits appartenant à la même catégorie de céréales pour petit déjeuner, ces isoflavones ne sont pas détectées. Les marques des aliments analysés sont des marques existantes en France, mais les formulations des produits d'une même marque peuvent différer selon le pays auquel est destiné le produit. Pour déterminer une teneur représentative en isoflavones de chaque type de céréales pour petit déjeuner, il a été choisi de calculer des moyennes à partir des teneurs disponibles dans les différents produits analysés : ces moyennes sont toutes inférieures à 20µg/100g pour la daïdzéine ou génistéine. Si on avait choisi de prendre comme valeur représentative la médiane des valeurs disponibles, les teneurs obtenues auraient été nulles. Les enfants de 6 à 11 ans consomment d'après l'enquête Inca plus de 20g de céréales pour petit déjeuner /jour/ personne : il serait donc utile de disposer de données analytiques fiables et adaptées à la consommation française de ce type de produit.

#### **1-2-6-3 Biscuits, barres céréalières, pâtisseries, viennoiseries**

Les recettes élaborées par l'OCA indiquent que la farine de soja peut être utilisée dans **les biscuits sucrés**, à hauteur de 2 à 7% (dans les gaufrettes fourrées, les biscuits roulés, les goûters chocolatés et les brownies). La restriction de l'utilisation de la farine de soja à ces quelques gâteaux et biscuits sucrés reflète-t-elle les pratiques industrielles ou bien pourrait-on trouver de la farine de soja dans d'autres aliments de cette catégorie? Horn-Ross (2000a) ont mesuré les teneurs en isoflavones de gâteaux, biscuits et muffins sans que les valeurs s'élèvent au dessus du niveau minimal permettant une répétition correcte des mesures (25µg/100g). Dans la base de données VENUS, des teneurs en daïdzéine et génistéine sont disponibles pour 6 biscuits sucrés seulement. Les teneurs de ces 6 biscuits se situent entre 8,8 et 25,9µg de daïdzéine /100g et entre 4,1 et 30µg de génistéine /100g, ce qui n'est pas incompatible avec les résultats de Horn-Ross. 45 types de biscuits ou pâtisseries différents ont été cités dans l'enquête INCA. On aurait pu calculer la moyenne des teneurs en génistéine et daïdzéine connues pour ces 6 biscuits et l'attribuer aux aliments des catégories biscuits et pâtisseries. En procédant ainsi, on aurait limité la sous-estimation des apports en isoflavones, mais les aliments pour lesquels des teneurs en daïdzéine et génistéine sont connues n'ont pas été jugés suffisamment représentatifs de leurs catégories pour permettre cette assimilation. Les catégories biscuits et pâtisseries auront donc beaucoup de valeurs manquantes dans notre table de composition.

Les **barres céréalières** sont susceptibles de contenir des graines de soja et de la farine de soja ainsi que des fruits secs et des graines contenant des isoflavones. Mais les recettes de ces produits sont très variables. En conséquence, la recette moyenne établie par l'OCA n'indique pas la présence d'ingrédients à base de soja. Parmi les données compilées, seule une donnée américaine a été trouvée et elle ne peut pas être tenue comme représentative des produits disponibles en France.

Les ingrédients des **pâtisseries** traditionnelles sont la farine de blé, le sucre, les œufs, le lait, la matière grasse, éventuellement de la levure, de la crème, de la confiture, des épices, du

chocolat, des fruits, et des fruits secs. Les ingrédients des produits industriels sont plus variés et plus difficiles à quantifier car leur recette est souvent confidentielle. Parmi les ingrédients proposés, les raisins secs sont les plus riches en génistéine (62.36 $\mu$ g /100g) et daïdzéine (22.5 $\mu$ g /100g). Dans tous les aliments contenant des raisins secs d'après la base de recette de l'OCA, on a calculé l'apport en isoflavones dû à cet ingrédient : il ne dépasse pas 3 $\mu$ g/100g pour la génistéine ou la daïdzéine. Il a été fait de même avec les pommes, moins riches en isoflavones que les raisins secs, mais utilisées en grande quantité dans certaines pâtisseries : l'apport en isoflavones dans ces produits est inférieur à 1 $\mu$ g/100g de pâtisserie !

Les ingrédients les plus fréquemment utilisés dans **les viennoiseries** sont les farines de blé, de froment ou d'autres céréales, l'eau, la matière grasse végétale, le levain, la poudre de lait, les œufs, le germe de blé, le malt et la lécithine. Ces ingrédients sont peu susceptibles de contenir des isoflavones, à part les œufs. Pour sa part, la lécithine est très faiblement polaire et n'aura donc que peu d'affinité avec les isoflavones sous forme glycosylée (forme sous laquelle se trouverait les isoflavones des plantes) : on doit donc s'attendre à de très faibles taux d'isoflavones dans la lécithine. Dans la base de données VENUS, les teneurs en isoflavones citées pour la lécithine proviennent d'une seule étude et semblent étonnamment élevées au regard de ce qui a été énoncé précédemment : 5400 $\mu$ g de daïdzéine /100g de lécithine et 10300 $\mu$ g de génistéine /100g de lécithine. La difficulté du dosage des isoflavones dans la lécithine est-elle à l'origine d'une sur-estimation de ces teneurs ? En effet, les solvants utilisés pour l'extraction des isoflavones, s'ils sont inadaptés, peuvent entraîner des lipides qui perturberont la chromatographie et les dosages immunologiques. Dans la mesure où la lécithine est un ingrédient courant dans de nombreux produits, il serait pertinent de confronter la valeur citée dans la base de données VENUS avec d'autres mesures obtenues à la suite d'extractions maîtrisées.

#### **I-2-6-4 Pâtes alimentaires et riz**

Les **pâtes alimentaires** sont composées de semoule de blé dur, et éventuellement d'œufs. On trouve quelques données sur les pâtes alimentaires cuites dans la base de données VENUS : elles contiendraient moins de 4 $\mu$ g de daïdzéine ou de génistéine/100g. Ce sont des valeurs très faibles, comme le laissent supposer les teneurs citées pour leurs ingrédients. Les données de la banque de données VENUS sur le **riz** donnent des teneurs en génistéine ou daïdzéine comprises entre 2,5 et 5 $\mu$ g/100g environ. Ce sont des valeurs plus de mille fois inférieures à celles trouvées dans le tofu par exemple, mais la consommation de riz est évidemment supérieure à celle du tofu dans la population générale française. Il peut donc être important de connaître les teneurs en isoflavones de ce type de produits très consommés, même si elles sont très faibles, en vue de l'estimation des apports en isoflavones dans la population française.

#### **I-2-7 Condiments et sauces**

On ne trouve pas de soja ou d'ingrédients faits à partir de soja dans les sauces, sauf dans la sauce soja qui contient 1367 $\mu$ g de génistéine /100g et 936 $\mu$ g de daïdzéine pour 100g. Les ingrédients les plus fréquemment utilisés dans les sauces sont l'huile, le vinaigre, l'eau, le concentré de tomates, différents sucres et amidons, le lait, la crème, la farine de blé, le beurre, les épices et aromates. Pour les épices et les aromates, peu de données sont disponibles mais les teneurs sont élevées pour certains. Pour les autres ingrédients, les données collectées ou déduites d'autres données, montrent qu'ils sont pauvres en isoflavones.

#### **I-2-8 Matières grasses végétales**

Parmi les aliments consommés par les participants de l'enquête Inca se trouvent 12 matières grasses végétales. Il n'y a pas de données dans les deux sources compilées sur tous ces aliments, par contre la base de données de United States Department of Agriculture (USDA 2002) indique que la teneur en isoflavones de l'huile de soja est nulle, alors que les graines de soja entières contiennent d'après cette même base de données entre 59750 et 118510 $\mu$ g



d'isoflavones totales /100g. Fletcher (2003) considère lui aussi que l'huile de soja est dépourvue d'isoflavones, puisqu'elle est obtenue soit par pressage, soit par extraction à l'hexane et que les isoflavones ne sont solubles ni dans l'hexane, ni dans les lipides. On considèrera donc que toutes les huiles végétales et margarines sont exemptes d'isoflavones. Pour les margarines, la base de recettes de l'OCA n'indique pas la présence d'ingrédients à base de soja et l'étude de Horn-Ross n'y a détecté au plus que des traces d'isoflavones.

### **I-2-9 Produits d'origine animale (viandes, poissons, crustacés et mollusques, volailles, gibiers, œufs, laits et dérivés)**

Les données concernant les produits d'origine animale sont détaillés dans l'annexe 2a. En effet, l'emploi du préfixe « phyto » pour qualifier cet ensemble de composés n'exclut pas pour autant de façon absolue leur présence dans des produits d'origine animale. D'une part, la présence d'isoflavones dans des produits d'origine apparemment animale peut s'expliquer par l'utilisation méconnue d'un ingrédient riche en isoflavones. D'autre part, il est possible que les produits issus d'animaux ayant consommé des phyto-estrogènes contiennent ces molécules : c'est ainsi que le métabolite principal de la daïdzéine, l'équol, est présent en faible quantité dans le lait (au plus une dizaine de microgrammes pour 100 ml) (King 1998), (Antignac 2003). En revanche, nous avons estimé que pour la génistéine et la daïdzéine, des teneurs de l'ordre de quelques dizaines de microgrammes dans des produits animaux étaient peu vraisemblables : ainsi, la valeur avancées par Horn-Ross et al (2000a) pour les œufs (27.6µg de daïdzéine pour 100g) n'a pas été retenue dans notre table de composition. Dans la table, en l'absence de données analytiques, on a considéré que les teneurs en isoflavones des produits d'origine animale étaient au plus égales à des traces.

### **I – 3 Limites de la table de composition**

La table de composition en génistéine et daïdzéine des aliments consommés en France réalisée pour ce rapport permet d'estimer l'apport des aliments en ces 2 isoflavones. Cette estimation comporte toutefois une marge d'erreur (mentionnée au cours du chapitre et détaillée en annexe 2) liée d'une part à la faible disponibilité des données sur la composition des aliments en phyto-estrogènes, et d'autre part aux difficultés liées à l'utilisation de compilations de données. En outre, on peut considérer que la table réalisée est légèrement sous-estimée, notamment par la difficulté de prendre en compte l'incorporation de farine de soja dans de nombreux produits industrialisés.

#### **REMERCIEMENTS**

*Ce travail a été possible grâce à l'utilisation de la banque de données VENUS. Nous remercions particulièrement les auteurs de cette banque de données ainsi que le Pr. Francesco Branca qui nous y a donné l'accès.*

### **II - Estimation des apports individuels en isoflavones par l'alimentation dans la population française (Bemrah-Aouachria 2004)**

Plusieurs raisons amènent au choix de l'enquête de consommation alimentaire INCA 99 (CREDOC-AFSSA-DGAL, 2000) pour estimer les apports en isoflavones à partir de la table de composition présentée ci-dessus : cette enquête est représentative de la population française, elle permet d'accéder à une estimation des apports individuels, elle est relativement récente, enfin cette enquête devant être renouvelée périodiquement, un suivi dans le temps des apports selon cette méthodologie est envisageable.

En revanche, l'enquête INCA n'ayant pas été conçue de façon à se focaliser sur les apports des groupes particuliers de population (végétariens, etc.), elle donne avant tout accès à l'apport en isoflavones dans un régime alimentaire occidental traditionnel. La consommation de produits à base de soja (essentiellement « yaourts » au soja, tonyu, tofu) émerge réellement depuis peu d'années, et l'hypothèse peut être faite qu'elle est encore en majorité cantonnée dans des sous-groupes de population ayant des comportements alimentaires particuliers (végétariens, personnes excluant les produits laitiers, etc.). De ce fait, sont analysés de façon totalement disjointe l'apport en isoflavones à partir des 3 produits à base

de soja sélectionnés et l'apport par les autres catégories alimentaires. Les apports sont alors estimés exclusivement sur la base de la consommation d'aliments à base de soja, les apports par d'autres sources devenant en effet négligeables. Toutefois dans ces derniers calculs, les apports en isoflavones dus à la consommation d'aliments à base de soja doivent être considérés comme indicatifs, car le faible effectif de la population consommatrice de ces aliments dans l'enquête INCA combiné au mode d'enregistrement sur une semaine unique dans l'année, limite la portée des valeurs estimées. Certains des écarts-types résultant des calculs sont illustratifs à cet égard. Enfin, l'enquête INCA inclut des enfants âgés de 3 ans et plus, ce qui exclut l'accès à l'exposition des nourrissons par ce moyen.

Les apports en génistéine et daïdzéine ont été estimés dans les populations générales d'adultes et d'enfants séparément, mais également par sexe et par classe d'âge dans ces mêmes populations. Cette approche stratifiée permet d'évaluer l'apport dans des populations cibles, telles que les femmes ménopausées (50 ans et plus) par exemple. L'apport est calculé pour chaque catégorie alimentaire, pour la génistéine, la daïdzéine et pour la somme des deux isoflavones. Les apports ont également été calculés pour chaque aliment, à base de soja. Enfin, l'apport a été ajusté sur l'apport calorique lorsque la distinction est faite entre les sexes et les classes d'âge. Les données détaillées sont présentées en annexe 2b.

## **II – 1 Méthodes**

L'enquête INCA 99 a été réalisée par le CREDOC en 1998-99 (CREDOC-AFSSA-DGAL, 2000). Elle recueille toutes les prises alimentaires des individus pendant une semaine entière. Les données de consommation alimentaire ont été obtenues à partir de carnets de consommation, renseignés sur une période de 7 jours consécutifs, l'identification des aliments et des portions étant facilitée par un cahier photographique. L'enquête a été réalisée auprès de 3 003 individus, enfants et adultes, représentatifs de la population française. La représentativité nationale a été assurée par stratification (âge, sexe, catégorie socioprofessionnelle individuelle et taille du ménage). L'échantillon des adultes comprend 1 985 individus de 15 ans et plus. Les données ne portent que sur les adultes normo-évaluants<sup>3</sup>. Cet échantillon comprend 1 474 individus. Quant à l'échantillon des enfants, il regroupe 1 018 individus âgés de 3 à 14 ans. Ne disposant d'aucune formule permettant de sélectionner les individus sous-évaluants, cet échantillon n'a pas été redressé. La nomenclature de cette enquête comporte 44 catégories alimentaires correspondant à 904 aliments consommés. Ces données ont été croisées avec la table de composition en isoflavones développée ci-dessus pour obtenir un apport journalier moyen. Lorsqu'ils sont détaillés, les apports ont été estimés par sexe et selon les classes d'âge suivantes : (i) enfants : 3 à 9 ans, 10 à 14 ans ; (ii) adultes : 15 à 18 ans, 19 à 49 ans et 50 ans et plus. Les aliments dénommés « aliments à base de soja » sont les desserts à base de soja, le tonyu, et le tofu. En revanche, cette dénomination ne concerne pas les aliments qui contiennent du soja sans que cet aspect ne motive l'achat par le consommateur : par exemple les biscuits qui contiennent de la farine de soja dans un but technologique

*Précision concernant le 95ème percentile : il représente la valeur dépassée par les 5% plus forts consommateurs. Lorsque le taux de consommateurs pour un produit est inférieur à 5%, la valeur du 95ème percentile pour ces forts consommateurs est nulle.*

## **II- 2 Apport en isoflavones hors aliments à base de soja**

Les apports en isoflavones sont très faibles, au maximum de l'ordre de la dizaine de microgramme. Les aliments les plus contributeurs sont discutés ci-dessous. Ces aliments sont indicatifs des sources d'isoflavones dans la population générale.

L'apport global dans la population adulte, pour la génistéine, la daïdzéine et la somme des 2 isoflavones, est présenté annexe 2b, tableaux A3 à A5. La catégorie la plus contributrice à

---

<sup>3</sup> Normo-évaluants : sujets pour lesquels on a vérifié que l'apport énergétique correspondant au métabolisme de base et à la dépense énergétique est suffisant (coefficient de Shofield).

cet apport est celle des « légumes hors pomme de terre » (34,1% pour les apports cumulés par les 2 isoflavones). Les apports cumulés en génistéine et daïdzéine sont en moyenne de 8,8 µg/j, et chez les 5% plus forts consommateurs (95<sup>ème</sup> percentile), ils sont de 25,1 µg/j. Les données de la table de composition montrent que dans cette catégorie, ce sont les germes de haricot mungo, les asperges, les brocolis, les haricots beurre et les haricots verts qui ont les teneurs les plus élevées en isoflavones<sup>4</sup>. Vient ensuite la catégorie des fruits (3,6 µg/j en moyenne). Les « condiments et sauces », les « riz et semoule », les « entrées », les « céréales pour petit déjeuner », et les « pâtes » apportent chacun plus de 1µg/j en moyenne. Il faut noter que le café en poudre soluble apparaît être l'une des trois plus fortes sources de daïdzéine (2,4µg/j en moyenne), mais que cette situation reste virtuelle puisque l'apport par le café liquide (prêt à la consommation) lui-même, ne ressort pas dans les aliments les plus contributeurs. Les apports par l'ensemble des autres catégories sont quant à eux tout à fait négligeables. L'apport total en génistéine dans la population adulte (tableau A3) est de 13,5 µg/j en moyenne avec un 95<sup>ème</sup> percentile de 34,8 µg/j. L'apport moyen en daïdzéine est de 12,2 µg/j (tableau A4) avec un 95<sup>ème</sup> percentile à 30,8 µg/j. Enfin, l'apport cumulé des deux isoflavones est de 25,8 µg/j en moyenne (écart-type : 24,1µg/j), il atteint 61,8µg/j au 95<sup>ème</sup> percentile.

Chez les enfants de 3 à 14 ans, (annexe 2b, tableaux A6 à A8), ce sont soit les légumes hors pomme de terre (apport moyen de 3,5 µg/j de génistéine), et les céréales pour petit déjeuner (apport moyen de 3µg/j de daïdzéine), qui sont les catégories les plus contributrices de l'apport. L'apport total des deux isoflavones est de 18,2µg/j en moyenne, et l'apport au 95<sup>ème</sup> percentile est de 39,1µg/j.

Une analyse plus fine des apports hors soja sur l'ensemble de la population, ajustée sur l'énergie et en fonction des classes d'âge et de sexe, est présentée en annexe 2b tableaux A9 à A11, et récapitulée dans le tableau 2 pour les apports totaux cumulés en génistéine et daïdzéine.

**Tableau 2. Apport en isoflavones (génistéine + daïdzéine) pour 1000 kcal et par jour, hors aliments à base de soja, sur l'ensemble de la population**

			Ensemble de la population			
			GENISTEINE+DAIDZEINE			
Catégorie	Sexe	Classe d'âge	Effectif	Moyenne (µg/1000 Kcal/j)	Écart-type (µg/1000 Kcal/j)	95 <sup>e</sup> perc. (µg/1000 Kcal/j)
Apport total hors aliments à base de soja	Garçon	3 à 9 ans	314	9.4	6.1	20.3
		10 à 14 ans	216	10	7.6	22
	Fille	3 à 9 ans	279	9	4.8	18.5
		10 à 14 ans	209	10.6	8.1	23.6
	Homme	15 à 18 ans	61	13	15.1	27.6
		19 à 49 ans	362	9.8	8.5	24.9
		50 ans et plus	249	11.9	10.3	26.2
	Femme	15 à 18 ans	74	15.6	21.3	50.9
		19 à 49 ans	454	12.4	11.7	30.6
			50 ans et plus	274	14.5	15

L'apport moyen en isoflavones totales varie relativement peu entre les différentes classes d'âge et de sexe, de 9 à 15,6 µg/1000kcal/j. Cet apport a toutefois tendance à être plus élevé chez les adultes. Les apports les plus élevés sont observés chez les individus de 15 à 18 ans, avec 13 µg/1000 Kcal/j pour les hommes et près de 16 µg/1000 Kcal/j pour les femmes.

<sup>4</sup> Toutefois, en terme d'apport, la teneur de ces aliments en isoflavones doit être mise en lien avec leur consommation

### **II-3 Apport dû à la consommation d'aliments à base de soja chez les seuls consommateurs de ces produits**

Le tableau A12 annexe 2b montre, par sexe et par classe d'âge, la consommation d'aliments à base de soja – desserts à base de soja (« desserts au soja aux ferments vivants »), tofu, tonyu.

Le taux de consommateurs d'aliments à base de soja dans la population française est très faible. Ainsi durant la semaine d'enquête :

- 9 adultes sur 1474 (0,6% de la population) et 2 enfants sur 1018 (0,2% de la population) ont consommé respectivement 48 g/j et 41 g/j en moyenne de dessert au soja ;
- 2 adultes et 1 enfant ont consommé respectivement 167 ml/j et 63 ml/j en moyenne de tonyu (0,1% de la population)
- et 1 seul adulte a consommé 42 g/j de tofu (0,07 % de la population).

Ces résultats montrent que les consommateurs d'aliments à base de soja représentaient en 1999 une très faible part de la population. Il convient donc de souligner le caractère essentiellement indicatif des données d'apport.

Les apports en isoflavones lors de la consommation d'aliments à base de soja sont présentés dans l'annexe 2, tableaux A13 à A18, et ils sont exprimés en milligramme par jour dans le texte<sup>5</sup>. Chez les adultes, quelle que soit l'isoflavone considérée, ce sont les desserts au soja qui sont les plus forts contributeurs avec un apport moyen de 16,7mg/j de génistéine+daïdzéine, et un 95<sup>ème</sup> percentile de 44,7 mg/j. Les apports moyens en isoflavones provenant du tonyu sont de 11,9 mg/j et ceux provenant du tofu sont de 10,5 mg/j. Quant aux apports totaux, ils sont en moyenne de 15,4 mg/j pour la somme génistéine+daïdzéine et de 44,7 mg/j au 95<sup>ème</sup> percentile.

Durant la semaine d'enquête, il n'y a eu aucun consommateur de tofu parmi les enfants de 3 à 14 ans, l'apport de ce produit est donc nul. Pour leurs parts, le dessert au soja et le tonyu apportent respectivement 14,3 mg et 4,5 mg par jour d'isoflavones chez les seuls consommateurs de 3 à 14 ans.

Une approche détaillée par classe d'âge et de sexe, rapportée à l'énergie ingérée, est présentée tableaux A19 à A21. Le tofu a été consommé par une seule femme de 50 ans et plus. Durant les 7 jours d'enquête, l'apport a été, chez cette personne de 5,6 mg/1000 Kcal/j d'isoflavones (genistéine+daïdzéine). La boisson au soja ou tonyu a été consommée par un homme de 15 à 18 ans avec un apport de 33,4 mg/1000 Kcal/j d'isoflavones. Deux femmes ont consommé ce produit durant les 7 jours d'enquête : une fille de 3 à 9 ans avec un apport de 2,9 mg pour 1000 kcal/j et une femme de 19 à 49 ans avec un apport de 7,8 mg/1000 Kcal/j. Sur les trois aliments au soja, le dessert au soja est celui qui a été le plus consommé, à l'exception des tranches d'âge 10-14 ans et 15-18 ans (hommes et femmes confondus). Dans la tranche d'âge de 50 ans et plus, un seul homme a été consommateur de ce produit avec un apport moyen cumulé de 23,7 mg/1000 Kcal/j, et deux femmes avec un apport moyen cumulé de 7,3 mg/1000 Kcal/j. Chez les femmes de 19 à 49 ans, cet apport est de 0,076 mg/1000 Kcal/j et chez les cinq consommatrices de dessert au soja, cet apport est de 6,9 mg pour 1000 kcal/j.

### **III- Autres repères de consommation**

Afin de préciser les apports en phyto-estrogènes dans la population française, il est utile de les discuter au regard d'autres repères de consommation : évolution des ventes d'aliments à base de soja en France, apport dans les populations asiatiques, apport dans la population générale européenne et apport des populations particulières.

#### **III-1 Evolution des ventes des produits à base de soja entre 1996 et 2001 (Tard A, 2004)**

L'évolution des ventes des aliments les plus contributeurs de l'apport en phyto-estrogènes (aliments à base de soja) entre 1996 et 2001 en France permet de représenter la tendance de l'évolution de ces ventes et de situer les apports estimés par l'enquête INCA (qui date de

---

<sup>5</sup> Ils sont en revanche exprimés en microgramme dans les tableaux présentés en annexe 2b

1999) dans une période plus actuelle. Cette évolution a été calculée au travers des données du panel d'achats Sécodip<sup>6</sup>. Les quantités ingérées présentées ici concernent factuellement les ménages, mais une estimation des apports est également calculée chez les individus. En outre, elles sont focalisées sur les apports chez les consommateurs réels de ces produits, et non sur l'ensemble de la population. Les marchés étudiés concernent les « laits » de soja ou tonyus, les desserts à base de soja (codifiés par SECODIP selon « desserts frais » et « desserts longue conservation arôme soja », ainsi que les aliments type « yaourts » au soja), et les plats composés à base de soja (dont le tofu). Ces derniers constituent une catégorie regroupant des aliments variés : plats, ou entrées, ou légumes cuisinés frais, les quenelles fraîches, les fromages à consommer chaud, les plats cuisinés surgelés, les préparations panées, et les autres entrées surgelées. La méthodologie de cette étude, le détail des estimations ainsi que les précautions de lecture sont précisés en annexe 2c.

Les taux de consommateurs renseignent sur l'évolution du comportement d'achat de ces produits sur l'ensemble de la population. Les calculs montrent que les desserts à base de soja sont les plus consommés de ces produits, avec une consommation dans environ 10% de la population générale. La consommation de tonyu, tout comme celle de plats consommés, est plus faible puisqu'elle touche moins de 5% de la population française.

Toutefois, la consommation de l'ensemble de ces produits a augmenté lentement mais régulièrement entre 1996 et 2001, et tout porte à croire que cette évolution se poursuit depuis. En effet, en terme de quantités ingérées, l'estimation à partir des données de vente montrent que la consommation journalière moyenne de desserts à base de soja et de tonyu a augmenté sur ces 5 années, portant les apports individuels estimés respectivement à 5,8 et 18,3 ml/j en moyenne. Chez les plus forts consommateurs (95<sup>ème</sup> percentile), on atteint en 2001 respectivement 27,1 et 92,3 ml/j. Si les apports en plats composés restent faibles, l'évolution de la consommation remarquée précédemment pour les desserts et les tonyu est encore plus marquée pour cette catégorie des plats consommés, dont la majeure partie de la consommation est la consommation de tofu. En effet, leur consommation est multipliée par 1,5 sur 5 ans (augmentation du nombre de consommateurs de 300% - de 1,7% à 5,1%).

### **III- 2 Apports en isoflavones dans diverses populations**

Une revue de la bibliographie concernant les apports alimentaires en isoflavones dans les pays asiatiques et dans les pays occidentaux est présentée dans le tableau 3 (présenté à la fin de ce chapitre).

A titre d'introduction, citons Yamamoto (2003) : ces auteurs ont estimé récemment que les apports en isoflavones au Japon sont sept fois plus élevés que les apports chez les Chinois de Singapour, 15 fois plus élevés que ceux des femmes américaines d'origine latine ou africaine, et 700 fois plus élevés que ceux de femmes américaines blanches.

#### **III-2-1 Méthodologie**

Une recherche bibliographique dans PubMed a permis de recueillir des informations sur les apports alimentaires en isoflavones dans diverses populations. Seules les publications utilisant des questionnaires alimentaires (recueils, questionnaires de fréquence, rappels de 24h, ...) couplés à des tables de composition alimentaires ont été retenues. Les publications qui fournissaient seulement des mesures biologiques d'isoflavones (par dosage plasmatique ou urinaire) comme marqueurs biologiques des apports n'ont pas été sélectionnées. L'étude de Wakai (1999) n'a également pas été retenue car les valeurs n'étaient pas représentatives : les deux méthodes comparées (carnets alimentaires de 1 et 3 jours) présentaient un coefficient de variation intra-individuel de 89% pour les apports en génistéine et daïdzéine.

Concernant les tables de composition des aliments en isoflavones utilisées dans les études sélectionnées, les méthodes analytiques de mesures des isoflavones ont été évaluées afin de connaître la forme (glycosylée ou aglycone) des isoflavones mesurées. En conclusion, toutes les études européennes et américaines ont utilisé des tables de composition

---

<sup>6</sup> Sécodip : Société d'Etude de la Consommation, de la Distribution et de la Publicité, Société du groupe TNS.

alimentaires en isoflavones aglycones. La plupart des études asiatiques ont également utilisé des valeurs d'isoflavones aglycones, mais pour quelques unes d'entre elles, l'information n'était pas indiquée. Globalement, les valeurs d'apports que nous indiquons sont basées sur des mesures d'isoflavones aglycones.

### **III-2-2 Apports en isoflavones dans les pays asiatiques**

Les populations asiatiques ont traditionnellement une consommation élevée en légumes et particulièrement en soja qui représente un aliment de base de l'alimentation chinoise et japonaise depuis plus de 4 000 ans. Les apports en isoflavones dans l'alimentation asiatique n'ont cependant pu être estimés avec précision que récemment avec le développement des premières tables alimentaires en 1996. D'une part, il semble que les premières valeurs des apports asiatiques en isoflavones aient été surestimées (Messina 1995). D'autre part, les apports asiatiques en isoflavones évoluent avec l'urbanisation croissante des populations asiatiques et l'occidentalisation progressive de leur comportement alimentaire. D'une manière générale, les aliments asiatiques traditionnels à base de soja apportent 1-3 mg d'isoflavones /g protéines et une portion de ces aliments fournit 25-40 mg d'isoflavones (Messina 1999).

D'après le tableau 3, les isoflavones consommées dans les populations asiatiques proviennent essentiellement des aliments à base de soja. Les apports moyens en isoflavones aglycones sont de : 45 mg/jour au Japon (valeurs variant entre un minimum de 8 et un maximum de 118 mg/jour), 35 mg/jour dans les zones urbaines de Chine (valeurs variant environ entre 5 et 60 mg/jour), 9 mg/jour dans les zones rurales de Chine (valeurs variant de 0 à 35 mg/jour), 15 mg/jour en Corée et 13 mg/jour à Singapour.

### **III-2-3 Apports en isoflavones dans les pays occidentaux**

Les populations européennes ont globalement une alimentation de type occidental, c'est-à-dire riche en protéines et en graisses animales et pauvre en produits céréaliers et végétaux. Malgré l'apparition du soja en Europe dans les années 1940, sa consommation reste faible dans les populations européennes mais est variable selon les profils alimentaires propres à chaque région ou à des populations particulières (végétariens par exemple). Les apports alimentaires en isoflavones étant directement liés à la consommation de soja, il est estimé que les apports moyens en isoflavones dans une alimentation occidentale typique représentent moins de 1 % des apports asiatiques. D'après le tableau 3, les apports moyens en isoflavones aglycones sont de 0,4 mg/jour environ (valeurs moyennes variant entre 0 et 2 mg/jour) dans les populations européennes et américaines typiques.

La large étude européenne EPIC a montré que les plus grands consommateurs de soja et par conséquent d'isoflavones sont les végétariens (représentés par la cohorte anglaise EPIC-Oxford) et les pays les plus faibles consommateurs sont l'Espagne, la Grèce, la Suède, le Danemark et la Norvège (0,2 à 0,8 % de ces populations) (Keinan-Boker 2002 a et b). Une conclusion importante de cette étude est également que la nature des aliments au soja consommés en Europe diffère considérablement de celle des aliments traditionnels asiatiques (tofu, miso, natto). Ainsi, les aliments au soja consommés le plus fréquemment en France et au Royaume-Uni sont les produits de substitution des produits laitiers comme le tonyu (jus de soja) et les desserts au soja ; aux Pays-Bas, en Allemagne et en Espagne, ce sont les pousses et les graines de soja ; en Italie, les produits céréaliers ; au Danemark, les substituts de viande.

Toutefois, il est important de noter que dans les populations occidentales, les isoflavones représenteraient seulement 20% des apports en phyto-estrogènes totaux alors que les lignanes représenteraient 80% des apports en phyto-estrogènes et les coumestanes moins de 0,1% (Ziegler 2004). Par conséquent, les lignanes pourraient jouer un rôle plus important que les isoflavones dans la santé des populations occidentales (ci-dessous, voir paragraphe IV sur les lignanes).

### **III-2-4 Apports en isoflavones dans des populations particulières**

En Europe ou aux Etats-Unis, certaines populations ont des apports en isoflavones intermédiaires entre les apports occidentaux typiquement faibles et les apports asiatiques traditionnellement élevés. C'est le cas en particulier des populations migrantes et des végétariens.

Les études de consommation d'isoflavones dans les populations migrantes se sont essentiellement intéressées aux populations asiatiques migrant aux Etats-Unis. Du fait du changement d'environnement et de l'acculturation, la première génération de migrantes (née en Asie et immigrée en Amérique) réduit sa consommation de soja (donc d'isoflavones) et la deuxième génération de migrantes (née aux Etats-Unis) a des apports en isoflavones qui se rapprochent des apports américains typiques. D'après le tableau 3, les apports moyens en isoflavones sont de 20 mg/jour dans la population immigrée d'Asie en Amérique, 14 mg/jour dans la population américaine aux origines asiatiques et 3 mg/jour dans la population américaine aux origines africaine ou latine.

L'alimentation des végétariens étant dépourvue de viandes et poissons, celle des lacto-végétariens dépourvue également d'œufs et celle des végétaliens dépourvue également d'œufs et de lait, le soja est largement consommé par ces populations car il constitue une source importante de protéines. Aucune étude de consommation d'isoflavones n'a été conduite dans des populations végétariennes mais il a été montré que les végétariens ont des concentrations urinaires en phyto-estrogènes plus élevées que les personnes omnivores (Adlercreutz 1982), ce qui reflète une consommation alimentaire plus élevée.

L'étude de consommation d'isoflavones en Europe basée sur la table de composition alimentaire VENUS n'a pas ciblé une population végétarienne en particulier mais elle a permis de séparer les consommateurs de soja des non-consommateurs (Van Erp-Baart 2003). Ainsi, cette étude a montré que les consommateurs de soja, sans être pour autant végétariens, ont des apports moyens en isoflavones pouvant atteindre en moyenne 11 mg/jour.

Dans la cohorte anglaise EPIC-Oxford, la population définie par un comportement alimentaire dit « sain » (consommateurs de poissons excluant la viande, végétariens, végétaliens) comporte les plus grands consommateurs européens de produits à base de soja (Keinan-Boker 2002a ; Keinan-Boker 2002b). Dans ce groupe, 28% des personnes déclaraient consommer des produits à base de soja contre 1-2% dans la population générale. Leurs apports en isoflavones se situaient entre 15 et 30 mg/jour et étaient comparables aux apports rencontrés dans les régimes asiatiques (Keinan-Boker 2002 a ou b) , (Verkasalo 2001), ceci bien que la densité en isoflavones des produits européens au soja soit plus faible que celle des produits asiatiques traditionnels. Par conséquent, dans les pays occidentaux, il est estimé que seule une alimentation de type macrobiotique<sup>6</sup> permettrait d'atteindre des apports en phyto-estrogènes proches de ceux rencontrés dans les pays asiatiques.

Les Adventistes du Septième Jour constituent une population d'étude particulière aux habitudes alimentaires et mode de vie spécifiques. Il a été montré que les Adventistes ont une consommation de produits à base de soja et de tonyu plus grande que la population générale du fait qu'une grande majorité est végétarienne ou végétalienne (Resnicow 1991). Une étude parmi une nouvelle cohorte Adventiste a été mise en place en 2003 et recueillera la consommation en soja de façon détaillée (Willett 2003).

### **IV- Apports alimentaires en lignanes**

Les lignanes constituent le deuxième groupe de phyto-estrogènes le plus étudié. La littérature disponible n'est pas suffisante pour établir une table de composition des aliments et l'estimation de leurs apports par une enquête de consommation alimentaire représentative de la population française. En revanche, quelques données bibliographiques peuvent être présentées.

Les lignanes sont présents dans un grand nombre de végétaux, leurs principales sources alimentaires sont les céréales, particulièrement le seigle et l'orge, et les produits à base de céréales complètes (Hoikkala 2003). Les fruits, les baies et les légumes contiennent des lignanes en moindre quantité mais constituent un apport important dans une alimentation

variée. Notons enfin que la plus grande source connue de lignanes est la graine de lin, mais que cette graine est très faiblement consommée, ce qui réduit la contribution de l'apport en lignanes par cette source dans la population.

L'utilisation de questionnaires alimentaires et de tables de composition en lignanes a permis d'estimer la consommation moyenne de lignanes dans différentes populations (tableau 4).

**Tableau 4. Apports alimentaires moyens en lignanes végétaux**

Référence	Pays, population	Apport alimentaire moyen (mg/jour)	Sources alimentaires principales
de Kleijn 2001	USA, femmes américaines en bonne santé, 35-81 ans	Matairésinol 0.02 Sécoisolaricirésinol 0.56	Fruits 12.7% Pain et produits céréaliers 10.5% Baies 8.3%
Boker 2002	NL, femmes 50-69 ans	Matairésinol 0.08 Sécoisolaricirésinol 1.03	Pain 47% Café, thé 17% Légumes 7%
Horn-Ross 2000	USA, femmes blanches, hispaniques et noires, 50-79 ans	Matairésinol 0.04	Jus d'orange 42% Patates douces 14% Riz 14%
		Sécoisolaricirésinol 0.14	Café 44% Abricots secs 13% Jus d'orange 6%
Valsta 2003	Finlande, femmes 25-64 ans	Matairésinol 0.03 Sécoisolaricirésinol 0.57	Graines, céréales, fruits baies et légumes
	Finlande, hommes 25-64 ans	Matairésinol 0.05 Sécoisolaricirésinol 0.24	

Dans les populations occidentales, la consommation moyenne de lignanes est difficile à estimer. Les tables de composition en lignanes étant très incomplètes, la consommation estimée paraît donc faible (valeur moyenne pouvant atteindre 1 mg/jour). L'apport principal de lignanes semble venir d'un nombre limité d'aliments et le reste des apports résulte de nombreux aliments contribuant chacun à un faible apport. De plus, le choix des aliments contributeurs est variable selon les personnes. La consommation de lignanes varie essentiellement selon le type de régime alimentaire (les régimes végétariens étant les plus riches en lignanes) et est contrastée d'un pays à l'autre ; par exemple, l'apport en lignanes aux USA vient principalement des fruits alors qu'il vient majoritairement des produits céréaliers en Finlande et aux Pays-Bas. A titre illustratif, une étude menée chez les hommes a mesuré les quantités d'entérolignanes présents dans le liquide prostatique et a montré des variations internationales pouvant possiblement refléter des apports alimentaires différents en lignanes (Morton 1997). Dans cette étude, les hommes portugais avaient la concentration la plus élevée d'entérolignanes ( $n=17$ , moyennes : entérodol=13.5 ng/ml, entérolactone=162 ng/ml) et les valeurs étaient similaires entre elles chez les hommes anglais, de Hong-Kong et de Chine (moyennes : entérodol=2.6 à 6.6 ng/ml, entérolactone=20,3 à 32,9 ng/ml).

#### **IV- Données sur les apports par les compléments alimentaires en France**

Synadiet, le Syndicat National des Fabricants en Produits Diététiques, Naturels et Compléments Alimentaires, situe la réelle émergence en France des compléments alimentaires contenant des isoflavones de soja en 1998. En octobre 2003, le marché des compléments en isoflavones représentait 43 millions d'euros en France pour le secteur pharmaceutique (soit environ 80% des ventes pour lesquelles des statistiques existent), et plus de 50 compléments alimentaires contenant des isoflavones étaient déjà disponibles sur le marché français. Ce marché est concentré sur les troubles de la ménopause. Il est annuellement en forte croissance et représente le troisième segment des compléments alimentaires. Il se peut que cette forte croissance du marché soit liée depuis 2002 à un transfert d'achat par les femmes sensibilisées à la restriction d'usage des traitements hormonaux substitutifs (THS) recommandé par l'Agence Française de



Sécurité Sanitaire des Produits de Santé et l'Agence Nationale d'Accréditation et d'Evaluation en Santé (ANAES 2004). En 2003, le marché français était dominé par cinq produits qui recouvraient plus de 90% des volumes de ventes.

Ce marché est caractérisé par une certaine variété : variété des circuits de distribution (essentiellement pharmacies, parapharmacies, magasins de diététique, grandes et moyennes surfaces) et donc variété des consommateurs de ces produits, variété des fournisseurs d'extraits, et finalement variété de la composition des produits. En revanche, la quasi-totalité de ces compléments alimentaires sont formulés au regard d'une d'allégations focalisées sur les effets inconfortables parfois observés au moment de la ménopause (essentiellement les bouffées de chaleur). Enfin, il n'existe pas actuellement en France de médicament à base de plantes contenant des phyto-estrogènes. En l'absence d'études de consommation alimentaire menées spécifiquement sur les compléments alimentaires à base de phyto-estrogènes, seuls des repères liés à l'étiquetage et au dosage de ces produits peuvent être formulés.

#### **IV-1 Composition des produits**

Les compléments alimentaires à base de phyto-estrogènes sont en majorité composés d'extraits de soja, dont les composés actifs sont la daïzdéine et la génistéine. Toutefois, ces extraits peuvent être associés à d'autres ingrédients, aussi bien d'autres extraits de plantes que des micronutriments tels des vitamines et/ou des minéraux.

L'association des extraits de soja à d'autres plantes soulève plusieurs questions. En effet ces plantes peuvent être incluses à la composition du complément alimentaire dans l'objectif d'atteindre un effet autre qu'un effet de type estrogénique : c'est probablement le cas du yam par exemple pour lequel certains revendiquent des effets de type progestagène. L'évaluation de cet aspect dépasse le cadre du rapport. En revanche, certaines des plantes associées au soja peuvent également exercer un effet de type estrogénique (voir chapitre Répertoire) : le houblon par exemple contient de la 8-prényl-naringénine (flavanone) et du xanthohumol (chalcone), ou encore de la luzerne qui contient du coumestrol. Ces molécules sont capables de se lier aux récepteurs des estrogènes. Dans ce type de situation, il est nécessaire d'être vigilant à la dose totale de composés actifs ingérés, nécessairement différente de la dose totale en isoflavones, car la sécurité d'un complément établie sur la base de la dose totale en isoflavones peut ne plus être assurée si la quantité totale de molécules capables de se lier aux récepteurs des estrogènes est différente.

#### **IV- 2 Apports**

Qu'il s'agisse uniquement d'un extrait à base de soja, ou d'une association de plantes, les seules concentrations moléculaires mentionnées sur l'étiquette de ces compléments concerne leur teneur en isoflavones. Cette simple indication n'existe d'ailleurs pas systématiquement, et seule la teneur en extrait de soja peut parfois être mentionnée. En outre, l'identification de l'apport réel est rendue difficile car la concentration en isoflavones est parfois indiquée en référence aux formes aglycones de ces substances, et parfois en référence à leur forme glycosylée. Enfin, sur le plan de l'estimation des apports, les conseils d'utilisation proposés sur l'étiquetage du complément (c'est à dire le nombre de gellules recommandé par jour) ne préjuge pas du respect de cette proposition par le consommateur.

Un échantillon de 53 compléments alimentaires (communication de Mme Bennetau pour le groupe de travail de l'Afssa) a été étudié. Si on se place du point de vue du consommateur, qui n'a que l'étiquette du produit à sa disposition, seuls 34 (64%) compléments mentionnent la dose d'isoflavones contenue dans le produit. La gamme des doses annoncées sur ces 34 produits s'étend de 10 à 250 mg d'isoflavones par comprimé, et les cures proposent une prise de 1 à 6 comprimés par jour. Ainsi, la gamme des prises journalières proposées s'étend de 20 mg à 250 mg pour les seules isoflavones sous une forme possiblement glycosylée ou non. En admettant que cette gamme concerne des produits glycosylés et un rapport de masse de 0,50 entre les formes aglycones et glycosylées (voir chapitre biodisponibilité), on aboutit à une prise d'isoflavones aglycones de 10 à 125 mg par jour.

L'analyse chimique du contenu d'une unité de ces produits montre que la dose réelle contenue dans les compléments alimentaires peut être différente de la dose affichée par rapport à la dose réelle en isoflavones. En terme d'estimation des apports, cette analyse montre que la dose réelle d'une unité varie de 0,6 à 92,8 mg d'isoflavones sous forme équivalente aglycone. L'apport quotidien réel si la cure proposée est suivie, varie alors de 0,76 à 92,8 mg, également sous forme équivalente aglycone. La répartition des doses journalières est présentée dans le tableau 5, elle montre que la plupart (75%) des compléments analysés ont des doses situées 0 et 40 mg d'isoflavones équivalents aglycones.

**Tableau 5 : apport réel journalier total (selon la cure proposée) en isoflavones équivalentes aglycones de 53 compléments alimentaires en isoflavones de soja dosés par ELISA (ENITA)**

Quantité d'isoflavones équivalentes aglycones (en mg)	0 à 10	11 à 20	21 à 30	31 à 40	41 à 50	51 à 60	61 à 70	71 à 80	81 à 90	91 à 100
Nombre de compléments alimentaires	11	11	8	10	6	3	2	0	1	1

Il faut noter par ailleurs que durant l'année 2004, la tendance des nouveaux compléments alimentaires à base d'isoflavones était à l'augmentation du dosage en isoflavones vers de très fortes doses dépassant 100mg isoflavones aglycones par jour.

#### **IV-3 Titre de l'extrait**

La composition du complément alimentaire varie en fonction de la quantité d'extrait de soja mais également en fonction du titre de l'extrait de soja en isoflavones. Ce point mérite d'être évoqué car il renvoie au caractère alimentaire et traditionnel de l'apport. S'il est généralement argumenté pour assurer la sécurité et le caractère alimentaire d'un complément contenant des isoflavones, que la composition respecte les formes et apports observés depuis des millénaires dans les populations asiatiques, qu'en est-il d'une forme très concentrée ? Car outre les doses qui peuvent parfois être très élevées, l'emploi de formes très concentrées, voire synthétiques, exclut les interactions possibles et éventuellement protectrices entre les isoflavones et les autres composants de la matrice alimentaire qui les contient lorsqu'ils sont traditionnellement consommés. Seules des études spécifiques menées sur ces produits peuvent prouver qu'ils présentent le même degré de sécurité que celui des isoflavones lorsqu'elles sont considérées dans leur matrice.

#### **Conclusion générale**

Sur l'ensemble des phyto-estrogènes identifiés dans le chapitre « Répertoire », les données de composition des aliments et de consommation disponibles concernent essentiellement les isoflavones. Quelques données sont également disponibles pour les lignanes mais des études supplémentaires sont nécessaires pour les autres phyto-estrogènes.

Malgré le peu de données disponibles, une table de composition en isoflavones (génistéine et daïdzéine, sous forme aglycone) des aliments consommés en France a pu être réalisée. Les apports sont toutefois sous-estimés, notamment du fait de la difficulté de prendre en compte l'incorporation de farine de soja dans de nombreux produits industriels. Naturellement, les teneurs en isoflavones sont les plus élevées dans les produits végétaux. Elles sont de l'ordre de la dizaine de milligrammes pour 100g dans les aliments à base de soja (tonyu, tofu, desserts à base de soja), et sont au maximum de quelques dizaines de microgrammes pour 100g dans les légumes, céréales et fruits où les isoflavones sont détectées.

L'estimation de l'apport journalier moyen en génistéine et daïdzéine dans la population française ayant un régime alimentaire occidental traditionnel (ce qui exclut la consommation d'aliments à base de soja) a pu être réalisée. Lorsque les produits à base de soja ne sont pas considérés, les légumes (hors pomme de terre) semblent être les plus forts contributeurs à l'apport en isoflavones, ainsi que les fruits. Chez les enfants, les céréales pour petit

déjeuner sont également contributrices. Enfin, d'autres catégories d'aliments semblent apporter des isoflavones en moindre quantité que les catégories ci-dessus. C'est le cas des légumineuses dont la teneur est relativement importante mais qui, étant donné la désaffection pour ce type d'aliment, n'apparaissent pas dans les catégories fortement contributrices. Ces estimations permettent d'avoir une première notion des apports en isoflavones aglycones chez les non consommateurs de soja, apports qui sont de l'ordre de 26 µg/j en moyenne chez les adultes, et de 18 µg/j chez les enfants de 3 à 15 ans. Ces résultats sont cohérents avec les rares données disponibles dans les autres populations européennes, qui placent les apports moyens en isoflavones entre 0 et 2mg/j. Par ailleurs, une approche dynamique des apports entre 1996 et 2001, via les données de vente des aliments à base de soja, montre que si la consommation de ces produits reste faible, elle augmente progressivement.

Une revue des études publiées sur les apports en isoflavones dans différentes populations montre que les populations asiatiques les plus exposées (Japonais) ont des apports moyens en isoflavones aglycones d'environ 45 mg/j (valeurs variant de 8 à 118 mg/j) tandis que ceux des populations occidentales sont d'environ 0,4 mg/j (entre 0 et 2 mg/j). Il n'apparaît pas d'étude réalisée sur l'exposition aux phyto-estrogènes des populations ayant une alimentation particulière (végétariens, ...) toutefois l'étude menée à partir de la table du CIQUAL dans ce rapport, tout comme l'étude VENUS, sans cibler une population végétarienne particulière, ont permis de séparer les consommateurs de soja des non consommateurs. Ces deux études concluent à des apports en isoflavones chez les populations consommatrices de soja de l'ordre de la dizaine de mg/j.

Un calcul illustratif des conséquences, en terme d'apport en isoflavones, de l'introduction d'aliments à base de soja dans le régime occidental traditionnel, peut être proposé. Par exemple, avec un régime alimentaire occidental traditionnel, l'apport moyen quotidien en isoflavones chez un adulte est de 25,8 µg. Ces apports deviennent de l'ordre de 15 mg d'isoflavones lors de l'introduction d'aliments à base de soja (si les apports moyens des 12 adultes ayant consommé des aliments à base de soja durant la semaine de l'enquête INCA sont repris à titre illustratif). Toujours à titre illustratif, un calcul peut être fait en faisant appel aux données de la table de composition en génistéine et daidzéine. A partir respectivement d'échantillons de vingt huit et quatre valeurs publiées, on estime que un verre de tonyu (150 ml) apporte entre 0,30 et 33 mg/j d'isoflavones (en moyenne environ 10 mg), et 1 dessert au soja (portion de 125 g), entre 8 et 76 mg d'isoflavones (en moyenne environ 44 mg/j). En conséquence, un individu consommant dans la même journée un verre de tonyu et 1 dessert au soja reçoit un apport entre 8,3 et 109 mg d'isoflavones aglycones (en moyenne environ 54mg). Ce calcul montre que l'introduction de plusieurs aliments à base de soja peut amener à des apports 1000 à 10 000 fois plus élevés que les apports observés par un régime occidental traditionnel. Ces apports sont également comparables voire supérieurs à ceux observés dans les populations asiatiques, et comparables voire supérieurs aux chiffres rapportés pour les quelques données disponibles dans les groupes particuliers (entre 15 et 30 mg/j dans la cohorte EPIC-Oxford).

Du fait que les lignanes ont été beaucoup moins étudiés que les isoflavones, les données de consommation sont rares pour les lignanes. Les tables de composition étant très incomplètes, la consommation est difficile à estimer. Les estimations faites jusqu'à présent dans des populations occidentales (apport moyen pouvant atteindre 1 mg/jour) sont probablement sous-évaluées et, de plus, la consommation de lignanes est très contrastée d'une population à une autre, suivant le type de régime alimentaire. Les principales sources de lignanes étant les céréales complètes, les fruits, et les légumes, les régimes végétariens sont probablement parmi les plus riches en lignanes. En l'absence de données extensives sur les lignanes dans l'alimentation, on peut tout de même avancer qu'une alimentation équilibrée, diversifiée, riche en produits végétaux et céréaliers et comprenant du thé ou du café est probablement une bonne source de lignanes.

Enfin, en l'absence d'études, l'apport par les compléments alimentaires est très difficile à évaluer. Une appréciation peut être donnée en se référant aux doses préconisées par les fabricants, et aux dosages que nous avons réalisés sur 53 compléments alimentaires à base d'isoflavones. Toutefois cette appréciation reste focalisée sur l'apport en isoflavones, elle exclut donc les apports dus à d'autres molécules actives sur le récepteur aux estrogènes (naringénine-8-prényl naringénine, etc...) présentes dans d'autres plantes que le soja (trèfle, kudzu, houblon, .etc.), mais parfois associées au soja dans la composition de ces compléments. En règle général et selon nos dosages, ces compléments apportent (selon la cure proposée) des doses journalières inférieures à 40 mg d'isoflavones aglycones. En dehors de tout aspect relatif aux différences inhérentes aux populations asiatiques et occidentales (mode de vie, métabolisme, ...) cet apport est comparable à celui observé chez les populations asiatiques. En revanche, la consommation soit de compléments alimentaires plus fortement dosés, soit d'aliments à base de soja et de compléments alimentaires de façon concomitante, amène à des apports en isoflavones beaucoup plus élevés que ceux observés dans les populations asiatiques traditionnellement exposées à l'apport d'isoflavones.

## Points clés et recommandations

### Points clés

- ❖ Par manque de données, il existe une incertitude quantitative sur le contenu des **aliments** en phyto-estrogènes et une grande variation saisonnière et locale. Une table de composition en isoflavones (équivalents aglycone de la daidzéine et de la génistéine) des aliments consommés en France a toutefois pu être initiée dans ce rapport.
- ❖ Globalement, une alimentation asiatique traditionnelle riche en soja peut être plus de 100 fois plus riche en isoflavones qu'une alimentation occidentale typique. Grâce au développement récent des tables de composition alimentaires en isoflavones, des apports moyens en isoflavones aglycones ont pu être estimés dans diverses populations : 45 mg/j au Japon, 9-35 mg/j dans les autres pays asiatiques et 0-2 mg/j dans les pays occidentaux comme en Europe ou aux Etats-Unis.
- ❖ Tels que nous avons pu les estimer grâce aux données de l'étude INCA 1999, les apports en génistéine et daïdezéine dans la population française chez les non consommateurs de soja, sont de 0,026 mg/j en moyenne (écart-type : 0,024 mg/j) chez les adultes.
- ❖ Dans les pays occidentaux, chez les consommateurs ayant un comportement alimentaire particulier (végétariens, consommateurs de soja, populations définies par un comportement alimentaire dit « sain », consommateurs de compléments en isoflavones de soja), la consommation en isoflavones peut atteindre voire dépasser les apports observés dans les populations asiatiques.
- ❖ Les apports en **précurseurs des entérolignanes** proviennent d'aliments très divers (céréales, légumes, fruits) et sont beaucoup moins connus que les apports en isoflavones. Selon les premières estimations, les apports atteindraient une moyenne de 1 mg/jour dans des populations occidentales mais sont probablement sous-évalués et très contrastés selon les populations.
- ❖ Depuis 1998, le marché des **compléments alimentaires** en isoflavones de soja s'est fortement amplifié en France et représente le troisième segment des compléments alimentaires. Il a pour cible essentiellement la ménopause et tous les phénomènes qui lui soient associés. On observe une tendance à l'augmentation des dosages.

### Recommandations

#### 1 - Recommandations à visée de connaissance et de recherche

- ❖ Il apparaît nécessaire de réaliser des études pour améliorer les tables de composition des aliments en phyto-estrogènes, en particulier en isoflavones et en lignanes.
- ❖ Etablir plus clairement une liste des aliments à base de soja les plus utilisés ou les extraits végétaux susceptibles de rentrer dans les compléments alimentaires (sauge, réglisse, ...).
- ❖ Inclure une gamme plus large d'aliments à base de soja dans les questionnaires des études de consommation.
- ❖ Dans les publications, préciser le dosage réalisé et la forme sous laquelle les phyto-estrogènes et en particulier les isoflavones sont exprimés.

## **2- Recommandations de Santé Publique**

- ❖ Les aliments non sucrés à base de soja présentent un intérêt nutritionnel puisqu'ils sont une bonne source de protéines végétales sans graisses saturées. Dans cette perspective, il faut dissocier les aliments courants à base de soja, des préparations pour nourrissons et des préparations de suite à base de protéines de soja et des compléments alimentaires riches en extraits concentrés.

## **3- Recommandations à visée d'information du consommateur.**

- ❖ Une information rigoureuse appuyée sur des données scientifiques, doit avertir le consommateur que les aliments à base de soja contiennent des isoflavones, qui sont potentiellement actives (effets indésirables ou bénéfiques).
- ❖ En ce sens les consommateurs devraient éviter de cumuler les sources de phyto-estrogènes : par exemple aliments dérivés du soja et compléments alimentaires, ou compléments alimentaires composés de plusieurs types de phyto-estrogènes (isoflavones, coumestanes, ...), en particulier si les apports totaux en phyto-estrogènes ne sont pas précisés.
- ❖ L'étiquetage doit préciser la teneur en phyto-estrogènes, exprimée en équivalents aglycone, notamment sur les aliments à base de soja et les compléments alimentaires. Ce qui signifie un contrôle des doses par les industriels à chaque fabrication avec un nouveau lot de soja.

**Tableau 3. Apports alimentaires journaliers en isoflavones dans les pays asiatiques, les pays occidentaux et les populations migrantes (moyenne, minimum-maximum à moins qu'il soit spécifié autrement)**

Référence	Pays, population	Outil de mesure	Aliments à base de soja	Protéines de soja	Isoflavones (total)	Isoflavones (individuelles)	Sources alimentaires
<b>ASIE</b>							
Messina 1999	Asie		1 portion = 25-40 mg d'isoflavones		1-3 mg/g protéine de soja		
Kimira 1998	<b>Japon</b> 50 femmes	3-day dietary records			39,46 mg (7,80-87,73)	Génistéine=23,27 mg (4,62-52,12) Daïdzéine=16,20 mg (3,18-35,61) Formes aglycones	
Arai 2000a	<b>Japon</b> Femmes	Dietary records				Génistéine=30,1 mg Daïzéine=16,4 mg Formes aglycones	Tofu, natto, miso
Arai 2000b	<b>Japon</b> 115 femmes, 29-78 ans	3-day dietary records			47,2 mg (12,0-118,9) <sup>7</sup> Forme aglycone		Tofu (37% apports)
Somekawa 2001	<b>Japon</b> 478 femmes ménopausées 44-80 ans	FFQ			54.3±1.0 mg/j		Tofu, lait de soja, produits fermentés etc.
Nagata 2002	<b>Japon</b> 87 femmes ménopausées	FFQ	62.4±41.2 (4.9-221) g/j		32.0±17.2 (2.5-79.1) mg/j		9 produits soja dont tofu, miso, jus de soja etc.
Yamamoto 2003	<b>Japon</b> 21852 femmes, 40-59 ans	Questionnaire alimentaire				Génistéine= Quartile 1 : 6,9 mg ±2,6 Quartile 4 : 25.3 mg ±2.2 Forme aglycone	Soybeans, tofu, tofu frit, Natto
Chen 1999	<b>Chine</b> Shanghai 60 femmes : 37-61 ans	FFQ	100.6 g (médiane) (25-75 <sup>ème</sup> % = 36.8-238.2)	8,7 g (médiane)	Médiane=39,26 mg		
Dai 2001	<b>Chine</b> Shanghai 3015 femmes : 25-64 ans	FFQ	Médiane=93,5 g (25-75 <sup>ème</sup> % = 50,0-178,5) Moyenne=135,4 g	Médiane=8,0 g (25-75 <sup>ème</sup> % = 4,8-12,9) Moyenne=10,3 g	Médiane=33,2 mg (25-75 <sup>ème</sup> % = 18,7-53,3) Moyenne=40,9 mg		1) Aliments au soja 2) Tofu
Dai 2002	<b>Chine</b> Shanghai 250 femmes témoins	FFQ		11,49 g (±0,61)			
Dai 2003	<b>Chine</b> Shanghai 117 femmes témoins	FFQ		13,2 g (±0,8)			
Shu 2001	<b>Chine</b> Shanghai	FFQ (17 items d'aliments au		Adolescence (13-15 ans) <sup>8</sup> : 5,4 g			Tofu, tonyu, autres produits à base de soja

<sup>7</sup> Les apports de flavonoïdes (= flavonols + flavones) ont aussi été estimés : 16,7 mg/jour (min-max 2,0-42,4), onions=45,9% apports.

Référence	Pays, population	Outil de mesure	Aliments à base de soja	Protéines de soja	Isoflavones (total)	Isoflavones (individuelles)	Sources alimentaires
	Femmes : 25-64 ans	soja)		(médiane=7.23)			
Mei 2001	<b>Chine</b> 650 femmes :19-86 ans	FFQ			25.4±35.0 (5.3_33.2) mg/j		9 produits soja dont Tofu, jus de soja etc
Zhao 2002	<b>Chine</b> 4 provinces 538 sujets : 50-60 ans	FFQ	Zones urbaines: 43,7 g (cité par Liu et al. 2004)				
Liu 2004	<b>Chine</b> Zones rurales 1188 femmes : 20-65 ans	FFQ	38,7 g (±58,2) (médiane=23,5 g)		Médiane=8,9 mg Moyenne=17,7 mg (± 26,6) Pour 89,2 % de la population : min-max=0-35 mg		Tofu, whole soy beans, sheet/ slab
Jakes 2002	<b>Singapour</b>	FFQ quantitatif		4,5 g/j (95%IC=4,1-4,9)	13,7 mg (95%IC= 12,6-14,8)		
Kim 2001	<b>Corée</b> 3224 hommes 3475 femmes	Korean National Nutrition Survey (1995)			14.88 mg	Génistéine 7,32 mg Daïdzéine 5,81 mg Glycitéine 1,75 mg	Soybeans, tofu, soybean paste, soybean sprouts =94% isoflavones
					Zones rurales : 15,18 mg		1) Soybeans
					Zones urbaines : 14,85 mg		1) Tofu
<b>OCCIDENT</b>							
Horn-Ross 2002	<b>USA</b> 111 526 femmes en Californie (87% blanches)	FFQ			1,778 mg <sup>9</sup> (20-80 <sup>ème</sup> %= 0,641-2,080) Forme aglycone		
Greendale 2002	<b>USA</b> Afro-américaines : 497 Caucasiennes1003	FFQ				Formes aglycones <b>Afro-américaines</b> Génistéine : Ech.total: 0.279±1.801 mg Conso :0.506±2.403 Daïdzéine : Ech.total: 0.140±0.969 mg Conso :0.254±1.295 <b>Caucasiennes</b> <b>G</b> : Ech.total: 0.978±3.873 mg Conso :1.426±4.586 <b>D</b> : Ech.total: 0.527±18012.176 mg <b>Conso :0.761±2.581</b>	Tous produits dérivés du soja chez les asiatiques mais seuls fermentés chez les Japonaises

<sup>8</sup> Valeurs de 1556 témoins<sup>9</sup> Isoflavones = génistéine + daïdzéine + formononétine + biochanine A



Référence	Pays, population	Outil de mesure	Aliments à base de soja	Protéines de soja	Isoflavones (total)	Isoflavones (individuelles)	Sources alimentaires
de Kleijn 2001	<b>USA</b> 964 femmes ménopausées 35-81 ans	FFQ			Médiane=0,154 mg (25-75 <sup>ème</sup> perc= 0,099-0,235) (moyenne=0,760 mg ±4345) Forme aglycone	Médianes (25-75 <sup>ème</sup> %): Génistéine 0,070 mg (0,028-0,120) Daïdzéine 0,039 mg (0,024-0,057) Formononéine 0,031 mg (0,013-0,044) Biochanine-A 0,006 mg (0,002-0,011) Formes aglycones	Haricots secs, pois, thé, café, fruits secs
Keinan-Boker 2002	<b>10 pays européens</b> 35955 participants EPIC 35-74 ans Hommes 36% Femmes 64%	Rappel de 24h	Hommes 1,96 g/jr Femmes 2,65 g/jr  1,5% hommes 2,1% femmes  Groupe "health conscious" (vegetarians): 35% hommes 24% femmes		< 2 mg		1)Substituts de produits laitiers au soja 2)Substituts de viande au soja
Peterson 2003	<b>Grèce</b>	FFQ			0,20 mg (10-90 <sup>ème</sup> %= 0,01-0,80) Forme aglycone		
Keinan Boker 2002	<b>Pays-Bas</b> 17357 femmes 50-69 ans	FFQ	Médiane=0,00 Moyenne=10,62 mg (±12,28)		Médiane=0,355 mg Moyenne=0,881 mg Forme aglycone	Médianes : Génistéine 0,141mg (0,091-0,224) Daïdzéine 0,134 mg (0,094-0,191) Formononéine 0,079 mg (0,055-0,117) Biochanine-A 0,001 mg (0,0008-0,0017) Formes aglycones	Pois, haricots secs, céréales, café/thé, aliments à base de soja, fruits secs
Keinan-Boker 2004	<b>Pays-Bas</b> 15555 femmes 49-70 ans	FFQ			Médiane <sup>10</sup> =0,37 mg (25-75 <sup>ème</sup> %= 0,26-0,54) Forme aglycone		
Linseisen 2004	<b>Allemagne</b> Femmes non ménopausées	FFQ			Médiane= 0,289 mg <sup>11</sup> (25-75 <sup>ème</sup> %= 0,173-0,414) Forme aglycone	Médianes : Gén+Daïd=0,172 mg (25-75 <sup>ème</sup> %=0,101-0,270) Formes aglycones	Pousses soja, légumineuses, sauce soja, café
Mulligan 2002	<b>Angleterre</b>	Recueil	Aliments au soja		0,680 mg (±687)	Génistéine=55%	

<sup>10</sup> Isoflavones = génistéine + daïdzéine + formononéine + biochanine A

<sup>11</sup> Isoflavones = génistéine + daïdzéine + formononéine + biochanine A (valeurs de 666 témoins)

Référence	Pays, population	Outil de mesure	Aliments à base de soja	Protéines de soja	Isoflavones (total)	Isoflavones (individuelles)	Sources alimentaires
	335 hommes et femmes 45-64 ans	alimentaire de 7 jours	consommés par 4% de la population		(5-95 <sup>ème</sup> % = 0,155-1,510) = génistéine + daïdzéine Forme aglycone	Daïdzéine=45% Formes aglycones	
Grace 2004	<b>Angleterre</b> 1674 femmes, 45-75 ans	Recueil alimentaire de 7 jours				Médiane Génistéine :0. 247 mg Daïdzéine : 0,205 mg Formes aglycones	
Van Erp-Baart 2003	Europe, 4 pays : <b>Irlande</b> 1379 <b>Italie</b> 1513 <b>Pays-Bas</b> 4085 <b>Royaume-Uni</b> 335	Recueil alimentaire de 2 ou 7 jours et table de composition VENUS			Formes aglycones <b>Non consommateurs de soja :</b> Irlande 0,545mg ±0,337 Italie 0,554mg ±1,072 Pays-Bas 0,683mg ±0,372 Royaume-Uni 0,602mg ±0,350 <b>Consommateurs de soja :</b> Irlande (n=42) 5,996mg ±8,123 Pays-Bas (n=85) 11,111mg ±6,728 Royaume-Uni (n=15) 3,176mg ±4,034		
Valsta 2003	<b>Finlande</b> 1361 hommes et 1501 femmes, 25-64 ans	Rappels de 24h (étude FINDIET 1997) et table de composition alimentaire Fineli			0,788 mg ±0,673 Forme aglycone	Génistéine 0,482mg ±0,381 Daïdzéine 0,306 mg ±0,291 Formes aglycones	
<b>POPULATIONS MIGRANTES</b>							
Horn-Ross 2000	<b>USA</b> 447 femmes (origine africaine ou latine, blanches) 50-79 ans	FFQ			2,872 mg Forme aglycone	Génistéine 1,483 mg Daïdzéine 1,281 mg Formononétine 0,029 mg Biochanine-A 0,079 mg Formes aglycones	Tofu, tonyu, aliments à base de soja
Horn-Ross 2001	<b>USA</b> Baie de San Francisco 1657 femmes (origine africaine ou latine, blanches) 35-79 ans	FFQ			3,326 mg Forme aglycone <sup>12</sup>		Tofu, beignets, tonyu, pain

<sup>12</sup> Isoflavones = génistéine + daïdzéine + formononétine + biochanine A (valeurs de 1610 témoins)

Référence	Pays, population	Outil de mesure	Aliments à base de soja	Protéines de soja	Isoflavones (total)	Isoflavones (individuelles)	Sources alimentaires
Wu 2002	USA, Los Angeles Américaines d'origine asiatique ou émigrantes	Questionnaire alimentaire et entretien (tofu à l'adolescence + aliments soja à l'âge adulte)			18,7 mg ( $\pm 22,1$ )		Soja (tofu 60%, tonuy 12%, miso 9%, graines de soja 5%, plats au soja 5%)
	Américaines d'origine asiatique				14,3 mg ( $\pm 14,3$ ) (Chine 11,6 mg, Japon 15,3 mg, Philippines 7,5 mg)		
	Asiatiques émigrées aux USA				20,4 mg ( $\pm 24,3$ ) (Chine 29,2 mg, Japon 26,6 mg, Philippines 9,4 mg)		
Greendale 2002	USA Chinoises : 200 Japonaises : 227	FFQ				Formes aglycones <b>Japonaises</b> G : Ech.total: 10.820 $\pm$ 10.217 mg Conso :10.868 $\pm$ 10.214 D : Ech.total: 7.539 $\pm$ 7.793 mg Conso :7.573 $\pm$ 7.794 <b>Chinoises :</b> G : Ech.total: 5.787 $\pm$ 6.736 mg <b>Conso :5.817<math>\pm</math>6.741</b> D : Ech.total: 3.001 $\pm$ 18013.488 mg Conso :3.016 $\pm$ 4.491	Tous produits dérivés du soja chez les asiatiques mais seuls fermentés chez les Japonaises
dos Santos-Silva 2004	Angleterre Femmes originaires d'Inde	FFQ			0,264 mg <sup>13</sup> (10-90 <sup>ème</sup> %=0,074-1,053) Forme aglycone		1) pain 2) légumes 3) légumes secs

<sup>13</sup> Isoflavones = génistéine + daïdzéine (valeurs de 475 témoins)

- Adlercreutz, H., Fotsis, T., Heikkinen, R., Dwyer, J.T., et al. (1982) Excretion of the lignans enterolactone and enterodiol and of equol in omnivorous and vegetarian postmenopausal women and in women with breast cancer. *Lancet*, 2, 1295-9.
- Agence Nationale d'Accréditation et d'Evaluation en Santé, Agence Française de Sécurité sanitaire des Produits de Santé (2004) Dossier de Presse : Traitement hormonaux substitutifs de la ménopause. Mercredi 12 mai 2004. Saint Denis, ANAES.
- Anderson, R., Wolf, W. (1995) Compositional changes in trypsin inhibitors, phytic acid, saponins and isoflavones related to soybean processing. *J Nutr*, 125, 581-8.
- Antignac, J.P., Cariou, R., Le Bizec, B., Cravedi, J.P., et al. (2003) Identification of phytoestrogens in bovine milk using liquid chromatography/electrospray tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 17, 1256-64.
- Arai, Y., Uehara, M., Sato, Y., Kimira, M., et al. (2000a) Comparison of isoflavones among dietary intake, plasma concentration and urinary excretion for accurate estimation of phytoestrogen intake. *J Epidemiol*, 10, pp.127-35.
- Arai, Y., Watanabe, S., Kimira, M., Shimoi, K., et al. (2000b) Dietary intakes of flavonols, flavones and isoflavones by Japanese women and the inverse correlation between quercetin intake and plasma LDL cholesterol concentration. *J Nutr*, 130, 2243-50.
- Aussenac, T., Lacombe, S., Dayde, J. (1998) Quantification of isoflavones by capillary zone electrophoresis in soybean seeds: effects of variety and environment. *Am J Clin Nutr*, 68, 1480S-1485.
- Bemraw-Aouachria, N., Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments (2004) Evaluation de l'apport en phyto-estrogènes dans la population française (données INCA 1999) OCA/NB/2004-141. Maisons-Alfort, AFSSA-OCA.
- Bennetau-Pelissero, C., Arnal-Schnebelen, B., Lamothe, V., Sauvart, P., et al. (2003) ELISA as a new method to measure genistein and daidzein in food and human fluids. *Food Chemistry*, 82, 6445-658.
- Bergström, L., National Food Administration, Nutrient Losses and Gains (1994) Nutrient losses and gains in the preparation of foods. N°32/94. Uppsala (Suède), National Food Administration.
- Bognar, A., Bundesforschungsanstalt für Ernährung (2002) Tables on weight yield of food and retention factors of food constituents for the calculation of nutrient composition of cooked food (dishes). Karlsruhe, BFE.
- Boker, L.K., Van der Schouw, Y.T., De Kleijn, M.J., Jacques, P.F., et al. (2002) Intake of dietary phytoestrogens by Dutch women. *J Nutr*, 132, 1319-28.
- Branca, F. (2003) Foreword. *Br J Nutr*, 89 suppl 1, 3-4.
- Chen, Z., Zheng, W., Custer, L.J., Dai, Q., et al. (1999) Usual dietary consumption of soy foods and its correlation with the excretion rate of isoflavonoids in overnight urine samples among Chinese women in Shanghai. *Nutr Cancer*, 33, 82-7.
- Coward, L., Smith, M., Kirk, M., Barnes, S. (1998) Chemical modification of isoflavones in soyfoods during cooking and processing. *Am J Clin Nutr*, 68, 1486S-1491S.
- Dai, Q., Franke, A.A., Jin, F., Shu, X.O., et al. (2002) Urinary excretion of phytoestrogens and risk of breast cancer among Chinese women in Shanghai. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 11, 815-21.
- Dai, Q., Franke, A.A., Yu, H., Shu, X.O., et al. (2003) Urinary phytoestrogen excretion and breast cancer risk: evaluating potential effect modifiers endogenous estrogens and anthropometrics. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 12, 497-502.
- Dai, Q., Shu, X.O., Jin, F., Potter, J.D., et al. (2001) Population-based case-control study of soyfood intake and breast cancer risk in Shanghai. *Br J Cancer*, 85, 372-8.
- de Kleijn, M.J., van der Schouw, Y.T., Wilson, P.W., Adlercreutz, H., et al. (2001) Intake of dietary phytoestrogens is low in postmenopausal women in the United States: the Framingham study(1-4). *J Nutr*, 131, 1826-32.
- Directive 2002/46/CE, Communauté Economique Européenne (2002) Directive 2002/46/CE du parlement européen et du conseil du 10 juin 2002 relative au rapprochement des législations des Etats membres concernant les compléments alimentaires. L 183/51. Journal Officiel des Communautés Européennes.
- dos Santos Silva, I., Mangtani, P., McCormack, V., Bhakta, D., et al. (2004) Phyto-oestrogen intake and breast cancer risk in South Asian women in England: findings from a population-based case-control study. *Cancer Causes Control*, 15, 805-18.
- Fletcher, R. (2003) Food sources of phyto-estrogens and their precursors in Europe. *Br J Nutr*, 89 Suppl 1, 39-43.
- Greenfield, H., Southgate, H. (1992) Food composition data : production, management, and use. London, Elsevier.
- Grun, I.U., Adhikari, K., Li, C., Li, Y., et al. (2001) Changes in the profile of genistein, daidzein, and their conjugates during thermal processing of tofu. *J Agric Food Chem*, 49, 2839-43.
- Hoikkala, A., Schiavoni, E., Wahala, K. (2003) Analysis of phyto-estrogens in biological matrices. *Br J Nutr*, 89 suppl 1, 5-18.
- Horn-Ross, P.L., Barnes, S., Lee, M., Coward, L., et al. (2000a) Assessing phytoestrogen exposure in epidemiologic studies: development of a database (United States). *Cancer Causes Control*, 11, 289-98.
- Horn-Ross, P.L., Hoggatt, K.J., West, D.W., Krone, M.R., et al. (2002) Recent diet and breast cancer risk: the California Teachers Study (USA). *Cancer Causes Control*, 13, 407-15.
- Horn-Ross, P.L., John, E.M., Lee, M., Stewart, S.L., et al. (2001) Phytoestrogen consumption and breast cancer risk in a multiethnic population: the Bay Area Breast Cancer Study. *Am J Epidemiol*, 154, 434-41.
- Horn-Ross, P.L., Lee, M., John, E.M., Koo, J. (2000) Sources of phytoestrogen exposure among non-asian women in California, USA. *Cancer Causes Control*, 11, 299-302.
- Jakes, R.W., Duffy, S.W., Ng, F.C., Gao, F., et al. (2002) Mammographic parenchymal patterns and self-reported soy intake in Singapore Chinese women. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 11, 608-13.
- Keinan-Boker, L., Peeters, P.H., Mulligan, A.A., Navarro, C., et al. (2002a) Soy product consumption in 10 European countries: the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC) study. *Public Health Nutr*, 5, 1217-26.
- Keinan-Boker, L., Peeters, P.H., Mulligan, A.A., Navarro, C., et al. (2002b) Consumption of soy products among European consumers of a health-conscious diet. *IARC Sci Publ*, 156, 109-12.

- Keinan-Boker, L., van Der Schouw, Y.T., Grobbee, D.E., Peeters, P.H. (2004) Dietary phytoestrogens and breast cancer risk. *Am J Clin Nutr*, 79, 282-8.
- Kiely, M., Faughnan, M., Wahala, K., Brants, H., et al. (2003) Phyto-oestrogen levels in foods: the design and construction of the VENUS database. *Br J Nutr*, 89 Suppl 1, S19-23.
- Kim, J., Kwon, C. (2001) Estimated dietary isoflavone intake of Korean population based on National Nutrition Survey. *Nutr Res*, 21, 947-953.
- Kimura, M., Arai, Y., Shimoi, K., Watanabe, S. (1998) Japanese intake of flavonoids and isoflavonoids from foods. *J Epidemiol*, 8, 168-75.
- King, R.A., Mano, M.M., Head, R.J. (1998) Assessment of isoflavonoid concentrations in Australian bovine milk samples. *J Dairy Res*, 65, 479-89.
- Lee, S.J., Ahn, J.K., Kim, S.H., Kim, J.T., et al. (2003) Variation in isoflavone of soybean cultivars with location and storage duration. *J Agric Food Chem*, 51, pp.3382-9.
- Liggins, J., Bluck, L.J., Runswick, S., Atkinson, C., et al. (2000) Daidzein and genistein contents of vegetables. *Br J Nutr*, 84, 717-25.
- Linseisen, J., Piller, R., Hermann, S., Chang-Claude, J. (2004) Dietary phytoestrogen intake and premenopausal breast cancer risk in a German case-control study. *Int J Cancer*, 110, 284-90.
- Liu, Z., Li, W., Sun, J., Liu, C., et al. (2004) Intake of soy foods and soy isoflavones by rural adult women in China. *Asia Pac J Clin Nutr*, 13, 204-9.
- Mazur, W. (1998) Phytoestrogen content in foods. *Baillieres Clin Endocrinol Metab*, 12, 729-42.
- Messina, M. (1995) Isoflavone intakes by Japanese were overestimated. *Am J Clin Nutr*, 62, 645.
- Messina, M.J. (1999) Legumes and soybeans: overview of their nutritional profiles and health effects. *Am J Clin Nutr*, 70, 439S-450S.
- Morton, M.S., Matos-Ferreira, A., Abranches-Monteiro, L., Correia, R., et al. (1997) Measurement and metabolism of isoflavonoids and lignans in the human male. *Cancer Lett*, 114, 145-51.
- Mulligan, A.A., Luben, R.N., Welch, A.A., Bingham, S.A. (2002) Daidzein and genistein intakes in England (the EPIC Norfolk cohort). *IARC Sci Publ*, 156, 369-70.
- Oseredczuk, M., Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments (2004) Table de composition en génistéine et daïdzéine des aliments consommés en France. CIQAL/MO/2004-190. Maisons Alfort, AFSSA-CIQAL.
- Peterson, J., Lagiou, P., Samoli, E., Lagiou, A., et al. (2003) Flavonoid intake and breast cancer risk: a case-control study in Greece. *Br J Cancer*, 89, 1255-9.
- Pillow, P.C., Duphorne, C.M., Chang, S., Contois, J.H., et al. (1999) Development of a database for assessing dietary phytoestrogen intake. *Nutr Cancer*, 33, 3-19.
- Resnicow, K., Barone, J., Engle, A., Miller, S., et al. (1991) Diet and serum lipids in vegan vegetarians: a model for risk reduction. *J Am Diet Assoc*, 91, 447-53.
- Setchell, K.D., Cole, S.J. (2003) Variations in isoflavone levels in soy foods and soy protein isolates and issues related to isoflavone databases and food labeling. *J Agric Food Chem*, 51, 4146-55.
- Shu, X.O., Jin, F., Dai, Q., Wen, W., et al. (2001) Soyfood intake during adolescence and subsequent risk of breast cancer among Chinese women. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 10, 483-8.
- Simonne, A.H., Smith, M., Weaver, D.B., Vail, T., et al. (2000) Retention and changes of soy isoflavones and carotenoids in immature soybean seeds (Edamame) during processing. *J Agric Food Chem*, 48, 6061-9.
- Singleton, K., Faller, J., Li, J.Y., Mahungu, S. (2000) Effect of extrusion on isoflavone content and antiproliferative bioactivity of soy/corn mixtures. *J Agric Food Chem*, 48, 3566-71.
- Tard, A., Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments (2004) Evaluation de l'apport en phytoestrogènes dans la population française (produits à base de soja, données Sécodip) OCA/AT/2004-142. Maisons-Alfort, AFSSA-OCA.
- United States Department of Agriculture, Nutrient Data Laboratory, Agricultural Research Service (2002) USDA food-lowa state university database on the isoflavone content of foods, release 1.3-2002. USDA.
- United States Department of Agriculture, Nutrient Data Laboratory, Agricultural Research Service (2003) USDA food composition data. Table of nutrient retention factors, release 5. USDA.
- Valsta, L.M., Kilkkinen, A., Mazur, W., Nummi, T., et al. (2003) Phyto-oestrogen database of foods and average intake in Finland. *Br J Nutr*, 89 Suppl 1, S31-8.
- van Erp-Baart, M.A., Brants, H.A., Kiely, M., Mulligan, A., et al. (2003) Isoflavone intake in four different European countries: the VENUS approach. *Br J Nutr*, 89 Suppl 1, S25-30.
- Verkasalo, P.K., Appleby, P.N., Allen, N.E., Davey, G., et al. (2001) Soya intake and plasma concentrations of daidzein and genistein: validity of dietary assessment among eighty British women (Oxford arm of the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition). *Br J Nutr*, 86, 415-21.
- Centre de Recherche pour l'Etude et l'Observation des Conditions de Vie, Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments, Ministère de l'Agriculture et de la Pêche (2000) Enquête individuelles et nationales sur les consommations alimentaires. Paris, Tec et Doc.
- Vyn, T.J., Yin, X., Bruulsema, T.W., Jackson, C.J., et al. (2002) Potassium fertilization effects on isoflavone concentrations in soybean [*Glycine max* (L.) Merr.]. *J Agric Food Chem*, 50, 3501-6.
- Wakai, K., Egami, I., Kato, K., Kawamura, T., et al. (1999) Dietary intake and sources of isoflavones among Japanese. *Nutr Cancer*, 33, 139-45.
- Willett, W. (2003) Lessons from dietary studies in Adventists and questions for the future. *Am J Clin Nutr*, 78, 539S-543S.
- Wu, A.H., Wan, P., Hankin, J., Tseng, C.C., et al. (2002) Adolescent and adult soy intake and risk of breast cancer in Asian-Americans. *Carcinogenesis*, 23, 1491-6.
- Yamamoto, S., Sobue, T., Kobayashi, M., Sasaki, S., et al. (2003) Soy, isoflavones, and breast cancer risk in Japan. *J Natl Cancer Inst*, 95, 906-13.
- Zhao, W., You, Y., Zhang, X., Wang, J. (2002) [Study on the food consumption pattern of elderly people in four "cuisine" areas of China]. *Wei Sheng Yan Jiu*, 31, 34-7.
- Ziegler, R.G. (2004) Phytoestrogens and breast cancer. *Am J Clin Nutr*, 79, 183-4.



# Biodisponibilité des phyto-estrogènes

Catherine Bennetau-Pelissero, Jacques Tulliez

Les éléments intervenant dans la biodisponibilité des phyto-estrogènes conditionnent les doses de sécurité, les doses efficaces, et la cinétique de délivrance de ces molécules sur le site où elles sont actives. La détermination des relations entre doses ingérées et doses circulantes est donc centrale pour pouvoir prédire un effet physiologique et le mode de prise<sup>14</sup> de ces substances. Le fait qu'elles soient absorbées et utilisées par l'organisme pour produire une activité estrogénique dépend de plusieurs facteurs et de plusieurs étapes. Schématiquement, ces facteurs et étapes incluent : la forme chimique de la molécule lors de son absorption, les processus mis en œuvre lors de son absorption et de son métabolisme, et enfin son transport dans l'organisme jusqu'aux cellules où l'activité peut se produire. La biodisponibilité est également le reflet de l'élimination des composés. La quantité de composés biodisponibles est ainsi la résultante d'une absorption orale, d'un métabolisme, d'une résorption<sup>15</sup> intestinale et d'une élimination fécale et urinaire.

Parmi les éléments à souligner de prime abord, notons que les phyto-estrogènes ne sont généralement pas présents dans les plantes sous une forme biologiquement active. Dans de nombreux cas, les molécules présentes dans la plante sont liées à des glucides sous forme glycosides (soit les formes glucoside, malonyl et acétyl) ou sous formes de précurseurs (matairésinol, secoisolaricirésinol, laricirésinol pour les lignanes, daidzéine pour l'équol). Ils acquièrent leur activité estrogénique à la suite d'une transformation métabolique par la flore bactérienne intestinale (Xie 2003), ou par les enzymes entérocytaires. La voie d'administration est donc cruciale, et un composé actif par voie orale comme par exemple la fomononétine, peut ne pas l'être par voie intraveineuse (Braden 1967). Notons également les limites inhérentes aux modèles *in vitro* : ces tests ne permettent pas de mettre en évidence de façon exhaustive les phénomènes liés à l'absorption des molécules, et à l'activité métabolique présente dans le tube digestif et dans le foie, où aboutissent tous les composés ingérés par voie orale. Il en résulte que des molécules actives *in vitro* ne sont pas nécessairement actives dans l'organisme, tout comme à l'inverse, l'activité métabolique dans l'organisme peut conférer à la substance absorbée une activité qui ne sera pas révélée par les tests *in vitro* utilisés (Bennetau-Pelissero 2004). En outre, il existe une certaine spécificité tissulaire de l'activité estrogénique, qui peut ne pas être reproduite par les modèles *in vitro* utilisés. C'est ainsi que l'équol, aujourd'hui considéré comme estrogénique, est passé pour un composé inerte au moment de sa découverte dans l'urine de jument (Marrian 1932). Enfin, soulignons que les phyto-estrogènes étant inclus dans les végétaux alimentaires, les éventuels effets de la matrice sur la biodisponibilité doivent être pris en considération.

Les étapes clés (ingestion, absorption, déterminants des taux circulants et urinaires) seront présentées, avant d'analyser le détail des données chiffrées disponibles, et de discuter les biomarqueurs d'exposition utilisés dans ce domaine.

## I- Mécanismes en jeu (voir figure 1)

### I-1 Absorption et métabolisme intestinal

Dans les matrices végétales, les phyto-estrogènes sont généralement liés à des sucres (voir figure 2A). Hormis quelques cas décrits dans la littérature concernant le passage direct de flavonoïdes glycosylés dans la circulation sanguine, les composés glycosylés qui entrent dans l'organisme par voie digestive sont généralement déglycosylés et la déglycosylation est un préalable à l'absorption par les entérocytes (Hollman 1997). L'étape de déglycosylation est également fondamentale car elle intervient directement sur l'efficacité du passage des substances dans le sang : chez l'Homme, la déglycosylation concerne 1 et 50% seulement des flavonoïdes ingérés (Hollman 1995). Pour les isoflavonoïdes, il semble que la transformation soit quantitative (Rowland 2003) et donc que tous les glycosides soient hydrolysés dans le tube digestif. Enfin, le métabolisme par la flore colique peut intervenir de façon fondamentale dans l'activité des substances ingérées en générant des métabolites inactifs comme la o-desmethyl angolensin ou le p-éthyl phénol et des métabolites actifs comme l'équol.

<sup>14</sup> généralement appelée « cure » par les industriels qui proposent des compléments alimentaires incluant ces substances

<sup>15</sup> résorption : transfert du compartiment intestinal au compartiment plasmatique ; c'est la phase ascendante de la courbe cinétique d'apparition des isoflavones dans le sang.

### I-1-1 Les étapes de déglycosylation puis de glucuronidation

La déglycosylation dépend de plusieurs facteurs, notamment la solubilité de la molécule dans le milieu intérieur et l'action des enzymes et des bactéries du tube digestif. La **solubilité** des phyto-estrogènes déglycosylés (soit sous forme dite « aglycone ») dans les milieux aqueux est parfois discutée. Compte tenu de ce que les phyto-estrogènes appartiennent tous à la grande famille chimique des polyphénols, ils sont à ce titre considérés comme faiblement solubles dans l'eau, et ce caractère peu hydrophile leur confère une plus grande facilité pour traverser les membranes cellulaires, et par suite une meilleure biodisponibilité potentielle (Izumi 2000). **Les composés de façon quasi générale doivent être sous forme aglycones** pour passer la barrière intestinale et il existe donc un délai lié à leur déglycosylation avant qu'ils n'entament leur résorption après avoir été ingérés sous forme de glycosydes (Setchell 2001). La différence de biodisponibilité entre les formes aglycones et glycosylées tient ainsi essentiellement à leur délai d'apparition dans le sang (résorption), la forme d'ingestion jouant donc probablement un rôle essentiellement en terme de cinétique de délivrance de la molécule absorbée au site d'action. Concernant le mécanisme de déglycosylation lui-même, on pensait initialement que les bactéries du tube digestif en étaient responsables. Si ces bactéries semblent effectivement intervenir (Setchell 2002), plusieurs considérations amènent aujourd'hui à considérer le rôle prépondérant des enzymes entérocytaires (notamment la  $\beta$  glucosidase de la bordure en brosse). Tout d'abord, on sait que ces enzymes sont très fortement exprimées sur la bordure en brosse au niveau du jéjunum (Day 1998). D'autre part chez le nourrisson dont la flore intestinale est très peu développée, les isoflavones passent la barrière intestinale (Setchell 1997), et elles ne peuvent la passer qu'après déglycosylation (Day 1998). Enfin, une absorption jéjunale est en accord avec les cinétiques d'apparition après ingestion. Pour les isoflavones, le  $T_{max}^{16}$  après ingestion se situe entre 4 et 6 heures. Pour les lignanes, les chalcones et le coumestrol, les suivis cinétiques restent à faire. A ce jour, aucune étude n'a rapporté la présence de glycosides dans les fèces, ce qui laisse à penser que les glycosides sont hydrolysés avant élimination fécale. Enfin, l'absorption pourrait être dans certains cas conditionnée à **une étape de glucuronidation** d'une partie des composés, au niveau de l'entérocyte lui-même. Cette étape a été démontrée chez le Rat (Crespi 2001) dans des expériences d'intestins isolés perfusés et par ailleurs des glucuronides d'isoflavones ont été dosés dans la circulation porte hépatique conduisant les composés absorbés par les entérocytes jusqu'au foie (Aldercreutz 1986a et 1986b). Le passage au foie pourrait comme pour d'autre polyphénols emprunter la voie portale ou la voie lymphatique en fonction du statut postprandial ou postabsorptif (figure 1). Mais ceci reste une hypothèse qu'il faut encore explorer. Cette glucuronidation partielle peut être à l'origine d'une faible partie des glucuronides observés dans les fèces, elle conduirait donc d'après Crespi (2001) à une sous-évaluation de l'absorption intestinale.

A titre de bilan net ingestion/excrétion, il faut noter que dans le cas des lignanes, la différence observée entre les quantités ingérées et les quantités excrétées par l'organisme ont amené certains auteurs à examiner plus précisément les sources connues de ces substances. En effet, il semble qu'outre les apports liés à la consommation de lin ou aux autres pourvoyeurs de précurseurs connus des lignanes (secoisolaricirésinol, matairésinol, laricirésinol...) ceux-ci puissent provenir du catabolisme des lignines. Les lignines sont des molécules complexes issues de la condensation d'unités de base polyphénoliques qui constituent une part importante de la paroi des cellules végétales, il est donc très important de les prendre en compte dans les régimes végétariens (Begum 2004 ; Nicolle 2002).

### I-1-2 Notion de premier passage

L'origine de la daïdzéine colique qui chez l'Homme est ensuite transformée en équol, n'est pas complètement connue : une part peut provenir d'un pool ayant passé l'intestin grêle sans être absorbée, l'autre peut provenir d'une excrétion biliaire. Une partie de la daïdzéine est en effet absorbée au niveau jéjunal, passe dans le sang porte puis est prise en charge par le foie ; elle est ensuite pour partie excrétée (principalement sous forme de conjugués) dans la bile, laquelle rejoint le duodénum via le canal cholédoque. C'est le phénomène de premier passage.

---

<sup>16</sup>  $T_{max}$  : temps (généralement en heures) auquel on observe la concentration plasmatique maximale.



### **I-1-3 Métabolisme par la flore colique**

D'autres biotransformations peuvent intervenir après l'absorption. Un peu plus loin dans le côlon, la flore bactérienne symbiote peut notamment être responsable de transformations métaboliques particulières. C'est le cas de la transformation de la biochanine A en génistéine, de la formononétine en daïdzéine puis en équol (Setchel 1998) et du pinorésinol, du laricirésinol, du mataïrésinol et du secoisolarricirésinol en entérolactone et entérodiol (Xie 2003). L'équol est une molécule souvent mise en avant dans les publications parce qu'elle semble être l'un des composés les plus importants en terme d'activité (Setchell 2002) et parce que les études chez l'animal de laboratoire (rat, souris, hamster, porc ou singe) ont montré que la grande majorité des espèces était capable de le produire. Toutefois, les études dont nous disposons aujourd'hui montrent qu'à l'inverse les humains ne sont pas systématiquement capables de transformer la daïdzéine en ce métabolite (Rowland 2000) : la proportion de producteurs d'équol est de l'ordre de 30 à 40% chez les occidentaux (Bennetau-Pelissero 2003, Setchell 2002). Elle est égale ou légèrement supérieure chez les asiatiques suivant les études : Uchiyama (2001) cité par Setchell (2002) rapporte une proportion de producteurs d'équol de 53,5% chez les femmes japonaises. Si l'estimation de cette proportion peut être fonction de la sensibilité des méthodes d'analyse utilisées pour détecter l'équol, il n'en reste pas moins que la différence Homme/animal observée conduit à être prudent pour ce qui concerne la transposition à l'Homme des effets démontrés chez l'animal.

### **I-2 Le métabolisme hépatique**

Les composés (glucuronidés ou non) passent ensuite dans la circulation porte hépatique. Au niveau du foie, ils vont être pris en charge par les enzymes de détoxification de phase II ainsi que par des enzymes de phase I. Ces enzymes participent classiquement à l'élimination, notamment des stéroïdes et des polyphénols. Les différentes étapes du métabolisme hépatique n'ont pas été étudiées, loin s'en faut et encore moins chez l'Homme, pour tous les phyto-estrogènes. On sait que les enzymes de phase I qui interviennent sur certains phyto-estrogènes sont plutôt des enzymes d'hydroxylation (Kulling 2001, Peng 2003). Des enzymes de phase II interviennent également pour une activité de glucuronidation ou de sulfatation des composés, l'un ou l'autre des processus étant majoritaire en fonction des espèces. Chez les mammifères, ce sont plutôt des processus de glucuronidation (très efficaces car rapides et peu saturables) qui sont mis en jeu. Les enzymes de phase II, comme les UDPGT (Uridine diphospho glucuronyl transférase) ou les sulfotransférases fixent sur les fonctions hydroxyles natives ou néo-formées par les enzymes de phase I, des groupements glucuronides et/ou sulfates. Ce faisant, la solubilité des composés augmente dans l'eau en même temps que le rapport atomes d'oxygène sur atomes de carbone. Cela favorise leur transport sanguin et finalement leur élimination urinaire. En ce qui concerne les isoflavones, il en résulte que les formes majoritaires des composés circulants dans le plasma sont des formes glucuro-conjuguées et sulfo-conjuguées (Shelnutt 2002, Zhang 2003). La molécule dont la conjugaison semble être la plus faible est l'équol. Ceci est peut être lié à sa structure particulière, dotée à l'inverse de ses molécules parentes d'un carbone asymétrique et d'une structure non plane (Setchell 2002). Chez le Rat, Sfakianos (1997) a montré qu'une partie des métabolites hépatiques passent dans la bile (notamment ceux issus des transformations de phase I). Ils sont ensuite excrétés dans l'intestin, où ils peuvent subir une ré-absorption (voir figure 1).

### **I-3 Variabilité des mécanismes en jeu de l'absorption à l'excrétion**

La faculté des molécules à passer la barrière intestinale dépend donc des activités enzymatiques intestinales, de la solubilité des composés (notamment dans les lipides de la membrane des cellules épithéliales), des interactions qu'ils tissent avec les autres constituants du bol alimentaire, et de la vitesse de transit dans les voies digestives. La plupart de ces paramètres sont sujets à une certaine variabilité.

**Les activités enzymatiques** résultent d'un polymorphisme génétique propre à chaque individu, chaque espèce, mais aussi d'une adaptation à très long terme au régime alimentaire. Concernant ce dernier point, Aldercreutz (1986a) ont ainsi montré que des femmes sous différents régimes présentaient des taux plasmatiques globalement différents pour une même prise, et Setchell

(1985) a montré que les taux d'équol excrétés par des non végétariens après une prise de soja sont proportionnellement plus élevés que ceux excrétés par des végétaliens habitués à ce régime. Il est fondamental de garder cette notion à l'esprit lors de la comparaison de populations ayant des habitudes alimentaires différentes.

La difficulté d'interprétation liée aux **interactions alimentaires** est en partie contournée dans certaines études ou situations où les phyto-estrogènes sont administrés sous forme d'extraits enrichis ou de composés aglycones purs. En tout état de cause, la forme d'administration des phyto-estrogènes doit être prise en compte lors de l'interprétation des résultats.

**Le transit** varie en fonction des espèces, de l'âge des individus, de la nature plus ou moins riche du régime en fibres, et de la richesse et de l'état de la flore colique. Ce processus est hautement variable d'une molécule à l'autre, d'une espèce à l'autre, d'un individu à l'autre. Il n'est donc pas surprenant que les premiers travaux rapportant des taux plasmatiques ou urinaires de phyto-estrogènes aient mentionné des variations inter-individuelles majeures (Aldercreutz 1982).

Compte tenu des activités enzymatiques qu'il est susceptible de mettre en œuvre, **le foie** peut influencer de façon importante les taux circulants, par l'activité enzymatique qu'il met en œuvre. L'activité métabolique est, là encore, influencée par le polymorphisme génétique des espèces et des individus. Elle peut également être modulée par la présence de stéroïdes ou d'autres xénobiotiques, et notamment des polyphénols. Ainsi, les études de biodisponibilité et/ou de pharmacocinétique bien construites tendent à réduire la prise de polyphénols concomitante de celle des phyto-estrogènes. Enfin, dans certains cas, on peut se poser la question de la saturabilité qui pourrait entre-autres expliquer des variations interindividuelles de la proportion des différentes formes circulantes. Cette fois, c'est non seulement le régime alimentaire, mais aussi les situations environnementales des individus et l'exposition éventuelle à des xénobiotiques de nature polyphénolique, qu'il faut prendre en compte. En effet, dans nombre de cas, des xénobiotiques polyphénoliques peuvent être pris en charge par les mêmes systèmes de détoxification que ceux qui prennent en charge les phyto-estrogènes (Court 2002). On peut également suspecter l'effet de certains de ces composés sur les enzymes de phase I ou II, avec dans certains cas une augmentation de leur activité, dans d'autres au contraire, des inhibitions non compétitives.

**L'élimination rénale** est également peu étudiée mais elle met en œuvre des enzymes qui dépendent du polymorphisme génétique de chaque espèce et de chaque individu. Elle peut évidemment être influencée par la quantité d'eau ingérée par unité de temps ; les mesures urinaires doivent donc être rapportées à celles d'un marqueur intrinsèque comme la créatinine, ou exogène comme l'acide para-aminobenzoïque (PABA), marqueur d'excrétion permettant de vérifier qu'on a bien recueilli la totalité des urines sur 24h). On voit donc que les taux urinaires sont susceptibles de varier considérablement d'un individu à l'autre pour une même prise alimentaire (Xu 1995). Ainsi, les facteurs jouant sur l'excrétion rénale se surajoutent à ceux qui influent sur l'absorption et la résorption plasmatique. On peut donc s'attendre à une moins grande variabilité des taux plasmatiques par rapport aux taux urinaires, si les concentrations sanguines sont toujours mesurées à la même distance de la dernière prise alimentaire.

## II- Les concentrations circulantes et urinaires

### II-1 Les différentes formes circulantes

#### ▪ **Les différentes formes (tableau 1) et leurs activités**

Les formes conjuguées (formes glucuro et sulfoconjuguées) sont des formes d'élimination, considérées comme inactives. Chez l'Homme, elles sont les plus importantes en pourcentage et représentent 60 à 90% de la fraction circulante (Shelnutt 2002). Pourtant, les études cinétiques ne recherchent pas ces molécules en tant que telles, mais l'analyse porte sur les aglycones totaux après une hydrolyse des conjugués et elle donne une concentration globale de composés circulants. Du fait des faibles concentrations plasmatiques généralement observées, il est difficile de procéder à des analyses HPLC-MS directes sur du plasma entier et l'on est obligé de réaliser préalablement une phase d'extraction qui, dans la plupart des cas, altère les molécules et entraîne au moins une hydrolyse partielle des conjugués. Aussi, plutôt que de communiquer des résultats entachés d'erreur, les auteurs préfèrent raisonner sur l'ensemble des fractions (conjugués + aglycones) en ramenant tout en composés non-conjugués (équivalents aglycones).

Ainsi, une ingestion de 10 mg/kg poids corporel/j chez un rat, entraîne des concentrations plasmatiques de 1µM. Chez l'Homme, cette même concentration est atteinte avec moins de 1mg/kg pc/j. Ainsi pour 50 mg de génistéine ingérés (moins d'1mg/kg pc), Setchell 2001 trouvent une Cmax plasmatique de 1,26 µM et pour 50 mg de daidzéine, ils trouvent une Cmax plasmatique de 0,76 µM. Ainsi, malgré l'absence de connaissances comparatives à ce jour entre le métabolisme des isoflavones chez l'animal et l'homme, on se fiera aux concentrations plasmatiques obtenues après une ingestion de soja ou d'isoflavones chez l'animal pour une éventuelle transposition de ses effets à l'Homme. Toutefois, il est troublant de constater que des prises d'isoflavones conduisant à des concentrations plasmatiques totales de 1 à 3 µM, ont des effets sur le sein, les bouffées de chaleur, la sécrétion de LH ou l'os (voir les autres chapitres de ce travail). Or, si l'on ne considère que les formes non-conjuguées, il faut conclure des données disponibles que les concentrations plasmatiques efficaces seraient de l'ordre de 10 à 120 nM. Ceci va à l'encontre de la grande majorité des résultats obtenus in vitro. Ainsi, soit les doses efficaces in vitro ne reflètent pas la véritable activité des molécules et on sous-estime donc leur efficacité, soit il faut envisager que les formes conjuguées peuvent localement être dé-conjuguées au moins par certains tissus cibles. Ce mécanisme participerait alors à la spécificité tissulaire des molécules. Il n'est pas possible de trancher dans un sens ou dans l'autre en l'état actuel de nos connaissances.

#### ▪ **Liaison à des protéines**

La fraction non conjuguée n'est pas libre dans le plasma. La faible solubilité des phyto-estrogènes dans le plasma, et leur polarité proche de celle des stéroïdes, amènerait à une distribution plasmatique proche de celle des hormones stéroïdiennes naturelles. Ainsi, en plus des formes conjuguées, une fraction des phyto-estrogènes sera liée par des liaisons de faible énergie (liaisons hydrogènes ou force de Van der Waals) à des protéines plasmatiques, la plus importante étant l'albumine. Ce pool de molécules est en fait en équilibre avec un pool de molécules libres dans le plasma, il reste de ce fait vraisemblablement assez constant. En outre, les isoflavones peuvent être transportées dans le sang par la Sex hormon binding globulin (SHBG). Cette glycoprotéine hépatique lie originellement l'estradiol avec une forte affinité, et la testostérone avec une affinité deux fois plus forte que l'estradiol (voir chapitre « Mécanismes »).

### **II-2 Biodisponibilité au niveau cellulaire**

La biodisponibilité des phyto-estrogènes au niveau cellulaire n'est pas simple à prévoir. Les concentrations de molécules libres à ce niveau sont fonction du débit sanguin et/ou lymphatique, et de l'aptitude des composés à entrer dans les cellules elles-mêmes. Si les composés libres entrent dans les cellules, il se crée localement un déséquilibre entre la fraction liée à l'albumine et la fraction libre qui tend alors à se reconstituer. Ces processus participent à la spécificité tissulaire des molécules. L'équilibre entre la fraction libre et celle liée à l'albumine peut éventuellement être déplacé par la présence en abondance d'autres polyphénols de polarité voisine puisque la liaison aux protéines n'est pas spécifique : c'est un exemple de l'influence que peut avoir la composition du bol alimentaire sur la biodisponibilité des phyto-estrogènes. Par ailleurs la liaison aux protéines porteuses des stéroïdes (SHBG) intervient dans la biodisponibilité au niveau cellulaire. Pour les isoflavones l'affinité pour la SHBG est en général 1000 fois inférieure à celle des stéroïdes. Les rapports de concentrations dans le plasma étant de cet ordre, on ne peut complètement ignorer ce processus bien que les études cinétiques n'aient rapporté à ce jour qu'une cinétique monocompartimentaire. Pourtant, d'après les travaux de Martin (1995), cette liaison serait non spécifique (pour certains composés en tout cas) et modifierait la conformation tridimensionnelle de la SHBG et son Kd pour la testostérone. La conséquence de la liaison des isoflavones à la SHBG est donc difficile à prévoir sur le plan physiologique? Va-t-elle influencer les concentrations circulantes de stéroïdes ? Des données plus précises sur ces points seront données dans le chapitre « Effets hormonaux ».

### **II-3 Les études de pharmacocinétique**

Classiquement les études pharmacocinétiques sont réalisées en deux temps. On procède d'abord à des ingestions isolées (dites « en prise unique »), puis à des ingestions répétées. On ne dispose pas aujourd'hui de cinétique complète comportant les deux approches dans une étude unique et donc conçue idéalement pour réaliser une courbe pharmacocinétique. Toutefois, à partir des différentes données publiées, un « puzzle » peut être élaboré pour se faire une idée de cette cinétique. Les données pharmacocinétiques disponibles chez l'Homme sont récentes, car les techniques d'analyse performantes

permettant de détecter les concentrations circulantes des isoflavones dans le sang existent depuis moins de 10 ans (voir le chapitre « Techniques d'analyse »). Aujourd'hui des données existent sur les isoflavones administrées en prise unique (Shelnutt 2002 , Setchell 2001, Watanabe 1998) mais aucun travail de suivi cinétique en doses répétées n'a été fait à ce jour. On dispose de certaines études qui rendent compte des taux circulants chez l'Homme (données ponctuelles) après plusieurs jours ou semaines d'ingestion d'isoflavones, mais pas de cinétique plasmatique en doses répétées à proprement parler. Les données sont très fragmentaires pour les autres phyto-estrogènes. Enfin, les données sur les taux de résorption concernent le modèle de laboratoire (Niemeyer 2003), ce qui est loin d'être transposable à l'Homme. En conséquence, les paramètres pharmacocinétiques que nous possédons et notamment ceux concernant la distribution tissulaire ne sont pas fiables.

### **II-3-1 Paramètres pharmacocinétiques lors d'un apport en isoflavones ; doses plasmatiques et urinaires lors de prises uniques ou répétées**

#### **II-3-1-1 Méthodologie**

**Les paramètres disponibles lors de prises uniques, tels que C<sub>max</sub><sup>17</sup>, T<sub>max</sub>, AUC<sup>18</sup>, ½ vie<sup>19</sup>**, sont listés dans le tableau 2. Pour construire ce tableau, nous n'avons retenu que les études de pharmacocinétique classiques incluant des mesures des concentrations plasmatiques à différents temps après l'ingestion. Les études sont peu nombreuses, toujours réalisées sur un petit nombre de sujets (rarement plus de 10), et les techniques d'analyse mises en œuvre ne sont pas toujours identiques.

Par ailleurs, **une compilation des données plasmatiques mesurées chez l'Homme après l'administration de isoflavones en doses répétées** est donnée dans le tableau 3. Il s'agit de concentrations plasmatiques telles qu'elles ont été rapportées par différents auteurs chez différents types de sujets et après des expositions diverses. Les valeurs ont été mesurées de 8 à 12 heures après la dernière prise d'isoflavones. Les données fournies englobent l'ensemble des formes circulantes. Dans ces études, l'objectif était uniquement d'évaluer la disponibilité plasmatique. Il ne s'agit pas d'études cinétiques mais seulement de mesures ponctuelles lors d'administrations chroniques. Compte tenu des temps d'exposition, on peut toutefois considérer que les doses mesurées ne sont pas trop éloignées d'un « plateau pharmacocinétique », vraisemblablement fluctuant, car nous n'avons retenu que les études qui mentionnaient le temps séparant la dernière prise alimentaire d'isoflavones et la prise de sang. Il s'agit en général d'un intervalle de 12h, correspondant à une nuit de jeûne. La demi-vie étant courte (6 à 8h pour les phyto-estrogènes), les niveaux indétectables dans le plasma seront atteints 24 voire 36 heures après une ingestion unique, en fonction des doses ingérées (Watanabe 1998 , Setchell 2000). **Une administration répartie en 2 prises (matin et soir) est donc à même d'induire des taux circulants à T=12h supérieurs à ceux qu'entraîneraient une prise unique, même si la dose ingérée est comparable.** En outre, des moyennes ont parfois été recalculées à partir des données originelles.

Enfin, quelques données collectées sur la **relation quantité d'isoflavones ingérées – quantité d'isoflavones excrétées chez l'Homme** sont données dans le tableau 4. Pour construire ce tableau, nous n'avons considéré que les prises répétées de façon à nous placer dans les conditions qui seraient celles d'une consommation de compléments alimentaires à base d'extraits de soja. C'est en effet le type de prise qui sera pratiqué. Les études mentionnées dans ce tableau correspondent à des prises chroniques sur plus de 4 jours, et les informations sur la prise de composés pouvaient être considérées fiables. Quand il est simplement mentionné une prise de soja ou un plat ou 3 plats de soja sans précision, les études n'ont pas été retenues. Enfin nous n'avons retenu que les études présentant des valeurs d'excrétion en µM ou en mg par 24 heures,

<sup>17</sup> C<sub>max</sub> : Concentration maximale de phyto-estrogènes atteinte dans le plasma après une ingestion.

<sup>18</sup> AUC : Aire sous la courbe. Critère pharmacocinétique permettant par intégration de connaître la quantité de composés passée dans le compartiment sanguin. Elle permet notamment de donner des pourcentages de résorption pour les composés considérés.

<sup>19</sup> ½ vie : Elle caractérise les phases de résorption et d'élimination. C'est le temps nécessaire pour diminuer de moitié la concentration plasmatique.

elles-même corrigées soit par la créatinine soit par le PABA (*p*-aminobenzoic acid). Dans ces tableaux figurent des moyennes qui ont parfois été recalculées à partir des données originelles. Les valeurs urinaires mentionnées dans le tableau 5 sont toujours extrêmement variables et il est vivement conseillé de se reporter aux articles originaux pour mesurer l'ampleur du phénomène et notamment à celui de Cassidy (1994).

### **II-3-1-2 Paramètres pharmacocinétiques**

Les valeurs des paramètres pharmacocinétiques pour chacun des produits considérés varient parfois d'une étude à l'autre. Ceci peut être dû à des différences dans les techniques ou la fréquence des mesures, cela peut également provenir de variations inter-individuelles. Ainsi le  $T_{max}$  varie suivant les composés et les études de 4,5 heures à 9 heures. Pour un même composé comme la génistéine par exemple, les variations ne sont pourtant pas très importantes d'une étude à l'autre ( $T_{max}$  varie entre 4,4 et 6 heures). On peut toutefois conclure que la cinétique de résorption intestinale, d'élimination rénale, et d'élimination biliaire, est relativement courte. En conséquence, ces composés ne sont pas susceptibles de s'accumuler de façon considérable dans les organismes. Selon les doses ingérées, les concentrations plasmatiques peuvent rester significatives et mesurables dans les 24 à 36 heures qui suivent la prise. Dans le cas de prises répétées avec un intervalle de 12 heures entre les prises (matin et soir), il serait donc possible de maintenir en prise chronique une fluctuation plasmatique autour d'une valeur moyenne appelée « plateau pharmacocinétique ». La valeur de ce plateau varierait forcément en fonction de la quantité de composé ingérée mais pour une consommation de 100 mg d'isoflavones en deux prises de 50 mg d'isoflavones matin et soir, on obtiendrait des concentrations plasmatiques de l'ordre de 4  $\mu\text{M}$ .

### **II-3-1-3 Différences de concentrations plasmatiques entre les Occidentaux et les Asiatiques**

Chez l'Homme, d'après les études disponibles (tableau 3 et figure 3), les concentrations plasmatiques moyennes mesurées après une exposition chronique sont supérieures chez les Occidentaux à celles mesurées chez les Asiatiques pour une prise alimentaire comparable. Ainsi, rares sont les études rapportant chez les Asiatiques des concentrations plasmatiques d'isoflavones supérieures à 1  $\mu\text{M}$  alors que de nombreux travaux estiment que les concentrations plasmatiques des Occidentaux consommant du soja oscillent de 0,3 à 3,5  $\mu\text{M}$ . Ceci n'est pas retrouvé pour des ingestions uniques après une longue période de « wash-out » (Setchell 2001, Watanabe 1998), conditions conduisant alors à des paramètres pharmacocinétiques tout à fait comparables. Si l'on admet que dans tous les cas les prélèvements plasmatiques sont réalisés au plus 12 heures après la dernière prise d'isoflavones, cela suggère une adaptation métabolique des Asiatiques. Il pourrait donc être fait l'hypothèse, que chez les Asiatiques après une exposition chronique, des mécanismes se mettent en place, soit pour réduire l'absorption soit pour accélérer l'élimination. A ce titre Zheng (2003) a pour sa part montré une différence entre Asiatiques et Occidentaux dans l'activité bactérienne intestinale métabolisant la daïdzéine. En substance, il pourrait être supposé qu'une proportion significative de sujets asiatiques possède une flore intestinale capable de cataboliser rapidement la daïdzéine. Ce mécanisme serait-il responsable des différences notées sur les taux plasmatiques ? Ceci mérite d'être étudié étant donné la méthodologie *ex vivo* utilisée dans cette étude. Dans tous les cas, les mesures ont été faites chez des personnes consommant régulièrement du soja ou des extraits d'isoflavones sans jeûne prolongé avant la mesure. Les concentrations circulantes sont en général obtenues après une nuit de jeûne et correspondent donc à des valeurs plutôt basses. Toutefois, quand on raisonne sur des études différentes il est également possible que des effets liés aux méthodes de dosage soient à l'origine des différences de concentrations plasmatiques que l'on mesure entre Asiatiques et Occidentaux. Notons tout de même que plusieurs résultats ont été obtenus dans les deux populations avec la même méthode (celle l'Adlercreutz) (Adlercreutz 1993, Adlercreutz 1999, Gooderham 1996) et qu'ils confirmeraient cette différence. En revanche, les résultats n'ont pas été obtenus avec la même chronologie de prélèvements ni dans le même contexte et ne sont donc pas strictement comparables.

## **II-3-2 Données pharmacocinétiques obtenues chez l'animal (isoflavones et entérolactone)**

### **II-3-2-1 Méthodologie**

Le tableau 5 donne la **relation quantité d'isoflavones ingérée – quantité d'isoflavones circulante** chez des animaux de laboratoire. La forme sous laquelle les isoflavones sont administrées (glycosides, aglycones, équivalent aglycone) est rarement précisée : seules 2 d'études donnent ces précisions clairement. Nous sommes donc partis du principe que sous le vocable génistéine et le vocable daïdzéine, les auteurs désignaient bien les composés aglycones. Ceci reste toutefois sujet à caution : il est possible que des erreurs subsistent si dans les études citées ici les complémentations ont été préparées à partir d'extraits non clairement identifiés.

Pour les composés autres que les isoflavones, peu de données sont encore disponibles chez l'Homme. Nous proposons dans le tableau 6 la **relation ingéré – circulant obtenue chez l'animal pour certains phyto-estrogènes de la famille des lignanes et des entérolactones**. Ces données sont présentées avec toute la variabilité due aux individus à laquelle s'ajoute celles inhérentes aux conditions de dosage.

### **II-3-2-2 Comparaison animal/humain**

Les taux circulants de l'ordre du  $\mu\text{M}$  ne sont pas atteints avec les mêmes quantités ingérées rapportées au poids corporel chez l'Homme et chez l'animal de laboratoire. En règle générale, les quantités ingérées doivent être 10 fois supérieures au moins chez les rongeurs, par rapport à celles qui sont nécessaires chez l'Homme. Ainsi, des concentrations plasmatiques de 0,2 à 5  $\mu\text{M}$  sont observées chez l'Homme qui consomme des aliments à base de soja, pour des quantités ingérées d'isoflavones de 5 à 150 mg/j (soit 0,1 à 3 mg/kg pc/j). Pour atteindre des concentrations similaires chez le rat, il faut des expositions de 10 à 20 mg/kg pc/j. La transformation de la daïdzéine en équol chez les animaux de laboratoire n'explique pas à elle seule la différence entre l'Homme et l'animal. En effet, si l'on tient compte des isoflavones et de l'équol, la somme des concentrations chez l'animal soumis à 0,1 à 3 mg/kg pc/j reste toujours inférieure à celle mesurée chez l'Homme pour la même prise. Pour finir, il est important de rappeler qu'il faut tenir compte de ces concentrations plasmatiques dans l'interprétation des données obtenues *in vitro*. En effet, ces tests peuvent permettre la mise en œuvre de concentrations de phyto-estrogènes allant du picomolaire au millimolaire. Toutefois, les concentrations supérieures à 10  $\mu\text{M}$  sont extra-physiologiques si l'on raisonne sur une prise d'isoflavones alimentaires, et ne peuvent en aucun cas être utilisées pour étudier les effets possibles d'une exposition de l'Homme par voie alimentaire. Par ailleurs, à partir de la concentration du millimolaire, la faible solubilité des polyphénols devient rédhibitoire et on observe souvent à ces concentrations des phénomènes aspécifiques liés à la précipitation des composés dans le milieu de culture.

### **II-3-2-3 Variabilité des taux circulants d'isoflavones chez l'animal**

Concernant les isoflavones, molécules pour lesquelles on dispose du plus de données à ce jour, on observe qu'il existe des différences de taux circulants chez l'animal en fonction de l'âge, du stade physiologique et du sexe. Ceci ne semble pas être le cas chez l'Homme (voir tableau 3). Si aucune explication claire n'est avancée à ce jour pour expliquer cet état de fait, on a vu précédemment que les phyto-estrogènes pouvaient interagir avec des enzymes ou les SHBG, et l'on peut donc dans certains cas imaginer des phénomènes de synergie ou de compétition avec les stéroïdes sexuels endogènes pour expliquer une influence du sexe et des stades physiologiques sur les concentrations plasmatiques de phyto-estrogènes.

## **III- Taux urinaires et plasmatiques en tant que bio-marqueurs d'exposition**

Plusieurs auteurs considèrent que les taux circulants ou urinaires présentent une corrélation positive avec l'exposition alimentaire aux phyto-estrogènes (Lampe, 2003, Ritchie 2004a, Ritchie 2004b). De même, certains travaux réalisés avec des prises d'isoflavones faibles (< 28 mg/j) montrent une corrélation significative entre concentrations plasmatiques et concentrations urinaires (Grace 2004, Ritchie 2004a, Ritchie 2004b). Ceci n'est pas prouvé pour les doses alimentaires élevées.

L'analyse des données révèle que les taux urinaires reflètent globalement la quantité ingérée puisqu'on ne retrouve que peu ou pas d'isoflavones chez les non-consommateurs de soja (Axelson 1982a, 1982b, 1984) et qu'une consommation de lin aboutit invariablement à une augmentation des taux de lignanes urinaires et plasmatiques (Axelson 1982b). Toutefois compte tenu de la grande variabilité des phénomènes impliqués dans la biodisponibilité et notamment avec les doses ingérées fortes il semble difficile d'utiliser les concentrations urinaires comme un reflet objectif des doses ingérées d'isoflavones. En tout état de cause, les concentrations urinaires seront plus représentatives d'un phénomène d'élimination sur la durée. On collecte donc généralement les urines de 24 heures et on cherche également à normaliser cette excrétion en la ramenant soit à la concentration de créatinine soit à celle du PABA. Certains auteurs montrent l'intérêt de ce type de collecte et/ou de normalisation dans le cas d'ingestion de faibles quantités d'isoflavones (Grace 2004, Ritchie 2004a, 2004b).

A l'opposé, les variabilités interindividuelles décrites précédemment tant au niveau de la résorption intestinale que de l'activité métabolique hépatique et rénale indiquent que pour une même dose ingérée, les taux urinaires excrétés peuvent être très variables allant de 1 à 2,5 pour Xu (1994) et de 1 à 16 pour Cassidy (1994). En outre, des prélèvements urinaires isolés, réalisés à des temps variables par rapport à la dernière prise alimentaire, ont peu de sens si l'on n'a pas pris la peine de les ramener à un taux d'excrétion urinaire de référence. Il faut en tenir compte dans l'interprétation d'études épidémiologiques portant sur la relation éventuelle entre un phénomène pathologique et des concentrations urinaires de phyto-estrogènes.

Pour interpréter ces valeurs il faut revenir à l'étude individuelle des quantités de composés ingérées, absorbées, résorbées, métabolisées au niveau hépatique ou encore éliminées au niveau urinaire et fécal. Ce qui n'est pas excrété par voie urinaire est-il excrété par voie fécale sous forme native ou métabolisée, ou au contraire maintenu dans le sang un peu plus longtemps ? Sur des prises chroniques, les connaissances établies sur des xénobiotiques de type médicaments montrent que le fait d'allonger la demi-vie conduit à augmenter le niveau du « plateau pharmacocinétique ».

Les taux urinaires en eux-mêmes n'indiquent qu'une seule chose, c'est à dire les quantités d'un produit éliminé par cette voie en un temps ou à un temps donné, et vouloir déduire des mesures urinaires isolées un ingesta précis ou une concentration sérique précise, est souvent aléatoire. En l'attente de données précises et fiables sur la pharmacocinétique de ces produits, il faut considérer l'utilisation de ces mesures comme marqueur d'exposition avec beaucoup de circonspection.

Dans ce contexte, on voit tout l'intérêt des mesures plasmatiques. En effet, pour peu que l'on respecte des temps post-prandiaux identiques elles sont relativement stables dans le cas d'ingestions chroniques et notamment celles qui correspondent à la consommation de compléments alimentaires (plateau pharmacocinétique). D'autres part, elles reflètent mieux que les taux urinaires ce qui atteint potentiellement la cellule. Ainsi, si l'ingesta contient plus de daïdzéine que de génistéine, on trouvera ce même rapport dans le plasma alors que dans l'urine le rapport pourra être inversé. La connaissance de la cinétique des composés permet ensuite de modéliser les taux circulants au cours du temps.

## **Conclusion**

En l'état actuel des données, chez l'Homme, nous ne disposons que de quelques résultats concernant la biodisponibilité des isoflavones de soja. Pour les autres composés il existe des données chez l'animal et notamment le rat ( $T_{1/2}$ ,  $C_{max}$ ,  $T_{max}$ , AUC...) mais compte tenu des particularités propres à chaque espèce, elles présentent des limites pour une transposition chez l'Homme. Ainsi, il faut prévoir une ingestion de 10 mg/kg poids corporel /j d'isoflavones aglycones chez un rat pour observer des concentrations plasmatiques de l'ordre de 1  $\mu$ M (équol exclu). Chez l'Homme cette même concentration est atteinte avec environ 1 mg/kg pc/j. Dans la mesure où cette transposition peut être différente en fonction des modèles animaux étudiés, on se fiera plutôt aux concentrations plasmatiques obtenues après une ingestion de soja ou de phyto-estrogènes chez l'animal pour une éventuelle transposition des effets à l'Homme puisque c'est cette concentration qui sera effectivement susceptible d'atteindre les cellules.

Le rôle joué par les biotransformations dans la biodisponibilité des composés est majeure, or ces activités enzymatiques résultent d'un polymorphisme génétique propre à chaque individu et peuvent aussi évoluer au cours de longues périodes d'exposition suivant les règles qui régissent généralement les processus d'adaptation. Ainsi, dans la mesure où les principales sources d'isoflavones (génistéine et daïdzéine) sont le soja et le kudzu (plantes asiatiques à l'origine), les teneurs auxquelles sont traditionnellement confrontés les Asiatiques sont très différentes de celles auxquelles peuvent être exposés les Occidentaux. Dans ce contexte, il peut être fait l'hypothèse d'une adaptation métabolique des Asiatiques.

Les phyto-estrogènes existent dans le corps humain sous différentes formes, glucuronidée, sulfatée et non conjuguée pour l'essentiel. Dans le sang, ils circulent essentiellement sous forme glucuronidée ou sulfatée, ce qui assure une meilleure solubilité de ces composés. En revanche, ce sont les phyto-estrogènes aglycones qui sont les meilleurs ligands des récepteurs aux estrogènes. Cette variété des formes circulantes pose le problème de la validité des tests *in vitro*, qui dans leur immense majorité sont réalisés à partir de composés aglycones. Nous n'avons que peu de données sur l'activité des glucuronides ou des sulfates (Kinjo 2004, Zhang 1999), mais ils paraissent moins actifs que les aglycones. Ceci pose donc de nouvelles questions. Si seules les formes aglycones sont actives, elles le seraient plus qu'on ne le croit habituellement sur la base des tests *in vitro*. En effet, si seuls les composés aglycones du plasma sont actifs, dans la mesure où ils ne représentent que 10 à 40% au maximum de ce qui est couramment mesuré dans le plasma, les concentrations efficaces *in vivo* seraient de l'ordre de 50 à 200µM. Si ce n'est pas le cas, cela pourrait indiquer que les formes conjuguées classiquement considérées comme inactives seraient dotées d'activité, au moins localement, si l'on envisage une déglucuronidation ou une désulfatation tissulaire. Ce processus existe chez le rat au niveau du foie, et dans cette espèce, il a été montré la présence de composés exclusivement aglycones dans le cerveau, le foie, le tissu mammaire, l'ovaire, la prostate, le testicule, la thyroïde et l'utérus (Chang 2000). Ce processus est peut être aussi valable chez l'Homme et pourrait participer à la spécificité tissulaire des molécules. Les phyto-estrogènes étant, par définition, d'origine végétale ils sont étrangers à l'organisme et peuvent être considérés comme des xénobiotiques. Ils se comportent également comme certains composés de synthèse du type de ceux qui sont utilisés en pharmacologie. A ce titre, les études de pharmacocinétique devraient constituer un préalable indispensable à leur utilisation en santé humaine.



## Points clés et Recommandations

### Points clés

- ❖ L'étude de la biodisponibilité des phyto-estrogènes en est encore à ses balbutiements. Pour les isoflavones, les techniques de quantification que nous possédons aujourd'hui, et qu'il faudrait standardiser (voir chapitre « méthodes analytiques »), ont permis de définir certains des paramètres pharmacocinétiques. Pour les autres molécules, les données chez l'Homme manquent encore.
- ❖ Il existe une grande variabilité interindividuelle dans la biodisponibilité des phyto-estrogènes et ce, même au cours d'une même étude.
- ❖ Certains sujets sont équol-producteurs, d'autres non.
- ❖ Les isoflavones circulent essentiellement sous forme de glucuro- ou de sulfo-conjugués. Cette réalité n'est pas prise en compte dans l'immense majorité des études *in vitro*.
- ❖ La biodisponibilité est différente entre animaux et humains, et doit être prise en compte dans les études *in vitro* ou chez l'animal. Il faut prévoir une ingestion de 10 mg/kg poids corporel d'isoflavones aglycones chez un rat pour observer des concentrations plasmatiques de 1  $\mu\text{M}$  toutes formes confondues (glucuronides, sulfates, aglycones).
- ❖ Les concentrations urinaires peuvent être utilisées en tant que reflet des ingesta, sauf dans le cas des apports élevés.
- ❖ Sur le fondement des données actuelles, chez l'Homme, l'apport de 1 mg/kg poids corporel/j d'isoflavones aglycones conduit à une concentration plasmatique d'isoflavones aglycones d'environ 1 $\mu\text{M}$ . La concentration plasmatique maximale en isoflavones aglycones est obtenue 4 à 6 heures après ingestion.
- ❖ La majorité des modèles de laboratoire : rat, souris, porc, singe, hamster sont des producteurs d'équol. L'équol étant un composé actif, il faut en tenir compte dans les essais de transposition à l'Homme qui lui n'est pas systématiquement un producteur d'équol.
- ❖ Les données disponibles à ce jour semblent indiquer une différence de concentrations plasmatiques entre Asiatiques et Occidentaux pour des ingestions identiques réitérées de manière chronique.

### Recommandations

#### 1 - Recommandations à visée de connaissance et de recherche

- ❖ Mettre au point et standardiser des techniques d'analyses sensibles et fiables pour tous les phyto-estrogènes. Le choix de ces techniques immunologiques ou physico-chimiques doit dépendre des objectifs que l'on cherche à atteindre ;
- ❖ Vérifier la qualité des composés présents dans le compartiment sanguin et lymphatique (glucuronides, sulfates, méthyl ...)
- ❖ Tester les formes circulantes (glucuronides, sulfates, méthyl ...) *in vitro* et travailler en mélanges physiologiques ;
- ❖ Analyser de manière comparable la biodisponibilité des phyto-estrogènes chez les consommateurs asiatiques et occidentaux si l'on veut extrapoler les données obtenues en Asie aux pays européens.

#### 2 - Recommandations de santé publique

- ❖ Reconnaître la difficulté de prédire l'efficacité d'un apport alimentaire par les phyto-estrogènes, étant donné la variabilité des facteurs de biodisponibilité ;
- ❖ Si la prise d'isoflavones sous forme aglycones diminue les facteurs de variabilité, elle impose des précautions d'emploi (voir le chapitre sécurité) ;

- ❖ Il n'est pas possible de conseiller une prise régulière de phyto-estrogènes sans prendre en compte la variabilité inter-individuelle qui existe chez les sujets humains (production d'équol entre autre). On doit donc encourager des recherches sur les facteurs de variabilité interindividuelle dans les populations occidentales. En tout état de cause, l'utilisation plus large de ces composés ne peut s'envisager que lorsque l'on aura des données précises sur ces facteurs de variabilité ;
- ❖ Dans le cas d'interactions avec certaines pathologies, ces dosages plasmatiques pourraient permettre d'identifier les patients prenant des phyto-estrogènes en connaissance de cause ou à leur insu ;
- ❖ D'éventuels essais thérapeutiques avec des phyto-estrogènes devront prendre en compte la variabilité métabolique des patients (et par exemple le fait qu'ils soient équol-producteurs ou non).

### **3 - Recommandations à visée d'information du consommateur**

- ❖ L'étiquetage doit préciser la teneur en phyto-estrogènes, exprimée en équivalents aglycones, notamment sur les aliments à base de soja et les compléments alimentaires. Ceci signifie un contrôle des doses par les industriels à chaque fabrication avec un nouveau lot de soja.
- ❖ Imposer une mention claire en équivalents aglycones (fraction active des phyto-estrogènes) sur les compléments alimentaires.

**Tableau 1. Proportion des différentes formes circulantes d'isoflavone. Etudes humaines**

	Génistéine non conjuguée	Daïdzéine non conjuguée	Génistéine glucuronidée	Daïdzéine glucuronidée	Génistéine sulfatée	Daïdzéine sulfatée
<b>Plasma</b>	15 – 40%	10 – 40%	48%	30%	10%	27%
<b>Urine</b>	5 – 12%	3 – 10%	85%	85%	5%	7%

*D'après Shelnutt (2002)*

**Tableau 2. Paramètres pharmacocinétiques des isoflavones aglycones et glycosylées lors d'une prise unique**

Etudes	Composés	Tmax (h)	AUC (µg/(mL*h))	Volume de distribution (L)	½ vie (h)
Setchell 2001	Genistéine	5,2	4,54 ± 1,41	161,1 ± 44,1	6,78 ± 0,84
	Daïdzéine	6,6	2,94 ± 0,22	236,4 ± 35,9	9,34 ± 1,3
	Génistine	9,3	4,95 ± 1,03	112,3 ± 34,5	7,0 ± 0,76
	Daidzine	9	4,52 ± 0,49	77 ± 14	4,59 ± 0,5
Watanabe 1998	Génistéine	? 6			8,36
	Daïdzéine	? 6			5,79
Shelnutt 2002	Genistéine	4,4	2,34		7,9
	Daïdzéine	5,5	0,58		3,4
	Génistéine gluc	6,0	3,70		8,4
	Daïdzéine gluc	4,5	1,16		3,2
	Génistéine sulf	4,5	0,57		5,7
	Daïdzéine sulf	4,5	0,59		3,1
Shelnutt 2003	Genistéine	5,5 ± 2,7	6,01 ± 0,63	258,76 ± 40,47	7,8 ± 0,25
	Daïdzéine	7,4 ± 2,1	5,02 ± 0,67	336,25 ± 48,63	7,75 ± 0,4

**Tableau 3. Concentrations plasmatiques d'isoflavones de soja en fonction de quantités ingérées de façon chronique. Etudes chez l'Homme**

Sujet	Prise d'isoflavones	Composition [génistéine - daïdzéine] mg	Fréquence	Concentration plasmatique (ng/mL) [génistéine - daïdzéine]	Concentration plasmatique (µM) [génistéine - daïdzéine]	Référence bibliographique
F Occ	126 mg/j ≈ 2 mg/kg/j	[55,7 – 70,7]	3 prises/1J	1149* [580 - 569]	4,4 [2,15 - 2,24]	Xu 1994
F Occ	82 mg/j ≈ 1,4 mg/kg/j	[36,2 – 45,9]	3 prises/1J	599 [289 - 310]	2,3 [1,07 - 1,22]	Xu 1994
F Occ	44 mg/j ≈ 0,75 mg/kg/j	[19,3 - 24,7]	3 prises/1J	400 [200 - 200]	1,5 [0,74 - 0,79]	Xu 1994
F Occ	9,8 mg/j ≈ 0,16 mg/kg/j	[5,7 - 4,1]	Chronique > 6 mois	177,2* [86,5 – 91,2]	0,71* [0,32 – 0,36]	Bennetau-Pelissero 2003
F Occ	4,9 mg/j ≈ 0,08 mg/kg/j	[2,9 - 2,0]	Chronique > 6 mois	146,3* [69,9 – 77,2]	0,49* [0,15 – 0,31]	Bennetau-Pelissero 2003
F Occ	45 mg ≈ 0,75 mg/kg/j	?	14 j	235,4* [135 – 76,2]	1,1* [0,5 – 0,3]	McMichael-Phillips 1998
F Occ	0,44 mg ≈ 0,0075 mg/kg/j	[0,24 – 0,19]	Chronique	6,1 [4,1 – 2,0]	0,048 [0,04 – 0,008]	Grace 2004
F & H Occ	56 mg ≈ 0,8 à 1 mg/kg/j	[34,8 – 21,2]	17 j	252,4* [152 – 76,2]	1,15* [0,75 – 0,3]	Sanders 2002
H Occ	70 mg/j ≈ 0,9 mg/kg/j	[48 - 22]	28 j	371 [246 - 125]	1,5 [0,91 - 0,49]	Gooderham 1996
H Asi	130 mg/j ≈ 2 mg/kg/j	[71 - 59]	4 sem	290 [189 - 101]	1,1 [0,70 – 0,40]	Izumi 2000
H Asi	60 g prot. de soja (env 45 mg/j)	?	Chronique	90 [73 - 17]	0,38 [0,27 – 0,11]	Adlercreutz 1993
H Asi	Alim. trad. Japonaise (env 45 mg/j)	?	Chronique	227* [132,3 - 71,12]	0,87* [0,49 – 0,28]	Morton 2002
F Asi	77 g prot. de soja (env 50 mg/j)	?	Chronique	60* [22,7 - 11,57]	0,23* [0,084 - 0,045]	Adlercreutz 1999
F Asi	46,5 mg ≈ 0,8mg/kg/j (soyfood)	[30,1 – 16,4]	Chronique	74,1 [55,6 – 18,5]	0,27 [0,2 – 0,07]	Arai 2000
F Asi	Alim. Trad. Japonaise (env 45 mg/j)	?	Chronique	213,52* [135 - 64]	0,80* [0,50 – 0,25]	Morton 2002
F Asi	Alim. trad. Asiatique 56,3 mg/j ≈ 0,9 mg/kg/j	[23,4 - 14,5]	Chronique	157,5 [127 – 30,5]	0,59 [0,47 - 0,12]	Yamamoto 2001

F : femme ; H : homme ; Occ : occidentale ; Asi : asiatique

\* le total tient compte de l'équol et/ou de la desmethylangolensine et n'est donc pas égal à daïdzéine + genistéine

Remarque : il s'agit de données ponctuelles recueillies après plusieurs jours ou semaines de traitement à moins de 12 heures postprandiales

**Tableau 4. Relation phyto-estrogènes ingérés / phyto-estrogènes urinaires . Etudes humaines**

Sujet	Prise d'isoflavones	Composition [génistéine - daïdzéine] mg	Durée d'administration	Concentration urinaire	Concentration urinaire	Références bibliographiques
				(µg/24h) [génistéine - daïdzéine]	(µM/24h) [génistéine - daïdzéine]	
F Occ	45 mg/j ≈ 0,75 mg/kg/j (60g soja)	[20 – 25]	1 mois	3461,7* [626,4 – 1833,9]]	12,80* [2,32 - 7,22]	Cassidy 1994
F Occ	158 mg/j ≈ 3 mg/kg/j	[84,9 - 73,2]	28 j	33 800 [9200 - 24 600]	136,5 [34,1 - 102,4]	Lu 2000
F & H Occ	9 mg/j ≈ 0,15 mg/kg/j (5 g soja)	?	9 j	1559,5 [513 - 1046,5]	6,02 [1,9 – 4,12]	Karr 1997
F & H Occ	18 mg/j ≈ 0,30 mg/kg/j (10g soja)	?	9 j	2510,9 [837 - 1673,9]	9,69 [3,1 – 6,59]	Karr1997
F & H Occ	36 mg/j ≈ 0,60 mg/kg/j (20g soja)	?	9 j	4609,3 [1701 - 2908,3]	17,75 [6,3 – 11,45]	Karr 1997
F Asi	38 mg/j ≈ 0,60 mg/kg/j	[23,4 - 14,5]	12 mois	8152 [3834 - 4318]	31,2 [14,2 - 17,0]]	Yamamoto 2001

F : femme ; H : homme ; Occ : occidentale ; Asi : asiatique

\* le total tient compte de l'équol et/ou de la desmethylangolensine et n'est donc pas égal à daïdzéine + génistéine.

**Tableau 5. Relation concentrations ingérées – concentrations circulantes d'isoflavones chez l'animal**

Espèce	Sexe & +	Prise alimentaire d'isoflavone*	Durée l'administration	Concentrations circulantes plasmatiques		Références bibliographiques
				En ng/mL	en µM***	
Rat	F Ovx	Iso 20 mg/kg/j	84 jours	610	2,4	Picherit 2000
Rat	F Ovx	Iso 40 mg/kg/j	84 jours	1235	4,2	Picherit 2000
Rat	F Ovx	Iso 80 mg/kg/j	84 jours	1253	4,94	Picherit 2000
Rat	F Ovx	Gen 10mg/kg/j	12 sem	150	0,56	Picherit 2001
Rat	F Ovx	Daïd 10 mg/kg/j	12 sem	140	0,57	Picherit 2001
Rat		Gen 20 mg/kg/j	1 prise	2970 (t=2h)	t = 2h.)	King 1996
Rat		Genistine 28 mg/kg/j	1 prise	1323 (t=2h)	(t=2h)	King 1996
Rat SD	M	Gen 500 ppm ≈ 50 mg/kg/j	98 jours	1620	6	Slikker 2001
Rat SD	F	Gen 500 ppm ≈ 50 mg/kg/j	98 jours	2160	8	Slikker 2001
Rat	F gestante	Daïd 25 mg/kg/j	Gestation	Daïd : 76,2; Eq : 128,3	Daïd : 0,3; Eq : 0,53	Lamartiniere 2002
Rat	F Néonatale	Daïd 25 mg/kg/j	7 j	Daïd : 248,9; Eq : 38,7	Daïd : 0,98 ; Eq : 0,16	Lamartiniere 2002
Rat	F	Daïd 25 mg/kg/j	21j	Daïd : 345,4; Eq : 288	Daïd : 1,36; Eq : 1,19	Lamartiniere 2002
Rat	F	Daïd 25 mg/kg/j	50j	Daïd : 160; Eq : 927	Daïd : 0,63 ; Eq : 3,83	Lamartiniere 2002
Rat	F gestante	Daïd 100 mg/kg/j	Gestation	Daïd : 104 ; Eq : 1079	Daïd : 0,41 ; Eq : 4,46	Lamartiniere 2002
Rat	F néonatale	Daïd 100 mg/kg/j	7 j	Daïd : 975,4 ; Eq : 244	Daïd : 3,84 ; Eq : 1,01	Lamartiniere 2002
Rat	F gestante	Daïd 100 mg/kg/j	Gestation	Daïd : 104 ; Eq : 1079	Daïd : 0,41 ; Eq : 4,46	Lamartiniere 2002
Rat	F néonatale	Daïd 100 mg/kg/j	7 j	Daïd : 975,4 ; Eq : 244	Daïd : 3,84 ; Eq : 1,01	Lamartiniere 2002

**Tableau 5 (suite). Relation concentrations ingérées – concentrations circulantes d'isoflavones chez l'animal**

Espèce	Sexe & +	Prise alimentaire d'isoflavone*	Durée l'administration	Concentrations circulantes plasmatiques		Références bibliographiques
				En ng/mL	en µM***	
Rat	F	Daid 100 mg/kg/j	21j	Daid : 841 ; Eq : 1566	Daid : 3,31 ; Eq : 6,47	Lamartiniere 2002
Rat	F	Daid 100 mg/kg/j	50j	Daid : 363 ; Eq : 1750	Daid : 1,43 ; Eq : 7,23	Lamartiniere 2002
Rat	M	600 ppm ≈ 60 mg/kg/j	75 jours	Gen : 300 ; Daid : 300 Eq : 1050	Gen : 1,1 ; Daid : 1,18 Eq : 4,34	Lephart 2003
Rat	F	600 ppm ≈ 60 mg/kg/j	75 jours	Gen : 90 ; Daid : 100 Eq : 950	Gen : 0,3 ; Daid : 0,39 Eq : 3,9	Lephart 2003
Rat	M	600 ppm ≈ 60 mg/kg/j	Toute la vie	Gen : 410 ; Daid : 390 Eq : 1200	Gen : 1,5 ; Daid : 1,5 Eq : 4,96	Lephart 2003
Rat	F	600 ppm ≈ 60 mg/kg/j	Toute la vie	Gen : 100 ; Daid : 120 Eq : 980	Gen : 0,37 ; Daid : 1,47 ; Eq : 4,05	Lephart 2003
Souris	F nude	Gen 125 ppm ≈ 12,5 mg/kg/j	22 sem	105	0,39	Ju 2000
Souris	F nude	Gen 250 ppm ≈ 25 mg/kg/j	22 sem	324	1,2	Ju 2000
Souris	F nude	Gen 500 ppm ≈ 50 mg/kg/j	22 sem	729	2,7	Ju 2000
Souris	F nude	Gen 1000 ppm ≈ 100 mg/kg/j	22 sem	918	3,4	Ju 2000
Souris	M	Gen 1000 ppm ≈ 100 mg/kg/j	21 jours	261	0,97	Yellayi 2003
Souris	M	Gen 1500 ppm ≈ 150 mg/kg/j	21 jours	302	1,12	
Souris	C57B16	Gen 20 mg/kg/j en gavage	5 jours	2484 (t= 2h)	9,2 (t=2h)	Record 1995
Hamster	M	325 ppm ≈ 32,5 mg/kg/j	16 sem	Gen : 162 ; Daid : 102 ; Eq : 4114	Gen : 0,6 ; Daid : 0,4 Eq : 17	Blair 2002
Hamster	F	325 ppm ≈ 32,5 mg/kg/j	16 sem	Gen : 162 ; Daid : 145 ; Eq : 726	Gen : 0,6 ; Daid : 0,6 Eq : 3	Blair 2002

**Tableau 6. Concentrations plasmatiques de phyto-estrogènes non contenu dans le soja, chez l'animal**

Composés	Concentrations plasmatiques nM	Concentrations plasmatiques µg/mL	Références bibliographiques
Entérolactone	16,6	4,9	Vanharanta 2002
	[7,0 – 70,0]		
	6,5 – 15,6	1,9 – 4,6	Stattin 2002
	9 - 21	2,6 – 6,2	Hultén 2002

Figure 1 : Les étapes interférant avec la biodisponibilité

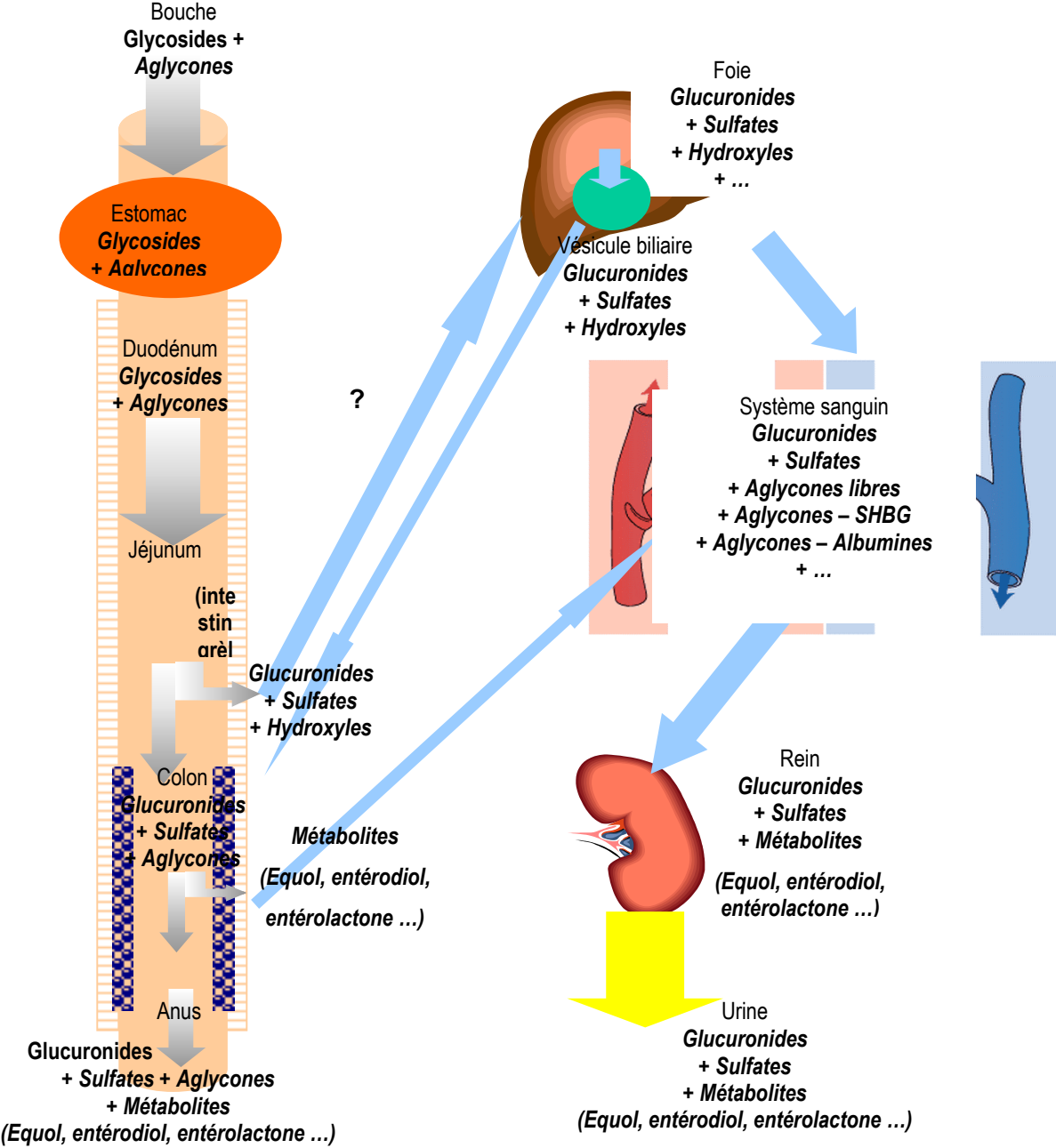
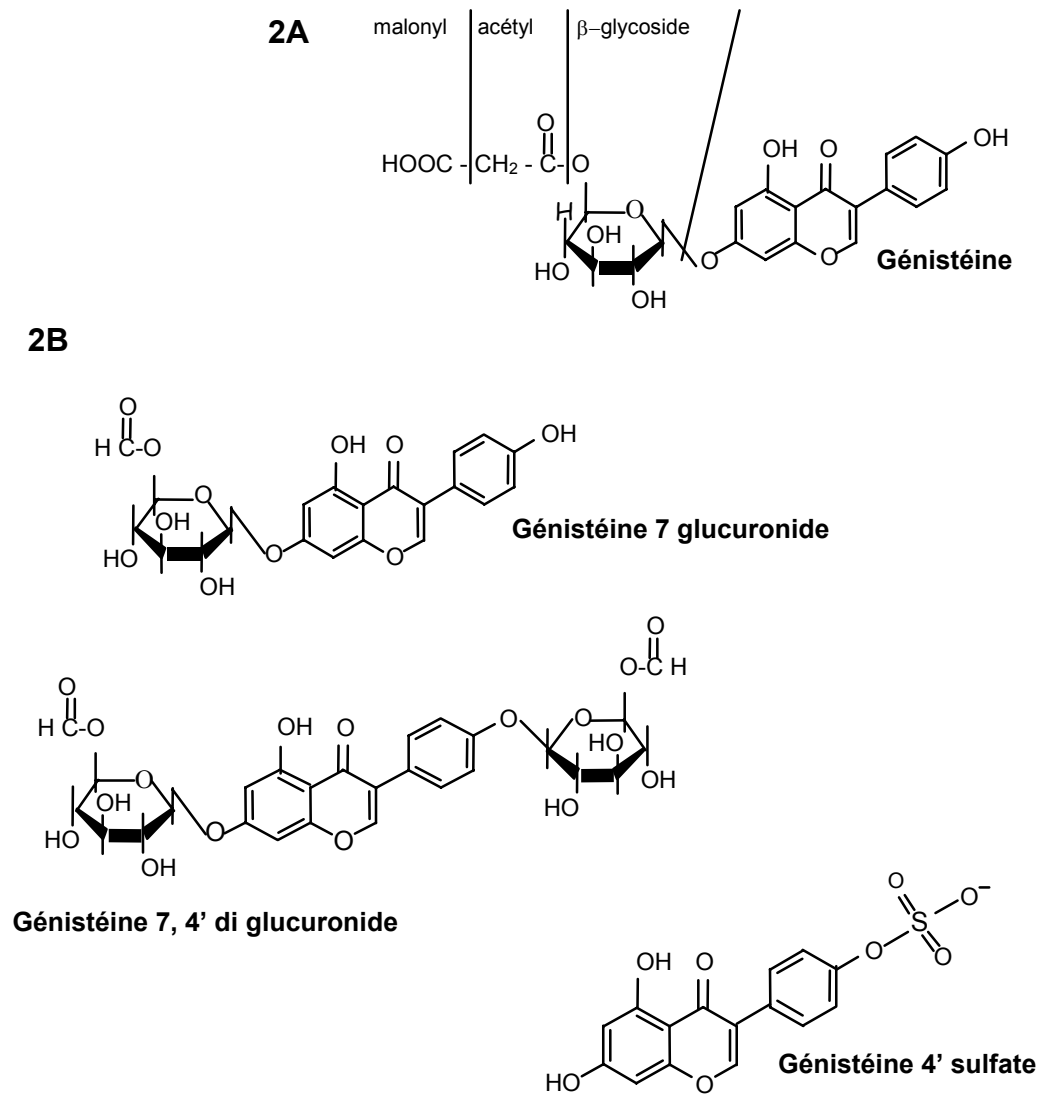
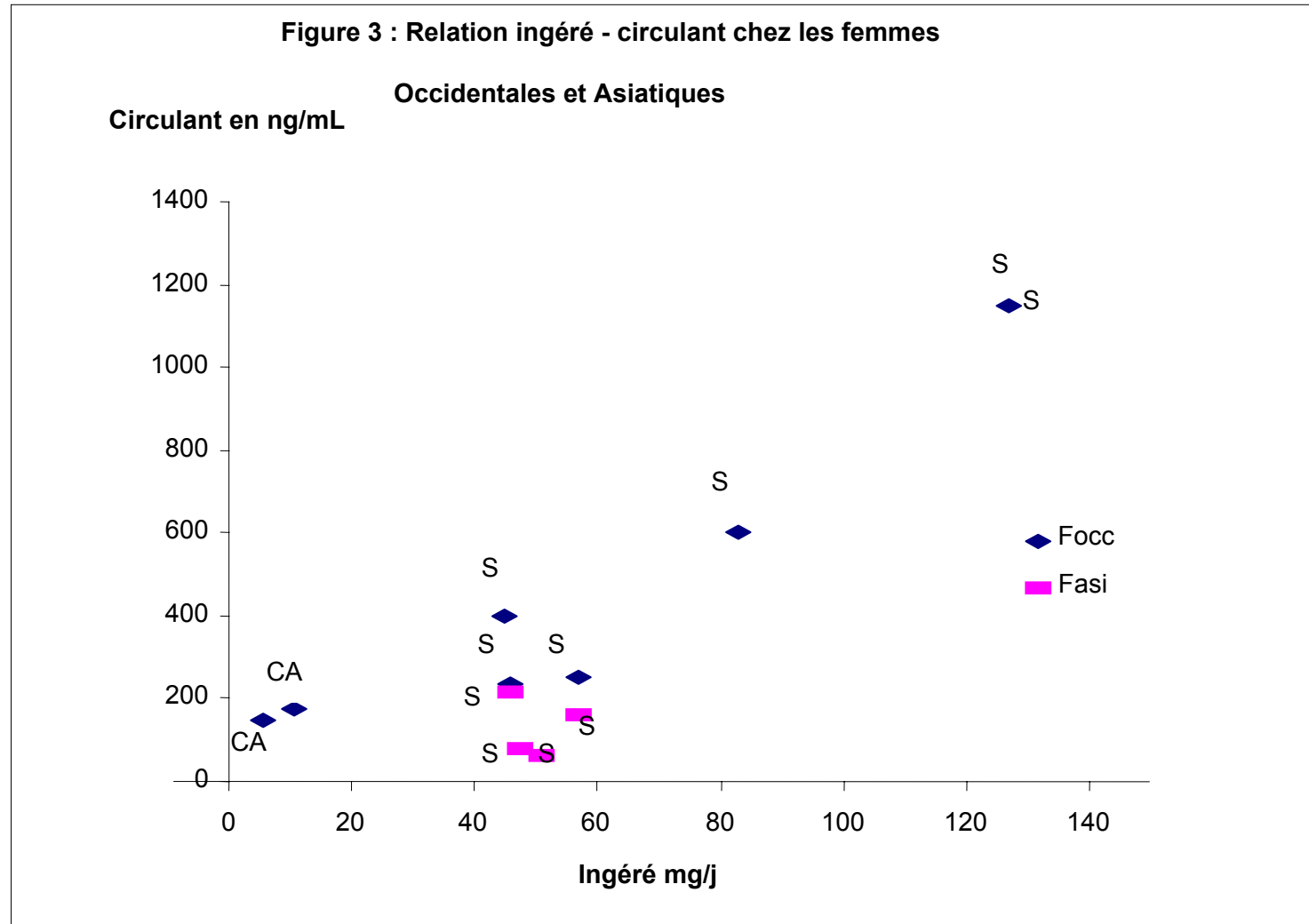


Figure 2. Les différentes formes des isoflavones : exemple de la génistéine







S = soyfood, CA = compléments alimentaires

- Adlercreutz, H., Fotsis, T., Bannwart, C., Hamalainen, E., et al. (1986a) Urinary estrogen profile determination in young Finnish vegetarian and omnivorous women. *J Steroid Biochem*, 24, 289-96.
- Adlercreutz, H., Fotsis, T., Bannwart, C., Wahala, K., et al. (1986b) Determination of urinary lignans and phytoestrogen metabolites, potential antiestrogens and anticarcinogens, in urine of women on various habitual diets. *J Steroid Biochem*, 25, 791-7.
- Adlercreutz, H., Fotsis, T., Heikkinen, R., Dwyer, J.T., et al. (1982) Excretion of the lignans enterolactone and enterodiol and of equol in omnivorous and vegetarian postmenopausal women and in women with breast cancer. *Lancet*, 2, 1295-9.
- Adlercreutz, H., Markkanen, H., Watanabe, S. (1993) Plasma concentrations of phyto-oestrogens in Japanese men. *Lancet*, 342, 1209-10.
- Adlercreutz, H., Yamada, T., Wahala, K., Watanabe, S. (1999) Maternal and neonatal phytoestrogens in Japanese women during birth. *Am J Obstet Gynecol*, 180, 737-43.
- Albertazzi, P., Pansini, F., Bonaccorsi, G., Zanotti, L., et al. (1998) The effect of dietary soy supplementation on hot flushes. *Obstet Gynecol*, 91, 6-11.
- Axelsson, M., Kirk, D.N., Farrant, R.D., Cooley, G., et al. (1982a) The identification of the weak oestrogen equol [7-hydroxy-3-(4'-hydroxyphenyl)chroman] in human urine. *Biochem J*, 201, 353-7.
- Axelsson, M., Sjoval, J., Gustafsson, B.E., Setchell, K.D. (1982b) Origin of lignans in mammals and identification of a precursor from plants. *Nature*, 298, 659-60.
- Axelsson, M., Sjoval, J., Gustafsson, B.E., Setchell, K.D. (1984) Soya—a dietary source of the non-steroidal oestrogen equol in man and animals. *J Endocrinol*, 102, 49-56.
- Begum, A.N., Nicolle, C., Mila, I., Lapierre, C., et al. (2004) Dietary lignins are precursors of mammalian lignans in rats. *J Nutr*, 134, 120-7.
- Bennetau-Pelissero, C., Arnal-Schnebelen, B., Lamothe, V., Sauvart, P. (2003) ELISA as a new method to measure genistein and daidzein in food and human fluids. *Food Chem Toxicol*, 41, 645-58.
- Bennetau-Pelissero, C., Latonnel, K.G., Lamothe, V., Shinkaruk-Poix, S., et al. (2004) Screening for oestrogenic activity of plant and food extracts using in vitro trout hepatocyte cultures. *Phytochem Anal*, 15, 40-5.
- Blair, R.M., Appt, S.E., Bennetau-Pelissero, C., Clarkson, T.B., et al. (2002) Dietary soy and soy isoflavones have gender-specific effects on plasma lipids and isoflavones in golden Syrian f(1)b hybrid hamsters. *J Nutr*, 132, 3585-91.
- Braden, A.W.H., Hart, N.K., Lambertson, J.A. (1967) The oestrogenic activity and metabolism of certain isoflavones in sheep. *Aust. J. Res.*, 18, 335-48.
- Cassidy, A., Bingham, S., Setchell, K.D. (1994) Biological effects of a diet of soy protein rich in isoflavones on the menstrual cycle of premenopausal women. *Am J Clin Nutr*, 60, 333-40.
- Chang, H.C., Churchwell, M.I., Delclos, K.B., Newbold, R.R., et al. (2000) Mass spectrometric determination of Genistein tissue distribution in diet-exposed Sprague-Dawley rats. *J Nutr*, 130, 1963-70.
- Chang, H.H., Robinson, A.R., Common, R.H. (1975) Excretion of radioactive diadzein and equol as monosulfates and disulfates in the urine of the laying hen. *Can J Biochem*, 53, 223-30.
- Court, M.H., Duan, S.X., Guillemette, C., Journault, K., et al. (2002) Stereoselective conjugation of oxazepam by human UDP-glucuronosyltransferases (UGTs): S-oxazepam is glucuronidated by UGT2B15, while R-oxazepam is glucuronidated by UGT2B7 and UGT1A9. *Drug Metab Dispos*, 30, 1257-65.
- Crespy, V., Morand, C., Besson, C., Manach, C., et al. (2001) Comparison of the intestinal absorption of quercetin, phloretin and their glucosides in rats. *J Nutr*, 131, 2109-14.
- Day, A.J., DuPont, M.S., Ridley, S., Rhodes, M., et al. (1998) Deglycosylation of flavonoid and isoflavonoid glycosides by human small intestine and liver beta-glucosidase activity. *FEBS Lett*, 436, 71-5.
- Erlund, I., Meririnne, E., Alfthan, G., Aro, A. (2001) Plasma kinetics and urinary excretion of the flavanones naringenin and hesperetin in humans after ingestion of orange juice and grapefruit juice. *J Nutr*, 131, 235-41.
- Faure, E.D., Chantre, P., Mares, P. (2002) Effects of a standardized soy extract on hot flushes: a multicenter, double-blind, randomized, placebo-controlled study. *Menopause*, 9, 329-34.
- Gooderham, M.H., Adlercreutz, H., Ojala, S.T., Wahala, K., et al. (1996) A soy protein isolate rich in genistein and daidzein and its effects on plasma isoflavone concentrations, platelet aggregation, blood lipids and fatty acid composition of plasma phospholipid in normal men. *J Nutr*, 126, 2000-6.
- Grace, P.B., Taylor, J.I., Low, Y.L., Luben, R.N., et al. (2004) Phytoestrogen concentrations in serum and spot urine as biomarkers for dietary phytoestrogen intake and their relation to breast cancer risk in European prospective investigation of cancer and nutrition-norfolk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 13, 698-708.
- Hargreaves, D.F., Potten, C.S., Harding, C., Shaw, L.E., et al. (1999) Two-week dietary soy supplementation has an estrogenic effect on normal premenopausal breast. *J Clin Endocrinol Metab*, 84, 4017-24.
- Hollman, P.C., de Vries, J.H., van Leeuwen, S.D., Mengelers, M.J., et al. (1995) Absorption of dietary quercetin glycosides and quercetin in healthy ileostomy volunteers. *Am J Clin Nutr*, 62, 1276-82.
- Hollman, P.C., Katan, M.B. (1997) Absorption, metabolism and health effects of dietary flavonoids in man. *Biomed Pharmacother*, 51, 305-10.
- Hulten, K., Winkvist, A., Lenner, P., Johansson, R., et al. (2002) An incident case-referent study on plasma enterolactone and breast cancer risk. *Eur J Nutr*, 41, 168-76.
- Izumi, T., Piskula, M.K., Osawa, S., Obata, A., et al. (2000) Soy isoflavone aglycones are absorbed faster and in higher amounts than their glucosides in humans. *J Nutr*, 130, 1695-9.

- Ju, Y.H., Carlson, K.E., Sun, J., Pathak, D., et al. (2000) Estrogenic effects of extracts from cabbage, fermented cabbage, and acidified brussels sprouts on growth and gene expression of estrogen-dependent human breast cancer (MCF-7) cells. *J Agric Food Chem*, 48, 4628-34.
- Karr, S.C., Lampe, J.W., Hutchins, A.M., Slavin, J.L. (1997) Urinary isoflavonoid excretion in humans is dose dependent at low to moderate levels of soy-protein consumption. *Am J Clin Nutr*, 66, 46-51.
- King, R.A., Broadbent, J.L., Head, R.J. (1996) Absorption and excretion of the soy isoflavone genistein in rats. *J Nutr*, 126, 176-82.
- Kinjo, J., Tsuchihashi, R., Morito, K., Hirose, T., et al. (2004) Interactions of phytoestrogens with estrogen receptors alpha and beta (III). Estrogenic activities of soy isoflavone aglycones and their metabolites isolated from human urine. *Biol Pharm Bull*, 27, 185-8.
- Kulling, S.E., Honig, D.M., Metzler, M. (2001) Oxidative metabolism of the soy isoflavones daidzein and genistein in humans in vitro and in vivo. *J Agric Food Chem* 49, 3024-33.
- Lamartiniere, C.A., Wang, J., Smith-Johnson, M., Eltoum, I.E. (2002) Daidzein: bioavailability, potential for reproductive toxicity, and breast cancer chemoprevention in female rats. *Toxicol Sci*, 65, 228-38.
- Lampe, J.W. (2003) Isoflavonoid and lignan phytoestrogens as dietary biomarkers. *J Nutr*, 133 Suppl 3, 956S-964S.
- Lephart, E.D., Rhee, R.W., Setchell, K.D., Bu, L.H., et al. (2003) Estrogens and phytoestrogens: brain plasticity of sexually dimorphic brain volumes. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 85, 299-309.
- Lu, L.J., Cree, M., Josyula, S., Nagamani, M., et al. (2000) Increased urinary excretion of 2-hydroxyestrone but not 16alpha-hydroxyestrone in premenopausal women during a soya diet containing isoflavones. *Cancer Res*, 60, 1299-305.
- Marrian G.F. and Haselwood G.A.D. (1932) Equol a new inactive phenol isolated from the ketohydroxy-oestrin fraction of mares' urine. *Biochem. J.*, 26, 1227-32.
- Martin, M.E., Vranckx, R., Benassayag, C., Nunez, E.A. (1986) Modifications of the properties of human sex steroid-binding protein by nonesterified fatty acids. *J Biol Chem*, 261, 2954-9.
- Martin, M.E., Haourigui, M., Pelissero, C., Bennassayag, G., Nunez, E. (1995) Interactions between phytoestrogens and human sex steroid binding protein. *Life Science* 58, 429-36.
- McMichael-Phillips, D.F., Harding, C., Morton, M., Roberts, S.A., et al. (1998) Effects of soy-protein supplementation on epithelial proliferation in the histologically normal human breast. *Am J Clin Nutr*, 68, 1431S-1435S.
- Morabito, N., Crisafulli, A., Vergara, C., Gaudio, A., et al. (2002) Effects of genistein and hormone-replacement therapy on bone loss in early postmenopausal women: a randomized double-blind placebo-controlled study. *J Bone Miner Res*, 17, 1904-12.
- Morton, M.S., Arisaka, O., Miyake, N., Morgan, L.D., et al. (2002) Phytoestrogen concentrations in serum from Japanese men and women over forty years of age. *J Nutr*, 132, 3168-71.
- Murkies, A.L., Lombard, C., Strauss, B.J., Wilcox, G., et al. (1995) Dietary flour supplementation decreases post-menopausal hot flushes: effect of soy and wheat. *Maturitas*, 21, 189-95.
- Nicolle, C., Manach, C., Morand, C., Mazur, W., et al. (2002) Mammalian lignan formation in rats fed a wheat bran diet. *J Agric Food Chem*, 50, 6222-6.
- Niemeyer, H.B., Honig, D.M., Kulling, S.E., Metzler, M. (2003) Studies on the metabolism of the plant lignans secoisolariciresinol and matairesinol. *J Agric Food Chem*, 51, 6317-25.
- Nikander, E., Kilkkinen, A., Metsa-Heikkila, M., Adlercreutz, H., et al. (2003) A randomized placebo-controlled crossover trial with phytoestrogens in treatment of menopause in breast cancer patients. *Obstet Gynecol*, 101, 1213-20.
- Peng, W.X., Wang, L.S., Li, H.D., El-Aty, A.M., et al. (2003) Evidence for the involvement of human liver microsomes CYP1A2 in the mono-hydroxylation of daidzein. *Clin Chim Acta*, 334, 77-85.
- Petrakis, N.L., Barnes, S., King, E.B., Lowenstein, J., et al. (1996) Stimulatory influence of soy protein isolate on breast secretion in pre- and postmenopausal women. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 5, 785-94.
- Picherit, C., Chanteranne, B., Bennetau-Pelissero, C., Davicco, M.J., et al. (2001) Dose-dependent bone-sparing effects of dietary isoflavones in the ovariectomized rat. *Br J Nutr*, 85, 307-16.
- Picherit, C., Coxam, V., Bennetau-Pelissero, C., Kati-Coulbaly, S., et al. (2000) Daidzein is more efficient than genistein in preventing ovariectomy-induced bone loss in rats. *J Nutr*, 130, 1675-81.
- Potter, S.M., Baum, J.A., Teng, H., Stillman, R.J., et al. (1998) Soy protein and isoflavones: their effects on blood lipids and bone density in postmenopausal women. *Am J Clin Nutr*, 68, 1375S-1379S.
- Record, I.R., Jannes, M., Dreosti, I.E., King, R.A. (1995) Induction of micronucleus formation in mouse splenocytes by the soy isoflavone genistein in vitro but not in vivo. *Food Chem Toxicol*, 33, 919-22.
- Ritchie, M.R., Morton, M.S., Deighton, N., Blake, A., et al. (2004a) Plasma and urinary phyto-oestrogens as biomarkers of intake: validation by duplicate diet analysis. *Br J Nutr*, 91, 447-57.
- Ritchie, M.R., Morton, M.S., Thompson, A.M., Deighton, N., et al. (2004b) Investigation of the reliability of 24 h urine excretion as a biomarker of isoflavone exposure over time and over a wide range of isoflavone intakes. *Eur J Clin Nutr*, 58, 1286-9.
- Rowland, I.R., Wiseman, H., Sanders, T.A., Adlercreutz, H., et al. (2000) Interindividual variation in metabolism of soy isoflavones and lignans: influence of habitual diet on equol production by the gut microflora. *Nutr Cancer*, 36, 27-32.
- Rowland I.R., Faughnan M., Hoey L., Wahala K., Williamson G., Cassidy A. (2003) Bioavailability of phyto-oestrogens. *Br J Nutr*. 89 Suppl 1, S45-58.
- Sanders, T.A., Dean, T.S., Grainger, D., Miller, G.J., et al. (2002) Moderate intakes of intact soy protein rich in isoflavones compared with ethanol-extracted soy protein increase HDL but do not influence transforming growth factor beta(1) concentrations and hemostatic risk factors for coronary heart disease in healthy subjects. *Am J Clin Nutr*, 76, 373-7.

- Setchell K.D. (1985) Naturally occurring non steroidal estrogens of dietary origin. In Estrogens in the environment II. McLachlan Ed. Elsevier Publ. Inc.69-85
- Setchell, K.D. (1998) Phytoestrogens: the biochemistry, physiology, and implications for human health of soy isoflavones. *Am J Clin Nutr*, 68, 1333S-1346S.
- Setchell, K.D. (2000) Absorption and metabolism of soy isoflavones-from food to dietary supplements and adults to infants. *J Nutr*, 130, 654S-655S.
- Setchell, K.D., Brown, N.M., Desai, P., Zimmer-Nechemias, L., et al. (2001) Bioavailability of pure isoflavones in healthy humans and analysis of commercial soy isoflavone supplements. *J Nutr*, 131, 1362S-1375S.
- Setchell, K.D., Brown, N.M., Lydeking-Olsen, E. (2002) The clinical importance of the metabolite equol-a clue to the effectiveness of soy and its isoflavones. *J Nutr*, 132, 3577-84.
- Setchell, K.D., Faughnan, M.S., Avades, T., Zimmer-Nechemias, L., et al. (2003) Comparing the pharmacokinetics of daidzein and genistein with the use of <sup>13</sup>C-labeled tracers in premenopausal women. *Am J Clin Nutr*, 77, 411-9.
- Setchell, K.D., Zimmer-Nechemias, L., Cai, J., Heubi, J.E. (1997) Exposure of infants to phyto-oestrogens from soy-based infant formula. *Lancet*, 350, 23-7.
- Stakianos, J., Coward, L., Kirk, M., Barnes, S. (1997) Intestinal uptake and biliary excretion of the isoflavone genistein in rats. *J Nutr*, 127, 1260-8.
- Shel Nutt, S.R., Cimino, C.O., Wiggins, P.A., Ronis, M.J., et al. (2002) Pharmacokinetics of the glucuronide and sulfate conjugates of genistein and daidzein in men and women after consumption of a soy beverage. *Am J Clin Nutr*, 76, 588-94.
- Slikker, W., Jr., Scallet, A.C., Doerge, D.R., Ferguson, S.A. (2001) Gender-based differences in rats after chronic dietary exposure to genistein. *Int J Toxicol*, 20, 175-9.
- Stattin, P., Adlercreutz, H., Tenkanen, L., Jellum, E., et al. (2002) Circulating enterolactone and prostate cancer risk: a Nordic nested case-control study. *Int J Cancer*, 99, 124-9.
- Uchiyama, S., Ueno, T. & Shirota, T. (2001) The relationship between soy isoflavones and the menopausal symptoms in Japanese perimenopausal women. *Ann. Nutr. Metab.* 45, 13 (Abstract).
- Uehar, M., Arai, Y., Watanabe, S., Adlercreutz, H. (2000) Comparison of plasma and urinary phytoestrogens in Japanese and Finnish women by time-resolved fluoroimmunoassay. *Biofactors*, 12, 217-25.
- Van Patten, C.L., Olivotto, I.A., Chambers, G.K., Gelmon, K.A., et al. (2002) Effect of soy phytoestrogens on hot flashes in postmenopausal women with breast cancer: a randomized, controlled clinical trial. *J Clin Oncol*, 20, 1449-55.
- Vanharanta, M., Voutilainen, S., Nurmi, T., Kaikkonen, J., et al. (2002) Association between low serum enterolactone and increased plasma F2-isoprostanes, a measure of lipid peroxidation. *Atherosclerosis*, 160, 465-9.
- Watanabe, S., Yamaguchi, M., Sobue, T., Takahashi, T., et al. (1998) Pharmacokinetics of soybean isoflavones in plasma, urine and feces of men after ingestion of 60 g baked soybean powder (kinako). *J Nutr*, 128, 1710-5.
- Xie, L.H., Akao, T., Hamasaki, K., Deyama, T., et al. (2003) Biotransformation of pinoresinol diglucoside to mammalian lignans by human intestinal microflora, and isolation of *Enterococcus faecalis* strain PDG-1 responsible for the transformation of (+)-pinoresinol to (+)-lariciresinol. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*, 51, 508-15.
- Xu, X., Harris, K.S., Wang, H.J., Murphy, P.A., et al. (1995) Bioavailability of soybean isoflavones depends upon gut microflora in women. *J Nutr*, 125, 2307-15.
- Xu, X., Wang, H.J., Murphy, P.A., Cook, L., et al. (1994) Daidzein is a more bioavailable soymilk isoflavone than is genistein in adult women. *J Nutr*, 124, 825-32.
- Yamamoto, S., Sobue, T., Sasaki, S., Kobayashi, M., et al. (2001) Validity and reproducibility of a self-administered food-frequency questionnaire to assess isoflavone intake in a Japanese population in comparison with dietary records and blood and urine isoflavones. *J Nutr*, 131, 2741-7.
- Yellayi, S., Zakroczymski, M.A., Selvaraj, V., Valli, V.E., et al. (2003) The phytoestrogen genistein suppresses cell-mediated immunity in mice. *J Endocrinol*, 176, 267-74.
- Zhang, Y., Hendrich, S., Murphy, P.A. (2003) Glucuronides are the main isoflavone metabolites in women. *J Nutr*, 133, 399-404.
- Zhang, Y., Wang, G.J., Song, T.T., Murphy, P.A., et al. (1999) Urinary disposition of the soybean isoflavones daidzein, genistein and glycitein differs among humans with moderate fecal isoflavone degradation activity. *J Nutr*, 129, 957-62.
- Zheng, Y., Hu, J., Murphy, P.A., Alekel, D.L., et al. (2003) Rapid gut transit time and slow fecal isoflavone disappearance phenotype are associated with greater genistein bioavailability in women. *J Nutr*, 133, 3110-6.

## Sécurité des phyto-estrogènes

*Joël Guillemain, Marie-Chantal Canivenc-Lavier, Isabelle Berta-Vanrullen*

D'une façon générale, et dans les conditions de consommation qui ont été celles rapportées jusqu'à ce jour, les phyto-estrogènes ne sont pas décrits comme des produits toxiques. Ces substances entrent dans l'alimentation humaine, notamment par les fruits et les légumes, mais plus encore par la consommation de soja dans les populations asiatiques. Les phyto-estrogènes bénéficient ainsi d'une réputation de sécurité liée à l'historique de leur consommation.

Toutefois, la possibilité d'une extension importante de leur apport dans certaines populations qui ne consommaient pas historiquement ces produits (végétariens occidentaux, consommateurs de compléments alimentaires), à des doses qui pourraient être élevées, et sous des formes éventuellement différentes des formes traditionnelles de consommation (notamment des extraits ou composés purifiés, voire synthétisés) soulève la question de la sécurité des phyto-estrogènes pour le consommateur. Cette interrogation est également justifiée au regard des propriétés biochimiques de ces substances. En effet, les phyto-estrogènes peuvent agir sur des enzymes ou des récepteurs (voir chapitre « Mécanisme »). Les risques potentiels qu'il faut envisager peuvent provenir d'une exacerbation des propriétés pharmacologiques des phyto-estrogènes sur les organes cibles (activité classique de type utéro-trophique par exemple) ou d'effets délétères sur des organes annexes liés ou non à la fonction sexuelle (hypophyse, thyroïdes, tissu osseux...). A cet égard, la notion de maturation sexuelle liée à l'âge d'exposition est un facteur pouvant largement amplifier la notion de risque. Enfin, les différences structurales des phyto-estrogènes ont des conséquences sur les caractéristiques cinétiques et métaboliques et donc sur l'activité et la toxicité potentielle de ces composés (Lieberman 1996).

Les phyto-estrogènes actuellement sur le marché sont présents dans des compléments alimentaires dont l'objectif est majoritairement focalisé sur l'amélioration potentielle des troubles de la ménopause. D'une part, ces compléments alimentaires relèvent du statut réglementaire encadrant les denrées alimentaires mais revêtent aussi, de par leur présentation et leur formulation auprès du consommateur, un caractère situé entre l'aliment et le médicament. D'autre part, l'état (physiologique ou pathologique) ciblé par les effets de ces substances peut être discuté (Cf. chapitres « Introduction » et « Conclusion générale » du rapport). L'évaluation de la sécurité de ces produits doit, en conséquence, tenir compte de ce contexte.

Les phyto-estrogènes ont en commun d'exercer des effets de type estrogénique, notamment chez les mammifères, cette action étant reliée à une parenté chimique structurale avec le 17 $\beta$ -estradiol (Price 1985, Knight 1996). La présence du noyau biphénolique apparaît essentielle pour la liaison avec les récepteurs aux estrogènes (Milsicek 1995). Utilisant la technique du profil d'expression de gènes, Moggs (2004) montrent que le 17 $\beta$ -estradiol, la génistéine et le diéthylstilbestrol modifient l'expression des mêmes 179 gènes dans l'utérus immature de la souris. La comparaison des effets bénéfiques ou néfastes des phyto-estrogènes avec les estrogènes de « référence » a donc été un élément soit d'expérimentation (études comparatives), soit de réflexion, en regard des effets largement décrits dans la littérature avec ces estrogènes. Toutefois, les quelques différences de structure qui conduisent aux différents groupes d'isoflavones, modulent l'interaction avec ces récepteurs et, en conséquence, leur spécificité d'action. Dans ces conditions, et selon le phyto-estrogène et la dose utilisée, des propriétés estrogéniques, anti-estrogéniques ou modulatrices de type SERMs<sup>20</sup> (Brzezinski 1999) sont rapportées, n'autorisant pas à établir un parallèle strict entre phyto-estrogènes et estrogènes.

<sup>20</sup> SERMs : modulateurs des récepteurs aux estrogènes

## I- Méthodologie

Les critères habituellement recommandés pour la réalisation des études de sécurité des produits destinés à traiter les maladies humaines ont guidé la recherche bibliographique nécessaire à l'étude de la sécurité des phyto-estrogènes, dans la mesure où leur utilisation est à la limite du médicament et de l'aliment.

Les critères prennent en compte les éléments suivants :

- utilisation d'espèces animales classiquement utilisées pour l'évaluation de la toxicité à visée réglementaire (rongeurs, chien, singe...),
- effectif des groupes suffisant et présence des deux sexes,
- identification suffisante du ou des produits administrés,
- voie d'administration identique à celle utilisée chez l'Homme,
- nombre suffisant de doses, permettant d'établir une relation dose-effet,
- schémas expérimentaux proches de ceux recommandés par les directives et spécifiques de chacun des aspects de la sécurité (toxicité par administration unique ou répétée, reprotoxicité, génotoxicité, carcinogénicité).

En l'absence de certains de ces critères, des études jugées intéressantes à travers un ou plusieurs paramètres d'évaluation ont toutefois pu être commentées. Enfin, le plan suivi, pour la présentation et l'analyse des études, est celui qui est habituellement recommandé pour documenter la sécurité d'un produit destiné à la santé humaine.

## II- Toxicologie par administration unique ou répétée

### II-1 Toxicité par administration unique

Aucun effet toxique particulier n'est rapporté après administration unique de daidzéine par voie orale ou sous-cutanée à des doses allant jusqu'à 10g/kg de poids corporel (pc) chez la souris ou le rat (European Patent Application, 1984). Deux études ont par ailleurs été réalisées aux Etats-Unis chez des volontaires sains lors d'administration unique *per os* de doses allant jusqu'à 16 mg/kg d'isoflavones purifiées (génistéine, daidzéine et glycitéine) chez l'homme sain volontaire (n=30) ou la femme post-ménopausée (n=24). Dans le premier cas, les seules modifications relevées concernent une augmentation de la lipoprotéine lipase et une hypophosphatémie sans autres signes particuliers de toxicité (Busby 2002). Dans le second cas (Bloedon 2002), des signes cliniques associant nausées, tension mammaire sont décrits ainsi qu'une baisse de la pression artérielle (7%). En l'absence d'essai conduit en aveugle contre placebo, ces données sont à relativiser. Dans les deux études, les paramètres pharmacocinétiques ont été explorés.

### II-2 Toxicité par administration répétée

La littérature fait état d'études essentiellement chez le rongeur et majoritairement par voie orale (Cf. tableau récapitulatif 1). Les produits administrés sont soit des protéines de soja, soit la génistéine. Selon le type d'étude, les durées de traitement vont de quelques jours à 22 mois. Nous considérerons plus particulièrement les études chez le rongeur et le chien rapportées par le National Cancer Institut (NCI,1996) à partir d'isoflavones purifiées de soja ou de génistéine et l'étude génistéine récente de 28 jours chez le rat conduite selon un protocole OCDE (Okazaki 2002). Les études sont présentées selon le protocole et sa conformité avec les directives réglementaires.

#### • **Etude souris Swiss (2 sexes, 4 semaines)**

L'administration orale quotidienne de génistéine à raison de 45 mg (4.5 mmol/kg/J, soit > 2g/kg) pendant 4 semaines chez des souris des deux sexes, entraîne une létalité (2/8) et une réduction significative du poids corporel et de certains organes : testicules, surrénales, reins, rate (Carter 1960).

#### • **Etude rat (2 sexes, 28 jours)**

La toxicité éventuelle de la génistéine a été étudiée selon un protocole OCDE 407 (Okazaki 2002), pour lequel une attention particulière a été portée à certains paramètres en liaison

avec l'activité du produit (poids et histologie des organes endocrines, caractéristiques du sperme, taux sériques hormonaux et cycle sexuel). Les animaux (Rats S.D. de 7 semaines, 10 de chaque sexe par groupe) reçoivent quotidiennement par gavage soit le véhicule seul, soit la génistéine aux doses de 120, 400 ou 1000 mg/kg/J pendant 28 jours, les femelles étaient sacrifiées le jour de l'estrus au cours des 4 jours suivant la 28<sup>ème</sup> administration. Boisson et aliment standard (caractéristiques non précisées) sont distribués *ad libitum*. Outre l'évolution pondérale et la consommation alimentaire, les signes cliniques éventuels, les paramètres hématologiques et biochimiques sanguins, le poids d'organes et l'autopsie (hypophyse, thyroïde, foie, reins, surrénales, testicules, épидидymes, vésicules séminales, prostate, ovaires et utérus et leur examen biologique), les taux sériques d'hormones (T<sub>3</sub>, T<sub>4</sub>, TSH, testostérone, estradiol, prolactine), les aspects qualitatifs et morphologiques du sperme ont été particulièrement étudiés.

Chez les animaux femelles, les examens histologiques mettent en évidence des signes du type de ceux observés après exposition aux « perturbateurs endocriniens » avec vacuolisation et mucinification de l'épithélium vaginal aux 2 doses les plus élevées, l'incidence des lésions étant toutefois jugée très faible mais génistéine reliée. L'imputabilité de la génistéine dans l'augmentation significative de la prolactine, dans le seul sexe mâle, à la dose forte uniquement, n'est pas jugée évidente par les auteurs compte tenu notamment des larges variations individuelles. Au plan biochimique, une augmentation des triglycérides plus marquée chez les femelles (400 et 1000 mg/kg) et de la protéinémie (1000 mg/kg), une diminution du rapport albumine/globulines (2 sexes, 1000 mg/kg/J) et une augmentation du poids du foie (400 et 1000 plus marqué) et du contenu en glycogène dans les hépatocytes péri-portaux (dès 120 mg chez les femelles) sont décrits. A partir de ces données, les auteurs concluent à une NOAEL de 120 mg/kg pc/J.

Malheureusement, cette étude ne comporte ni groupe satellite<sup>21</sup> pour une évaluation de la symptomatologie toxique en fonction des taux circulants dans le temps, ni animaux supplémentaires destinés à l'évaluation de la réversibilité des effets délétères, limitant ainsi la portée des conclusions en regard de l'extrapolation des données à l'Homme.

Contrairement aux études du N.C.I. (Cf. ci-après), ni le poids corporel, ni la consommation alimentaire ne sont modifiés à des doses pourtant très élevées. On peut s'interroger sur ces divergences, d'autres études explorant notamment la fonction de reproduction ayant clairement objectivé cette diminution du poids corporel. Ainsi, Gallo *et al.* (1999) observent des baisses de poids significatives chez des rats femelles traitées par un extrait de soja standardisé, contenant 12 % d'isoflavones et 35 % de saponines, incorporé dans l'alimentation à raison de 2,4 %. Cet effet est partiellement relié à une baisse de consommation alimentaire. Toutefois, les auteurs font état de travaux antérieurs reliant cette baisse pondérale à une suppression de la sécrétion d'hormone de croissance par l'hypophyse antérieure (Stob 1983, Hartsook 1957).

• **Etude rat (1 seul sexe, 25-50 semaines)**

Sur un modèle d'induction de tumeur à l'azoxyméthane (AOM), l'incorporation de génistéine dans l'aliment à raison de 500 ppm (92.5 µmol/kg/J) soit  $\cong$  50 mg/kg ou 250 ppm (46.3 µmol/kg/J) soit  $\cong$  25 mg/kg pendant 50 semaines chez le rat mâle entraîne une baisse rapide du poids corporel à la dose forte (-14 %) conduisant à l'arrêt du traitement après 2 semaines, alors qu'aucun effet n'est rapporté à la dose plus faible après 25 semaines de traitement (N.C.I. 1996). La baisse pondérale importante peut être un marqueur de toxicité, mais cette observation, chez des animaux porteurs de tumeur, enlève de la pertinence à l'étude.

• **Etude rat (2 sexes, péri-post natalité)**

Bien que ne répondant pas aux critères habituels des essais de toxicité générale, l'étude de Slikker (2001) réalisée chez des jeunes animaux soumis à un régime génistéine du sevrage au sacrifice à 140 jours, et eux-mêmes issus de parents ayant reçu ce régime, montre qu'à la concentration de 500 ppm dans l'aliment ( $\cong$  50 mg/kg), les taux circulants varient entre 6 à 8 µM selon le sexe. Les seuls événements significatifs, rapportés dans des groupes

---

<sup>21</sup> groupes d'animaux supplémentaires destinés aux prélèvements pour étude cinétique

satellites, sont une augmentation de la consommation de boisson enrichie en NaCl (3%) à la concentration de génistéine de 1250 ppm (phénomène déjà décrit par Ferguson (2000) avec un composé « estrogénomimétique » comme le nonylphénol), ainsi qu'une réduction significative de la surface de l'aire sexuelle médiane pré-optique (MPOC) chez le mâle uniquement dès la plus faible concentration de 25 ppm. Selon les auteurs, ce paramètre serait le marqueur le plus sensible d'une altération liée à une exposition précoce et chronique de génistéine *via* l'alimentation (Cf. Chapitre « Système nerveux central, fonctions cérébrales et cognitives »).

• **Etude rat (1 seul sexe, 12 mois)**

Une étude récente réalisée chez le rat Wistar, mais dans le seul sexe mâle, à partir d'un aliment enrichi à raison de 200 ou 2000 mg d'isoflavones/kg d'aliment pendant 12 mois au moins (dès 10 semaines d'âge), conclut à l'absence de modification de l'évolution pondérale et d'atteinte macroscopique des organes, en particulier du poids des testicules et des épидидymes (Faqui 2004). Une fois encore, aucune donnée de cinétique ne vient étayer l'absence de toxicité mentionnée, limitant ainsi la portée de l'étude.

• **Etude chien beagle (2 sexes, 90 jours)**

Le traitement, administré sous forme de capsules correspond à des isoflavones purifiés de soja titrant respectivement 90 % ou 43 % de génistéine et 7% ou 21% de daidzéine. Trois niveaux de doses sont étudiés pour chacune des formulations :

- 5, 25 et 70 mg/kg/j soit 0.02, 0.09 et 0.3 mmol génistéine/kg/j (90 % génistéine)
- 10, 50 et 140 mg/kg/j soit 0.02, 0.08 et 0.2 mmol génistéine/kg/j (43 % génistéine)

Aucun effet clinique ou histologique particulier n'est rapporté. Après déconjugaison, les taux de génistéine plasmatique correspondant sont compris entre 0.17 et 0.83 µg/mL (0.6 à 3.1 µM) dans les deux groupes. Le document fait par ailleurs état d'un taux plasmatique de génistéine de 0.055 µg/mL (0.2 µM) 6 heures après administration intra-gastrique unique de génistéine à 28 mg/kg (N.C.I. 1996).

### **II-3 Discussion**

La faible toxicité générale des phyto-estrogènes évoquée en préambule sur la base des données humaines historiques, est en accord avec les résultats des études réalisées tant chez le Rongeur que chez le Chien. Les effets majoritairement observés chez le rongeur sont une baisse de poids corporel avec la génistéine (Slikker 2001) parfois reliée à une baisse de la consommation alimentaire avec le soja sous forme de farine, concentré ou isolat de protéines (Rackis 1979). L'essai le plus récent (Okazaki 2002) ne confirme cependant pas ces faits, même à la dose de 1000 mg/kg pc /jour pendant 28 jours. Dans cette même étude la dose n'entraînant aucun effet délétère est de 120 mg/kg pc /j. En l'absence de données de cinétique propres à l'étude, une estimation fondée sur l'extrapolation des données «ingéré-circulant » (voir chapitre biodisponibilité) conduirait à des taux circulants plasmatiques de génistéine supérieurs à 5 µM. Cette concentration peut être atteinte chez l'Homme avec des doses de 1,5 à 2 mg/kg pc /j.

Les doses administrées chez l'animal, conduisant aux quelques effets observés, sont sensiblement supérieures à celles des apports chez l'Homme (parmi les apports les plus élevés), soit entre 25 et 1000 mg/kg pc /j de génistéine chez le Rat et 70 mg/kg pc /j chez le Chien contre 0,16 à 2 mg/kg/j chez l'Homme selon le tableau relations « ingéré-circulant » (voir chapitre « biodisponibilité »).

Toutefois les quelques données d'exposition chez le Chien tendent à montrer que les taux plasmatiques de génistéine sont assez proches de ceux rapportés chez l'Homme (tableau « ingéré-circulant » du chapitre « Biodisponibilité »), signifiant qu'il est nécessaire d'utiliser des doses sensiblement supérieures chez l'animal pour obtenir des expositions circulantes proches de celles observés habituellement chez l'Homme. De telles différences, en relation avec la biodisponibilité ou le métabolisme du produit administré, sont classiquement observées en toxicologie selon l'espèce considérée. Les taux circulants (et les taux tissulaires lorsqu'on en dispose), permettent de juger de la « validité » de l'étude et de la pertinence de l'extrapolation des données à l'Homme. Des taux similaires animal-Homme



sont largement insuffisants pour parler de véritable étude de toxicité. C'est un des points faibles des études de toxicologie dont nous disposons.

La conséquence importante est que la prise en compte des taux circulants de génistéine, tant chez le Rat que chez le Chien, conduit à considérer que la toxicité de doses quotidiennes réitérées *per os* au delà de 1 mg/kg chez l'Homme, n'a pas été explorée selon les critères habituels des essais dits précliniques, la durée des études « réglementaires » disponibles étant par ailleurs sensiblement inférieure à celle habituellement requise pour un produit destiné à la santé humaine. L'utilisation des phyto-estrogènes, sous la forme de leurs composés « actifs » et à des fins thérapeutiques, nécessiterait la disponibilité d'essais conduits conformément aux recommandations avec une échelle de dose conduisant à une exposition plasmatique sensiblement supérieure à celle observée chez l'Homme, impliquant des études de toxicocinétique simultanées qui font le plus souvent défaut dans les études rapportées dans la littérature (cf Rao 1997, Anastasia 1990).

En l'état actuel des données, les recommandations quant à une dose quotidienne maximale de phyto-estrogènes chez l'adulte, toute consommation confondue, pourraient être de l'ordre de 1 mg/kg, rejoignant en cela les recommandations formulées en Allemagne par la « Senate Commission on the Evaluation of Food Safety (Bolt 2001).

### III- Génotoxicité

Le potentiel génotoxique des phyto-estrogènes a été recherché tant *in vitro* qu'*in vivo* par de nombreux auteurs. Les études réalisées sont le plus souvent récentes et conduites selon une méthodologie conforme à celle préconisée à ce jour. Ces résultats sont par ailleurs à rapprocher de ceux observés avec l'estradiol.

#### III-1 Résultats des études *in vitro*

##### III-1-1 Isoflavones

**Sur le test de Ames**, à partir des souches de *Salmonella typhimurium* TA 1538, TA 98 et TA 100, la génistéine et la daidzéine à des concentrations allant jusqu'à 100 µg/plaque en présence ou non d'activateur métabolique, ne sont pas mutagènes (Bartholomew 1980). Ces résultats sont conformes à ceux obtenus avec l'estradiol pour lequel une absence d'effet mutagène est décrite dans des conditions expérimentales identiques à des concentrations allant jusqu'à 104 µg/plaque. L'étude d'isoflavones de soja par le National Cancer Institute sur 6 souches de bactéries confirme l'absence d'effet mutagène en l'absence ou présence d'activation métabolique (Misra 2002).

**La formation de micronoyaux** est rapportée par Boos (2000) avec la génistéine à des concentrations supérieures à 7 µM mais également par Kulling (1997, 2002) avec la génistéine (25 µM) mais pas la daidzéine, à partir de **culture de fibroblastes pulmonaires V79 de hamster chinois**. Compte tenu de la cytotoxicité de la génistéine à cette concentration, le potentiel mutagène est toutefois jugé douteux. Ces résultats sont en accord avec ceux précédemment rapportés par Record et al en 1995 lors d'un essai comparatif entre la génistéine ou la génistine (25 µM) et l'étoposide (0.1 µM) pris comme produit de référence. A ces concentrations, le nombre de micronoyaux observés sur des splénocytes murins en culture est significativement augmenté par tous les produits, alors qu'à 2.5 µM ou 12.5 µM, aucun effet clastogène n'est observé avec la génistéine. L'absence de formation de micronoyau avec la daidzéine a été récemment confirmée par Schmitt (2003) à partir de cellules de lymphome de souris L5178Y. Toutefois, alors qu'à la concentration maximale de 100 µM (limite de solubilité) la daidzéine est dépourvue d'effet, ses quatre principaux métabolites (équol, O-desméthylangolensine, 4',6,7-isoflavone et 3',4',7-isoflavone) induisent la formation de micronoyaux de façon dose dépendante à des concentrations allant de 10 à 100 µM. L'une des dernières études publiées (Di Virgilio 2004), confirme l'induction de micronoyaux sur le modèle des cellules V79 avec la génistéine (5-25 µM), mais également avec la daidzéine entre 25 et 100 µM. Dans les mêmes conditions expérimentales, l'équol

induit la formation de micronoyaux au-delà de 25  $\mu\text{M}$ , sans augmentation de l'effet lorsque la concentration croît.

A partir d'un **test comète** réalisé sur **des lymphocytes ou du sperme humain**, Anderson (1997) concluent à l'augmentation de **l'incidence des cassures de brin d'ADN** après exposition à la génistéine ou daïdzéine ( $\geq 10 \mu\text{M}$ ). Toutefois, les résultats diffèrent en fonction du type cellulaire et du sexe du donneur. Des cassures de chromatides et des délétions dans des cultures de lymphocytes ont également été décrites par Kulling (1999) avec la génistéine (25  $\mu\text{M}$ ). Les effets de la génistéine ( $\geq 7 \mu\text{M}$ ) sur la topoisomérase II (Boos 2000) pourraient être à l'origine de ces cassures de l'ADN rapportées également par Kiguchi et al (1990) et par Constantinou (1990). Ce mécanisme cellulaire a conduit Snyder (2003) à s'interroger sur la génotoxicité de ce type de composés, l'estradiol étant également décrit comme génotoxique. Mais d'autres constituants dont le mécanisme d'action serait différent (inhibiteur catalytique de la topoisomérase II et non « poison mitotique ») joueraient au contraire un rôle anti-clastogène (Sierens 2001). C'est le cas de la daïdzéine et de la biochanine A (Snyder 2003). Ces interactions entre composés posent le problème des « actifs » isolés en opposition avec le « totum<sup>22</sup> » tel que rencontré dans les extraits de soja. Elles posent également la question de la différence des effets entre compléments alimentaires et aliments. Ces propriétés antimutagènes, notamment de la 8-hydroxy isoflavone et de la 6-hydroxydaïdzéine ont également été rapportées par Chen (2003), le nombre et la position des groupements hydroxy et méthoxy conditionnant ces effets.

L'utilisation de **cellules de lymphome murin** conduit à une augmentation significative de la **fréquence des mutations** avec ou sans activation métabolique à des concentrations d'isoflavones  $\geq 0.8$  et 12  $\mu\text{g}/\text{mL}$  respectivement, l'effet étant dose reliée et concernant aussi bien les petites que les grandes colonies (Misra 2002).

**L'évaluation simultanée, *in vitro*, des effets potentiels carcinogènes et mutagènes** a conduit Tsutsui et al (2003) à étudier 5 phyto-estrogènes (génistéine, daïdzéine, coumestrol, biochanine A, prunétine, 10, 20, 50, 100, et 200  $\mu\text{M}$ ) sur le **modèle des cellules embryonnaires de hamster syrien (SHE)**. Les auteurs concluent que seule la prunétine conduit à des résultats négatifs quel que soit le marqueur de génotoxicité. Les autres composés sont à l'origine d'une transformation des cellules découlant d'au moins 2 effets mutagènes (mutations géniques, aberrations chromosomiques, aneuploïdie ou formation d'adduits à l'ADN) suggérant une origine mutagène aux effets carcinogènes parfois rapportés. Cette relation entre un effet carcinogène potentiel et un mécanisme génotoxique et/ou épigénétique a été évoquée pour les estrogènes ( $\beta$ -estradiol, estriol ou estrone) qui conduisent à des résultats positifs sur le test des comètes, à des concentrations de l'ordre de  $10^{-8}$  M (Yared 2002). Toutefois, ces effets doivent être pondérés en se référant aux concentrations d'isoflavones utilisées pour mettre en évidence ces effets dans les modèles *in vivo*. Cette remarque trouve *a priori* sa réponse dans l'étude de Miltyk (2003) qui explore l'éventuelle génotoxicité d'isoflavones purifiées de soja (mélange de génistéine, daïdzéine et glycitéine) à partir de lymphocytes périphériques de sujets présentant un cancer de la prostate et traités à raison de 300 mg/j pendant 28 jours puis 600 mg/j pendant 56 jours. Les auteurs observent une augmentation de fréquence des micronoyaux sur des lymphocytes exposés *in vitro* à des concentrations  $\geq 100 \mu\text{mol}/\text{L}$  alors que les taux circulants ( $C_{\text{max}}$ ) de génistéine total ou libre sont de 27.1  $\mu\text{mol}/\text{L}$  et 0.32  $\mu\text{mol}/\text{L}$  respectivement dans l'étude rapportée. Les auteurs concluent que si certaines isoflavones entraînent des effets génotoxiques *in vitro*, de tels effets ne sont pas observés *in vivo* chez des sujets traités par des isoflavones purifiées issues du soja.

Dans des lignées de cellules prostatiques cancéreuses humaines (PC3, LNCaP) la génistéine à des doses inférieures à 10  $\mu\text{M}$  induit des cassures de l'ADN mais pas la

---

<sup>22</sup> totum : ensemble des constituants d'une plante contribuant à l'activité attribuée à cette plante

daidzéine. Il faut des doses de coumestrol supérieures à 250  $\mu\text{M}$  et des doses d'équol supérieures à 50  $\mu\text{M}$  pour obtenir une génotoxicité équivalente (Mitchell 2000). Par contre, les 4 produits utilisés ont une activité anti-proliférative sur les lignées testées.

Enfin, les effets précédemment rapportés sont à rapprocher de ceux décrits avec l'estradiol pour lequel une augmentation significative de la fréquence des aberrations chromosomiques ou des échanges de chromatides sur des lymphocytes humains en culture est rapportée à 10 et 100  $\mu\text{g/ml}$ .

### **III-1-2 Coumestanes**

Les études de Kulling et Metzler (1997) ont montré que le coumestrol induit des cassures d'ADN (dès 25  $\mu\text{M}$ , dose dépendant), la formation de micronoyaux (50  $\mu\text{M}$ ) et des mutations sur le gène Hypoxanthine Phosphoribosyl Transférase (HPRT) de cellules ovariennes de Hamster chinois (10 à 50  $\mu\text{M}$ ). Une étude plus récente de Domon et al. (2001) complète ces données à partir de cultures de cellules lymphoblastiques humaines AHH-1 TK(+/-). Des mutations sont induites sur le gène Thymidine kinase et une hypothèse basée sur l'inhibition de la topoisomérase II est avancée pour expliquer ces effets mutagènes et clastogènes du coumestrol dont la structure chimique est considérée comme proche de celle du diéthylstilbestrol. Il a aussi été décrit par Kulling (1999), avec le coumestrol (>50  $\mu\text{M}$ ), des cassures de chromatides et des délétions dans des cultures de lymphocytes

### **III-2 Résultats des études *in vivo***

Les effets d'une administration orale de génistéine (20 mg/kg pc/j) pendant 5 jours chez la souris C57BL6J (dose estimée équivalente à la consommation de 2.8 kg/jour de soja chez un homme de 70 kg par les auteurs...) ont été recherchés par Record et al. (1995) à partir de la **formation de micronoyaux** dans les splénocytes. Aucun effet n'est observé comparativement à des animaux témoins, les concentrations plasmatiques atteintes étant plutôt supérieures à celles classiquement observées chez l'Homme consommant des aliments à base de soja (9.2  $\mu\text{M}$  contre 0.276  $\mu\text{M}$  selon Adlereretz (1993) et Bennetau (2003) rapportant toutefois un taux de 6.9  $\mu\text{M}$  après absorption de 100 mg de génistéine).

Par comparaison, seules des doses fortes d'estradiol (> 1mg/kg voie intrapéritonéale (i.p.)) conduisent à une augmentation significative de micronoyaux dans les érythrocytes de souris traitées. De leur côté, Misra (2002) font état d'une augmentation significative des micronoyaux 24 h après traitement à raison de 500 ou 1000 mg/kg d'isoflavones de soja, mais pour le seul sexe femelle et sans effet dose, l'effet disparaissant 48 heures après traitement.

### **III-3 Conclusion**

La génistéine comme la daidzéine et, à un moindre degré la génistine et le coumestrol, ont fait l'objet d'études à partir de tests classiques habituellement mis en œuvre pour évaluer le potentiel génotoxique des produits chimiques ou des médicaments. Au-delà du problème spécifique des impuretés qui pourraient être liées à l'obtention des isoflavones par synthèse ou des solvants résiduels d'extraction, le potentiel génotoxique des isoflavones de soja n'apparaît pas être significativement différent de celui rapporté avec l'estradiol, les effets pouvant toutefois varier selon le type d'isoflavone considéré.

## **IV- Carcinogénicité**

Alors que l'estradiol a fait l'objet d'études détaillées et de monographies critiques émises notamment par l'IARC, nous n'avons pas retrouvé dans la littérature d'études des phytoestrogènes conduites selon les recommandations « études de carcinogénicité » habituellement mises en œuvre pour documenter le potentiel carcinogène des produits chimiques ou des principes actifs à visé thérapeutique. Certaines des études publiées permettent toutefois d'estimer ce risque et nous commenterons leurs caractéristiques

méthodologiques et leurs résultats. Dans ce chapitre dédié à la toxicité, nous focaliserons notre analyse sur les études *in vivo* visant précisément à rechercher un éventuel effet carcinogène (tableau récapitulatif 2)<sup>23</sup>. Les études présentant un effet favorable ou un intérêt sur le plan mécanistique sont présentées dans les chapitres « effets sur le cancer » et « Mécanismes ».

#### **IV-1 Dualité de l'effet en fonction de la dose**

Selon la concentration utilisée, la génistéine exerce un effet stimulant sur la croissance tumorale (faible dose inférieure à 5 µmol/L selon Ju 2001) ou au contraire inhibiteur à des doses plus fortes. Ce fait, décrit initialement par Zava (1997) à partir de lignées tumorales mammaires humaines, a été confirmé par d'autres équipes. Ainsi, selon Santell 1997, Hsieh 1998, Wang 1996 (cités par Ju 2001), la génistéine ( $\geq 10$  µmol/L) inhibe la croissance de cellules tumorales mammaires ER dépendantes ou indépendantes. Mais pour d'autres auteurs (Martin 1978, Hsieh 1998, Wang 1996) la génistéine, dont l'affinité pour le récepteur ER est 20 à 100 fois plus faible que celle de l'estradiol (voir Chapitre mécanismes et Adlercreutz 1995, Santell 1997), stimule la prolifération des cellules MCF-7 et induit l'expression du gène ps2 à des concentrations de 0,1 à 1,0 µmol/L. Cette dualité d'effet en fonction de la dose a également été observée *in vivo*.

#### **IV-2 Etudes *in vivo***

Nous avons précédemment fait allusion à la similarité structurale de certains phyto-estrogènes avec le diéthylstilbestrol (DES) dont on connaît les effets délétères<sup>24</sup>. Ceci a logiquement conduit à s'interroger sur les **effets à long terme** des phyto-estrogènes, notamment lorsqu'ils sont administrés à des enfants ou à des adolescents (Strauss 1998). Ainsi, certains auteurs estiment qu'il est nécessaire de disposer d'études sur les risques éventuels d'apparition de cancer du sein ou de la prostate, chez les enfants consommateurs d'aliments à base ou enrichis en soja, ou en tout autre phyto-estrogène. L'attention est en général attirée sur la consommation de phyto-estrogènes isolés et/ou purifiés à des doses élevées (Cos 2003). Enfin, quelques rares études ont été conservées malgré une voie non alimentaire qui maximalise les effets, ce qui présente un intérêt dans une optique de toxicologie.

##### **IV-2-1 Effets des isoflavones**

###### **➤ Augmentation de l'incidence des tumeurs spontanées :**

Considérant précisément le développement de **cancers du vagin** et du col de l'utérus (adénocarcinomes à cellules claires) après exposition fœtale humaine au diéthylstilbestrol (DES), Newbold (2001) ont étudié les effets de la génistéine administrée par voie sous-cutanée aux jours 1 à 5 de la gestation chez la souris CD-1. La dose de 50 mg/kg p.c./j de génistéine contre DES 0,001 mg/kg pc/j conduit à une augmentation de l'incidence d'adénocarcinome utérin de 35% et 31% respectivement, par rapport à un groupe témoin, 18 mois après traitement par la génistéine. Les auteurs concluent que la génistéine est carcinogène chez le fœtus exposé lors d'une phase critique de son développement et dans des conditions maximalisées d'exposition. Même s'il s'agit de conditions expérimentales particulières qui maximalisent les risques avec une voie d'apport non alimentaire, l'intérêt de cette étude est de souligner que la balance bénéfique/risque des isoflavones dépend étroitement de la dose administrée, ce qui est classique, mais surtout de la période d'exposition, ce qui rejoint également la problématique de la toxicité sur la fonction de reproduction abordée ultérieurement dans ce chapitre.

---

<sup>23</sup> Les études animales qui visent à démontrer les effets protecteurs du soja ou des phyto-estrogènes ne seront donc pas abordées, ni les études d'observation humaines cherchant la relation entre cancers et exposition aux phyto-estrogènes (Cf. chapitre « Cancer »).

<sup>24</sup> L'exposition *in utero* à cette hormone de synthèse a provoqué des cancers du vagin et du col de l'utérus (adénocarcinomes à cellules claires) chez les filles des mères exposées.

Thigpen (2001) concluent que la génistéine et la daidzéine incorporées dans l'aliment (228 mg d'isoflavones/kg d'aliment) pendant 1 à 3 mois augmentent, par rapport à l'aliment caséine, l'incidence de **cancer de la vulve** chez une souche de souris (129/J) qui les développe spontanément. Cette différence n'est toutefois pas retrouvée aux temps 6 ou 12 mois.

Seike (2003) font état d'une augmentation significative des **carcinomes pulmonaires** chez le rat F344 recevant la génistéine à raison de 25 ou 250 ppm, soit de l'ordre de 2.5 à 25 mg/kg, pendant 28 jours.

➤ **Potentialisation de l'effet de carcinogènes : tumeurs chimio-induites**

Si de nombreuses études montrent une réduction des processus cancéreux induits par des composés chimiques divers après traitement par les phyto-estrogènes, quelques travaux évoquent au contraire une amplification. C'est le cas de Rao (1997) qui rapportent une augmentation des tumeurs du côlon induites chez le rat Fischer 344 par l'azoxyméthane (AOM), traité ensuite pendant 52 semaines par la génistéine (250 ppm dans l'aliment soit  $\approx$  25 mg/kg).

Cet effet potentialisateur des phyto-estrogènes est également décrit vis-à-vis de cancérigène mammaire : une exposition *in utero* et périnatale à des doses pharmacologiques de génistéine (jusqu'à 80mg/kg de p.c.) entraîne une plus grande sensibilité de la progéniture au DMBA, un cancérigène également estrogénique (Hilakivi-Clarke 1999a et 1999b; .Yang 2000 ; You 2002a;). Cet effet est corrélé à la dose de génistéine reçue (Hilakivi-Clarke 1999a). A noter qu'une exposition *in utero* en tamoxifène (un anti-estrogène partiel) entraîne également une plus grande sensibilité de la progéniture femelle aux effets cancérogènes du DMBA qui se traduit par une augmentation de l'incidence des tumeurs (X2) et une diminution de leur niveau de différenciation (histopathologie), signe d'une plus forte agressivité (Halakivi-Clarke 2000).

➤ **Augmentation de la prolifération tumorale : tumeurs hormono-dépendantes**

La souris nude présente un statut immunitaire qui facilite l'implantation de cellules tumorales afin d'en étudier la régression ou la prolifération sous l'effet de divers traitements. Bien que particulier, le modèle utilisé par Hsieh, Allred ou Ju n'occulte pas pour autant les capacités de réponse immunitaire de ces animaux, notamment à travers la réponse NK plus spécifiquement impliquée dans l'immunité cellulaire. En conséquence, il est considéré comme pertinent pour juger de l'activité intrinsèque proliférative sur des cellules tumorales hormono-dépendantes implantées, l'ovariectomie conduisant par ailleurs à des taux sanguins d'estradiol de 10 pmol/L, proches de ceux observés chez les femmes ménopausées.

Hsieh (1998) démontrent que la génistéine, à raison de 750  $\mu$ g/g d'aliment, **stimule la prolifération de cellules tumorales mammaires** MCF-7 implantées chez la souris nude athymique ovariectomisée, le taux plasmatique de génistéine étant de 2,1  $\mu$ mol/L, similaire à celui observé chez la femme selon Xu (1998). Ju (2001), confirment ces faits dans des conditions expérimentales identiques, les animaux étant traités par des concentrations de génistéine de 125, 250, 500 et 1000  $\mu$ g/g d'aliment, conduisant à des taux plasmatiques de génistéine (formes aglycone et conjuguée) variant entre 0,39 et 3,36  $\mu$ M selon la dose (méthode de dosage LC-ES/MS avec une limite de sensibilité de 0,02  $\mu$ M). Les auteurs concluent qu'à des doses entraînant chez la souris nude une exposition plasmatique en génistéine similaire à celle rencontrée lors d'apports en isoflavones supérieurs à 1 mg/kg/j chez l'Homme (Xu 1998), la génistéine peut stimuler la prolifération de lignées cellulaires estrogéno-dépendantes. Cette étude confirme les résultats rapportés auparavant par une autre équipe selon une méthodologie similaire (Allred 2001). Les traitements administrés étaient dans ce cas soit un isolat de protéine de soja correspondant à 15, 150 ou 300 ppm de génistéine (60% sous forme aglycone), soit ces mêmes concentrations de génistéine incorporées dans un régime caséiné pendant 29 semaines. La croissance de la tumeur hormono-dépendante et l'expression de pS2 sont dose dépendantes. Ces résultats sont

également à rapprocher d'études réalisées in vitro qui montrent, de façon dose dépendante, la prolifération de cellules tumorales, soumises à des concentrations de génistéine de 0.2 à 1.0 µM, comparable à ce que l'on observe avec l'estradiol à 1 nM (Martin 1978, Hsieh 1998 cité par Ju 2001).

Ces résultats ne peuvent à eux seuls préjuger de tels effets chez l'Homme, mais ils requièrent une attitude vigilante quant aux risques d'un apport de phyto-estrogènes chez des sujets qui seraient porteurs de tumeurs hormono-sensibles.

#### ➤ Une étude assez proche des exigences réglementaires

L'étude d'Anastasia (1990) est la plus proche, au plan réglementaire, d'une évaluation du potentiel carcinogène bien qu'il ne s'agisse pas d'une étude ciblée spécifiquement sur l'évaluation de ce potentiel. Elle est menée chez le rat S.D., les effectifs de 43 à 50 animaux par sexe et par groupe étant ceux habituellement requis pour ce type d'étude. Les auteurs concluent en l'absence de différence quant à l'incidence de phénomènes néoplasiques entre les rats traités pendant 24 mois avec un régime soja équivalent à 21,8% de la ration alimentaire protéique et les animaux témoins recevant un régime caséine.

### IV-2-2 Interactions avec d'autres substances

Des interactions entre la génistéine et des composés (anti)-estrogéniques sont décrits chez plusieurs espèces.

Ju (2002) montrent que la génistéine à raison de 1000 ppm **s'oppose aux effets inhibiteurs du tamoxifène**<sup>25</sup> (un anti-estrogène partiel) administré simultanément aux doses de 2.5 et 5 mg chez la souris nude implantée avec des cellules MCF-7, tumeurs mammaires d'origine humaine

Par ailleurs, et contrairement aux conclusions de Allred (2001) ou de Ju (2001, 2002a) l'administration de phyto-estrogènes chez le singe macaque ovariectomisé **antagonise, à des doses jugées non estrogéniques** (protéines de soja équivalent à 1,27 mg de génistéine et 0,42 mg de daidzéine/g de protéine), **l'hyperplasie de l'endomètre et la prolifération cellulaire mammaire induites par les estrogènes** (Cline 2001)

Dans un contexte un peu différent, il est montré qu'une exposition à la génistéine (300 et 800 ppm) *in utero* puis au cours de la lactation (GD1 jusqu'à J21), potentialise l'effet d'une exposition *in utero* en methoxychlor (800 ppm), un xéno-estrogène insecticide reconnu et bien documenté qui engendre de profonds changements morphologiques de la glande mammaire en accentuant la formation de canaux mammaires et des bourgeons alvéolaires, phénomène considéré comme un facteur de risque en cancérogenèse mammaire (You 2002a et b). Ces travaux précisent que la glande mammaire de la progéniture mâle serait plus sensible que celle de la progéniture femelle à l'action de ces composés estrogéniques (You 2002b). Plus récemment, Foster (2004) confirment ces effets et montrent qu'une exposition périnatale en génistéine (J2 à J8, 10 µg de mélange de pesticide/kg/j, sc) potentialise les effets d'une exposition *in utero* à un mélange de pesticides estrogéniques (GD9 à GD 16, 10 mg/kg per os) sur la glande mammaire à l'âge adulte (J200) : alors que les effets sont faibles chez les animaux recevant seulement les pesticides. Une hyperplasie prononcée, des modifications lactationnelles et une fibrose intense plus importante sont observées chez les animaux subissant la muti-exposition « xéno-estrogènes/génistéine » par rapport à la génistéine seule.

Prises dans leur ensemble, ces données démontrent que des phyto-estrogènes peuvent interagir avec les effets de xéno-estrogènes ou autres composés à action hormonale.

### IV-3 Discussion

D'emblée, il faut noter que les résultats de l'ensemble des études publiées sont globalement variables, parfois contradictoires, ne débouchant pas sur des conclusions claires et concernent majoritairement les isoflavones, génistéine et daidzéine. Pour Cotroneo (2001), bien que des doses pharmacologiques de génistéine produisent des effets de type

---

<sup>25</sup> Le tamoxifène est un agent anti-estrogénique qui agit par inhibition compétitive de la liaison de l'estradiol avec ses récepteurs. Il possède aussi un effet estrogénique sur plusieurs tissus (endomètre, os...)

estrogénique objectivables sur le tissu utérin du rat, l'évidence de tels effets à partir d'un régime alimentaire n'apparaît qu'à de fortes concentrations chez la ratte ovariectomisée (50-75 mg/kg/j). Ces faits conduisent les auteurs à écrire que « des doses physiologiques de génistéine apportées via l'alimentation ne produisent pas d'effet estrogénique significatif et seraient, dans ces conditions, dépourvues de toxicité. Cet avis n'est pas partagé par le NCI (1996) qui préconise des études de carcinogénicité avant l'initiation d'essais cliniques de longue durée. Cette position découle de l'absence de véritables études à caractère réglementaire et du fait que la génistéine induise des cassures de brins d'ADN sur des cellules humaines *in vitro* (Kiguhi 1990, Constantinou 1990). La position de Lamartinière semble s'affranchir de la relation qui existe entre la dose ingérée et la concentration d'isoflavone circulants.

En effet des apports sensiblement supérieurs d'isoflavones sont nécessaires chez le rat pour atteindre des taux circulants identiques à ceux observés chez l'Homme pour des apports moindres. Le mécanisme qui sous-tend cette observation n'est pas totalement élucidé. La transformation de l'aglycone en ses métabolites peut en partie l'expliquer. De telles différences entre doses à administrer chez l'animal et chez l'Homme afin d'atteindre des taux circulants sont classiques. Elles peuvent découler de différences cinétiques entre les espèces (biodisponibilité, distribution, métabolisme).

Néanmoins, si les données actuelles ne permettent pas de conclure clairement quant à un effet cancérogène *in vivo* des phyto-estrogènes *via* une altération génétique, leur interaction avec des molécules cancérogènes est clairement identifiée, en particulier avec les xenoestrogènes. Si l'effet peut varier selon la dose utilisée (Hilakivi-Clarke, 1999a et b), plusieurs auteurs soulignent l'importance de la période d'exposition en phyto-estrogènes et mettent en évidence la période *in utero* et néonatale comme une période critique dont les conséquences apparaissent à l'âge adulte. Divers travaux (cf chap mécanisme) montrent que ces effets sont associés à une action sur la morphogénèse de la glande mammaire et sur l'expression des récepteurs hormonaux et des PKC, lesquels jouent un rôle important en cancérogénèse mammaire (Hilakivi-Clarke 1994 ;1998 ; 2001; 2002).

Le modèle de souris « nude athymique ovariectomisée », mis en œuvre par différents auteurs, présente des caractéristiques physiologiques particulières qui permettent d'illustrer le potentiel prolifératif des phyto-estrogènes vis-à-vis de cellules tumorales hormono-dépendantes, en particulier d'origine mammaire **humaine (MCF-7)**. Ces résultats conduisent raisonnablement à s'interroger sur les risques potentiels de tels régimes chez certains sujets dont l'état physio-pathologique présenterait des similitudes avec le modèle murin utilisé. Par ailleurs, la génistéine à des concentrations de 0.2 à 1.0  $\mu$ M augmente la prolifération de cellules, certes en culture, mais de façon dose-dépendante et comparable à ce que l'on observe avec l'estradiol à 1 nM (Martin 1978, Hsieh 1998 cité par Ju 2001). Ceci a conduit Ju *et al* à considérer qu'un régime contenant plus de 250  $\mu$ g de génistéine/g de régime conduirait à des taux circulants suffisants pour stimuler la croissance de cellules tumorales estrogéno-dépendantes. Parmi les aliments les plus concentrés (Cf. Chapitre « Estimation des apports ») le tofu et les desserts soja sont susceptibles d'entraîner de tels apports. Cette notion de dose est à souligner et peut être mise en relation avec la dose efficace (250 mg/kg p.c./j) pour laquelle l'effet utéro-trophique (prolifération de l'épithélium utérin) de la génistéine est significatif chez la rate immature ou adulte ovariectomisée ) (ex : Stroheker 2003b).

Enfin, il faut rappeler qu'en 1979, l'IARC concluait qu'il existait des preuves évidentes du potentiel carcinogène du 17 $\beta$ -estradiol chez l'animal de laboratoire, conclusion étendue à l'Homme par un amendement en 1987. Même si le doute portait principalement sur le cancer de l'endomètre, ces conclusions avaient conduit le NIH en 1996, à considérer que le potentiel carcinogène des estrogènes était établi tant chez l'animal que chez l'Homme et que, dans ces conditions, des précautions devaient être prises lors de la mise en œuvre des traitements hormonaux substitutifs chez la femme ménopausée. Il y a donc lieu de s'interroger sur les différences entre phyto-estrogènes et estrogènes qui conduiraient à

s'affranchir de ces réserves, illustrées depuis lors par quelques fortes interrogations, à défaut des certitudes évoquées par certains.

Enfin, les interactions identifiées entre phyto-estrogènes et hormones ou médicaments pouvant réduire ou favoriser l'apparition de processus prolifératifs sont un réel sujet d'interrogation qui devra être pris en compte dans l'évaluation du rapport bénéfices/risques de certaines situations pathologiques ou populations à risque.

## **V- Toxicité sur la fonction de reproduction et le développement**

### **V-1 Méthodologie**

Les études retenues pour cette analyse bibliographique portent sur des travaux directement liés à la fertilité, aux organes de la reproduction et au développement fœtal ou péri-post natal. Nous avons écarté les travaux qui présentent l'effet des molécules sur la glande mammaire ou sur la prostate, en relation avec le développement de cancers hormonaux. La plupart de ces études concernent les rongeurs, quelques unes ayant toutefois été menées chez le Singe Aucune des études rapportées ne répond stricto sensu aux critères méthodologiques des essais habituellement exigés pour un médicament. Toutefois, certaines phases et/ou durées d'exposition s'en rapprochent. Enfin, la diversité des schémas posologiques complique l'interprétation et l'extrapolation des résultats à l'Homme. Quelques rares études ont été conservées malgré une voie non orale car elle maximalise les effets, ce qui présente un intérêt dans une optique de toxicologie.

### **V-2 Rappel historique**

Les premiers cas de toxicité liée aux phyto-estrogènes ont été mentionnés dans la littérature dès les années 50 après avoir constaté des phénomènes de stérilité et d'anomalies de l'appareil reproducteur dans des troupeaux de moutons situés dans des prairies riches en trèfles et en luzerne (Bennetts 1946). Les femelles non fécondées présentaient des hyper-sécrétions vaginales, une congestion de la muqueuse utérine et une sécrétion lactée. Des anomalies de la prostate étaient observées chez les mâles castrés et des anomalies de l'appareil reproducteur chez les jeunes mâles exposés *in utero*. De nombreuses études ont rapporté les effets d'autres phyto-estrogènes (isoflavones, coumestanes) sur la fertilité des herbivores, dont des anovulations et des altérations de la concentration en spermatozoïdes (Pelissero-Benettau, 1996, Hughes 1988). Des problèmes de fertilité et d'hépatotoxicité liés à l'ingestion d'isoflavones ont été décrits 40 ans plus tard sur des guépards en captivité et dont l'apport protéique était assuré par du soja (Setchell 1987). Depuis lors, des études expérimentales chez les rongeurs ont permis de confirmer et de corrélérer ces effets sur la fertilité à des effets estrogéniques dont les données, reprises dans de nombreuses revues (Verdeal 1979, Santti 1998), ont conduit à identifier de nouvelles molécules et leurs métabolites actifs sur la base de tests *in vitro* et *in vivo*.

## **V-3 Fertilité et développement de la fonction de reproduction**

### **V-3-1 Etudes *in vitro***

*In vitro*, la génisteine et la 8-prénylnaringénine ont été testées sur des **suspensions de spermatozoïdes normaux (capacited cells) ou altérés (uncapacited cells) de souris**. Ces deux molécules stimulent la réaction acrosomique, la capacitation spermatique ( $\geq 1$  nmol/L) et le potentiel fertilisateur des spermatozoïdes ( $\geq 100$  nmol/L) dans les suspensions de spermatozoïdes altérés, à des doses 1000 fois et 100 fois inférieures à celles de l'estradiol respectivement (Adeoya-Osiguwa 2003). Cependant, l'hydroxytamoxifène est incapable d'inhiber l'effet sur la réaction acrosomique et, dans les suspensions normales, seul l'estradiol est sans effet sur les paramètres précités. Aussi, les auteurs suggèrent que les effets des phyto-estrogènes passent par une voie indépendante des récepteurs aux estrogènes.



### V-3-2 Etudes chez le rongeur

Les études chez le rongeur ont permis de mettre en évidence l'importance de la période d'exposition aux phyto-estrogènes (isoflavones, coumestanes, lignanes) dans l'apparition d'effets sur la fertilité. Dans les études disponibles pour les lignanes et les coumestanes, les animaux ne sont parfois sacrifiés qu'après une période qui couvre les différentes phases de la vie de l'animal et il est donc plus difficile de conclure strictement quant à l'importance de la période d'exposition.

#### V-3-2-1 Données en fonction de la période d'exposition

- Plusieurs études montrent des effets lors d'une exposition *in utero*.

##### **Effet de la génistéine**

**Chez les mâles**, lorsque les rates sont exposées à de fortes doses de génistéine (20 à 200 mg/kg p.c./j) pendant la gestation, on observe une diminution de la distance anogénitale (Levy 1995). L'exposition des mères à un régime contenant de 5 à 1250 ppm [ $\approx$  0,5 à 125 mg/kg p.c.] conduit chez le nouveau-né, à la dose de 1250 ppm, à une diminution du poids de la prostate ventrale, à une spermatogenèse perturbée et diluée, et à un déficit des paramètres spermatiques.

**Chez les femelles**, l'étude de Lévy (1995) montre que l'exposition des mères à des doses de 20 à 200 mg/kg pc/j de génistéine conduit, dans leur descendance femelle, à un avancement de l'âge de la puberté. De même, Delclos (2001) montre que la descendance femelle des mères exposées à des doses de 5 à 1250 ppm ( $\approx$  0,5 à 125 mg/kg p.c./j) dans un régime semi-synthétique conduit à des cellules anormales dans les frottis vaginaux, des follicules anormaux, et une hyperplasie des alvéoles, et aux doses de 250 et 1250 ppm [ $\approx$  25 à 125 mg/kg pc/j] à une hyperplasie des glandes mammaires. En revanche, une exposition des mères à des doses fortes de génistéine (200 à 1000 ppm [ $\approx$  20 à 100 mg/kg pc/j]) entraîne une diminution générale du poids corporel, sans faire apparaître d'irrégularités des cycles ni d'altération histologiques de l'utérus (Masutomi, 2003).

Enfin, dans les deux sexes, Delclos (2001) observent, dès la dose de 250 ppm ( $\approx$  25 mg/kg pc /j), une augmentation du poids relatif de la glande pituitaire et une sévère minéralisation des tubules rénaux.

##### **Effet des lignanes**

L'action des molécules actives issues des lignanes (entérolactone, entérodol) ou d'extraits de plantes qui sont riches en précurseurs (comme le lin par exemple), a été aussi étudiée *in vivo* et aux stades précoces de la vie. Administrés ***in utero* ou pendant la lactation** (5 à 10% du régime), des extraits de lin ou de précurseurs des lignanes de type sécoisolaricirésinol glycoside, exercent des effets de nature estrogénique qui se traduisent, **chez le jeune mâle** par une élévation du poids relatif de la prostate et des glandes sexuelles, et **chez la jeune femelle** par une augmentation du poids de l'utérus et des ovaires ainsi que de la durée des cycles (oestrus persistant) (Tou 1998).

- **Exposition néonatale**

##### **Effet des isoflavones (essentiellement la génistéine)**

**Chez les mâles**, une exposition à des doses inférieures à 5 mg/kg pc/j altère la spermatogenèse à la puberté et entraîne une diminution pondérale accompagnée d'une diminution de la FSH plasmatique et de la taille des testicules à l'âge adulte (Atanassova 2000). En revanche, Lewis (2003), à la dose de 1 mg/kg pc/j, ne trouvent pas d'effets sur les mâles. Une étude similaire à celle d'Atanassova, cette fois à des doses plus fortes (12,5 à 100 mg/kg pc/j) et avec un régime riche en produits dérivés du soja (qui apporte plus de 350 mg d'isoflavones/kg pc/j), ne rapporte pas non plus, à la puberté, d'effet sur la fertilité mâle (séparation du prépuce, taux sériques de testostérone, qualité spermatique, histopathologie des organes génitaux) mais uniquement une altération pondérale. De même, Lamartinière (1998), lors d'injections de doses pharmacologiques (500mg/kg/j) à des rats mâles

immatures (J16, J18 et J20) ne rapportent pas non plus d'effet sur les paramètres de fertilité mesurés (poids du corps, descente testiculaire).

Une étude récente a été menée chez la souris qui a reçu, **pendant les phases de gestation et de lactation**, des doses quotidiennes orales comparables à celles rencontrées dans l'alimentation humaine (de 0.1 à 10 mg/kg/j de génistéine). Cette étude, ne conclut à aucun effet significatif sur le nombre ou la mobilité des spermatozoïdes des mâles issus des femelles traitées, examinés 105 et 305 jours après la naissance (Fielden 2003). L'expression de gènes testiculaires examinée par PCR n'est pas modifiée comparativement à ce qui est décrit avec le DES. Il n'apparaît pas non plus de modification du poids corporel des rats à la naissance, ni de la distance ano-génitale ou du poids des testicules ou vésicules séminales. *In vitro*, le potentiel fertilisant du sperme de l'épididyme est augmenté significativement à la dose la plus forte.

Ces conclusions rejoignent celles d'une étude précédente (Kang 2002) conduite chez des rats recevant par gavage de la génistéine à raison de 0,4 ou 4 mg/kg/j pendant les phases de gestation et de lactation. L'administration orale de génistéine à des doses allant de 12,5 à 100 mg/kg p.c. des Jours 1 à 5 en post-natal, n'entraîne pas d'effet sur le développement et la fertilité des animaux (Nagao 2001).

**Chez les femelles**, dans cette même étude de Nagao (2001), des doses de génistéine supérieures à 12,5 mg/kg pc/j entraînent une altération histologique des ovaires et de l'utérus, ainsi qu'une irrégularité des cycles avec réduction significative de la fertilité, sans modification de la date d'ouverture vaginale. A la dose de 1 mg/kg pc/j, des effets similaires à ceux observés dans l'étude de Nagao (2001) sont observés, avec également un avancement de la date d'ouverture vaginale identique à celui induit par l'estradiol (Kouki 2003, Lewis 2003). En revanche, l'étude de Lamartinière *et al.* (1998), lors d'injections de doses pharmacologiques de génistéine (500mg/kg pc/j), à des rats femelles immatures (J16J18 et J20) ne rapporte aucun effet sur les paramètres de fertilité mesurés (poids du corps, distance anogénitale, ouverture vaginale, durée des cycles, développement folliculaire), mais uniquement un effet sur le développement de canaux mammaires. L'absence d'effet, notamment sur le poids des petits à la naissance, la taille des portées, la répartition par sexe, la distance ano-génitale, l'ouverture vaginale, est également rapportée par Kang (2002) à des doses orales allant jusqu'à 4 mg/kg/j pendant la gestation et la lactation. Par contre, à la dose forte de 500 mg/kg p.c./j administrée par Lamartinière (1998), une exposition plus précoce (jours 2, 4 et 6 après la naissance) entraîne une réduction significative du poids de l'utérus à J21 et J50, du taux plasmatique de progestérone et du nombre de corps jaunes.

#### **Effet des coumestanes**

**Chez les mâles**, une exposition de la mère au coumestrol, en période de lactation (1-10 jours post-natal), *via* une exposition des mères à un régime riche en phyto-estrogènes (100 mg/kg d'aliment), entraîne une perturbation des fonctions et du comportement sexuel chez les rats mâles. Une exposition plus prolongée (1-21 jours post-natal) conduit à des effets identiques (Whitten 1995a).

**Chez les femelles**, une étude effet-dose menée avec le coumestane (0,001 à 100 µg/jour s.c.) lors d'une exposition néonatale chez la souris (1-5 jours post natal), fait apparaître des altérations : ouverture précoce du vagin, anomalies des organes de la reproduction à toutes les doses et absence de corps jaune à 100 µg/j (Burroughs 1990). A cette même dose de 100 µg/j injectée des jours 10 à 14 en post natal chez la rate, Medlock 1995) rapportent une altération du développement de l'utérus. Une exposition plus prolongée chez la rate (1-21 jours en post-natal) conduit à un œstrus permanent (Whitten 1993). L'exposition directe après sevrage (21-24 jours post-natal) *via* un aliment contenant 100 mg/kg de phyto-estrogènes entraîne une augmentation du poids de l'utérus et de l'expression des récepteurs à la progestérone (Whitten 1992). En revanche, l'exposition au coumestane, lors de la lactation (1-10 jours en post-natal), *via* une alimentation des mères riche en phyto-

estrogènes (100 mg/kg d'aliment), n'entraîne pas d'effet chez les rates (Whitten 1993) Les effets observés pourraient dépendre de la dose ou du phyto-estrogène considéré, puisque cette même étude rapporte qu'une exposition de rats femelles au coumestane pendant la lactation (1-21 jours en post-natal) et *via* une alimentation des mères riche en phyto-estrogènes (100 mg/kg d'aliment), entraîne des anovulations prématurées (Whitten 1993).

➤ **Exposition strictement pubertaire :**

Il y a peu de données expérimentales sur une exposition strictement limitée à la période pubertaire. Lorsque des rats mâles, issus de femelles nourries avec un régime totalement dépourvu de phyto-estrogènes pendant leur gestation et la lactation, ont été gavés avec de la génistéine (250 et 1000 mg/kg de régime) du sevrage (J21) à J 35, aucun effet n'est observé sur le développement testiculaire, le poids et la morphologie des organes génitaux, ni sur l'expression des récepteurs AR et EGFR ou des kinases, contrairement à ce qui est observé avec le DES à 75µ/kg de régime/j (Fritz 2003).

Des souris mâles issus de femelles nourries avec un régime totalement dépourvu de phyto-estrogènes pendant leur gestation et la lactation, ont été gavés avec de la génistéine (2.5 et 5 mg/kg pc/j) à partir du sevrage (J21) mais pendant 5 semaines. Aucun effet n'a été observé sur le poids des organes génitaux, mais les taux spermatiques dans l'épididyme sont fortement diminués et la mobilité spermatique est augmentée chez les animaux exposés. Au niveau cellulaire, l'exposition à la génistéine entraîne des hyperplasies des cellules de Leidig et augmente le taux de fibroblastes interstitiels dans l'épididyme. Même si les dommages sont moins élevés qu'avec l'estradiol (7.5 µg/kg pc/j), ces travaux montrent qu'une exposition à la génistéine en période juvénile peut altérer les paramètres de la reproduction chez la souris mâle (Lee 2004).

Les effets de la génistéine lors d'une exposition pubertaire semblent donc varier selon les modèles animaux et/ou la durée de l'exposition, mais des effets délétères ne peuvent être écartés.

➤ **Exposition strictement à l'âge adulte**

***Effet des isoflavones***

Chez les mâles, une exposition à l'âge adulte ne semble pas avoir de conséquences majeures (Known 2001, Faqi 2004). Toutefois, des souris ont été exposées à différents rapports de génistéine/daïdzéine correspondant à une dose d'isoflavones de 40 mg/kg pendant 16 semaines (Cline 2004). Pour un rapport de 10 génistéine/1 daïdzéine, des effets mineurs sont observés (atrophie des glandes annexes). Des rapports de 2G/1D ou 1G/10D conduisent à des effets plus importants (réduction de la testostérone plasmatique, atrophie de l'épithélium séminifère et des glandes sexuelles annexes, métaplasie des vésicules séminales). Okasaki (2002) ont mené une étude avec des doses pharmacologiques (120, 400 et 1000 mg/kg pc/j) pendant 28 jours sur des rats pubères âgés de 7 semaines. Les taux de prolactine sérique et le poids du foie sont fortement augmentés à la plus forte dose, mais aucun effet n'apparaît sur la fertilité. Enfin, Stroheker (2003a) montre qu'un régime riche en phyto-estrogènes (plus de 22% de protéines de soja soit environ 6mg pc/j de génistéine et 3 mg pc/g de daïdzéine) peut exercer des effets anti-androgéniques (test de Hergsberger) et altérer le développement des organes reproducteurs, ce qui laisse entrevoir des conséquences possibles sur le taux de fécondité.

Chez les femelles, des études récentes montrent qu'un régime riche en isoflavones (plus de 22% de protéines de soja) influe sur le développement des organes reproducteurs (Tansey 1998, Odum 2001, Degen 2002). Okasaki (2002) ont mené une étude avec des doses pharmacologiques (120, 400 et 1000 mg/kg pc/j) pendant 28 jours sur des rats pubères âgés de 7 semaines, qui montre des effets histologiques de type estrogénique apparaissant sur les tissus-cibles, dont une vacuolisation et une mucinification de l'épithélium vaginal aux deux fortes doses. L'étude de Cline (2004) ne montre pas d'effet pour le rapport 10 génistéine/1 daïdzéine, mais des effets majeurs aux rapport 2/1 ou 1/10 (endométriase, développement de l'utérus, kératinisation de l'épithélium vaginal, métaplasie de l'utérus).

## ➤ Exposition longue

### ***Effet de la génistéine***

Des travaux mentionnent des effets dans des conditions d'exposition plus longues.

**Chez le mâle**, Fritz (2002) montre, lors d'une exposition de la conception à l'âge adulte et à des doses fortes de génistéine (200 à 1000 ppm [ $\approx$  20 à 100 mg/kg pc/j ]), des modifications biochimiques qui devraient entraîner des modifications fonctionnelles de la prostate (réduction de l'expression des récepteurs aux androgènes et aux estrogènes de manière dose dépendante), mais sans observer d'altération pondérale ou morphologique du tractus génital. Plus récemment, l'équipe du Pr Jouannet (Eustache 2003) a étudié chez le rat mâle lors d'une exposition *in utero, néonatale et pubertaire*, l'effet des interactions entre des perturbateurs endocriniens estrogéniques et anti-androgéniques. Les animaux reçoivent par gavage, dès l'accouplement et jusqu'au sacrifice (J21), soit une dose de génistéine proche des conditions d'exposition alimentaire (1mg/kg/j, soit l'équivalent de 60 mg à 80 mg pour un homme adulte), soit une forte dose plus représentative d'une exposition pharmacologique (10 mg/kg pc /J). Les observations anatomiques et histologiques de l'appareil reproducteur à J21 montrent que la génistéine induit des anomalies du développement testiculaire, des vésicules séminales, des épидидymes et du pénis après des expositions dès la plus faible dose. La vinclozoline, utilisée comme anti-androgène, a également été administrée par gavage seule (1 ou 30 mg/kg/j) ou en présence de génistéine. Cette étude met en évidence un fort effet de synergie, la diminution générale des capacités de reproduction étant d'autant plus élevées que les molécules sont associées aux plus faibles doses

### ***Effet des lignanes***

**Chez les mâles**, un apport de lignanes (régime à 20 ou 40%) du début de la gestation au jour 70 post natal, conduit à une augmentation de la testostérone (régime 40%) et à une diminution du poids de la prostate chez le Rat (régime 20%), et à une augmentation significative du poids de l'épididyme caudal (20% et 40%) (Sprando 2000a et b) En revanche, à des doses plus faibles (régime à 10%, 177 mg de sécoisolaricrésinol/kg d'aliment) lors d'une exposition post natale des jours 1 à 132 chez le Rat, Ward (2001) n'observent pas d'effet. Ces données ne sont pas en accord avec celles de Tou (1999) qui observent une augmentation du poids de la prostate, des vésicules séminales et des testicules avec un régime et une période de traitement identiques. Ces résultats confirment ceux d'une étude antérieure (Tou 1998) conduite avec un régime à 10% distribué du premier jour de la gestation au 21<sup>ème</sup> jour en post natal.

**Chez les femelles**, Tou (1999) décrivent un retard de la puberté avec un régime à 5%, une puberté plus précoce au contraire avec le régime à 10%, ainsi qu'un prolongement de la phase d'oestrus et une augmentation du taux d'estradiol sérique .

### ***Effet des coumestanes***

**Chez les femelles** (rat), une exposition directe après sevrage jusqu'à l'âge adulte avancé (21-60 jours post-natal) *via* un aliment contenant 100 mg/kg entraîne une ouverture précoce du vagin avec irrégularité des cycles (Whitten 1992).

### **V-3-2-2 Modèle particulier**

D'autres travaux mentionnent des effets particuliers de phyto-estrogènes sur l'appareil reproducteurs. Ainsi, Cotroneo (2001) ont étudié les effets de la génistéine sur des rates ovariectomisées. Les animaux ont reçu la génistéine, soit par voie sous cutanée (5, 16.6 ou 50  $\mu$ g/g p.c.), soit *via* l'aliment (250 ou 1000 mg/kg d'aliment). Les auteurs constatent que des doses « pharmacologiques » (à partir de 16.6  $\mu$ g/g s.c. et 1000 mg/kg d'aliment) induisent une endométriose. Pour autant, les auteurs constatent que les taux plasmatiques de génistéine sont proches (1380 et 1115 nM respectivement) après 16.6  $\mu$ g/g s.c. ( $\uparrow$  significative rapport poids utérus/poids corps) et 250 mg/kg d'aliment ( $\uparrow$  non significative) mais que la différence du rapport

poids utérus/poids corps est seulement significative après injection et qu'il apparaît, dans ce cas, 4 fois plus de forme libre de génistéine après injection.

### **V-3-3 Etudes chez le Primate**

#### **V-3-3-1 Fonction de reproduction**

Quelques études chez les primates permettent de préciser les effets des phyto-estrogènes .

Une étude réalisée chez le **singe marmoset** (n=30) montre qu'une consommation **néonatale** de préparation pour nourrisson à base de soja, équivalent à 1,6 - 3,5 mg/kg/j des jours 4-5 à 35-45, conduit à une diminution significative du taux sérique de testostérone (de 53 à 70%) et, paradoxalement, à une augmentation du nombre de cellules de Leydig (74%) sans modification des cellules germinales ou de Sertoli chez les jeunes mâles (Sharpe 2002). Pour les auteurs, cette consommation qui représente de 40 à 87% de la consommation de certains nourrissons appelle de sérieuses réserves quant à cette pratique au cours des 5 premiers mois de la vie.

**Chez le macaque** adulte (14F et 13M) recevant un régime à base de protéines de soja équivalent à 1,27 mg de génistéine et 0,42 mg de daidzéine/g de protéine, aucune modification significative des hormones dosées (thyroxine, SBG, déhydroépiandrosterone, estradiol, testostérone) et du poids des organes impliqués dans la fonction de reproduction (prostate, testicules, utérus), n'est observée à l'issue de 24 semaines de ce régime par rapport au régime sans soja. Au plan biochimique, une baisse significative du cholestérol total et des LDL+VLDL cholestérol est rapportée, alors que le LDL cholestérol est inchangé et que les triglycérides augmentent faiblement mais significativement chez le mâle, ce phénomène a déjà été observé par ce même auteur chez le singe cynomolgus pré-pubère (Anthony 1996).

Dans le cadre d'un essai croisé, Harrison (1999) ont administré à des **femelles macaques gestantes**, une dose de génistéine de 8.0 mg/kg (équivalent à 0.625 mg d'estradiol par jour d'après les auteurs), dose correspondant à ce que reçoivent certains nourrissons élevés avec des produit pédiatriques à base de soja (Fort 1990). L'administration débute le jour suivant le diagnostic de la gestation (différent selon les animaux) et se poursuit jusqu'au jour de la délivrance par césarienne à 155 jours de gestation. Une augmentation significative de l'estradiol est observée chez les animaux traités par rapport aux témoins. Ces augmentations concernent aussi bien la circulation périphérique (veines fémorales), que la circulation utéro-foeto-placentaire (veines utérines) ou ovarienne (veines utéro-ovariennes). Bien que non significatives, il apparaît également une augmentation de la progestérone, de l'estrone et de la DHEA-SO<sub>4</sub> dans le groupe génistéine versus témoin.

#### **V-3-3-2 Modèle particulier**

**Des femelles macaques ont été ovariectomisées à l'âge adulte** puis traitées pendant 6 mois avec des isoflavones, de l'estradiol ou un placebo (nature et dose à préciser). Au terme du traitement, des examens histologiques, morphométrique et immunohistochimiques ont été pratiqués sur l'endomètre et les glandes mammaires. Aucun effet de type estrogénique n'a été mis en évidence dans ces conditions expérimentales (Foth 2000).

A partir d'un modèle identique, Cline (2001) ont étudié les effets à long terme (5 semaines à 3 ans) des phyto-estrogènes de soja comparativement à l'estradiol conjugué d'origine équine (CEE), les estrogènes estérifiés, des progestagènes (acétate de médroxyprogestérone (MPA), acétate de nomégestrol, association CEE+MPA, tamoxifène, des SERMs et des androgènes). Les doses ont été définies sur la base des concentrations sériques habituellement observées chez la femme (à préciser). Des examens histologiques, morphométrique et immunohistochimiques ont été pratiqués sur l'endomètre et les glandes mammaires (prolifération cellulaire, expression des récepteurs alpha aux estrogènes ou des récepteurs à la progestérone. A des doses « diététiques » (à préciser), les phyto-estrogènes ne présentent pas d'effet estrogénique mais antagonisent les effets prolifératifs des estrogènes sur l'endomètre et les glandes mammaires.

### V-3-4 Etude chez l'Homme

Chez l'homme (mâle), une étude menée sur des volontaires (40 mg /kg/j) pendant 2 mois, n'a pas permis de déceler un effet sur les paramètres de fertilité (qualité spermatique, volume testiculaire, dosages sériques des hormones stéroïdiennes et gonadotropiques), (Mitchell 2001).

### V-4 Conclusion

Les effets des phyto-estrogènes sur la fonction de reproduction sont surtout documentés pour les isoflavones. La similarité structurale entre ces molécules et le 17 $\beta$ -estradiol, à l'origine de l'activité de certains phyto-estrogènes et de leur utilisation ciblée actuelle, a logiquement conduit à s'interroger sur les conséquences, en terme de sécurité, d'une consommation importante et régulière de ces composés sur la fonction de reproduction et le développement. Il existe certes des différences inter espèce, notamment en relation avec des différences de métabolisme, qui doivent conduire à pondérer certaines données expérimentales dans le cadre d'extrapolation à l'Homme. Toutefois, les données pharmacotoxicologiques abondantes sur l'estradiol permettent d'orienter les réflexions sur ces risques potentiels. Il convient de souligner que peu ou pas d'études ont été réalisées dans l'esprit des essais habituellement menés pour définir la marge de sécurité des médicaments. Certaines conclusions, faisant état d'absence d'effet délétère sur la fonction de reproduction, doivent par ailleurs être rapprochées des doses faibles utilisées et de l'absence de données de cinétiques, ne permettant pas d'associer les signes cliniques et les taux circulants de phyto-estrogènes.

Au vu des données expérimentales issues d'études menées chez les rongeurs ou le primate, les isoflavones se caractérisent par :

- Des effets sur les organes de reproduction mâle lors d'une exposition *in utero* ou néonatale avec des risques de féminisation pouvant se traduire par des phénomènes visibles sur la fertilité mâle dès la naissance (cryptorchidie) ou à la puberté (morphogénèse de la glande mammaire).
- Des effets sur les organes de reproduction femelle avec une diminution du temps d'ouverture du vagin et une augmentation du poids de l'utérus notamment.

Dans les deux cas, la notion d'exposition précoce est un élément qui favorise les effets des phyto-estrogènes et qui doit conduire à s'interroger sur les précautions à prendre chez la femme enceinte forte consommatrice de phyto-estrogènes, mais également chez le nourrisson alimenté avec des préparations à base de soja (cf chapitre « Préparations pour nourrissons »).

Les études conduites chez l'animal montrent, en particulier avec la génistéine, qu'une absence d'effet sur la fonction de reproduction peut être observée pour des doses quotidiennes allant jusqu'à 200 mg/kg chez le rat mâle adulte pendant 12 mois et 100 mg/kg chez la femelle, avec des séquences de traitement variables (gestation seule ou avec période de lactation). Cependant, d'autres études, là aussi réalisées de façon quasi exclusive avec la génistéine, montrent que des effets peuvent apparaître avec des doses de 8 mg/kg *per os* chez le singe et de l'ordre de 10 mg/kg chez le rat. Cette difficulté à tirer des conclusions quant à des effets-dose et à comparer à l'Homme découle probablement d'une différence de biodisponibilité entre espèce (cf chapitre « Biodisponibilité des phyto-estrogènes »), mais suggère fortement le fait que les réponses ne suivent pas une loi linéaire. Ce phénomène de réponse conduisant à des courbes effets-doses en U ou en cloche est déjà décrit pour d'autres xéno-estrogènes. Une des explications pourrait être l'aptitude des molécules à exercer des effets hormonaux qui seraient différents selon la dose. En tout état de cause, les conditions d'administration hétérogènes selon les études, ne permettent pas pour l'instant d'en tirer des conclusions formelles quant aux risques pour l'Homme, mais elles incitent fortement à la prudence vis-à-vis de deux populations à risques : celle de la femme enceinte et celle du nourrisson.

## VI- Autres effets hormonaux

### VI-1 Méthodologie

Les effets hormonaux qui sous-tendent souvent les effets sur la reproduction décrits ci-dessus doivent également être considérés dans le cadre d'une pharmacologie de sécurité. Ces effets sont essentiellement de type estrogénique (répertoriés dans le paragraphe précédent), mais d'autres effets peuvent également co-exister. Ces effets ont été répertoriés, par types de molécules (isoflavones, coumestranes, lignanes, etc... ) sur la base de tests *in vivo* et d'études mécanistiques tant *in vivo* qu'*in vitro*. Les isoflavones sont les phyto-estrogènes pour lesquels les données sont les plus fournies.

### VI-2 Isoflavones

Leurs effets hormonaux autres qu'estrogéniques peuvent être classés en quatre catégories : anti-estrogéniques, anti-androgéniques, anti-thyroïdiens et anti-gonadotropiques.

#### VI-2-1 Effets anti-estrogéniques

*In vivo*, les effets anti-estrogéniques des isoflavones sont parfois observés (Cline 1996). Des études *in vitro* montrent que les isoflavones peuvent agir sur les voies de synthèse des stéroïdes dont l'aromatase, et sont donc susceptibles d'exercer des effets anti-estrogéniques (Le Bail 2000).

#### VI-2-2 Effets anti-androgéniques :

*In vivo*, une exposition par une alimentation riche en phyto-estrogènes (600µg/kg d'aliment) modifie les paramètres androgéniques chez le rat après 5 semaines d'exposition: diminution du poids du corps et de la prostate, par rapport aux animaux nourris à un régime semi synthétique<sup>26</sup>. Ces effets s'accompagnent d'une diminution des taux plasmatiques d'androgènes mais aucun effet n'est observé sur le taux de LH ou celui d'estrogène, ni sur l'activité 5-alpha réductase prostatique (Weber 2001). Plus récemment, des tests ont confirmé que chez des rats mâles castrés, un régime contenant plus de 22% de protéines de soja exerçait un effet anti-androgénique (test de Hersberger<sup>27</sup>; Stroheker 2003a) Ces effets anti-androgéniques sont également décrits lorsque l'exposition en génistéine porte sur des animaux jeunes : une exposition pendant les phases de lactation et de gestation entraîne une chute de testostérone plasmatique qui s'accompagne d'une féminisation du tractus génital mâle (Wisniewski 2003).

*In vitro*, les résultats sont controversés. Des études montrent que les isoflavones peuvent supprimer la synthèse de glucocorticoïdes et stimuler la production d'androgènes dans des cultures de cellules de cortex surrénal, (Mesiano 1999). D'autres auteurs montrent qu'elles peuvent exercer des effets anti-androgéniques sur la prolifération cellulaire de lignées tumorales MDA MB 453 (AR + ; A-Screen) (Stroheker 2004).

#### VI-2-3 Effets anti-thyroïdiens:

Des cas de goitres thyroïdiens ont été rapportés depuis plus de 40 ans chez des enfants nourris au soja (Van 1959; Shepard 1960; Block 1961). Selon Divi (1996), les isoflavones pourraient se substituer aux hormones thyroïdiennes T3 et T4 dans les chaînes métaboliques qui conduisent à leur ioduration. Ce phénomène aboutit à des isoflavones mono- et di-iodurées qui peuvent entraîner une hypothyroïdie (voir chapitre « effets sur la thyroïde »).

Les cas cliniques rapportés chez les enfants (cf chapitres « Thyroïde » et « Préparations pour nourrissons ») ont conduit à rechercher chez l'animal d'éventuelles modifications des taux de thyroïde peroxydase (TPO) Une exposition *in utero* et jusqu'au jour 140 en post-natal chez le rat à des doses de génistéine de 0,34 à 39,9 mg/kg/j entraîne une diminution significative et dose-dépendante de la TPO, sans effet significatif sur le poids de la thyroïde et les concentrations hormonales (Chang 2000a et b). Chez le rat, un régime carencé en

<sup>26</sup> Régime semi-synthétique : régime dépourvu de soja et de légumineuses

<sup>27</sup> Test toxicologique de référence pour mettre en évidence un effet androgénique et/ou anti-androgénique *in vivo*

iode associé à un apport en isoflavones (0,04 à 0,2%) ou soja (20%) dans l'aliment pendant 5 semaines n'altère pas significativement la fonction thyroïdienne (Son 2001).

#### **VI-2-4 Activité anti-gonadotrope:**

L'activité anti-gonadotrope des phyto-estrogènes, notamment des isoflavones, a été rapportée chez la femelle pour **différentes espèces animales**, et en tout premier lieu les brebis, et depuis lors chez le rongeur et le singe (Whitten 1995a et b; Whitten et Naftolin F, 1999).

Chez les brebis, la perturbation de la LH par les isoflavones est vraisemblablement liée à une perturbation hypothalamique de la sécrétion de la LHRH (Findlay 1973). Cette diminution de LH est également retrouvée lors d'une ingestion de coumestrol (luzerne) pendant la période de reproduction active (Romanowicz 2004).

Chez les rongeurs, une exposition *in utero* ou néonatale d'isoflavones (à des doses extra-alimentaires, supérieures à 150 mg/kg pc/j) (Faber 1991), perturbe la sécrétion de LH à la puberté, notamment celle induite par la LHRH, et augmente le volume du noyau dimorphique sexuel de l'aire préoptique (SDN-POA). Chez des singes, si on bloque le pic de LH qui survient naturellement en phase néonatale chez les petits mâles, on observe des perturbations du système immunitaire (lymphocyte T CD4+), une diminution de la minéralisation osseuse, un hypo-développement testiculaire et une perturbation du comportement social et sexuel à la puberté (Mann 1989, 1993, 1994; Eisler 1993).

### **VI-3 Les coumestanes**

#### **VI-3-1 Effets estrogéniques**

**Chez la femelle**, O' Connor (2000) décrivent une augmentation de la base épithéliale et de la prolifération stromatique de l'utérus et du taux de prolactine sérique.

#### **VI-3-2 Effets anti-estrogéniques**

**In vivo chez la femelle**, une exposition pendant la période de lactation *via* un régime enrichi à 0,01% de coumestrol entraîne des effets anti-estrogéniques à l'âge adulte. Whitten (1993, 1995) observe, à 132 jours d'âge chez les seuls animaux traités, une anovulation, un oestrus persistant et une incapacité synthétiser de la LH suite à une injection d'oestradiol (Whitten 1993). Chez des jeunes animaux, une exposition alimentaire pendant 4 jours à 500 ppm de coumestrol précédant un test utérotrophique à l'estradiol entraîne une diminution du taux de récepteurs aux estrogènes qui peut être assimilée à un effet anti-estrogénique (Whitten 1995).

#### **VI-3-3 Effets hormonaux multiples**

**Chez le mâle** jeune traité pendant 15 jours, O'Connor (2000) décrit des effets à la fois anti-estrogéniques et anti-androgéniques : une diminution des taux sériques de testostérone, hydroxytestostérone et estradiol, et une augmentation des taux sériques de prolactine.

### **VI-4 les lignanes**

#### **VI-4-1 Effet estrogénique**

**In vivo**, sur la base du test utérotrophique, divers auteurs montrent que l'entérolactone est peu estrogénique (Dehennin 1982). Toutefois, elle stimule la sécrétion de la prolactine et induit la synthèse du récepteur à la progestérone, deux paramètres associés à un phénomène d'estrogénicité (Wang 2002).

**In vitro**, la molécule la plus étudiée est l'entérolactone. Sur la base du test de E-Screen, Mousavi (1992) ont confirmé l'effet estrogénique de l'entérolactone à des doses proches des taux sériques rencontrés chez l'Homme (0.5 à 2 µM). A ces mêmes concentrations, elle induit aussi la synthèse de pS2, une protéine tumorale régulée par le ER (Sathyamoorthy 1994). Par contre à plus forte dose (10µM), l'entérolactone inhibe la croissance des cellules, rappelant l'effet biphasique des isoflavones (Mousavi 1992). D'autres auteurs observent un phénomène similaire sur la synthèse de DNA mais à des doses plus élevées : stimulation à 10µM et inhibition à des doses supérieures à 50µM (Wang 1997, 1998). Ces mêmes auteurs



obtiennent à 10µM un effet synergique vis à vis de l'estradiol (0,02 nM). De plus, des tests de liaison au ER montrent que l'entérolactone est un faible agoniste (Mueller 2004).

#### **VI-4-2 Effet anti-estrogénique**

*In vitro*, l'entérolactone est décrite comme anti-estrogénique par son effet répresseur sur l'expression du récepteur ER (Waters 1982). En outre, à la dose de 0,02 nM, Mousavi et Aldercreutz (1992) observent un effet anti-estrogénique (diminution de la croissance induite par l'estradiol).

#### **VI-4-3 Effet hormonaux multiples**

L'entérolactone peut inhiber de manière compétitive l'aromatase humaine (Aldercreutz 1993, Wang 1994), se lier aux SHBG (Martin 1996; Schottner 1998) ou, à l'image de la génistéine, augmenter leurs taux plasmatiques (Aldercreutz 1987; Moussavi et Aldercreutz, 1993) et ainsi diminuer le taux d'hormones sexuelles libres.

#### **VI-5 Flavonoïdes : le cas de l'apigénine**

L'apigénine est un analogue flavonique de la génistéine auxquels les médicaments à base de plantes attribuent traditionnellement des propriétés contraceptives. Hiremath et al. (2000) ont également décrit expérimentalement des effets négatifs sur la fertilité (implantation embryonnaire). L'apigénine n'entraîne pas d'effets utéro-trophiques significatifs (les doses actuellement testées vont jusqu'à 200mg/kg/j (Stroheker 2003b), et n'a donc pas été retenue dans la liste des phyto-estrogènes (cf chapitre « Répertoire »). Cette molécule est toutefois présente dans le soja, en particulier dans les dicotylédones en réponse à une élicitation<sup>28</sup> (Boue 2003; Scuro 2004). Il n'existe actuellement aucune données *in vivo* mentionnant des effets interactifs entre l'apigénine et les isoflavones. Toutefois dans une optique de sécurité, les effets de cette molécule doivent être considérés comme des points d'alerte.

##### **VI-5-1 Effets *in vitro***

L'apigénine possède **des effets estrogéniques** 10 fois plus faibles que ceux décrits pour la génistéine (Miksicek 1995; Stroheker 2004). Elle possède également **un effet androgénique** en diminuant l'activité de la 5 α-réductase (Le bail 2000). Récemment, **des effets anti-androgéniques** comparables à ceux de la génistéine ont été décrits sur la base d'un test de prolifération cellulaire androgénodépendante (Stroheker 2004) et sur d'autres modèles cellulaires (Kuroyanagi 1999, Papiez 2002).

##### **VI-5-2 Effets *in vivo***

###### **- Effets estrogéniques**

Si l'on considère des paramètres plus sensibles que le test utéro-trophique, des effets estrogéniques de l'apigénine ont été démontrés : chez des rates immatures, des rates adultes ovariectomisées (Stroheker 2003b) ou chez la souris (Breinholt 2000) l'apigénine induit le récepteur ER dans l'utérus, et entraîne une cornification vaginale. Chez la rate immature ou adulte ovariectomisée, l'apigénine peut également interagir avec des doses non utéro-trophiques d'estradiol (100 mg/kg pc/j) pour induire une estrogénicité 10 à 100 fois plus forte que ce dernier (Stroheker 2003b). Cet effet potentialisateur est également obtenu à la plus faible dose de 5mg/kg pc/j lors d'une ingestion prolongée (21 jours). Cet effet n'est pas mis en évidence avec la génistéine. Enfin, cet effet s'accompagne d'une induction de l'expression des récepteurs aux estrogènes et à la progestérone (Gradolatto A., 2004, thèse; Canivenc-Lavier, communication personnelle ; travaux en cours de publication).

###### **- Effets anti-androgéniques**

Des effets anti-androgéniques sont également décrits *in vivo* avec l'apigénine au niveau des testicules chez le rat (Papiez 2002).

---

<sup>28</sup> Elicitation : stimulation traumatique (par un insecte, un couteau, ...)

## VI-6 Conclusion sur les autres effets hormonaux

Il ressort de cette analyse bibliographique que les phyto-estrogènes n'exercent pas seulement des effets de types estrogéniques. Des effets anti-estrogéniques, anti-androgéniques, anti-thyroïdiens et antigonadotropes sont également décrits. La pluralité de ces effets hormonaux amène à supposer qu'ils puissent être à l'origine des différences d'activités observées aux cours des différents stades de la vie.

## VII- Conclusion générale

La consommation de produits dérivés du soja, partie intégrante de l'alimentation traditionnelle dans les pays asiatiques, n'a pas conduit à recenser de risques particuliers de toxicité. Certains bénéfiques pour la santé ayant été rapportés dans ces populations, le principe d'un enrichissement de l'alimentation occidentale a été conseillé et/ou adopté par certains. Les isoflavones, composés phénoliques non stéroïdiens dont les effets estrogéniques ont été démontrés, seraient à l'origine des effets recherchés.

Toutefois, l'activité pharmacologique et le profil toxicologique de ces phyto-estrogènes isolés sont parfois différents d'un composé à l'autre. Ceux d'un totum<sup>29</sup> au sein d'une matrice végétale, comme par exemple le soja, peuvent également se comporter différemment dans l'organisme. Dans ces conditions, les données recueillies avec un phyto-estrogène isolé peuvent servir de base à une estimation de l'activité et/ou de la toxicité potentielle des phyto-estrogènes, mais ne peuvent en aucun cas documenter l'ensemble de ces phyto-estrogènes dont la diversité a été soulignée dans le chapitre « Répertoire ».

Les études de **toxicité par administration unique ou répétée** de phyto-estrogènes, n'ont pas mis en évidence de toxicité particulière de ces composés. Il convient toutefois de souligner que ces études ont deux limites :

- D'une part elles n'ont pas fait l'objet, le plus souvent, d'une évaluation parallèle des taux circulants de phyto-estrogènes.
- D'autre part, les quelques études qui le mentionnent font état de taux plasmatiques assez proches de ceux observés chez l'Homme lors de consommation alimentaire, alors qu'elles auraient dû être menées avec des doses qui assurent une exposition très supérieure à celle qui est communément observée chez l'Homme.

Les conclusions, en terme d'évaluation du potentiel toxique, s'en trouvent ainsi limitées. Une possibilité d'appréciation du potentiel toxique serait de s'appuyer sur les données largement disponibles pour le 17 $\beta$ -estradiol qui présente certaines similarités structurales avec les phyto-estrogènes. Au delà de l'équivalent d'une dose de génistéine de l'ordre de 1 mg/kg pc/j, calculée à partir d'une NOAEL chez le Rat, on ne peut considérer que l'usage chez l'Homme soit étayé par des données de toxicologie générale réglementaire.

Il apparaît que certains phyto-estrogènes ne sont pas dépourvus **d'effets génotoxiques**, et peuvent dans des conditions particulières conduire à des effets de type carcinogène. Leur profil n'est pas sensiblement différent de celui qui a été observé avec l'estradiol. En conséquence, les différences de profil d'activité entre estrogènes et phyto-estrogènes et l'existence, notamment, d'effet ambivalent de type estrogénique ou anti-estrogénique conduisent à s'interroger sur les risques de consommation des phyto-estrogènes dans des situations physio-pathologiques particulières comme l'existence de tumeurs hormono-dépendantes ou d'antécédents familiaux de cette nature. Des traitements concomitants à visée hormonale peuvent également interagir avec la prise de phyto-estrogènes, comme cela a été montré tant *in vitro* qu'*in vivo* avec le tamoxifène.

Les différences inter-espèces relatives au **métabolisme** des phyto-estrogènes et à la production d'équol en particulier, constituent un sujet d'interrogation quant à l'extrapolation des résultats observés chez le rongeur par rapport à l'Homme. Dans la mesure où il existe une grande variabilité interindividuelle humaine, notamment à cause de la capacité de certains sujets à produire de l'équol, on peut admettre que le rat présente une analogie avec la

---

<sup>29</sup> Totum : ensemble des constituants d'une plante contribuant à l'activité attribuée à cette plante

situation humaine. Cela pose toutefois la question du choix de la meilleure espèce et/ou du modèle pour l'étude de la toxicité des phyto-estrogènes et de la contribution spécifique de l'équol à la toxicité.

Des troubles de la **fertilité et de la fonction de reproduction** ont été initialement décrits chez la brebis ayant consommé du trèfle. La relation avec la présence de phyto-estrogènes a ensuite été établie.

Au-delà des spécificités des phyto-estrogènes qui expliquent leurs effets non hormonaux, la similarité structurale avec le  $17\beta$ -estradiol précédemment évoquée, conduit à s'interroger sur les effets potentiels des isoflavones sur la fonction de reproduction et le développement.

Les études les plus nombreuses ont été réalisées chez le rongeur; certaines d'entre elles utilisant la voie sous-cutanée qui court-circuite l'action de la flore digestive et l'effet de premier passage hépatique, deux événements essentiels dans l'action des phyto-estrogènes. Ce fait nous a donc conduit à limiter nos commentaires à quelques unes des études réalisées par voie sous-cutanée dans la mesure où l'exposition des animaux aux phytoestrogènes s'en trouvait augmentée, ce qui présente un intérêt dans l'évaluation d'un potentiel toxique. Les quelques études répertoriées chez le primate non humain par voie orale ont toutes été analysées, compte tenu de la similitude des réponses aux estrogènes en général, entre cette espèce et l'Homme.

Il existe donc des différences de réponse consécutives à la consommation des phyto-estrogènes, liées à l'espèce et à leurs particularités métaboliques ainsi qu'à la nature du phyto-estrogène. Ces considérations, ainsi que la diversité des schémas expérimentaux mis en œuvre chez l'animal, réduisent parfois la portée de ces études en regard de l'utilisation chez l'Homme. Il n'en demeure pas moins que certaines données doivent être considérées comme des signes d'alerte d'une toxicité potentielle qui pourrait s'exprimer chez des populations à risque, pour peu que les quantités globales de phyto-estrogènes consommés excèdent certaines doses ou soient consommées pendant des phases sensibles du développement. C'est le cas des périodes néo-natale et pré-pubertaire pour lesquelles les effets délétères des phyto-estrogènes sont les plus fréquemment rapportés. Ce fait est à souligner étant donné l'utilisation de préparations pour nourrissons à base de protéines de soja, à teneur élevée en isoflavones.

**Les interactions potentielles entre phyto-estrogènes et hormones thyroïdiennes** sont un autre motif d'interrogation qui doit justifier une attention toute particulière chez des sujets qui présenteraient des troubles de la fonction thyroïdienne.

D'une façon générale, la notion d'interaction entre phyto-estrogènes et traitements hormonaux n'est pas suffisamment documentée et le risque d'exacerbation ou de neutralisation de traitements concomitants doit faire l'objet d'études plus approfondies.

L'utilisation historique du soja ne peut, à elle seule, servir de garantie à la sécurité des phyto-estrogènes tant est grande la diversité de ces composés. Il a été montré, en particulier lors d'études de génotoxicité, que certains composés pouvaient exercer un effet mutagène alors que d'autres s'opposaient à ce même effet. Cela tend à démontrer qu'un ensemble de composés actifs au sein d'une matrice « naturelle » peut conduire à des effets différents de ceux des principes actifs pris isolément. Une autre étude montre que le rapport entre génistéine et daidzéine peut sensiblement modifier l'activité estrogénique et donc la toxicité de l'association.

On ne saurait donc admettre que la sécurité des isoflavones dans le soja ou celle de principes actifs isolés et plus largement étudiés (génistéine et daidzéine à un moindre degré) puissent servir de caution à d'autres phyto-estrogènes, notamment lorsqu'ils sont associés entre eux dans des proportions « originales » ou avec d'autres composés qui pourraient en modifier la biodisponibilité, le métabolisme, l'activité et, par voie de conséquence, la toxicité.

## Points clés et recommandations

### Points clés

- ❖ Il convient de souligner que la grande majorité des études qui ont fait l'objet d'un commentaire dans ce chapitre « Toxicité » concerne la génistéine et, à un degré sensiblement moindre, la daidzéine et le coumestrol.
- ❖ Les différences inter-espèces relatives au **métabolisme** des phyto-estrogènes et à la production d'équol en particulier, constituent un sujet d'interrogation quant au degré d'extrapolation des résultats observés chez le rongeur par rapport à l'Homme.
- ❖ Les études de **toxicité par administration unique ou réitérée**, qui recouvrent essentiellement la génistéine, n'ont pas mis en évidence de toxicité particulière. L'utilisation traditionnelle du soja dans les populations asiatiques, qui ne s'applique pas aux nourrissons, ne peut toutefois, à elle seule, servir de garantie à la sécurité des phyto-estrogènes tant est grande la diversité de ces composés.
- ❖ Le **profil génotoxique** de la génistéine n'est pas sensiblement différent de celui qui a été observé avec l'estradiol. Celui de la daidzéine est moins superposable, des effets anti-mutagènes ayant même été rapportés. Le coumestrol, la glycitéine, et la biochanine A ont également été étudiés ainsi que quatre métabolites de la daidzéine dont l'équol. Des effets génotoxiques dose dépendants ont été observés dans ce cas, à partir d'un test *in vitro* (lymphome de la souris). De tels effets ne sont pas confirmés chez des sujets malades (cancer de la prostate) recevant 300 à 600 mg/j de génistéine, daidzéine ou glycitéine pendant au moins 28 jours.
- ❖ L'existence, notamment, d'effet ambivalent de type estrogénique ou anti-estrogénique conduit à s'interroger sur les risques de consommation des phyto-estrogènes dans des situations physiopathologiques particulières comme l'existence de **tumeurs hormono-sensibles** ou d'antécédents familiaux de cette nature. Des traitements concomitants à visée hormonale peuvent également interagir avec la prise de phyto-estrogènes, comme cela a été montré tant *in vitro* qu'*in vivo* avec le tamoxifène.
- ❖ Les périodes **néo-natale et pré-pubertaire** pour lesquelles les effets délétères des phyto-estrogènes sur le développement et la maturation des organes sexuels sont les plus fréquemment rapportés constituent les périodes sensibles de risque lié à une consommation excessive de phyto-estrogènes. Cette remarque s'applique tout particulièrement aux préparations pour nourrissons à base de protéines de soja contenant des isoflavones.
- ❖ Les **interactions** potentielles entre phyto-estrogènes et hormones thyroïdiennes sont un autre motif d'interrogation qui doit justifier d'une attention toute particulière chez des sujets qui présenteraient des troubles de la fonction thyroïdienne.  
D'une façon générale, la notion d'interaction entre phyto-estrogènes et traitements hormonaux n'est pas suffisamment documentée et le risque d'exacerbation ou de neutralisation de traitements concomitants doit faire l'objet d'études plus approfondies.
- ❖ Il ne peut être exclu qu'une consommation élevée de phyto-estrogènes, notamment de composés « actifs » isolés ou associés à des doses ou dans des proportions différentes de celles de la matrice végétale naturelle, puisse être à l'origine d'effets indésirables. Cette remarque s'applique en particulier à des populations dites « à risque » (nourrissons, femmes enceintes, sujets avec troubles thyroïdiens ou tumeurs hormono-sensibles).

### Recommandations

#### 1- Recommandations à visée de connaissance et de recherche

##### **Toxicité générale :**

- il est nécessaire de développer des études conformes aux « recommandations médicament », comprenant 3 doses dont la plus élevée entraîne une symptomatologie du même type que celle que l'on peut observer chez le rat avec l'estradiol après 90 jours d'exposition à 0.05, 2.5, 10 et 50 ppm de régime. Cela permettrait de mieux situer la toxicité d'un phyto-estrogène (génistéine par exemple) par rapport à un estrogène largement utilisé par ailleurs et éventuellement d'établir un profil toxique parallèle.
- il serait bon d'envisager des études des ces molécules à faibles doses, à l'image de ce qui est entrepris pour les xéno-estrogènes puisque plusieurs expériences mentionnent des effets marqués aux faibles doses qui ne sont pas ou moins retrouvés aux fortes doses

- il convient de disposer d'études d'une durée de 6 mois, au moins sur une espèce dont le métabolisme est le plus proche de celui de l'Homme, puisque la durée des études devrait prendre en compte le fait que ces phyto-estrogènes sont destinés à être « consommés » pendant de longues périodes de la vie. Dans ces conditions, on estime que le rat n'est pas le modèle le plus pertinent pour des raisons **métaboliques**. Des études de toxicocinétique (TK) devront impérativement être menées pour relier la symptomatologie clinique et les modifications des paramètres hémato-biochimiques ou histologiques au degré de l'exposition sanguine.
- Compte tenu des particularités métaboliques du Rat chez lequel le plus grand nombre d'études a été réalisé et de l'existence de sujets « équal producteur » chez l'Homme, il conviendrait de mieux documenter la toxicité potentielle de ce métabolite. D'autres métabolites pourraient être considérés au cas par cas par ces approches.

#### **Effets hormonaux**

- Prendre en considération les **effets hormonaux multiples (anti-estrogénique, thyroïdiens...)** et les risques d'**interaction** entre phyto-estrogènes ou médicaments (anti-thyroïdiens, tamoxifène ou équivalent...)

## **2- Recommandations de santé publique :**

### **Données historiques de consommation.**

On ne saurait les remettre en cause en l'absence d'effets délétères spécifiques rapportés. Toutefois, il convient de rester vigilant quant aux extrapolations qui en seraient faites sur la consommation de compléments alimentaires : totum végétal contre produits purifiés et concentrés, « actifs » produits par synthèse, proportion de molécules actives différentes de celle des produits naturels, associations « potentialisatrices »

### **Toxicité générale**

En l'état actuel des connaissances, l'apport d'1mg/kg de poids corporel d'isoflavones en équivalents aglycones peut être considéré comme la dose limite administrable à l'Homme ayant fait l'objet d'études de sécurité chez l'animal conduisant à une dose sans effet indésirable. Ces données concernent plus spécifiquement la génistéine.

Il appartient donc aux industriels qui souhaiteraient aller au-delà de cette dose quotidienne d'isoflavones ou mettre sur le marché des associations « originales », d'apporter la preuve de l'innocuité de leur produit dans les conditions d'utilisation préconisées.

### **Génotoxicité**

Il convient de reconsidérer toute donnée de ce type pour des composés issus d'un procédé de synthèse pouvant générer des impuretés de synthèse ou de dégradation ainsi que pour les produits d'extraction mettant en oeuvre des solvants susceptibles de se retrouver à l'état de trace en tant que résidus.

### **Carcinogénicité**

Les études animales montrent que les isoflavones peuvent favoriser la prolifération et la croissance de tumeurs mammaires hormonodépendantes, suggérant un risque potentiel pour les personnes ayant des antécédents personnels ou familiaux de cancers du sein hormonodépendants.

### **Maturation des organes sexuels**

Les études animales montrent que les phases précoces du développement des organes sexuels (pendant la gestation et la lactation) sont particulièrement sensibles à l'exposition aux phyto-estrogènes. Des anomalies morphologiques pouvant entraîner une diminution de la fertilité mais aussi une plus grande sensibilité aux carcinogènes sont observées. Une précaution importante apparaît donc d'éviter chez la femme enceinte et allaitante une consommation élevée d'isoflavones, notamment sous la forme de compléments alimentaires. De même, la consommation de produits à base de soja chez le nourrisson (préparations à base de protéines de soja, puis lait de suite) et l'enfant en bas âge (tonyu, yaourt au soja) est à éviter.

### **Interactions hormonales**

L'interaction des phyto-estrogènes avec la synthèse des hormones thyroïdiennes commande l'exclusion de leur consommation sous quelque forme que ce soit par les sujets hypothyroïdiens traités ou non traités

Il existe aussi des risques d'interaction avec d'autres traitements hormonaux (par ex : tamoxifène) pouvant exacerber ou neutraliser ces traitements. La consommation de phyto-estrogènes devrait être également évitée dans ces situations.

**Tableau 1. Etudes de toxicité par administration orale réitérée**

Espèce	Voie	Substance	Durée	Dose (mg/kg/jour)	Paramètres/Résultats	Réf.
Rat SD 10/groupe -13 groupes	Orale (régime)	Proteines soja (farine 28%, concentré 22%, isolat 16%)	35-168-215-285 jours	11-39* mg/kg/j	↓ EVP, ↑ poids relatifs reins, foie, testicules (versus régime caséine).	Rackis 1979
Rat F344	Orale	Génistéine	52 sem.	12.5** mg/kg/j	Pas d'effets significatif.	Rao 1997
Rat SD 50M+50F/groupe	Orale	Proteines soja (21.8% composition) versus rég.caséine	22 mois	15 – 17*** mg/kg/j	PC, conso., organes/p.c., macro, micro, minéraux org, hématol., bioch. sanguine. Pas de différ. majeures entre régimes.	Anastasia 1990
Rat SD 6 à 12/dose/groupe	Orale (régime)	Génistéine (aglycone)	PN 42 Parents PN21-140 F1 G7-21 PN21-77	5-25-100-250-500-625 1250 ppm	PK, comportement, neurohistologie.	Slikker 2001
Rat Crj :CD 10M+10F/groupe 4 groupes	Orale	Génistéine	28 jours	0, 120, 400, 1000 mg/kg/j	PC, conso., organes/p.c., macro, micro, hématol., bioch. sanguine. NOAEL = 120 mg/kg/J	Okazaki 2002
Chien beagle M-F	Orale (capsules)	Isoflavones purifiées	90 jours	5-25-70 mg/kg/j (90% génistéine + 7% daidzéine) 10-50-140 mg/kg/j 43% génistéine + 21% daidzéine	Pas d'effets cliniques. ou histologiques significatifs.	NCI 1996

PN = post-natale et G = gestation

\* Sur la base de 2, 1 et 1 mg isoflavones/g de farine de soja, concentré ou isolat protéines de soja respectivement et d'une consommation de 36 g par jour pour des rats de 523 g en moyenne.

\*\* Base de conversion 1 ppm dans le régime correspond à 0.05 mg/kg P.C./j

\*\*\* Base 1mg isoflavone/g isolat, poids moyen 523 g (M) et 338 g (F), consommation quotidienne de 36 g et 27 g respectivement.

**Tableau 2. Etudes de « carcinogénicité »**

Espèce	Voie	Substance	Durée	Dose (mg/kg/jour)	Résultats	Réf.
Souris	Orale	Génistéine	22 sem	25 – 200*	↑ prolifération cellulaire, ↑ taille tumeurs (dose dépendante)	Ju 2001
Souris	Orale	Génistéine	29 sem	2.25 – 45**	Stimulation dose dépendante croissance tumeurs estrogéno dépendantes	Allred 2001
Souris	Sous cutanée	Génistéine	Néonatale J1 à J5	50	↑ poids utérus, prolifération anormale oviducte, absence corps jaune (18 mois), adénocarcinome uterin	Newbold 2001
Rat SD (50 M+50 F par groupe)	Orale	Protéines soja (21,8% vs caséine ou standard)	22 mois	15-17***	P.C., conso., organes/p.c., obsev. macro et micro, hématol., bioch. Sang, cont. minéral Pas de différence majeure entre régimes	Anastasia 1990
Rat	Orale	Gen, Daidz Glycitéine	2 sem 13 sem	0.16, 1.69 ou 4.28 0.11, 1.26 ou 2.91	Pas d'effets significatif	Appelt 1999

\*Dose estimée sur la base d'une consommation quotidienne de 4g pour un animal de 20 g.

\*\* Dose estimée à partir de la conversion 1 ppm dans l'aliment correspond à 0,15 mg/kg/j.

\*\*\* Base 1mg isoflavone/g isolat, poids moyen 523 g (M) et 338 g (F), consommation quotidienne de 36 g et 27 g respectivement.

**Tableau 3. Etudes sur la fonction de reproduction et le développement**

Phyto-estrogène	Dose/voie/durée	Espèce/souche	Effets observés	Remarques	Références
<b>Exposition <i>in utero</i></b>					
Génistéine	5 ou 25 mg/kg/j J16 à J20 gestation sous-cutanée.	Rat	Pas d'effet significatif sur l'effectif des portées mais poids des petits inférieurs à la dose forte.		Lévy 1995
Génistéine	0,1 – 1,5 mg/kg/j J15 à J20 gestation, sous-cutanée.	Rat	Pas d'effet significatif sur la fonction de reproduction.		Hilakivi-Clarke 1999
Génistéine	20 µg/j J15 à J20 gestation, sous-cutanée.	Souris	Pas d'effet significatif sur la fonction de reproduction mais développement mammaire et ouverture vaginale plus précoces.		Hilakivi-Clarke 1998
<b>Exposition néonatale (gestation et lactation)</b>					
Génistéine	500 mg/kg p.c./j) Post natal 2-4-6 jours. sous-cutanée P.N. 16-18-20 jours.	Rats (femelles)	↓ significative. poids utérus à J21 et 50, des concentrations plasmatiques progestérone et du nombre de corps jaunes. ↓ transitoire poids utérus uniquement.		Lamartinière 1998
Génistéine	2.5 - 25 mg/kg/j Gest.1- J21 Post part Orale	Rat	Pas d'effet significatif chez les femelles (mères et petits) ou les mâles. Dosage génistéine dans le sang, le lait et les glandes mammaires.	Concentr. serum dose forte (PN21) : génistéine totale 1.8 µM libre 0.1 µM	Fritz 1998
Génistéine	a) Néonatale 100 µg à 1 mg/petit/j, 3 jours Voie s.c. (adulte voir ci-après)	Souris mâles	a) augmentation de la sensibilité aux oestrogènes à l'âge adulte : seule la forte dose (~ 500 mg/kg/j) induit des malformations du tractus génital équivalentes à celles du DES.	a) seule les fortes doses sont actives au stade néonatal	Strauss 1998
Lignanes sécoisolaricirésinol Graine lin	1.5 mg/j Gestation à PN J21 5 à 10% dans aliment	Rat	Femelles : retard puberté (5%, séco) ou avance puberté (10%) Mâles : ↑ poids prostate et glandes annexes (10%)		Tou 1998
Génistéine,	0.02-0.1% génistéine (20-100 mg/kg/j *) Orale, 43 jours Gestation-lactation * base consommation 20g/200g	Rat S D	↑ distance anogénitale 2 sexes, ↑ poids absolu et relatif utérus chez les petits, ↓ temps ouverture vagin (100). ↓ gain pondéral et consommation alimentaire des mères et ↓ gain pondéral petits mâles (100).	Un aliment contenant 16mg de génistéine et 14 mg de daidzéine/100g aliment (soit 16 et 14 mg/kg p.c./j) n'entraîne aucun effet.	Casanova 1999
Génistéine	Exposition néonatale J2 à J18. 4mg/kg/j* * Dose équivalente à celle d'enfants recevant des jus de soja	Rat mâle Wistar	Spermatogenèse à la puberté (D18 à D25) Taille des testicules et fertilité (D90 à D100) Dans la plupart des cas, la génistéine n'altère pas la fertilité mâle, mais quelques animaux sont infertiles. Les animaux ayant reçu une alimentation soja-free ont des poids corporel et des poids de testicules supérieurs ainsi qu'un taux plasmatique de FSH plus faible.	La présence de soja ou de génistéine à cette période a des conséquences à court-terme (spermatogenèse pubertaire) et à long terme (poids du corps, taille des testicules, taux de FSH) sur les mâles	Atanassova 2000



**Tableau 3 (suite). Etudes sur la fonction de reproduction et le développement**

Phyto-estrogène	Dose/voie/durée	Espèce/souche	Effets observés	Remarques	Références
Préparation soja nourrissons (SFM)	1,6 à 3,5 mg/kg/j d'isoflavone. Néonatale (PN J4-J5 à PN J35- J45) orale	Singe marmoset mâle	Comparaison avec le lait de vache (SMA) SMA SMF Testostérone : 2,8-3,1 ng/ml 1,2-2,6 ng/ml Cell Leidig 100 175 Cell sertoli et cell germinales : pas d'effet Pas de dosage des gonadotropines	Faible effet mais courte exposition Cette exposition est environ 40% inférieure à celle de jeunes bébés nourris par ces SFM.	Sharpe 2002
Génistéine	12,5 – 25 – 50 (10. □ mg/kg/p.c./j orale J1 à J5 Post natal	Rat SD (Régime CE-2 Clea Japan)	Fonction reproductive après la puberté - Diminution du poids corporel (4 doses), - Pas d'effet sur l'ouverture vaginale ou sur la séparation du prépuce - Fertilité mâle non affectée, taux sériques testostérone et qualité spermatique non perturbés, pas d'altération histologique des gonades. - Fertilité femelle affectée (100) : irrégularité des cycles, histopathologie des ovaires et de l'utérus.	Ces résultats ne concordent pas avec ceux d'autres études. Cela pourrait provenir du fait que le régime utilisé contient plus de 350 mg d'isoflavones	Nagao 2001
Génistéine (contre DES)	4-40, s.c. puis orale 10µg/kg Naissance à PN J21	Rat	↑ poids utérus, ↓ temps ouverture vagin, estrus permanent, ↓ progestérone.		Delclos 2001
Génistéine contre E2	0.4 – 4 mg/kg p.c. 10 µg/kg orale Gestation + lactation	Rat	RAS sur poids des petits, effectifs et sexes des portées, organes de la reproduction, distance ano- génitale, ouverture vaginale, motilité et taux sperme		Kang 2002
Génistéine Daidzéine E2	1mg/kg/j dans l'huile de sésame expo néonate : J1 à J5 100µg/kg/j	Rat Wistar femelle	Ouverture vaginale : D et Tém : J35 ; G et E2 :J28 Cycles : Tém : 4j ; E2 : persistent oestrus ; G : 3 oestrus persistants et 6 oestrus prolongés D : 10 cycles normaux et 2 oestrus prolongés Absence de lutéus avec les trois molécules.	Follicules de Graaf maintenus	Kouki 2003
Génistéine	0.2 ou 4 mg/kg p.c./j s.c., PND 1-6 4 ou 40 mg/kg p.c./j orale, PN J7- J21.	Rat Alderley Park a)mères allaitantes → expo néonatale, per os (lactation) b) petits, sc et po.	Dosage des « résidus » dans le sérum et dans le lait pendant 5 jours. Développement post natal (J22) : effets seulement à la forte dose chez femelles : Poids utérus x 2 et cornification persistante ; Ouverture vaginale avancée de 4 jours ; taux de progestérone sang divisé par 2. Pas d'effet chez mâles (prépuce, pds testicules).	La voie s.c. conduit à des taux plasmatiques de génistéine identiques à ceux obtenus par voie orale.	Lewis 2003
Génistéine	Génistéine, Daidzéine (10,2 et 8,7mg/100g) dans l'aliment Gestation 3 à PN J21 Gen : 20, 200 et 1000 ppm, G15 à PN J10	Rat SD	Irrégularité des cycles à forte dose. Altération histopathologiques de l'utérus et de l'hypophyse antérieure.	Pas d'effets aux faibles doses	Masutomi 2003

**Tableau 3 (suite). Etudes sur la fonction de reproduction et le développement**

Phyto-estrogène	Dose/voie/durée	Espèce/souche	Effets observés	Remarques	Références
Génistéine	0.1-0.5-2.5-10 mg/kg/j orale Gestation + lactation	Souris	Absence d'effet à PND 105 et 315 : distance ano-génitale, poids vésicules séminales et testicules, motilité spermatique, expression des gènes.		Fielden 2003
Coumestrol	0.001-100 µg/J PN J1- J5, s.c.	Souris	Ouverture vaginale avancée, anomalies organes reproduction (2 doses). Absence de corps jaune (dose forte)		Burroughs 1990
Coumestrol	100 mg/kg aliment PN J1- J21	Rat	Cycles irréguliers et oestrus permanent		Whitten 1993
Coumestrol	100 mg/kg aliment PN J1- J10 PN J1- J21	Rat	↓ comportement sexuel chez le mâle, RAS femelle. ↓ comport. sexuel chez le M, oestrus permanent F.		Whitten 1995
Equol	10,100, 1000 µg/j PN J1- J5, s.c.	Rat femelle	↓ transitoire poids relatif utérus à PND 25 (dose forte), non observé à PND 60.		Medlock 1995
<b>Exposition au stade immature</b>					
Genistéine contre DES	250-1000mg/kg alim. 75 µg/kg aliment. Post natal J21-J35		RAS poids testicules, testostérone., Andro-R, EGFR, kinases 1-2, morphologie et apoptose des tubules séminifères	Exposition d'animaux immatures	Fritz 2003
Coumestrol	100 mg/kg aliment PN J21-J24	Rat	↑ poids utérus et des récepteurs progestérone.	Exposition courte durée animaux immature	Whitten Naftolin 1992
Génistéine	25,50,100 et 200mg/kg ; + ou - estradiol (45µ/Kg/J) J21- J24	Rats wistar	Analyse à J 24 : ↑ poids utérus et cornification vaginale intense dès 100mg/kg ouverture vaginale à 200mg/kg/j pas d'interaction avec l'oestradiol	Régime soy free	Stroheker 2003b
<b>Exposition chez l'adulte</b>					
Génistéine	375 à 750 mg/kg aliment, PN J30-J44	Rat SD femelle	Absence d'effet sur l'utérus de ces animaux pré pubères mais pas adulte	Génistéine sérique (750) autre groupe totale = 2.2 µmol/l, libre 0.4	Santell 1997
Génistéine, Daidzéine	200 g isolat protéine soja/kg aliment (≈ 1.7 mg isoflavon./g) 6 mois	Singe rhésus adulte mâle et femelle	Absence d'effet sur la fonction de reproduction, thyroxine, SHBG, DHEAS, estradiol, poids utérus, testostérone, poids testicules et prostate		Anthony 1996
Génistéine	b) adulte : 0,025 à 2.5 mg/kg p.c.x 9 jours Voie s.c.  c) adulte castré: 0.025 0.25 - 2.5 mg/kg p.c. Voie s.c. 10 jours	Souris mâles	b) réduction de la taille des testicules, de la testostérone sérique, de la LH pituitaire et du poids de la prostate à la plus forte dose.  c) Induction du <i>c-fos</i> mRNA métaplasie épithéliale des canaux péri urétraux.	b) seule les fortes doses sont actives au stade néonatal  c) effets obtenus à des doses parfois rencontrées dans l'alimentation humaine.	Strauss 1998

**Tableau 3 (suite). Etudes sur la fonction de reproduction et le développement**

Phyto-estrogène	Dose/voie/durée	Espèce/souche	Effets observés	Remarques	Références
Génistéine	250 à 1000 mg/kg aliment ou 5,16.6 ou 50µg/g p.c. s.c. 3 semaines	Rat SD femelle ovariectomisée	Activité estrogénique (endométriase) des doses « pharmacologiques » par voie s.c. mais pas « diététiques » <i>per os</i>	Dosage de la génistéine sérique totale et libre : 450 à 5090 nM <i>per os</i> et 1115 à 2031 nM s.c. (forme libre).	Cotronéo Lamartinière 2001
Isoflavones (génistin et daidzin majeures)	600 mg/kg d'aliment PN J50, 5 semaines	Rat SD mâle	Phyto-estrogènes plasmatiques x35 / témoins ↓↓ poids du corps et de la prostate ↓↓ plasmatique testostérone et androstène dione 5α-réductase, LH et estradiol : non affectées StAR testiculaire non affecté.	Exposition longue durée	Weber 2001
Genisteine, daidzeine	300 mg/kg/j pendant 9 semaines	Rats Wistar mâles âgés de 6 semaines	Poids du corps ↓ mais celui de la prostate varie peu Morphologie et pathologie des organes Androgènes sériques Isoflavones intraprostatiques	Exposition longue durée	Known 2001
génisteine	100 mg/kg ; + ou – estradiol (100µ/Kg/J) 4 jours	Rats wistar de 8 semaines ovariectomisés	Analyse ) pas d'effet sur le poids utérus administrée seule Pas de synergie significative avec l'oestradiol	Régime soy free	Stroheker 2003b
<b>Exposition longue durée</b>					
Génistéine	5 mg/kg régime (≈ 0.2 mg/kg p.c./j) J17 gestat. à PN J70	Rat	↓ significative poids des ovaires et utérus, des concentr. plasmatiques estradiol et progestérone à J21 post natal. Non confirmé à J70.		Awoniyi 1998
Génistéine	25-250 ou 1250 ppm J7 gestat. à PN J77	Rat	↓ poids corporel, RAS sur reproduction et développement ↓ poids prostate, ↓ LH , ↓ testo sérique et testiculaire.		Ferguson 1998
Isoflavones soja	Régime à 0.7 – 1.2 ou 2.4% (équivalent 86, 144, 288 mg/kg p.c.) Orale, 95 jours Sevrage à Post part 7	Rat Wistar	Inflam vaginale, hyper et dyskératose (288), ↓ follicules ovariens (2 doses), ↑ cycle oestrus, ↑ poids absolu utérus, œdème stroma, hyperplasie endothéliale, infiltr. leucocyt et hémorragies, ouverture précoce vagin, ↓ croissance (288).	L'aliment standard contient de la farine et de l'huile de soja et de la farine d'alfalfa...	Gallo 1999
Génistéine	8 mg/kg, jusqu'à 155 jours de gestation	Singe rhésus femelle	↑ NS oestrone chez mères, ↑ estradiol sang des fœtus.	Risque de féminisation lors d'une exposition <i>in utero</i>	Harrison 1999
Lignanes Graines de lin	5 à 10% dans aliment Gestation J1 à PN J132	Rat	Femelles : retard puberté (5%) ou avance puberté, prolongement estrus, ↑ estradiol (10%) Mâles : ↑ poids prostate et glandes annexes, vésicules séminales, testicules (10%).		Tou 1999
Lignanes (Graines de lin)	20% à 40% dans l'aliment, J1 gestation à PN J70	Rat	↑ testostérone sérique (40%), ↓ poids prostate (20%).		Sprando 2000
Lignanes Equivalent sécoisolaricirésinol	10% dans l'aliment, (177 mg /kg aliment) PN J1 à PN J132	Rat	Absence d'effet		Ward 2001

**Tableau 3 (suite). Etudes sur la fonction de reproduction et le développement**

Phyto-estrogène	Dose/voie/durée	Espèce/souche	Effets observés	Remarques	Références
Coumestrol	100 mg/kg aliment PN J21- J60	Rat	Ouverture vaginale avancée, irrégularité du cycle.	Exposition longue durée	Whitten et Naftolin 1992
<b>Génistéine</b>	5,100, 500 ppm (0.4-8- 40 mg/kg/j), PN J42 F0 à PN J22 F3 Orale, 4 générations	<b>Rat SD</b>	<b>Pas d'effet significatif.</b>		Flynn 2000
<b>Génistéine</b>	0, 500, 1000 ppm pendant 1 an	Truite	Accélération du développement testiculaire; Diminution de la qualité et de la motilité du sperme; Augmentation du taux de vittélogénine chez les femelles; Diminution du taux de testostérone au début de l'ovogenèse, du taux de fertilité, de la gamétogenèse	Pas d'effet sur la croissance générale	Bennetau-Pelissero 2001
Génistéine	0, 5, 25, 100, 250 625, 1250 ppm dans un régime (Gestation J7 à Post Natal J50)	Rat SD femelle gestante	Développement des mâles - diminution de la prostate ventrale - spermatogenèse aberrantes et diluée dès 1250 ppm - déficit spermatique Développement des femelles : - Cellules anormales vagin - Follicules anormaux - Hyperplasie des alvéoles et ducts des glandes mammaires Points communs : - augmentation de la glande pituitaire - sévère minéralisation des tubes rénaux dès 250 ppm - ↓ gain pondéral et consommation alimentaire.	La génistéine produit des effets sur plusieurs tissus cibles des oestrogènes chez le mâle et chez la femelle La plupart des effets sont obtenus à partir de la dose de 250 ppm.	Delclos 2001
Génistéine	a) 25 et 250 mg/kg/j de la conception à J70 Post partum orale b) 250 et 1000 mg/kg/J de J56 à J70 orale	Rats mâles Sprague Dawley	a) diminution de l'expression du AR et des ER $\alpha$ et $\beta$ dans la prostate dorsale proportionnelle à la dose de traitement b) b) idem à l'âge adulte Pas d'altération pondérale ou morphologique du tractus génital	La diminution du nombre de récepteur est associée à une diminution de l'incidence du cancer de la prostate	Fritz 2002
Genistein+ daidzein	0,3 à 0,55 mg/kg (régime), 3 jours	Rats DA/Han (130g) Wistar	Estrogénisation de l'utérus et du vagin Poids des utérus témoin supérieurs à ceux qui ont reçu un régime estrogen-free		Degen 2002
Génistéine	120 - 400 1200 mg/kg/j orale 28 et 31 jours	Rats SD mâles et femelles	Cycles : ras Hormones sériques : prolactine ↑ mâles Poids des organes : foie ↑ mâles Epithélium vaginal : épaissement Analyse de spermes : pas d'effet	Aliment avec 100 ppm de phytoestrogènes (soit 10mg/kg/j)	Okazaki 2002
Daidzéine	250 ou 1000 ppm 2 sem pré-accoupl-D50 post-partum	Rat femelle	1000 : ↓ gain pondéral et consommation alimentaire, ↓ progestérone, 2 doses : ↓ NS poids ovaires, utérus, glandes mam. Ras sur fertilité, distance ano-génital petits, Dosages sanguins daidzéine et équol + lait+ glandes mammaires.	Pas d'effet majeur de doses supra physiologiques de daidzéine	Lamartinière 2002

**Tableau 3 (suite). Etudes sur la fonction de reproduction et le développement**

Phyto-estrogène	Dose/voie/durée	Espèce/souche	Effets observés	Remarques	Références
Génistéine	26 à 65 mg/kg (mères) ou 79 (petits) orale J1 Gest à PN 100	Rat	Pas d'effet significatif		You 2002
Genistéine (soja) 8-prenylnaringenin (houblon)	Etude in vitro E2 : 10 µmol/l ; Gen et 8-PN 0,1µMol/l	Suspension de sperme de souris altérés (uncapacitated)	Stimulation de la capacitation spermatique: E2 : 1 µmol/l ; Gen et 8-NP : 1 nmol/l. Réaction acrosomique : seul E2 pas d'effet, Pas de sensibilité au tamoxifén Stimulation de la vitalité et de la fertilisation des spermatozoïdes : -2 fois plus d'oocytes fécondés.	Les phyto-estrogènes sont plus actifs que l'estradiol lui-même et n'agissent pas via les ER	Adeoya-Osiguwa 2003
Génistéine	1 et 30 mg/kg/j Exposition <i>in utero</i> , + néonatale + 2 générations	Rats Wistar	Cas de cryptorchidies et d'hypospadias à forte dose ↓ des paramètres spermatiques	Exposition à très long terme	Eustache.2003
Génistéine Equol	1mg/l 0.4-0.8 µg/l, Naissance à 100 jours	Caille	Féminisation des mâles avec l'équol.		Kiparissis 2003
Isoflavones (Génistéine 45%, daïdzéine 23%, glycitéine 4%)	200 ou 2000 mg/kg aliment, 10 semaines à 12 mois d'âge	Rat mâle	Absence de toxicité générale (RAS sur poids corporel), pas d'effet sur paramètres de fertilité et organes reproduction	Ces données chez le mâle diffèrent de ce qui est habituellement observé chez les femelles.	Faqui 2004
Isoflavones	Ratios variables de Génistéine/daïdzéine 40 mg aglycone/kg p.c. , 16 semaines	Souris	Ratio 10G/1D : Absence d'effet chez femelles, atrophie glandes sexuelles annexes chez mâle. Ratios 2G/1D ou 1G/10D : effet estrogénique puissant dans les 2 sexes		Cline 2004

J = Jours de traitement – PN = Post Natal – F = génération (F0 = parents)

## Références bibliographiques

- Adeoya-Osiguwa, S.A., Markoulaki, S., Pocock, V., Milligan, S.R., et al. (2003) 17beta-Estradiol and environmental estrogens significantly affect mammalian sperm function. *Hum Reprod*, 18, 100-7.
- Adlercreutz, C.H., Goldin, B.R., Gorbach, S.L., Hockerstedt, K.A., et al. (1995) Soybean phytoestrogen intake and cancer risk. *J Nutr*, 125, 757S-770S.
- Adlercreutz, H., Bannwart, C., Wahala, K., Makela, T., et al. (1993) Inhibition of human aromatase by mammalian lignans and isoflavonoid phytoestrogens. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 44, 147-53.
- Adlercreutz, H., Fotsis, T., Lampe, J., Wahala, K., et al. (1993) Quantitative determination of lignans and isoflavonoids in plasma of omnivorous and vegetarian women by isotope dilution gas chromatography-mass spectrometry. *Scand J Clin Lab Invest Suppl*, 215, 5-18.
- Adlercreutz, H., Hockerstedt, K., Bannwart, C., Bloigu, S., et al. (1987) Effect of dietary components, including lignans and phytoestrogens, on enterohepatic circulation and liver metabolism of estrogens and on sex hormone binding globulin (SHBG). *J Steroid Biochem*, 27, 1135-44.
- Allred, C.D., Allred, K.F., Ju, Y.H., Virant, S.M., et al. (2001) Soy diets containing varying amounts of genistein stimulate growth of estrogen-dependent (MCF-7) tumors in a dose-dependent manner. *Cancer Res*, 61, 5045-50.
- Anastasia, J.V., Braun, B.L., Smith, K.T. (1990) General and histopathological results of a two-year study of rats fed semi-purified diets containing casein and soya protein. *Food Chem Toxicol*, 28, 147-56.
- Anderson, D., Dobrzynska, M.M., Basaran, N. (1997) Effect of various genotoxins and reproductive toxins in human lymphocytes and sperm in the Comet assay. *Teratog Carcinog Mutagen*, 17, 29-43.
- Anthony, M.S., Clarkson, T.B., Hughes, C.L., Jr., Morgan, T.M., et al. (1996) Soybean isoflavones improve cardiovascular risk factors without affecting the reproductive system of peripubertal rhesus monkeys. *J Nutr*, 126,43-50.
- Appelt L.C., Reicks M.M. (1999) Soy induces phase II enzymes but does not inhibit dimethylbenz[*a*]anthracene-induced carcinogenesis in female rats. *J. Nutr.*, 129, 1820-26.
- Atanassova, N., McKinnell, C., Turner, K.J., Walker, M., et al. (2000) Comparative effects of neonatal exposure of male rats to potent and weak (environmental) estrogens on spermatogenesis at puberty and the relationship to adult testis size and fertility: evidence for stimulatory effects of low estrogen levels. *Endocrinology*, 141,3898-907.
- Awoniyi, CA, Roberts, D, Veeramachaneni, DN, Hurst, BS, Tucker, KE, Schlaff, WD. (1998) Reproductive sequelae in female rats after in utero and neonatal exposure to the phytoestrogen genistein. *Fertil Steril. Sep;70(3):440-7.*
- Bartholomew, R.M., Ryan, D.S. (1980) Lack of mutagenicity of some phytoestrogens in the salmonella/mammalian microsome assay. *Mutat Res*, 78, 317-21.
- Bennetau-Pelissero C, Breton B B, Bennetau B, Corraze G, Le Menn F, Davail-Cuisset B, Helou C, Kaushik SJ. (2001) Effect of genistein-enriched diets on the endocrine process of gametogenesis and on reproduction efficiency of the rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Gen Comp Endocrinol. Feb;121(2):173-87.*
- Pelissero-Bennetau C., 1996. Les phyto-œstrogènes : des œstrogènes naturels de l'environnement Ministère du Travail et des affaires Sociales, Direction Générale de la Santé. Rapport d'expertise (195 references)
- Bennetau-Pelissero C, Arnal-Schnebelen B., Lamothe V., Sauvart P. (2003) ELISA as a new method to measure genistein and daidzein in food and human fluids. *Food Chem. Toxicol.*, 82, 645-648.
- Bennetts, H., Underwood, E., Shier, F. (1946) A specific breeding problem of sheep on subterranean clover pastures in Western Austria. *Aust Vet*, 22, 2-12.
- Bloedon, L.T., Jeffcoat, A.R., Lopaczynski, W., Schell, M.J., et al. (2002) Safety and pharmacokinetics of purified soy isoflavones: single-dose administration to postmenopausal women. *Am J Clin Nutr*, 76, 1126-37.
- Blok, R. (1961) *Arch Biochem Biophys*, 93, 15-24.
- Bolt, H.M., Janning, P., Michna, H., Degen, G.H. (2001) Comparative assessment of endocrine modulators with oestrogenic activity: I. Definition of a hygiene-based margin of safety (HB MOS) for xeno-oestrogens against the background of European developments. *Arch Toxicol*, 74, 649-62.
- Boos G., Stopper H. (2000) Genotoxicity of several clinically used topoisomerase II inhibitors. *Toxicol. Lett.*, 116(1-2), 7-16.
- Boue, S.M., Carter-Wientjes, C.H., Shih, B.Y., Cleveland, T.E. (2003) Identification of flavone aglycones and glycosides in soybean pods by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A*, 991, 61-8.
- Breinholt V, Hossaini A, Svendsen GW, Brouwer C, Nielsen E. (2000) Estrogenic activity of flavonoids in mice. The importance of estrogen receptor distribution, metabolism and bioavailability. *Food Chem Toxicol. Jul;38(7):555-64*
- Brzezinski A., Debi A. (1999) Phytoestrogens: the "natural" selective estrogen receptor modulators? *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.*, 85, 47-51.
- Burroughs, C.D., Mills, K.T., Bern, H.A. (1990) Reproductive abnormalities in female mice exposed neonatally to various doses of coumestrol. *J Toxicol Environ Health*, 30, 105-22.
- Busby, M.G., Jeffcoat, A.R., Bloedon, L.T., Koch, M.A., et al. (2002) Clinical characteristics and pharmacokinetics of purified soy isoflavones: single-dose administration to healthy men. *Am J Clin Nutr*, 75, 126-36.
- Carter, M.W., Matrone, G., Smart, W.W., Jr. (1960) The effect of genistin and its aglycone on weight gain in the mouse. *Br J Nutr*, 14, 301-4.
- Casanova, M, You, L, Gaido, KW, Archibeque-Engle S, Janszen, DB, Heck, HA. (1999) Developmental effects of dietary phytoestrogens in Sprague-Dawley rats and interactions of genistein and daidzein with rat estrogen receptors alpha and beta in vitro. *Toxicol Sci. Oct;51(2):236-44.*
- Chang, HC, Churchwell, MI, Delclos, KB, Newbold, RR, Doerge, DR. (2000a) Mass spectrometric determination of Genistein tissue distribution in diet-exposed Sprague-Dawley rats. *J Nutr. Aug;130(8):1963-70.*

- Chang, H.C., Doerge, D.R. (2000b) Dietary genistein inactivates rat thyroid peroxidase in vivo without an apparent hypothyroid effect. *Toxicol Appl Pharmacol*, 168(3):244-52.
- Chen, Y.C., Inaba, M., Abe, N., Hirota, A. (2003) Antimutagenic activity of 8-hydroxyisoflavones and 6-hydroxydaidzein from soybean miso. *Biosci Biotechnol Biochem*, 67, 903-6.
- Cline, J.M., Franke, A.A., Register, T.C., Golden, D.L., et al. (2004) Effects of dietary isoflavone aglycones on the reproductive tract of male and female mice. *Toxicol Pathol*, 32, 91-9.
- Cline, J.M., Paschold, J.C., Anthony, M.S., Obasanjo, I.O., Adams, M.R. (1996) Effects of hormonal therapies and dietary soy phytoestrogens on vaginal cytology in surgically postmenopausal macaques. *Fertil Steril*, 65(5):1031-5.
- Cline, J.M., Soderqvist, G., Register, T.C., Williams, J.K., et al. (2001) Assessment of hormonally active agents in the reproductive tract of female nonhuman primates. *Toxicol Pathol*, 29, 84-90.
- Constantinou, A., Kiguchi, K., Huberman, E. (1990) Induction of differentiation and DNA strand breakage in human HL-60 and K-562 leukemia cells by genistein. *Cancer Res*, 50, 2618-24.
- Cos, P., De Bruyne, T., Apers, S., Vanden Berghe, D., et al. (2003) Phytoestrogens: recent developments. *Planta Med*, 69, 589-99.
- Cotroneo, M.S., Lamartiniere, C.A. (2001) Pharmacologic, but not dietary, genistein supports endometriosis in a rat model. *Toxicol Sci*, 61, 68-75.
- Degen, G.H., Janning, P., Diel, P., Bolt, H.M. (2002) Estrogenic isoflavones in rodent diets. *Toxicol Lett*, 128, 145-57.
- Dehennin, L., Reiffsteck, A., Jondet, M., Thibier, M. (1982) Identification and quantitative estimation of a lignan in human and bovine semen. *J Reprod Fertil*, 66, 305-9.
- Delclos, K.B., Bucci, T.J., Lomax, L.G., Latendresse, J.R., et al. (2001) Effects of dietary genistein exposure during development on male and female CD (Sprague-Dawley) rats. *Reprod Toxicol*, 15, 647-63.
- Di Virgilio, A.L., Iwami, K., Watjen, W., Kahl, R., et al. (2004) Genotoxicity of the isoflavones genistein, daidzein and equol in V79 cells. *Toxicol Lett*, 151, 151-62.
- Divi, R.L., Doerge, D.R. (1996) Inhibition of thyroid peroxidase by dietary flavonoids. *Chem Res Toxicol*, 9, 16-23.
- Domon, O.E., McGarrity, L.J., Bishop, M., Yoshioka, M., et al. (2001) Evaluation of the genotoxicity of the phytoestrogen, coumestrol, in AHH-1 TK(+/-) human lymphoblastoid cells. *Mutat Res*, 474, 129-37.
- Eisler JA, Tannenbaum PL, Mann DR, Wallen K. (1993) Neonatal testicular suppression with a GnRH agonist in rhesus monkeys: effects on adult endocrine function and behavior. *Horm Behav*. Dec;27(4):551-67.
- European Patent Application. EP 0135172 (1984) Method for treating osteoporosis. Osaka, Japan : Takeda Chemical Industries Ltd.
- Eustache, F., Lesaffre, C., Canivenc, M., Jouannet, P., et al. (2003) Effets d'une exposition à la vinchlozoline et à la génistéine de la gestation à l'âge adulte sur la fonction de reproduction du rat wistar mâle : protocole et résultats préliminaires. *Endocrinologie*, 13, 170-8.
- Faber, K.A., Hughes, C.L., Jr. (1991) The effect of neonatal exposure to diethylstilbestrol, genistein, and zearalenone on pituitary responsiveness and sexually dimorphic nucleus volume in the castrated adult rat. *Biol Reprod*, 45, 649-53.
- Faqi, A.S., Johnson, W.D., Morrissey, R.L., McCormick, D.L. (2004) Reproductive toxicity assessment of chronic dietary exposure to soy isoflavones in male rats. *Reprod Toxicol*, 18, 605-11.
- Ferguson SA, Flynn KM, Delclos KB, Newbold RR. (2000) Maternal and offspring toxicity but few sexually dimorphic behavioral alterations result from nonylphenol exposure. *Neurotoxicol Teratol*. Jul-Aug;22(4):583-91.
- Fielden, M.R., Samy, S.M., Chou, K.C., Zacharewski, T.R. (2003) Effect of human dietary exposure levels of genistein during gestation and lactation on long-term reproductive development and sperm quality in mice. *Food Chem Toxicol*, 41, 447-54.
- Findlay, J.K., Buckmaster, J.M., Chamley, W.A., Cumming, I.A., et al. (1973) Release of luteinizing hormone by oestradiol-17 and a gonadotrophin-releasing hormone in ewes affected with clover disease. *Neuroendocrinology*, 11, 57-66.
- Flynn KM, Ferguson SA, Delclos KB, Newbold RR. 2000 Effects of genistein exposure on sexually dimorphic behaviors in rats. *Toxicol Sci*. Jun;55(2):311-9.
- Fort, P., Moses, N., Fasano, M., Goldberg, T., Lifshitz, F. (1990) Breast and soy-formula feedings in early infancy and the prevalence of autoimmune thyroid disease in children. *J Am Coll Nutr*. Apr;9(2):164-7.
- Foster W.G., Younglai E.V., Boutross-Tadross O., Hughes C.L., Wade M.G. (2004) Mammary gland in Sprague-Dawley rats following treatment with an organochlorine mixture in utero and neonatal genistein
- Foth D, Cline JM, Romer T.(2000) [Effect of isoflavones on mammary gland and endometrium of postmenopausal macaques (*Macaca fascicularis*)] *Zentralbl Gynakol*.;122(2):96-102. [Article in German]
- Fritz WA, Cotroneo MS., Wang J, Eltoun IE, et Lamartinière CA. 2003. Dietary diethylstilbestrol but not genistein adversely affects rat testicular development. *Nutrient Interactions and Toxicity*, 2287-2293
- Fritz WA, Coward L, Wang J, Lamartiniere CA. (1998) Dietary genistein: perinatal mammary cancer prevention, bioavailability and toxicity testing in the rat. *Carcinogenesis*. Dec;19(12):2151-8.
- Fritz, W.A., Wang, J., Eltoun, I.E., Lamartiniere, C.A. (2002) Dietary genistein down-regulates androgen and estrogen receptor expression in the rat prostate. *Mol Cell Endocrinol*, 186, 89-99.
- Gallo, D., Cantelmo, F., Distefano, M., Ferlini, C., et al. (1999) Reproductive effects of dietary soy in female Wistar rats. *Food Chem Toxicol*, 37, 493-502.
- Gradolatto, A. (2004) Evaluation et identification du potentiel endocrinien d'un flavonoïde hydroxylé, l'apigénine, et comparaison à un perturbateur endocrinien reconnu, le Bisphénol A. Thèse de Doctorat des Sciences de la Vie et de la Santé de l'Université de Bourgogne.
- Harrison, R.M., Phillippi, P.P., Swan, K.F., Henson, M.C. (1999) Effect of genistein on steroid hormone production in the pregnant rhesus monkey. *Proc Soc Exp Biol Med*, 222, 78-84.
- Hartsook, E.W., Magruder, N.D. (1957) Actions of diethylstilbestrol in the albino rat. *Am J Physiol*, 190, 255-8.

- Hilakivi-Clarke, L., Clarke, R., Lippman, M.E. (1994) Perinatal factors increase breast cancer risk. *Breast Cancer Res Treat*, 31, 273-84.
- Hilakivi-Clarke, L., Clarke, R. (1998) Timing of dietary fat exposure and mammary tumorigenesis: role of estrogen receptor and protein kinase C activity. *Mol Cell Biochem*, 188, 5-12.
- Hilakivi-Clarke, L., Cho, E., Onojafe, I., Raygada, M., et al. (1999a) Maternal exposure to genistein during pregnancy increases carcinogen-induced mammary tumorigenesis in female rat offspring. *Oncol Rep*, 6, 1089-95.
- Hilakivi-Clarke, L., Clarke, R., Lippman, M. (1999b) The influence of maternal diet on breast cancer risk among female offspring. *Nutrition*, 15, 392-401.
- Hilakivi-Clarke, L., Onojafe, I., Raygada, M., Cho, E., et al. (1999c) Prepubertal exposure to zearalenone or genistein reduces mammary tumorigenesis. *Br J Cancer*, 80, 1682-8.
- Hilakivi-Clarke, L., Cho, E., Onojafe, I., Liao, D.J., et al. (2000) Maternal exposure to tamoxifen during pregnancy increases carcinogen-induced mammary tumorigenesis among female rat offspring. *Clin Cancer Res*, 6, 305-8.
- Hilakivi-Clarke, L., Cho, E., deAssis, S., Olivo, S., et al. (2001) Maternal and prepubertal diet, mammary development and breast cancer risk. *J Nutr*, 131, 154S-157S.
- Hilakivi-Clarke, L., Cho, E., Cabanes, A., DeAssis, S., et al. (2002) Dietary modulation of pregnancy estrogen levels and breast cancer risk among female rat offspring. *Clin Cancer Res*, 8, 3601-10.
- Hiremath, S.P., Badami, S., Hunasagatta, S.K., Patil, S.B. (2000) Antifertility and hormonal properties of flavones of *Striga orobanchioides*. *Eur J Pharmacol*, 391, 193-7.
- Hsieh, C.Y., Santell, R.C., Haslam, S.Z., Helferich, W.G. (1998) Estrogenic effects of genistein on the growth of estrogen receptor-positive human breast cancer (MCF-7) cells in vitro and in vivo. *Cancer Res*, 58, 3833-8.
- Hughes, C.L., Jr. (1988) Phytochemical mimicry of reproductive hormones and modulation of herbivore fertility by phytoestrogens. *Environ Health Perspect*, 78, 171-4.
- Ju, Y.H., Allred, C.D., Allred, K.F., Karko, K.L., et al. (2001) Physiological concentrations of dietary genistein dose-dependently stimulate growth of estrogen-dependent human breast cancer (MCF-7) tumors implanted in athymic nude mice. *J Nutr*, 131, 2957-62.
- Ju, Y.H., Doerge, D.R., Allred, K.F., Allred, C.D., et al. (2002) Dietary genistein negates the inhibitory effect of tamoxifen on growth of estrogen-dependent human breast cancer (MCF-7) cells implanted in athymic mice. *Cancer Res*, 62, 2474-7.
- Kang, K.S., Che, J.H., Lee, Y.S. (2002) Lack of adverse effects in the F1 offspring maternally exposed to genistein at human intake dose level. *Food Chem Toxicol*, 40, 43-51.
- Kiguchi, K., Constantinou, A.I., Huberman, E. (1990) Genistein-induced cell differentiation and protein-linked DNA strand breakage in human melanoma cells. *Cancer Commun*, 2, 271-7.
- Kiparissis, Y., Balch, G.C., Metcalfe, T.L., Metcalfe, C.D. (2003) Effects of the isoflavones genistein and equol on the gonadal development of Japanese medaka *Oryzias latipes*. *Environ Health Perspect*. Jul;111(9):1158-63.
- Knight D.C., Eden J.A. (1996) A review of the clinical effects of phytoestrogens. *Obstet. Gynecol.*, 87, 897-904.
- Known S.M. et al. (2001) *Yonsei Medical J.*, 42, 395-404.
- Kouki, T., Kishitake, M., Okamoto, M., Oosuka, I., et al. (2003) Effects of neonatal treatment with phytoestrogens, genistein and daidzein, on sex difference in female rat brain function: estrous cycle and lordosis. *Horm Behav*, 44, 140-5.
- Kulling, S.E., Metzler, M. (1997) Induction of micronuclei, DNA strand breaks and HPRT mutations in cultured Chinese hamster V79 cells by the phytoestrogen coumestrol. *Food Chem Toxicol*, 35, 605-13.
- Kulling, S.E., Rosenberg B., Jacobs B., Metzler, M. (1999) The phytoestrogens coumestrol and genistein induce structural chromosomal aberrations in cultured human peripheral lymphocytes. *Arch. Toxicol.*, 73, 50-54.
- Kulling, S.E., Lehmann, L., Metzler, M. (2002) Oxidative metabolism and genotoxic potential of major isoflavone phytoestrogens. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 777, 211-8.
- Kuroyanagi, M., Arakawa, T., Hirayama, Y., Hayashi, T. (1999) Antibacterial and antiandrogen flavonoids from *Sophora flavescens*. *J Nat Prod*, 62, 1595-9.
- Lamartiniere, C.A., Moore, J.B., Brown, N.M., Thompson, R., et al. (1995) Genistein suppresses mammary cancer in rats. *Carcinogenesis*, 16, 2833-40.
- Lamartiniere, C.A., Wang, J., Smith-Johnson, M., Eltoum, I.E. (2002) Daidzein: bioavailability, potential for reproductive toxicity, and breast cancer chemoprevention in female rats. *Toxicol Sci*, 65, 228-38.
- Lamartiniere, C.A., Zhang, J.X., Cotroneo, M.S. (1998) Genistein studies in rats: potential for breast cancer prevention and reproductive and developmental toxicity. *Am J Clin Nutr*, 68, 1400S-1405S.
- Le Bail, J.C., Champavier, Y., Chulia, A.J., Habrioux, G. (2000) Effects of phytoestrogens on aromatase, 3beta and 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase activities and human breast cancer cells. *Life Sci*, 66, 1281-91.
- Lee, B.J., Jung, E.Y., Yun, Y.W., Kang, J.K., et al. (2004) Effects of exposure to genistein during pubertal development on the reproductive system of male mice. *J Reprod Dev*, 50, 399-409.
- Levy, J.R., Faber, K.A., Ayyash, L., Hughes, C.L., Jr. (1995) The effect of prenatal exposure to the phytoestrogen genistein on sexual differentiation in rats. *Proc Soc Exp Biol Med*, 208, 60-6.
- Lewis, R.W., Brooks, N., Milburn, G.M., Soames, A., et al. (2003) The effects of the phytoestrogen genistein on the postnatal development of the rat. *Toxicol Sci*, 71, 74-83.
- Lieberman, S. (1996) Are the differences between estradiol and other estrogens, naturally occurring or synthetic, merely semantical? *J Clin Endocrinol Metab*, 81, 850-1.
- Martin, M.E., Haourigui, M., Pelissero, C., Benassayag, C., et al. (1996) Interactions between phytoestrogens and human sex steroid binding protein. *Life Sci*, 58, 429-36.



- Martin, P.M., Horwitz, K.B., Ryan, D.S., McGuire, W.L. (1978) Phytoestrogen interaction with estrogen receptors in human breast cancer cells. *Endocrinology*, 103, 1860-7.
- Mann DR, Ansari AA, Akinbami MA, Wallen K, Gould KG, McClure HM (1994) Neonatal treatment with luteinizing hormone-releasing hormone analogs alters peripheral lymphocyte subsets and cellular and humorally mediated immune responses in juvenile and adult male monkeys. *J Clin Endocrinol Metab*. 1994 Feb;78(2):292-8.
- Mann, DR, Akinbami, MA, Gould, KG, Tanner, JM, Wallen, K (1993) Neonatal treatment of male monkeys with a gonadotropin-releasing hormone agonist alters differentiation of central nervous system centers that regulate sexual and skeletal development. *J Clin Endocrinol Metab*. May;76(5):1319-24.
- Mann DR, Gould KG, Collins DC, Wallen K. (1989) Blockade of neonatal activation of the pituitary-testicular axis: effect on peripubertal luteinizing hormone and testosterone secretion and on testicular development in male monkeys. *J Clin Endocrinol Metab*. 1989 Mar;68(3):600-7.
- Masutomi, N., Shibutani, M., Takagi, H., Uneyama, C., et al. (2003) Impact of dietary exposure to methoxychlor, genistein, or diisononyl phthalate during the perinatal period on the development of the rat endocrine/reproductive systems in later life. *Toxicology*, 192, 149-70.
- Medlock, K.L., Branham, W.S., Sheehan, D.M. (1995) The effects of phytoestrogens on neonatal rat uterine growth and development. *Proc Soc Exp Biol Med*, 208, 307-13.
- Mesiano, S., Katz, S.L., Lee, J.Y., Jaffe, R.B. (1999) Phytoestrogens alter adrenocortical function: genistein and daidzein suppress glucocorticoid and stimulate androgen production by cultured adrenal cortical cells. *J Clin Endocrinol Metab*, 84, 2443-8.
- Messina, M.J., Persky, V., Setchell, K.D., Barnes, S. (1994) Soy intake and cancer risk: a review of the in vitro and in vivo data. *Nutr Cancer*, 21, 113-31.
- Miksicek RJ. (1995) Estrogenic flavonoids: structural requirements for biological activity *Proc Soc Exp Biol Med*. Jan;208(1):44-50.
- Miltyk, W., Craciunescu, C.N., Fischer, L., Jeffcoat, R.A., et al. (2003) Lack of significant genotoxicity of purified soy isoflavones (genistein, daidzein, and glycitein) in 20 patients with prostate cancer. *Am J Clin Nutr*, 77, 875-82.
- Misra, R.R., Hursting, S.D., Perkins, S.N., Sathyamoorthy, N., et al. (2002) Genotoxicity and carcinogenicity studies of soy isoflavones. *Int J Toxicol*, 21, 277-85.
- Mitchell JH, Duthie SJ, Collins AR. (2000) Effects of phytoestrogens on growth and DNA integrity in human prostate tumor cell lines: PC-3 and LNCaP *Nutr Cancer*. 2000;38(2):223-8.
- Mitchell, JH, Cawood, E, Kinniburgh, D, Provan, A, Collins, AR, Irvine, DS. (2001) Effect of a phytoestrogen food supplement on reproductive health in normal males *Clin Sci (Lond)*. Jun;100(6):613-8.
- Moggs JG, Ashby J, Tinwell H, Lim FL, Moore DJ, Kimber I, Orphanides G. (2004) The need to decide if all estrogens are intrinsically similar. *Environ Health Perspect*. Aug;112(11):1137-42.
- Mousavi, Y., Adlercreutz, H. (1992) Enterolactone and estradiol inhibit each other's proliferative effect on MCF-7 breast cancer cells in culture. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 41, 615-9.
- Mousavi, Y., Adlercreutz, H. (1993) Genistein is an effective stimulator of sex hormone-binding globulin production in hepatocarcinoma human liver cancer cells and suppresses proliferation of these cells in culture. *Steroids*, 58, 301-4.
- Mueller, S.O., Simon, S., Chae, K., Metzler, M., et al. (2004) Phytoestrogens and their human metabolites show distinct agonistic and antagonistic properties on estrogen receptor alpha (ERalpha) and ERbeta in human cells. *Toxicol Sci*, 80, 14-25.
- Nagao, T., Yoshimura, S., Saito, Y., Nakagomi, M., et al. (2001) Reproductive effects in male and female rats of neonatal exposure to genistein. *Reprod Toxicol*, 15, 399-411.
- National Cancer Institute, Chemoprevention Branch and Agent Development Committee (1996) Clinical Development plan: genistein. *J. Cell. Biochem.*, 26S, 114-126.
- Newbold, R.R., Banks, E.P., Bullock, B., Jefferson, W.N. (2001) Uterine adenocarcinoma in mice treated neonatally with genistein. *Cancer Res*, 61, 4325-8.
- O'Connor, JC, Davis, LG, Frame, SR, Cook, JC. (2000) Evaluation of a Tier I screening battery for detecting endocrine-active compounds (EACs) using the positive controls testosterone, coumestrol, progesterone, and RU486. *Toxicol Sci*. Apr;54(2):338-54
- Odum, J., Tinwell, H., Jones, K., Van Miller, J.P., et al. (2001) Effect of rodent diets on the sexual development of the rat. *Toxicol Sci*, 61, 115-27.
- Okazaki, K., Okazaki, S., Nakamura, H., Kitamura, Y., et al. (2002) A repeated 28-day oral dose toxicity study of genistein in rats, based on the 'Enhanced OECD Test Guideline 407' for screening endocrine-disrupting chemicals. *Arch Toxicol*, 76, 553-9.
- Papiez, M., Gancarczyk, M., Bilinska, B. (2002) The compounds from the hollyhock extract (*Althaea rosea* Cav. var. *nigra*) affect the aromatization in rat testicular cells in vivo and in vitro. *Folia Histochem Cytobiol*, 40, 353-9.
- Price, K.R., Fenwick, G.R. (1985) Naturally occurring oestrogens in foods--a review. *Food Addit Contam*, 2, 73-106.
- Rackis J.J., McGee J.E., Gumbmann M.R., Booth A.N. (1979) Effect of soy proteins containing trypsin inhibitors in long term feeding studies in rats. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 56, 162-168.
- Rao, C.V., Wang, C.X., Simi, B., Lubet, R., et al. (1997) Enhancement of experimental colon cancer by genistein. *Cancer Res*, 57, 3717-22.
- Record, I.R., Jannes, M., Dreosti, I.E., King, R.A. (1995) Induction of micronucleus formation in mouse splenocytes by the soy isoflavone genistein in vitro but not in vivo. *Food Chem Toxicol*, 33, 919-22.
- Romanowicz K, Misztal T, Barcikowski B. (2004) Genistein, a phytoestrogen, effectively modulates luteinizing hormone and prolactin secretion in ovariectomized ewes during seasonal anestrus *Neuroendocrinology*. Feb;79(2):73-81
- Santell R.C., Chang Y.C., Nair M.G., Helferich W.G. (1997) Dietary genistein exerts estrogenic effects upon the uterus, mammary gland and the hypothalamic/pituitary axis in rats. *J. Nutr.*, 127(2), 263-269.

- Santti, R., Makela, S., Strauss, L., Korkman, J., et al. (1998) Phytoestrogens: potential endocrine disruptors in males. *Toxicol Ind Health*, 14, 223-37.
- Sathyamoorthy, N., Wang, T.T., Phang, J.M. (1994) Stimulation of pS2 expression by diet-derived compounds. *Cancer Res*, 54, 957-61.
- Schmitt, E., Metzler, M., Jonas, R., Dekant, W., et al. (2003) Genotoxic activity of four metabolites of the soy isoflavone daidzein. *Mutat Res*, 542, 43-8.
- Schottner, M., Spiteller, G., Gansser, D. (1998) Lignans interfering with 5 alpha-dihydrotestosterone binding to human sex hormone-binding globulin. *J Nat Prod*, 61, 119-21.
- Scuro, L.S., Simioni, P.U., Grabriel, D.L., Saviani, E.E., et al. (2004) Suppression of nitric oxide production in mouse macrophages by soybean flavonoids accumulated in response to nitroprusside and fungal elicitation. *BMC Biochem*, 5, 5.
- Seike, N., Wanibuchi, H., Morimura, K., Wei, M., et al. (2003) Enhancement of lung carcinogenesis by nonylphenol and genistein in a F344 rat multiorgan carcinogenesis model. *Cancer Lett*, 192, 25-36.
- Setchell, K.D., Gosselin, S.J., Welsh, M.B., Johnston, J.O., et al. (1987) Dietary estrogens—a probable cause of infertility and liver disease in captive cheetahs. *Gastroenterology*, 93, 225-33.
- Sharpe, R.M., Martin, B., Morris, K., Greig, I., et al. (2002) Infant feeding with soy formula milk: effects on the testis and on blood testosterone levels in marmoset monkeys during the period of neonatal testicular activity. *Hum Reprod*, 17, 1692-703.
- Sheehan, D.M. (1998) Herbal medicines, phytoestrogens and toxicity: risk:benefit considerations. *Proc Soc Exp Biol Med*, 217, 379-85.
- Shepard, T. (1960) SANS TITRE. *New Eng J Med*, 262, 1099-103.
- Sierens, J., Hartley, J.A., Campbell, M.J., Leatham, A.J., et al. (2001) Effect of phytoestrogen and antioxidant supplementation on oxidative DNA damage assessed using the comet assay. *Mutat Res*, 485, 169-76.
- Snyder, R.D., Gillies, P.J. (2003) Reduction of genistein clastogenicity in Chinese hamster V79 cells by daidzein and other flavonoids. *Food Chem Toxicol*, 41, 1291-8.
- Son, H.Y., Nishikawa, A., Ikeda, T., Imazawa, T., Kimura, S., Hirose, M. (2001) Lack of effect of soy isoflavone on thyroid hyperplasia in rats receiving an iodine-deficient diet. *Jpn J Cancer Res*. Feb;92(2):103-8.
- Sprando, R.L., Collins, T.F., Black, T.N., Olejnik, N., et al. (2000b) The effect of maternal exposure to flaxseed on spermatogenesis in F(1) generation rats. *Food Chem Toxicol*, 38, 325-34.
- Sprando, R.L., Collins, T.F., Wiesenfeld, P., Babu, U.S., et al. (2000a) Testing the potential of flaxseed to affect spermatogenesis: morphometry. *Food Chem Toxicol*, 38, 887-92.
- Stob, M. (1983) Naturally occurring food toxicant: estrogens. IN: Rechnig, M. ed. *Handbook of naturally occurring food toxicant*. CRC Press, 81-100.
- Strauss, L., Santti, R., Saarinen, N., Streng, T., et al. (1998) Dietary phytoestrogens and their role in hormonally dependent disease. *Toxicol Lett*, 102-103, 349-54.
- Stroheker, T., Cabaton, N., Berges, R., Lamothe, V., et al. (2003a) Influence of dietary soy isoflavones on the accessory sex organs of the Wistar rat. *Food Chem Toxicol*, 41, 1175-83.
- Stroheker, T., Chagnon, M.C., Pinnert, M.F., Berges, R., Canivenc-Lavier, M.C. (2003b) Estrogenic effects of food packaging xenoestrogens and flavonoids in female Wistar rats: a comparative study. *Reproductive Toxicology*, 17, 421-432
- Stroheker, T., Picard, K., Lhuguenot, J.C., Canivenc-Lavier, M.C., et al. (2004) Steroid activities comparison of natural and food wrap compounds in human breast cancer cell lines. *Food Chem Toxicol*, 42, 887-97.
- Tansey, G., Hughes, C.L., Jr., Cline, J.M., Krummer, A., et al. (1998) Effects of dietary soybean estrogens on the reproductive tract in female rats. *Proc Soc Exp Biol Med*, 217, 340-4.
- Thigpen, J.E., Locklear, J., Haseman, J.K., Saunders, H., et al. (2001) Effects of the dietary phytoestrogens daidzein and genistein on the incidence of vulvar carcinomas in 129/J mice. *Cancer Detect Prev*, 25, 527-32.
- Tou, J.C., Chen, J., Thompson, L.U. (1998) Flaxseed and its lignan precursor, secoisolariciresinol diglycoside, affect pregnancy outcome and reproductive development in rats. *J Nutr*, 128, 1861-8.
- Tou, J.C., Chen, J., Thompson, L.U. (1999) Dose, timing, and duration of flaxseed exposure affect reproductive indices and sex hormone levels in rats. *J Toxicol Environ Health A*, 56, 555-70.
- Tsutsui, T., Tamura, Y., Yagi, E., Someya, H., et al. (2003) Cell-transforming activity and mutagenicity of 5 phytoestrogens in cultured mammalian cells. *Int J Cancer*, 105, 312-20.
- Van Wyk, J.J., Arnold, M.B., Wynn, J., Pepper, F. (1959) The effects of a soybean product on thyroid function in humans. *Pediatrics*, 24, 752-60.
- Verdal, K., DS, R. (1979) Naturally occurring estrogens in plant foodstuffs. A review. *J Food Protection*, 42, 577-83.
- Wang, L.Q. (2002) Mammalian phytoestrogens: enterodiol and enterolactone. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. Sep 25;777(1-2):289-309.
- Wang, C., Kurzer, M.S. (1997) Phytoestrogen concentration determines effects on DNA synthesis in human breast cancer cells. *Nutr Cancer*, 28, 236-47.
- Wang, C., Kurzer, M.S. (1998) Effects of phytoestrogens on DNA synthesis in MCF-7 cells in the presence of estradiol or growth factors. *Nutr Cancer*, 31, 90-100.
- Wang, C., Makela, T., Hase, T., Adlercreutz, H., et al. (1994) Lignans and flavonoids inhibit aromatase enzyme in human preadipocytes. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 50, 205-12.
- Wang, T.T., Sathyamoorthy, N., Phang, J.M. (1996) Molecular effects of genistein on estrogen receptor mediated pathways. *Carcinogenesis*, 17, 271-5.
- Ward, W.E., Chen, J., Thompson, L.U. (2001) Exposure to flaxseed or its purified lignan during suckling only or continuously does not alter reproductive indices in male and female offspring. *J Toxicol Environ Health A*, 64, 567-77.

- Waters, A.P., Knowler, J.T. (1982) Effect of a lignan (HPMF) on RNA synthesis in the rat uterus. *J Reprod Fertil*, 66, 379-81.
- Weber, K.S., Setchell, K.D., Stocco, D.M., Lephart, E.D. (2001) Dietary soy-phytoestrogens decrease testosterone levels and prostate weight without altering LH, prostate 5alpha-reductase or testicular steroidogenic acute regulatory peptide levels in adult male Sprague-Dawley rats. *J Endocrinol*, 170, 591-9.
- Whitten, P.L. (1999) Reproductive action of phytoestrogens *Baillere's Clin Endocrinol Metab*, 12, 667-90.
- Whitten, P.L., Lewis, C., Naftolin, F. (1993) A phytoestrogen diet induces the premature anovulatory syndrome in lactationally exposed female rats. *Biol Reprod*, 49, 1117-21.
- Whitten, P.L., Lewis, C., Russell, E., Naftolin, F. (1995) Phytoestrogen influences on the development of behavior and gonadotropin function. *Proc Soc Exp Biol Med*, 208, 82-6.
- Whitten, P.L., Lewis, C., Russell, E., Naftolin, F. (1995) Potential adverse effects of phytoestrogens. *J Nutr*, 125, 771S-776S.
- Whitten, P.L., Naftolin, F. (1992) Effects of a phytoestrogen diet on estrogen-dependent reproductive processes in immature female rats. *Steroids*, 57, 56-61. ??elle est citée ou?
- Whitten PL, Naftolin F., 1999. Reproductive action of phytoestrogens. *Baillière's Clin. Endocrinol., Metab.*, 12(4): 667-690
- Wisniewski, A.B., Klein, S.L., Lakshmanan, Y., Gearhart, J.P. (2003) Exposure to genistein during gestation and lactation demasculinizes the reproductive system in rats. *J Urol*, 169, 1582-6.
- Xu X., Duncan A.M., Merz B.E., Kurzer M.S. (1998) Effects of soy isoflavones on estrogen and phytoestrogens metabolism in premenopausal woman. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev.*, 12, 1101-1108.
- Yang, J., Nakagawa, H., Tsuta, K., Tsubura, A. (2000) Influence of perinatal genistein exposure on the development of MNU-induced mammary carcinoma in female Sprague-Dawley rats. *Cancer Lett*, 149, 171-9.
- Yared, E., McMillan, T.J., Martin, F.L. (2002) Genotoxic effects of oestrogens in breast cells detected by the micronucleus assay and the Comet assay. *Mutagenesis*, 17, 345-52.
- You, L., Casanova, M., Bartolucci, E.J., Fryczynski, M.W., et al. (2002a) Combined effects of dietary phytoestrogen and synthetic endocrine-active compound on reproductive development in Sprague-Dawley rats: genistein and methoxychlor. *Toxicol Sci*, 66, 91-104.
- You, L., Sar, M., Bartolucci, E.J., McIntyre, B.S., et al. (2002b) Modulation of mammary gland development in prepubertal male rats exposed to genistein and methoxychlor. *Toxicol Sci*, 66, 216-25.



# Mécanismes moléculaires et cellulaires des estrogènes et des phyto-estrogènes

*Thierry Maudelonde, Michel Pugeat, Marie-Chantal Canivenc-Lavier*

Les estrogènes sont des hormones lipophiles, stéroïdiennes, impliquées dans la régulation du développement et de la différenciation de nombreux tissus de l'organisme. Ils agissent principalement via des récepteurs nucléaires appartenant à une superfamille de protéines régulatrices de l'expression des gènes. Ils sont aussi capables de provoquer des effets rapides qui pourraient passer par des mécanismes non génomiques. De nombreuses passerelles entre leur voie métabolique et d'autres voies métaboliques telles que celle des facteurs de croissance participent à l'harmonisation du développement et de la différenciation des tissus.

Les phytoestrogènes, tels qu'ils ont été définis précédemment, ont une structure chimique assez voisine de celle des estrogènes. Comme nous le verrons dans ce chapitre, le site de liaison à l'hormone des récepteurs des estrogènes est assez large pour accepter des molécules de structure proche. Mais les effets qui en résultent ne sont pas obligatoirement identiques à ceux de l'estradiol. A l'heure actuelle, un grand nombre d'études fondamentales ou cliniques, chez l'animal, montrent des effets biologiques indiscutables de ces molécules naturelles mais leur importance sur l'organisme humain entier reste difficile à apprécier. Les études cliniques qui ont été faites jusqu'à présent ont le plus souvent une méthodologie discutable et ont obtenu des résultats contradictoires.

## I- Les récepteurs nucléaires

Les récepteurs nucléaires appartiennent à une superfamille dont la fonction reconnue est de réguler l'expression des gènes. Cette famille comporte 49 membres, elle englobe les récepteurs des stéroïdes (estrogènes, androgènes, progestérone, ...), de certaines vitamines (vitamine D, A) et des hormones thyroïdiennes. Mais la majorité des membres de cette famille n'a pas encore de ligands spécifiques connus (Chawla 2001). Les ligands paraissent être des lipides de basse affinité, dérivés du métabolisme du cholestérol et de certains lipides alimentaires. Ils semblent jouer un rôle majeur dans l'impact de l'environnement, notamment alimentaire, sur les fonctions de l'organisme et plus précisément sur les fonctions cellulaires.

La structure de cette famille de gènes présente des caractéristiques communes. Ils comportent 8 exons, qui correspondent au niveau de la protéine à des domaines (A à E ou F) dont les fonctions sont bien définies. Les extrémités NH<sub>2</sub> (A/B) et COOH (D-E/F) sont nécessaires à l'activité de régulation transcriptionnelle du récepteur et sont respectivement appelées AF1 et AF2. AF1 serait fonctionnel dès que le récepteur dimérisé serait fixé sur l'ADN alors que l'activité d'AF2 serait fonction de la molécule ayant lié le récepteur. Le domaine C présente deux doigts de zinc (Mader 1993) responsables de la liaison à l'ADN au niveau de régions spécifiques, appelées éléments de réponse (ER ; ERE pour les estrogènes) et situées dans la zone régulatrice des gènes contrôlés. Cette liaison est responsable de l'initiation ou de l'inhibition de la transcription des gènes cibles. C'est sur la région D-E/F que se lie le ligand spécifique, mais ce domaine contribue également à d'autres fonctions : dimérisation des récepteurs, translocation nucléaire, interactions avec les cofacteurs nucléaires (co-activateurs et co-inhibiteurs).

## II- Les récepteurs des estrogènes (RE)

Il existe deux iso formes du RE. Le premier appelé RE  $\alpha$  est codé par le bras long du chromosome 6 (Green S, 1986) et le RE  $\beta$  est codé par la région q22-24 du chromosome 14 (Kuiper 1996, Enmark 1997, Mosselman 1996). Une troisième forme a été mise en évidence chez les téléostes<sup>30</sup> mais n'a pas été identifiée chez l'humain (Hawkins 2000). La structure

<sup>30</sup> Téléoste : poisson osseux

des gènes des récepteurs des estrogènes présente des caractéristiques communes. Ils comportent 8 exons correspondant, au niveau de la protéine, à des domaines fonctionnels (A à E ou F) (Kumar 1986). Les extrémités NH<sub>2</sub> (A/B) et COOH (D-E/F) sont nécessaires à l'activité de régulation transcriptionnelle du récepteur et sont respectivement appelées AF1 (Tora 1989) et AF2 (Montano 1995, Henttu 1997). AF1 serait fonctionnel dès que le récepteur activé se fixe sur l'ADN alors que l'activité d'AF2 serait fonction du ligand (la molécule ayant lié le récepteur). Le domaine C assure la liaison à l'ADN au niveau de régions spécifiques appelées éléments de réponse (ER) situées dans la zone régulatrice des gènes contrôlés. C'est sur la région D-E/F que se lie le ligand spécifique mais ce domaine a aussi d'autres fonctions : il est nécessaire à la dimérisation des récepteurs, à la translocation nucléaire et aux interactions avec les cofacteurs nucléaires (co-activateurs et co-inhibiteurs). Les domaines C des deux iso formes sont quasi identiques (96% d'homologie) alors que leurs domaines de liaison à l'hormone diffèrent de façon significative (55% d'homologie) et que leurs domaines de régulation transcriptionnelle sont différents (<20% d'homologie pour le domaine A/B). Il en résulte qu'ils ont des sites de liaison identiques sur l'ADN mais que leurs effets biologiques différents (Pearce 2004, Cowley 1999, Liu 2002) et que les affinités des ligands naturels ou de synthèse ne sont pas identiques pour les 2 iso formes (Kuiper 1998).

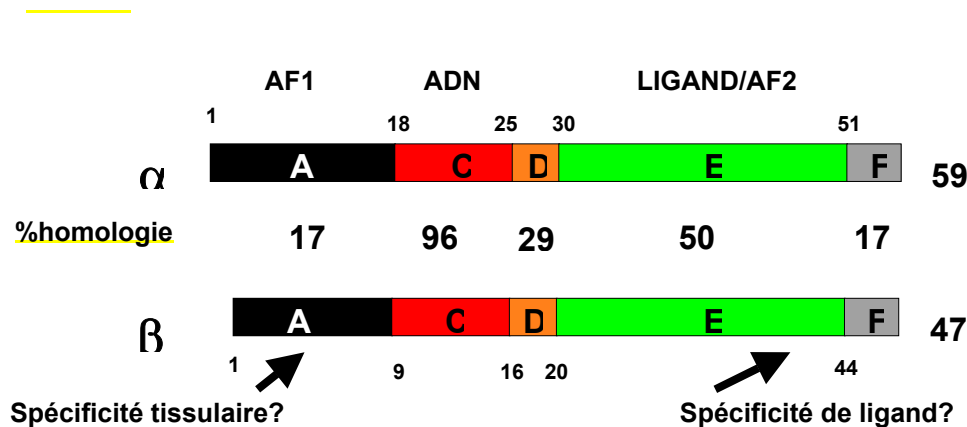
Les deux iso formes  $\alpha$  et  $\beta$  s'expriment dans tous les tissus de l'organisme mais en des proportions relatives variables. Ceci a surtout été démontré chez le rongeur (Brandenberger 1997, Couse 1997, Enmark 1997, Kuiper 1997). De façon générale, le RE  $\alpha$  prédomine dans les tissus dont les processus de cancérogenèse peuvent dépendre des estrogènes, comme le sein et le foie. Les tubules contournés du cortex rénal, la peau, les glandes surrénales, l'intestin et le rectum, le thymus, le cerveau, l'hypophyse, les leucocytes, la moelle osseuse, les cellules séminifères des testicules et l'ovaire semblent exprimer fortement le RE  $\beta$ , à un niveau supérieur à celui du RE  $\alpha$ . Les 2 formes sont retrouvées dans l'os, les vaisseaux, le poumon et à des degrés moindres dans tous les autres tissus de l'organisme. Dans le cerveau, l'ARN du RE  $\beta$  est particulièrement abondant dans les zones intervenant dans l'apprentissage et la mémorisation tel que le néo-cortex et l'hippocampe (Shughrue 1997). Au niveau de la protéine, la localisation des isoformes est rendue difficile car les anticorps du commerce ne détectent que la forme  $\alpha$ . Toutefois, quelques études préliminaires faites avec un anticorps dirigé contre les acides aminés 196-213 de la forme  $\beta$  du rat, montrent la présence de la protéine RE  $\beta$  dans l'ovaire, l'utérus, les poumons, la vessie, le cœur, les surrénales et le thymus ainsi que dans les vésicules séminales (Saunders 1997). Ce n'est qu'après la découverte du RE  $\beta$  dans du testicule de rat qu'on a pris conscience de l'importance des estrogènes dans la fécondité masculine car le RE  $\alpha$  y est très faiblement exprimé. Ce rôle a été bien mis en évidence par l'étude de l'inactivation des REs chez la souris. Dans les processus de cancérogenèse des tissus dont la croissance dépend des estrogènes, il semblerait que l'augmentation du rapport RE $\alpha$ /RE $\beta$  soit un phénomène régulièrement retrouvé (sein :Leygue 1998; ovaire : Pujol 1998).

Par ailleurs, les molécules naturelles ou de synthèse capables de lier les RE sont regroupées sous le terme de « modulateurs sélectifs des récepteurs des estrogènes » (SERMs). Ils induisent des effets biologiques qui vont être spécifiques de la molécule liée. Le ligand naturel est l'estradiol. Les autres estrogènes naturels tel l'estrone, peuvent les lier mais avec une affinité inférieure.

## **II-1 Structure-fonction des RE $\alpha$ et $\beta$**

Bien qu'ils soient situés sur 2 gènes différents les RE  $\alpha$  et  $\beta$  ont des séquences protéiques voisines (Kuiper, 1996, Mosselman, Polman, Dijkema 1996). Ils présentent des domaines de liaison à l'ADN (C) dont les séquences sont très voisines (94-96% d'homologie selon les publications). Ceci suggère qu'ils peuvent interagir avec les mêmes régions de l'ADN. Par contre les domaines de liaison à l'hormone (E/F) n'ont que 55% d'homologie. La région F qui participe à la fonction de régulation transcriptionnelle n'a que 17% d'homologie. Aussi, les iso-formes sont capables de lier des ligands identiques, mais avec des affinités différentes,

et les complexes ainsi formés vont induire des réponses probablement différentes. La région A/B est très différente (17% d'homologie). Elle est supposée porter une activité de régulation transcriptionnelle dépendante de phosphorylations spécifiquement localisées et qui ne paraissent pas dépendantes du ligand qui lie le récepteur. Le domaine D contribue à la flexibilité entre le domaine de liaison à l'ADN et celui du ligand. Il pourrait aussi interférer avec la liaison de certains co-facteurs.



**Figure 1 : Domaine de structure des RE  $\alpha$  et  $\beta$  et du degré d'homologie de leurs gènes**

Le mécanisme d'action des récepteurs aux estrogènes est complexe. Classiquement le RE inactif est lié à des protéines chaperonnes ou protéines de choc thermique (HSP 90, HSP70, HSP59) (Joab 1984, Sanchez 1990). Lorsque l'estradiol pénètre dans la cellule, il se lie au récepteur, qui se sépare alors des molécules chaperonnes et s'active en modifiant sa conformation. Il se dimérise et il acquiert une haute affinité pour des régions très spécifiques de l'ADN appelées pour cette raison « élément de réponse aux estrogènes » (ERE). Cette séquence d'ADN dite consensus, consiste en une séquence répétée de 13 paires de bases formée de 2 répétitions inversées AGGTCA séparées par 3 nucléotides (Parker 1995). Ces ERE sont souvent situés dans la région promotrice des gènes estrogéno-sensibles. Une fois lié à l'ADN, le RE va moduler l'expression des gènes cibles. Leur activité régulatrice est le plus souvent sous le contrôle de protéines nucléaires appelées co-facteurs qui vont lier le récepteur activé. En cas d'activation de la transcription, ces protéines sont appelées co-activateurs, et dans le cas contraire ce sont des co-inhibiteurs. La plupart de ces co-facteurs sont multi-fonctionnels et ils ne semblent pas spécifiques d'un récepteur nucléaire. Ils agissent le plus souvent en complexes multi-protéiques qui possèdent notamment une activité histone acétyltransférase, une activité de remodelage de la chromatine et de ré-initiation de la transcription quand il s'agit de co-activateurs (Jones KA 2001 ; Nilsson 2001, Wang 2001). Cette activité favorise l'acétylation des histones qui, alors, se dissocient. L'ADN se linéarise, ce qui permet l'action des protéines impliquées dans la transcription en ARN messenger. L'inactivation, chez la souris, de l'un d'entre eux (le Steroid Receptor Coactivator 1: SRC-1) induit une résistance partielle aux estrogènes (Xu 1998). Les co-inhibiteurs ont au contraire une activité désacétylase (Nagy 1997) ou ils recrutent des protéines à activité désacétylase (Chen 1995, Privalsky 2004, Nagy 1997) qui va entraîner la reconstitution du nucléosome par ré-association des histones. La proportion variable de ces cofacteurs dans les cellules des divers tissus cibles permet d'expliquer, pour partie, la spécificité tissulaire des réponses aux estrogènes (Glass 2000). Les REs sont aussi responsables d'autres effets génomiques (Nilsson 2001).

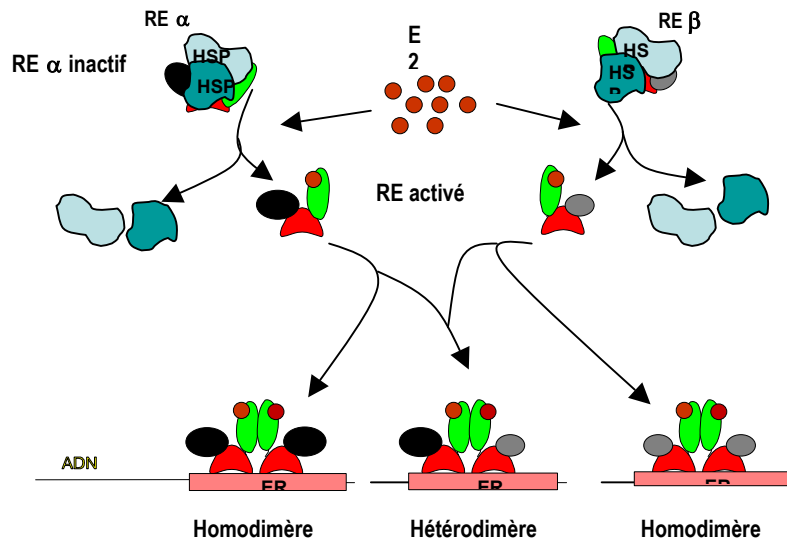


Figure 2 : Trafic intracellulaire des RE

Les REs sont aussi capables de s'hétéro-dimériser et d'avoir ainsi des effets possiblement variables en fonction de leur dimérisation (figure 2) (Cowley 1997). Ils sont aussi responsables d'autres effets génomiques (Nilsson 2001) (fig.3) : ils peuvent moduler l'activité d'autres facteurs transcriptionnels comme SP1 (Porter 1997) et l'activité des facteurs de croissance en particulier en se fixant au niveau du complexe AP1 (Webb 1995). Une interférence avec la voie de NFκB a aussi été décrite. Des études, *in vitro*, ont montré que les hétérodimères d'autres récepteurs nucléaires sont capables de lier les EREs tels que les hétérodimères constitués du récepteur de l'acide rétinoïque et de PPAR (RXR/PPAR) et de l'hétérodimère constitué de l'association AHR/ARNT (Nunez 1995, Ohtake 2003).

L'activation du récepteur nucléaire, classiquement effectué par la liaison de son ligand naturel, peut aussi se produire par phosphorylation de certains acides aminés de sa région NH2 terminale (domaine AF1) par des kinases, qui sont elles-mêmes activées par la voie des facteurs de croissance (Aronica 1993, Thordarson 2004).



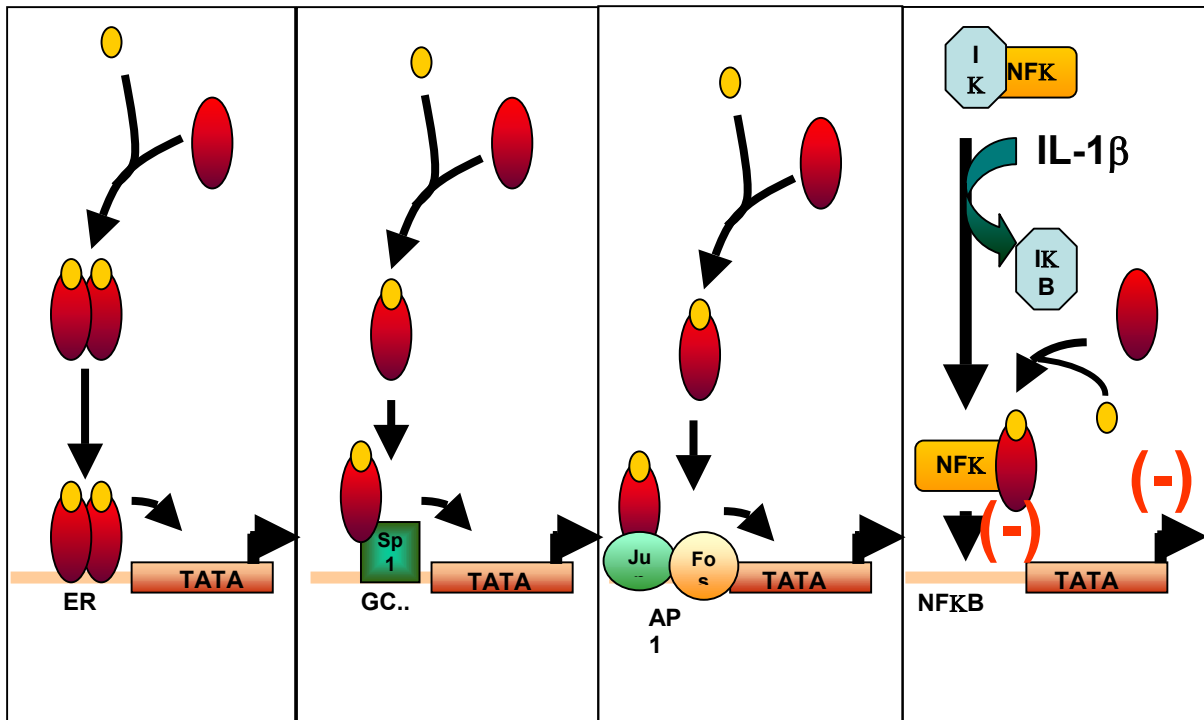


Figure 3 : Les différents modes de régulation transcriptionnelle des REs (d'après Nilsson 2001)

## II-2 Les inactivations des gènes des récepteurs

### II-2-1 Chez la souris

Le modèle de la souris transgénique « ERKO » (knock out du RE), dans laquelle  $RE\alpha$  et/ou  $RE\beta$  sont inactivés, a permis de montrer que les RE sont présents dans la quasi totalité des tissus d'un organisme et qu'ils ont un rôle parfois majeur dans des tissus qui ne sont pas des cibles classiquement reconnues des estrogènes (Curtis 2000, Couse 1999).

#### II-2-1-1 L'inactivation du récepteur $\alpha$ des estrogènes chez les souris

L'inactivation du  $RE\alpha$  a permis de mettre en évidence l'importance de ce récepteur dans certains tissus et son rôle dans l'action des facteurs de croissance. Chez les souris homozygotes pour l'inactivation du  $RE\alpha$  ( $ERKO\alpha$ ), les souris mâles et femelles ne sont pas fertiles. Ces souris présentent des troubles de la sexualité et, chez la femelle des anomalies du développement mammaire. Les taux d'estradiol plasmatique peuvent expliquer les caractéristiques ovariennes de ces souris. Le phénotype observé correspond à une résistance à l'action des estrogènes à l'exception de certaines régulations :

- **l'utérus :**

Il présente une morphologie normale et ses 3 compartiments définitifs (myomètre, stroma et épithélium) au stade néonatal et prépubère. Mais au stade adulte, et malgré des taux d'estradiol plasmatique élevés, ces souris ont une hypoplasie des trois tuniques de l'utérus. Les cellules épithéliales ont une forme cuboïde et non pas allongée de type colonnaire avec un noyau basal comme dans un épithélium utérin normal mature. Un traitement par diéthylstilbestrol (DES) n'entraîne pas d'augmentation du poids de l'utérus des femelles  $ERKO\alpha$  castrées montrant bien que le  $RE\alpha$  est le principal récepteur des estrogènes de l'utérus. Il en est de même pour l'effet agoniste du tamoxifène qui n'existe pas chez les souris  $ERKO\alpha$  (Korach 1994). Chez ces souris, les taux constitutifs de récepteur de la progestérone persistent ainsi que les réponses biologiques à la progestérone alors que l'induction de leur synthèse par les estrogènes principalement au niveau du myomètre et du compartiment stromal, chez la souris, n'existe plus (Curtis 1999). Le rôle des facteurs de

croissance est important pour le développement de l'utérus et des passerelles existent entre la voie des facteurs de croissance et celle des estrogènes. Chez les souris ERKO $\alpha$ , les effets de l'EGF (facteur de croissance épidermique) sur la prolifération et l'induction des gènes classiquement induits par les estrogènes sont abolis (Curtis 1996). Certaines actions estrogéniques sont cependant conservées. Ainsi, le 4-hydroxyestradiol (4-OH-E2) augmente la synthèse de l'ARN messager de la lactoferrine de 60 fois chez les souris ERKO $\alpha$  et l'E2 n'induit aucune réponse alors qu'il entraîne une augmentation de 85 fois de cette synthèse chez les femelles normales (Das 1997). Une réponse plus modeste est aussi obtenue avec des xéno-estrogènes tel que le képone ou le méthoxychlore. Ces réponses ne sont pas inhibées par l'anti-estrogène pur ICI 182,780 aussi bien chez la femelle de type sauvage que chez celle qui est ERKO $\alpha$  (Ghosh 1998).

Les réponses à la progestérone sont globalement respectées. Bien que la décidualisation nécessite, chez les femelles de type sauvage, un effet estrogénique, celui-ci ne paraît pas nécessaire chez les souris ERKO $\alpha$  car une maturation utérine (décidualisation) a été obtenue chez ces souris après traitement par la progestérone (Curtis 1999)

- **Au niveau du vagin :**

Des RE $\alpha$  sont présents dans le stroma et l'épithélium (Stumpf 1976). Les effets induits par l'estradiol (stratification et cornification de l'épithélium notamment) sont abolis chez les souris ERKO $\alpha$  (Korach 1996). Les effets des estrogènes sont donc principalement médiés par le RE $\alpha$  dans le vagin.

- **Dans les ovaires des individus de type sauvage :**

Au niveau des follicules ovariens en croissance, les estrogènes augmentent le taux de leurs propres récepteurs, stimulent la synthèse d'IGF-1 et potentialisent l'action de la FSH en contribuant au maintien des taux de récepteurs de la FSH puis à l'apparition de ceux de la LH (Goldenberg 1972). Par hybridation *in situ*, les ARN messagers du RE $\alpha$  sont à des taux faibles et présents dans tous les compartiments de l'ovaire, alors que les ARN messagers du RE $\beta$  sont largement présents dans les cellules de la granulosa des follicules en croissance (Byers 1997).

Les ovaires des femelles ERKO $\alpha$  durant la période néonatale et prépubère ne présentent pas de différences notables avec ceux des femelles de type sauvage (Schomberg 1999). Au début de leur maturité sexuelle, les femelles ERKO $\alpha$  sont anovulatoires et ont des ovaires présentant de gros follicules kystiques et hémorragiques, démontrant ainsi que le RE $\alpha$  n'est pas nécessaire pour le recrutement des follicules primordiaux et les étapes initiales de la folliculogénèse (Couse 1999). Les ovaires de ces souris ERKO $\alpha$  ne présentent jamais de corps jaune, ce qui objective leur incapacité à ovuler spontanément. Il pourrait s'agir d'un effet indirect de l'absence de RE $\alpha$  notamment par la diminution des récepteurs de la LH.

- **La glande mammaire des souris ERKO $\alpha$**

Elle est normale lors de la période néonatale et prépubère. Cependant, à l'âge adulte, le sein demeure prépubère, démontrant ainsi que le RE $\alpha$  est nécessaire pour la maturation de la glande mammaire. Les glandes de ces souris possèdent toutes les structures nécessaires à leur développement : stroma, épithélium, tissu conjonctif et arbre canalaire rudimentaire. Il est possible que cette absence de développement soit liée à une diminution locale du taux de récepteurs à la progestérone et de la production de prolactine au niveau hypophysaire (Couse, Korach 1999).

- **Au niveau de l'axe hypothalamo-hypophysaire**

Malgré les taux élevés d'estradiol plasmatique, les taux des ARN messagers des sous-unités des gonadotrophines des souris ERKO $\alpha$  sont aussi élevés que dans les hypophyses des souris de type sauvage castrées (Scully 1997). Ceci démontre le rôle majeur des RE $\alpha$  dans la régulation de la production des gonadotrophines. Cependant, bien que les transcrits des sous-unités  $\beta$  de la LH et de la FSH soient élevées, seule la LH est élevée au niveau des protéines, la FSH se trouvant dans les valeurs des souris de type sauvage (Couse, Korach 1999). La production d'inhibine (qui est responsable de la régulation négative de FSH)

pourrait suffire à normaliser les taux de FSH dans les souris ERKO $\alpha$ . Un rôle coopératif entre les estrogènes et la progestérone dans l'induction du pic pré-ovulatoire de LH est possible. Chez les souris ERKO $\alpha$  il y a une augmentation du taux des ARN messagers des récepteurs de la progestérone (RP) qui peut être due à une action compensatrice du RE $\beta$  sous l'effet des taux élevés d'estradiol (Shughrue, Lane, Merchenthaler 1997).

Les estrogènes agissent sur de nombreuses régions du cerveau pour réguler, non seulement la production de gamètes, mais aussi le comportement sexuel des individus. Ils agissent, en particulier, par l'induction du RP. Chez les souris ERKO $\alpha$ , il y a une diminution de la quantité d'ARN messager du RP dans certains noyaux hypothalamiques notamment dans le noyau pré-optique, bien mise en évidence par hybridation *in situ*. L'adjonction d'estradiol entraîne une augmentation de la quantité de cet ARN messager dans les souris ERKO $\alpha$  suggérant que cette régulation du gène du RP est sous la dépendance du RE $\beta$  ou bien qu'il existe une autre voie de régulation extra-génomique (Shughrue, Lane, Merchenthaler 1997). Le comportement sexuel des souris femelle ERKO $\alpha$  est fortement perturbé malgré la présence plasmatique des hormones théoriquement nécessaires pour un comportement normal. Au contraire, elles auraient tendance à exhiber un comportement assez masculin pouvant s'expliquer par les forts taux de testostérone circulante (Ogawa 1996).

▪ **Le développement de l'appareil de reproduction du mâle ERKO $\alpha$  :**

Il est normal jusqu'au stade prépubère. Mais, vers la vingtième semaine, le poids des testicules diminue alors que la prostate et les vésicules séminales sont normales. Le taux circulant de FSH est normal alors que celui de la LH est un peu élevé et bien corrélé avec l'hyperplasie des cellules de Leydig retrouvée chez ces souris et l'augmentation de la testostérone circulante. Par contre la spermatogenèse est très altérée avec une chute du nombre et de la mobilité des spermatozoïdes associée à une modification de la forme où la tête du spermatozoïde est séparée de la queue (Eddy 1996). Sur le plan histologique l'épithélium séminifère est atrophique. Chez les mâles âgés, on retrouve très fréquemment une hyperplasie de la vessie et de la prostate. L'élévation des taux de LH chez les mâles ERKO $\alpha$  suggère que l'aromatase joue un rôle important dans la régulation des gonadotrophines chez le mâle. Cette observation pourrait être rapprochée de la diminution de la prolactine observée chez ces souris.

▪ **Sur le métabolisme osseux de la souris :**

Peu d'études ont été faites sur l'impact des estrogènes. Néanmoins l'analyse des fémurs montre que la longueur et le diamètre des fémurs étaient diminués chez les souris ERKO $\alpha$ , et ceci de façon plus importante chez les femelles que chez les mâles (Korach 1997). Ces appréciations sont confirmées par les mesures de la densité osseuse et du contenu minéral.

▪ **Sur le retentissement cardiovasculaire :**

Les études sont aussi peu nombreuses et ne paraissent pas montrer de perturbation majeure du système cardiovasculaire. Cependant il a été montré que les femelles ERKO $\alpha$  présentaient un surpoids par rapport aux femelles de type sauvage du même âge. Cette augmentation pondérale est liée à une augmentation du tissu adipeux, et plus précisément de la graisse claire localisée dans les parties latéro-ventrales de la cavité abdominale et au niveau du tissu de soutien mammaire (Couse, 1999, Ohlsson 2000). Cette observation est similaire à celles qui ont été faites chez les souris femelles castrées soulignant le rôle important joué par les estrogènes dans l'adipogenèse.

▪ **Conclusion**

Au total, le modèle des souris ERKO $\alpha$  permet de montrer que le RE $\alpha$  joue un rôle majeur dans l'activité estrogénique présente dans les tissus cibles.

## II- 2-1-2 L'inactivation du récepteur $\beta$

Chez les souris homozygotes pour l'inactivation du RE $\beta$ , les organes de reproduction féminins sont normaux jusqu'à la période de développement pubertaire. Mais, à l'âge adulte une hypofertilité apparaît. A ce moment là, l'utérus et le vagin paraissent avoir un

développement normal avec des modifications cycliques induites par les hormones stéroïdes (Krege 1998). Par contre l'ovaire, malgré une apparence macroscopique identique à ceux des souris du type sauvage, semble être en cause. Il existe une augmentation du nombre de follicules précocement atrétiques et moins de corps jaunes dans les ovaires de souris ERKO $\beta$  comparés à ceux de type sauvage. Ces caractéristiques s'expliquent probablement par une anomalie de la dernière étape du développement folliculaire. Lorsqu'on hyperstimule ces souris ERKO $\beta$  le nombre moyen d'ovocytes obtenus (n=6) est largement inférieur à celui des souris normales (n = 33) (Krege 1998). Ainsi l'inactivation du RE $\beta$  aboutit à une diminution drastique dans la capacité ovulatoire des ovaires. Chez ces souris, il y a peu de modification du comportement sexuel par rapport à une population de type sauvage. Les études du retentissement cardiovasculaire et osseux de l'inactivation du RE $\beta$  restent à faire. A signaler cependant une étude (Zhu 2002) montrant que ces souris ont, en vieillissant, une augmentation de la pression artérielle. Cette observation est à rapprocher de la notion d'une prépondérance des RE $\beta$  dans le tissu myocardique.

La glande mammaire des souris homozygotes pour ERKO $\beta$  apparaît aussi avoir une différenciation normale à l'âge adulte avec une structure lobulo-alvéolaire normale durant les grossesses, montrant bien que, dans le sein comme dans l'utérus, c'est le RE $\alpha$  qui paraît prédominant pour l'effet biologique.

### II-2-1-3 l'inactivation des deux récepteurs

L'inactivation des 2 récepteurs  $\alpha$  et  $\beta$  conduit à la suppression totale des effets estrogéniques passant par la voie des récepteurs. Cette double inactivation a été faite chez des souris appelées  $\alpha\beta$ ERKO (Couse, Korach 1999). Les souris des deux sexes survivent jusqu'à l'âge adulte battant ainsi en brèche l'ancienne hypothèse que les altérations de la structure des RE étaient léthales.

Chez l'individu mâle, les testicules présentent les différents stades de la spermatogenèse mais le nombre de spermatozoïdes ainsi que leur mobilité sont diminués respectivement de 80 et 5%. Ce phénotype est équivalent à celui des mâles  $\alpha$ ERKO. Mais ce tableau est différent de celui de l'inactivation de l'aromatase (Robertson 1999) qui entraîne un arrêt total de la spermatogenèse suggérant qu'il existe dans le testicule des actions de l'aromatase ou des estrogènes qui sont différentes de celles induites par l'activation des RE.

Chez l'individu femelle  $\alpha\beta$ ERKO, la différenciation des organes génitaux femelles s'effectue normalement durant la vie fœtale. Cependant, à l'âge adulte apparaît une hypoplasie utérine sévère équivalente à celle observée chez les animaux femelles  $\alpha$ ERKO. Ainsi, conformément aux études de castration fœtale réalisée par A.Jost la différenciation du tractus génital féminin est indépendante des hormones ovariennes mais les RE sont nécessaires au développement post fœtal de ces organes. Si au stade prépubère, l'ovaire  $\alpha\beta$ ERKO possède des follicules avec thèque et antrum correspondant à une maturation précoce qui peut être expliquée par une élévation importante de la LH supérieure même à celle retrouvée chez les femelles  $\alpha$ ERKO, l'absence des 2 isotypes de RE amène des altérations morphologiques importantes des ovaires chez l'individu adulte. En effet, si on retrouve dans ces ovaires de souris adulte des follicules primordiaux, aucun corps jaune n'a été observé. Par contre apparaissent des structures équivalentes à des tubules séminifères comportant des cellules similaires à celles de cellules de Sertoli suggérant ainsi une redifférenciation dans le sens mâle. Cette hypothèse est étayée par l'expression aberrante de protéines spécifiques des structures testiculaires dans ces régions ovariennes. Il s'agit de l'hormone anti-müllérienne, de la glycoprotéine sulfatée 2 et de Sox 9 marqueurs de la différenciation des cellules de Sertoli (Wagner 1994).

Ceci démontre que les cellules somatiques ovariennes conservent la capacité de se redifférencier en cellules de Sertoli pendant toute la vie de la souris. Le mécanisme n'en est pas encore connu mais ce sont les RE  $\alpha$  qui sont majoritaires dans la composante thécale et stromale de l'ovaire alors que le RE $\beta$  prédomine dans les cellules de la granulosa (Fitzpatrick 1999). D'autre part, les souris trans-géniques hyper-exprimant la LH ne montrent

pas de différenciation des ovaires dans un sens testiculaire de même que les souris porteuses d'une inactivation du gène de l'aromatase (Fisher 1998).

Le comportement des souris ayant la double inactivation montre une agressivité équivalente à celle des souris  $\alpha$ ERKO alors que les souris  $\beta$ ERKO sont beaucoup plus agressive suggérant que le RE $\beta$  a un effet inhibiteur sur le RE $\alpha$  possiblement par hétérodimérisation (Ogawa 2000). A la lumière de ces modèles, le rôle des ER sur le comportement n'est pas clair. Les ERS sont présents dans les noyaux arqués et l'aire préoptique de l'hypothalamus. ER $\alpha$  est présent dans les noyaux ventro-médians et ER $\beta$  dans les noyaux paraventriculaires. Ces structures hypothalamiques sont importantes dans le comportement alimentaire, la reproduction, l'activité sexuelle, et la thermorégulation. Les ERs sont également présents dans l'amygdale et l'hippocampe deux zones impliquées dans les mécanismes de la mémoire récente et les émotions. ER $\beta$  a été identifié dans le cervelet et les régions corticales (Shughrue 1998, Kuiper 1997).

#### **II-2-1-4 Le phénotype des souris dépourvu du gène Cyp19 qui code pour l'aromatase (ArKO)**

Il est marqué par un défaut de développement normal des organes génitaux, de l'utérus et des glandes mammaires et une stérilité par défaut d'ovulation chez les femelles. La spermatogénèse est préservée chez les jeunes mâles puis leur comportement de reproduction est ralenti et la fécondité réduite (O'Donnell 2001, Robertson 1999, Robertson 2001). Les souris ArKO ont une ostéopénie plus sévère avec l'âge chez les femelles. Les marqueurs du remodelage sont augmentés dans les deux sexes, mais des différences existent entre les deux sexes, avec une augmentation du remodelage chez les femelles alors que celui-ci est diminué chez les mâles avec baisse de la formation osseuse (Oz 2000).

### **II-2-2 Chez l'humain**

#### **II-2-2-1 L'inactivation du RE $\alpha$**

Un seul cas de mutation du RE $\alpha$  a été décrit dans la littérature (Smith 1994). Il concerne un homme de 28 ans qui faisait 204 cm de hauteur pour un poids de 127 kg. Il avait fait une puberté normale à 13 ans avec une pilosité et des organes génitaux externes normaux mais sa croissance ne s'était pas arrêtée. L'anomalie la plus spectaculaire était un âge osseux de 15 ans avec une déminéralisation importante (>3DS). Le spermogramme montrait une quantité de spermatozoïdes normale mais une viabilité diminuée (18%). Le taux de testostérone plasmatique était normal mais ceux de FSH, LH, estrone et estradiol étaient élevés. Ce tableau clinique évoquait une résistance aux estrogènes. Ceux-ci ayant un rôle qui n'était pas soupçonné chez l'homme, au niveau de la synthèse osseuse et de la fertilité masculine. Le séquençage du RE $\alpha$  sur l'ADN des lymphocytes circulants a objectivé une mutation ponctuelle homozygote remplaçant une cytosine par une thymidine au codon 157 et résultant dans le remplacement d'un codon arginine (CGA) par un codon stop prématuré (TGA). Ce qui induit la formation d'une protéine tronquée ne possédant pas de domaine de liaison à l'ADN ni de domaine de liaison aux estrogènes.

Il est possible qu'il existe des mutations induisant une résistance plus discrète et que l'hyperestrogénie compensatrice arrive à surpasser la résistance et autorise un phénotype normal.

L'inactivation du RE $\beta$  n'a pas été retrouvée chez l'homme, à ce jour, de même que des inactivations simultanées des 2 REs.

### **II-3 Les variants des RE $\alpha$ et $\beta$**

Une fois qu'un gène est transcrit en ARN messager, ce dernier va subir une maturation qui lui permet d'exciser certaines de ses régions (les introns) par un mécanisme qui s'appelle « épissage ». Les introns ne participeront pas à la traduction en protéine. L'épissage permet non seulement de couper mais aussi de recoller les fragments restants (les exons) afin de former l'ARN mature, qui se trouve ensuite traduit en protéine. On a découvert depuis peu que l'épissage subissait aussi une régulation et qu'il était capable de sélectionner les exons pour constituer des

ARN messagers matures différents. On appelle cet épissage par rapport à l'épissage classique « l'épissage différentiel ou alternatif ». Un gène peut donc donner plusieurs ARN messagers, par épissage différentiel de l'ARN messenger premier transcrit. Ces différents ARN messagers peuvent, eux aussi, donner plusieurs protéines lors de la maturation post-traductionnelle. Son mécanisme demeure encore peu connu mais il s'agit d'un domaine en pleine évolution (Ast 2004). Il semblerait avoir une importance encore mal appréciée en pathologie car certains variants d'épissage seraient susceptibles d'avoir des fonctions biologiques indésirables, tel que l'inhibition de la fonction biologique de la forme normale ou au contraire son amplification. On a montré que les gènes des récepteurs aux estrogènes donnent effectivement plusieurs transcrits matures après épissage différentiel appelés variants d'épissage. Ces formes variantes des récepteurs des estrogènes sont présentes physiologiquement dans les divers tissus cibles. Leurs actions ne sont pas encore connues, cependant ces modifications entraînent parfois la disparition d'un ou de plusieurs domaines du récepteur dont les fonctions sont donc altérées. Ces variants peuvent potentiellement perturber le fonctionnement du récepteur normal lorsqu'il est présent. Dans d'autres cas, le variant retrouvé correspond à une délétion d'une partie plus ou moins grande du récepteur qui peut être remplacée par une séquence différente (voir annexe 5 « L'épissage différentiel (ou alternatif) des récepteurs  $\alpha$  et  $\beta$  aux estrogènes : les variants possibles chez l'Homme » pour plus de détails).

#### **II-4 Les effets non génomiques des récepteurs des estrogènes**

De nombreuses études récentes ont montré que les récepteurs des estrogènes comme d'autres récepteurs nucléaires pouvaient induire des réponses très rapides liées à des effets membranaires ou cytoplasmiques (Losel 2003b, Losel 2003a). Ces effets ont été retrouvés dans de nombreux tissus. Ces effets seraient dus à une faible concentration des REs eux mêmes ou peut-être à des variants d'épissage du RE $\alpha$  (Figtree 2003), voire à une isoforme qui ne possède pas le domaine AF1 (Flouriot 2000). Ces RE $\alpha$  peuvent directement ou indirectement activer les récepteurs membranaires à activité tyrosine kinase (familles des IGF-R, des EGF-R...) et leur action peut être inhibée par l'antiestrogène fulvestrant (ICI 182781) et les inhibiteurs des « mitogen activated protein kinase » (MAPK kinase : Kahler 2000). Ces RE peuvent aussi se lier avec d'autres molécules clés de ces voies de signalisation telles que Src, Shc et Iz sous unité P85 $\alpha$  de la PI3Kinase (Migliaccio 2002 ; Wong 2002). Tout comme l'activité génomique, cette activité non génomique dépend du ligand (Figtree 2000), des protéines corégulatrices et de la teneur du milieu en facteurs de croissance.

#### **II-5 Notion de modulateurs des REs**

De très nombreuses molécules naturelles ou de synthèse sont capables de lier les RE. Leur liaison à un RE va induire soit une activité estrogénique, dite agoniste, soit une inhibition de l'action estrogénique, dite alors antagoniste. En fait, la même molécule va souvent avoir des effets antagonistes ou agonistes qui seront fonction du tissu considéré et aussi du gène régulé. C'est pour cette raison qu'on les appelle des modulateurs sélectifs des RE (SERM). Leur mécanisme d'action est partiellement expliqué. La structure du domaine de liaison aux estrogènes et la manière dont certains ligands estrogéniques lient le RE  $\alpha$  et le RE  $\beta$  sont connues (Pike 2001, Pike 2000, Shiau 1998, Brzozowski 1997) et la liaison d'un SERM au RE entraîne bien leur activation avec dimérisation et translocation nucléaire. Mais elle entraîne aussi une transconformation du domaine de liaison qui va créer des sites reconnus par des co-activateurs si elle est identique à celle induite par l'estradiol (Montano 1995). Dans le cas contraire, ces sites peuvent être reconnus par d'autres protéines, notamment des co-inhibiteurs. Les proportions relatives de co-activateurs et de co-inhibiteurs, variant d'un tissu à l'autre, vont donc jouer un rôle essentiel dans la réponse aux SERMs et sa spécificité tissulaire (Smith 2004). A titre d'exemple, l'estradiol active la transcription via le site AP1 en se liant au RE  $\alpha$  mais l'inhibe en se liant au RE  $\beta$ . Le tamoxifène ou le raloxifène vont activer la transcription via le site AP1 en se liant au RE  $\beta$ . Ainsi les 2 REs vont avoir une activité qui va dépendre de l'élément de réponse et du ligand (Paech 1997). La concentration cellulaire en co-activateurs et en corépresseurs va aussi jouer un grand rôle (figure 4) et est probablement une des raisons de la spécificité tissulaire des réponses aux ligands des REs.

Selon l'abondance de l'une de ces catégories de protéines nucléaires, un effet agoniste ou antagoniste va être prédominé (Collingwood 1999). Un répresseur de l'activité des REs (REA) interagissant avec le RE lié aux antiestrogènes augmente l'activité antagoniste du tamoxifène et atténue l'activité estrogénique de l'estradiol (Montano 1995). Un autre répresseur de l'activité transcriptionnelle du tamoxifène (RTA) inhibe l'activité estrogénique partielle du tamoxifène avec des effets minimes sur les agonistes purs tels que l'estradiol (Norris 2002). Ce même répresseur peut aussi inhiber l'activité transcriptionnelle des purs agonistes des récepteurs aux glucocorticoïdes et de la progestérone. Un dysfonctionnement des corépresseurs a été décrit dans les syndromes de résistance aux hormones thyroïdiennes (Clifton-Bligh 1998 ; Matsushita 2000) mais il n'a pas encore été décrit d'équivalent pour les résistances aux estrogènes chez l'humain.

Le terme de SERMs va logiquement englober toute molécule liant des REs. Cependant, à l'heure actuelle, on les dissocie de l'estradiol qui est l'agoniste pur et des antiestrogènes purs qui empêchent la dimérisation du récepteur et favorisent sa dégradation. Certains seront dits naturels car ce sont des ligands physiologiques (phyto-estrogènes...), d'autres sont des ligands de synthèse produits pour moduler la fonction des RE (Paech 1997) au niveau de AF2 (Garcia Pedrero 2003). Leur action antagoniste ou agoniste des estrogènes dépend du type de RE, du tissu, du gène et de leur structure (Rocheffort 1989, Castro-Rivera 2003). La catégorie la plus nombreuse est celle des produits retrouvés dans notre environnement, qu'ils soient naturels comme les phyto-estrogènes, ou de synthèse comme les pesticides (Danzo 1997). Ils vont lier les RE avec des affinités parfois très faibles (Kuiper 1997) mais qui, du fait de leur accumulation dans certains tissus ou bien de leur utilisation extensive, atteignent des concentrations suffisantes pour occuper les RE et influencer sur leur fonctionnement (Safe 2001, Yoon 2001). Les concentrations en coactivateurs et en coinhibiteurs vont être déterminantes pour l'activité de ces produits

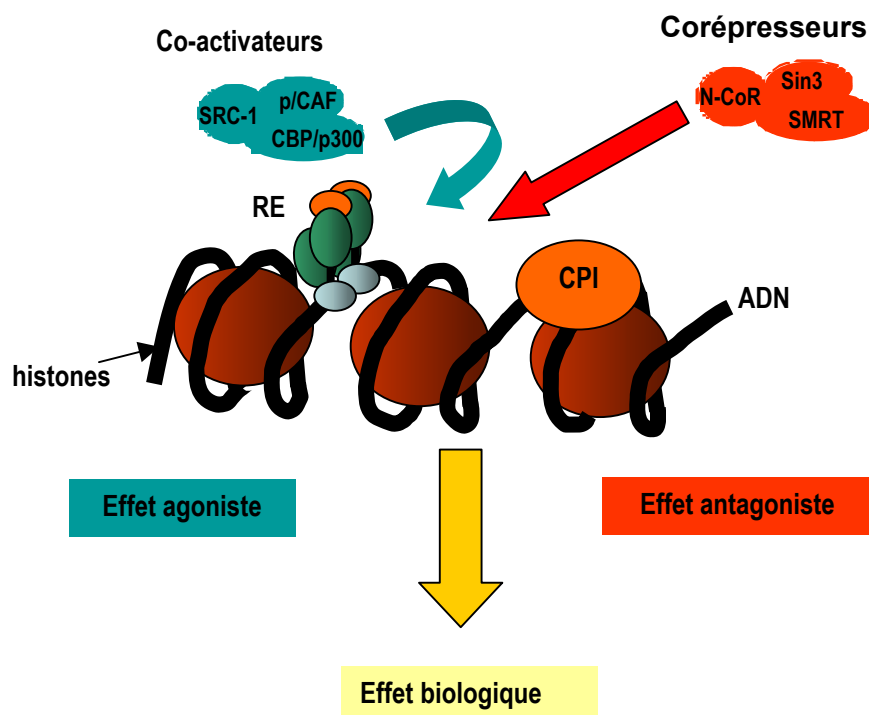


Figure 4 : La réponse biologique aux SERM va dépendre des proportions relatives de coactivateurs et de corépresseurs présentes dans la cellule cible. D'après (Collingwood, Urnov, Wolfe 1999)

### III- Les phyto-estrogènes

Les phyto-estrogènes sont capables de lier les REs et d'induire des effets biologiques qui leur sont propres. Ils peuvent être considérés comme des SERMs naturels (Brzezinski 1999). Ils vont lier les REs avec des affinités très variables d'un produit à l'autre et leurs effets peuvent être différents. Cette affinité est généralement inférieure à celle de l'oestradiol

Les isoflavones et les coumestanes sont les meilleurs ligands de cette classe de molécules (Le Bail 2000, Miksicek 1993). Dans le cas des flavonoïdes, une substitution en position C5, C7 et C4' semble conditionner l'affinité au RE et la réponse oestrogénique (Miksicek 1995). La puissance d'un produit va dépendre de son affinité pour le RE (Clarke 1996). S'ils induisent des réponses biologiques à des doses identiques voire inférieures à celle de l'estradiol, ils sont considérés comme puissants (puissant agoniste ou antagoniste). Au contraire, s'ils ont un effet biologique à des concentrations largement supérieures à celle de l'estradiol ils sont de faible puissance. En tout état de cause, les phytoestrogènes sont, à l'heure actuelle, considérés comme des SERM à faible potentiel d'un point de vue pharmacologique. D'une manière générale, les phytoestrogènes montrent, du moins *in vitro*, une affinité supérieure envers le récepteur RE beta (Kuiper 1997, Kuiper 1998, Pearce, Jordan 2004) (Mueller 2002) (tableau 1). Plusieurs études montrent, sur la base de tests de liaisons ou de prolifération cellulaire, que leur structure confère aux phytoestrogènes une sélectivité envers le RE  $\beta$  (Miller 2003).

**Tableau 1. Sélectivité des phyto-estrogènes**

Composés	RE $\alpha$		RE $\beta$		select $\beta$
	ARL	Act.E2	ARL	Act.E2	
E2	100	100	100	100	1
Coumestrol	20	102	140	98	
<b>Isoflavones</b>					
Génistéine	4	198	87	182	41
Daidzéine	0,1	97	0,5	80	
Formononétine	0,01	6	0,01	2	
Biochanine A	0,01	36	0,01	53	
<b>Chalcone</b>					
Phlorétine	0,2	49	0,7	10	

### III-1 Actions au niveau nucléaire (effets génomiques)

Leurs effets sur les grandes fonctions cellulaires sont largement démontrés par de nombreuses publications. Le mécanisme d'action de ces produits est complexe et « multi-sites ». Ils ont globalement une action faiblement estrogénique (Miksicek 1993) en agissant à plusieurs niveaux:

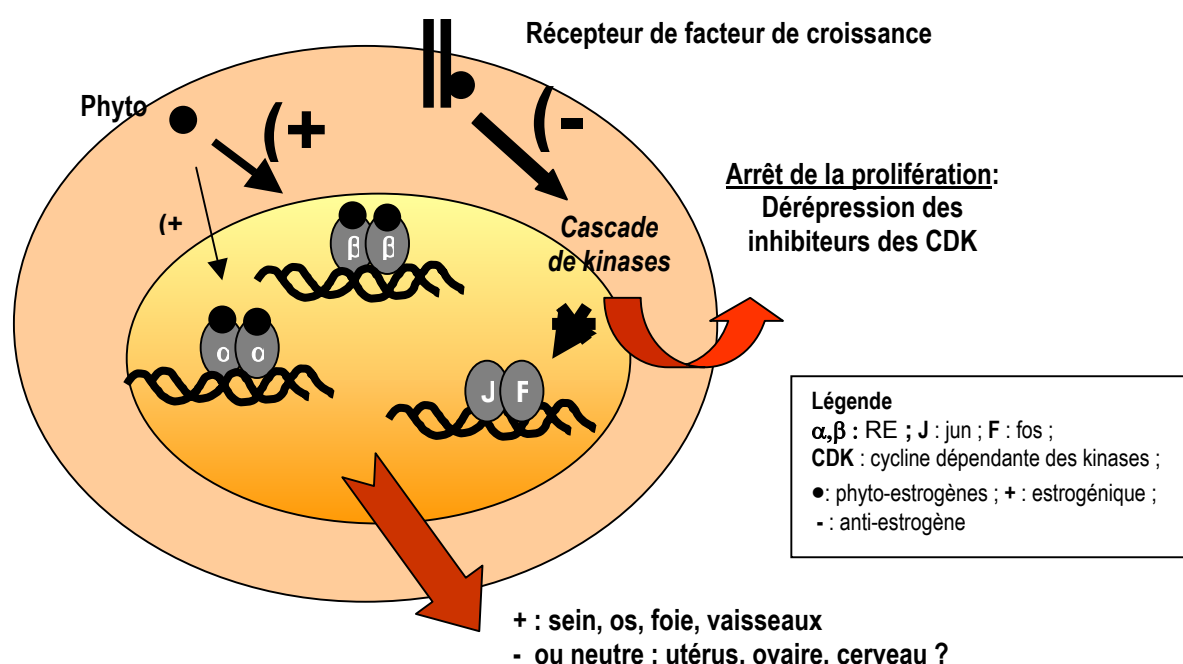
#### III-1-1 Au niveau des récepteurs des estrogènes

Selon leur structure, ils lient les REs avec des affinités différentes pour les 2 isoformes ( $\alpha$  et  $\beta$ ). Génistéine, daidzéine, coumestrol lient préférentiellement la forme  $\beta$  (Kuiper 1997, Booth 1999). L'existence et la position de groupements hydroxyl et phénolique semblent jouer un rôle important. A titre d'exemple la génistéine, qui a une taille voisine de celle de l'estradiol et qui présente des groupements hydroxyl, lie le RE  $\beta$  avec une affinité 21 fois plus importante que pour le RE  $\alpha$  (Bourguet 2000). Dans de nombreux modèles *in vitro* utilisant des cellules co-transfectées avec le gène du RE $\alpha$  ou  $\beta$  et un gène rapporteur comportant un ERE dans sa région promotrice (cellules mammaires cancéreuses : Breinholt 1998 ; levure : Collins 1997), les phytoestrogènes, en l'absence d'estrogènes, lient les REs et induisent des effets biologiques (Mueller 2002). Lors d'expériences de compétition avec l'estradiol pour la liaison avec les REs par ordre décroissant d'affinité pour le RE $\alpha$  : zéaralénone > coumestrol > génistéine > glycéolline > daidzéine. Pour le RE $\beta$  l'ordre décroissant est génistéine > zéaralénone > coumestrol > daidzéine > glycéolline (Nikov 2000). Tous les phyto-estrogènes n'induisent pas la même activité des REs. Les études de



liaison du RE activé sur les ERE de gènes régulés montrent que la liaison du RE lié à un phytoestrogène n'est pas la même pour 2 ERE différents (Nikov 2000).

Les études cristallographiques suggèrent qu'ils induisent des conformations du domaine de liaison du RE différentes de celle induite par la liaison de l'estradiol ou du raloxifène (Pike 1999, Brzezinski, Debi 1999). Les phytoestrogènes tels que la génistéine pourraient ainsi moduler l'activité transcriptionnelle du RE  $\alpha$  ou  $\beta$  de façon particulière en l'amenant, par exemple, à recruter des cofacteurs (An 2001) dont certains sont habituellement non reconnus lors de la liaison du récepteur par l'estradiol (Figtree 2000). Cette hypothèse pourrait expliquer les effets estrogéniques et/ou antiestrogéniques en fonction du tissu analysé et du phytoestrogène étudié (Giovannucci 1999). En étudiant la puissance estrogénique des phytoestrogènes sur des modèles cellulaires, la génistéine et la daidzéine, qui sont les produits les plus souvent retrouvés dans l'alimentation et les compléments alimentaires, stimulent les activités estrogéniques mais sont 10 à 100 fois moins puissants que l'estradiol (Makela 1994, Richard, 2003). Cette observation est à rapprocher des études fondamentales analysant l'affinité du RE activé sur différents ERE.



**Figure 5 : Voies principales d'effets biologiques des phyto-estrogènes;**

### III-1-2 Action au niveau d'autres récepteurs nucléaires

Les phyto-estrogènes sont capables de lier d'autres récepteurs nucléaires stéroïdiens tel que celui des androgènes et ceux de la progestérone (Beck 2003), ce qui rend plus difficile une bonne compréhension de leur mécanisme d'action. Il a été récemment démontré que la génistéine liait PPAR $\gamma$ , induisant ainsi l'adipogenèse et diminuant l'ostéogenèse (Horn-Ross 2000). L'activation de PPAR $\gamma$  se fait à forte dose ( $> 1 \mu\text{M}$ ) et amènerait la diminution de l'activité estrogénique de la génistéine via ER $\beta$  (Dang 2003) à la concentration de  $4 \mu\text{M}$ . Cette concentration supra-physiologique peut être observée après consommation de produits à base de soja. Dans ces conditions, les phyto-estrogènes pourraient être anti-prolifératifs et pro-apoptotiques par cette voie. Le récepteur prégnane X (PXR) est aussi un récepteur nucléaire stéroïdien (Zhang 1999), il est surtout exprimé dans l'intestin et le foie chez l'humain. Phyto-estrogènes et xéno-estrogènes seraient capables de lier ce récepteur, et de réguler l'expression des enzymes capables de les métaboliser (Savas 1999). Par ce biais les phyto-estrogènes pourraient favoriser le métabolisme des estrogènes endogènes.

### **III-1-3 Action sur d'autres fonctions nucléaires**

Une interférence avec les kinases dépendantes des cyclines (CDKs), qui régulent le cycle cellulaire, a aussi été décrite ainsi que d'autres activités biologiques, ce qui démontrent l'aspect réellement polyvalent de ces molécules (apoptose, action immunitaire et anti-oxydante).

L'action sur l'inhibition des topoisomérase II mérite d'être détaillée. Cet enzyme est impliquée dans la réplication de l'ADN et la régulation transcriptionnelle, elle catalyse la réaction de déroulement de l'ADN superenroulé (Wang 2001). La topoisomérase II intervient donc dans les mécanismes de multiplication cellulaire. Un grand nombre d'études montrent que la génistéine peut interagir avec la topoisomérase II (Polkowski 2000 ; Okura A, 1988). Pour certains, elle stabilise le complexe topoisomérase II-ADN favorisant ainsi le clivage de l'ADN (concentration de génistéine supérieure à 10  $\mu$ M) (Markovits 1989) mais elle inhiberait la religation de l'ADN (peut-être en bloquant la réaction d'hydrolyse de l'ATP (Robertson 1999). *In vivo*, des études faites chez le rongeur montrent que la génistéine, à des doses de 50 mg/kg/j en injection intra-péritonéale réduit les volumes de tumeurs de la vessie de près de 40 % en diminuant la croissance cellulaire et en augmentant l'apoptose (Zhou 1998). Les auteurs suggèrent que l'inhibition de la topoisomérase II pourrait être un des mécanismes en jeu.

### **III-1-5 Conclusion**

Au total, il existe de nombreux arguments fondamentaux pour penser que les phyto-estrogènes ont des effets au niveau nucléaire. Cette action paraît se faire surtout par liaison aux récepteurs nucléaires et, plus particulièrement ceux des estrogènes. La conformation du RE lié aux phytoestrogènes paraît différente de celle du RE lié à l'estradiol. L'action biologique peut donc être différente. Une liaison préférentielle des 2 phyto-estrogènes majoritaires du soja et des phyto-estrogènes les plus utilisés en complément alimentaire au RE $\beta$  induisant des effets plutôt agonistes suggérerait que leur effet pourrait être bénéfique. Cependant les effets antiprolifératifs démontrés *in vitro*, en culture de cellules, sont en général obtenus par de fortes doses non utilisées en clinique.

## **III-2 Effets non génomiques des phyto-estrogènes**

### **III-2-1 Définition**

Un effet non génomique des phyto-estrogènes suppose l'absence d'effet direct sur la transcription de gènes pour exercer son effet biologique. Les mécanismes moléculaires de ces effets non génomiques directs sont de type biochimique, tels la phosphorylation de facteurs de croissance ou l'inhibition de tyrosine kinase. Cette définition n'exclut pas l'interaction possible avec les récepteurs  $\alpha$  ou  $\beta$  des estrogènes, mais sans induction de leur activité de transcription. La présence de RE dans la membrane cytoplasmique des cellules de certains organes permet aux phyto-estrogènes d'exercer un effet non génomique. L'interaction compétitive ou non compétitive avec les sites catalytiques de divers complexes enzymatiques permet aux phyto-estrogènes d'exercer des effets cellulaires sur un grand nombre d'enzymes (notamment des enzymes du métabolisme des hormones stéroïdes) et des hormones thyroïdiennes.

### **III-2-2 Interaction avec les récepteurs membranaires des estrogènes**

La présence des ER $\alpha$  et ER $\beta$  à la surface des cellules dans la membrane a été démontrée (Collins 1999). Ces récepteurs sont identiques aux récepteurs nucléaires et sont codés par les mêmes gènes. Il existe un lien entre ces récepteurs membranaires et la voie de transduction des MAPK. Par ce mécanisme les estrogènes peuvent interagir avec la voie de signalisation de facteurs tel que c-Src, Ras, ou Raf, modifier l'activité NO synthase dans la paroi endothéliale des vaisseaux, exercer un effet de neuroprotection, activer la prolifération des cellules de cancer du sein, et agir sur les ostéoblastes pour activer la production osseuse (Schiff 2004).

Les deux iso formes du RE ont été retrouvées dans les mitochondries des cellules normales (Yang 2004, Chen 2004b) et dans les cellules mammaires cancéreuses en cultures (Chen 2004a). Ils pourraient avoir un rôle dans l'induction de l'apoptose notamment dans les

spermatozoïdes où ils seraient responsables d'une libération de cytochrome c (Mishra 2004) qui permettrait d'expliquer, pour partie, les hypofertilités induites par les estrogènes. D'autre part, l'apigénine, via les RE, induit l'apoptose dans les cellules prostatiques en diminuant la production de Bcl2 (Morrissey 2004).

### **III-2-3 Activité anti- facteur de croissance (figure 5)**

Les récepteurs de facteurs de croissance, ont une fonction kinase dans leur partie intracellulaire, qui est activée par la liaison à leur ligand spécifique. Cette fonction va alors phosphoryler un certain nombre de protéines intervenant dans la prolifération cellulaire et la croissance tissulaire, telles que la voie de signalisation dite « ras » et celle de la famille des MAP kinases. La génistéine et d'autres phyto-estrogènes sont des inhibiteurs compétitifs de l'ATP au niveau de son site de liaison kinase (Huang 1999). Il a été mis en évidence par des expériences sur des cellules mammaires humaines cancéreuses dépourvues de récepteurs aux estrogènes. Cet effet survient surtout aux fortes doses de génistéine (>10 micromoles) et semble toucher tous les récepteurs de facteurs de croissance mais à des concentrations variables (Jefferson 2002). Chez le rat, un régime riche en génistéine (>250mg/kg) inhibe la fonction tyrosine kinase de du récepteur de l'EGF (HER1) et de HER2 (ErbB2) dans la prostate (Dalu 1998). Par ce mécanisme, ils peuvent être anti-prolifératifs au niveau des cellules normales et cancéreuses, ainsi qu'au niveau des cellules endothéliales vasculaires en bloquant la néo-angiogenèse. Sous l'influence de ces facteurs de croissance, la phosphorylation des REs au niveau de sa région A/B suffit à induire son activité de transcription, en l'absence de ligand, et ainsi peut maintenir un effet estrogénique dans les tissus privés d'hormones naturelles. L'interférence des phyto-estrogènes avec les facteurs de croissance peut ainsi contribuer à un effet anti-estrogénique sans interaction avec les ERs (Gillesby 1998).

Par contre, Chen 2004a, Chen 2004b trouve une augmentation de l'expression de l'IGF1-R et de l'IRS-1 dans les cellules MCF7 associée à une augmentation de la prolifération sous l'effet de la génistéine à la dose de 1  $\mu$ M. D'autres voies d'activité anti-facteur de croissance ont été décrites mais les données biologiques sont contradictoires (Hsieh 1998, Peterson 1996a, Peterson 1996b, Twaddle 1999). Il a été décrit une diminution de l'IGF-1 et de l'insuline plasmatique associée à une augmentation des IGF-BP lors des régimes végétariens (Kirk 1998).

### **III-2-4 Effets sur le transport des estrogènes**

L'estradiol circule dans le sang lié à une glycoprotéine hépatique, la « sex hormone-binding globulin » (SHBG), qui lie l'estradiol avec une forte affinité mais également la testostérone avec une affinité deux fois plus forte que l'estradiol. Chez la femme, environ 40% de l'estradiol circule lié à la SHBG, et seule une fraction inférieure à 3% est libre, non liée aux protéines. La faible affinité de l'albumine pour les hormones stéroïdes est compensée par une très forte capacité de liaison ce qui explique que plus de 50% de l'oestradiol circule lié à l'albumine. Cependant, cette liaison de faible affinité permet la dissociation rapide du complexe estradiol albumine et sa diffusion vers les cellules (Rosner, Hammond). Ainsi la fraction d'un stéroïde circulant non lié à la SHBG est la fraction biologiquement active pour les cellules ou biodisponible. La concentration de SHBG diminue après la puberté avec un dimorphisme sexuel qui maintient la SHBG à une valeur plus élevée chez la femme que chez l'homme ce qui contribue à un « climat » plus estrogénique chez la femme.

Il a été montré par plusieurs équipes une interaction significative de certains phytoestrogènes avec les sites de liaison de la SHBG. Leur constante d'affinité est habituellement de l'ordre du  $\mu$ M c'est-à-dire 1000 fois moindre que la constante d'affinité de la testostérone qui est de l'ordre du nM. D'après Martin (1996), l'ordre décroissant d'affinité des phyto-estrogènes est le suivant entérolactone > équol > génistéine > entérodol et daidzéine avec des ID<sub>50</sub> de 10 à 50  $\mu$ M. Milligan (1998) ont montré que des concentrations de génistéine, daidzéine, ou coumestrol supérieures à 100  $\mu$ M sont nécessaires pour déplacer la dihydrotestostérone ou l'estradiol de la SHBG. Plus récemment, Dechaud (1999) ont montré que la génistéine mais pas la génistine est capable de déplacer l'oestradiol et la testostérone des sites de liaison de la SHBG avec un ID<sub>50</sub> respectif de 11.5 et 4.5  $\mu$ M. Des résultats analogues ont été rapportés par Hammond. De ces travaux il ressort que pour la plupart des phytoestrogènes les formes glycosylés ne lient pas la SHBG mais que les principaux phyto-estrogènes actifs génistéine, daidzéine, équol, et entérolactone sont capables de

lier la SHBG et qu'aux concentrations habituelles l'hypothèse d'un déplacement de l'estradiol ou de la testostérone des sites de la SHBG est peu probable.

### III-2-4-1 Effets des phyto-estrogènes sur la SHBG hépatique

#### ▪ *In vitro*

Sur la lignée d'hépatome humain HePG2, Mousavi & Adlercreutz (Mousavi 1993) ont rapporté un effet positif des lignanes et des isoflavones sur la production de SHBG *in vitro*. Ainsi l'entérolactone stimule la production de SHBG de façon dose-dépendante pour des concentrations de 1 à 10  $\mu\text{M}$ . Au delà de 50  $\mu\text{M}$  un effet inhibiteur est observé (Adlercreutz 1992). La génistéine stimule la production de SHBG (x 7) par les cellules HePG2 de façon dose-dépendante pour des concentrations de 5 à 30  $\mu\text{M}$ . Pour Raverot (2000) cet effet ne serait indépendant de la présence des ERs et ferait intervenir les propriétés inhibitrices des tyrosine kinases.

#### ▪ *In vivo*.

**Avant la ménopause.** Deux études d'Adlercreutz ont rapporté une corrélation positive entre la consommation de lignanes et d'isoflavones et la concentrations de SHBG chez 62 femmes non ménopausées (Adlercreutz 1999, Adlercreutz 1998). Ces résultats sont en opposition avec les études d'intervention. Ainsi, deux études non randomisées n'ont pas retrouvé d'effet d'un complément de soja (Martini 1999, Cassidy 1994). Une étude randomisée avec cross over a étudié l'effet d'un complément de 64 ou 128 mg d'isoflavone par jour pendant 3 cycles menstruels chez 14 femmes et n'a observé aucun effet sur la SHBG. Une autre étude randomisée avec cross over n'a pas trouvé d'effet de l'administration d'extraits de graines de lin sur la SHBG malgré une augmentation (x 30) de l'excrétion urinaire d'entérolactone (Phipps 1993). Enfin, une étude transversale n'a pas trouvé de corrélation significative entre l'apport d'un complément d'extrait de soja ( $38 \pm 26$  g/jour) et la concentration de la SHBG mesurée à deux reprises au cours du cycle menstruel (J11 et J22) (n=50) (Nagata 1997). Un travail de Duncan (Duncan 2000) rapporte chez 50 femmes que les « producteurs d'équol » capable de métaboliser la daidzéine ont un profil hormonal associant des taux de testostérone plus bas de 30% et de SHBG plus élevée de 50% bien qu'il n'y ait pas de corrélation entre ces paramètres et l'excrétion urinaire d'équol.

**Après la ménopause,** plusieurs études ont montré un effet positif de l'apport de soja sur le niveau de SHBG. Dans une étude randomisée un effet marginal mais significatif est rapporté par Duncan (Duncan 1999b) après administration randomisée et croisée d'un complément de 65 ou 132 mg par jour d'isoflavones pendant 93 jours. L'étude de Baird ne retrouve pas d'effet sur les concentrations de gonadotrophines, FSH et LH, et de SHBG de 97 femmes ménopausées après 4 semaines d'administration randomisée d'un supplément de soja contenant 165mg par jour d'isoflavones. Adlercreutz (1992) rapporte une corrélation positive entre la concentration de SHBG et l'excrétion urinaire de lignanes ( $r=0,38$ ) et de diphénols ( $r=0,4$ ) dans trois groupes de femmes ménopausées (11 omnivores, 10 végétariennes et 9 avec des antécédents de cancer du sein). Une élévation significative de la SHBG a été rapportée par Brzezinski (1997) après administration quotidienne de 30 grammes de « lait » de soja, contenant 69 mg d'isoflavone, pendant 10 semaines. La concentration plasmatique d'isoflavones augmentait en moyenne de  $0,014 \pm 0,01$   $\mu\text{M}$  à  $0,53 \pm 0,19$   $\mu\text{M}$  après administration de soja. Une élévation de la SHBG en moyenne de 25% a également été rapportée par Berrino (2001) chez 312 femmes recevant un régime riche en phytoestrogène associé à un apport faible en hydrate de carbone et en graisses saturées mais riche en acides gras polyinsaturés.

#### ▪ *Chez l'homme*

Une étude a recherché l'effet de la prescription randomisée et croisée d'un régime riche en tofu (290 mg/jour) contrôlé en viande (150 gr par jour) chez 42 hommes. Au cours de la période de régime, l'excrétion urinaire d'isoflavones a été multipliée par 19 et la SHBG a augmenté de 9% (Habito 2000). Dans une autre étude transversale, il a été montré chez 69 hommes âgés de plus de 35 ans que la consommation de soja est en corrélation inverse avec le taux d'estradiol ( $r=-0,32$ ) mais sans association avec la SHBG (Nagata 2000).

L'administration de graines de lin, associée à une excrétion urinaire de 57mmol de lignanes urinaire par jour, chez 7 hommes de 25 à 42 ans, pendant 2 semaines ne modifie pas la SHBG et la concentration de testostérone libre (Shultz 1999).

### III-2-4-2 Conclusion

La génistéine et un certain nombre de phyto-estrogènes, à fortes doses, paraissent avoir des effets anti facteurs de croissance. Les effets hépatiques, *in vivo*, paraissent bien incertains et les études cliniques comportent en général trop peu de sujets pour permettre de conclure sur un éventuel rôle biologique significatif.

### III-2-5 Effets des phyto-estrogène sur la synthèse et le métabolisme des estrogènes

L'influence des phyto-estrogènes sur l'activité enzymatique des enzymes de la synthèse et du métabolisme des hormones stéroïdes est un des domaines les mieux documentés des effets potentiels des phyto-estrogènes.

#### III-2-5-1 La 17 $\beta$ hydroxystéroïde oxydoréductase (17 $\beta$ -HSOR)

Elle intervient dans la conversion d'estrone en estradiol et pour convertir l'estradiol en estrone, présente 2 iso formes (I et II). L'isoforme I convertit l'estrone en estradiol et l'isoforme II convertit, l'estradiol en estrone. Les phytoestrogènes sont capables d'inhiber les 2 iso formes (Makela 1995, Krazeisen 2001, Santti 1998). Cependant la position et le nombre de groupement hydroxyls de l'isoflavone concernée déterminent son activité inhibitrice. Les molécules ayant des groupements hydroxyls en position 5, 7 et 4' sont les plus puissants inhibiteurs de l'isoforme I alors que les composés ayant des groupements hydroxyls en 3, 5 et 7 inhibent l'isoforme II. L'isoforme I est inhibée par la génistéine et le coumestrol à des doses de 0.01 à 1  $\mu$ molaire (Makela 1995).

#### III-2-5-2 Inhibition de l'aromatase

L'aromatase est une enzyme clé de la synthèse des oestrogènes à 18 atomes de carbone à partir des androgènes à 19 atomes de carbone. Ce complexe enzymatique du groupe des cytochromes P450 est codé par le gène *Cyp19*. Son expression dépend de différents promoteurs alternatifs qui expliquent une régulation complexe et une expression spécifique de tissus (Simpson, 2002). Les phytoestrogènes ont une activité anti-aromatase modérée (Kao 1998, Chen 1997) à des concentrations pharmacologiques non atteintes par les régimes alimentaires habituels (entérolactones >flavonoïdes à des concentrations de 150  $\mu$ molaire) et non démontrée *in vivo*. C'est surtout les lignanes qui exercent une activité inhibitrice de l'aromatase et par ce mécanisme pourraient augmenter le rapport androgènes/estrogènes (Pelissero 1996, Adlercreutz 1993, Campbell 1993, Chen, Kao,Laughton 1997, Kao 1998). Les isoflavones sont des inhibiteurs de l'aromatase moins efficaces que les flavones notamment la naringénine (Kellis 1984, Kao 1998). Cependant les effets sont décrits pour des concentrations très élevées  $\geq 100 \mu$ M qui sont peu compatibles pour un effet *in vivo*.

Tableau 2. Phyto-estrogènes à activité inhibitrice de l'aromatase

Nom du composé	Ki ( $\mu$ M)
Biochanine A	12 $\pm$ 5
Génistéine	123 $\pm$ 8

#### III-2-5-3 Inhibition des stéroïdes-sulfatases et des sulfotransférases

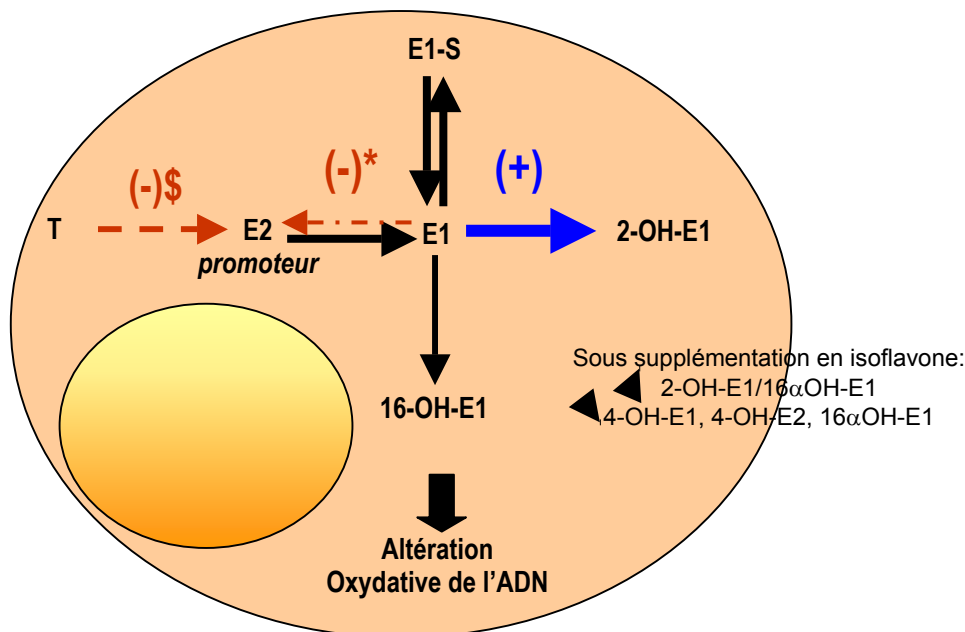
L'addition d'un sulfate à un stéroïde, par une sulfotransférase, augmente la solubilité des stéroïdes et facilite leur diffusion dans les cellules ce qui réduit leur métabolisme et augmente leur demi-vie. Ainsi le sulfate de DHEA, hormone produite principalement par la corticosurrénale chez la femme, et le sulfate d'estrone représentent une réserve

d'androgènes et d'oestrogènes. Les dérivés sulfate des stéroïdes sont habituellement inactifs biologiquement par une faible interaction avec les récepteurs hormonaux. Les stéroïdes-sulfatases inversent la sulfatation induite par la stéroïde sulfotransférase et permettent de régénérer l'hormone active ; leur importance est cruciale dans les états de carence comme pendant la période de la ménopause. Il a été montré que l'activité sulfotransférase est diminuée dans les tissus mammaires cancéreux ce qui pourrait expliquer une augmentation locale de l'activité des oestrogènes (Qian 1998). La concentration des stéroïdes sulfatés est 20 -30 fois supérieure à celle des non sulfatés. La génistéine et la daidzéine sont de puissants inhibiteurs de la stéroïde sulfatase et pourraient donc augmenter la concentration des estrogènes actifs dans les tissus où se trouve localisée la sulfatase (Kirk 2001). Les dérivés sulfoconjugués de la daidzéine sont de puissants inhibiteurs de la sulfatase et de la sulfotransférase (Wong 1997).

**Tableau 3. Inhibition des stéroïdes sulfatases et sulfotransférases par les phyto-estrogènes ; d'après Wong (1997), Kirk (2001)**

Type d'enzyme	Phyto-estrogène	ID <sub>50</sub> (μM)
Stéroïde sulfatase	Génistéine	>25
	Daidzéine	>50
	Daidzéine-4'-O-sulfate	6-8,6
	Daidzéine-7,4'-di-O-sulfate	1.5
Stéroïde sulfotransférase	Génistéine	0,8
	Daidzéine	1,0
	Daidzéine-4'-O-sulfate	>100
	Daidzéine-7,4'-di-O-sulfate	>100

De plus, les phyto-estrogènes augmentent l'inactivation des estrogènes en 2-hydroxyestrone qui a une activité anticancéreuse, mais pas la 16 $\alpha$  hydroxylation qui donne des métabolites cancérogènes (Lu 2000). Ils pourraient, par cette action au niveau de la synthèse des estrogènes, jouer un rôle protecteur contre les cancers hormonodépendants.



**Figure 6. Influence des phyto-estrogènes sur le métabolisme de l'estradiol. (Makela 1995 et 1998, Krazeisen 2002, Kao 1998, Xu 1998)**



#### **III-2-5-4 Effets sur la régulation hypothalamo-hypophysaire de la production d'estrogènes**

La production d'hormones stéroïdes par les gonades est sous le contrôle des gonadotrophines hypophysaires qui stimulent, après interaction avec leur récepteurs membranaires et l'induction d'un signal AMPc, l'expression des enzymes de la synthèse des stéroïdes et ainsi la production d'hormones sexuelles. Les phytoestrogènes peuvent intervenir sur la production des stéroïdes sexuels par un mécanisme de rétrocontrôle négatif de la sécrétion de LH et/ou de FSH ou par une influence sur la sécrétion pulsatile de l'hormone hypothalamique GnRH.

Sur un modèle de souris castrées, une alimentation enrichie en soja a montré un effet oestrogénique sur les organes cibles, qui disparaît en présence d'un antagoniste des oestrogènes, le faslodex (Ashby 2000). Les effets oestrogéniques des phytoestrogènes chez l'animal intact disparaissent, contrairement à ceux du diéthylstilbestrol ou de l'estradiol, si l'animal reçoit un antagoniste du GnRH, l'antarellix, ou un inhibiteur de l'aromatase, l'anastrazole. Ces résultats suggèrent que les phyto-estrogènes chez le rongeur pourraient activer l'axe hypothalamo-hypophysaire chez le rongeur et la production de stéroïdes par les gonades. Cependant, ces effets ne semblent pas spécifiques aux phyto-estrogènes puisque des résultats identiques ont été obtenus chez l'animal recevant un régime avec lait de vache sans phyto-estrogènes.

En revanche un effet inhibiteur sur la sécrétion des gonadotrophines chez l'enfant et chez la femme en activité ovarienne semble possible et est discuté dans la section effets des phytoestrogènes sur les gonadotrophines (Chapitre « Sécurité »).

#### **III-2-5-5 Activité anti-oxydante des phyto-estrogènes**

Les espèces réactives de l'oxygène, telles que les radicaux hydroxylés, induisent des altérations de l'ADN, des protéines, et des lipides. Elles jouent un rôle dans les processus de cancérogenèse et dans le développement des maladies cardiovasculaires (voir chapitres cancer et maladies cardio-vasculaires). Les études du pouvoir anti-oxydant des phyto-estrogènes sont rares. En utilisant un modèle *in vitro* d'altération oxydative de l'ADN, Harper (1999) ont montré que certains phyto-estrogènes pouvaient avoir un pouvoir anti-oxydant mais à des doses pharmacologiques largement supérieures à celles que l'on est susceptible de rencontrer dans les conditions physiologiques (Harper 1999). Par ordre d'efficacité décroissante, les auteurs trouvaient le pouvoir anti-oxydant de la génistéine supérieur à celui de l'équol, lui même supérieur à celui de l'entérolactone. L'IC<sub>50</sub> de la génistéine était de 9 µM. Ce classement en fonction du pouvoir anti-oxydant est différent de celui rapporté dans le chapitre maladies cardio-vasculaires où le pouvoir antioxydant est estimé non vis à vis de l'ADN, mais vis à vis des LDL. Cette apparente contradiction illustre bien que ce type d'étude fournit des résultats dont la portée est limitée au système redox étudié.

La génistéine protège contre la peroxydation des lipides et l'oxydation des LDL (Wilson 2002, Patel 2001), mais à des concentrations extra-physiologiques (voir le chapitre bio-disponibilité). L'acide ascorbique régénère les polyphénols oxydés en polyphénols réduits *in vitro* et probablement *in vivo*. L'acide ascorbique et les polyphénols agissent en synergie (Kalyanaraman 1992). C'est la raison pour laquelle l'acide ascorbique paraît amplifier la protection anti-oxydante des LDL par la génistéine, la daidzéine et l'équol (Patel 2002 ; Huang, 2000, Noroozi 1998).

#### **III-2-5-7 Effets sur la peroxydase thyroïdienne (TPO)**

La peroxydase thyroïdienne (TPO) est une enzyme de la synthèse des hormones thyroïdiennes qui catalyse l'oxydation des iodures en radical iode I permettant l'iodination des tyrosines en tri-iodothyronines (T3) et thyroxine (T4). *In vitro*, les phytoestrogènes peuvent exercer un effet inhibiteur sur la TPO et ainsi réduire la production d'hormones thyroïdiennes. Ainsi la génistéine, la daidzéine et la biochanine, par une analogie structurale avec les hormones thyroïdiennes inhibent *in vitro* l'activité TPO (Divi 1996 et 1997).

Cependant en présence d'iodure cet effet inhibiteur disparaît. Les conséquences de cet effet et seront analysées au chapitre phyto-estrogènes et fonction thyroïdienne chez l'homme.

**Tableau 4. Effets inhibiteurs des phytoestrogènes sur l'activité de la peroxydase thyroïdienne (TPO) (Divi 1996 et 1997)**

Composé	Concentration (M)	% inhibition
Génistéine	3,2	50
Daidzéine	7,6	50
Biochanine A	6	15
Flavonone	> 1500	2
Flavone	> 1500	7

### **III-3 Conclusion sur les mécanismes des phyto-estrogènes**

Au total, les données fondamentales montrent que la génistéine et la daidzéine lient les récepteurs aux estrogènes avec, cependant, une plus grande affinité pour le RE  $\beta$ . Le récepteur activé par les phyto-estrogènes prend une conformation différente de celle qu'il prend avec l'estradiol et va induire des effets agonistes ou antagonistes qui sont fonction du tissu considéré et du gène régulé. Ces isoflavones ont aussi des effets non génomiques qui peuvent être médiés par les récepteurs des estrogènes ou par des effets directs. Ces actions qui se font le plus souvent à des fortes concentrations provoquent un blocage de la voie des facteurs de croissance, une modification du métabolisme des estrogènes, un certain pouvoir anti-oxydant et surtout perturbent la biosynthèse des hormones thyroïdiennes. Cette dernière activité biologique semble être la plus retrouvée chez l'humain.

### **IV- Conclusion générale**

Le mécanisme d'action des estrogènes apparaît beaucoup plus complexe qu'on ne le pensait. Si leurs activités biologiques semblent passer le plus souvent par une voie génomique via des récepteurs nucléaires, une partie non négligeable de leur activité s'explique par le contrôle d'autres voies métaboliques, notamment celle des facteurs de croissance. *In vitro*, les isoflavones sont capables de lier les récepteurs estrogéniques et d'avoir des effets biologiques soit de type estrogénique, soit de type antiestrogénique selon le tissu et le gène considéré. C'est pour cette raison que certains auteurs les classent dans la famille des modulateurs des récepteurs des estrogènes. Des effets biologiques de ces produits, notamment de type anti facteur de croissance, pourraient ne pas passer par la voie des récepteurs nucléaires.



## Points clés et recommandations

### Points clés

- ❖ Les estrogènes agissent sur leurs tissus cibles principalement par l'intermédiaire de 2 protéines nucléaires appelés récepteurs  $\alpha$  et  $\beta$  des estrogènes. Ces derniers présentent :
  - un domaine de liaison à l'ADN très voisin (94% d'homologie) ;
  - un domaine de liaison à l'hormone d'homologie plus faible (50%) ;
  - des domaines de régulation transcriptionnelle très différents (~17% d'homologie) ce qui laisse supposer des fonctions biologiques différentes pour les deux types de récepteur aux estrogènes.
- ❖ Pour qu'il existe un effet estrogénique :
  - le dimère estradiol-récepteur des estrogènes fixé sur l'ADN doit aussi lier d'autres protéines nucléaires, appelées co-activateurs, nécessaires à la régulation de la transcription des gènes ;
  - En cas de liaison du récepteur des estrogènes par une molécule antagoniste telle que le tamoxifène, ce sont des co-inhibiteurs qui seront liés par le récepteur des estrogènes, empêchant ainsi l'activité estrogénique.
- ❖ Les estrogènes peuvent avoir d'autres effets dits non génomiques situés pour partie au niveau de la membrane cytoplasmique. Par cette voie les estrogènes pourraient avoir des effets sur la voie métabolique de plusieurs familles de facteur de croissance en interférant, en particulier avec le complexe AP1.
- ❖ Les modulateurs des récepteurs des estrogènes (SERM) sont capables d'avoir des effets estrogéniques ou antiestrogéniques selon le tissu, et dans le même tissu en fonction du gène considéré. Leur structure biochimique influe aussi beaucoup sur leurs effets biologiques.
- ❖ Les isoflavones peuvent être considérés comme des SERM naturels qui lient les récepteurs des estrogènes avec une faible affinité. Ils sont en général plus affins pour le récepteur  $\beta$ . Leur fonctionnalité est plus dans le sens d'un effet estrogénique dans beaucoup de tissus. Cependant ils semblent diminuer la biosynthèse des estrogènes. L'effet global pourrait donc être un effet estrogénique faible.
- ❖ Les isoflavones peuvent avoir d'autres fonctions biologiques telles que, par exemple, celles d'être inhibiteur de la fonction tyrosine kinase de certains récepteurs membranaires de facteurs de croissance ou d'avoir des propriétés anti-oxydante. Ces effets biologiques semblent pour chacun d'entre eux optimaux pour des concentrations différentes du produit utilisé ce qui rend particulièrement délicat leur évaluation en clinique.

### Les points obscurs

- ❖ Les isoflavones ont, *in vitro*, des effets biologiques indéniables mais extrêmement polymorphes qui sont parfois très éloignés d'un effet agoniste ou antagoniste des estrogènes et ces effets diffèrent selon l'isoflavone considéré. *In vivo*, les études concernent des mélanges de phytoestrogènes sous forme active et/ou inactive qui rendent quasi impossible leur interprétation. L'ingestion quotidienne d'une quantité de flavonoïdes plus ou moins importante rend difficile l'appréciation de l'utilité d'un rajout, si important soit-il.

## Recommandations

### 1/ Recommandations à visée de connaissance et de recherche

Développer des études cliniques utilisant des produits purs, sans association, avec des marqueurs de réponses biologiques fiables afin de juger, dans un premier temps, sur des critères objectifs l'impact que peuvent avoir ces produits sur l'organisme. Ces études d'efficacité devraient être suivies d'études cliniques recherchant les effets bénéfiques escomptés aux doses efficaces démontrées et les potentiels effets délétères des doses élevées.

- Adlercreutz H, Hockerstedt K, Bannwart C, Bloigu S, Hamalainen E, Fotsis T, Ollus A. (1987) Effects of dietary components, including lignans and phytoestrogens, on enterohepatic circulation and liver metabolism of oestrogens and on sex hormone binding globulin (SHBG). *J Steroid Biochem.*; 27: 1135-1144
- Adlercreutz, H., Bannwart, C., Wahala, K., Makela, T., et al. (1993) Inhibition of human aromatase by mammalian lignans and isoflavonoid phytoestrogens. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 44, pp.147-53.
- Adlercreutz, H., Hockerstedt, K., Bannwart, C., Hamalainen, E., et al. (1998) Association between dietary fibre, urinary excretion of lignans and isoflavonic phytoestrogens, and plasma non-protein bound sex hormones in relation to breast cancer. *Prog Cancer Res Ther*, 35, pp.409-12.
- Adlercreutz, H., Mousavi, Y., Clark, J., Hockerstedt, K., et al. (1992) Dietary phytoestrogens and cancer: in vitro and in vivo studies. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 41, pp.331-7.
- An, J., Tzagarakis-Foster, C., Scharschmidt, T.C., Lomri, N., et al. (2001) Estrogen receptor beta-selective transcriptional activity and recruitment of coregulators by phytoestrogens. *J Biol Chem*, 276, pp.17808-14.
- Aronica, S.M., Katzenellenbogen, B.S. (1993) Stimulation of estrogen receptor-mediated transcription and alteration in the phosphorylation state of the rat uterine estrogen receptor by estrogen, cyclic adenosine monophosphate, and insulin-like growth factor-I. *Mol Endocrinol*, 7, pp.743-52.
- Ashby, J., Tinwell, H., Odum, J., Kimber, I., et al. (2000) Diet and the aetiology of temporal advances in human and rodent sexual development. *J Appl Toxicol*, 20, pp.343-7.
- Ast, G. (2004) How did alternative splicing evolve? *Nat Rev Genet*, 5, pp.773-82.
- Beck, V., Unterrieder, E., Krenn, L., Kubelka, W., et al. (2003) Comparison of hormonal activity (estrogen, androgen and progestin) of standardized plant extracts for large scale use in hormone replacement therapy. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 84, pp.259-68.
- Berrino, F., Bellati, C., Secreto, G., Camerini, E., et al. (2001) Reducing bioavailable sex hormones through a comprehensive change in diet: the diet and androgens (DIANA) randomized trial. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 10, pp.25-33.
- Booth, C., Hargreaves, D.F., Hadfield, J.A., McGown, A.T., et al. (1999) Isoflavones inhibit intestinal epithelial cell proliferation and induce apoptosis in vitro. *Br J Cancer*, 80, pp.1550-7.
- Bourguet, W., Germain, P., Gronemeyer, H. (2000) Nuclear receptor ligand-binding domains: three-dimensional structures, molecular interactions and pharmacological implications. *Trends Pharmacol Sci*, 21, pp.381-8.
- Brandenberger, A.W., Tee, M.K., Lee, J.Y., Chao, V., et al. (1997) Tissue distribution of estrogen receptors alpha (ER-alpha) and beta (ER-beta) mRNA in the midgestational human fetus. *J Clin Endocrinol Metab*, 82, pp.3509-12.
- Breinholt, V., Larsen, J.C. (1998) Detection of weak estrogenic flavonoids using a recombinant yeast strain and a modified MCF7 cell proliferation assay. *Chem Res Toxicol*, 11, pp.622-9.
- Brzezinski, A., Adlercreutz, H., shaul, R., Rosler, A., et al. (1997) Short-term effects of phytoestrogen-rich diet on postmenopausal women. *J North American Menopause Soc*, 4, pp.89-94.
- Brzezinski, A., Debi, A. (1999) Phytoestrogens: the "natural" selective estrogen receptor modulators? *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 85, pp.47-51.
- Brzozowski, A.M., Pike, A.C., Dauter, Z., Hubbard, R.E., et al. (1997) *Molecular basis of agonism and antagonism in the oestrogen receptor*. *Nature*, 389, pp.753-8.
- Byers, M., Kuiper, G.G., Gustafsson, J.A., Park-Sarge, O.K. (1997) Estrogen receptor-beta mRNA expression in rat ovary: down-regulation by gonadotropins. *Mol Endocrinol*, 11, pp.172-82.
- Campbell, D.R., Kurzer, M.S. (1993) Flavonoid inhibition of aromatase enzyme activity in human preadipocytes. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 46, pp.381-8.
- Cassidy, A., Bingham, S., Setchell, K.D. (1994) Biological effects of a diet of soy protein rich in isoflavones on the menstrual cycle of premenopausal women. *Am J Clin Nutr*, 60, pp.333-40.
- Castro-Rivera, E., Safe, S. (2003) 17 beta-estradiol- and 4-hydroxytamoxifen-induced transactivation in breast, endometrial and liver cancer cells is dependent on ER-subtype, cell and promoter context. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 84, pp.23-31.
- Chawla, A., Repa, J.J., Evans, R.M., Mangelsdorf, D.J. (2001) *Nuclear receptors and lipid physiology: opening the X-files*. *Science*, 294, pp.1866-70.
- Chen, J.D., Evans, R.M. (1995) A transcriptional co-repressor that interacts with nuclear hormone receptors. *Nature*, 377, pp.454-7.
- Chen, J.Q., Delannoy, M., Cooke, C., Yager, J.D. (2004a) Mitochondrial localization of ERalpha and ERbeta in human MCF7 cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 286, pp.E1011-22.
- Chen, J.Q., Eshete, M., Alworth, W.L., Yager, J.D. (2004b) Binding of MCF-7 cell mitochondrial proteins and recombinant human estrogen receptors alpha and beta to human mitochondrial DNA estrogen response elements. *J Cell Biochem*, 93, pp.358-73.
- Chen, S., Kao, Y.C., Laughton, C.A. (1997) Binding characteristics of aromatase inhibitors and phytoestrogens to human aromatase. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 61, pp.107-15.
- Clarke, R., Hilakivi-Clarke, L., Cho, E., James, M.R., et al. (1996) *Estrogens, phytoestrogens, and breast cancer*. *Adv Exp Med Biol*, 401, pp.63-85.
- Clifton-Bligh RJ, de Zegher F, Wagner RL, Collingwood TN, Francois I, Van Helvoirt M, Fletterick RJ, Chatterjee VK. A novel TR beta mutation (R383H) in resistance to thyroid hormone syndrome predominantly impairs corepressor release and negative transcriptional regulation. *Mol Endocrinol*. 1998 May;12(5):609-21.
- Collingwood, T.N., Urv, F.D., Wolffe, A.P. (1999) Nuclear receptors: coactivators, corepressors and chromatin remodeling in the control of transcription. *J Mol Endocrinol*, 23, pp.255-75.
- Collins, B.M., McLachlan, J.A., Arnold, S.F. (1997) The estrogenic and antiestrogenic activities of phytochemicals with the human estrogen receptor expressed in yeast. *Steroids*, 62, pp.365-72.

- Collins, P., Webb, C. (1999) *Estrogen hits the surface*. *Nat Med*, 5, pp.1130-1.
- Couse, J.F., Korach, K.S. (1999) Estrogen receptor null mice: what have we learned and where will they lead us? *Endocr Rev*, 20, pp.358-417.
- Couse, J.F., Lindzey, J., Grandien, K., Gustafsson, J.A., et al. (1997) Tissue distribution and quantitative analysis of estrogen receptor-alpha (ERalpha) and estrogen receptor-beta (ERbeta) messenger ribonucleic acid in the wild-type and ERalpha-knockout mouse. *Endocrinology*, 138, pp.4613-21.
- Cowley, S.M., Hoare, S., Mosselman, S., Parker, M.G. (1997) *Estrogen receptors alpha and beta form heterodimers on DNA*. *J Biol Chem*, 272, pp.19858-62.
- Cowley, S.M., Parker, M.G. (1999) A comparison of transcriptional activation by ER alpha and ER beta. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 69, pp.165-75.
- Curtis, S.H., Korach, K.S. (2000) Steroid receptor knockout models: phenotypes and responses illustrate interactions between receptor signaling pathways in vivo. *Adv Pharmacol*, 47, pp.357-80.
- Curtis, S.W., Clark, J., Myers, P., Korach, K.S. (1999) Disruption of estrogen signaling does not prevent progesterone action in the estrogen receptor alpha knockout mouse uterus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96, pp.3646-51.
- Curtis, S.W., Washburn, T., Sewall, C., DiAugustine, R., et al. (1996) Physiological coupling of growth factor and steroid receptor signaling pathways: estrogen receptor knockout mice lack estrogen-like response to epidermal growth factor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93, pp.12626-30.
- Dalu, A., Haskell, J.F., Coward, L., Lamartiniere, C.A. (1998) Genistein, a component of soy, inhibits the expression of the EGF and ErbB2/Neu receptors in the rat dorsolateral prostate. *Prostate*, 37, pp.36-43.
- Dang, Z.C., Audinot, V., Papapoulos, S.E., Boutin, J.A., et al. (2003) Peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) as a molecular target for the soy phytoestrogen genistein. *J Biol Chem*, 278, pp.962-7.
- Danzo, B.J. (1997) Environmental xenobiotics may disrupt normal endocrine function by interfering with the binding of physiological ligands to steroid receptors and binding proteins. *Environ Health Perspect*, 105, pp.294-301.
- Das, S.K., Taylor, J.A., Korach, K.S., Paria, B.C., et al. (1997) Estrogenic responses in estrogen receptor-alpha deficient mice reveal a distinct estrogen signaling pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94, pp.12786-91.
- Dechaud, H., Ravard, C., Claustrat, F., de la Perriere, A.B., et al. (1999) *Xenoestrogen interaction with human sex hormone-binding globulin (hSHBG)*. *Steroids*, 64, pp.328-34.
- Divi, R.L., Chang, H.C., Doerge, D.R. (1997) Anti-thyroid isoflavones from soybean: isolation, characterization, and mechanisms of action. *Biochem Pharmacol*, 54, pp.1087-96.
- Divi, R.L., Doerge, D.R. (1996) Inhibition of thyroid peroxidase by dietary flavonoids. *Chem Res Toxicol*, 9, pp.16-23.
- Duncan, A.M., Merz, B.E., Xu, X., Nagel, T.C., et al. (1999b) Soy isoflavones exert modest hormonal effects in premenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab*, 84, pp.192-7.
- Duncan, A.M., Merz-Demlow, B.E., Xu, X., Phipps, W.R., et al. (2000) Premenopausal equol excretors show plasma hormone profiles associated with lowered risk of breast cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 9, pp.581-6.
- Eddy, E.M., Washburn, T.F., Bunch, D.O., Goulding, E.H., et al. (1996) Targeted disruption of the estrogen receptor gene in male mice causes alteration of spermatogenesis and infertility. *Endocrinology*, 137, pp.4796-805.
- Enmark, E., Peltö-Huikko, M., Grandien, K., Lagercrantz, S., et al. (1997) Human estrogen receptor beta-gene structure, chromosomal localization, and expression pattern. *J Clin Endocrinol Metab*, 82, pp.4258-65.
- Figtree, G.A., Griffiths, H., Lu, Y.Q., Webb, C.M., et al. (2000) Plant-derived estrogens relax coronary arteries in vitro by a calcium antagonistic mechanism. *J Am Coll Cardiol*, 35, pp.1977-85.
- Figtree, G.A., McDonald, D., Watkins, H., Channon, K.M. (2003) Truncated estrogen receptor alpha 46-kDa isoform in human endothelial cells: relationship to acute activation of nitric oxide synthase. *Circulation*, 107, pp.120-6.
- Fisher CR, Graves KH, Parlow AF, Simpson ER. Characterization of mice deficient in aromatase (ArKO) because of targeted disruption of the cyp19 gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998 Jun 9;95(12):6965-70.
- Fitzpatrick, S.L., Funkhouser, J.M., Sindoni, D.M., Stevis, P.E., et al. (1999) *Expression of estrogen receptor-beta protein in rodent ovary*. *Endocrinology*, 140, pp.2581-91.
- Flouriot, G., Brand, H., Denger, S., Metivier, R., et al. (2000) Identification of a new isoform of the human estrogen receptor-alpha (hER-alpha) that is encoded by distinct transcripts and that is able to repress hER-alpha activation function 1. *Embo J*, 19, pp.4688-700.
- Garcia Pedrero, J.M., Zuazua, P., Martinez-Campa, C., Lazo, P.S., et al. (2003) The naturally occurring variant of estrogen receptor (ER) ERDeltaE7 suppresses estrogen-dependent transcriptional activation by both wild-type ERalpha and ERbeta. *Endocrinology*, 144, pp.2967-76.
- Ghosh, D., Bagenin, A., Taylor, J.A., Lubahn, D.B. (1998) Methoxychlor acts in ER-KO mice through an ER independent mechanism (Abstract). 80th Annual Meeting of the Endocrine Society, New-Orleans (LA). pp.1-569.
- Gillesby, B., Zacharewski, T. (1998) Xenostrogen: mechanism of action and strategie for identification and assessment. *Environ Toxicol Chem-Annual Review*, 17, pp.3-14.
- Giovannucci, E. (1999) Insulin-like growth factor-I and binding protein-3 and risk of cancer. *Horm Res*, 51 Suppl 3, pp.34-41.
- Glass, C.K., Rosenfeld, M.G. (2000) The coregulator exchange in transcriptional functions of nuclear receptors. *Genes Dev*, 14, pp.121-41.
- Goldenberg, R.L., Vaitukaitis, J.L., Ross, G.T. (1972) Estrogen and follicle stimulation hormone interactions on follicle growth in rats. *Endocrinology*, 90, pp.1492-8.
- Habito, R.C., Montalto, J., Leslie, E., Ball, M.J. (2000) Effects of replacing meat with soyabean in the diet on sex hormone concentrations in healthy adult males. *Br J Nutr*, 84, pp.557-63.
- Harper, A., Kerr, D.J., Gescher, A., Chipman, J.K. (1999) Antioxidant effects of isoflavonoids and lignans, and protection against DNA oxidation. *Free Radic Res*, 31, pp.149-60.

- Hawkins, M.B., Thornton, J.W., Crews, D., Skipper, J.K., et al. (2000) Identification of a third distinct estrogen receptor and reclassification of estrogen receptors in teleosts. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97, pp.10751-6.
- Henttu, P.M., Kalkhoven, E., Parker, M.G. (1997) AF-2 activity and recruitment of steroid receptor coactivator 1 to the estrogen receptor depend on a lysine residue conserved in nuclear receptors. *Mol Cell Biol*, 17, pp.1832-9.
- Horn-Ross, P.L., Barnes, S., Lee, M., Coward, L., et al. (2000) Assessing phytoestrogen exposure in epidemiologic studies: development of a database (United States). *Cancer Causes Control*, 11, pp.289-98.
- Hsieh, C.Y., Santell, R.C., Haslam, S.Z., Helferich, W.G. (1998) Estrogenic effects of genistein on the growth of estrogen receptor-positive human breast cancer (MCF-7) cells in vitro and in vivo. *Cancer Res*, 58, pp.3833-8.
- Huang, R.Q., Fang, M.J., Dillon, G.H. (1999) The tyrosine kinase inhibitor genistein directly inhibits GABAA receptors. *Brain Res Mol Brain Res*, 67, pp.177-83.
- Huang MH, Harrison GG, Mohamed MM, Gornbein JA, Henning SM, Go VL, Greendale GA. (2000) Assessing the accuracy of a food frequency questionnaire for estimating usual intake of phytoestrogens. *Nutr Cancer*;37(2):145-54.
- Jefferson, W.N., Couse, J.F., Padilla-Banks, E., Korach, K.S., et al. (2002) Neonatal exposure to genistein induces estrogen receptor (ER)alpha expression and multioocyte follicles in the maturing mouse ovary: evidence for ERbeta-mediated and nonestrogenic actions. *Biol Reprod*, 67, pp.1285-96.
- Joab, I., Radanyi, C., Renoir, M., Buchou, T., et al. (1984) Common non-hormone binding component in non-transformed chick oviduct receptors of four steroid hormones. *Nature*, 308, pp.850-3.
- Kahlert, S., Nuedling, S., van Eickels, M., Vetter, H., et al. (2000) *Estrogen receptor alpha rapidly activates the IGF-1 receptor pathway. J Biol Chem*, 275, pp.18447-53.
- Kalyanaraman, B., Darley-Usmar, V.M., Wood, J., Joseph, J., et al. (1992) Synergistic interaction between the probucoyl phenoxyl radical and ascorbic acid in inhibiting the oxidation of low density lipoprotein. *J Biol Chem*, 267, pp.6789-95.
- Kao, Y.C., Zhou, C., Sherman, M., Laughton, C.A., et al. (1998) Molecular basis of the inhibition of human aromatase (estrogen synthetase) by flavone and isoflavone phytoestrogens: A site-directed mutagenesis study. *Environ Health Perspect*, 106, pp.85-92.
- Kellis, J.T., Jr., Vickery, L.E. (1984) Inhibition of human estrogen synthetase (aromatase) by flavones. *Science*, 225, pp.1032-4.
- Kirk, C.J., Harris, R.M., Wood, D.M., Waring, R.H., et al. (2001) Do dietary phytoestrogens influence susceptibility to hormone-dependent cancer by disrupting the metabolism of endogenous oestrogens? *Biochem Soc Trans*, 29, pp.209-16.
- Kirk, E.A., Sutherland, P., Wang, S.A., Chait, A., et al. (1998) Dietary isoflavones reduce plasma cholesterol and atherosclerosis in C57BL/6 mice but not LDL receptor-deficient mice. *J Nutr*, 128, pp.954-9.
- Korach, K.S. (1994) Insights from the study of animals lacking functional estrogen receptor. *Science*, 266, pp.1524-7.
- Korach, K.S., Couse, J.F., Curtis, S.W., Washburn, T.F., et al. (1996) Estrogen receptor gene disruption: molecular characterization and experimental and clinical phenotypes. *Recent Prog Horm Res*, 51, pp.159-86; discussion 186-8.
- Korach, K.S., Taki, M., Kimbro, K.S. (1997) *The effects of estrogen receptor disruption on bone*. IN: Paoletti, R. ed. *Women's health and menopause*. Amsterdam, Kluwer Academic. 69-73.
- Krazeisen, A., Breitling, R., Moller, G., Adamski, J. (2001) Phytoestrogens inhibit human 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 5. *Mol Cell Endocrinol*, 171, pp.151-62.
- Krazeisen, A., Breitling, R., Moller, G., Adamski, J. (2002) Human 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 5 is inhibited by dietary flavonoids. *Adv Exp Med Biol*, 505, pp.151-61.
- Krege, J.H., Hodgin, J.B., Couse, J.F., Enmark, E., et al. (1998) Generation and reproductive phenotypes of mice lacking estrogen receptor beta. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95, pp.15677-82.
- Kuiper, G.G., Carlsson, B., Grandien, K., Enmark, E., et al. (1997) Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors alpha and beta. *Endocrinology*, 138, pp.863-70.
- Kuiper, G.G., Enmark, E., Pelto-Huikko, M., Nilsson, S., et al. (1996) Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93, pp.5925-30.
- Kuiper, G.G., Lemmen, J.G., Carlsson, B., Corton, J.C., et al. (1998) Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor beta. *Endocrinology*, 139, pp.4252-63.
- Kumar, V., Green, S., Staub, A., Chambon, P. (1986) Localisation of the oestradiol-binding and putative DNA-binding domains of the human oestrogen receptor. *Embo J*, 5, pp.2231-6.
- Le Bail, J.C., Champavier, Y., Chulia, A.J., Habrioux, G. (2000) Effects of phytoestrogens on aromatase, 3beta and 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase activities and human breast cancer cells. *Life Sci*, 66, pp.1281-91.
- Leygue, E., Dotzlaw, H., Watson, P.H., Murphy, L.C. (1998) Altered estrogen receptor alpha and beta messenger RNA expression during human breast tumorigenesis. *Cancer Res*, 58, pp.3197-201.
- Liu, M.M., Albanese, C., Anderson, C.M., Hilty, K., et al. (2002) Opposing action of estrogen receptors alpha and beta on cyclin D1 gene expression. *J Biol Chem*, 277, pp.24353-60.
- Losel, R., Wehling, M. (2003a) Nongenomic actions of steroid hormones. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 4, pp.46-56.
- Losel, R.M., Falkenstein, E., Feuring, M., Schultz, A., et al. (2003b) *Nongenomic steroid action: controversies, questions, and answers. Physiol Rev*, 83, pp.965-1016.
- Lu, L.J., Cree, M., Josyula, S., Nagamani, M., et al. (2000) Increased urinary excretion of 2-hydroxyestrone but not 16alpha-hydroxyestrone in premenopausal women during a soya diet containing isoflavones. *Cancer Res*, 60, pp.1299-305.
- Mader, S., Chambon, P., White, J.H. (1993) Defining a minimal estrogen receptor DNA binding domain. *Nucleic Acids Res*, 21, pp.1125-32.

- Makela, S., Davis, V.L., Tally, W.C., Korkman, J., et al. (1994) Dietary Estrogens Act through Estrogen Receptor-Mediated Processes and Show No Antiestrogenicity in Cultured Breast Cancer Cells. *Environ Health Perspect*, 102, pp.572-8.
- Makela, S., Poutanen, M., Kostian, M.L., Lehtimäki, N., et al. (1998) Inhibition of 17 $\beta$ -hydroxysteroid oxidoreductase by flavonoids in breast and prostate cancer cells. *Proc Soc Exp Biol Med*, 217, pp.310-6.
- Makela, S., Poutanen, M., Lehtimäki, J., Kostian, M.L., et al. (1995) Estrogen-specific 17  $\beta$ -hydroxysteroid oxidoreductase type 1 (E.C. 1.1.1.62) as a possible target for the action of phytoestrogens. *Proc Soc Exp Biol Med*, 208, pp.51-9.
- Markovits, J., Linassier, C., Fosse, P., Couprie, J., et al. (1989) Inhibitory effects of the tyrosine kinase inhibitor genistein on mammalian DNA topoisomerase II. *Cancer Res*, 49, pp.5111-7.
- Martin, M.E., Haourigui, M., Pelissero, C., Benassayag, C., et al. (1996) *Interactions between phytoestrogens and human sex steroid binding protein*. *Life Sci*, 58, pp.429-36.
- Martini, M.C., Dancisak, B.B., Haggans, C.J., Thomas, W., et al. (1999) *Effects of soy intake on sex hormone metabolism in premenopausal women*. *Nutr Cancer*, 34, pp.133-9.
- Matsushita A, Misawa H, Andoh S, Natsume H, Nishiyama K, Sasaki S, Nakamura H. Very strong correlation between dominant negative activities of mutant thyroid hormone receptors and their binding avidity for corepressor SMRT. *J Endocrinol*. 2000 Dec;167(3):493-503.
- Migliaccio, A., Castoria, G., Di Domenico, M., De Falco, A., et al. (2002) *Src is an initial target of sex steroid hormone action*. *Ann N Y Acad Sci*, 963, pp.185-90.
- Miksicsek, R.J. (1993) Commonly occurring plant flavonoids have estrogenic activity. *Mol Pharmacol*, 44, pp.37-43.
- Miksicsek, R.J. (1995) Estrogenic flavonoids: structural requirements for biological activity. *Proc Soc Exp Biol Med*, 208, pp.44-50.
- Miller, C.P., Collini, M.D., Harris, H.A. (2003) Constrained phytoestrogens and analogues as ER $\beta$  selective ligands. *Bioorg Med Chem Lett*, 13, pp.2399-403.
- Milligan, S.R., Khan, O., Nash, M. (1998) Competitive binding of xenobiotic oestrogens to rat alpha-fetoprotein and to sex steroid binding proteins in human and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) plasma. *Gen Comp Endocrinol*, 112, pp.89-95.
- Mishra, D.P., Shaha, C. (2004) Estrogen induced spermatogenic cell apoptosis occur via the mitochondrial pathway: role of superoxide and nitric oxide. *J Biol Chem*.
- Montano, M.M., Muller, V., Trobaugh, A., Katzenellenbogen, B.S. (1995) The carboxy-terminal F domain of the human estrogen receptor: role in the transcriptional activity of the receptor and the effectiveness of antiestrogens as estrogen antagonists. *Mol Endocrinol*, 9, pp.814-25.
- Morrissey, C., O'Neill, A., Spengler, B., Christoffel, V., et al. (2004) Apigenin drives the production of reactive oxygen species and initiates a mitochondrial mediated cell death pathway in prostate epithelial cells. *Prostate*.
- Mosselman, S., Polman, J., Dijkema, R. (1996) ER  $\beta$ : identification and characterization of a novel human estrogen receptor. *FEBS Lett*, 392, pp.49-53.
- Mousavi, Y., Adlercreutz, H. (1993) Genistein is an effective stimulator of sex hormone-binding globulin production in hepatocarcinoma human liver cancer cells and suppresses proliferation of these cells in culture. *Steroids*, 58, pp.301-4.
- Mueller, S.O. (2002) Overview of in vitro tools to assess the estrogenic and antiestrogenic activity of phytoestrogens. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 777, pp.155-65.
- Nagata, C., Inaba, S., Kawakami, N., Kakizoe, T., et al. (2000) Inverse association of soy product intake with serum androgen and estrogen concentrations in Japanese men. *Nutr Cancer*, 36, pp.14-8.
- Nagata, C., Kabuto, M., Kurisu, Y., Shimizu, H. (1997) Decreased serum estradiol concentration associated with high dietary intake of soy products in premenopausal Japanese women. *Nutr Cancer*, 29, pp.228-33.
- Nagy, L., Kao, H.Y., Chakravarti, D., Lin, R.J., et al. (1997) Nuclear receptor repression mediated by a complex containing SMRT, mSin3A, and histone deacetylase. *Cell*, 89, pp.373-80.
- Nikov, G.N., Hopkins, N.E., Boue, S., Alworth, W.L. (2000) Interactions of dietary estrogens with human estrogen receptors and the effect on estrogen receptor-estrogen response element complex formation. *Environ Health Perspect*, 108, pp.867-72.
- Nilsson, S., Makela, S., Treuter, E., Tujague, M., et al. (2001) *Mechanisms of estrogen action*. *Physiol Rev*, 81, pp.1535-65.
- Norris JD, Fan D, Sherk A, McDonnell DP. A negative coregulator for the human ER. *Mol Endocrinol*. 2002 Mar;16(3):459-68.
- Norozi, M., Angerson, W.J., Lean, M.E. (1998) Effects of flavonoids and vitamin C on oxidative DNA damage to human lymphocytes. *Am J Clin Nutr*, 67, pp.1210-8.
- Nunez, S.B., Medin, J.A., Keller, H., Wang, K., et al. (1995) Retinoid X receptor beta and peroxisome proliferator-activated receptor activate an estrogen response element. *Recent Prog Horm Res*, 50, pp.409-16.
- O'Donnell, L., Robertson, K.M., Jones, M.E., Simpson, E.R. (2001) *Estrogen and spermatogenesis*. *Endocr Rev*, 22, pp.289-318.
- Ogawa, S., Chester, A.E., Hewitt, S.C., Walker, V.R., et al. (2000) Abolition of male sexual behaviors in mice lacking estrogen receptors alpha and beta (alpha beta ERKO). *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97, pp.14737-41.
- Ogawa, S., Taylor, J.A., Lubahn, D.B., Korach, K.S., et al. (1996) Reversal of sex roles in genetic female mice by disruption of estrogen receptor gene. *Neuroendocrinology*, 64, pp.467-70.
- Ohlsson, C., Hellberg, N., Parini, P., Vidal, O., et al. (2000) Obesity and disturbed lipoprotein profile in estrogen receptor-alpha-deficient male mice. *Biochem Biophys Res Commun*, 278, pp.640-5.
- Ohtake, F., Takeyama, K., Matsumoto, T., Kitagawa, H., et al. (2003) Modulation of oestrogen receptor signalling by association with the activated dioxin receptor. *Nature*, 423, pp.545-50.

- Oz, O.K., Zerwekh, J.E., Fisher, C., Graves, K., et al. (2000) Bone has a sexually dimorphic response to aromatase deficiency. *J Bone Miner Res*, 15, pp.507-14.
- Paech, K., Webb, P., Kuiper, G.G., Nilsson, S., et al. (1997) Differential ligand activation of estrogen receptors ERalpha and ERbeta at AP1 sites. *Science*, 277, pp.1508-10.
- Parker, M.G. (1995) Structure and function of estrogen receptors. *Vitam Horm*, 51, pp.267-87.
- Patel, R.P., Boersma, B.J., Crawford, J.H., Hogg, N., et al. (2001) Antioxidant mechanisms of isoflavones in lipid systems: paradoxical effects of peroxy radical scavenging. *Free Radic Biol Med*, 31, pp.1570-81.
- Patel RP, Boersma BJ, Crawford JH, Hogg N, Kirk M, Kalyanaraman B, Parks DA, Barnes S, Darley-Usmar V. (2001) Antioxidant mechanisms of isoflavones in lipid systems: paradoxical effects of peroxy radical scavenging. *Free Radic Biol Med*. Dec 15;31 (12) :1570-81
- Pearce, S.T., Jordan, V.C. (2004) The biological role of estrogen receptors alpha and beta in cancer. *Crit Rev Oncol Hematol*, 50, pp.3-22.
- Pelissero, C., Lenczowski, M.J., Chinzì, D., Davail-Cuisset, B., et al. (1996) *Effects of flavonoids on aromatase activity, an in vitro study. J Steroid Biochem Mol Biol*, 57, pp.215-23.
- Peterson, G., Barnes, S. (1996a) Genistein inhibits both estrogen and growth factor-stimulated proliferation of human breast cancer cells. *Cell Growth Differ*, 7, pp.1345-51.
- Peterson, T.G., Coward, L., Kirk, M., Falany, C.N., et al. (1996b) The role of metabolism in mammary epithelial cell growth inhibition by the isoflavones genistein and biochanin A. *Carcinogenesis*, 17, pp.1861-9.
- Phipps, W.R., Martini, M.C., Lampe, J.W., Slavin, J.L., et al. (1993) *Effect of flax seed ingestion on the menstrual cycle. J Clin Endocrinol Metab*, 77, pp.1215-9.
- Pike, A.C., Brzozowski, A.M., Hubbard, R.E., Bonn, T., et al. (1999) Structure of the ligand-binding domain of oestrogen receptor beta in the presence of a partial agonist and a full antagonist. *Embo J*, 18, pp.4608-18.
- Pike, A.C., Brzozowski, A.M., Walton, J., Hubbard, R.E., et al. (2000) Structural aspects of agonism and antagonism in the oestrogen receptor. *Biochem Soc Trans*, 28, pp.396-400.
- Pike, A.C., Brzozowski, A.M., Walton, J., Hubbard, R.E., et al. (2001) *Structural insights into the mode of action of a pure antiestrogen. Structure (Camb)*, 9, pp.145-53.
- Porter, W., Saville, B., Hoivik, D., Safe, S. (1997) Functional synergy between the transcription factor Sp1 and the estrogen receptor. *Mol Endocrinol*, 11, pp.1569-80.
- Privalsky, M.L. (2004) The role of corepressors in transcriptional regulation by nuclear hormone receptors. *Annu Rev Physiol*, 66, pp.315-60.
- Pujol, P., Rey, J.M., Nirde, P., Roger, P., et al. (1998) Differential expression of estrogen receptor-alpha and -beta messenger RNAs as a potential marker of ovarian carcinogenesis. *Cancer Res*, 58, pp.5367-73.
- Qian, Y., Deng, C., Song, W.C. (1998) Expression of estrogen sulfotransferase in MCF-7 cells by cDNA transfection suppresses the estrogen response: potential role of the enzyme in regulating estrogen-dependent growth of breast epithelial cells. *J Pharmacol Exp Ther*, 286, pp.555-60.
- Raverot G, Cousin P, Emptoz-Bonneton A, Baret C, Pugeat M. The phytoestrogen genistein increases sex Hormone-Binding Globulin (SHBG) production by a human hepatoma cell lines, independently of estrogen receptor  $\alpha$ . ( 2002 ) (Poster P2-489) 84th Annual Meeting of the Endocrine Society. San Francisco (USA), June 19-22,
- Robertson, K.M., O'Donnell, L., Jones, M.E., Meachem, S.J., et al. (1999) Impairment of spermatogenesis in mice lacking a functional aromatase (cyp 19) gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96, pp.7986-91.
- Robertson, K.M., Simpson, E.R., Lacham-Kaplan, O., Jones, M.E. (2001) *Characterization of the fertility of male aromatase knockout mice. J Androl*, 22, pp.825-30.
- Rocheftort, H., Maudelonde, T. (1989) *Les antiestrogènes*. Paris, Flammarion.
- Safe, S.H., Pallaroni, L., Yoon, K., Gaido, K., et al. (2001) *Toxicology of environmental estrogens. Reprod Fertil Dev*, 13, pp.307-15.
- Sanchez, E.R., Faber, L.E., Henzel, W.J., Pratt, W.B. (1990) The 56-59-kilodalton protein identified in untransformed steroid receptor complexes is a unique protein that exists in cytosol in a complex with both the 70- and 90-kilodalton heat shock proteins. *Biochemistry*, 29, pp.5145-52.
- Santti, R., Makela, S., Strauss, L., Korkman, J., et al. (1998) *Phytoestrogens: potential endocrine disruptors in males. Toxicol Ind Health*, 14, pp.223-37.
- Saunders, P.T., Maguire, S.M., Gaughan, J., Millar, M.R. (1997) Expression of oestrogen receptor beta (ER beta) in multiple rat tissues visualised by immunohistochemistry. *J Endocrinol*, 154, pp.R13-6.
- Savas, U., Griffin, K.J., Johnson, E.F. (1999) Molecular mechanisms of cytochrome P-450 induction by xenobiotics: An expanded role for nuclear hormone receptors. *Mol Pharmacol*, 56, pp.851-7.
- Schiff, R., Massarweh, S.A., Shou, J., Bharwani, L., et al. (2004) Cross-talk between estrogen receptor and growth factor pathways as a molecular target for overcoming endocrine resistance. *Clin Cancer Res*, 10, pp.331S-6S.
- Schomberg, D.W., Couse, J.F., Mukherjee, A., Lubahn, D.B., et al. (1999) Targeted disruption of the estrogen receptor-alpha gene in female mice: characterization of ovarian responses and phenotype in the adult. *Endocrinology*, 140, pp.2733-44.
- Scully, K.M., Gleiberman, A.S., Lindzey, J., Lubahn, D.B., et al. (1997) *Role of estrogen receptor-alpha in the anterior pituitary gland. Mol Endocrinol*, 11, pp.674-81.
- Shultz TD, Bonorden WR, Seaman WR. (1991) Effect of short-term flaxseed consumption on lignan and sex hormone metabolism in men. *Nutr Res*, 11:1089-1100
- Shiau, A.K., Barstad, D., Loria, P.M., Cheng, L., et al. (1998) The structural basis of estrogen receptor/coactivator recognition and the antagonism of this interaction by tamoxifen. *Cell*, 95, pp.927-37.

- Shughrue, P.J., Lane, M.V., Merchenthaler, I. (1997) Comparative distribution of estrogen receptor-alpha and -beta mRNA in the rat central nervous system. *J Comp Neurol*, 388, pp.507-25.
- Shughrue, P.J., Lane, M.V., Scrimo, P.J., Merchenthaler, I. (1998) Comparative distribution of estrogen receptor-alpha (ER-alpha) and beta (ER-beta) mRNA in the rat pituitary, gonad, and reproductive tract. *Steroids*, 63, pp.498-504.
- Simpson ER. Aromatase: biologic relevance of tissue-specific expression. *Semin Reprod Med*. 2004 Feb;22(1):11-23
- Smith, C.L., O'Malley, B.W. (2004) Coregulator function: a key to understanding tissue specificity of selective receptor modulators. *Endocr Rev*, 25, pp.45-71.
- Smith, E.P., Boyd, J., Frank, G.R., Takahashi, H., et al. (1994) Estrogen resistance caused by a mutation in the estrogen-receptor gene in a man. *N Engl J Med*, 331, pp.1056-61.
- Stumpf, W., Sar, M. (1976) Autoradiographic localization of estrogen, androgen, progestin, and glucocorticoid in "target tissues" and "non target tissues". IN: Pasqualini, J. R. ed. *Receptors and mechanisms of action of steroid hormones*. New-York, Marcel Deker. 41-84.
- Thordarson G, Slusher N, Leong H, Ochoa D, Rajkumar L, Guzman R, Nandi S, Talamantes F. Insulin-like growth factor (IGF)-I obliterates the pregnancy-associated protection against mammary carcinogenesis in rats: evidence that IGF-I enhances cancer progression through estrogen receptor-alpha activation via the mitogen-activated protein kinase pathway. *Breast Cancer Res*. 2004;6(4):R423-36.
- Tora, L., White, J., Brou, C., Tasset, D., et al. (1989) The human estrogen receptor has two independent nonacidic transcriptional activation functions. *Cell*, 59, pp.477-87.
- Twaddle, G.M., Turbov, J., Liu, N., Murthy, S. (1999) Tyrosine kinase inhibitors as antiproliferative agents against an estrogen-dependent breast cancer cell line in vitro. *J Surg Oncol*, 70, pp.83-90.
- Wagner, T., Wirth, J., Meyer, J., Zabel, B., et al. (1994) Autosomal sex reversal and campomelic dysplasia are caused by mutations in and around the SRY-related gene SOX9. *Cell*, 79, pp.1111-20.
- Wang, C., Fu, M., Angeletti, R.H., Siconolfi-Baez, L., et al. (2001) Direct acetylation of the estrogen receptor alpha hinge region by p300 regulates transactivation and hormone sensitivity. *J Biol Chem*, 276, pp.18375-83.
- Webb, P., Lopez, G.N., Uht, R.M., Kushner, P.J. (1995) Tamoxifen activation of the estrogen receptor/AP-1 pathway: potential origin for the cell-specific estrogen-like effects of antiestrogens. *Mol Endocrinol*, 9, pp.443-56.
- Wilson, T., March, H., Ban, W.J., Hou, Y., et al. (2002) Antioxidant effects of phyto-and synthetic-estrogens on cupric ion-induced oxidation of human low-density lipoproteins in vitro. *Life Sci*, 70, pp.2287-97.
- Wong, C.K., Keung, W.M. (1997) Daidzein sulfoconjugates are potent inhibitors of sterol sulfatase (EC 3.1.6.2). *Biochem Biophys Res Commun*, 233, pp.579-83.
- Wong CW, McNally C, Nickbarg E, Komm BS, Cheskis BJ. Estrogen receptor-interacting protein that modulates its nongenomic activity-crosstalk with Src/Erk phosphorylation cascade. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002 Nov 12;99(23):14783-8.
- Xu, J., Qiu, Y., DeMayo, F.J., Tsai, S.Y., et al. (1998) Partial hormone resistance in mice with disruption of the steroid receptor coactivator-1 (SRC-1) gene. *Science*, 279, pp.1922-5.
- Yang, S.H., Liu, R., Perez, E.J., Wen, Y., et al. (2004) Mitochondrial localization of estrogen receptor beta. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101, pp.4130-5.
- Yoon, K., Pallaroni, L., Stoner, M., Gaido, K., et al. (2001) Differential activation of wild-type and variant forms of estrogen receptor alpha by synthetic and natural estrogenic compounds using a promoter containing three estrogen-responsive elements. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 78, pp.25-32.
- Zhang, H., LeCulysse, E., Liu, L., Hu, M., et al. (1999) Rat pregnane X receptor: molecular cloning, tissue distribution, and xenobiotic regulation. *Arch Biochem Biophys*, 368, pp.14-22.
- Zhou, J.R., Mukherjee, P., Gugger, E.T., Tanaka, T., et al. (1998) Inhibition of murine bladder tumorigenesis by soy isoflavones via alterations in the cell cycle, apoptosis, and angiogenesis. *Cancer Res*, 58, pp.5231-8.
- Zhu, Y., Bian, Z., Lu, P., Karas, R.H., et al. (2002) Abnormal vascular function and hypertension in mice deficient in estrogen receptor beta. *Science*, 295, pp.505-8.





## **Effets physiopathologiques des phyto-estrogènes**



## **Phyto-estrogènes et préparations pour nourrissons et préparations de suite à base de protéines de soja**

*Daniel Rieu, Sonia Tenailleau*

Les préparations à base de soja ont été proposées au début des années 1900 aux Etats-Unis comme substituts du lait pour les nourrissons atteints d'intolérance au lait de vache. Au cours du temps les techniques de fabrication et la composition de ces préparations ont beaucoup évolué. Actuellement, seuls les produits contenant 90 à 95 % de protéines de soja (isolats) sont autorisés dans la fabrication des préparations pour nourrissons et préparations de suite à base de protéines de soja (PPS).

Alors qu'on dispose actuellement de nombreux aliments diététiques sans lactose et/ou sans protéines entières de lait de vache, on constate dans plusieurs pays une augmentation de la consommation de PPS. Aux Etats-Unis, celle-ci aurait doublé au cours des dix dernières années et atteindrait environ 25 % de la consommation des laits infantiles (American Academy of Pediatrics – Committee on Nutrition 1998). En Italie, elle représentait en 1997 5,6 % de celle-ci (Zoppi 1999). En France, d'après le Syndicat des aliments de l'enfance et de la diététique (SFAED), la consommation est passée de 0,5% en 1996 à 1,7% en 2000 et 2,1 % en 2003.

Les préparations pour nourrissons et les préparations de suite à base de protéines de soja sont des produits diététiques sans lactose, sans saccharose, sans gluten et sans protéines du lait de vache. Comme pour les préparations à base de lait de vache, leur composition doit répondre aux critères définis par les directives de la Commission des Communautés Européennes de 1991 (91/321/CEE) et 1996 (96/4/CEE) qui ont été traduites en droit français (arrêté du 11 janvier 1994 ; arrêté du 5 octobre 2000). En France, conformément à l'arrêté du 1<sup>er</sup> juillet 1976 chapitre 1<sup>er</sup> article 6, «leur teneur en substances hormonales en particulier oestrogènes ou anabolisants doit être inférieure à 1µg/kg » (voir annexe 4).

Pendant longtemps les PPS ont été les seuls aliments diététiques utilisables chez les nourrissons qui ne toléraient pas le lait de vache soit par intolérance au lactose soit par allergie aux protéines du lait. Aujourd'hui la place des PPS dans le traitement de ces affections s'est considérablement réduite. On dispose de nombreux autres produits diététiques sans lactose et/ou sans protéines entières du lait de vache. Certains nourrissons allergiques aux protéines du lait de vache peuvent présenter également une allergie aux protéines de soja [15 à 60 %]. En France, en cas d'allergie aux protéines du lait de vache, on préfère donc utiliser en première intention une préparation à charge antigénique réduite (hydrolysate de protéines). D'autre part, les PPS ne sont pas indiquées actuellement dans la prévention des maladies allergiques, que ce soit chez l'enfant normal ou chez l'enfant à risque allergique ; c'est l'allaitement maternel qui est recommandé ou à défaut une formule contenant des protéines partiellement hydrolysées voire un hydrolysate de protéines (Comité de nutrition de la société française de pédiatrie 2001 ; Bennetau-Pelissero 2004).

On sait depuis quelques années que les préparations à base de protéines de soja destinées aux nourrissons et aux jeunes enfants contiennent des phyto-estrogènes, en particulier des isoflavones. Compte tenu des effets délétères des isoflavones observés chez l'animal (voir chapitre « sécurité des phyto-estrogènes »), en particulier sur le développement neuro-endocrinien et immunitaire, on s'interroge aujourd'hui sur les risques éventuels de tels apports en phyto-estrogènes chez le jeune enfant.

Seront abordés successivement l'apport en phyto-estrogènes, leur biodisponibilité, et les risques éventuels des phyto-estrogènes chez les nourrissons et les jeunes enfants.

## **I- Apport de phyto-estrogènes chez les nourrissons alimentés avec des préparations à base de protéines de soja**

Depuis la publication de Setchell (1987), plusieurs travaux ont confirmé la présence de quantités importantes d'isoflavones dans les préparations pour nourrissons à base de protéines de soja commercialisées dans différents pays. Setchell (1997) ont dosé par HPLC les isoflavones dans cinq PPS utilisées aux Etats-Unis. Dans les solutions reconstituées, les concentrations d'isoflavones totales variaient de 32 à 47 mg/L avec 67,1 % de génistéine et 28,7% de daidzéine. Les  $\beta$ -glycosides représentaient 79,5 % d'isoflavones totales, les aglycones 3 à 6 %. On notait aussi la présence de quantités non négligeables de glycitine. A Hawaï, Franke (1998) ont dosé par HPLC les isoflavones dans quatre PPS ; les valeurs variaient de 155 à 281  $\mu\text{g/g}$  de poudre à reconstituer. Irvine (1998), dans quatre préparations commercialisées en Nouvelle-Zélande ont trouvé par dosage HPLC des taux de génistéine de 81 à 92  $\mu\text{g/g}$  de poudre à reconstituer et des taux de daidzéine de 44 à 55  $\mu\text{g/g}$ . Au Royaume-Uni, les concentrations d'isoflavones totales dosées par HPLC dans six préparations pour nourrissons à base de protéines de soja variaient de 18 à 41  $\mu\text{g/mL}$  (Committee on toxicity 2003). Benneteau-Pelissero (2004) ont dosé les isoflavones de quatre PPS commercialisées en France avec les résultats suivants : isoflavones totales : 17,5 –38  $\mu\text{g/mL}$ , génistéine : 11,1-26,5  $\mu\text{g/mL}$ , daidzéine : 6,3-13,1  $\mu\text{g/mL}$ .

Ainsi, Setchell (1998) ont estimé que des nourrissons de 4 mois pesant de 4,8 à 7,5 kg consommant 800 à 1 000 mL d'une PPS contenant 45  $\mu\text{g/mL}$  d'isoflavones recevaient entre 41 et 45 mg d'isoflavones par jour, soit de 6 à 9,3 mg par kilo de poids corporel et par jour (mg/kg pc/j). En se basant sur le même calcul, la consommation estimée est de 6 à 11,9 mg/kg pc/j pour un nourrisson de 1 mois et de 6 à 10 mg/kg pc/j pour un nourrisson de 2 mois. Comparativement, des adultes consommant de 57 à 85 g d'aliments à base de soja par jour reçoivent 50 à 100 mg d'isoflavones, soit 0,7 à 1,4 mg/kg pc/j. Par ailleurs, on sait que les concentrations d'isoflavones dans le lait maternel varient avec l'alimentation mais restent faibles : 1,6 à 13,6  $\mu\text{g/L}$  sur 9 dosages aux USA (Setchell 1998), 0 à 32  $\mu\text{g/kg}$  de lait sur 31 dosages au Royaume-Uni (Committee on toxicity 2003).

En France, sur des échantillons de lait de vache du commerce, Antignac (2004) ont trouvé des concentrations d'isoflavones de 0,1 à 5  $\mu\text{g/L}$ , mais des concentrations plus élevées d'équol (14,1 – 293  $\mu\text{g/L}$ ) et d'entérolactone (14,3 – 94,4  $\mu\text{g/L}$ ).

Enfin, on peut signaler la différence d'exposition aux isoflavones qui existe en général entre les nourrissons occidentaux et asiatiques. En Asie, les habitudes alimentaires n'intègrent pas le fait de donner des aliments ou des préparations à base de protéines de soja aux nourrissons au cours des quatre à six premiers mois. Par contre, les mères consommant des aliments à base de soja, les enfants sont exposés aux isoflavones au cours de leur vie fœtale. Après la naissance, s'ils sont alimentés au sein, ils en reçoivent de petites quantités avec le lait maternel (Committee on toxicity 2003).

## **II - Biodisponibilité et métabolisme des isoflavones chez le nourrisson alimenté avec des PPS**

Chez l'adulte, les isoflavones alimentaires conjuguées à des sucres ( $\beta$ -glycosides) sont hydrolysées sous l'action à la fois des  $\beta$ -glucosidases des entérocytes et de la flore intestinale (voir chapitre "Biodisponibilité"). Au cours et après absorption, les formes aglycones sont reconjuguées avec de l'acide glucuronique et des sulfates puis excrétées dans les urines et la bile. Dans le tube digestif, ces composés présents dans la bile sont déconjugués et métabolisés par la flore intestinale avant d'être réabsorbés (cycle entéro-hépatique). La qualité de la flore digestive joue un rôle essentiel sur les métabolites produits ; c'est un des facteurs qui explique l'importante variation individuelle du métabolisme des phyto-estrogènes (Rowland 2003). Chez le nourrisson, bien qu'il y ait peu d'études et qu'elles portent sur un petit nombre de sujets, on sait que les isoflavones apportées par les PPS sont métabolisées puisqu'on en retrouve dans les urines et le plasma. Irvine (1998) ont étudié l'excrétion urinaire de génistéine et de daidzéine chez quatre

nourrissons alimentés avec des PPS recevant 3,2 mg/kg pc/j d'isoflavones entre 2 et 16 semaines après la naissance. L'excrétion urinaire moyenne était de  $38 \pm 4$  % de la dose journalière ingérée pour la daidzéine et de  $13 \pm 3$  % pour la génistéine. Setchell (1997 ; 1998) ont dosé par HPLC les isoflavones plasmatiques dans 3 groupes de 7 nourrissons âgés de 4 mois alimentés de façon exclusive avec une préparation à base de protéines de soja (PPS) ou une préparation à base de lait de vache ou du lait maternel. Chez les nourrissons alimentés avec une PPS, les taux plasmatiques d'isoflavones totales variaient de 552 à 1 775  $\mu\text{g/L}$  (moyenne 980  $\mu\text{g/L}$ ) ; les concentrations moyennes étaient de 684  $\mu\text{g/L}$  pour la génistéine et 295  $\mu\text{g/L}$  pour la daidzéine. Dans les groupes nourris au lait de vache ou au lait maternel, les concentrations moyennes étaient respectivement de 3,2  $\mu\text{g/L}$  et 2,8  $\mu\text{g/L}$  pour la génistéine et 2,1  $\mu\text{g/L}$  et 1,4  $\mu\text{g/L}$  pour la daidzéine. Ainsi, chez les nourrissons alimentés avec une préparation à base de protéines de soja, les taux plasmatiques d'isoflavones sont plus élevés que les concentrations rapportées chez l'adulte consommant des aliments à base de soja (50 à 200  $\mu\text{g/L}$ ) (Setchell 1997). Outre l'effet de la quantité prise, il est possible que la répétition des prises alimentaires dans la journée et une certaine immaturité des enzymes de la flore intestinale qui chez l'adulte transforment les isoflavones en divers métabolites puissent expliquer les taux élevés de génistéine et daidzéine trouvés chez ces nourrissons. On ne dispose que de très peu d'informations sur la capacité des nourrissons et des enfants à produire de l'équol à partir de la daidzéine. Setchell (1997 ; 1998) ont trouvé de petites quantités d'équol dans le plasma de 4 nourrissons sur 7 alimentés avec une PPS et d'un nourrisson sur 7 alimentés au lait de femme ; le plasma des 7 nourrissons alimentés avec une préparation à base de lait de vache contenait des quantités d'équol légèrement plus élevées ( $4,11 \pm 0,49$   $\mu\text{g/L}$ ). Setchell (2002) considèrent donc que les nourrissons de 4 mois alimentés avec des PPS ne sont pas des producteurs d'équol à cause de leur flore digestive. L'équol possède une forte activité estrogénique, il paraît donc important d'étudier sa production chez un plus grand nombre de nourrissons et d'enfants recevant des PPS ou des aliments à base de soja.

### **III - Risques éventuels des isoflavones chez les nourrissons alimentés avec des préparations à base de protéines de soja**

#### **III – 1 Croissance, développement endocrinien, puberté, fertilité**

Depuis la découverte dans les années 1940 du syndrome d'infertilité des brebis australiennes absorbant de grandes quantités de biochanine A et de formononétine, de nombreux travaux expérimentaux ont porté sur les effets des phyto-estrogènes sur le développement et le fonctionnement neuro-endocrinien dans différentes espèces animales (Klein 1998) (Voir chapitre « Sécurité des phyto-estrogènes »). A la suite des effets observés chez l'animal, on s'est demandé si la consommation de quantités importantes d'isoflavones chez la femme enceinte ou le jeune nourrisson alimenté avec des PPS ne pouvait pas avoir d'effets délétères sur la croissance, le développement pubertaire de l'enfant et sur la fertilité à l'âge adulte (Tönz 1997 ; Klein 1998 ; Benneteau-Pelissero 2001 ; Comité de nutrition 2001 ; Zung 2001 ; Committee on toxicity 2003 ; Miniello 2003 ; British Dietetic Association 2003 ; Chen 2004). Bien que les préparations à base de protéines de soja soient utilisées aux Etats-Unis depuis plus de 30 ans, il n'a pas été rapporté jusqu'à maintenant chez les enfants qui les ont consommées de troubles particuliers de la croissance ou du développement endocrinien (Klein 1998 ; Mendez 2002). Cependant, très peu d'études cliniques et/ou biologiques ont été réalisées chez des nourrissons alimentés exclusivement avec des PPS ou chez des enfants et des adultes qui en ont reçues au cours des premiers mois de leur vie. En 2001, Strom (2001) ont rapporté les résultats d'une enquête réalisée chez des hommes et des femmes âgés de 20 à 34 ans qui avaient été alimentés entre 1965 et 1978 de la naissance à 4 mois avec des préparations pour nourrissons soit à base de lait de vache soit à base de protéines de soja. Au total, 295 hommes et 268 femmes qui avaient reçu du lait de vache, et 120 hommes et 128 femmes qui avaient reçu des préparations à base de protéines de soja, ont répondu à un questionnaire très détaillé au cours d'un entretien téléphonique. Le questionnaire était composé de 30 items portant sur le poids, la

taille, le niveau d'éducation, l'âge de la puberté, le syndrome prémenstruel, la régularité des cycles, les règles, les grossesses, les avortements, le nombre d'enfants, l'existence de malformations chez les enfants, les maladies hormonales, les cancers, l'orientation sexuelle.... Parmi les nombreuses données recueillies, les seules différences statistiquement significatives entre les 2 groupes étaient un discret allongement de la durée des règles et leur caractère plus inconfortable chez les femmes qui avaient consommé les préparations à base de protéines de soja entre la naissance et 4 mois. Ceci peut être rapproché du discret allongement de la durée des règles observé dans les études d'intervention par protéines de soja ou aliments dérivés du soja, et du cycle menstruel plus long, de 1 à 2 jours en moyenne, des femmes japonaises.

Dans l'état actuel des connaissances, il est difficile d'évaluer les risques éventuels à court, moyen ou long terme des préparations pour nourrissons à base de protéines de soja riches en phyto-estrogènes. Il est indispensable que soient réalisées des études prospectives basées sur des dosages hormonaux chez des nourrissons alimentés pendant plusieurs mois avec des PPS et des études rétrospectives portant sur la puberté, la fertilité, la qualité du sperme d'adultes ayant consommé des PPS pendant les premiers mois de leur vie.

### **III – 2 Thyroïde**

Dans les années 1950-1960, plusieurs observations de goîtres chez des nourrissons alimentés avec des préparations à base de farines de soja ont été rapportées, les mécanismes discutés étant un déficit en iode et/ou la présence de substances goitrigènes (Shepard 1960). Par la suite, les préparations pour nourrissons ont été fabriquées à partir d'isolats (contenant 90 à 95 % de protéines) et ont été enrichies en iode. Depuis ces modifications, il n'a plus été observé de goîtres chez les nourrissons consommant ces préparations mais trois publications font état chez des enfants hypothyroïdiens d'interférence avec le traitement par la L-thyroxine. Pinchera (1965) ont observé chez un enfant atteint d'athyréose alimenté avec une préparation à base de soja enrichie en iode, une « résistance » au traitement habituel par la thyroxine. Ils ont montré que l'excrétion de T4 marquée à l'iode 131 était augmentée dans les selles avec l'alimentation à base de soja et pas avec le lait de vache. Chorazy (1995) ont observé chez un nourrisson atteint d'hypothyroïdie dépistée à la naissance nourri avec une préparation à base de protéines de soja la persistance de taux élevés de TSH 49 jours après la mise sous traitement par la thyroxine à la dose de 14,5 µg/kg/j. Après passage au lait de vache, les taux de TSH se sont progressivement normalisés et les besoins en L-thyroxine ont diminué. Chez 2 nourrissons atteints d'hypothyroïdie congénitale traités par la L-thyroxine, Jabbar et al (1997) ont observé des taux élevés de thyroxine 4 semaines après le remplacement d'une préparation à base de protéines de soja par du lait de vache. Chez un troisième enfant hypothyroïdien nourri avec une préparation à base de protéines de soja, les taux de TSH sont restés élevés, malgré des doses de thyroxine de 19 µg/kg p.c./j. Le passage au lait de vache a entraîné la normalisation de la TSH en 3 semaines et la diminution des doses de thyroxine à 8,6 µg/kg p.c./j. Pour expliquer ces besoins plus élevés en thyroxine chez les enfants hypothyroïdiens nourris avec des préparations à base de protéines de soja, on invoque la perte de thyroxine par les selles ou des interactions entre les phyto-estrogènes et la Thyroïd Binding Globulin (TBG) (Committee on toxicity 2003).

En 1998, le Ministère de la santé de Nouvelle-Zélande a recommandé aux médecins de surveiller les taux de thyroxine chez les enfants hypothyroïdiens alimentés avec des préparations à base de protéines de soja ou recevant des quantités importantes d'aliments contenant du soja. De plus, pour les enfants qui ne sont pas atteints d'hypothyroïdie mais qui sont alimentés avec des préparations à base de protéines de soja, l'attention des médecins a été attirée sur les interactions possibles entre ces préparations et le fonctionnement thyroïdien (Ministry of health 1998 ; Fitzpatrick 2000).

### **III – 3 Immunité**

Les hormones sexuelles interviennent dans le développement et le maintien de l'immunité. L'influence de la génistéine et de la daïdzéine sur le système immunitaire a fait l'objet de

nombreux travaux expérimentaux (voir chapitre phyto-estrogènes et immunité). Zoppi (1982) ont comparé des nourrissons alimentés pendant les 5 premiers mois avec des préparations à base de lait de vache ou de farines de soja enrichies avec deux niveaux différents d'apports protéiques soit 4 ou 5 g/kg pc/j soit 2 g/kg pc/j. Ils ont observé des valeurs plus basses des taux sériques d'immunoglobulines, de transferrine et des fractions du complément chez les enfants qui recevaient les préparations à base de soja. Dans une autre étude, Zoppi (1983) ont étudié la réponse après vaccination DTICOQ POLIO chez des nourrissons alimentés au lait de femme ou avec des préparations à base de lait de vache ou de farines de soja. La réponse anticorps à certains antigènes était plus faible chez les enfants qui avaient reçu la préparation à base de soja. Pour les auteurs, ces résultats mettent en cause la qualité nutritionnelle des protéines de soja. En fait, l'intérêt de ce travail est limité par le petit nombre de sujets étudiés (9 nourrissons dans le groupe soja). En 1990, Businco (1990) n'ont pas trouvé de différence dans la séro-conversion après vaccination anti-poliomyélite chez des nourrissons de familles allergiques alimentés avec des préparations à base de protéines de soja, par rapport aux enfants nourris au lait de mère. Ostrom (2002) et Cordle (2002) ont comparé le statut immunitaire au cours de la première année de vie de 94 nourrissons nés à terme, alimentés exclusivement avec une préparation à base de protéines de soja de la naissance à 4 mois avec celui de 81 nourrissons alimentés au lait de mère de la naissance à 2 mois puis avec une préparation à base de lait de vache. Ces auteurs n'ont pas trouvé de différences significatives à 6,7 et 12 mois entre les deux groupes concernant les immunoglobulines G et A, les anticorps sériques après vaccination contre la diphtérie, le tétanos, la poliomyélite, *Hemophilus influenzae* type b. De même le nombre et le pourcentage de lymphocytes B, T, et NK n'étaient pas différents. Pour les sous-populations lymphocytaires, seuls les NK CD57 étaient significativement plus élevés à 12 mois dans le groupe lait de mère par rapport au groupe protéines de soja.

Y a-t-il une relation entre la prise de préparations à base de protéines de soja au cours des premiers mois de la vie et la survenue ultérieure de manifestations auto-immunes ou allergiques ? Chez 59 enfants atteints de maladies thyroïdiennes auto-immunes, Fort (1990) ont constaté que 31 % d'entre eux avaient reçu étant nourrisson une préparation à base de soja, la prévalence étant de 13 % dans le groupe témoin préciser que la différence est significative. Dans l'enquête de Strom (2001), on remarque que l'utilisation de médicaments anti-asthmatiques ou anti-allergiques est significativement plus fréquente chez les adultes qui ont reçu des préparations à base de protéines de soja entre la naissance et 4 mois que chez ceux du groupe lait de vache. De même dans l'enquête de Lack (2003), 24,5 % des enfants allergiques à l'arachide ont consommé des préparations à base de protéines de soja ou des jus de soja au cours des 2 premières années, contre 8,3 % chez les témoins. Pour expliquer ces constatations, le rôle de l'allergie aux protéines de soja paraît plus probable qu'un éventuel effet des phyto-estrogènes.

## Conclusion

Les préparations pour nourrissons à base de protéines de soja dont la consommation est en augmentation dans de nombreux pays contiennent des quantités importantes d'isoflavones, principalement de la génistéine et de la daidzéine. Les nourrissons de 4 mois alimentés exclusivement depuis la naissance avec de telles préparations peuvent recevoir de 6 à 9,3 mg/kg pc./j d'isoflavones ce qui en fait le sous groupe de la population le plus exposé aux phyto-estrogènes dans la population générale. Les nourrissons absorbent la génistéine et la daidzéine qui sont retrouvées à des concentrations élevées dans le plasma ; il ne semble pas que leur flore intestinale soit capable de transformer la daidzéine en équol mais ce point doit être confirmé par des études portant sur un plus grand nombre de sujets de différents âges.

Alors que plusieurs études expérimentales font état de l'action des phyto-estrogènes sur le développement neuro-endocrinien et immunitaire de jeunes animaux, peu de travaux ont été réalisés chez des enfants ou des adultes qui ont été alimentés avec des préparations à base de protéines de soja au cours des premiers mois de leur vie. La seule étude à long terme est l'enquête de Strom (2001) (voir paragraphe 3.1). Pour évaluer les risques éventuels à court, moyen ou long terme des préparations à base de protéines de soja sur le développement



endocrinien du nourrisson et la fertilité à l'âge adulte, des études cliniques et biologiques sont indispensables. Actuellement, l'attention des médecins responsables de la prise en charge des enfants hypothyroïdiens dépistés en période néonatale doit être attirée sur l'existence possible d'interférences entre les phyto-estrogènes des PPS et le traitement par la L-thyroxine. Dans l'état actuel des connaissances, l'utilisation des préparations à base de protéines de soja chez le nourrisson devrait se baser sur les indications récemment précisées par différents groupes d'experts (American Academy of Pediatrics – Committee on Nutrition 1998 ; Comité de nutrition de la société française de pédiatrie 2001 ; Scientific Committee on Food 2003). Dans l'attente d'informations complémentaires sur les risques éventuels des phyto-estrogènes et en l'absence à l'heure actuelle de PPS sans isoflavones ou à taux réduit d'isoflavones, il paraît prudent de d'éviter pour les nourrissons et les enfants en bas âge l'utilisation de préparations à base de protéines de soja. A notre connaissance, il n'existe pas actuellement de préparations à base de soja dépourvues d'isoflavones disponibles sur le marché. En France, l'arrêté du 1<sup>er</sup> juillet 1976 modifié concernant les préparations pour nourrissons et les préparations de suite (chapitre 1<sup>er</sup> article 6) indique que «leur teneur en substances hormonales en particulier en oestrogènes ou anabolisants doit être inférieure à 1 µg/kg». Compte tenu de l'activité estrogénique reconnue des phyto-estrogènes, la nouvelle directive européenne concernant les préparations pour nourrissons et les préparations de suite actuellement en cours d'élaboration devrait fixer la concentration d'isoflavones à ne pas dépasser. Celle-ci devrait être inférieure à 1 mg/L de préparation reconstituée en équivalent aglycone.



## Points clés et Recommandations

### Points clés

- ❖ les préparations pour nourrissons et les préparations de suite à base de protéines de soja (PPS) actuellement commercialisées contiennent des quantités élevées d'isoflavones (18 à 47 mg/l de préparation reconstituée), principalement sous forme de génistéine et de daidzéine. De ce fait, les nourrissons alimentés de façon exclusive avec ces préparations constituent le sous-groupe de la population actuellement le plus exposé aux phyto-estrogènes.
- ❖ De nombreux travaux expérimentaux montrent que les phyto-estrogènes ont des effets sur le développement et le fonctionnement neuro-endocrinien et immunitaire dans différentes espèces animales. Cependant, malgré la forte exposition et les concentrations plasmatiques rapportées chez les nourrissons et enfants alimentés de façon prolongée avec des préparations à base de soja, il n'a pas été observé jusqu'à présent de troubles particuliers de la croissance et du développement endocrinien. Toutefois, on ne dispose pas d'étude à long terme portant notamment sur la fertilité.

### Recommandations

#### 1 - Recommandations à visée de connaissance et de recherche

- ❖ Des études sont nécessaires non seulement pour contrôler l'état hormonal des nourrissons alimentés avec des PPS, mais aussi pour apprécier leur développement à long terme : croissance, puberté. Des études approfondies, cliniques et biologiques devraient être entreprises pour apprécier l'état neuro-endocrinien, la fertilité, la qualité du sperme des adultes qui ont reçu des PPS au cours des premiers mois de leur vie.
- ❖ Des études analytiques devraient être entreprises sur le contenu en phyto-estrogènes des préparations pour nourrissons et des préparations de suite à base de protéines de lait de vache, compte-tenu de l'évolution des pratiques en alimentation animales, notamment par l'utilisation de tourteau de soja riche en phyto-estrogènes.

#### 2 – Recommandations de Santé Publique

- ❖ Compte tenu de l'état actuel des connaissances et des incertitudes concernant les effets à long terme des fortes doses d'isoflavones ingérées de façon prolongée par les nourrissons (dans le cas où les PPS sont utilisées pour leur alimentation à défaut d'allaitement maternel ou de préparations au lait de vache), il paraît prudent de ne pas recommander pour la tranche d'âge de la naissance à 3 ans, l'utilisation de préparations à base de protéines de soja si celles-ci ne sont pas à teneur réduite en isoflavones. A notre connaissance ces préparations ne sont pas actuellement disponibles sur le marché français. L'article 6 chapitre 1<sup>er</sup> de l'arrêté du 1<sup>er</sup> juillet 1976 modifié relatif aux aliments destinés aux nourrissons et aux enfants en bas âge, indique que «... la teneur en substances hormonales en particulier en estrogènes ou anabolisants doit être inférieure à 1 µg/kg d'aliment ...». La nouvelle directive européenne concernant les préparations pour nourrissons et les préparations de suite qui est en cours d'élaboration devrait préciser que leur concentration en isoflavones doit être inférieure à 1 mg/l de préparation reconstituée en équivalent-aglycone.
- ❖ En outre, les médecins prenant en charge les nourrissons atteints d'hypothyroïdie congénitale doivent être informés que les phyto-estrogènes présents dans les préparations à base de protéines de soja peuvent entraîner des besoins plus élevés en thyroxine chez leurs malades.

#### 3- Recommandations à visée d'information du consommateur

- ❖ Compte tenu de leur composition, les tonyus (jus de soja) sont contre-indiqués pour l'alimentation des nourrissons et des enfants en bas âge (de la naissance à 3 ans).
- ❖ L'étiquetage de toute préparation diététique à base de protéines de soja destinée aux nourrissons et aux enfants en bas âge doit préciser la teneur en phyto-estrogènes, exprimée en équivalents aglycone.
- ❖ la concentration en phyto-estrogènes des préparations pour nourrissons et des préparations de suite à base de protéines de lait de vache actuellement utilisées, devrait être régulièrement précisée, compte tenu de l'évolution des pratiques en alimentation animale.

## Références bibliographiques

- (1998) American Academy of Pediatrics. Committee on Nutrition. Soy protein-based formulas: recommendations for use in infant feeding. *Pediatrics*, 101, pp.148-53.
- (2003) Paediatric group position statement on the use of soya protein for infants. *J Fam Health Care*, 13, pp.93.
- Antignac, J., Cariou, R., Le Bizec BF, A. (2004) New data regarding phytoestrogens content in bovine milk. *Food Chem*, 87, pp.275-81.
- Arrêté du 5 octobre 2000 (2000) modifiant l'arrêté du 1er juillet 1976 relatif aux aliments destinés aux nourrissons et aux enfants en bas âge. *Journal Officiel* 12 octobre 2000.
- Arrêté du 11 janvier 1994 (1994) modifiant l'arrêté du 1er juillet 1976 relatif aux aliments diététiques et de régime de l'enfance et l'arrêté du 30 mars 1978 relatif aux aliments lactés diététiques. *Journal Officiel* 15 février 1994, pp.2252-9.
- Benneteau-Pelissero, C. (2001) Les phyto-estrogènes dans l'alimentation et la thérapie : discussion. *Cahiers de Nutrition et de Diététique*, 36, pp.25-38.
- Benneteau-Pelissero, C., Sauvant, P., Peltre, G. et al. (2004) Phyto-estrogènes du soja : problèmes posés chez le nourrisson allergique au lait de vache et consommant des formules à base de soja. *Cahiers de Nutrition et de Diététique*, 39, pp.24-32.
- Comité de nutrition de la société française de pédiatrie. Bocquet, A., Bresson, J.L., Briend, A., Chouraqui, J.P. et al. (2001) e [Infant formulas and soy protein-based formulas: current data]. *Arch Pédiatr*, 8, pp.1226-33.
- Bussinco, L., Bruno, G. Grandolfo, G. (1990) Response to poliovirus immunisation and type of feeding in babies of atopic families. *Mette l'abréviation officielle de la revue et pas le titre au complet Pediatric Allergy and Immunology*, 1, pp.60-3.
- Chen, A.Rogan, W.J. (2004) Isoflavones in soy infant formula: A Review of evidence for endocrine and other activity in infants. *Annu Rev Nutr*, 24, pp.33-54.
- Chorazy, P.A., Himelhoch, S., Hopwood, N.J., Greger, N.G., et al. (1995) Persistent hypothyroidism in an infant receiving a soy formula: case report and review of the literature. *Pediatrics*, 96, pp.148-50.
- Committee on Toxicity (2003) Committee on toxicity of chemicals in food, consumer products and the environment. London, Phytoestrogens and Health Food Standard Agency.
- Communauté Economique Européenne (1991) Directive de la commission du 14 mai 1991 concernant les préparations pour nourrissons et les préparations de suite 91/321/CEE L 175. *Journal Officiel des Communautés Européennes*, pp.35-49.
- Communauté Economique Européenne (1996) Directive 96/4/CE de la commission du 16 février 1996 modifiant la directive 91/321/CEE concernant les préparations pour nourrissons et les préparations de suite L 49. *Journal Officiel des Communautés Européennes*, pp.12-6.
- Cordle, C.T., Winship, T.R., Schaller, J.P., Thomas, D.J., et al. (2002) Immune status of infants fed soy-based formulas with or without added nucleotides for 1 year: part 2: immune cell populations. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 34, pp.145-53.
- European Commission Scientific Committee on Food (2003) Report of the scientific committee on food on the revision of essential requirements of infant formulae and follow-on formulae. SCF/CS/NUT/IF/65 Final. Brussels, European Commission (adopted on April 4, 2003).
- Fitzpatrick, M. (2000) Soy formulas and the effects of isoflavones on the thyroid. *N Z Med J*, 113, pp.24-6.
- Fort, P., Moses, N., Fasano, M., Goldberg, T., et al. (1990) Breast and soy-formula feedings in early infancy and the prevalence of autoimmune thyroid disease in children. *J Am Coll Nutr*, 9, pp.164-7.
- Franke, A.A., Custer, L.J., Tanaka, Y. (1998) Isoflavones in human breast milk and other biological fluids. *Am J Clin Nutr*, 68, pp.1466S-1473S.
- Irvine, C.H., Shand, N., Fitzpatrick, M.G., Alexander, S.L. (1998) Daily intake and urinary excretion of genistein and daidzein by infant fed soy-or-dairy-based formulas. *Am J Clin Nutr*, 68, pp.1462S-1465S.
- Jabbar, M.A., Larrea, J., Shaw, R.A. (1997) Abnormal thyroid function tests in infants with congenital hypothyroidism: the influence of soy-based formula. *J Am Coll Nutr*, 16, pp.280-2.
- Klein, K.O. (1998) Isoflavones, soy-based infant formulas, and relevance to endocrine function. *Nutr Rev*, 56, pp.193-204.
- Lack, G., Fox, D., Northstone, K., Golding, J. (2003) Factors associated with the development of peanut allergy in childhood. *N Engl J Med*, 348, pp.977-85.
- Mendez, M.A., Anthony, M.S., Arab, L. (2002) Soy-based formulae and infant growth and development: a review. *J Nutr*, 132, pp.2127-30.
- Miniello, V.L., Moro, G.E., Tarantino, M., Natile, M., et al. (2003) Soy-based formulas and phyto-oestrogens: a safety profile. *Acta Paediatr Suppl*, 91, pp.93-100.
- Ministry of Health (1998) Soy based infant formula. Wellington (New Zealand).
- Ostrom, K.M., Cordle, C.T., Schaller, J.P., Winship, T.R., et al. (2002) Immune status of infants fed soy-based formulas with or without added nucleotides for 1 year: part 1: vaccine responses, and morbidity. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 34, pp.137-44.
- Pinchera, A., Macgillivray, M.H., Crawford, J.D., Freeman, A.G. (1965) Thyroid refractoriness in an athyreotic cretin fed soybean formula. *N Engl J Med*, 273, pp.83-7.
- Rowland, I., Faughnan, M., Hoey, L., Wahala, K., et al. (2003) Bioavailability of phyto-oestrogens. *Br J Nutr*, 89 Suppl 1, pp.S45-58.
- Setchell, K.D., Brown, N.M., Lydeking-Olsen, E. (2002) The clinical importance of the metabolite equol-a clue to the effectiveness of soy and its isoflavones. *J Nutr*, 132, pp.3577-84.
- Setchell, K.D., Welsh, M.B., Lim, C.K. (1987) High-performance liquid chromatographic analysis of phytoestrogens in soy protein preparations with ultraviolet, electrochemical and thermospray mass spectrometric detection. *J Chromatogr*, 386, pp.315-23.
- Setchell, K.D., Zimmer-Nechemias, L., Cai, J., Heubi, J.E. (1997) Exposure of infants to phyto-oestrogens from soy-based infant formula. *Lancet*, 350, pp.23-7.
- Setchell, K.D., Zimmer-Nechemias, L., Cai, J., Heubi, J.E. (1998) Isoflavone content of infant formulas and the metabolic fate of these phytoestrogens in early life. *Am J Clin Nutr*, 68, pp.1453S-1461S.
- Shepard, T., Pyne, G., Kirschvink, J., McLean, M. (1960) Soy-bean goiter: report of three cases. *N Engl J Med*, 262, pp.1099-103.
- Strom, B.L., Schinnar, R., Ziegler, E.E., Barnhart, K.T., et al. (2001) Exposure to soy-based formula in infancy and endocrinological and reproductive outcomes in young adulthood. *Jama*, 286, pp.807-14.
- Tönz, O., Zimmerli, B. (1997) Les phyto-oestrogènes dans l'alimentation des nourrissons à base de protéines de soja. *Paediatrica*, 8, pp.16-7.
- Zoppi, G., Gasparini, R., Mantovanelli, F., Gobio-Casali, L., et al. (1983) Diet and antibody response to vaccinations in healthy infants. *Lancet*, 2, pp.11-4.
- Zoppi, G., Gerosa, F., Pezzini, A., Bassani, N., et al. (1982) Immunocompetence and dietary protein intake in early infancy. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 1, pp.175-82.
- Zoppi, G., Guandalini, S. (1999) The story of soy formula feeding in infants: a road paved with good intentions. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 28, pp.541-3.
- Zung, A., Reifen, R., Kerem, Z., Zadik, Z. (2001) Phytoestrogens: the pediatric perspective. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 33, pp.112-8.

# Effets des phyto-estrogènes sur la fonction thyroïdienne

Michel Pugeat

Par différents mécanismes, les phyto-estrogènes ont un potentiel de perturbateur de l'équilibre thyroïdien. Nous présenterons dans ce chapitre les mécanismes moléculaires connus avant de discuter les travaux cliniques qui ont étudié chez l'Homme les conséquences de l'administration de protéines de soja ou d'un supplément d'isoflavones sur l'équilibre et l'activité de hormones thyroïdiennes.

## I- Physiologie de la fonction thyroïdienne

**Le cheminement de l'iode dans la glande thyroïde** suit trois étapes successives : 1) l'ion iodure ( $I^-$ ) est sélectivement transporté à travers la membrane plasmique basolatérale des thyrocytes grâce à une protéine membranaire, le symporteur  $Na^+/I^-$  ou NIS. L'iode minérale  $I^-$  pénètre dans le follicule thyroïdien pour être transformé en iode organique sous l'effet d'une protéine accepteur, la thyroglobuline, des enzymes thyroperoxydase (TPO) et NADPH oxydase, et de la protéine THOX. La production d'iodothyronines et d'hormones thyroïdiennes au sein de la thyroglobuline est la dernière étape de synthèse des hormones thyroïdiennes (Rousset 2003).

**La production de thyroxine (T4) et de triiodothyronine (T3)** est assurée par la glande thyroïde sous le contrôle de l'hormone hypophysaire thyrotrope (TSH). La TSH possède des récepteurs spécifiques membranaires. La transduction du signal de TSH par l'intermédiaire de sa liaison au récepteur induit plusieurs effets : expression de la protéine NIS, captation des iodures et oxydation en radical iode, synthèse de T3 et T4 au niveau de la thyroglobuline située dans la colloïde des vésicules thyroïdiennes et sécrétion des hormones thyroïdiennes.

**Les hormones thyroïdiennes circulent dans le sang** liées à une protéine spécifique de transport la « thyroxine-binding globulin » (TBG) d'origine hépatique. Sa production est régulée en partie par les estrogènes. Ses variations physiologiques et son élévation sous contraceptif oraux ou pendant la grossesse ont conduit à la mise au point du dosage de la fraction libre, biologiquement active de la T4 ou T4-libre dont la concentration est directement le reflet de la production contrairement au dosage de la T4 totale qui dépend du niveau de TBG qui modifie la clairance métabolique et de ce fait la concentration de T4 indépendamment d'un effet sur la production. La T3 circule également liée avec un pré albumine. La perturbation de cette liaison peut augmenter la disponibilité tissulaire de la T3.

**Une source importante de T3** provient du métabolisme périphérique grâce à la présence dans les tissus de plusieurs types d'enzyme 5'-dédiiodase qui maintiennent localement la présence de T3. La T3 est considérée comme l'hormone active du fait de sa forte affinité pour les récepteurs alpha et bêta des hormones thyroïdiennes ( $TR_\alpha$  et  $TR_\beta$ ). Ces récepteurs assurent l'activation ou la désactivation de l'activité de transcription des récepteurs qui possèdent des sites consensus de reconnaissance sur les séquences des promoteurs de nombreux gènes régulés par les hormones thyroïdiennes. Notamment, au niveau de l'hypophyse, la conversion de T4 en T3 facilite la répression du gène sécrétant les sous unités bêta de la TSH ce qui assure un mécanisme de régulation négative de la sécrétion de TSH et ainsi le contrôle de la production d'hormones thyroïdiennes. Ce mécanisme de rétrocontrôle élémentaire assure en permanence les besoins en hormones thyroïdiennes dont les récepteurs nucléaires sont très largement distribués dans la plus part des cellules où elles exercent une activité essentielle sur les métabolismes énergétiques et notamment le découplage de la phosphorylation oxydative et la production d'ATP.

**L'intégration de la fonction thyroïdienne** avec l'environnement est assurée par une régulation hypothalamique qui produit l'hormone TRH dont l'activité est de stimuler la sécrétion hypophysaire de TSH. Cette organisation permet une grande plasticité d'adaptation aux besoins et le maintien des grandes fonctions des hormones thyroïdiennes notamment le cœur et les vaisseaux (en association avec les récepteurs bêta adrénergiques), la peau (en association avec les récepteurs aux rétinoïdes), le foie, les os et sur les métabolismes des glucides (captation du glucose digestif, glycolyse), des lipides (transfert du cholestérol), et des protéines (catabolisme).

**Les hormones thyroïdiennes sont essentielles au développement cérébral.** Ainsi tout défaut de production, de métabolisme ou d'activité des hormones thyroïdiennes a des conséquences graves sur le développement psychomoteur et l'apprentissage ultérieur. L'irréversibilité du « crétinisme » lié à l'hypothyroïdie a conduit au dépistage néonatal de cette affection par le dosage de TSH ou de T4 pour permettre rapidement la mise en route d'un traitement substitutif, préventif des troubles neurologiques (Haddow 1999).

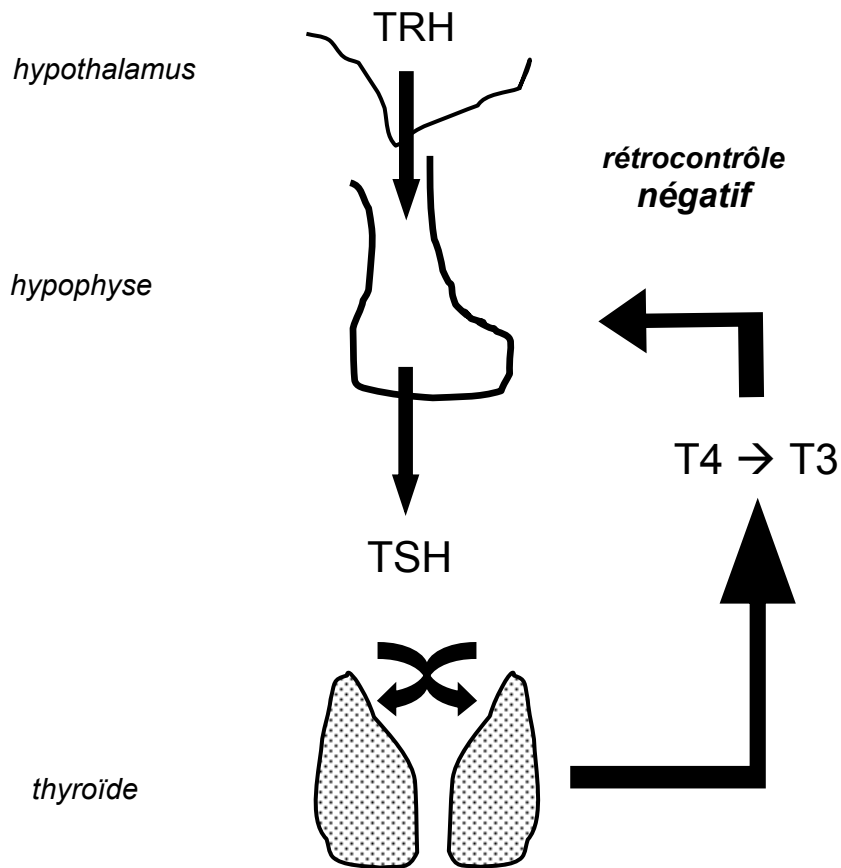
**L'ébauche thyroïdienne se met en place** entre la 10<sup>ème</sup> et la 12<sup>ème</sup> semaine de gestation. A ce stade, le fœtus est dépendant des hormones thyroïdiennes de la mère. La sécrétion de TSH assure la production de T4 du fœtus à partir de la 18<sup>ème</sup> semaine de gestation. Jusqu'à la 18<sup>ème</sup> semaine, le fœtus est totalement dépendant des hormones de la mère. Le taux de T3 n'augmente qu'après l'accouchement sous l'effet de l'activité 5'-déiodase (Morreale de Escobar 1988 ; Thrope-Beeston 1992).

L'apport en iode est essentiel pour la synthèse des hormones thyroïdiennes. Ainsi la carence en iode est une des principales causes de développement du volume thyroïdien ou goitre. Pendant la vie *in utero* la susceptibilité de développer un goitre est élevée.

**La grossesse et la vie fœtale : une période sensible aux conséquences de la carence en iode.** Lorsque l'apport iodé est adapté (200 µg/jour), l'économie thyroïdienne est assurée. Pour un apport inférieur à 100 µg/jour une stimulation excessive de la fonction de la thyroïde explique la survenue de goitre associée à une diminution des concentrations circulantes de T4. La grossesse est un révélateur de la carence en iode et la gestation l'aggrave. Cette carence peut être associée au développement de goitre chez l'enfant mais principalement à des altérations sévères ou retardées du développement psychoneuro-intellectuel de l'enfant. Il a été proposé d'apporter systématiquement un supplément d'iode de l'ordre de 125 µg/j aux femmes enceintes sous la forme de sel iodé ou de complexe polyvitaminé (Glinioer 2003).

Ainsi, toute altération du métabolisme des hormones thyroïdiennes, directement ou indirectement par la consommation de soja ou d'isoflavones doit donc être considérée comme potentiellement associée à de sévères retentissements sur le développement du cerveau fœtal pendant la période de la grossesse.

Figure 1 – Régulation de la fonction thyroïdienne



## II- Effet chez l'Homme des phyto-estrogènes sur la fonction thyroïdienne

### II-1 Etudes avec le soja

#### II-1-2 Chez l'enfant

- **Il a été rapporté 12 cas de dysfonctionnement thyroïdien après exposition à une alimentation à base de soja** (Hydovitz 1960 ; Rawson 1955, Shephard 1960) ; (Van Wyk 1959). Ces cas sont pour la plus part des goitres associés à une carence iodée (Van Middlesworth 1957). Une explication proposée est l'augmentation de l'élimination de T4 dans les selles (Chorazy 1995) comme l'a démontré Pinchera (1965) chez un enfant sans thyroïde dont l'élimination fécale de T4 marquée à l'iode radioactif était augmentée (51 vs 31,6% d'élimination chez un témoin).
- **L'utilisation d'extraits de protéine de soja plus tôt que de farine entière, associée à une supplémentation d'iode**, depuis 1960, semble avoir contribué à la disparition de ces effets du soja sur le développement de goitre (Fomon 1993).

#### II-1-3 Chez l'adulte

La possibilité d'un effet antithyroïdien des isoflavones contribuant au développement d'un goitre a été discutée par plusieurs auteurs (Gaitan 1989).

*Ishizuki (1991)* montre que la consommation chez l'homme de 30 g de soja par jour augmente la TSH sans variation significative de T3 et T4 avec apparition d'un goitre dans la moitié des cas *Key (1992)* rapporte une élévation de TSH chez des hommes végétariens (n=48) plus exposés à la consommation de phytoestrogènes que les omnivores (n=53).

Cette augmentation de TSH était plus marquée en cas « *kelp supplement* », une source importante d'iode.

*Duncan (1999a)* rapporte une baisse isolée de T3 chez la femme ménopausée recevant 128 mg d'isoflavones par jour sans effet sur la TSH ni la T4 libre.

*Duncan (1999b)* dans une autre étude chez la femme ménopausée observe une augmentation de la TBG après un apport modéré d'isoflavones (65 mg/jour) mais en revanche une baisse de la TBG après un régime plus riche (132 mg/jour).

*Persky (2002)* compare les effets de deux doses d'isoflavones (90 mg vs 132 mg/jour) pendant 6 mois chez la femme ménopausée et montre une augmentation de T4 à la dose la plus faible mais une augmentation de T3 et de TSH pour la dose la plus forte. Ces effets sont de faibles amplitudes et leurs conséquences physiologiques sont discutées

*Jayagopal (2002)* rapporte chez des 32 femmes diabétiques de type II ménopausées, recevant de façon randomisée et croisée en double aveugle du soja (contenant 132 mg d'isoflavones par jour) ou de la cellulose (30 gr/jour) pendant 12 semaines une diminution significative la T4-libre (2.5%,  $p=0,004$ ) sans modification de TSH et de T3.

## **II-2 Effets potentiels des phyto-estrogènes**

### **II-2-1 Chez l'enfant**

Il n'y a pas de travaux chez l'enfant qui ait étudié les conséquences de l'exposition in utero aux phyto-estrogènes du soja sur le développement de la glande thyroïde et la production d'hormones thyroïdiennes.

Chez l'enfant nourri au soja exclusif, sans protéines de lait de vache (principale source d'iode) l'incidence de goitre est plus élevée (*Labib 1989*). Ainsi la consommation de soja en zone de carence en iode pourrait augmenter l'incidence de goitre.

Il n'a pas été rapporté d'incidence significative d'hypothyroïdie auto-immune (thyroïdite d'Hashimoto) entre le Japon et la grande Bretagne ce qui aurait pu évoquer une influence de la différence de consommation de soja (*Toublanc 1992*). En désaccord avec ce résultat, *Fort (1990)* a rapporté une augmentation de la prévalence du diabète de type 1 et d'hypothyroïdie auto-immune (31 vs 7% d'incidence) chez les enfants nourris au lait de soja. Cette étude rétrospective d'enquête par téléphone reste à confirmer par une étude de suivi.

### **II-2-2 Sur le traitement substitutif en hormone thyroïdienne**

L'augmentation de l'élimination de T4 dans les selles est un mécanisme pouvant expliquer la réduction des taux de T4 au cours du traitement substitutif. En cas de consommation de soja, il a été montré une augmentation des besoins en substitution de thyroxine de 18 à 25% chez l'enfant hypothyroïdien (*Jabbar 1997*). Cet effet n'est plus observé avec les préparations d'extrait de protéines de soja. Ainsi, le New Zealand Ministry of Health (1998) a recommandé d'adapter la prescription d'hormones thyroïdiennes en fonction de la consommation de soja.

### **II-2-3 Sur le cancer de la thyroïde**

**Chez l'animal** l'élévation de TSH pourrait augmenter l'incidence de cancer de la thyroïde (*Thomas 1999*)

un régime riche en soja augmente l'incidence des goitres folliculaires et est associé à une plus grande fréquence de cancer (*Kimura 1976*)

il n'y a pas d'effet significatif des estrogènes ni de l'apport de génistéine (25, 250 mg/kg de nourriture) sur un modèle de cancer de la thyroïde induit (*Son 2000a 2000b*)

**Chez l'Homme** il n'y a pas de démonstration que l'augmentation de TSH induit les cancers de la thyroïde. En terme de protection, une étude rétrospective faite à San Francisco (*Horn-Ross 2002*) comparant 608 cas vs 558 sujets témoins rapporte que la consommation de phyto-estrogènes ou de soja non fermenté évaluée par un questionnaire pourrait diminuer la prévalence du cancer de la thyroïde.

### III- Possibles mécanismes des effets du soja sur la fonction thyroïdienne

L'analogie de structure de la génistéine et de la daidzéine avec celle des hormones thyroïdiennes T3 et T4 pourrait expliquer une interaction de ces isoflavones avec la peroxydase thyroïdienne (TPO) qui catalyse l'oxydation des iodures en radical iode facilitant l'iodation des tyrosine et la synthèse de T3 et T4 (Divi 1997). *In vitro*, la génistéine, la daidzéine et la biochanine ont une activité inhibitrice de l'activité TPO (Divi 1997 ; Divi 1996). Cet effet inhibiteur disparaît en présence d'iodures.

Tableau 1 - Effets inhibiteurs des isoflavones sur l'activité de la peroxydase thyroïdienne (TPO) (d'après Divi 1996 et 1997)

Composé	Concentration (M)	% inhibition
Génistéine	3,2	50
Daidzéine	7,6	50
Biochanine A	6	15
Flavonone	> 1500	2
Flavone	> 1500	7

*In vivo*, l'exposition *in utero* à un apport de génistéine (5 à 500 mg/kg) diminue de façon dose dépendante l'activité de la peroxydase thyroïdienne microsomiale sans retentir sur la synthèse d'HT (Chang 2000)

*Interaction avec la TBG* : il n'y a pas dans la littérature de travaux qui aient étudié l'influence des isoflavones sur la liaison des hormones thyroïdiennes avec leur protéines de transport ni d'évidence de l'influence *in vitro* sur la production hépatique de TBG.

### IV- Effet chez l'animal des phyto-estrogènes sur la fonction thyroïdienne

**Une activité goitrigène des phyto-estrogènes** a été rapportée chez le rat dont l'alimentation enrichie en extrait de soja augmente le poids de la thyroïde et diminue la captation d'iode (McCarrison 1933). Cet effet disparaît après chauffage de l'extrait de soja. Dans ce cas, la captation de l'iode augmente ainsi que les concentrations de T3 et T4 (Filisetti 1981). Ces résultats ont été confirmés chez le rat par une étude qui montre que les taux de T4 augmentent au cours d'une régime riche en extrait de soja (Balmie 1996) et chez le cobaye adulte, chez qui l'apport de protéine de soja (250 g/kg de poids de nourriture) augmente la T4 (Potter, 1996). Cet effet est associé à une baisse de T3 chez les rats plus âgés (18 mois) (Mitsuma 1998).

**L'apport de soja associé à une carence en iode augmente la taille de la thyroïde** (aspect d'hyperplasie folliculaire) chez la femelle de rat et diminue le taux de T4 (Ikeda 2001). Des résultats similaires ont été rapportés par Son (2001) avec une augmentation de TSH sous l'effet combiné de la carence en iode et de l'apport d'isoflavones (400 ou 2000 mg/kg d'extrait).

Ainsi, les variations de TSH quelque soit le profil hormonal semble le facteur associé à l'augmentation du volume thyroïdien et à l'apparition de goitre lors de la consommation de protéines du soja. La carence en iode, éventuellement induite par les phytoestrogènes, est un mécanisme clé de l'effet goitrigène de la consommation de soja.

### Conclusion

La consommation de soja dans les circonstances d'une carence en iode semble associée à une augmentation de la TSH avec risque de développer un goitre. Il n'a pas été démontré chez l'homme que cet effet pouvait abaisser la T4 au cours de la grossesse et dans ce cas exposé à un effet délétère sur le développement psychomoteur du fœtus qui éventuellement ne pourrait se manifester qu'à la phase des apprentissages.

En, en cas d'apport iodé la consommation de soja pourrait augmenter la concentration de TSH et par ce biais celle des hormones thyroïdiennes.

## Points clés et recommandations

### Points clés

- ❖ La consommation d'isoflavones pourrait modifier les taux circulants d'hormones thyroïdiennes par un effet sur la synthèse, en agissant sur la peroxydase thyroïdienne, ou sur la conversion périphérique de T4 en T3, en agissant sur les 5'-déiodases ; ces effets sont probablement associés à l'analogie de structure de certaines isoflavones avec les hormones thyroïdiennes.
- ❖ Ces effets sont atténués *in vitro* par la présence d'iodures
- ❖ Les effets des isoflavones sur le développement d'un goitre ont été suggérés mais non démontrés chez l'adulte. Ils se limitent à la consommation de farine de soja mais ne sont pas observés en cas d'utilisation de protéines extraites de soja enrichi en iode
- ❖ Des études complémentaires doivent être encouragées pour préciser la relation les mécanismes de l'effet goitrigène du soja
- ❖ Les études épidémiologiques sont limitées ; elles ne montrent pas de relation entre la consommation de soja et d'isoflavones avec le risque de développer un cancer de la thyroïde.
- ❖ Le principal risque de la consommation d'isoflavones pourrait être d'augmenter les besoins en hormones thyroïdiennes chez les patients hypothyroïdiens substitués ou freinés par thyroxine, comme cela a été documenté chez l'enfant (voir chapitre phyto-estrogènes et nourrisson)

### Recommandations

#### Recommandations de Santé Publique

- ❖ Il est recommandé de prévenir les médecins que la consommation de protéines de soja ou de phyto-estrogènes peut augmenter les besoins de substitution en hormones thyroïdiennes chez les patients hypothyroïdiens
- ❖ Bien que les concentrations d'isoflavones libres chez l'enfant ou l'adulte n'atteignent probablement pas des valeurs délétères pour la fonction thyroïdienne, un supplément d'iode devrait être recommandé chez les femmes enceintes consommant des phyto-estrogènes



- Balmir F, Stack R, Jeffrey E, Jimenez MD, Wang L, Potter SM. An extract of soy flour influences serum cholesterol and thyroid hormones in rats and hamsters. *J Nutr*. 1996; 126:3046-3053.
- Chang HC, Doerge DR. Dietary genistein inactivates rat thyroid peroxidase *in vivo* without an apparent hypothyroid effect. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2000, 168:224-252.
- Chorazy PA, Himelhoch S, Hopwood NJ, Greger NG, Postellon DC. Persistent hypothyroidism in an infant receiving soy formula: case report review and review of the literature. *Pediatrics*. 1995, 96:148-150.
- Divi RL, Chang HC, Doerge DR. Anti-thyroid isoflavones from soybean. *Biochem Pharmacol*. 1997, 54:1087-1096.
- Divi RL, Doerge DR. Inhibition of thyroid peroxidase by dietary flavonoids. *Chem Res Toxicol*. 1996, 9:16-23.
- Duncan AM, Merz BE, Xu X, Nagel TC, Phipps WR, Kurzer MS. Soy isoflavones exert modest hormonal effects in premenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab*. 1999a, 84:192-197.
- Duncan AM, Underhill KEW, Xu X, Lavalleur J, Phipps WR, Kurzer MS. Modest hormonal effects of soy isoflavones in postmenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab*. 1999b, 84:3479-3484.
- Filiseti TMCC, Lajolo FM. Efeito da ingestão de frações de soja crua ou autoclavada sobre a tireóide de ratos. *Arch Latino Nutr*. 1981, 31:287-313.
- Fort P, Moses N, Fasano M, Goldberg T, Lifshitz F. Breast and soy-formula feedings in early infancy and the prevalence of autoimmune thyroid disease in children. *J Am Coll Nutr*. 1990, 9:164-167.
- Gaitan E, Lindsay RH, Reichert RD, Ingbar SH, Cooksey RC, Legan J, Meydrech EF, Hill J, Kubota K. Antithyroid and goitrogenic effects of millet: role of C-glycosylflavones. *J Clin Endocrinol Metab*. 1989, 68:707-714.
- Glinoe D. Fetp-maternal repercussions of iodine deficiency during pregnancy. *Ann. Endocrinol*. 2003 ; 64, n°1 :37-44.
- Haddow JE, Palomaki GE, Allan WC, Williams JR, Knight GJ, Gagnon J, O'Heir CE, Mitchell ML, Hermos RJ, Waisbren SE, Faix JD, Klein RZ. Maternal thyroid deficiency during pregnancy and subsequent neuropsychological development of the child. *N Engl J Med*. 1999, 341:549-555.
- Horn-Ross PL, Hoggatt KJ, Lee MM. Phytoestrogens and thyroid cancer risk: the San Francisco bay area thyroid cancer study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2002, 11:43-49.
- Hydovitz JD. Occurrence of goiter in an infant soy diet. *N Engl J Med*. 1960, 262:351-353.
- Ikeda T, Nishikawa A, Imazawa T, Kimura S, Hirose M. Dramatic synergism between excess soybean intake and iodine deficiency on the development of rat thyroid hyperplasia. *Carcinogenesis*. 2000, 21:707-713.
- Ikeda T, Nishikawa A, Son HY, Nakamura H, Miyauchi M, Imazawa T, Kimura S, Hirose M. Synergistic effects of high-dose soybean intake with iodine deficiency, but not sulfadimethoxine or phenobarbital, on rat thyroid proliferation. *Jpn J Cancer Res*. 2001, 92:390-395.
- Ishizuki Y, Hirooka, Maruta Y, Tigashi K. The effects on the thyroid gland of soybeans administered experimentally in healthy subjects. *Folia Endocrinol*. 1991, 67:622-629.
- Jabbar MA, Larrea J, Shaw RA. Abnormal thyroid function test in infants with congenital hypothyroidism: the influence of soy-based formula. *J Am Coll Nutr*. 1997, 16:280-282.
- Jayagopal V, Albertazzi P, Kilpatrick ES, Howarth EM, Jennings PE, Hepburn DA, Atkin SL. Beneficial effects of soy phytoestrogen intake in postmenopausal women with type 2 diabetes. *Diabetes Care*. 2002, 25:1709-1714.
- Key TJA, Thorogood M, Keenan J, Long A. Raised thyroid stimulating hormone associated with kelp intake in British vegan men. *J Hum Nutr Diet*. 1992, 5:323-326.
- Kimura S, Suwa J, Ito M, Sato H. Development of malignant goiter by defatted soybean with iodine-deficient diet in rats. *Gann*. 1976, 67:763-765.
- Labib M, Gama R, Wright J, Marks V, Robins D. Dietary maladvice as a cause of hypothyroidism and short stature. *Br Med J*. 1989, 298:232-233.
- McCarrison R. The goitrogenic action of soybean and ground-nut. *Indian J Med Res*. 1933, 21:179.
- Ministry of Agriculture Fisheries and Food. Iodine in milk. *Food Surveillance Paper No. 198*. London, UK, 1999.
- Mitsuma T, Ito Y, Hirooka Y, Kayama M, Iyuni M, Hasegawa M, Shin K, Mori Y, Adachi K, Sato T, Tauchi H. The effects of soybean diet on thyroid hormone and thyrotrophin levels in ageing rats. *Endocr Regul*. 1998, 32:183-186.
- Morreale de Escobar G, Obregon MJ, Escobar del Rey F. Maternal-fetal thyroid hormone relationships and the fetal brain. *Acta Med Austriaca*. 1988, 15:66-70.
- New Zealand Ministry of Health. Soy based infant formula. 1998.
- Persky VW, Turyk ME, Wang L, Freels S, Chatterton R, Barnes S, Erdman J, Sepkovic DW, Bradlow HL, Potter S. Effect of soy protein on endogenous hormones in postmenopausal women. *Am J Clin Nutr*. 2002, 75:145-153.
- Pinchera A, MacGillivray MH, Crawford JD, Freeman AG. Thyroid refractoriness in an athyreotic cretin fed soybean formula. *N Engl J Med*. 1965, 273:83-87.
- Potter SM, Pertile J, Berber-Jimenez MD. Soy protein concentrate and isolated soy protein similarly lower blood serum cholesterol but differently affect thyroid hormones in hamsters. *J Nutr*. 1996, 126:2007-2011.
- Rawson RW, Rall JE. Endocrinology of neoplastic disease. *Recent Prog Horm Res*. 1955, 11:257-290.
- Rousset B. Le cheminement de l'iode dans la glande thyroïde. *Ann. Endocrinol*. 2003 ; 64, n°1 :4-7
- Shephard TH, Pyne GE, Kirschvink JF, McLean M. Soybean goiter. *N Engl J Med*. 1960, 262:1099-1103.
- Son HY, Nishikawa A, Ikeda T, Furukawa F, Hirose M. Lack of modification by environmental estrogenic compounds of thyroid carcinogenesis in ovariectomized rats pretreated with N-bis(2-hydroxypropyl)nitrosamine (DHPN). *Jpn J Cancer Res*. 2000a, 91:966-972.
- Son HY, Nishikawa A, Ikeda T, Nakamura H, Miyauchi M, Imazawa T, Furukawa F, Hirose. Lack of modifying effects of environmental estrogenic compounds on the development of proliferative lesions in male rats pretreated with N-bis(2-hydroxypropyl)nitrosamine (DHPN). *Jpn J Cancer Res*. 2000b, 91:899-905.
- Son HY, Nishikawa A, Ikeda T, Imazawa T, Kimura S, Hirose M. Lack of effect of soy isoflavone on thyroid hyperplasia in rats receiving an iodine deficient diet. *Jpn J Cancer Res*. 2001, 92:103-108.

Thomas GA, Williams ED. Thyroid stimulating hormone (TSH)-associated follicular hypertrophy and hyperplasia as a mechanism of thyroid carcinogenesis in mice and rats. IARC Sci Publ. 1999, 147:45-59.

Thrope-Beeston JG, Nicolaidis KH, McGregor AM. Fetal thyroid function. 1992, 2:207-217.

Toublanc JE. Comparison of epidemiological data on congenital hypothyroidism in Europe with those of other parts in the world. Horm Res. 1992, 38:230-235.

Van Middlesworth L. Re-evaluation of certain aspects of iodine metabolism. Recent Prog Horm Res. 1957, 16:405-438.

Van Wyk JJ, Arnold MB, Wynn J, Pepper F. The effects of a soybean product on thyroid function in humans. Pediatrics. 1959, 752-760.

# Phyto-estrogènes et immunité

Catherine Bennetau-pelissero, Daniel Rieu

Généralement, chez les mammifères non gestant, les estrogènes activent la réponse immunitaire et diminuent la susceptibilité aux infections (Olsen 1996) alors que les androgènes auraient plutôt l'effet inverse (Olsen 2001). Les estrogènes semblent par ailleurs favoriser les maladies auto-immunes (McMurray 2001). Par ailleurs, le GnRH (hormone hypothalamique déclenchant le relargage des hormones gonadotropes hypophysaires qui contrôlent la synthèse d'oestradiol) et les stéroïdes sexuels affectent la réponse immunitaire et la susceptibilité aux maladies (Tanriverdi 2003). Les thymocytes, les splénocytes et les cellules immunitaires possèdent des récepteurs au GnRH. Les thymocytes présentent des récepteurs aux androgènes et aux estrogènes (Tanriverdi 2003). Les phyto-estrogènes possédant à la fois des effets estrogéniques, anti-estrogéniques et anti-GnRH, leur effet sur l'immunité doit être évalué. Hélas, peu de données sont actuellement disponibles et réellement interprétables sur les interactions entre phyto-estrogènes et immunité. Nous possédons essentiellement des études mettant en œuvre du soja et qui, dans leur grande majorité ne donnent pas d'éléments sur les teneurs en isoflavones. L'effet des isoflavones elles-mêmes a surtout été testé *in vitro* et *in vivo* chez des modèles de laboratoire (Klein 2002), et une seule étude chez l'Homme rapporte l'effet des isoflavones en tant que telles sur la fonction immunitaire (Jenkins 2002).

Après quelques rappels sur l'immunité, les effets des phyto-estrogènes chez les modèles animaux (exposés dans le chapitre « Sécurité ») seront rappelés. Les données connues chez l'Homme seront ensuite analysées, elles concernent d'une part la fonction immunitaire, et d'autre part l'allergie.

## I. Quelques rappels sur l'immunité

### I-1 Définitions

Le système immunitaire regroupe l'ensemble des molécules, cellules, tissus et organes qui participent à la réponse immunitaire ou qui participent au rejet des particules étrangères. L'immunité est la capacité de rejet d'un corps étranger ou antigène par l'organisme. Cet antigène peut être une cellule, un microbe, un virus, mais aussi une molécule alimentaire. Les antigènes peuvent pénétrer dans l'organisme par voie entérale ou parentérale mais la voie entérale au travers de la muqueuse intestinale est peu importante, étant donné la présence d'une réponse immunitaire au niveau des cellules intestinales. L'immunité naturelle regroupe cellules (leucocytes et autres cellules sanguines ou lymphoïdes) et anticorps présents naturellement dans l'organisme et dirigés contre les antigènes qui n'y ont pas été introduits. L'immunité acquise (ou adaptative) correspond à celle qui est due à des anticorps et des cellules apparus après l'introduction des antigènes contre lesquels ils sont dirigés. Elle est primaire lorsque l'antigène est introduit pour la première fois. Dans ce cas, elle ne se développe qu'après un temps de latence. Elle est secondaire si le contact avec le même antigène a déjà eu lieu précédemment. L'organisme déjà sensibilisé à cet antigène synthétise rapidement des anticorps et/ou sensibilise des cellules à cet antigène.

Les antigènes d'histocompatibilité sont les molécules caractérisant le « soi » et à ce titre conditionnent la réponse immunitaire. Ces molécules sont groupées en Ag de classes 1 et 2. Les premiers (HLA) sont présents à la surface de toutes les cellules de l'organisme adulte et constituent la signature moléculaire d'un sujet et les seconds (HLA-DR), aussi présents à la surface des cellules, sont limités aux cellules impliquées dans la réponse immunitaire mais aussi sur certaines cellules tumorales.

Ces molécules sont les produits des gènes du complexe majeur d'histocompatibilité CMH. Les cellules du système immunitaire reconnaissent les molécules étrangères qui leur sont présentées associées quand elles sont associées aux Ag du CMH. Le rejet du non soi est donc étroitement lié à la reconnaissance du soi. Dans le cas des maladies auto-immunes, le système immunitaire a perdu la reconnaissance du soi.

## I-2 Anticorps

Les anticorps (Ac) sont des immunoglobulines (Ig).

### I-2-1 Caractères généraux des Ig

Les Ig sont des protéines formées de chaînes polypeptidiques reliées entre elles par un lien peptidique. Les immunoglobulines, sont formées de 2 types de chaînes : les chaînes lourdes (H) d'une longueur de 400 résidus d'acides aminés (AA), les chaînes légères (L) longues de 214 résidus d'AA. Il existe 5 types de chaînes lourdes et chaque type est à l'origine d'une classe d'Ig. Il y a deux types de chaînes légères (lambda et kappa) que possèdent toutes les Ig. Enfin, les chaînes H et L sont maintenues par des liaisons S-S et des ponts H2.

Dans les 2 types de chaînes, les 107 acides aminés situés du côté NH<sub>2</sub> constituent la partie variable de l'Ig et participent à l'interaction avec l'Ag (site actif). Les 93 acides aminés du côté C-terminal des chaînes H et les 107 acides aminés du côté C-terminal des chaînes L constituent la partie constante de l'Ig. L'Ig (le monomère H<sub>2</sub>L<sub>2</sub>) a la forme d'un Y. La partie variable reconnaît l'Ag, le lie en un complexe Ag-Ac et l'inactive. La partie constante est responsable de l'activité biologique de l'Ig. Elle détermine sa répartition dans l'organisme, elle fixe le complément et/ou certaines cellules immunitaires pour augmenter leur activité ou induire leur réaction ; elle permet à l'Ig de se fixer à des cellules infectées par l'Ag, induisant ainsi la reconnaissance de ces cellules par des lymphocytes tueurs.

### I-2-2 Les différentes Ig

Les Ig diffèrent l'une de l'autre par leur partie variable et donc leur affinité pour différents Ag. Elles diffèrent aussi par leur partie constante même si elles reconnaissent le même antigène. On retrouve 5 types d'Ig dans la fraction □ des protéines sériques : les IgG, IgA, IgM, IgD, IgE. Ces molécules diffèrent par leurs chaînes lourdes. Leur répartition dans le sang est la suivante : IgG 75%, IgA 15%, IgM 7,5%, IgD 1%, IgE < 1%. Les pourcentages restants correspondent à des Ig inclassables.

*L'IgG*, qui a deux sites de reconnaissance identiques de l'antigène, est monospécifique. Ce sont les principales Ig de la réponse immunitaire secondaire. Certains Ig, persistent dans le sang après l'immunisation. Elles passent la barrière placentaire et sont à l'origine d'une immunité héritée par le fœtus et le nouveau-né. Enfin, elles passent dans le système lymphatique où elles neutralisent les toxines bactériennes et se fixent aux cellules phagocytaires, aux cellules infectées et aux micro-organismes. Elles sont à l'origine de la défense cellulaire.

*Les Ig A* sont des dimères (2 x H<sub>2</sub>L<sub>2</sub>) grâce une pièce protéinique J qui assure la jonction entre les monomères. On distingue les IgA sériques et les IgA exocrines qui possèdent en plus une pièce sécrétoire. Cette pièce sécrétoire est une partie polypeptidique qui reconnaît les Ag de l'individu qui les fabrique. Les IgA sécrétoires sont synthétisées directement par les plasmocytes des muqueuses. Elles constituent la première ligne de défense spécifique humorale. Elles se trouvent dans toutes les sécrétions : système digestif, respiratoire, génital, larmes, sueur, salive, etc. Elles neutralisent les microorganismes envahisseurs et régularisent les flores commensales.

*Les IgM* ont une structure pentamérique (5 x H<sub>2</sub>L<sub>2</sub>) mais généralement seuls 5 sites actifs sont liés à l'Ag. En raison de leur valence élevée, elles ont une activité cytolytique très importante. Ce sont les premières à apparaître lors de la réponse immunitaire. Leur activité de lyse des Ag est très importante.

*Les IgE* sont monomériques (H<sub>2</sub>L<sub>2</sub>). Seule une petite proportion de plasmocytes les synthétisent. Elles sont présentes dans le sérum à très faibles concentrations. Elles sont également liées aux mastocytes ; le contact avec l'antigène provoque la dégranulation des mastocytes et la libération d'amines vasoactives. Ce processus est responsable des symptômes allergiques développés en présence d'allergènes.

*Les IgD* sont également des monomères (H<sub>2</sub>L<sub>2</sub>). Leur rôle est peu connu. On a démontré la présence de récepteurs à IgD à la surface de nombreux lymphocytes du sang et du cordon.

Il y a aussi des anticorps non classés car il arrive qu'on ne puisse pas caractériser immunochimiquement un Ac dont on connaît cependant l'activité sérologique. On les appelle alors anticorps cytophiles (anticorps libres qui se lient aux cellules), ou anticorps sessiles (à la surface de certaines cellules lymphoïdes), ou anticorps naturels (présents dans le sérum des individus et qui apparemment ne proviennent pas de stimulations antigéniques).

### **I-3 Cellules du système immunitaire**

Les cellules immunitaires sont différentes du point de vue morphologique et moléculaire. La morphologie ne suffit pas à classer ces cellules qui bien qu'identiques peuvent avoir un comportement immunitaire très différent.

#### **I-3-1 Cellules phagocytaires**

Elles regroupent les microphages (polynucléaires) et les macrophages (monocytes sanguins) et sont douées de phagocytose. Elles éliminent les bactéries, virus, parasites, cellules vieilles ou endommagées grâce à leurs lysosomes. Les macrophages sont des cellules clef du système de défense. Ils phagocytent leurs cibles et présentent l'antigène dans le contexte HLA aux cellules capables de synthétiser les anticorps. Les macrophages sont activés par les cytokines des lymphocytes (MA, MIF, INF  $\gamma$ ). Les macrophages activés sécrètent alors du TNF $\alpha$ .

#### **I-3-2 Cellules lymphoïdes**

On distingue les lymphocytes T et B et les plasmocytes. La maturation des premiers se fait dans le thymus, alors que celle des lymphocytes B se fait dans des organes mal définis correspondant à la bourse de Fabricius des oiseaux.

**Les lymphocytes T** sont issus des cellules souches de la moelle osseuse mais se différencient dans le thymus ; ils sont responsables de la réponse cellulaire et migrent vers les autres organes du système immunitaire. On distingue :

- les lymphocytes T cytotoxiques. (C.T.L.) ou tueurs ou Killer Cells (TK ou CD8+) : Ils tuent spécifiquement les cellules étrangères ou reconnues comme telles (contaminées par l'Ag).
- les lymphocytes T auxiliaires ou helpers (TH ou CD4) : Ils contribuent à la sécrétion d'anticorps et sont indispensables à la différenciation des cellules B pour la production d'anticorps. On les divise en deux populations, les Th1 et les Th2. Les cytokines produites par les lymphocytes Th1 sont l'IL-2, l'interféron  $\gamma$ , et le TNF $\beta$ . Les cytokines produites par les lymphocytes Th2 sont l'IL-4, l'IL-5, l'IL-10 et l'IL-13. Certaines cytokines peuvent être produites à la fois par les Th1 et les Th2 comme l'IL-3, le GM-CSF, le TNF $\alpha$ .
- les lymphocytes T suppresseurs (TS) : Ils freinent ou arrêtent la réponse immunitaire en bloquant ou en diminuant l'activité des autres cellules du système immunitaire.
- les lymphocytes TA amplificateurs qui amplifient l'action des lymphocytes T auxiliaires.

Les lymphocytes T quels qu'ils soient ne peuvent être activés que par l'antigène modifié par le macrophage.

**Les lymphocytes B** naissent dans la moelle osseuse et se différencient dans les structures équivalentes à la bourse de Fabricius. Ils passent ensuite dans les organes lymphoïdes périphériques où ils côtoient les lymphocytes T. Les cellules B exposent à leur surface des récepteurs pour un Ag précis. Le contact de l'Ag avec les lymphocytes B provoque chez ces derniers l'expression de récepteurs des cytokines. Les cellules prolifèrent alors et se différencient en plasmocytes sécréteurs d'Ig spécifiques de l'Ag en cause. La nature des Ig dépend de la nature des cytokines spécifiques de l'Ag en cause. Les lymphocytes B doivent interagir avec les lymphocytes TA pour produire des anticorps.

#### **I-3-3 Autres cellules**

Les cellules NK (Natural Killer) sont les médiateurs de l'immunité anti-tumorale naturelle. Elles sont capables de lyser in vitro des lignées tumorales. Leur mode d'action est proche

des lymphocytes T cytotoxiques (intervention des perforine et granzynes). Elles peuvent détruire des cibles tumorales recouvertes d'Ac car elles expriment à leur surface un récepteur pour les IgG. L'action des cellules NK est potentialisée par certaines cytokines: TNF, IL-2 (libérée par les lymphocytes T CD4) et IL-12 (sécrétée par les macrophages) sécrétée de façon concomittente. Le rôle des cellules NK est surtout potentialisé par l'IL-2 : lorsque les cellules NK sont en présence de IL-2, on les appelle cellules LAK (Lymphokine Activated Killer). Ces LAK sont dérivées des TILs (Tumor Infiltrating Lymphocytes) lorsque ceux-ci sont cultivés in vitro en présence de forte dose d'IL-2.

D'autres cellules interviennent dans ces réactions immunitaires aspécifiques. Ce sont les mastocytes et les basophiles, responsables de la sécrétions de substances vaso-actives.

#### **I-4 Cytokines**

Pour communiquer entre elles, les cellules immunitaires utilisent des messagers chimiques des interleukines ou cytokines. Leur synthèse n'est pas spécifique de l'Ag. Les cytokines stimulent la prolifération cellulaire via des récepteurs membranaires spécifiques de ces cellules. Une même cytokine peut exercer plusieurs fonctions sur différents types de cellules. Plusieurs interleukines différentes peuvent avoir le même type d'activités. (production des cellules sanguines, développement et expression de la réponse immunitaire).

##### **I-4-1 L'interleukine 1 (IL1)**

l'IL1 est surtout sécrétée par les macrophages et les lymphocytes B, T et les cellules endothéliales. Les macrophages présentent l'Ag étranger dans le contexte du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) et l'IL1 active les lymphocytes T. Ceux-ci se différencient d'abord en lymphocytes TA (helpers ou auxiliaires) qui produisent l'IL2. Celle-ci fait la relation avec les Lymphocytes CTL (cytotoxiques). L'IL-1 est aussi le LAF (Lymphocyte Activating Factor) le BAF (B Cell Activating Factor) le MP (Mitogenic Protein) le TPF (Thymocyte Proliferation Factor).

##### **I-4-2 L'interleukine 2 (IL-2)**

Elle est produite par les lymphocytes T activés et induit la prolifération des CD4 et des CD8 porteuses du récepteur pour IL-2 Elle entraîne la multiplication des lymphocytes T et l'activation des lymphocytes TK (natural killers). Elle active les lymphocytes TA qui sécrètent à leur tour des cytokines. Celles-ci sont :

- des facteurs induisant la prolifération et la différenciation des lymphocytes et plasmocytes.
- des facteurs activant les macrophages.
- la lymphotoxine (Tumor Necrosis Factor Bêta, TNF $\beta$ ).
- l'interféron gamma (INF $\gamma$ ).

##### **I-4-3 L'interleukine 6 (IL-6)**

Elle est aussi appelé Hepatocyte stimulating factor ou B cell stimulating factor. Elle est sécrétée par les monocytes, les cellules endothéliales, les lymphocytes T et B les fibroblastes etc... Elle stimule la croissance et la prolifération des lymphocytes B, la génération des plaquettes, et la sécrétion hépatique de protéines de l'inflammation (fibrinogène, protéine C réactive). Elle a un rôle pro-inflammatoire et cytotoxique vis à vis de certaines cellules tumorales.

#### **I-5 Fonctionnement du système immunitaire**

##### **I-5-1 réaction inflammatoire**

L'inflammation, réponse aspécifique impliquant les macrophages (oxydative burst) et la synthèse des métabolites de la voie des cyclo-oxygénases et des lipoxigénases, préserve le sujet, même si elle peut entraîner des conséquences dommageables.

## **I-5-2 La réponse immunitaire**

La réponse primaire comprend plusieurs étapes chronologiques. Tout d'abord un temps de latence pendant lequel se produisent les interactions cellulaires entre macrophages et populations lymphocytaires (T et B), puis une phase de synthèse d'anticorps proportionnelle au nombre de plasmocytes issus des lymphocytes activés, une phase de déclin qui commence dès que la réserve d'Ag est épuisée, et enfin une phase de repos durant laquelle l'Ac n'est plus détectable. Toutefois l'organisme possède à ce moment des cellules ayant mémorisé ce premier contact (lymphocytes T CD4+).

Dès que le même antigène pénètre à nouveau l'organisme la réponse secondaire s'enclenche. La latence est brève et les CD4+, se transforment en plasmocytes au contact de l'Ag et synthétisent les anticorps. Les Ig sont produites rapidement par les CD4+ et les plasmocytes (réponse immunitaire normale au contact de l'Ag). Le déclin est plus lent à cause de la grande réserve d'anticorps. La phase de repos est plus longue pour la même raison. Tout cela augmente avec des contacts répétés avec l'Ag.

## **I-5-3 La tolérance immunitaire**

La tolérance immunitaire est une absence de réponse qui permet d'accepter un Ag dans l'organisme. C'est l'absence de réaction antigénique à un Ag. On distingue la tolérance naturelle au soi et la tolérance acquise. Sauf erreur et pathologie (maladie auto-immune) l'organisme ne s'attaque pas à lui-même. La distinction entre le soi et le non soi pourrait être acquise et se mettre en place dès l'apparition des premiers lymphocytes chez l'embryon et continuer toute la vie. Tous les nouveaux lymphocytes passeraient par une phase d'"éducation". Les cellules B sont encore immatures quand elles reconnaissent l'antigène et donc incapables de produire des anticorps. Les cellules T sont contrôlées par les cellules T suppressives, qui produisent des facteurs suppresseurs spécifiques. La non reconnaissance du soi étant un équilibre entre activation et suppression, en toute logique lorsque l'activité des cellules suppressives diminue des maladies auto-immunes apparaissent.

La tolérance acquise est l'absence de réaction immunitaire momentanée vis à vis d'un Ag donné. Cette situation apparaît lorsque la dose d'antigène est faible ou au contraire très forte et si l'Ag, par sa structure ou sa configuration, n'est pas capté par les macrophages.

## **II- Effet des phyto-estrogènes sur la réponse immune**

### **II-1 Modèles animaux**

Dans les modèles animaux, les données que nous possédons ne sont pas claires. Elles rapportent des effets immunodépresseurs (Yellayi 2003, Yellayi 2002, O'Connor 2002, Verdrengh 2003) et d'autres au contraire immunostimulants (Zhang 1999, Guo 2001).

Très brièvement Yellayi (2002) rapportent chez des rats que la génistéine utilisée seule réduit le poids et la taille du thymus de manière dose dépendante entre 8mg/kg pc/j et 200 mg/kg pc/j. A 8 mg/kg pc/j, on observe une diminution des taux circulant d' IgG anti-KLH, de lymphocytes CD4+ et de lymphocytes totaux. Les doses responsables de l'immunodépression sont de l'ordre de 8 à 10 mg/kg pc/j. Elles correspondent à des taux plasmatiques compatibles avec ceux circulant chez un Homme consommateur de soja. En 2003 Yellayi proposent une autre étude. Ils montrent qu'à des doses équivalentes à celles testées dans l'étude précédente il y a un retard dans l'apparition d'hypersensibilité au NP-O-SU et diminution des taux de lymphocytes T CD4+ et CD8+ dans les nodules lymphatiques. Par ailleurs en réponse à une stimulation l'infiltration des lymphocytes dans le tissu testé et suivi histologiquement est moins importante chez les animaux traités que chez les témoins.

O'Connor 2002 partant de la constatation que les isoflavones du soja induisent *in vitro* une immunosuppression, décident de les tester sur le rejet de greffe de cœur chez le rat. Les rats sont soumis à 3 régimes alimentaires : Caséine, Caséine + Isoflavone et Soja (dose de 20 mg/kg pc/j). Il relève un effet significatif de l'allongement de la tolérance chez les animaux nourris avec le soja mais pas avec les deux autres régimes. En testant ensuite la génistéine seule en injection intrapéritonéale à raison d'une dose comparable à 20 mg/kg pc/j per os ils

montrent que son effet est comparable à celui de la cyclosporine et que l'isoflavone augmente l'action de celle-ci. Enfin ils montrent que les animaux traités à la génistéine par injection intraveineuse (20 mg/kg pc/j) présentent des taux d'interféron- $\gamma$  8 fois plus faibles que des témoins. Les travaux de Yellayi nous indiquent que 20 mg/kg pc/j d'isoflavone correspondent à des taux plasmatiques comparables à ceux qui circulent chez des consommateurs de soja.

Verdrengh 2003, quant à eux, testent sur des souris soumises ou non à la génistéine, la réponse à l'injection d'oxazolone (hypersensibilité) et d'huile d'olive (inflammation). Ils montrent que la réaction médiée par les granulocytes est significativement diminuée chez les animaux traités à la génistéine. Le taux d'anticorps anti-oxazolone est réduit. L'inflammation est réduite chez les animaux traités.

D'après Klein 2002, l'exposition in utero puis néonatale de rat à des doses de génistéine de 0,42 mg/kg pc/j et de 25 mg/kg pc/j affecte durablement la fonction immunitaire de rats mâles. Le plus fort traitement augmente le poids du thymus. Les lymphocytes T sont augmentés chez les traités par rapport aux témoins. L'interféron- $\gamma$  est augmenté de façon non significative dans la rate et le thymus. Il n'y a pas d'effet sur les lymphocytes B, les CD4+ et une légère augmentation des CD8+. Les auteurs font l'hypothèse que cet effet passe par un effet sur la fonction de reproduction et notamment par le facteur hypothalamique gonadotrope : le GnRH, dans la mesure où une démasculinisation est observée chez les animaux traités.

Dans ce contexte les travaux de Zang (1997) sur des souris sous daidzéine 10, 20 ou 40 mg/kg de poids vif interrogent quelque-peu. Dans leur cas les doses testées qui sont très élevées entraînent une augmentation du poids du thymus et de l'activité phagocytaire dose-dépendante, une augmentation de la proportion de lymphocytes dans le sang périphérique et une augmentation de la production de lymphocytes M dans la rate. Ces doses sont toutefois jugées très élevées par les auteurs eux-même.

Guo 2001 rapportent eux aussi des travaux sur des souris gavées avec des solutions de 2, 6 et 20 mg/kg de poids vif de génistéine après leurs avoir injecté des cellules tumorales pulmonaire de type B16F10. Les observations montrent une protection contre la prolifération des nodules tumoraux. Il est observé, une légère tendance à la diminution du poids du thymus mais seulement à la dose de 20 mg/kg de poids vif de génistéine. La diminution de la prolifération des nodules B16F10 est attribuée à une augmentation de l'activité immunitaire chez les animaux traités portant sur les CTL (6 et 2 mg/kg), la réponse des NK à IL-2, la prolifération des splénocytes. Tous les paramètres immunitaires ne sont pas touchés et notamment les taux circulants d'IGM et IgG ou l'activité des macrophages ou des mononucléaires. Les taux circulants d'isoflavones n'ont pas été mesurés mais les auteurs considèrent les doses utilisées comme étant physiologiques. Dans une autre étude où les mères et les petits ont été exposés in utero et jusqu'au 78ème jour (Guo 2002) les auteurs montrent une augmentation significative de l'activité des cellules NK chez les mères des lymphocytes T totaux, helpers et cytotoxiques chez les jeunes mâles alors que chez les femelles les effets sont pratiquement inexistantes. Là encore il n'y a pas d'effet sur les lymphocytes B quelque-soit les individus.

Ces études, bien que réalisées chez des modèles animaux, présentent l'avantage d'avoir testé des doses physiologiques. Considérant les résultats discordants obtenus il est difficile de trancher à la vue de ces travaux même s'ils se dégagent en majorité des effets immunodépresseurs sur les modèles animaux. Une interaction via l'axe hypothalamus-hypophyse-gonade n'est pas à exclure.

Le problème soulevé par ce type d'étude réside dans le fait que le métabolisme des isoflavones chez le rat ou la souris est différent de celui de l'homme. En effet, les rats, souris, singes, porcs sont tous des producteurs d'équol alors que l'homme n'est pas systématiquement capable de synthétiser ce composé. Or, des données récentes (Setchell 2002) et d'autres plus anciennes (Thompson 1984) montrent que l'équol est sans doute une des molécules les plus actives parmi les phyto-estrogènes circulants dans le sang. D'une manière générale, même si les doses circulantes sont globalement comparables, il est



parfois difficile de transposer des données obtenues chez l'animal à l'homme à cause de ces différences de métabolisme.

## **II-2 Modèles *in vitro***

Les résultats sont souvent incohérents. Plusieurs études ont été menées *in vitro* impliquant des cellules immunitaires et notamment la génistéine en tant qu'inhibiteur de la tyrosine kinase. On a pu montrer à des doses supérieures à 10 µM des effets activateurs de l'aggrégation plaquettaire (Gottstein 2003). Jacob (2002) ont également montré une inhibition par la génistéine de la différenciation des monocytes et des macrophages. De la même façon (Takami 2001) ont montré que la génistéine inhibait l'adhésion des neutrophiles impliqués dans de nombreux phénomènes et notamment dans la phagocytose.

Certains auteurs rapportent également des effets immunosuppresseurs (Polkowski 2000), Revue) et pour Zhang (1999) à doses physiologiques on observe une activation des NK par des doses physiologiques de dérivés glucuronidés de la génistéine et la daidzéine.

Ces effets notamment ceux obtenus à fortes doses sont difficilement transposables *in vivo* et doivent être considérés avec prudence. L'interprétation qui en est faite par les auteurs est souvent partielle en fonction des effets recherchés. Si l'on ajoute à ces données que la génistéine n'est jamais seule dans le plasma mais plutôt accompagnée par la daidzéine et éventuellement de l'équol qui ne possèdent pas les mêmes propriétés d'inhibition sur la tyrosine kinase, on reste dubitatif quant au crédit à attribuer à ce type d'études et surtout à leur transposition à la consommation de soja ou d'extraits d'isoflavones.

## **II-3 Etudes chez l'Homme**

Les études chez l'Homme se présentent soit sous des approches *ex vivo* soit sous forme d'étude *in vivo* mais dans ce dernier cas ce sont surtout des études rétrospectives. Nous avons peu de données sur l'effet des isoflavones en tant que telles.

Pour les effets du soja *in vivo* les principaux éléments ont été obtenus chez des nourrissons nourris à l'aide de préparations infantiles et de préparations de suite à bases de protéines de soja. Elles sont présentées dans le chapitre « Préparations pour nourrissons et préparations de suite à base de protéines de soja ». Très rapidement, dans les années 1990, les études de Zoppi (1983) ont montré une diminution de la réponse immunitaire à certains vaccins chez des enfants nourris avec des préparations à base de protéines de soja. Plus récemment dans les années 2000 de tels phénomènes ont été remis en question (Ostrom 2002, Cordle 2002). Ces effets ne peuvent pas directement être attribués aux isoflavones et ce dans les deux cas. On manque de précision dans des deux études sur la composition exacte des préparations qui a pu être modifiée au cours du temps mais ce sont les seules dont on dispose à ce jour.

Aux vues de ces études contradictoires comme et des observations de terrain il semble aujourd'hui qu'une atteinte directe de la fonction immunitaire ne serait pas à craindre. Toutefois comme il l'a été mentionné précédemment on sait qu'une perturbation de l'axe hypothalamus-hypophyse-gonade peut elle-même avoir des effets sur la fonction immunitaire. Or la question de cette perturbation par les phyto-estrogènes reste d'actualité compte tenu du manque de données scientifiques dont on dispose à ce jour.

Chez l'adulte on dispose aujourd'hui de deux études cliniques d'intervention. La première (Jenkins 2002) rapporte l'effet de trois alimentations l'une riche en isoflavones (73 mg/j) l'autre pauvre en isoflavones (10 mg/j), la troisième étant le témoin, chez des 18 femmes et des 23 hommes en surpoids (LDL Cholestérol élevé ; >4,1 mmol/L). Plusieurs critères ont été analysés : le niveau circulant de la protéine C réactive, l'amyloïde A sérique, l'interleukine 6 et le TNF-α. Parmi ces marqueurs seul l'IL-6 est légèrement augmentée chez les femmes mais cette modification perd sa significativité après ajustement des paramètres sur la dose testée et la séquence de traitement. L'effet semble donc non significatif.

L'autre étude (Davis 2001) a été réalisée sur 6 volontaires sains de 25 à 40 ans qui ont pris pendant 3 semaines un extrait de soja dosé à 50 mg d'isoflavones. Un prélèvement de sang a été réalisé à T0 à T 3 semaines et à T 3 mois après le début de la prise d'isoflavones. Les cellules sanguines ont été placées en culture et traitées avec une isoflavone seule, du TNF-

$\alpha$  ou une association des deux. Ces traitements ont été comparés à un témoin. Il ressort qu'*in vitro* alors que classiquement le TNF- $\alpha$  augmente la production de NF- $\kappa$ B, cette production est inhibée par un cotraitement avec la génistéine. Cette inhibition est retrouvée sur les échantillons de sang prélevé à 3 semaines et ce sans cotraitement avec des isoflavones et abolie sur les prélèvements réalisés à 3 mois après l'administration des isoflavones. NF- $\kappa$ B est un facteur lymphocytaire impliqué dans la transcription, les réponses immunitaire et inflammatoire, et dans la réponse anti-apoptotique.

Dans ces deux études (Jenkins 2002, Davis 2001) les auteurs ne prennent en compte dans leur discussion que les effets anti-cancer et orientent donc leurs conclusions en parlant d'effet positifs. Pour Davis (2001) ce sont les effets anti-apoptotiques de NF- $\kappa$ B qui sont mis en exergue et les auteurs suggèrent ainsi un effet anti-cancer lié éventuellement à la diminution de la résistance des cellules cancéreuses à l'apoptose. Pour Jenkins (2002) c'est l'augmentation de IL-6 qui est mis en avant en suggérant une augmentation de la réponse immunitaire s'opposant à la progression tumorale.

Rappelons que dans cette étude, les résultats sont à la limite de la significativité. Elles mériteraient d'être confirmées sur un nombre plus important de personne. Notons également que les deux effets cités ici sont antagonistes sur la fonction immunitaire. L'augmentation d'IL-6 irait dans le sens d'une augmentation du nombre de lymphocyte T et B (ce qui n'est pas montré). La diminution de la sécrétion de NF- $\kappa$ B en réponse à TNF- $\alpha$  irait au contraire dans le sens d'une dépression de la réponse immunitaire.

Notons également que Fort (1990) ont rapporté une plus forte proportion d'enfants atteints de maladies auto-immunes parmi des enfants nourris avec des préparations infantiles à base de protéines de soja. On pourra consulter ces données de façon plus explicites dans le chapitre « Préparations pour nourrissons et préparations de suite à base de protéines de soja ».

### **III- Effets des phyto-estrogènes sur l'allergie et/ou ses manifestations**

Les allergies au soja ont été à ce jour essentiellement rapportées chez des enfants et elles disparaissent après 1 à 2 années d'éviction totale (Sicherer 1999, Zeiger, 2000). Rien ne permet de penser que les isoflavones sont responsables de ces phénomènes mais le soja étant une des sources majeures d'isoflavones il faut documenter cet effet même de façon sommaire pour éviter les utilisations abusives.

Chez l'adulte la poussière de soja entraîne une allergie respiratoire par l'exposition à des protéines de la pellicule de la graine : les protéines Gly m1 et Gly m2 (Mittag 2004). Par ailleurs, certains autres allergènes du soja ont été identifiés ce sont à ce jour : l'inhibiteur trypsique Kunitz (Moroz 1980), la glycinine (Djurtoft 1991), la sous unité  $\alpha$  de la  $\beta$ -conglycinine (Ogawa 1995) et une protéine de 50 KD présentant des homologie avec la chlorophille A-B binding protéine (Codina 2002). Dans ce contexte il est bon de reprendre les données scientifiques majeures que nous possédons dans ce domaine.

Ainsi plusieurs réactions croisées ont été rapportées entre le soja et d'autres allergènes tels le pollen de bouleau (Mittag 2004) l'arachide (Lack 2003 , Koppelman 1999 et 2003) et le lait de vache (Ahn 2003).

Par ailleurs Chandra (1989, 1991) montrent que pour les enfants à risques familiaux de dermatite atopique il vaut mieux l'allaitement sous restriction alimentaire pour la mère ou un hydrolysate de caséine que des préparations à base de lait de vache ou de soja. Ces dernières sont équivalentes.

Enfin Strom (2001) montrent que des adultes nourris au soja dans leur toute petite enfance rapportent une plus grande utilisation de médicaments contre les allergies et l'asthme que des adultes nourris dans l'enfance au lait de vache. Les niveaux de significativité sont pour les hommes  $P=0,08$  et pour les femmes  $P=0,047$ . Cela dit, on ne peut en déduire que la prise de formules infantiles à base de soja est à l'origine de ces différences, elle peut en être la cause.

## **Conclusion**

Les interactions entre les phyto-estrogènes et l'immunité ne sont peut-être pas inexistantes si l'on considère qu'il existe des interactions entre l'axe hypothalamus-hypophyse-gonade et la fonction immunitaire. Toutefois, à ce jour aucune donnée scientifique ne permet de conclure à un effet de la prise de soja ou d'isoflavones sur cette fonction. Seules des études rigoureuses pourront permettre de trancher définitivement dans un sens ou dans l'autre concernant l'immunité.

Concernant les phénomènes allergiques si le soja est connu comme allergène et si dans la plante, transformée ou non, plusieurs protéines antigéniques ont été identifiées (famille des glycinines), rien ne permet de penser que les isoflavones ou les phyto-estrogènes dans un sens plus large sont impliquées d'une quelconque façon dans ces processus. Le soja n'est donc pas à conseiller chez le petit enfant allergique du fait de la mise en évidence de nombreux cas d'allergie croisée. En ce qui concerne les extraits de soja riches en phyto-estrogènes aucune donnée à ce jour ne permet de penser qu'ils soient allergisants du fait de leur teneur en phyto-estrogènes.

## Points clés et recommandations

### Points clés

- ❖ Les études concernant l'effet des phyto-estrogènes et surtout des isoflavones sont éparses et contradictoires que l'on examine les résultats obtenus in vivo chez l'animal, in vitro sur cellules humaines et in vivo chez l'homme.
- ❖ Le soja qui est l'un des principaux pourvoyeur de phyto-estrogènes est un allergène puissant par le biais de certaines de ces protéines notamment la  $\beta$ -conglycinine, l'inhibiteur trypsique Kunitz ou la glycinine.

### Recommandations

#### 1- Recommandations à visée de connaissance et de recherche

- ❖ Des études d'intervention restent à faire chez l'enfant et l'adulte pour vérifier l'action des phyto-estrogènes au sens large et des isoflavones du soja en particulier sur la fonction immunitaire.
- ❖ Les estrogènes activent la fonction immunitaire. Le GnRH neurohormone clé du système hypothalamo-hypophysaire participe également au contrôle de la fonction immunitaire. Elle agit soit directement via des récepteurs présents sur le thymus soit indirectement via son action sur les taux circulants d'estrogènes. Les effets anti-LH des isoflavones et du coumestrol ayant été attribué par certains auteurs à une perturbation de la sécrétion de GnRH, et l'influence des estrogènes et de ce déca peptide sur la fonction immunitaire étant connues, il serait bon de vérifier si une interaction des isoflavones et du coumestrol avec la fonction immunitaire pourrait passer via une perturbation de la fonction gonadotrope.

#### 2- Recommandations à visée d'information du consommateur

- ❖ Bien qu'aucun phénomène d'allergie n'ait à ce jour été rapporté avec les compléments alimentaires à base d'isoflavones de soja, la variété des modes d'obtention de ces extraits doit inciter les personnes notoirement sensibles aux protéines de soja à la prudence vis à vis de ces préparations.

**Tableau récapitulatif des effets chez l'animal.**

Modèle	Formes administrées et doses	Effet global	Effet précis	Référence bibliographique
Rat	Génistéine 2, 8, 20, 80 et 200 mg/kg pc/j	Immunodépresseur	↘ du poids du thymus dose dépendante ↘ IgG anti KLH, ↘ des lymphocyte T CD4+ et lymphocytes totaux	Yellayi 2002
Rat	Génistéine 2, 8, 20, 80 et 200 mg/kg pc/j	Immunodépresseur	Retard d'hypersensibilité à un immunogène ↘ des lymphocyte T CD4+ et CD8+ lymphatiques, Retard d'infiltration des lymphocytes dans un tissu en réponse à une stimulation immunitaire.	Yellayi 2003
Rat	Génistéine 20 mg/kg pc/j per os et équivalent par voie intraveineuse	Immuno dépresseur	↘ Réaction de rejet de cœur greffé	O'Connor 2002
Souris	Génistéine	Immunodépresseur	↘ inflammation, ↘ des anticorps spécifiques	Verdrengh 2003,
Rats ♂ in utero et néonatal	Génistéine 0 ; 0,42 et 25 mg/kg pc/j	Immunoactivateur	Doses fortes : ↗ du poids du thymus, ↗ du % des thymocytes CD4+, CD8+ ↗ des splénocytes CD8+ et des TC spléniques interféron β dans la rate & le thymus.	Klein 2002
Souris	Daidzéine 10, 20, 40 mg/kg pc	Immuno-activateur	↗ du poids du thymus, ↗ activité phagocytaire, ↗ des lymphocytes totaux, ↗ des lymphocytes M spléniques	Zang 1997
Souris	Génistéine 2, 6, 20 mg/kg pc	Immuno-activateur à faible dose et tendance à l'immunodépression à 20 mg/kg pc	Faibles doses : ↗ prolifération des thymocytes, ↗ réactivité de NK à IL-2 et ↗ des CTL. A 20 mg/kg pc ↘ poids du thymus	Guo 2001
Rates Sprague Dawley gestantes + petits	Génistéine 2, 6, 20 mg/kg pc	Immuno-activateur à faible dose	↗ des LCT ↗ des LTH, et ↗ des NK chez les mère et les jeunes ♂	Guo 2002

- Ahn, K. M., Han, Y. S., Nam, S. Y., Park, et al. (2003) Prevalence of soy protein hypersensitivity in cow's milk protein-sensitive children in Korea. *J Korean Med Sci*, 18 (4), pp.473-7.
- Chandra, R. K. Hamed, A. (1991) Cumulative incidence of atopic disorders in high risk infants fed whey hydrolysate, soy, and conventional cow milk formulas. *Ann Allergy*, 67 (2 Pt 1), pp.129-32.
- Chandra, R. K., Puri, S. Hamed, A. (1989a) Influence of maternal diet during lactation and use of formula feeds on development of atopic eczema in high risk infants. *Bmj*, 299 (6693), pp.228-30.
- Chandra, R. K., Singh, G. Shridhara, B. (1989b) Effect of feeding whey hydrolysate, soy and conventional cow milk formulas on incidence of atopic disease in high risk infants. *Ann Allergy*, 63 (2), pp.102-6.
- Codina, R., Arduoso, L., Lockey, R. F., Crisci, C. D., et al. (2002) Identification of the soybean hull allergens involved in sensitization to soybean dust in a rural population from Argentina and N-terminal sequence of a major 50 KD allergen. *Clin Exp Allergy*, 32 (7), pp.1059-63.
- Cordle, C. T., Winship, T. R., Schaller, J. P., Thomas, D. J. et al. (2002) Immune status of infants fed soy-based formulas with or without added nucleotides for 1 year: part 2: immune cell populations. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 34 (2), pp.145-53.
- Davis, J. N., Kucuk, O., Djuric, Z. Sarkar, F. H. (2001) Soy isoflavone supplementation in healthy men prevents NF-kappa B activation by TNF-alpha in blood lymphocytes. *Free Radic Biol Med*, 30 (11), pp.1293-302.
- Djurtoft, R., Pedersen, H. S., Aabin, B. Barkholt, V. (1991) Studies of food allergens: soybean and egg proteins. *Adv Exp Med Biol*, 289, pp.281-93
- Fort, P., Moses, N., Fasano, M., Goldberg, T. Lifshitz, F. (1990) Breast and soy-formula feedings in early infancy and the prevalence of autoimmune thyroid disease in children. *J Am Coll Nutr*, 9 (2), pp.164-7.
- Gottstein, N., Ewins, B. A., Eccleston, C., Hubbard, G. P., et al. (2003) Effect of genistein and daidzein on platelet aggregation and monocyte and endothelial function. *Br J Nutr*, 89 (5), pp.607-16.
- Guo, T. L., McCay, J. A., Zhang, L. X., Brown, R. D., et al. (2001) Genistein modulates immune responses and increases host resistance to B16F10 tumor in adult female B6C3F1 mice. *J Nutr*, 131 (12), pp.3251-8.
- Guo, T. L., White, K. L., Jr., Brown, R. D., Delclos, K. B., et al. (2002) Genistein modulates splenic natural killer cell activity, antibody-forming cell response, and phenotypic marker expression in F(0) and F(1) generations of Sprague-Dawley rats. *Toxicol Appl Pharmacol*, 181 (3), pp.219-27.
- Jacob, S. S. Sudhakaran, P. R. (2002) Molecular mechanism involved in matrix dependent upregulation of matrix metalloproteinases in monocyte/macrophage. *J Biochem Mol Biol Biophys*, 6 (5), pp.335-40.
- Jenkins, D. J., Kendall, C. W., Connelly, P. W., Jackson, et al. (2002) Effects of high- and low-isoflavone (phytoestrogen) soy foods on inflammatory biomarkers and proinflammatory cytokines in middle-aged men and women. *Metabolism*, 51 (7), pp.919-24.
- Klein, S. L., Wisniewski, A. B., Marson, A. L., Glass, G. E. et al. (2002) Early exposure to genistein exerts long-lasting effects on the endocrine and immune systems in rats. *Mol Med*, 8 (11), pp.742-9.
- Koppelman, S. J., Bruijnzeel-Koomen, C. A., Hensing, M. de Jongh, H. H. (1999) Heat-induced conformational changes of Ara h 1, a major peanut allergen, do not affect its allergenic properties. *J Biol Chem*, 274 (8), pp.4770-7.
- Koppelman, S. J., Knol, E. F., Vlooswijk, R. A., Wensing, M., et al. (2003) Peanut allergen Ara h 3: isolation from peanuts and biochemical characterization. *Allergy*, 58 (11), pp.1144-51.
- Lack, G., Fox, D., Northstone, K. Golding, J. (2003) Factors associated with the development of peanut allergy in childhood. *N Engl J Med*, 348 (11), pp.977-85.
- McMurray, R. W. (2001) Estrogen, prolactin, and autoimmunity: actions and interactions. *Int Immunopharmacol*, 1 (6), pp.995-1008.
- Mittag, D., Vieths, S., Vogel, L., Becker, W. M., et al. (2004) Soybean allergy in patients allergic to birch pollen: clinical investigation and molecular characterization of allergens. *J Allergy Clin Immunol*, 113 (1), pp.148-54
- Moroz L. A. Yang W. H. (1980) Kunitz soybean trypsin inhibitor: a specific allergen in food anaphylaxis. *N. Engl. J. Immunol*, 302, pp.350-352.
- O'Connor, T. P., Liesen, D. A., Mann, P. C., Rolando, L. et al. (2002) A high isoflavone soy protein diet and intravenous genistein delay rejection of rat cardiac allografts. *J Nutr*, 132 (8), pp.2283-7.
- Ogawa, T., Bando, N., Tsuji, H., Nishikawa, K. et al. (1995) Alpha-subunit of beta-conglycinin, an allergenic protein recognized by IgE antibodies of soybean-sensitive patients with atopic dermatitis. *Biosci Biotechnol Biochem*, 59 (5), pp.831-3
- Olsen, N. J., Kovacs W. J. (1996) Gonadal steroids and Immunity. *Endocrine Reviews*, 17(4), pp.369-83.
- Olsen, N. J., Olson, G., Viselli, S. M., Gu, X. et al. (2001) Androgen receptors in thymic epithelium modulate thymus size and thymocyte development. *Endocrinology*, 142 (3), pp.1278-83.
- Ostrom, K. M., Cordle, C. T., Schaller, J. P., Winship, T. R., et al. (2002) Immune status of infants fed soy-based formulas with or without added nucleotides for 1 year: part 1: vaccine responses, and morbidity. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 34 (2), pp.137-44.
- Polkowski, K., Mazurek, A. P. (2000) Biological properties of genistein. A review of in vitro and in vivo data. *Acta Pol Pharm*, 57 (2), pp.135-55.
- Setchell, K. D., Brown, N. M., Lydeking-Olsen, E. (2002) The clinical importance of the metabolite equol-a clue to the effectiveness of soy and its isoflavones. *J Nutr*, 132 (12), pp.3577-84.
- Sicherer S. H., Sampson H. A. (1999) Food hypersensitivity and atopic dermatitis : pathophysiology, epidemiology, diagnosis and management. *J. Allergy Clin. Immunol.* 104(3), pp.114-22.
- Strom, B. L., Schinnar, R., Ziegler, E. E., Barnhart, K. T. et al. (2001) Exposure to soy-based formula in infancy and endocrinological and reproductive outcomes in young adulthood. *Jama*, 286 (7), pp.807-14.
- Takami, M., Herrera, R. Petruzzelli, L. (2001) Mac-1-dependent tyrosine phosphorylation during neutrophil adhesion. *Am J Physiol Cell Physiol*, 280 (5), pp.C1045-56.
- Tanriverdi, F., Silveira, L. F., MacColl, G. S. Bouloux, P. M. (2003) The hypothalamic-pituitary-gonadal axis: immune function and autoimmunity. *J Endocrinol*, 176 (3), pp.293-304.
- Thompson, M. A., Lasley, B. L., Rideout, B. A. Kasman, L. H. (1984) Characterization of the estrogenic properties of a nonsteroidal estrogen, equol, extracted from urine of pregnant macaques. *Biol Reprod*, 31 (4), pp.705-13.
- Verdrengh, M., Jonsson, I. M., Holmdahl, R. Tarkowski, A. (2003) Genistein as an anti-inflammatory agent. *Inflamm Res*, 52 (8), pp.341-6.
- Yellayi, S., Naaz, A., Szewczykowski, M. A., Sato, T., et al. (2002) The phytoestrogen genistein induces thymic and immune changes: a human health concern? *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99 (11), pp.7616-21.
- Yellayi, S., Zakroczymski, M. A., Selvaraj, V., Valli, V. E., et al. (2003) The phytoestrogen genistein suppresses cell-mediated immunity in mice. *J Endocrinol*, 176 (2), pp.267-74.
- Zeiger R. S. (2000) Dietary aspects of food allergy prevention in infants and children. *J. Pediatr. Gastroenterol Nutr.* 30 (S), pp.77-86.
- Zhang, Y., Song, T. T., Cunnick, J. E., Murphy, P. A. et al. (1999) Daidzein and genistein glucuronides in vitro are weakly estrogenic and activate human natural killer cells at nutritionally relevant concentrations. *J Nutr*, 129 (2), pp.399-405.
- Zoppi, G., Gasparini, R., Mantovanelli, F., Gobio-Casali, L., et al. (1983) Diet and antibody response to vaccinations in healthy infants. *Lancet*, 2 (8340), pp.11-4.

# Effets hormonaux des phyto-estrogènes chez la femme et chez l'homme.

*Michel Pugeat, Mariette Gerber, Charles Caulin*

Ce chapitre, à partir des données épidémiologiques et des études d'intervention, analyse les conséquences de la consommation de soja ou de l'apport de phyto-estrogènes sur l'équilibre hormonal, chez la femme et chez l'homme. Du fait de l'importance des recommandations actuelles concernant le traitement hormonal substitutif de la femme ménopausée, une analyse systématique des études humaines portant sur l'effet d'un apport de phyto-estrogènes sur les troubles du climatère sera développée.

## I- Physiologie de la fonction ovarienne

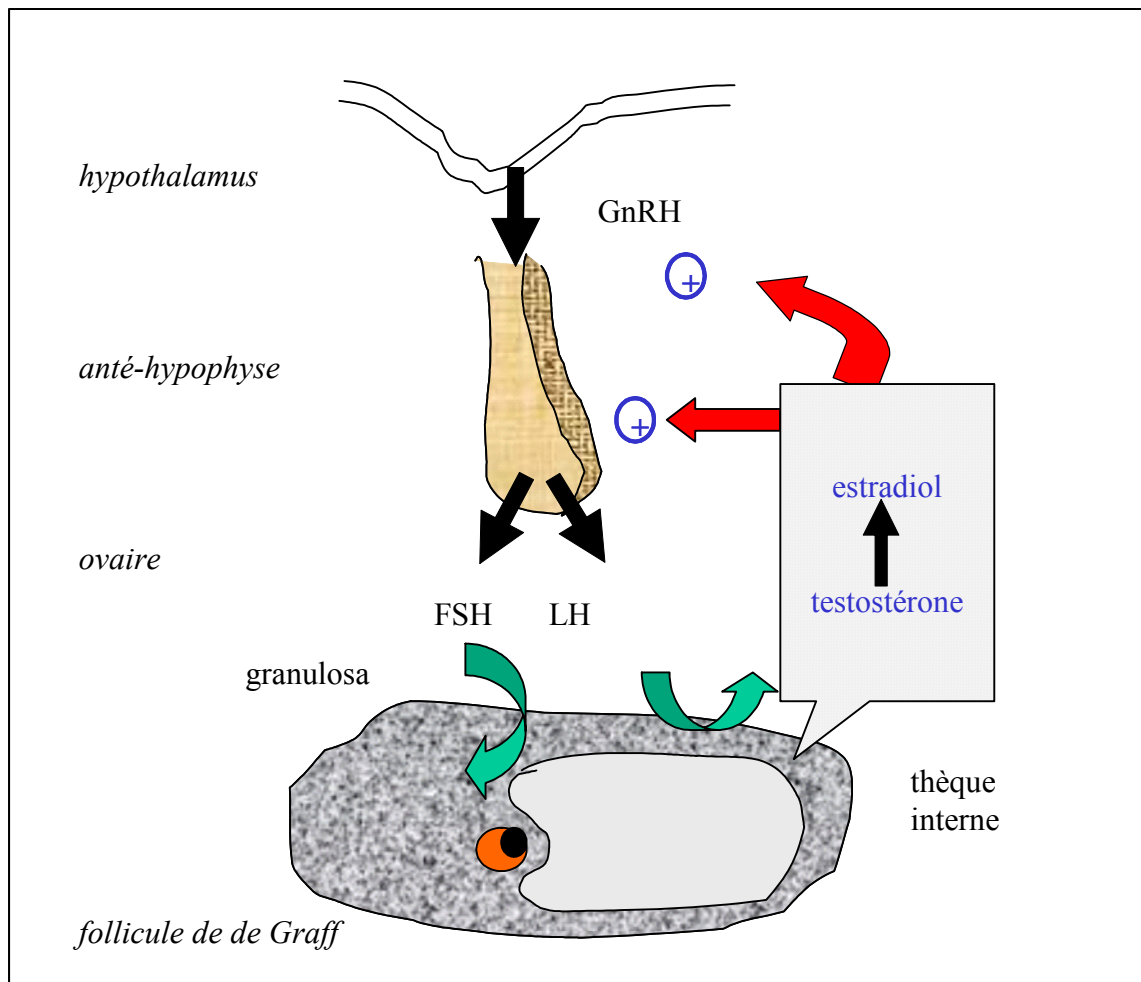
**L'ovaire assure deux fonctions cycliques indissociables** sous le contrôle de deux hormones gonadotropes hypophysaires, FSH et LH. La FSH assure la maturation folliculaire, et la LH contrôle la sécrétion d'estradiol tout au long du cycle ainsi que la sécrétion de progestérone par le corps jaune, après l'ovulation.

**Le cycle menstruel de la femme dure 28 jours** et débute le premier jour des règles. Il comporte une phase dite folliculaire pendant laquelle se produit le développement de plusieurs follicules avec augmentation de la sécrétion d'estradiol sous le contrôle combiné de LH et de FSH. Un mécanisme encore inconnu permet le recrutement et la maturation d'un seul follicule. Par un effet rétrocontrôle positif, l'estradiol augmente la sécrétion tonique de LH jusqu'au pic ovulatoire de LH qui marque le milieu du cycle. Le pic de LH déclenche la rupture du follicule mature et l'expulsion d'un ovocyte dans les trompes vers l'utérus. La sécrétion de progestérone n'apparaît qu'après le pic ovulatoire de LH, pendant la phase lutéale. Elle témoigne de la présence d'un corps jaune constitué des cellules de la granulosa lutéinisées sous l'effet de LH.

**Au moment de la puberté** puis pendant la vie de reproduction la sécrétion d'estradiol permet le développement et le maintien des caractères sexuels féminins notamment le développement mammaire et la prolifération de l'endomètre. La progestérone accentue le développement de la dentelle utérine en prévision de l'éventuelle nidation d'un ovocyte fécondé par un spermatozoïde. En l'absence de nidation et de démarrage d'une grossesse, la sécrétion d'estradiol et de progestérone s'épuise. Un phénomène d'hémorragie de l'endomètre se produit avec évacuation du flux menstruel. Commence alors un nouveau cycle.

**La sécrétion de LH et de FSH est pulsatile** avec une fréquence d'environ un pic toutes les 90 minutes. Ce phénomène est sous la dépendance de neurones, qui après migration des placodes olfactives vers l'hypothalamus, sécrètent de façon également pulsatile un décapeptide, le GnRH (ou LHRH). L'axe hypothalamo-hypophysaire est soumis au rétrocontrôle positif de l'estradiol pendant la période d'activité cyclique de l'ovaire. Ce système est soumis à l'influence de peptides ovariens qui sont également présents dans l'hypophyse : l'inhibine B, qui régule négativement la sécrétion de FSH et l'activine qui augmente la sécrétion de FSH (Figure 1).

Figure 1 – Contrôle de la fonction ovarienne



**La ménopause** traduit la phase d'épuisement du capital folliculaire ovarien qui est fixé dès la naissance et ne cesse de décroître tout au long de la vie. Ainsi, en fonction de conditions environnementales ou génétiques, l'âge de la ménopause varie entre 45 et 55 ans. L'installation de la ménopause peut durer entre un et cinq ans. Elle est marquée par l'apparition des bouffées de chaleur liées à la diminution de la production d'estrogènes. Elle s'associe à une augmentation de FSH en relation avec la diminution de l'inhibine B, un marqueur du capital folliculaire, et à la diminution de l'estradiol qui précède l'augmentation de LH. Les fluctuations de la sécrétion de ces hormones s'accompagnent de troubles du climatère qui associent des phénomènes vasomoteurs connus sous le nom de bouffées de chaleur, des modifications de l'humeur, des troubles du sommeil, un état de fatigue, une sensation de tension et de gonflement, de phénomènes de sécheresse de la peau et des muqueuses, des douleurs articulaires et musculaires (Eden 1998).

**La physiopathologie des bouffées de chaleur**, qui cliniquement reste le signe le plus objectif de l'installation de la ménopause, est incomplètement expliquée. Les bouffées de chaleurs semblent bien associées à la carence en estrogènes puisque l'administration d'estrogènes atténue leur fréquence, avec toutefois un remarquable effet placebo. La comparaison de la prévalence de bouffées de chaleur et d'hypersudation que l'on retrouve dans 80% des populations féminines est cependant plus faible dans les populations vivant en Asie du Sud Est (Eden, 1998).



## II- Modalités d'évaluation d'un traitement sur les symptômes de la ménopause

Les modalités d'évaluation d'un traitement des symptômes de la ménopause sont aujourd'hui bien codifiées car les études de médicaments ont été nombreuses, notamment celles concernant les estrogènes médicamenteux et les associations d'estrogènes et de progestatifs. L'évaluation de ces traitements se rapporte en premier lieu à la méthodologie d'évaluation des essais thérapeutiques.

Les signes dont se plaignent les femmes ménopausées sont multiples : bouffées de chaleur, sueurs nocturnes, troubles muqueux avec sécheresse vaginale, et plus rarement dyspareunie. L'atrophie vaginale entraîne un trouble de la maturation de l'épithélium. L'insomnie, la fatigue, les modifications psychologiques, émotionnelles, voire les tendances dépressives qui peuvent être observées, sont d'interprétation plus difficile.

### II-1 Evaluation de l'efficacité

**Le critère d'évaluation principal** des études d'intervention peut être :

*le nombre quotidien de bouffées de chaleur* - Ces bouffées vasomotrices sont le plus souvent notées par les femmes se plaignant de troubles et recueillies sur un bordereau journalier. Dans de très rares cas, elles sont enregistrées en laboratoire (mesure de conductance cutanée et de température cutanée) ;

- *le nombre de bouffées de chaleur ressenties comme gênantes* par jour (recueil quotidien) ;
- *L'index de Kupperman* - Ce score développé en 1953 recueille 11 symptômes (bouffées vasomotrices – paresthésies – insomnie – nervosité – humeur dépressive – vertiges – fatigue – arthralgies...) en donnant à chacun une note particulière en fonction de la sévérité (entre 0 et 3) et un poids spécifique (x 4 pour bouffée de chaleur – x 1 pour fatigue...). Le score de chaque recueil est donc un nombre entre 0 et 51 (d'autant plus élevé que les troubles sont intenses) (Kupperman 1959).
- *L'index de maturation cytologique du frottis vaginal (Hustin 1979)*. Ce test est sensible mais sans corrélation clinique établie ;
- *Les études de qualité de vie* pourraient être utilisées mais il y aurait lieu de les valider et d'en définir les techniques d'analyse et d'interprétation des résultats.

En pratique, le nombre de bouffées de chaleur notées quotidiennement par les patientes ou l'indice de Kupperman sont les plus utilisés. Ils ont aisément permis l'évaluation des médicaments.

Bien entendu, **les règles générales des essais thérapeutiques** doivent impérativement être respectées :

- *définition claire des populations à traiter* ;
- *étude comparative – randomisée* dans l'extrême majorité des cas en groupes parallèles afin de prendre en compte les aléas de l'évolution spontanée des symptômes ;
- *étude contre placebo* afin de minimiser la subjectivité de l'évaluation des patientes et des investigateurs ;
- *définition a priori du nombre de sujets à inclure* (en fonction des risques et de la différence attendue) ;
- *qualité de la randomisation de la réalisation du suivi* ; respect des bonnes pratiques cliniques ; très faible nombre de perdus de vue afin de permettre l'interprétation des résultats ;
- *analyse statistique portant sur la différence concernant le critère principal d'évaluation antérieurement défini, réalisée à la fin prévue de l'essai, pour tous les patients inclus* ; la différence est significative si  $p < 0,005$  ; lorsqu'une seule analyse est faite (en cas d'analyses multiples le p devra être ajusté) ;
- *interprétation clinique de la différence observée* (bénéfice thérapeutique) si la différence est statistiquement significative.

**D'une façon générale, les traitements hormonaux substitutifs de la ménopause ont montré leur efficacité sur les troubles de la ménopause en comparaison d'un placebo dans les études en double insu. Cet effet favorable est habituellement observé dès le premier mois de traitement ; cet effet est parfois plus net encore après 2 à 3 mois.**

## **II-2 Evaluation de la sécurité**

Outre leur efficacité, les traitements médicamenteux des symptômes de la ménopause doivent montrer l'absence d'effet délétère sur l'endomètre. En effet en l'absence d'association à un progestatif, les estrogènes peuvent entraîner une hyperplasie de l'endomètre favorisant la survenue du cancer de l'endomètre. L'absence d'hyperplasie doit être démontrée chez au moins 200 patientes traitées durant un an (évaluation par échographie et/ou biopsie de l'endomètre). La vérification de l'absence de cet effet délétère est également nécessaire lorsque des substances non médicamenteuses allèguent pour un effet sur les symptômes de la ménopause.

Les effets rapportés dans la littérature seront présentés de façon chronologique chez la femme en activité génitale puis au cours de la ménopause.

## **III- Méthodologie**

La recherche bibliographique de ce chapitre a été conduite en interrogeant PubMed à l'aide de mots clés croisés incluant phyto-estrogènes et ménopause, fonction ovarienne, hormones stéroïdes sexuelles, reproduction... Les études épidémiologiques qui ont étudié la relation entre fonction ovarienne et consommation de phyto-estrogènes, et les études d'intervention qui ont recherché l'effet d'un apport de protéines de soja ou d'un supplément de phyto-estrogènes chez l'homme et chez la femme avant et après la ménopause ont été analysées. Les études sont présentées par rubrique et par ordre d'apparition dans la littérature. Elles sont critiquées selon les critères d'évaluation des essais thérapeutiques précédemment décrits (voir aussi chapitre « Méthodologie », et éventuellement rejetées lorsque le respect de ces critères a été jugé insuffisant.

Chez la femme ménopausée, seules les études contrôlées contre placebo précisant le type d'apport de protéines de soja ou de supplément de phyto-estrogènes ont été retenues et on fait l'objet d'un tableau récapitulatif. Les recommandations de ce chapitre sont basées sur ces études. Quant aux études pilotes et aux études ouvertes, elles ont été mentionnées mais non retenues dans l'analyse finale. Enfin, une attention particulière a été apportée aux études qui ont mesuré dans le sang ou les urines les phyto-estrogènes avant et après apport contrôlé.

## **IV- Influence de la consommation de soja ou de l'apport de phyto-estrogènes sur le cycle menstruel et l'équilibre hormonal chez la femme non ménopausée**

Les phyto-estrogènes de l'alimentation et plus particulièrement les isoflavones aglycones, ont une activité estrogénique potentielle du fait de leur affinité de liaison pour les récepteurs alpha ( $ER\alpha$ ) ou bêta ( $ER\beta$ ) des estrogènes. Ils peuvent également modifier les taux circulants des hormones stéroïdes sexuelles par interaction avec les enzymes de synthèse ou de conversion périphérique. Ils peuvent aussi perturber l'équilibre des hormones circulantes en se liant à la protéine de transport des stéroïdes sexuels, la « sex hormone-binding globulin » (SHBG) (voir chapitres "Biodisponibilité" et "Mécanismes") ou en influençant son niveau de concentration par un effet sur sa synthèse hépatique.

L'analyse détaillée des études est présentée ci-dessous. Des données détaillées rapportant les effets des phyto-estrogènes chez la femme pendant la période de reproduction sont récapitulées dans les tableaux 1a et 1b, présentées respectivement selon le type d'apport, alimentaire ou compléments alimentaires.

## **IV-1 Effets sur le cycle menstruel, les gonadotrophines et les hormones stéroïdes sexuelles**

### **IV-1-1 Etudes épidémiologiques d'observation**

*Nagata (1997)* rapporte dans une population de 50 femmes âgées de 21 à 42 ans, que la consommation de soja principalement sous forme de tofu ou de miso, est estimée à  $5 \pm 3$  mg par jour d'après un questionnaire de fréquence de consommation. La consommation des produits dérivés du soja est en corrélation inverse avec les concentrations sériques d'estradiol mesurées au 11<sup>ème</sup> et 22<sup>ème</sup> jour du cycle, et celle de miso en corrélation inverse avec les concentrations sériques de SHBG mesurées au 22<sup>ème</sup> jour du cycle après correction pour l'âge, l'index de masse corporelle, la durée du cycle et l'apport calorique.

*Verksalo (2001)*, dans le cadre de l'étude EPIC (European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition), a inclus 636 femmes âgées de 20 à 40 ans dont 65 % étaient végétariennes et évalué la consommation de lait de soja par un questionnaire de fréquence alimentaire. Cette étude ne rapporte aucune association entre la consommation de « jus » de soja et les taux circulants d'hormones sexuelles. La durée du cycle n'a pas été analysée.

### **IV-1-2 Etudes ouvertes non contrôlées**

Outre son caractère historique, l'étude de *Cassidy (1994)* présente l'intérêt d'avoir été menée avec un témoin de protéines sans isoflavones. Elle montre, chez 6 femmes normalement réglées, que la consommation quotidienne de 60 g de protéines de soja (45 mg d'isoflavones) augmente la durée de la phase folliculaire ( $p < 0,01$ ) et la durée totale des cycles en moyenne de 2,5 jours, sans effet sur la durée de la phase lutéale. Le complément de soja diminue la LH ( $p < 0,05$ ) et la FSH ( $p < 0,01$ ), augmente l'estradiol ( $p < 0,02$ ) en phase folliculaire, mais n'a pas effet significatif sur la progestérone, la SHBG, et la testostérone. La même équipe (*Cassidy 1999*) retrouve chez 15 femmes non végétariennes un allongement de la phase folliculaire et de la durée du cycle avec diminution des pics de LH et FSH après un complément par différentes isoflavones sur 4 cycles.

A la suite plusieurs études, présentées ci-dessous, ont été mises en œuvre sans le témoin protéine de soja et avec un nombre également faible nombre de sujets ce qui enlève du poids à l'étude.

*Lu (1996)* ne retrouve pas d'allongement significatif du cycle menstruel chez 6 femmes recevant de façon quotidienne du tonyu (200 mg d'isoflavones) pendant 1 mois. Cependant, le cycle suivant l'administration d'isoflavones est plus long et ne redevient normal qu'après 5 à 6 cycles. Pendant la prise de soja les taux d'estradiol et de progestérone en phase lutéale diminuent (respectivement  $p < 0,03$  et  $p < 0,002$ ) ainsi que le taux de sulfate de DHEA, un androgènes d'origine surrénale ( $p < 0,03$ ).

*Nicholls (2002)* dans une étude ouverte montre chez 5 femmes normalement réglées que la consommation de 50 g de protéine de soja contenant 60 mg d'isoflavones, augmente l'excrétion urinaire de génistéine ( $1,57 \pm 0,09$  vs  $3,59 \pm 0,07$  mg/24h) et de daidzéine ( $1,03 \pm 0,12$  vs  $4,18 \pm 0,12$  mg/24h), n'a pas d'effet sur les concentrations d'estradiol et de progestérone et ne modifie pas la réponse de LH après stimulation par GnRH. Une patiente a présenté une forte augmentation de la réponse de LH sous GnRH. Sur ce cas, les auteurs suggèrent une susceptibilité individuelle aux phyto-estrogènes.

*Wu (2000)* a étudié pendant 7 mois dix femmes asiatiques et dix femmes non-asiatiques qui ont reçu pendant 3 cycles un supplément alimentaire de soja (sous la forme de tofu, "jus" de soja ou tarte de soja) correspondant à 32 mg d'isoflavones par jour. Une baisse en moyenne de 17,4 % de l'estradiol pendant la phase lutéale a été observée seulement chez les femmes asiatiques pendant la période d'intervention mais sans modification de la durée du cycle et des variations des gonadotrophines ou de la progestérone.

*Lu (2000a)* montre qu'un complément alimentaire quotidien « tonyu » contenant en moyenne de  $154 \pm 8.4$  mg d'isoflavones durant 1 cycle menstruel ne modifie pas la durée du cycle et celle de la phase folliculaire avec une tendance non significative à la réduction de la durée de la phase lutéale. Cependant une diminution significative de l'estradiol ( $p < 0,001$ ) et de progestérone ( $p < 0,0001$ ), corrélée à l'excrétion urinaire, était observée, sans modification de LH et de FSH.

#### **IV-1-3 Etudes ouvertes contrôlées**

L'étude de *Nagata (1998)* concerne 31 femmes en bonne santé et normalement réglées, qui ont reçues 400 ml de jus de soja, soit environ 109 mg d'isoflavones. Ces femmes ont été comparées à 29 femmes recevant un régime sans adjonction de soja. Un allongement du cycle et une diminution des concentrations d'estrone et d'estradiol sont observés dans le groupe ingérant du soja mais les différences ne sont pas significatives.

L'étude de *Duncan (1999a)*, concerne un groupe unique de 14 femmes étudiées de façon longitudinale qui ont été randomisées en crossover pour recevoir un complément de 64 ou 128 mg d'isoflavones après une période contrôle. Bien que sans effet sur la durée des phases du cycle menstruel, l'administration d'isoflavones réduit les taux de LH ( $p < 0,009$ ) et de FSH ( $p < 0,04$ ) dans la période péri ovulatoire. Seule la dose de 128 mg, diminue l'estrone au milieu de la phase folliculaire et, en phase folliculaire précoce, les concentrations de T3 libre ( $p < 0.02$ ) et de DHEAS ( $p = 0.02$ ).

L'étude croisé de *Watanabe (2000)* montre qu'un complément d'isoflavones (20 ou 40 mg par jour) dans l'alimentation allonge la durée du cycle menstruel de 10 à 20 jours chez 60% des femmes étudiées ( $n = 42$ ), alors qu'il raccourci la durée du cycle dans 20% des cas. Dans cette étude, il n'y avait pas de différence significative des concentrations d'estradiol mesurées en phase folliculaire ou lutéale. Une baisse de l'estradiol et une augmentation de la SHBG sont observées chez 3 femmes. Par ailleurs, les taux de T3 et T4 augmentaient en phase folliculaire mais au contraire diminuaient en phase lutéale.

L'étude à protocole croisé rapportée par *Martini (1999)* n'a montré aucun effet pendant l'administration quotidienne de lait contenant 38 mg d'isoflavones pendant deux cycles menstruels (concentrations sérique d'estrogène, longueur du cycle et rapport du 2-hydroxyestrone sur le 16-hydroxyestrone). Mais le premier objectif de cette étude était d'étudier l'effet de consommation de soja sur la prise de pilule contraceptive : les auteurs ont étudié 36 femmes en bonne santé réparties en utilisatrices de contraception orale (20) et non-utilisatrices (16) en ne montre aucun effet hormonal, ce qui réduit la puissance de l'analyse. Par ailleurs, il n'y a pas de prise en compte de l'apport alimentaire.

#### **IV-1-3 Etudes d'intervention contrôlées versus placebo en double aveugle**

Deux études d'intervention contrôlées en double aveugle ont été retenues (Kumar 2002 ; Maskarinec 2002).

L'étude de *Kumar (2002)* concerne 68 femmes âgées de 25 à 55 ans recevant un complément de protéine de soja contenant 40 mg de génistéine ou placebo (protéine de lait) en deux doses durant 12 semaines. Les auteurs annoncent un allongement significatif de la durée du cycle de 3,5 jours sur les 3 cycles comparé au groupe placebo. Cet allongement est dû à un allongement de la phase folliculaire. Aucune autre différence inter-groupe n'est observée, mais il existe une tendance à la diminution de la concentration d'estradiol libre ( $p = 0.08$ ) et à une augmentation de celle de SHBG ( $p = 0.05$ ) dans le groupe supplémenté entre les mesures initiales et finales.

L'étude de *Maskarinec (2002)* concerne 34 femmes qui ont reçu soit un placebo soit 100 mg d'isoflavones en 2 prises (51% daidzeine, 44% génistéine, 5% glyciteine, dont seulement 1%

étaient sous forme aglycone) par jour pendant une période de un an. Les prélèvements de sang ont été collectés au début de l'étude, 5 jours après l'ovulation puis aux temps 3, 6, 9 et 12 mois. Dans cette étude, la durée du cycle était augmenté d'un jour lors de chaque période de mesure et les concentrations sériques moyennes d'estradiol total et libre plus élevées sur la périodes totale, mais ces deux résultats n'atteignaient pas la significativité. L'augmentation de la durée du cycle n'a pas été calculée sur la période d'étude totale. Aucune différence sur les autres paramètres hormonaux (estrone, SHBG, LH et FSH) n'a été observée.

#### **IV-2 Effet sur le métabolisme oxydatif des estrogènes**

La présence dans les tissus d'enzymes de type hydroxylase permet une voie de métabolisme oxydatif des estrogènes (voir chapitre "Mécanismes"). L'hydroxylation en 2 de l'estrone serait un mécanisme protecteur de cancer, tandis que l'hydroxylation en 16 $\alpha$  produirait un métabolite cancérigène. Ainsi, l'augmentation du rapport de l'excrétion urinaire des dérivés hydroxylés en 2 sur 16 $\alpha$ , a été associée à une diminution du risque de cancer du sein (Kabat 1997). Deux études ont rapporté les conséquences de l'apport de produits contenant des isoflavones sur le métabolisme oxydatif des estrogènes.

*Xu (1998)* montre que chez 12 femmes recevant 10, 65 ou 128 mg par jour d'isoflavones pendant une période 100 jours avec une période sans isoflavones de 3 semaines, l'excrétion de 4-OH estradiol et du rapport 2-hydroxyestrone sur 16 $\alpha$ -hydroxyestrone ( $p < 0,05$ ), augmente et aussi celle de l'estradiol, et des estrogènes totaux, quand on compare le groupe ayant ingéré la dose d'isoflavone à celui ayant ingéré la plus faible.

*Lu (2000b)*, chez 8 femmes normales, montre qu'après apport alimentaire quotidien de « tonyu » contenant en moyenne de 154 $\pm$ 8.4 mg d'isoflavones durant 1 cycle menstruel, le rapport 2-hydroxyestrone sur 16 $\alpha$ -hydroxyestrone augmente de façon significative ( $p < 0,01$ ) dans les urines comparé à celui observé dans le même groupe de femmes après une consommation de même quantité de tonyu dépourvu d'isoflavones. Il est montré que le 2-hydroxyestrone augmente alors que le 16 $\alpha$ -hydroxyestrone n'est pas modifié.

#### **IV-3 Equol productrices et profil hormonal avant la ménopause**

L'étude du *Duncan (2000)* a montré dans un groupe de 15 patientes normalement réglées que celles capables de transformer la daidzéine en équol, mesuré dans les urines après une dose croissante d'isoflavones (0,5, 1 et 1,5 mg/kg de poids) et qualifiées d'« *équol productrices* », présentait un profil hormonal associant une réduction de l'estradiol et de la testostérone et une augmentation de la SHBG ( $n=5$ ) en comparaison des « *équol non productrices* » ( $n=9$ ).

#### **IV-4 Récapitulatif**

Les études d'intervention suggèrent qu'un apport de protéines de soja contenant des isoflavones pourrait modifier la durée du cycle et diminuer la sécrétion ovarienne d'estradiol. Deux études rapportent ce lien suite à la prise directe de génistéine (Watanabe 2000, Kumar 2002). Aucune de ces études n'a rapporté d'effet estrogénique des isoflavones sur la prolifération de l'endomètre avant la ménopause (Kurzer 2002 et 2003) mais aucune ne mentionne l'avoir recherché.

Les effets d'un supplément de protéines de soja contenant des isoflavones sur le métabolisme des estrogènes et sur l'excrétion urinaire de métabolites hydroxylés en 2 et en 16 $\alpha$  rapportés par deux études, indiquent que les protéines du soja et/ou les isoflavones pourraient modifier le métabolisme des estrogènes dans le sens d'une diminution de leur activité biologique. Même si ces effets sont modestes, associés aux effets observés chez les femme productrices d'équol, ils convergent tous vers un profil hormonal à moindre risque de cancer du sein.

## V- Effet sur les symptômes cliniques de la ménopause

### V-1 Etudes épidémiologiques analytiques

Trois études transversales rapportées par Nagata (1999,2000,2001a) suggèrent que les aliments à base de soja ont une influence sur les symptômes de la ménopause. Tout d'abord, une étude sur 284 femmes de 40 à 59 ans a montré que les femmes ayant des bouffées de chaleur avaient une consommation significativement plus faible en tous produits dérivés du soja (-15%,  $p=0.02$ ) et en produits fermentés (-19%,  $p=0.01$ ), que les femmes non atteintes après ajustement pour les covariables. De même la consommation de produits fermentés était négativement corrélée avec la sévérité des bouffées de chaleur. Cependant, les symptômes cliniques de la ménopause sont indépendants de la consommation totale de soja ou de produits fermentés du soja.

Dans l'étude publiée en 2000, l'état de bien-être mental a été évalué chez 86 femmes. La consommation de produits dérivés du soja était négativement associée avec une échelle mesurant l'état dépressif. Celui-ci était également négativement corrélé au taux de DHEA sulfate mais pas l'estradiol.

L'étude prospective de 1106 femmes japonaises (2001) âgées de 35 à 54 ans, suivies pendant 6 ans, a comparé la consommation de soja (FFQ) avec la fréquence des bouffées de chaleur. Dans un groupe de 101 femmes qui présentaient des bouffées de chaleur modérées ou sévères, la fréquence des bouffées de chaleur est diminuée avec l'augmentation de la consommation de soja (OR= 0.47, 95% CI 0.28-0.79 ; test de tendance :  $p=0.005$  ; pour une consommation de 115.9g/j ; comparé à 44.5 g/j) ainsi qu'avec la quantité d'isoflavones consommées (OR= 0.42, 95% CI 0.25-0.72, test de tendance  $p=0.002$  ; pour une consommation de 50.8mg/j ; comparé à 20.5 mg/j).

Verksalo (2001), dans le cadre de l'étude EPIC (European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition ), a inclu 456 femmes ménopausées âgées d'au moins 55 ans dont 65% étaient végétariennes et évalué la consommation de lait de soja par un questionnaire de fréquence alimentaire. Cette étude ne rapporte aucune association entre la consommation de « jus » de soja et les taux circulants d'hormones sexuelles dans les deux groupes étudiés.

### V-2 Etudes d'intervention (tableau 2)

Les études d'intervention non comparatives n'ont pas été retenues : c'est le cas des études de Albertazzi (1999) et d'Albert (2002), la dernière concernant un extrait de glycine dont la composition n'est pas connue. L'étude de Murkies (1995) n'a pas été retenue car elle ne donne pas la teneur du traitement (farine de soja) en isoflavones.

#### V-2-1 Etudes évaluant le critère « bouffées de chaleur »

Sur les 7 études décrites ci-dessous, 6 ont des effets significatifs mais présentent des biais méthodologiques et ne permettent pas de conclure. Seule l'étude de Crisafulli (2004) a une méthodologie satisfaisante.

L'étude de Washburn (1999) étudie chez 51 femmes ménopausées l'administration en double aveugle de 34 mg d'isoflavones en une ou deux prises pendant 6 semaines. Parmi les différents signes de la ménopause évalués par un questionnaire quotidien et l'échelle de Likert, seule la sévérité des bouffées de chaleur est améliorée par la seule prise en 2 fois.

Drapier-Faure (2002) compare les effets randomisés en parallèle sur 16 semaines d'un placebo et d'une préparation standardisée d'un extrait de soja (4 capsules de Phytosojia®, 325 mg) contenant 70 mg d'isoflavones (sous forme de génistéine, daidzéine et leur précurseurs méthylés biochanine et formonétine) administrée en double aveugle dans une étude multicentrique de femmes ménopausées ayant au moins 7 bouffées de chaleur par jour. Une réduction significative des bouffées de chaleur a été observée dans les deux

groupes : 39% vs 25% (sous placebo) dès la 4<sup>ème</sup> semaine, 51% vs 33% à la 8<sup>ème</sup> semaine et 61% vs 21% à la fin du traitement. Cependant la sortie de l'essai de 6 patientes du groupe soja et 14 du groupe placebo rend l'interprétation de la significativité de l'effet soja difficile. Cette étude a cherché à identifier les bons répondeurs sur la base de 50% de régression des bouffées de chaleur, et rapporte 65.8% de bon répondeurs dans le groupe soja (n=38) vs 34.2% dans le groupe placebo (n=34). Aucun dosage d'isoflavones n'est rapporté dans cette étude. Quand les modèles des mesures répétées sont pratiqués, le changement lié au soja est faible et non significatif, quand le modèle utilise seulement les données mesurées à la fin de l'étude (les sujets ayant abandonnés dans le cours de l'essai n'étant pas pris en compte).

*Han (2002)* compare contre un placebo les effets d'un supplément d'une capsule quotidienne de 100 mg de soja contenant 33.3 mg d'isoflavones aglycones (majoritairement génistéine, 23.3 mg) en 3 prises dans deux populations de 40 femmes ménopausées brésiliennes. Le placebo était de la protéine de soja sans isoflavones. Après 4 mois de traitement, l'indice de Kupperman présente une amélioration significative ( $p < 0.01$ ) dans le groupe traité par les isoflavones  $44.6 \pm 1.0$  vs  $24.9 \pm 1.7$  et  $40.3 \pm 1.2$  vs  $41.6 \pm 1.1$  dans le groupe témoin. Le placebo et les isoflavones ont abaissé de façon significative les taux de FSH ( $67 \pm 3$  vs  $90 \pm 3$  et  $66 \pm 4$  vs  $84 \pm 1$  pg/mL) et les isoflavones ont augmenté le taux d'estradiol ( $19 \pm 23$  vs  $9 \pm 32$  pg/mL) sans effet sur LH. Aucun effet n'a été observé sur l'épaisseur de l'endomètre à l'échographie malgré l'augmentation de l'estradiol sérique. Deux points paraissent importants à relever : i) la franche anomalie de la randomisation qui a comporté la remise aux patientes d'enveloppes comportant l'information "n° 1" ou "n° 2". Le n° 1 correspondait au placebo et le n° 2 au traitement par isoflavones. Une telle répartition avec une claire indication est aujourd'hui tout à fait récusée car elle permet la levée de l'ensemble de l'aveugle pour les 80 patients si un seul des traitements est dévoilé ii la curieuse absence d'amélioration dans le groupe placebo. Il faut aussi noter que la diminution de l'indice de Kupperman est essentiellement due aux phénomènes psychologiques (nervosité, mélancolie) et moins à la réduction des bouffées de chaleur.

*Jeri (2002)* compare l'effet du Promensil®<sup>31</sup> 40 mg (99.9 % d'aglycones) à un placebo durant 12 semaines chez 30 patientes ménopausées (soit 15 dans chaque groupe) ayant plus de 5 bouffées de chaleur par jour. Le rapport est publié avec assez peu de détails dans une revue non référencée « The female patient ». Les résultats sont positifs : différence de 38 % de bouffées de chaleur entre le groupe traité et le groupe placebo. L'auteur ne discute pas la différence initiale du nombre de bouffées de chaleur entre le groupe traité (7,0 par jour et le groupe contrôle 5,7 par jour). Malgré cette différence il n'y a pas de calcul ajusté de la différence de réduction entre les 2 groupes. En outre, le faible effet placebo pose ici aussi le problème de la réalité de l'insu. Il faut encore noter la faiblesse des effectifs sans calcul du nombre de cas, et le caractère très orienté de la bibliographie.

*Scambia (2000)* compare l'effet de 400 mg d'extrait de soja (Soyselect en comprimé contenant l'équivalent de 50 mg d'isoflavones (35% de saponines et 12% d'isoflavones) chez 20 femmes versus 19 recevant un placebo durant 6 semaines. Les concentrations moyennes de daidzéine augmentaient de 0 à  $105 \pm 15$  et  $117 \pm 14$  ng/ml et de génistéine de 0 à  $175 \pm 23$  et  $185 \pm 32$  ng/ml, respectivement de l'état basal puis après 6 et 10 mois d'administration Soyselect. Placebo et soja diminuent le nombre de bouffées de chaleur. L'effet du traitement par le soja concernant le nombre de bouffées de chaleur est présenté comme supérieur, mais il existe une différence initiale du entre le groupe traité (33 bouffées de chaleur par semaine), et le groupe placebo (25 bouffées de chaleur par semaine). Malgré cette différence il n'y a pas de calcul ajusté de la différence de réduction entre les 2 groupes. De plus il n'existe pas de corrélation entre les concentrations sériques d'isoflavone et l'amélioration du nombre de bouffées de chaleur. Aucun effet significatif n'a été observé sur

---

<sup>31</sup> Promensil : préparation extraite de graines de trèfle rouge, contenant en majorité de la biochanine A et de la génistéine, mais aussi de la formononétine. Il contient 82 mg d'isoflavones,

la pulsatilité de l'artère utérine, l'épaisseur de l'endomètre et la cytologie vaginale. Par ailleurs, il est à noter que les patientes reçoivent ultérieurement 0,625 mg d'estrogènes équinés conjugués et que, après ce traitement, le nombre de bouffées de chaleur est réduit à 9,8 dans le groupe traité et 8,2 dans le groupe placebo et il existe dans les 2 groupes des signes de maturation de la cytologie vaginale et d'augmentation de l'épaisseur de l'endomètre.

*Van de Weijer (2002)* montre les résultats d'une étude dans laquelle 30 femmes présentant au moins 5 bouffées de chaleur par jour prennent d'abord un placebo pendant 4 semaines et observent une réduction de 16%. Puis on compare un groupe de ces 16 femmes qui reçoivent Promensil 80 mg en 2 prises avec les 14 restantes qui continuent la prise de placebo pendant 12 semaines. A la fin de l'essai, le groupe traité présente réduction significative supplémentaire de 2,70 bouffées de chaleur (44 %) de moins que le groupe placebo. Les auteurs ne discutent pas le très faible effectif.

En revanche, *l'essai de Crisafulli (2004)* montre une efficacité sur les bouffées de chaleur et paraît répondre aux règles usuelles des études d'intervention. L'échantillon total était de 90 individus. Les phyto-estrogènes étaient testés versus THS et placebo. Dans un groupe de 30 femmes souffrant de troubles climatériques et ayant en moyenne 4,6 bouffées de chaleur par jour, le traitement par 54 mg de génistéine entraîne après un an une diminution significative de 24 % du nombre de flushs par rapport au placebo. Il faut noter que le traitement par 1 mg de 17 bêta-estradiol et 0,5 mg de NETA (acétate de norethindrone, progestatif) entraîne une diminution de 54 % du nombre de bouffées de chaleur par rapport au placebo. La différence entre génistéine 54 mg et DHS 1 mg de 17 bêta-estradiol est statistiquement significative.

### **V-2-2 Etudes contrôlées d'intervention sans effets significatifs**

Huit études d'intervention sont menées selon les règles usuelles (essais comparatifs versus placebo). Quand elles montrent une réduction des bouffées de chaleur par la consommation d'isoflavones (ou d'aliments riches en isoflavones), cet effet est le plus souvent comparable à celui du placebo. Ainsi, ces études, qui regroupent plus de 1100 patients, n'ont mis aucune évidence de différence significative sur le critère principal de l'essai à la fin prévue de l'essai versus placebo ou traitement témoin.

L'étude de *Baber (1999)* montre une réduction des bouffées de chaleur après administration de Promensil 40 mg à 51 femmes ménopausées, de façon randomisée en double aveugle contre placebo selon un protocole croisé pendant une période de 12 semaines suivi d'une période de un mois sans traitement avant nouvelle période de 12 semaines, mais la réduction est identique sous placebo. Il en va de même pour le score de Greene. La cytologie vaginale; et les concentrations de SHBG et stéroïdes sexuels étaient inchangés durant les différentes phases de traitement ou de placebo. Pourtant, après 12 semaines d'administration de Promensil ou de placebo, dans l'ensemble de la population, l'excrétion urinaire d'isoflavones, mesurée par HPLC pour la biochanine A, la formonétine, la génistéine et la daidzéine, augmentait respectivement de  $0.9 \pm 1.4$  à  $5.5 \pm 4.1$  mg/24h versus  $1.3 \pm 1.5$  à  $1.2 \pm 1.8$  mg/24h. Les auteurs indiquent qu'il existe une corrélation inverse entre l'excrétion de daidzéine et la fréquence des bouffées de chaleurs quand ils considèrent l'effectif total, mais ne donnent ni intervalle de confiance, ni significativité.

*Knight (1999)* dans une étude en double aveugle, contrôlée et randomisée ne retrouve aucun effet de 2 doses de Promensil® (40 ou 160 mg en 4 prises) versus placebo, chez 37 femmes ménopausées sur le score de Greene, le pH vaginal, la FSH, la SHBG. Une augmentation de 18.1% du cholestérol HDL ( $p < 0.038$ ) est observée sous 40 mg de Promensil®.



L'étude *d'Upmalis (2000)* concerne 177 femmes ménopausées recevant en double insu 50 mg d'isoflavones (génistéine et daidzéine) ou placebo durant 12 semaines. L'administration d'isoflavones réduit de façon plus rapide (en deux semaines sous isoflavones (n=59) versus 4 semaines sous placebo (n=63)) et de façon plus significative la sévérité des bouffées de chaleur ( $p < 0.001$ ). Cependant à 12 semaines la différence n'était pas significative. Aucun effet n'est observé sur les paramètres lipidiques, l'épaisseur de l'endomètre, sur la cytologie et le pH vaginale.

*St Germain (2001)* rapporte une étude randomisée en double aveugle de trois groupes de femmes ménopausées, recevant un régime pauvre (n=24) ou riche (n=24) en soja, apportant 4,4 mg ou 80 mg d'isoflavones aglycones, ou un placebo (protéine du blé) (n=21) pendant 24 semaines. Les patientes étaient suivies dans une « Unité de Soins Métaboliques » toutes les 6 semaines. Ces femmes présentaient au moins 10 épisodes de bouffées de chaleur dans les 12 mois suivant le début de la ménopause (définie par la disparition des règles associées à un taux de FSH > 30 UI/L). Les résultats montrent l'absence d'effet des isoflavones sur les bouffées de chaleur ou sur les troubles du climatère évalués par un « Index menopausal » (adapté de Kupperman), alors que dans les trois groupes la fréquence des bouffées de chaleur et des épisodes de sueurs nocturnes diminue de façon significative avec le temps.

L'étude de *Knight (2001)* chez 24 femmes ménopausées ne retrouve aucun effet significatif après 12 semaines d'administration d'isoflavones contre placebo, sur les bouffées de chaleur, les taux de FSH et LH, TBG et SHBG, et la cytologie vaginale.

*Tice (2003)* rapporte l'effet de l'administration de Promensil® (41mg d'isoflavones, biochanine A et génistéine) sur les bouffées de chaleur ou de Rimostril® (contenant 29 mg d'isoflavones, formononétine et daidzéine) dans une étude multicentrique randomisée en double aveugle vs placebo incluant 252 femmes ménopausées avec plus de 8 bouffées de chaleur par jour. Quatre vingt dix huit pour-cent des patientes ont terminé l'étude après 12 semaines (n=246). La réduction des bouffées de chaleur était similaire et significative dans les trois groupes, sans différence intergroupe. Il existe une interaction avec l'IMC dans les cas des isoflavones qui ont une activité supérieure chez les femmes présentant un IMC >25. Enfin il n'y a pas d'écrrélation entre la modification du nombre de bouffées de chaleur et l'excrétion urinaire des isoflavones.

Une étude un peu particulière (*Dalais, 1998*) a porté sur 52 femmes ménopausées recevant du pain contenant soit 45g de soja, soit 45 de graines de lin (qui contiennent essentiellement des lignanes) soit un placebo de farine de blé pendant 12 semaines. Une réduction significative des bouffées de chaleur ( $p < 0,009$ ) et des sueurs ( $p < 0,001$ ) est observée avec les pains à la graine de lin et au blé, mais pas d'effet de type estrogène sur la cytologie vaginale. En revanche, le pain au soja (consommation estimée de 52 mg d'isoflavones par jour) n'a pas d'effet sur les bouffées de chaleur mais augmente l'index de maturité vaginale ( $p < 0,03$ ).

*Brzezinski (1997)* utilise une approche nutritionnelle (à rapprocher de l'étude DIANA, Berrino 2000, voir chapitre cancer). Il montre que l'administration pendant 12 semaines d'un régime représentant un quart de l'apport calorique quotidien, riche en soja (tofu, miso, tonyu et en graines de lin (contenant des isoflavones et des lignanes), augmente de façon significative l'excrétion urinaire d'entérodol, entérolactone, O-desmétilangolensine, équol, génistéine et daidzéine comparé à un groupe consommant le régime omnivore habituel. Ce régime diminue aussi le score MSQ (score synthétique des troubles de la ménopause), critère principal de l'essai, la sévérité des bouffées de chaleur et la sécheresse vaginale ; toutefois il n'y a pas de différence significative dans le groupe traité (n=78) comparé le groupe placebo (n=38). Aucun effet sur les concentrations de gonadotrophines et de stéroïdes sexuels n'a été observé dans cette étude. En revanche le régime riche en phyto-estrogènes et en lignanes augmentait de façon significative la SHBG ( $55.8 \pm 7.1$  vs  $71.2 \pm 6.5$  nmol/L ;  $p < 0.003$ ).

### **V-2-3 Essais chez des femmes souffrant de troubles climatériques dans les suites de traitement de cancer du sein**

*Quella (2000)* rapporte dans une étude randomisée en double aveugle avec protocole croisé l'effet de l'administration quotidienne de 3 comprimés d'une préparation d'extrait de 600 mg de protéines de soja contenant 50 mg d'isoflavones (40-45% de génistéine et 40-45% de daidzéine et 10-20% de glycitéine) pendant 4 semaines suivie d'une semaine sans traitement puis d'une nouvelle période de 4 semaines de traitement ou de placebo dans une population de 177 femmes traitées pour cancer du sein. L'analyse des données de 149 femmes qui ont accompli la totalité de l'étude montre que pendant la période de traitement la réduction des bouffées de chaleur était de 24% contre 36% pendant la période placebo. De même une même proportion de femmes (respectivement 33 et 34 %) manifestent une préférence pour le soja ou le placebo.

*Nikander (2002)* rapporte une étude randomisée dans un protocole croisé de 56 femmes aux antécédents de cancers du sein montre que l'administration de phyto-estrogènes sous la forme de 114 mg d'isoflavonoïdes contre un placebo pendant 3 mois, suivie d'une période sans apport puis reprise de placebo ou isoflavones. Les concentrations sériques de daidzéine atteignent en moyenne  $1059 \pm 785$  nmol/L et de génistéine  $403 \pm 275$  nmol/L, soit une augmentation de 20 fois sous isoflavonoïdes. La réduction du score des bouffées de chaleur est modeste et comparable dans les 2 groupes (baisse de 15,5 % de l'index de Kupperman vs 14,7% sous placebo), Ce traitement n'améliore pas de façon significative la qualité de vie, et n'a aucun effet sur les concentrations de FSH, d'estradiol et de SHBG. Aucun effet délétère de l'apport d'isoflavonoïdes n'a été rapporté sur les fonctions hépatiques, la créatinine, le poids et la tension artérielle.

*Van Patten (2002)* étudie 119 femmes ménopausées aux antécédents de cancer du sein et sous traitement de tamoxifène, et ne montre pas de différence sur les bouffées de chaleur notées sur une période de 4 semaines avant traitement, puis pendant 12 semaines d'administration d'un supplément d'une boisson contenant 90 mg d'isoflavones (n=59) en comparaison d'un supplément d'une boisson d'eau de riz (n=64) alors que les 2 traitements réduisent significativement les bouffées de chaleur. La concentration sérique de génistéine dans le groupe isoflavones était plus élevée ( $p < 0,02$ ) que dans le groupe placebo ( $0,61 \pm 0,43$  vs  $0,43 \pm 0,37$   $\mu\text{mol/L}$ ).

### **V-3 Essais d'intervention avec évaluation sur les critères biologiques comme critère principal**

On ne retiendra pas l'étude non contrôlée de *Wilcox (1990)* qui a montré chez 25 femmes ménopausées que l'administration d'un supplément en farine de soja, graines de lin ou pousse de trèfle rouge augmente l'index d'estrogénicité de la cytologie vaginale après 2 semaines de traitement et diminue de façon significative le taux de FSH, mais sans effet sur LH après six semaines.

Une étude randomisée contre placebo (*Baird, 1995*) a montré que l'administration de 165 mg par jour d'isoflavones sous forme de soja à 97 femmes ménopausées augmente de façon modeste et non significative le pourcentage de cellules superficielles vaginales. Dans cette étude aucun effet significatif n'a été observé sur les gonadotrophines et la SHBG. La consommation d'isoflavone a été vérifiée par dosage urinaire.

L'étude de *Duncan (1999b)* montre que l'apport de farine de soja contenant différentes quantités d'isoflavones, résultant en des doses de 7.65 or 132 mg par jour pendant 93 jours chez 18 femmes ménopausées, étudiées de façon randomisée et en double aveugle dans un protocole croisé (phases de traitement séparées par 1 cycle menstruel) réduit la concentration de sulfate d'estrone ( $p < 0.05$ ) avec une tendance, mais non significative, à la diminution de l'estradiol et de l'estrone pour la dose la plus élevée d'apport en isoflavones

par rapport au niveau de départ, mais la même diminution est observée pendant la phase témoin. La SHBG est significativement plus élevée lors du traitement par la dose forte d'isoflavones, mais ce niveau est inférieur à celui du début de l'étude. Aucun effet d'imprégnation estrogénique sur la muqueuse vaginale ou l'épaisseur de l'endomètre n'a été rapporté. Chez les mêmes patientes, Xu (2000) a mesuré le métabolisme oxydatif de l'estradiol et montré que le rapport 2-hydroxyestrone sur 16 hydroxyestrone augmente de façon significative ( $p < 0.05$ ).

Une autre étude de Duncan (2001), portant sur 18 femmes ménopausées volontaires randomisées et croisées, sur trois périodes de 93 jours, ne retrouve aucun effet de l'administration d'isoflavones (90% de forme glycoside dans une poudre de soja à la dose quotidienne de 0, 1 et 2 mg/kg) sur les paramètres hormonaux, la cytologie vaginale et l'épaisseur de l'endomètre. Cette étude ne rapporte pas les effets climatériques. La dose la plus forte d'isoflavones était associée à une tendance non significative à la baisse des taux d'estradiol, d'estrone et de sulfate d'estrone. En revanche, l'augmentation de la SHBG bien que modeste était significative ( $P < 0,04$ ). Cet effet est interprété par les auteurs comme un effet lié aux protéines de soja plutôt qu'aux isoflavones.

Hutchins (2001) rapportent que la consommation de 5 ou 10 gr de graines de lin, riches en lignane, par 28 femmes ménopausées âgées de 52 à 82 ans en protocole croisé pendant 3 périodes de 7 semaines, avec des périodes de non consommation de 7 à 14 semaines, s'accompagne d'une diminution de l'estradiol et du sulfate d'estrone ( $p = 0.04$ ), augmente la prolactine ( $p = 0.04$ ) mais ne modifie pas la SHBG, l'estrone, la  $\Delta 4$ -androsténone, la progestérone, la testostérone libre, la DHEAS et la DHEA.

Nicholls (2002) a montré chez 5 femmes jeunes et 7 femmes ménopausées que l'administration de 60 mg d'isoflavones ne modifie pas les concentrations circulantes de LH et de FSH et leur réponse à la stimulation par l'hormone hypothalamique GnRH. Cependant, à l'arrêt de l'apport d'isoflavones les taux de LH continuaient à diminuer de façon significative chez les femmes ménopausées. Le très faible effectif de cette étude la rend difficilement interprétable.

L'étude de Squadrito (2003) a étudié les effets de l'administration de génistéine sur la fonction endothéliale, ne retrouve pas d'effet significatif sur les bouffées de chaleur en comparant 3 groupes de 30 femmes ménopausées recevant de façon randomisée en double aveugle soit un THS contenant 1 mg de  $17\beta$ -estradiol + 0.5 mg de noréthistérone, soit une préparation de 54 mg de génistéine, soit un placebo. Dans le groupe génistéine, la concentration plasmatique de génistéine augmentait de  $0.06 \pm 0.02$  à  $1.4 \pm 0.8$   $\mu\text{mol/L}$ , après un an de traitement.

#### **V-4 Récapitulatif :**

Le Tableau 2 résume les caractéristiques de 16 études intervention contrôlées qui ont recherché un effet de l'administration de protéines de soja ou d'isoflavones sur les troubles de la ménopause liées à la carence en estrogènes, notamment les bouffées de chaleur, si l'on regroupe les essais chez les femmes ménopausées et les femmes ayant des troubles climatériques dans les suites de traitement de cancer. 13 essais, sont dans l'ensemble bien menés, et 3 ont des biais méthodologiques, 4 ont utilisé des produits dérivés du soja et 12 des isoflavones. Sur les 13 études à méthodologie acceptable, 4 ont un effet significatif sur les bouffées de chaleur allant d'une réduction de 5 à 24 %, 1 montre un effet sur la cytologie vaginale, 1 n'a pas d'effet et 7 ont un effet comparable au placebo. Quand elle a été recherchée, l'efficacité est nettement inférieure à celle de 1 mg de  $17\beta$ -estradiol.

En fonction de l'ensemble de ces données, il n'est pas possible d'admettre à ce jour que l'effet thérapeutique des phyto-estrogènes dans les troubles climatériques soit établi (voir revue générale par Huntley 2004). Il est possible de s'interroger sur l'importance des

résultats négatifs et sur la grande variabilité des résultats. Une explication de résultats discordants pourrait impliquer la variabilité individuelle de la capacité de métabolisme des isoflavones. Par exemple la conversion de la daidzéine en équol, retrouvée dans un peu moins de 30% de la population féminine, pourrait être associée à une réponse différente à l'administration de soja ou d'isoflavones.

L'explication proposée par Messina (2003) qui ont montré dans une revue générale que la réponse des symptômes du climatère à l'administration de soja ou de supplément d'isoflavones dépend du nombre de bouffées de chaleur initiale, est valable pour la plus part des études d'intervention thérapeutiques des troubles de la ménopause. Par ailleurs, cette observation est également valable pour l'effet placebo. Les 3 études réalisées chez des patientes aux antécédents de cancer du sein présentant un nombre quotidien de bouffées de chaleur supérieur à 7 et chez lesquelles aucun effet positif n'a été observé ne semblent pas confirmer cette hypothèse. Il s'agit cependant d'une population anormale et potentiellement à risque d'un effet de type estrogène du soja ou des phyto-estrogènes.

## **VI- Influence des phyto-estrogènes sur les hormones chez l'homme**

Les données chez l'homme de l'effet des phyto-estrogènes sont limitées à quelques études épidémiologiques et à de rares études d'intervention pour la plupart ouvertes qui seront présentées dans ce chapitre.

### **VI-1 Etudes épidémiologiques**

Deux études transversales ont été conduites pour rechercher si les éventuels effets protecteurs de la consommation de soja sur le risque de cancer de la prostate (voir Chapitre « Cancer ») étaient en relation avec un changement de production ou de métabolisme des androgènes chez l'homme.

L'étude conduite par *Nagata (2001b)* chez 69 japonais a montré que la consommation d'isoflavones évaluée à 22 mg par jour d'isoflavones d'après un questionnaire d'enquête alimentaire est inversement corrélée avec les concentrations plasmatiques d'estradiol ( $p < 0.009$ ), l'estrone ( $p < 0.05$ ) et la testostérone ( $p < 0.05$ ).

L'étude *EPIC-Oxford* a recruté 58,000 sujets âgés de plus de 20 ans entre 1993 et 1999 et évalué par un questionnaire la fréquence de consommation (FFQ) de lait de soja. Ce questionnaire a été validé chez la femme sur la corrélation significative entre les données du questionnaire et la concentration de daidzéine. Allen (2001) a rapporté les résultats de l'étude transversale de 696 sujets males, britanniques et caucasiens, en bonne santé parmi lesquels 105 buvaient une « pinte » (330 mL) de « jus » de soja, estimée à un apport de 26,7 mg d'isoflavones et 132 buvaient plus d'une « pinte » de « jus » de soja, estimée à un apport de 50,9 mg d'isoflavones par jour. Les consommateurs de soja étaient plus minces et plus actifs physiquement que les non consommateurs. Malgré cette différence, aucune relation significative de la consommation de soja avec les concentrations sériques de testostérone totale et libre, SHBG, glucuronide d'androstanediol, et LH n'a été observée.

### **VI-2 Etudes d'interventions**

L'étude randomisées de *Habito (2000)* a inclus 42 hommes qui consommaient chaque jour 150 gr de protéines ou 290 gr de tofu (contenant 70 mg d'isoflavones). Elle montre une diminutions significative du rapport testostérone sur estradiol ( $p < 0.05$ ) et une augmentation de la SHBG ( $p = 0,01$ ) suggérant un effet possible de la consommation de protéines du soja sur le métabolisme des androgènes par l'intermédiaire d'une effet sur la protéine de transport.

L'étude de *Nagata (2001b)* ne confirme pas ces résultats et montre chez 35 japonais consommant tous les jours 400 ml de « jus » de soja (contenant 90 mg d'isoflavones) l'absence d'effet sur la testostérone et la SHBG, mais cependant une réduction significative de l'estrone ( $p < 0.04$ ).

L'étude pilote et ouverte de *Mitchell (2001)* montre qu'un supplément de 40 mg d'isoflavones par jour pendant 2 mois chez 14 hommes ne modifie pas de façon significative les concentrations d'estrogènes et d'androgènes ni les gonadotrophines plasmatiques. Dans cette étude, le volume testiculaire, la qualité du spermogramme et le volume de l'éjaculat n'étaient pas altérés.

En conclusion, le petit nombre d'études disponibles ne permet pas de conclure de façon définitive à un effet d'une alimentation riche en soja ou d'un supplément d'isoflavones sur la fonction testiculaire et le métabolisme des androgènes chez l'homme. Si ces effets existent, ils semblent discrets avec une tendance vers l'augmentation de la SHBG qui influence le métabolisme et l'activité biologique de la testostérone et de l'estradiol. L'influence des facteurs nutritionnels et en particulier l'effet inhibiteur de l'insuline sur l'expression du gène de la SHBG dans le foie pourrait expliquer l'effet de la consommation de protéine du soja sur le niveau de la SHBG (Crave 1995).

### Points clés

- ❖ Les études épidémiologiques et la plupart des études d'intervention ont rapporté un effet de la consommation de soja, et dans certains cas d'isoflavones sur l'allongement du cycle menstruel avec une tendance à la diminution des concentrations de l'estradiol et à l'augmentation de son catabolisme en composés peu actifs biologiquement.
- ❖ Cet effet ne paraît pas associé à un effet de type estrogène sur l'endomètre ou la cytologie vaginale.
- ❖ Les études épidémiologiques menées au Japon ont dans l'ensemble montré que la consommation de produits dérivés du soja est associée à un nombre et une sévérité moindre des bouffées de chaleur qu'en Europe. Mais, ces études n'ont pas cherché à identifier les facteurs de confusion possibles associés à la consommation traditionnelle de soja entre les populations asiatiques, nord américaines ou européennes.
- ❖ L'engouement actuel pour la consommation de phyto-estrogènes sous la forme de complément d'extraits de protéines de soja enrichis en isoflavones ne repose pas sur la démonstration d'un effet bénéfique sur les bouffées de chaleur ou sur la démonstration d'un effet comparable à celui des estrogènes. Les essais randomisés d'un apport contrôlé de protéines de soja (aliment) n'ont généralement pas montré de bénéfice significativement supérieur à celui d'un placebo sur les bouffées de chaleur.
- ❖ Concernant le fort effet placebo des compléments de phyto-estrogène observé dans la plupart des études et la différence significative d'avec le placebo observée dans certaines études, on peut formuler l'hypothèse que certaines femmes ont un métabolisme particulier des isoflavones (§production d'équol) qui pourrait augmenter leur biodisponibilité et leur activité estrogénique expliquant leur effet favorable sur les bouffées de chaleur.
- ❖ Bien que les trois études réalisées dans des populations de femmes traitées pour cancer du sein n'aient pas montré d'effet particulier sur le sein on ne peut pas écarter le risque d'un effet de type estrogène potentiellement dangereux.

### Recommandations

#### 1 - Recommandations à visée de connaissance et de recherche.

- ❖ Mise en place d'études contrôlées présentant des effectifs suffisants et calculés afin de répondre à la question ouverte des risques ou bénéfiques de l'apport de soja et/ou d'isoflavones chez la femme ménopausée. Ces études d'intervention devront respecter les règles usuelles des essais thérapeutiques.

#### 2- Recommandations de Santé Publique

- ❖ Il doit être clairement mentionné que les produits dérivés du soja ne doivent pas faire allégation de traitement alternatif au traitement hormonal substitutif de la ménopause.
- ❖ Il paraît prudent de ne pas recommander un apport d'un complément de phyto-estrogènes ou d'isoflavones chez des femmes ménopausées aux antécédents de cancer du sein, bien qu'il y ait pas d'étude à long terme

#### 3- Recommandations à visée d'information du consommateur.

- ❖ Les consommateurs de produits dérivés du soja doivent être informés que ces produits contiennent des isoflavones dont il a été montré qu'elles pouvaient exercer des effets hormonaux. La composition en isoflavones de ces compléments doit être clairement mentionnée. La mention « Parlez en avec votre médecin » doit alerter les consommateurs d'éventuelles contre indications.
- ❖ La publicité sur les phyto-estrogènes doit être rigoureusement contrôlée.

**Tableau 1 a. Etudes d'intervention sur critères marqueurs hormonaux chez la femme avant la ménopause : apport alimentaire**

Auteurs pays	Sujets	Intervention	Durée/adhésion	Effets
Cassidy (1999) UK	15 pré-M non végétariennes	1-60 g TVP avec 45mg conj. lfl (n=6) 2-50g miso avec 25mg lfl aglycone (n=3) 3-Arcon F 0 lfl ( n=5) 4- =1/2: 23mg conj lfl (n=6)	1, 2, 4, commencent par 1 cycle témoin, puis supplémentation	Allongement de la phase folliculaire Allongement de la durée du cycle Suppression des pics LH et FSH (1), Retard du pic de progestérone (2) Diminution cholestérol (1) et augmentation (3)
Nagata (1997) Japon	Pré-M ; 31 vs 29	400ml lait de soja vs régime normal (# 27mg lF) dosages sériques	4 cycles	Diminution estrone (23%), estradiol (27%), mais NS entre les 2 groupes Allongement du cycle : 2 jours
Martini (1999)	36 femmes pré M	boisson contenant 38 mg d'isoflavones	2 cycles	Aucun effet sur l'estrone et ses métabolites (2-OH-E1 et 16-O- E1)
Wu , (2000) Japon	20 10 européennes 10 asiatiques	Boisson contenant 32 mg d'isoflavones		Diminution d'estradiol uniquement chez les femmes asiatiques dont l'excrétion urinaire d'isoflavones n'augmentait pas contrairement aux européennes

**Tableau 1b Etudes d'intervention sur critères marqueurs hormonaux chez la femme préménopausée : apport de compléments alimentaires**

Auteurs et pays	Sujets	Intervention	Durée/adhésion	Effet	Remarques
Xu (1998)	14 femmes pré ménopausées	étude randomisée double aveugle 0.11 mg/kg/jour (T),1 (L) 2 (H)	3 cycles + 9 j vide de 3 semaines dosage jour 1, 36-38,64-66, 92-94	↑ des 2-OH et ↓des 4-OH et donc du rapport	
Duncan (1999a) USA	14 femmes normalement réglées Exclusion des végétariens, des forts consommateurs de fibres ou de produits soja	étude randomisée et croisée 0.11 mg/kg/jour (T),1 (L) 2 (H) (exprimés en aglycone)	3x 93 jours , 3 cycles + 9 j vide de 3 semaines dosage sanguin jour 1, 36-38,64-66, 92-94	L et H effet sur ↓LH sans dose effet (phase péri ovulatoire) L ↑E1 et H E1 (milieu de phase folliculaire) H diminue T4-libre et DHEA-S L : augmente DHEA-S	Pas d'effet sur longueur du cycle
Duncan (2000) USA	Pré-M n=145 excrétrices et 9 non Exclusion id Caractéristiques id	Etude croisée, 3 régimes 0.15 mg/kg/jour (T),1 (L) 2 (H) (exprimés en aglycone)#7, 65, 132mg lfl totales respectivement génistéine 55%, daidzéine 37, glycitéine 8	3 cycles +Vide de 9 jours ↑génistéine et daidzéine toutes équol excrétrices mais NS non excr. (urines) GC-MS	Equol excrétrices : moins d'oestrone et estrone-S, testostérone, androstenedione, DHEA, et plus SHBG et progestérone milieu de phase lutéale Pas de différence sur oestradiol	

**Tableau 2 : Essais contrôlés de l'effet d'un apport alimentaire de soja ou d'un supplément d'isoflavones sur les bouffées de chaleur et les signes de carence en estrogènes de la ménopause**

Auteur (année)	Type d'étude	Durée (sem)	Dose d'ifl (mg/jour)	Age (année)	Nb de sujets témoins	Nb de sujets Soja ou ifl	Nb de bouffées/jour	% de changement vs placebo (P) ou témoin
<i>Essais impliquant un supplément de soja</i>								
Dalais (1998)	croisée	12	52	54	11	11	3,9	↑ 29% maturation vaginale
Washburn (1999)	croisée	6	34	51	51	51	3,7	↓ 4,7% bouffées de chaleur
Knight (1999)	parallèle	12	77	53	12	13	7,6	Pas d'effet
St Germain (2001)	parallèle	24	80	50	24	21	2,2	↓ 4,7% bouffées de chaleur = P
<b>total</b>					98	96		
<i>Essais impliquant un supplément d'isoflavones</i>								
Baber, (1999)	parallèle	12	40	54	26	25	>3	↓ 22% bouffées de chaleur =P
Upmallis (2000)	parallèle	12	50	55	63	59	8,6	↓ 9% sévérité bouffées de chaleur
Scambia (2000)	parallèle	6	50	54	19	20	4,3	↓ 19,5% bouffées de chaleur =P
Van de Weijr (2002)-	parallèle	12	80	49-65	14	16	+	↓ 4.7 % bouffées de chaleur
Tice (2003)	parallèle	12	82	52	85	84	5	↓ 40% bouffées de chaleur=P
Crisafulli (2004)	parallèle	52	54	47-57	30	30	4,6	↓ 24 % bouffées de chaleur
Jeri (2002)	parallèle	16	40	52	15	15	5	↓ 38 % bouffées de chaleur
Han* (2002)	parallèle	16	33.3	49	40	40	10,7	↓ 26,4% bouffées de chaleur
Drapier Faure* (2002)	parallèle	16	70	54	35	38	9,8	↓ 51 bouffées de chaleur
<b>total</b>					327	327		
<i>Essais concernant des patients aux antécédents de cancer du sein</i>								
Quella (2000)	croisé	4	150	>18	155	155	7,3	↓ 2 % bouffées de chaleur =P
Van Patten (2002)	parallèle	12	90	55	64	59	7,3	↓ 30%bouffées de chaleur =P
Nikander (2003)	parallèle	8	114	54	30	32	2	↓ 0.2% bouffées de chaleur <P

\* ces études comportent un biais méthodologique ; ifl : isoflavones



- Albert A, Altare C, Baro F, Buendia E, Cabero A, Cancelo MJ, Castelo-Branco C, Chantre P, Duran M, Haya J, Imbert P, Julia D, Lanchares JL, Llana P, Manubens M, Minano A, Quereda F, Ribes C, Vazquez F. Efficacy and safety of a phytoestrogen preparation derived from *Glycine max* (L.) Merr in climacteric symptomatology: a multicentric, open, prospective and non-randomized trial. *Phytomedicine*. 2002, 9:85-92.
- Albertazzi P, Pansini F, Bonaccorsi G, Zanotti L, Forini E, De Aloysio D. The effect of dietary soy supplementation on hot flushes. *Obstet Gynecol*. 1998, 91:6-11.
- Albertazzi P, Pansini F, Bottazzi M, Bonaccorsi G, De Aloysio D, Morton MS. Dietary soy supplementation and phytoestrogen levels. *Obstet Gynecol*. 1999, 94:229-231.
- Allen NE, Appleby PN, Davey GK, Key TJ. Soy milk in relation to serum sex hormone levels in British men. *Nutrition and Cancer* 2001; 41:41-46.
- Allison DB, Gadbury G, Schwartz LG, Murugesan R, Kraker JL, Heshka S, Fontaine KR, Heymsfield SB. A novel soy-based meal replacement formula for weight loss among obese individuals : a randomized controlled clinical trial. *European J Clin Nutri* 2003; 57:514-522.
- Baber RJ, Templeman C, Morton T, Kelly GE, West L. Randomized placebo-controlled trial of an isoflavones supplement and menopausal symptoms in women. *Climacteric*. 1999, 2:85-92.
- Baird DD, Umbach DM, Lansdell L, Hughes CL, Setchell KDR, Weinberg CR, Haney AF, Wilcox AJ, McLachlan JA. Dietary intervention study to assess estrogenicity of dietary soy among postmenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab*. 1995, 80:1685-1690.
- Berrino F, Bellati C, Secreto G, Camerini E, Pala V, Panico S, Allegro G, Kaaks R. Reducing bioavailable sex hormones through a comprehensive change in diet: the diet and androgens (DIANA) randomized trial. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2001; 10:25-33.
- Bhathena SJ, Velasquez MT. Beneficial role of dietary phytoestrogens in obesity and diabetes. *Am J Clin Nutr* 2002 ; 76:1191-1201.
- Brzezinski A, Adlercreutz H, Shaoul R, Rösler A, Shmueli A, Tanos V, Schenker JG. Short-term effects of phytoestrogen-rich diet on postmenopausal women. *Menopause*. 1997, 4:89-94.
- Cassidy A, Bingham S, Setchell KDR. Biological effects of a diet of soy protein rich in isoflavones on the menstrual cycle of premenopausal women. *Am J Clin Nutr*. 1994, 60:333-340.
- Crave JC, Lejeune H, Brébant C, Baret C, Pugeat M. Differential effects of insulin and insulin-like growth factor I on the production of plasma steroid binding globulins by human hepatoblastoma-derived (Hep G2) cells. *J Clin Endocrinol Metab* 1995; 80: 1283-1289.
- Dalais FS, Rice GE, Wahlqvist ML, Grehan M, Murkies AL, Medley G, Ayton R, Strauss BJG. Effects of dietary phytoestrogens in postmenopausal women. *Climacteric*. 1998, 1:124-129.
- Drapier-Faure E, Chantre Ph, Mares P. Effects of a standardized soy extract on hot flushes: a multicenter, double-blind, randomized, placebo-controlled study. *Menopause* 2002; 9:329-334.
- Duncan AM, Merz BE, Xu X, Nagel TC, Phipps WR, Kurzer MS. Soy isoflavones exert modest hormonal effects in premenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab*. 1999a, 84:192-197.
- Duncan AM, Underhill KEW, Xu X, Lavalleur J, Phipps WR, Kurzer MS. Modest hormonal effects of soy isoflavones in postmenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab*. 1999b, 84:3479-3484.
- Duncan AM, Merz-Demlow BE, Xu X, Phipps WR, Kurzer MS. Premenopausal equol excretors show plasma hormone profiles associated with lowered risk of breast cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2000; 9:581-586.
- Eden J. Phytoestrogens and the menopause. *Baillieres Clin Endocrinol Metab*. 1998, 12:581-587.
- Friedenwald J, Ruharh J. The use of soybean as food in diabetes. *Am J Med Sci*. 1910, 793-803.
- Fujimoto WY, Leonetti DL, Kinyoun JL, Newell-Morris L, Shuman WP, Stolov WC, Wahl PW. Prevalence of diabetes mellitus and impaired glucose tolerance among second-generation Japanese-American men. *Diabetes*. 1987, 36:721-729.
- Fujimoto WY, Leonetti DL, Bergstrom RW, Kinyoun JL, Stolov WC, Wahl PW. Glucose intolerance and diabetic complications among Japanese-American women. *Diabetes Res Clin Prac*. 1991, 13:119-130.
- Habito RC, Montalto J, Leslie E, Balla MJ. Effects of replacing meat with soybean in the diet on sex hormones concentrations in healthy adult males. *Br j Nutr* 2000; 84:557-563. Han KK, Soares JM Jr, Haidar MA, de Lima GR, Baracat EC. Benefits of soy isoflavone therapeutic regimen on menopausal symptoms. *Obstet Gynecol*. 2002, 99:389-394.
- Huntley AL, Ernst E. Soy for the treatment of perimenopausal symptoms – a systematic review. *Maturitas* 2004; 47:1-9
- Hustin J, Drykonnigen GJA. Estrogen Treatment of postmenopausal vaginal atrophy. A cytological assessment. *Maturitas* 1979;1:207-213
- Hutchins AM, Martini MC, Olson BA, Thomas W, Slavin JL. Flaxseed consumption influences endogenous hormone concentrations in postmenopausal women. *Nutr Cancer*. 2001, 39:58-65.
- Jayagopal V, Albertazzi P, Kilpatrick ES, Howarth EM, Jennings PE, Hepburn DA, Atkin SL. Beneficial effects of soy phytoestrogen intake in postmenopausal women with type 2 diabetes. *Diabetes Care*. 2002, 25:1709-1714.
- Jeri AR. The use of an isoflavone supplement to relieve hot flushes. *Female Patient*. 2002, 27:35-37.
- Kabat GC, Chang CJ, Sparano JA, Sepkovic DW, Hu X, Khalil A, Rosenblatt R, Bradlow HL. Urinary estrogen metabolites and breast cancer: a case-control study. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev* 1997;6:505-509
- Knight DC, Howes JB, Eden JA. The effect of Promensil™, an isoflavone extract, on menopausal symptoms. *Climacteric*. 1999, 2:79-84.
- Knight DC, Howes JB, Eden JA, Howes LG. Effects on menopausal symptoms and acceptability of isoflavones containing soy powder dietary supplementation. *Climacteric*. 2001, 4:13-18.
- Kotsopoulos D, Dalais FS, Liang YL, McGrath BP, Teede HJ. The effects of soy protein containing phytoestrogens on menopausal symptoms in postmenopausal women. *Climacteric*. 2000 Sep;3(3):161-7.

Kreijkamp-Kaspers S, Kok L, Grobee DE, deHaan EH, Aleman A, Lampe JW, van der Schouw YT. Effect of soy protein containing isoflavones on cognitive function, bone mineral density, and plasma lipids in postmenopausal women: a randomized controlled trial. *JAMA*, 2004,292, 65-74

Kupperman HS, Wechler BB, Blatt MHG. Contemporary therapy of the menopause syndrome. *Jama* 1959 171 1627-1637.

Kumar NB, Cantor A, Allen K, Riccardi D, Cox CE. The specific role of isoflavones on estrogen metabolism in premenopausal women. *Cancer*. 2002, 94:1166-1174. Kupperman HS, Wechler BB, Blatt MHG. Contemporary therapy of the menopause syndrome. *JAMA*.1959,171:1627-1637

Kurzer MS Hormonal effects of soy in women and men. *J Nutr* 2002; 132:570S-73S

Kurzer MS Phytoestrogen supplement use by women. *J Nutr* 2003; 133:1883S-86S

Lee D-S, Lee S-H. Genistein, a soy isoflavone, is a potent  $\beta$ -glucosidase inhibitor. *FEBS Lett*. 2001, 501:84-86.

Lu L-JW, Anderson KE, Grady JJ, Nagamani M. Effects of soya consumption for one month on steroid hormones in premenopausal women : implications for breast cancer risk reduction. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev*. 1996;5:63-70.

Lu L-JW, Anderson KE, Grady JJ, Kohen F, Nagamani M. Decreased ovarian hormones during a soja diet :implication for breast cancer prevention. *Cancer Res*. 2000 ; 60:4112-4121.

Lu L-JW, Cree M, Josyula S, Nagamani M, Grady JJ, Anderson KE. Increased urinary excretion of 2-hydroxyestrone but not 16 $\beta$ -hydroxyestrone in premenopausal women during a soya diet containing isoflavones. *Cancer Res*. 2000, 60:1299-1305.

Martini MC, Dancisak BB, Haggans CJ, Thomas W, Slavin JL. Effects of soy intake on sex hormone metabolism in premenopausal women. *Nutr Cancer*. 1999, 34:133-139.

Maskarinec G, Williams AE, Inouye JS, Stanczyk FZ, Franke AA. A randomized isoflavone intervention among premenopausal women. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2002; 11:195-201.

Messina M, Hughes C Efficacy of soyfoods and soybean isoflavones supplement for alleviating menopausal symptoms is positively related to initial hot flus frequency. *Journal of Medecine Food* 2003; 6:1-11.

Mitchell JH, Cawood E, Kinniburgh D, Provan A, Collins AR, Irvine DS. Effect of a phytoestrogen food supplement on reproductive health in normal males. *Clin Sci* 2001; 100:613-618.

Murkies AL, Lombard C, Strauss BJG, Wilcox G, Burger HG, Morton MS. Dietary flour supplementation decreases post-menopausal hot flushes: effect of soy and wheat. *Maturitas*. 1995, 21:189-195.

Nagata C, Kabuto M, Kurisu Y, Shimizu H. Decreased serum estradiol concentration associated with high dietary intake of soy products in premenopausal women. *Nutr Cancer*. 1997, 29:228-233.

Nagata C, Takatsuka N, Inaba S, Kawakami N, Shimizu H. Association of diet and other lifestyle with onset of menopause in Japanese women. *Maturitas*. 1998, 29:105-113.

Nagata C, Shimizu H, Takami R, Hayashi M, Takeda N, Yasuda K. Hot flushes and other menopausal symptoms in relation to soy product intake in Japanese women. *Climacteric*. 1999, 2:6-12.

Nagata C, Shimizu H, Takami R, Hayashi M, Takeda N, Yasuda K. Serum concentrations of estradiol and dehydroepiandrosterone sulfate and soy product intake in relation to psychologic well-being in peri- and postmenopausal Japanese women. *Metabolism*. 2000, 49:1561-1564.

Nagata C, Takatsuka N, Kawakami N, Shimizu H. Soy product intake and hot flashes in Japanese women: results from a community-based prospective study. *Am J Epidemiol*. 2001a, 153:790-793.

Nagata C, Takatsuka N, Shimizu H, Hayashi H, Akamatsu T, Murase K. Effect of soymilk consumption on serum estrogen and androgen concentrations in Japanese men. *Cancer Epidemiol Biomark Prev*. 2001b, 10:179-184.

Nicholls J, Lasley BL, Nakajima ST, Setchell KD, Schneeman BO. Effects of soy consumption on gonadotropin secretion and acute pituitary responses to gonadotropin-releasing hormone in women. *J Nutr*. 2002; 132:708-714.

Nikander E, Kilkinen A, Metsa-Heikkila M, Adlercreutz H, Pietinen P, Tiitinen A, Ylikorkala O. A randomized placebo-controlled crossover trial with phytoestrogènes in treatment of menopause in breast cancer patients *Obstet. Gynecol*, 2003, 101, 1213-20

Quella SK, Loprinzi CL, Barton DL, Knost JA, Sloan JA, La Vasseur BI, Swan D, Krupp KR, Miller KD, Novotny PJ. Evaluation of soy phytoestrogens for the treatment of hot flashes in breast cancer survivors: a north central cancer treatment group trial. *J Clin Oncol*. 2000, 18:1068-1074.

Scambia G, Mango D, Signorelle PG, Angeli RA, Palena C, Gallo D, Bombardelli E, Morazzoni P, Riva A, Mancuso S. Clinical effects of a standardised soy extract in postmenopausal women: a pilot study. *Menopause*. 2000, 7:105-111.

Sorenson RL, Brelje TC, Roth C. Effect of tyrosine kinase inhibitors on islets of Langerhans: evidence for tyrosine kinases in the regulation of insulin secretion. *Endocrinol*. 1994, 134:1975-1978.

St Germain A, Peterson CT, Robinson JG, Alekel DL. Isoflavone-reich or isofalvone-poor soy protein does not reduce menopausal symptoms during 24 weeks of treatment. *Menopause* 2001; 8:17-26

Tice JA, Ettinger B, Ensrud K, Wallace R, Blackwell T, Cummings SR. Phytoestrogen supplements for the treatment of hot flashes : the Isoflavone Clover Extract (ICE) Study : a randomized controlled trial. *JAMA*, 290,207-217

The endogenous Hormones and Breast Cancer Collaborative Group. 2002 Endogenous sex hormones and breast cancer in postmenopausal women: reanalysis of nine prospective studies. *J Natl Cancer Inst* 94:606-616.

Upmalis DH, Lobo R, Bradley L, Warren M, Cone FL, Lamia CA. Vasomotor symptom relief by soy isoflavones extract tablets in postmenopausal women: a multicenter, double-blind, randomized, placebo-controlled study. *Menopause*. 2000, 7:236-242.

Van der Weijer PHM, Barentsen R. Isoflavones from red clover (Promensil®) significantly reduce menopausal hot flush symptoms compared with placebo. *Maturitas*. 2002, 42:187-193.

Van Patten CL, Olivotto IA, Chambers GK, Gelmon KA, Hislop TG, Templeton E, Wattie A, Prior JC. Effect of soy phytoestrogens on hot flashes in postmenopausal women with breast cancer: a randomized, controlled clinical trial. *J Clin Oncol*. 2002, 20:1449-1455.

Verkasalo PK, Appleby PN, Davey GK, Key TJ. Soy milk intake and plasma sex hormones: a cross-sectional study in pre- and postmenopausal women (EPIC-Oxford). *Nutr Cancer*. 2001; 40:79-86.

Wagner JD, Cefalu WT, Anthony MS, Litwak KN, Zhang L, Clarkson TB. Dietary soy protein and estrogen replacement therapy improve cardiovascular risk factors and decrease aortic cholesteryl ester content in ovariectomized cynomolgus monkeys. *Metabolism*. 1997, 46:698-705.

Wagner JD, Zhang L, Greaves KA, Shadoan MK, Schwenke DC. Soy protein reduces the arterial low-density lipoprotein (LDL) concentration and delivery of LDL cholesterol to the arteries of diabetic and non diabetic male cynomolgus monkeys. *Metabolism*. 2000, 49:1188-96.

Washburn S, Burke GL, Morgan T, Anthony M. Effect of soy protein supplementation on serum lipoproteins, blood pressure, and menopausal symptoms in perimenopausal women. *Menopause*. 1999, 6:7-13.

Watanabe S, Terashima K, Sato Y, Arai S, Eboshida A. Effects of isoflavone supplement on healthy women. *BioFactors*. 2000, 12:233-241.

Wilcox G, Wahlgvist ML, Burger HG, Medley G. Oestrogenic effects of plant foods in postmenopausal women. *Br Med J*. 1990, 301:905-906.

Writing Group for the Women's Health Initiative Investigators. Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women. Principle results from the Women's Health Initiative Randomized Controlled Trial. *JAMA*. 2002, 288:321-333.

Wu AH, Stanczyk FZ, Hendrich S, Murphy PA, Zhang C, Wan P, Pike MC. Effects of soy foods on ovarian function in premenopausal women. *Br J Cancer*. 2000, 82:1879-1886.

Xu X, Duncan AM, Merz BE, Kurzer MS. Effects of soy isoflavones on estrogen and phytoestrogen metabolism in premenopausal women. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 1998, 7:1101-1108.

Xu X, Duncan AM, Wangen KE, Kurzer MS. Soy consumption alters endogenous estrogen metabolism in postmenopausal women. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2000, 9:781-786.



# Effets des phyto-estrogènes sur l'ostéoporose

*Véronique Coxam, Mariette Gerber*

Dans le contexte de l'évolution démographique actuelle des populations occidentales, témoignant d'un allongement de la longévité, l'ostéoporose, dont l'incidence augmente drastiquement avec l'âge, est considérée comme un problème majeur de santé publique. En effet, chez la femme caucasienne âgée de 50 ans, le risque cumulé de développer une fracture pendant les années restant à vivre (estimé sur la base de l'incidence en Amérique du Nord et en fonction de l'espérance de vie à un âge donné) atteint 40% (respectivement 15,5%, 15,6% et 16% pour la hanche, la colonne vertébrale et le poignet) (Melton 1992 ; Johnell 1998). Au-delà de 80 ans, 70% des femmes sont ostéoporotiques et 60% développeront une ou plusieurs fractures (Melton, 1995). En fait à l'échelon national, environ 50 000 fractures non traumatiques du col fémoral sont recensées annuellement (Cooper 1992) auxquelles il faut ajouter 50 000 nouveaux cas de tassements vertébraux diagnostiqués (le nombre réel atteignant probablement 150 000). La France n'a bien sûr pas l'apanage de cette affection largement répandue sur le globe. Ainsi, outre Atlantique, 25 millions d'Américains souffrent de cette pathologie (200 000 fractures du poignet, 300 000 fractures du col fémoral et 500 000 tassements vertébraux sont dénombrés chaque année). En fait, l'incidence cumulée des fractures ostéoporotiques en Europe, au Japon et aux Etats-Unis atteint 75 millions de patients (Cooper & Melton, 1992). Or, d'après certaines études prospectives, le nombre de fractures de la hanche devrait augmenter, au niveau européen, de 135% d'ici 50 ans (soit 972 000 contre 414 000 au début de ce siècle) (Gullberg 1997) et la prévalence projetée des tassements vertébraux correspondrait à un accroissement de 75% (37,3 millions en 2050 contre 23,7 millions en 2000). Toutefois, ces sombres prévisions pourraient être démenties par un dépistage, une prise en charge précoce et adaptée des patients, associée à une amélioration des stratégies préventives (Coxam & Horcajada, 2004). Enfin, Les estimations de l'impact financier de l'ostéoporose sont préoccupantes du fait de la relation avec le vieillissement et du poids de cette pathologie comme facteur de comorbidité, deux phénomènes dont l'existence conjointe est susceptible d'influencer massivement les dépenses de santé dans les pays industrialisés. Selon les études françaises récentes, le coût médical direct moyen d'une fracture de l'extrémité supérieure du fémur est évalué entre 6000 euros en court séjour et 11 000 euros en moyen séjour, auquel il faut ajouter des coûts économiques et sociaux indirects, notamment la perte de production pour les personnes en activité (INSERM, 1996). A l'échelle populationnelle, les coûts engendrés dépasseraient les 560 millions d'euros, soit plus de 9 000 milliards d'euros à l'échelon européen (Rapport sur l'ostéoporose dans la CE, 1999).

## I- Généralités sur le tissu osseux

D'un point de vue conceptuel, l'ostéoporose est définie par une faible masse osseuse accompagnée d'une altération microarchitecturale, conduisant à une fragilité accrue et, par conséquent, à une augmentation du risque fracturaire (Consensus Development Conference, 1991). En référence aux travaux de Riggs et Melton (1983), il est classique de distinguer l'ostéoporose post ménopausique trabéculaire (type 1) à expression vertébrale (qui, comme son nom l'indique, résulte d'une carence estrogénique, les concentrations circulantes d'estradiol et d'estrone passant respectivement de 40-350 à 15 pg/ml et de 40-200 à 30 pg/ml en post ménopause), de l'ostéoporose sénile (type 2) dont l'étiopathogénie est multifactorielle et qui affecte une population plus âgée (>70 ans). En outre, ont également été décrites des ostéoporoses secondaires d'origine endocrinienne (hypogonadisme, hyperthyroïdie et hyperparathyroïdie, syndrome de Cushing, hyperprolactinémie), ou liées à des affections malignes, à une immobilisation prolongée, ou encore consécutives à une corticothérapie (traitement de l'asthme et des affections rhumatismales et cutanées) (Alexandre, 1989).

## **I-1 Physiopathologie de l'ostéoporose**

L'os est un tissu vivant dont le remaniement permet une adaptation permanente aux contraintes environnantes, voire de réparer le cas échéant les éléments constitutifs, de façon à préserver les propriétés de rigidité et de flexibilité de la structure et de maintenir l'homéostasie phosphocalcique. Ce processus de remodelage correspond à un phénomène cyclique d'érosion, assurée par les ostéoclastes, suivi d'une phase de réparation des microcavités engendrées (remplacement par de l'os néoformé grâce à l'activité ostéoblastique), duquel dépend la masse osseuse. En fait, la période de croissance coïncide avec l'acquisition du capital osseux qui atteint un maximum avant la trentaine. Chez l'adulte, une phase stationnaire est démontrée. Avec l'âge, un déséquilibre s'installe, l'accrétion ne compensant plus la résorption, du fait de l'incompétence progressive des ostéoblastes à combler totalement les lacunes de résorption. L'accumulation de ces déficits élémentaires conduisant à une ostéopénie est particulièrement importante au cours de la péri-ménopause et pendant les 5 ans qui suivent l'arrêt de la fonction ovarienne, avec une perte moyenne annuelle atteignant 0,3 à 5% ou plus. Ainsi, entre l'âge de 30 et 80 ans, environ 45% du capital est détruit chez la femme (Cummings 1995). Exacerbée, cette ostéopénie aboutit ainsi au risque fracturaire (densité minérale au dessous de laquelle le moindre choc est susceptible de provoquer une fracture) qui correspond au seuil pathologique et donc au diagnostique de l'ostéoporose.

Le tableau clinique des complications ostéoporotiques diffère. Les complications inhérentes aux tassements vertébraux incluent des douleurs dorsales ainsi que des troubles de la posture (réduction de la taille, cyphose) qui peuvent entraîner, dans les cas extrêmes, une gêne respiratoire, une satiété précoce associée à des problèmes digestifs. Des séquelles psychologiques sont également décrites : perte de l'estime de soi, désocialisation, anxiété, problèmes de sommeil, une dépression étant la traduction ultime. La fracture de la hanche, quant à elle, est une des causes majeures d'entrée en dépendance des personnes âgées. En effet, 50% des patients conservent des handicaps plus ou moins invalidants puisque 25% d'entre eux doivent être pris en charge dans des maisons de long séjour. Une mortalité est enregistrée dans les 6 mois dans 20% des cas. Ainsi seuls 30% des patients préservent une qualité de vie équivalente à celle antérieure à la fracture.

## **I-2 Outils de diagnostic**

### **I-2-1 Les marqueurs biochimiques**

Le dosage de marqueurs biochimiques dans les liquides biologiques permet d'évaluer de façon non invasive le remodelage osseux, avec la possibilité de répéter les mesures chez un même individu. Les principaux témoins des activités ostéoblastiques et de résorption peuvent être des substances matricielles (élaborées lors de la formation osseuse ou libérées lors de la résorption) ou des activités enzymatiques spécifiques. Le dosage de l'ostéocalcine et de la phosphatase alcaline osseuse (par méthode radio-immunologique) sont, à ce jour, considérés comme les plus fidèles reflets de l'activité ostéoblastique, tandis que la quantification des agents de pontage (exemple, la déoxyypyridinoline urinaire (DPD) ou de certains produits de dégradation du collagène de type I (dosages immunologiques ou par HPLC) renseignent sur le niveau de résorption (Garnero 1999 ; Miller 1999). En outre, la mise au point récente du dosage de l'isoforme 5b de la phosphatase acide tartrate résistante ouvre des perspectives intéressantes en termes de corrélation avec l'incidence de fractures (Gerdhem 2004). Toutefois, ces analyses ne donnent qu'une indication reflétant les activités métaboliques à un instant précis qui ne reflètent pas la valeur cumulative du capital osseux. En outre, en raison de la variabilité nyctémérale et annuelle, les résultats sont difficiles à extrapoler.

### I-2-2 La densité minérale osseuse

En fait, le diagnostic clinique de l'ostéoporose repose sur la détermination de la masse osseuse par ostéodensitométrie (densité minérale osseuse, DMO), qui permet également un suivi thérapeutique. L'identification des sujets à risque (standards validés uniquement pour les femmes de race caucasienne) repose ainsi sur la valeur du T-score, exprimée en déviation standard qui correspond à l'écart de masse osseuse par rapport à la valeur moyenne d'un jeune adulte. Selon les critères de l'OMS, un T-score supérieur à  $-1$  déviation standard est considéré normal, une ostéopénie est avérée lorsqu'il est compris entre  $-1$  et  $-2,5$ , et le seuil pathologique est atteint lorsque la valeur est inférieure à  $-2,5$ . Le scanner (tomodensitométrie quantitative) permet d'exprimer une estimation volumétrique de la densité minérale. C'est cependant encore exclusivement un outil de recherche dont l'usage est relativement peu développé (Roux, 2003). Il est d'autre part possible d'évaluer la densité osseuse par une méthodologie ultrasonique au niveau périphérique, mais, du fait de la diversité technologique disponible, la prise de décision thérapeutique sur cette base est déconseillée (Ayers 2000).

Il faut cependant rappeler que les propriétés biomécaniques de l'os sont tributaires non seulement du degré de minéralisation, mais aussi de la matrice, dont sa composition et sa géométrie qui ne sont pas prises en compte lors d'un tel examen. Ainsi, la densité minérale osseuse exprime un critère intermédiaire d'efficacité à partir duquel il est difficile d'extrapoler un éventuel risque de fracture. A titre d'exemple, il est considéré que, sous traitement au raloxifène (SERM), l'augmentation de ce paramètre ne contribue qu'à hauteur de 4 à 35% à l'amélioration du risque fracturaire (Sarkar 2002). Les chiffres de 16 à 28% sont avancés pour les biphosphonates (Cummings 2002 ; Li 2001). Par conséquent, pour pouvoir évaluer le critère ultime de la qualité osseuse, à savoir les propriétés biomécaniques du squelette, il est donc indispensable de mettre en place des études cliniques permettant de quantifier l'impact sur le risque de fracture. Ceci implique, pour atteindre un degré de signification, de conduire les essais sur une population importante et sur une période suffisamment longue. Enfin, l'exploration radiologique est classiquement pratiquée pour déceler une fracture, ultime manifestation clinique.

### I-3 Estrogènes et ostéoporose

La carence estrogénique consécutive à la ménopause est le principal déterminant de la perte osseuse (Riggs 2002). Au niveau tissulaire, les estrogènes ralentissent le remodelage et maintiennent un équilibre entre les activités de formation et de résorption. A l'échelle cellulaire, une action directe est démontrée puisque des récepteurs spécifiques ont été identifiés aussi bien sur les ostéoblastes que les ostéoclastes (Hoyland 1997 ; Onoe 1997 ; Kusec 1998 ; Braidman 2001), les  $Er\beta$  étant prédominants dans l'os trabéculaire alors que les  $Er\alpha$  sont majoritaires dans la corticale. En ce qui concerne les ostéoclastes, ils modulent effectivement le recrutement des précurseurs et réduisent l'activité des cellules matures en stimulant l'apoptose (Manolagas, 2000). Ils sont également susceptibles d'induire la formation, la différenciation, la prolifération et l'activité des ostéoblastes (Chow 1992). En fait, les études d'inactivation du récepteur  $Er\alpha$  (modèle ERKO) ou  $Er\beta$  (BERKO) ou des deux types simultanément (DERKO) menées chez la souris ont permis d'appréhender le rôle respectif de chaque récepteur. La croissance osseuse serait médiée par  $Er\alpha$  $Er\beta$  interviendrait dans l'expression du dimorphisme sexuel, ainsi que dans les phénomènes d'ostéopénie liés à l'âge en stimulant la résorption et en inhibant la formation médiée par les récepteurs de type  $\alpha$ . Enfin, les médiateurs moléculaires des estrogènes incluent les cytokines inflammatoires et la production de mono-oxyde d'azote (marqueur du stress oxydant) (Armour 1999 ; Das 2002). En effet, les concentrations plasmatiques en cytokines inflammatoires ( $IL_1$ ,  $IL_6$  et  $TNF\alpha$ ) sont accrues chez la femme ménopausée (Pacifici 1996). De même, *in vitro*, leur production monocytaire est supérieure lorsque les cellules ont été prélevées chez des femmes ménopausées (Cohen-Solal 1998).

## **II- Etudes chez l'Homme**

### **II-1 Méthodologie**

La méthodologie générale relative aux études épidémiologiques est décrite dans un chapitre précédent. Pour les études d'épidémiologie analytique, ne seront retenues que les investigations présentant des critères de validité : effectif, mesure de l'exposition, et pour les études d'intervention, celles qui sont randomisées, contrôlées, portant sur l'évaluation des paramètres osseux (exemple mesure périphérique alors que les sites privilégiés par la pathologie concernent essentiellement la colonne vertébrale ou le col fémoral).

### **II-2 Etudes écologiques**

La mise en évidence d'une distribution géographique mondiale différentielle de l'incidence de l'ostéoporose est à l'origine de l'hypothèse du rôle protecteur des phyto-estrogènes, puisque la forte consommation de produits dérivés du soja (source importante de phyto-estrogènes) dans les pays asiatiques (où la pathologie est peu représentée) a été incriminée pour expliquer cette disparité.

Les études écologiques recensent effectivement une moindre incidence des fractures ostéoporotiques chez les Asiatiques (Ross 1991 ; Fujita 1992 ; Dennison 1998 ; Iki 2001). Une étude descriptive conduite sur 2113 femmes à Beijing (Chine) montre que la prévalence de fractures vertébrales serait de 5% dans la tranche d'âge des 50-59 ans et atteindrait 37% chez les femmes de plus de 80 ans, données très inférieures aux références établies pour la population caucasienne (Ling 2000). En fait, cette différence pourrait être expliquée par une vitesse de perte osseuse plus faible (0,74% chez la Japonaise ménopausée (Tsunenari 1995) contre, chez la femme caucasienne, 1,5-2,3% dans les 2 années consécutives à la ménopause et 1,2% après 5 ans) (Nilas 1988, Harris 1992 ; Lukey 1996 ; Young 1996 ; Pouilles 1995).

D'autre part, l'occidentalisation des mœurs, reflétant une réduction de la consommation des plats traditionnels à base de soja, se traduit par un nivellement de ces données au Japon (Hadfield, 1995). Une tendance similaire a été démontrée à Hong-Kong où le taux de fractures de la hanche pour la tranche des 70-79 ans (valeur pour 100 000 habitants) de 173 en 1966 atteignait 581 en 1991 (chiffre non expliqué par la seule évolution démographique) (Lau 1996).

Pour expliquer cette inégalité devant la pathologie, le principal élément discriminant ayant été avancé est la plus forte consommation de phyto-estrogènes dans les pays orientaux (Kleijn 2001 ; van Erp-Baart 2003). Dans une telle situation multifactorielle, il est toutefois difficile d'établir un lien de causalité unique. On ne peut effectivement exclure l'implication de prédispositions génétiques, une morphologie différente du squelette (avec notamment une valeur de l'axe fémoral plus courte offrant probablement une meilleure résistance à la fracture). S'y associent également des habitudes de posture anatomique différentes, une activité physique vraisemblablement plus importante et une meilleure hygiène alimentaire assurant une plus forte consommation de vitamine D (très concentrée dans les poissons gras) impliquée dans la régulation de l'absorption intestinale du calcium, de vitamine K (élaborée lors du procédé de fermentation du tofu) nécessaire à l'activité biologique de l'ostéocalcine. Enfin, parmi les facteurs confondants potentiels, il ne faut pas oublier la consommation importante de fruits et légumes dont on connaît les propriétés alcalinisantes, anti-oxydantes et anti-inflammatoires nécessaires à l'épargne calcique.

En tout état de cause, on ne peut revendiquer des propriétés ostéoprotectrices sur la seule base de ces études écologiques, d'autant plus que les procédures d'enregistrement et de gestion des patients peuvent différer considérablement d'un pays à l'autre. En fait, le deuxième critère à considérer est l'existence éventuelle d'association entre le niveau de consommation de phyto-estrogènes et le capital osseux, mise en évidence dans le cadre d'études épidémiologiques analytiques ou d'études d'intervention.



## II-3 Etudes d'épidémiologie analytique (tableau 1)

Onze études d'observation (dont trois non retenues et de ce fait non présentées dans le tableau 1)) ont à ce jour été publiées, auxquelles il faut ajouter 4 études non prises en considération dans cette revue car seul le résumé était actuellement disponible. De l'analyse critique de ces travaux, il ressort une disparité importante en termes d'ethnie, il s'ensuit donc des écarts importants quant aux niveaux relatifs de consommation de phyto-estrogènes et les aliments source. A ce titre, la méthodologie d'investigation des apports alimentaires diffère (questionnaires de fréquences alimentaires, pesées, voire dosage des phyto-estrogènes dans les fluides biologiques) et cible soit la consommation actuelle ou usuelle. A ceci, il faut ajouter un niveau de complexité supplémentaire si l'on considère la diversité des caractéristiques physiologiques des populations étudiées (âge, statut hormonal : préménopause/postménopause), ainsi que des paramètres mesurés (marqueurs du métabolisme osseux, densité minérale osseuse). En outre, la taille de l'échantillon étudié et la durée d'investigation restent très variables, ainsi que les facteurs confondants potentiels considérés (pour revue : Branca, 2003 ; Setchell 2003).

### II-3-1 Données chez la femme non ménopausée

Dans l'étude d'observation conduite par Mei (2001) sur 298 **femmes chinoises** non ménopausées basées à Hong-Kong (âge moyen :  $37,5 \pm 9,4$  ans), il n'existe pas de relation évidente entre la consommation de phyto-estrogènes évaluée par questionnaire de fréquence alimentaire en intégrant les isoflavones, les lignanes et le coumestrol et la densité minérale osseuse. A l'inverse, dans une étude de 3 ans portant sur 132 femmes chinoises vivant à Hong-Kong (analyse sur 116 sujets), âgées de 30 à 40 ans, l'analyse par régression linéaire multiple indique que la consommation d'isoflavones (évaluée par questionnaire de fréquences alimentaires) explique 12.8 % de la variance des taux de DMO (Ho 2001).

**En ce qui concerne les femmes occidentales**, les études de Di Leo (2002) et de Kaadinaal (1998) n'ont pas été retenues car portant sur un nombre trop restreint de volontaires (30 et 67 femmes, respectivement). Il en est de même pour l'investigation de Horiuchi (2000) conduite sur une population japonaise dans laquelle l'évaluation de la consommation était insuffisante car basée uniquement sur la méthode des pesées sur 3 jours).

### II-3-2 Données chez la femme au cours de la périménopause

Dans l'étude de Yokohama city (Tsuchida 1999), réalisée sur 995 **femmes japonaises** âgées de 40 à 49 ans, la mesure périphérique de la DMO au niveau du deuxième métacarpe reflète l'existence d'un gradient indépendant de la consommation d'isoflavones, après ajustement ou non sur l'âge et les apports calciques hebdomadaires.

Dans une étude portant sur une cohorte de 3302 **Américaines** âgées de 42 à 52 ans, représentative de quatre ethnies différentes (caucasienne :  $n=1003$ , noir-américaine :  $n=497$ , japonaise :  $n=227$  et chinoise :  $n=200$ ), Greendale (2002). Les apports des deux premières populations étaient trop faibles pour être analysés (exposition estimée par questionnaire de fréquence alimentaire :  $0,5 - 1,4$  mg/j). Aucune association avec la DMO n'a pu être mise en évidence chez les Chinoises dont la moyenne des apports était de  $5,8$  mg/j +/-  $6,7$ . A l'inverse, pour les japonaises dont la consommation moyenne quotidienne atteignait  $10,9$  +/-  $10,2$  mg, un effet dose-réponse était observé (DMO vertébrale et fémorale supérieure de respectivement 7,7% et 12% dans le plus haut tertile) chez les femmes non ménopausées, mais pas en situation de périménopause.

### II-3-3 Données chez la femme ménopausée

#### II-3-3-1 Population multi-ethnique

Dans le cadre d'une étude portant sur 208 femmes ménopausées âgées de 47 à 74 ans, vivant en Californie du sud et issues de divers groupes ethniques (race blanche, hispanique, asiatique, amer-indienne et noire), Kritz-Silvertein (2002) suggèrent un effet protecteur de la consommation d'isoflavones (estimée par un questionnaire de fréquence de consommation

alimentaire de soja portant sur l'année précédente et se situant entre 0 et 4.36 mg/j pour la génistéine). En effet, les volontaires ayant les apports les plus forts avaient des taux de NTX, un marqueur de résorption, de 18% inférieurs ( $p=0.01$ ). L'analyse multivariée montre que le NTX tend à diminuer de 5 % pour un apport de 100mg d'isoflavonoïdes totaux ( $p=0,09$ ). Un effet indépendant positif sur la DMO vertébrale est également observé, toutefois avec un coefficient très faible (0.001%,  $p=0,07$ ).

### II-3-3-2 Population asiatique

Chez 357 femmes ménopausées chinoises vivant à Hong-Kong (Mei 2001), après ajustement des résultats sur l'âge, le poids, le traitement hormonal substitutif, les apports calciques (en l'occurrence supérieurs dans le groupe consommant le plus de phyto-estrogènes)..., il ressort que les femmes ayant la plus forte ingestion d'isoflavones (tertile : 47 mg/j) ont aussi une DMO supérieure, que ce soit au niveau vertébral ( $0,820 \pm 0,145$  vs  $0,771 \pm 0,131$  g/cm<sup>2</sup>,  $P<0,05$ ) ou fémoral ( $p<0,05$ ), par rapport aux plus faibles consommatrices. Cet effet résulterait probablement d'un ralentissement du remodelage osseux, comme l'indique la réduction des marqueurs d'accrétion et de résorption. De même les taux plasmatiques en parathormone étaient plus faibles.

Dans la cohorte de 478 Japonaises ménopausées conduite par Somekawa (2001), le niveau de consommation quotidien moyen était estimé à 54,3 mg. La DMO vertébrale (L2-L4) était significativement différente ( $p<0,01$ ) dans le plus haut quartile, après ajustement pour les années consécutives à la ménopause et le poids. Cette constatation était vérifiée aussi bien chez les femmes en début de ménopause que chez les plus âgées.

Dans l'étude réalisée chez 75 femmes coréennes âgées de 52 à 65 ans, et ménopausées depuis environ 7 ans, la mesure des phyto-estrogènes par GCMS indique que l'excrétion urinaire d'entérolactone (témoin de consommation) est inférieure à celle en daïdzéine, contrairement aux données chez les occidentales (Kim 2002). Les taux d'entérolactone sont plus faibles chez les volontaires souffrant d'ostéoporose et la DMO vertébrale, fémorale, et au niveau du triangle de Ward, est positivement corrélée avec les taux d'entérolactone (mais négativement avec l'apigénine). Cependant cette corrélation disparaît dans l'analyse multivariée (contrairement à l'apigénine).

En revanche, dans une étude transversale sur 87 Japonaises ménopausées, aucune association n'a pu être mise en évidence entre les paramètres osseux (la DMO périphérique au niveau du calcaneum, et phosphatase alcaline osseuse) et la consommation d'isoflavones estimée à partir d'un questionnaire de fréquence alimentaire (62 g/j de produits à base de soja, soit  $32 \pm 17.2$  mg/j d'isoflavones en moyenne) et la mesure des taux sériques de génistéine et daïdzéine par HPLC MS/MS (respectivement : 414 et 162 nmol/l, en moyenne) (Nagata 2002). 45 femmes n'étaient pas productrices d'équol.

**Pour résumer**, il ressort de l'ensemble de ces études d'observation qu'il est difficile de mettre en évidence une relation évidente entre le niveau de consommation de phyto-estrogènes (en général évalué par un questionnaire de fréquences alimentaires) et la qualité du squelette (généralement extrapolée à partir de la mesure de marqueurs du métabolisme osseux ou de la DMO) chez la femme adulte. Il en est de même pour la phase de périménopause. En revanche, chez la femme ménopausée, exceptées les données publiées par Nagata (2002) qui, il est vrai, portent sur une analyse périphérique de la masse osseuse alors que les atteintes pathologiques ciblent en principe la colonne vertébrale, une protection par ces molécules est plus souvent retrouvée. Cependant les effets sont faibles, souvent marginalement significatifs et portent sur des marqueurs qui ne reflètent pas réellement le risque de fracture ostéoporotique (rapport OMS, European Nutrition conference, Rome, 2003). De plus, un certain niveau d'apport est nécessaire, comme le démontrent notamment les études portant sur plusieurs ethnies. Certes, la qualité des aliments diffère également puisque les phyto-estrogènes consommés par les populations occidentales sont essentiellement de type lignanes, alors que les isoflavones sont majoritairement représentées dans l'alimentation asiatique. Il est possible également qu'il existe des fenêtres

d'exposition (fonction de l'âge) qui soient déterminantes pour l'effet biologique de ces molécules (cas d'une exposition précoce ?).

## **II-4 Etudes cliniques**

Schématiquement, on distingue les études cliniques par les objectifs visés. Effectivement, la conduite d'un essai clinique sur une durée inférieure à 6 mois (au minimum) ne permet pas d'appréhender l'impact des nutriments ou molécules sur la densité minérale osseuse. Dans ce cas, les critères principaux de jugement sont restreints aux marqueurs du remodelage osseux qui reflètent uniquement une orientation métabolique à un instant donné. A l'inverse, une supplémentation d'au moins 6 mois autorise l'évaluation des paramètres de masse osseuse.

En fait, l'essentiel des données bibliographiques disponibles actuellement correspondent à des études de courte durée (3, 6, 12 mois). Seuls Lydeking-Olsen (2002) et Vitolins (2002) ont conduit une étude d'intervention sur 2 ans. Toutefois, les résultats ne sont toujours disponibles que sous forme de résumé, ce qui implique de déroger à la règle visant à ne considérer que les articles édités dans une version intégrale, d'autant plus que le premier travail ouvre des perspectives intéressantes reposant sur le concept de bons/mauvais répondeurs (identifiés par leur capacité à produire ou non de l'équol). Il est évident que de telles approches expérimentales ne permettent pas d'évaluer l'impact des phyto-estrogènes sur le risque fracturaire, critère ultime de la qualité du squelette, qui implique de conduire le traitement sur une durée encore plus longue, ainsi que sur une cohorte très importante, de façon à pouvoir diagnostiquer un nombre suffisant de cas. Enfin, les études prospectives ayant pour objectif l'investigation du rôle de l'ipriflavone, molécule de synthèse dont un des métabolites a une formule chimique analogue à celle de la daïdzéine ne sont pas décrites dans ce document (voir pour revue Scheiber MD & Rebar RW, 1999).

### **II-4-1 Etudes ciblant les marqueurs du métabolisme osseux**

A l'heure actuelle, 17 études d'intervention ayant évalué l'influence d'une supplémentation (à court terme) sur les marqueurs du métabolisme osseux ont été publiées, dont 5 résumés non pris en compte dans cette analyse. Il est intéressant de remarquer que ces essais cliniques résultent de l'engouement récent pour les phyto-estrogènes puisque, excepté pour deux d'entre elles, la date de publication est ultérieure à 2000 (incluse).

**En terme de méthodologie**, les deux premières études recherchant l'impact de la consommation de soja (soit 74 mg/j d'isoflavones pendant 3 mois ; Murkies 1995) ou d'isolats protéiques de soja (soit 34 mg/j d'isoflavones pendant 1,5 mois ; Washburn 1999) sur le métabolisme osseux ne doivent pas être considérées car seuls des marqueurs non spécifiques du métabolisme osseux ont été dosés (hydroxyproline et phosphatase alcaline).

En fait, la majorité des essais cliniques publiés ultérieurement n'ont pas mis en évidence d'effet significatif de telles stratégies de supplémentation à court terme sur les paramètres du remodelage (voir tableau 2). Tel est le cas notamment des données rapportées par Scambia (2000), selon lesquelles un apport journalier équivalent à 50 mg d'isoflavones pendant 1,5 mois, chez 39 femmes ménopausées suivant un protocole randomisé en cross-over, n'était pas associé à une modification de l'ostéocalcémie. De même, Wangen (2000) considèrent que les variations de la phosphatase alcaline osseuse, de l'ostéocalcine (témoins de l'activité ostéoblastique), de la DPD ou du CTX (reflétant la résorption) ou encore d'un facteur de croissance (l'IGF1) et de sa protéine vectrice (IGFBP 3), après consommation d'isolats protéiques apportant quotidiennement pendant 3 mois 8, 65 ou 130 mg d'isoflavones, n'atteignent pas un niveau de signification clinique. Etude conduite chez des femmes Nord-Américaines ménopausées (n=14) ou non (n=17). A l'identique, dans l'étude multicentrique de Upmalis (2000), aucune modification significative des teneurs sériques en ostéocalcine ou de l'excrétion urinaire de NTX (molécule issue de la dégradation du collagène) n'a pu être induite par 3 mois de supplémentation avec des extraits d'isoflavones (50 mg/j de génistéine). Plus récemment, Dalais (2003) ont obtenu des résultats également non significatifs relatifs à l'excrétion urinaire de pyridinoline et de DPD, chez 106 femmes

ménopausées supplémentées ou non pendant 3 mois. Lucas (2002) n'ont pas eu de données plus probantes avec une distribution de graines de lin (40g/j ; étude randomisée chez 36 femmes ménopausées sur 3 mois), en termes de DPD urinaire ou d'IGF1 et d'IGFBP3. Enfin, dans le cadre d'un essai randomisé contre placebo (protéines de lait), Khalil (2002), ont distribué 40g de protéines de soja à 64 hommes (dont 16 avaient plus de 65 ans) pendant 3 mois, sans induire de modification du niveau d'accrétion (phosphatase alcaline osseuse) ni de résorption (DPD). Néanmoins, les taux sériques d'IGF1 étaient augmentés dans les 2 groupes, et ceci de façon plus importante avec le régime soja.

En revanche, 3 études ont mis en évidence une évolution positive des indicateurs de résorption après traitement. En effet, selon une approche contrôlée randomisée de 1 mois chez 33 femmes âgées de (40 à 62 ans) en périménopause, Uesugi (2002) ont observé une réduction de la DPD (et de la pyridinoline) chez les sujets ayant consommé quotidiennement 61,8 mg d'isoflavones. Il en est de même chez 20 femmes ménopausées japonaises (émigrées au Brésil) ayant reçu pendant 2,5 mois des germes de soja apportant journalièrement 37,3 mg d'isoflavones: diminution des teneurs urinaires en DPD et pyridinoline par rapport au groupe placebo (n=20) (Yamori 2002). Arjmandi (2003), selon un protocole identique à celui développé par Khalil, ont aussi obtenu une réduction de la DPD chez des femmes ménopausées (cohorte totale de 71 volontaires) ayant consommé 40g de protéines de soja pendant 3 mois, uniquement chez les volontaires n'étant pas sous hormonothérapie substitutive. Une augmentation des teneurs plasmatiques en IGF1 était également observée. Mais cette étude est biaisée par le nombre important d'abandons (41%).

La seule étude démontrant un impact simultané sur les deux activités métaboliques du squelette (formation et résorption) est celle conduite par Scheiber (2001) chez 42 femmes ménopausées pendant 3 mois. Après consommation d'aliments à base de soja fournissant quotidiennement 60 mg d'isoflavones, une diminution de l'ordre de 13,9% de l'élimination urinaire de NTX était induite (l'effet étant plus marqué (26%) chez les personnes initialement en phase de résorption accrue (NTX basal > 50 nmol/mmol créatinine), associée à une augmentation de 10,2% de l'ostéocalcinémie. Toutefois, le protocole n'a pas été considéré comme valide du fait de l'absence de randomisation.

Enfin, il faut aussi mentionner l'étude de Zitterman (2004) conduite selon un schéma croisé chez 40 jeunes femmes (âge moyen :  $24 \pm 0,1$  ans) qui ont reçu quotidiennement pendant un cycle menstruel, soit des biscuits apportant l'équivalent de 52 mg d'isoflavones, soit un aliment placebo, une interruption de deux mois étant respectée entre les deux périodes expérimentales. Une augmentation du rapport C-télopeptide (marqueur de résorption) sur ostéocalcine était observée en milieu de phase lutéale, reflétant un découplage des activités de résorption et d'accrétion.

**Pour résumer**, il est difficile de conclure à une action protectrice des phyto-estrogènes sur le métabolisme osseux car, lorsqu'un effet est observé, il est souvent marginal, donc de signification clinique incertaine. Ces études ne reflètent qu'une activité métabolique ponctuelle, non représentative du capital osseux en termes qualitatif ou quantitatif.

#### **II-4-2 Etudes ciblant la densité minérale osseuse**

**En terme de méthodologie**, l'étude décrite par Hsu (2001) portant sur 37 femmes ménopausées recevant 150 mg/j d'isoflavones, n'a pas été retenue du fait du faible effectif. Il en est de même, pour l'essai clinique croisé, randomisé, conduit en double aveugle contre placebo sur 52 femmes ménopausées par Dalais (1998) car portant sur l'os ancillaire et aboutissant à des résultats tout à fait improbables en terme d'amplitude de variation du contenu minéral osseux (5,2% en 3 mois de consommation). Enfin, le protocole développé par Clifton-Bligh (2001) (chez 46 femmes ménopausées ayant reçu quotidiennement pendant 6 mois 28,5 mg, 57 mg ou 85,5 mg d'isoflavones extraites à partir d'une préparation de trèfle rouge) n'a pas été considéré du fait de l'absence de contrôle simultané.

Les études sont présentées selon un ordre chronologique.

Historiquement, Potter (1998) ont été les premiers à mettre en évidence une augmentation du contenu minéral osseux (CMO) et de la DMO au niveau vertébral, après consommation quotidienne de 40 g d'isolats protéiques de soja pendant 6 mois (apportant 90 mg/j d'isoflavones, alors que la dose de 56 mg était inefficace), dans le cadre d'une étude randomisée contre placebo (40 g de caséine), conduite en double aveugle chez 66 femmes ménopausées hypercholestérolémiques (entre 6,21 et 7,76 mmol/l). Toutefois, un biais expérimental important peut être démontré car les volontaires randomisées présentaient une DMO basale différente. Ainsi, la valeur initiale de ce paramètre, exprimée en g/cm<sup>2</sup> était de 0,892 ± 0,114 chez les femmes ayant reçu la dose « efficace » contre 0,971 ± 0,145 et 0,940 ± 0,159 pour les groupes faible dose et placebo, excluant une comparaison inter-groupe. La valeur atteinte après traitement (0,912 ± 0,119) reste inférieur ou équivalente au niveau basal évalué chez les témoins. Mais, elle correspond néanmoins à une augmentation significative intra-groupe (2,2%), alors qu'une diminution est observée dans le groupe placebo.

De l'étude randomisée, double aveugle, contre placebo, mise en place chez 69 femmes en péri-ménopause (âge moyen 50,6 ans) par Alekel (2000), il ressort que la consommation quotidienne de 40 g de protéines de soja riches en isoflavones (80,4 mg aglycones), pendant 6 mois, permet d'atténuer la perte osseuse liée à la ménopause au niveau lombaire. Cependant, la comparaison intergroupe après ajustement pour toutes les covariables, montre que seule la différence sur le CMO entre la valeur à l'origine et après 6 mois est significativement différente de celle du groupe témoin.

Enfin, dans l'étude italienne Chiechi (2002) randomisée de 6 mois réalisée chez 187 femmes ménopausées, la baisse de la DMO démontrée chez les volontaires du groupe témoin était évitée chez les personnes sous hormono-thérapie substitutive, ainsi que chez celles ayant consommé le régime soja apportant 47 mg/j d'isoflavones. En outre, l'ostéocalcine sérique était accrue dans le groupe recevant les 47mg d'isoflavones.

Dans l'étude randomisée contre placebo conduite en double aveugle par Kreijkamp-Kaspers (2004), la distribution quotidienne de 25,6 g de protéines de soja (apportant 99 mg d'isoflavones aglycones) pendant 1 an à des femmes ménopausées de 60 à 75 ans, n'a pas exercé d'effet significatif sur la densité minérale osseuse, que ce soit au niveau vertébral ou fémoral. Toutefois, aucune déminéralisation n'a été observée dans le groupe témoin. Il est par conséquent probable que les volontaires avaient dépassé la phase de perte accélérée. Il est donc difficile de visualiser des modifications en une si courte période.

Les seuls travaux rapportant les effets d'une intervention chez une population asiatique sont les suivants : dans un essai randomisé mené en double aveugle, contre placebo, 203 Chinoises ménopausées depuis moins de 10 ans (âgées de 48 à 62 ans) ont reçu pendant 1 an soit un régime placebo (1 g d'amidon), soit une alimentation apportant 0,5 g d'amidon et 0,5 g d'extraits de soja fournissant l'équivalent de 40 mg ou 80 mg d'isoflavones (Chen 2003). De plus, 500 mg de calcium et 125 IU de vitamine D étaient distribués quotidiennement à toutes les volontaires. La consommation spontanée de soja a été estimée par questionnaire de fréquence alimentaire mais celle d'isoflavones n'est pas rapportée. En revanche, la valeur de 20 mg est évoquée en référence à la littérature. Une analyse de régression multiple indique que la plus forte dose a exercé une modulation favorable sur l'évolution du CMO au niveau de la hanche et du trochanter. Une analyse stratifiée révèle que cet effet n'est observé que chez les sujets ayant une valeur basale faible.

Les seules interventions menées sur 2 ans correspondent, d'une part, au travail publié (uniquement sous forme de résumé) par Lydeking-Olsen (2002). 108 femmes ménopausées ont bu quotidiennement 500 ml de lait de soja, riche en isoflavones (85 mg/j en équivalents aglycones), ou dépourvu de phyto-estrogènes (<1 mg/j). En fait, une ostéopénie de l'ordre de 4,2% et 4,3%, en terme de DMO et CMO, était observée dans le groupe placebo. En revanche, une augmentation de 1,1% et 2,2%, respectivement de ces paramètres était identifiée avec la consommation d'isoflavones, sans toutefois atteindre un niveau significatif. Néanmoins, si une analyse stratifiée sur la capacité ou non de synthétiser de l'équol était

pratiquée, une augmentation significative de 2,4% était alors décelée chez les producteurs, contre -0,6 chez les non producteurs.

D'autre part, dans l'étude conduite par Vitolins (2002) chez la femme ménopausée (également disponible uniquement sous forme de résumé), 25 g de protéines de soja (dont les teneurs en isoflavones étaient respectivement de 5, 42 et 58 mg) ont été administrées quotidiennement pendant 2 ans. Un effet protecteur au niveau de la DMO totale a été identifié, indépendamment de la teneur en isoflavones.

A l'inverse, la réelle démonstration des effets osseux intrinsèques des phyto-estrogènes chez la femme ménopausée est issue des travaux de Morabito (2002). Dans une étude randomisée, menée en double aveugle contre placebo pendant un an chez 90 femmes ménopausées de 47 à 57 ans, la génistéine (54 mg/j, n=30) a été comparée au traitement hormonal substitutif (1 mg de 17 $\beta$ -estradiol et 0,5 mg d'acétate de noréthistérone, n=30), ou à l'absence d'intervention (groupe placebo, n=30). La consommation de génistéine a été associée à une réduction significative de l'excrétion urinaire en déoxypyridinoline, aussi bien à 6 mois (-55  $\pm$  13%), qu'à 12 mois (-44  $\pm$  16%). De plus, une augmentation des indicateurs de l'activité ostéoblastique était démontrée aux deux périodes expérimentales (valeurs à 12 mois, ostéocalcine : 37  $\pm$  16%, phosphatase alcaline osseuse : 25  $\pm$  7%), avec un coefficient significatif de 43% dans l'analyse multivariée. Une augmentation de la DMO était aussi identifiée, aussi bien au niveau lombaire (3  $\pm$  2%, contre 3,8  $\pm$  2,7% pour le THS), que fémoral (3,6  $\pm$  3%, contre 2,4  $\pm$  2% pour le THS). On peut cependant s'interroger sur l'importance de ces variations.

Enfin, la seule étude disponible chez la jeune femme (âge moyen : 21-25 ans) conduite sur un an (supplémentation quotidienne 160 mg isoflavones / j) par Anderson (2002) n'a pas été retenue car l'effectif est très faible et les apports calciques des groupes expérimentaux différents.

Une analyse critique de ces études d'intervention révèle des conditions expérimentales parfois discutables (voir pour revue l'article publié par Valtuena (2003) en ce qui concerne les règles générales pour la mise en place d'études d'intervention ciblant les effets osseux des phyto-estrogènes). A titre d'exemple, dans les groupes placebo, les protéines de soja sont classiquement remplacées par de la caséine, dont le potentiel acidifiant peut éventuellement exacerber l'ostéopénie liée à la carence hormonale, à l'inverse des protéines de soja qui sont plutôt alcalinisantes (et évitent la mobilisation du calcium à partir du squelette pour le maintien de l'homéostasie électrolytique).

En outre, l'extrapolation des résultats et concepts établis à partir d'essais cliniques est très difficile car en aucun cas une telle approche ne reflète les conditions d'une exposition à l'échelle d'une vie. En fait, elle fait aussi abstraction d'un éventuel effet « programming », principe selon lequel il est possible qu'une intervention précoce soit indispensable, par rapport à une prise en charge initiée seulement en période de ménopause. De plus, il est certain que les conditions expérimentales diffèrent considérablement des habitudes alimentaires des Asiatiques, et pratiquement aucune des études ne prend en considération les éventuelles interactions alimentaires.

**En résumé**, la modulation des marqueurs du remodelage osseux par le soja (ou les protéines de soja, voire les isoflavones) est très controversée. Toutefois, lorsqu'un effet est observé, il concerne majoritairement la vitesse de résorption (diminution de l'excrétion urinaire des produits issus du catabolisme du collagène), plutôt qu'une stimulation de l'accrétion. Il est vrai que ces études correspondent à une imprégnation très courte (entre 1 et 3 mois). A l'inverse, l'impact osseux d'une stratégie à plus long terme (entre 6 et 24 mois) montre une tendance d'effet positif mais des biais expérimentaux importants sont parfois identifiés et la taille des groupes expérimentaux souvent réduite). Il dépend de la dose et la réponse est site spécifique. Ainsi, si la modulation des critères de masse osseuse sont indicatives, les données relatives à la modulation des paramètres de remodelage sont très difficilement exploitables. De plus, si l'on considère que le critère ultime de la qualité du squelette est le risque fracturaire, il est évident qu'il est prématuré de conclure sur les effets

des phyto-estrogènes en terme de prévention de l'ostéoporose car aucune donnée n'est actuellement publiée utilisant ce critère.

### **III- Etudes chez l'animal**

Si la littérature relatant l'investigation des phyto-estrogènes sur la sphère osseuse par le biais d'essais d'observation ou d'intervention est peu étoffée, l'approche basée sur l'expérimentation animale est bien documentée et a été analysée récemment (Coxam, 2003). Par rapport aux études *in vitro*, elle a l'avantage d'intégrer la physiologie dans son ensemble et notamment la complexité des interactions cellulaires. De plus, elle prend en compte la biodisponibilité de ces molécules, notion à considérer pour leur efficacité.

Enfin, de telles études, tout en respectant les règles de l'éthique, permettent de mettre en place des outils analytiques invasifs tels que la mesure post-mortem des propriétés biomécaniques fémorales, unique indicateur disponible de la qualité du squelette.

Cela dit, même si les données issues de l'expérimentation animale sont très indicatives d'un phénomène ou principe, il convient de rester prudent dans l'extrapolation à l'homme, la principale limite résultant du concept d'une perturbation unique du métabolisme (exemple pratique de la castration), alors que le vieillissement correspond à un processus multifactoriel extrêmement complexe.

#### **III- 1 Modèles expérimentaux**

Bien que la déplétion ovocytaire induite par le vieillissement soit constante chez tous les mammifères, la ménopause ne survient que chez les primates. Hormis ceux-ci, il n'existe donc aucun modèle animal reproduisant parfaitement les conditions physiologiques post-ménopausiques. Néanmoins, plusieurs espèces sont utilisées avec plus ou moins de succès puisqu'un modèle animal d'ostéoporose post-ménopausique adapté doit présenter une perte osseuse après arrêt spontané ou induit de l'activité ovarienne et, par suite, des caractéristiques biochimiques, ainsi que des conséquences physiologiques et pathologiques analogues à celles survenant chez la femme ménopausée. Dans ce contexte, le rat est classiquement l'animal de choix pour étudier la régulation de la physiologie osseuse. Cependant, même si selon les recommandations de la FDA (1994) toutes les thérapies anti-ostéoporotiques doivent être testées sur le modèle rongeur, il n'en reste pas moins qu'il s'agit d'un quadrupède dont les contraintes mécaniques sont différentes et qu'à l'inverse du squelette humain son tissu osseux cortical n'est pas organisé en système haversiens. En outre, il est certain que la rate suffisamment alimentée ne présente pas d'ostéopénie de vieillissement (Hansard 1957) et que, chez cet animal, la soudure des cartilages épiphysaires est très tardive (croissance continue sur toute sa vie (Kimmel) 1991). Enfin, l'ovariectomie n'induit jamais l'apparition de fractures chez la rate (Kalu 1989). Néanmoins, malgré ces limitations, le rat reste le modèle préconisé pour étudier l'ostéoporose postménopausique (Kalu 1989 ; Kalu 1991, 1999), notamment pour des approches endocriniennes impliquant les estrogènes (Wronski 1989 et 1991).

La rate ovariectomisée (OVX) a ainsi été la plus utilisée pour l'étude du potentiel ostéoprotecteur des phyto-estrogènes (Omi 1992, 1994 ; Blair 1996 ; Arjmandi 1996, 1998a, 1998b ; Drapper 1997, Fantini 1998 ; Ishida 1998 ; Horcajada-Molteni 2000 ; Picherit 2000). Il est vrai qu'un effet bénéfique de la génistéine a également été décrit chez la rate lactante castrée (Anderson 1998), ainsi que chez la rate âgée (Gao 1998), ou la souris privée de ses ovaires (Ishimi 1999). Les résultats issus de ces études restent cependant difficilement extrapolables à la femme pour des raisons de biodisponibilité. Le rat est effectivement un excellent producteur d'équol, molécule qui bénéficie d'un métabolisme particulièrement favorable et dont les effets biologiques sont supérieurs à ceux des autres isoflavones. En revanche, en ce qui concerne la situation humaine, seulement 30% de la population occidentale est capable de synthétiser cette molécule, ce qui suppose une moindre efficacité chez les 2/3 des personnes.

A l'opposé du modèle rongeur, la consommation de 28 mg/j d'isoflavones pendant 2 ans n'a pas amélioré les paramètres osseux de la guénon en ménopause chirurgicale (Jayo 1996).

De la même façon, chez le singe cynomolgus ovariectomisé, les travaux de Lees (1998) ont permis de montrer que la consommation de protéines de soja (fournissant pendant 7 mois l'équivalent d'une dose quotidienne de 148 mg d'isoflavones chez la femme) ne prévient pas l'accélération du remodelage, le seul effet induit étant une faible augmentation de l'accrétion au niveau de la surface endocorticale. Il est donc probable que le modèle simien ne soit pas adapté pour l'étude de ces molécules, vraisemblablement faute de sensibilité, puisqu'un dosage similaire à celui utilisé chez la femme ménopausée reste inefficace.

### III-2 Molécules d'intérêt

Les études portant sur les médecines traditionnelles chinoises ne sont pas considérées car, même si elles sont préparées à partir de plantes riches en phyto-estrogènes, la composition en "principes actifs" n'est jamais précisée. De plus, il est difficile d'accéder à ces données, ce qui empêche une analyse exhaustive.

#### III-2-1 Isoflavones

**Soja.** Dès 1988 l'équipe Kalu suggérait que la potentialisation de l'absorption intestinale calcique, associée à une modulation de l'hormone parathyroïdienne, pouvait expliquer au moins partiellement les effets bénéfiques de la consommation de soja sur le capital osseux. En 1992, l'équipe d'Omi a décrit le lait de soja comme un excellent aliment pour la préservation du capital osseux de la rate ovariectomisée (évalué par la mesure de la densité minérale et des propriétés biomécaniques). Cependant, comme les mécanismes impliqués restaient obscurs, notamment en termes de principe actif, ils ont renouvelé l'expérimentation en administrant deux préparations de lait de soja distinctes par leur poids moléculaire (haut et faible poids moléculaire incluant les peptides). Des résultats analogues ont été obtenus, pouvant à nouveau être expliqués par une augmentation de l'absorption intestinale. En revanche, la molécule d'intérêt n'a pu être identifiée (Omi 1994). Plus récemment, Arjmandi (2002) ont confirmé l'amélioration de la biodisponibilité du calcium chez la rate castrée consommant du soja contenant des isoflavones.

**Protéines de soja.** En 1996 Arjmandi ont évité la perte osseuse consécutive à la castration en distribuant pendant 30j un isolat de protéines de soja (22,7%) à des rates de 90j, tandis que le groupe placebo recevait de la caséine. Selon une approche similaire chez des animaux âgés de 1 mois recevant 22% de protéines de soja, Harrison (1998) ont aussi obtenu une augmentation du poids de cendres et du contenu calcique fémoral et tibial, sans toutefois aucune modulation du remodelage.

**Isoflavones de soja.** En fait, il s'avère que ce sont effectivement les isoflavones qui sont dotées de cette capacité d'épargne squelettique. En effet, dans une expérimentation conduite chez des rates de 95j recevant pendant 1 mois des protéines de soja (à raison de 22,7% dans le régime) contenant des isoflavones (génistine : 1462, génistéine : 25.1, daïdzine : 590 ; daïdzéine : 11.3 mg / kg isolat protéique) ou dépourvues d'isoflavones (moins de 10%), seuls les animaux ayant consommé les protéines non déplétées en phyto-estrogènes ( $1.497 \pm 0.03 \text{ g / cm}^3$ ) avaient une densité minérale supérieure à celle des témoins castrés ( $1.449 \pm 0.044$ ) (Goyal 1995 ; Arjmandi 1998). Ces résultats ont été confirmés plus récemment par le travail de Jeffery (2000), qui ont traité des rates pendant 3 mois avec de la caséine enrichie en isoflavones, ou avec des protéines de soja, ou encore avec des protéines de soja dépourvues d'isoflavones. Néanmoins, Juma (1996) ont démontré une protection contre la perte d'élasticité induite par orchidectomie chez des rats de 90j par la consommation de soja pendant 65j, ceci quel que soit le contenu en isoflavones.

Des extraits d'isoflavones (348 mg isoflavones /g ; génistine 159 mg, daïdzine 156 mg, glycitine 33 mg) ont également été testés pour leurs vertus ostéoprotectrices aux doses de 20, 40 ou 80 mg/kg pendant 3 mois chez des rates de 195j (Picherit 2001a,b). Un tel régime a permis de prévenir l'installation d'une ostéopénie lors du développement d'une carence hormonale. En revanche, contrairement aux travaux de Arjmandi (1998), une stimulation de l'activité ostéoblastique, révélée par une augmentation de l'ostéocalcémie, était mise en jeu.



Cet effet dépend probablement de la qualité des isoflavones car l'essai de Drapper (1997) basé sur l'administration d'isoflavones isolées du trèfle (25g d'isoflavones incorporées dans 10 kg d'aliment) pendant 6 semaines à des rates OVX de 6 mois a échoué. Il est vrai que la biochanine A et la formononétine (les principales isoflavones du trèfle) ont un potentiel inférieur de 0,006% et 0,0006%, respectivement, à celui de l'estradiol sur l'activité phosphatase alcaline de cellules endothéliales humaines, par rapport à 0,084% pour la génistéine, 0,061% pour la daïdzéine et 0,202% pour le coumestrol (Markiewicz 1993).

Génistéine, daïdzéine, glycitéine. Les rates OVX lactantes nourries avec une alimentation relativement pauvre en calcium et recevant une préparation d'isoflavones de soja riche en génistéine (0,5-1,6 ou 5 mg/j) pendant 14j maintenaient plus efficacement leur masse osseuse que les animaux castrés sous régime témoin ainsi que chez ceux traités par une dose physiologique d'estrogènes conjugués (Prémairine ; 5 µg/j) (Anderson 1995, 1998). Les molécules purifiées ont également été étudiées. En effet, la génistéine administrée à raison de 44 µmol/j pendant 30j à des rates OVX de 200g permettait d'augmenter de 12% le poids des fémurs (Blair 1996). Ces auteurs ont aussi mis en évidence une réduction de l'activité ostéoclastique via un mécanisme indépendant des processus d'attachement, à une dose correspondant à celle susceptible d'engager une inhibition de la tyrosine kinase *in vitro*. D'autre part, l'injection journalière sous cutanée de 1, 5 ou 25 µg/g de génistéine à des rates OVX de 2 mois pendant 21j était associée à un taux d'accrétion supérieur, tandis que les paramètres de résorption n'étaient pas affectés, ce qui augmentait la rétention aussi bien au niveau trabéculaire que cortical (Fanti 1998). De la même façon, chez la souris OVX, l'administration de 0,1 ou 0,7 mg/j de génistéine en sous cutané, grâce à une mini pompe osmotique pendant 2 à 4 semaines, permettait de restaurer le volume d'os trabéculaire au niveau de la métaphyse fémorale distale (Ishimi 1999). Le potentiel de la daïdzéine a également été comparé à celui de la génistéine (Picherit 2000). Des rates castrées de 12 mois ont ainsi reçu ces 2 molécules à la dose de 10 µg/g poids corporel pendant 3 mois. Dans le groupe expérimental daïdzéine, la densité minérale osseuse mesurée au niveau vertébral ou fémoral (métaphyse et diaphyse) était similaire à celle des animaux pseudo-opérés, alors que chez ceux ayant consommé la génistéine seule la zone métaphysaire était équivalente à celle des témoins. Ainsi donc la daïdzéine serait plus efficace. En fait, ces résultats corroborent les données de Ishida (1998) qui ont utilisé les formes glycosylées. Ce même laboratoire a également démontré que la déminéralisation et la détérioration des propriétés biomécaniques du fémur de rates OVX de 11 semaines étaient largement empêchées par la daïdzéine ou la glycitéine (50 mg/kg/j), mais pas par une dose équivalente de génistéine (Ishida 2000).

### **III-2-2 Coumestanes**

Dodge (1996) ont montré que l'administration par voie orale d'une dose de 0,1- 1- 10 ou 30 mg/kg de coumestrol pendant 5 semaines (débutant 1 mois après l'intervention chirurgicale) prévenait efficacement la perte osseuse induite par castration chez des rates de 6 mois. De la même façon, l'injection de 1,5 mmol de coumestrol par voie intra-musculaire deux fois par semaine pendant 6 semaines à des rates OVX de 6 mois s'est avérée efficace (Drapper 1997).

### **II-2-1 Lignanes**

Dans le cadre d'une expérimentation conduite chez des rates ovariectomisées de 3 mois, la consommation d'un régime contenant 10% de graines de lin (source de lignanes) n'a exercé aucun effet sur la densité minérale osseuse. En revanche, les propriétés biomécaniques étaient maintenues. En fait, l'analyse histologique a permis de démontrer un impact positif sur l'architecture trabéculaire (Horcajada-Molteni 2000).

### **III-3 Relations biodisponibilité et effets santé**

#### **III-3-1 Influence des formes moléculaires**

Dans la mesure où les isoflavones sont présentes spontanément dans le règne végétal sous forme glycosylée, il était intéressant d'étudier ces molécules sous leur forme native. En fait, il semble que l'impact de la génistéine et de la daïdzéine (Picherit 2000) au niveau osseux soit comparable à celui de leur précurseurs (Ishida 1998). De même, l'administration orale de 7-O-béta-(6"-O-succinyl)-D-glucoside de daïdzéine ou de 7-O-béta-(6"-O-succinyl)-D-glucoside de or génistéine, isolées à partir de graines de soja fermentées par *Bacillus subtilis* (natto), distribuées pendant 4 semaines à la dose de 50 mg/kg poids corporel/j, permettait de prévenir l'ostéopénie consécutive à la castration chez des rates OVX alimentées avec un régime carencé en calcium, et ceci de façon aussi efficace que la daïdzéine et la génistéine, respectivement (Toda 1999).

#### **III-3-1 Influence de la modulation de la flore intestinale**

La nutrition préventive fait appel à des notions complexes et notamment au concept d'apports optimaux, intégrant les paramètres de biodisponibilité car des différences de métabolisme peuvent contribuer à des variations d'exposition, et donc d'effets physiologiques. Il est donc essentiel de disposer de données claires sur la biodisponibilité des isoflavones avant d'engager des programmes de prévention à long terme. Les connaissances actuelles indiquent que la flore intestinale joue un rôle prépondérant dans le métabolisme des isoflavones, puisqu'elle est responsable de la production d'équol. Même si le déterminisme de cette synthèse d'équol est inconnu, ce processus pourrait être modulé par l'alimentation puisque la consommation d'un régime riche en fibres peut modifier le métabolisme des isoflavones (Xu 1994). De même, l'ingestion d'oligofructose stimule l'activité  $\beta$ -glucosidase au niveau du colon, générant une meilleure absorption de ces molécules (Uehara 2001). En fait, chez la souris OVX (Otha 2002) ou la rate castrée (Mathey 2003), la consommation de ce sucre non fermentescible permet d'exacerber l'effet bénéfique des isoflavones sur la masse osseuse, notamment en potentialisant la conversion de la daïdzéine en équol. Ces deux études expérimentales ouvrent donc des perspectives très intéressantes, d'autant que d'après les résultats préliminaires de Lydeking-Olsen (2002) une réponse accrue en terme de minéralisation est obtenue chez les femmes ménopausées capables de métaboliser l'équol.

#### **III-4 Influence de la stratégie d'intervention (préventive contre curative)**

Arjmandi (1998) ont administré des protéines de soja à des rates ovariectomisées de façon curative. Ces auteurs ont obtenu une légère amélioration, probablement du fait d'une augmentation du nombre de transcrits d'ARNm codant pour l'IGF1 au niveau fémoral, ceci quelle que soit la quantité d'isoflavones présentes. En revanche, ces résultats n'ont pas été confirmés par l'étude de Picherit (2001) selon laquelle seule une approche préventive était efficace pour le maintien du capital osseux de la rate en situation de carence oestrogénique.

#### **III-5 Résumé de ces données issues de l'expérimentation animale**

En résumé, dans les modèles animaux, l'effet ostéoprotecteur des phyto-estrogènes est cohérent. Il faut toutefois rappeler que les primates non humains semblent peu réceptifs, contrairement aux rongeurs. En outre, il est important de privilégier une stratégie préventive plutôt qu'une intervention curative.

### **IV- Etudes *in vitro***

L'approche *in vitro* fournit une contribution intéressante au dossier scientifique car elle a permis de démontrer une interaction directe avec les cellules osseuses et surtout de mieux appréhender les mécanismes engagés.

## IV-1 Approche tissulaire

Une stimulation de la minéralisation et une inhibition de la résorption osseuse spontanée ou induite par la PTH, la vitamine D ou la PGE2 par le coumestrol (effet maximal à  $10^{-5}$ M) ont été initialement mises en évidence sur culture d'explants fémoraux d'embryons aviaires par Tsustumi (1995).

Yamaguchi & Gao (1997), en utilisant des métaphyses fémorales de rats adultes (50 semaines), ont ensuite confirmé le pouvoir stimulateur des phyto-estrogènes sur l'activité ostéoblastique par la démonstration d'une augmentation de l'activité phosphatase alcaline et du contenu en ADN en cas d'incubation avec la génistéine. Cet effet est inhibé par le tamoxifène, un anti-estrogène.

## IV-2 Approche cellulaire

### IV-2-1 Au niveau des ostéoblastes

De nombreux travaux reflètent l'existence d'une *modulation directe des ostéoblastes par les phyto-estrogènes* (Yamaguchi 1998 ; Yamaguchi 1998, 2000 ; Sugimoto 2000a,b ; Anderson 2000 ; Rickard 2003). Les résultats d'Anderson (1997) sur cellules de type ostéoblastique (ROS 17/2.8 et ROS.SMER qui expriment 8 fois plus de récepteurs estrogènes) corroborent la modulation de l'activité de la phosphatase alcaline, marqueur de différenciation ostéoblastique, par la génistéine. A nouveau, Choi (2001) ont démontré qu'un extrait éthanolique de protéines de soja accroît la prolifération (cet effet étant atténué par l'addition de tamoxifène), ainsi que l'activité de cellules de type ostéoblastique (MC3T3-E1), comme l'indique l'augmentation de la synthèse de collagène et de la phosphatase alcaline. En fait, Jia (2003) ont montré que des médiateurs potentiels de l'effet des phyto-estrogènes serait la BMP2 (Bone Morphogenetic Protein) dont la synthèse est effectivement induite par la daïdzéine en culture primaire d'ostéoblastes isolés à partir de rats nouveau-nés.

En ce qui concerne la *prolifération cellulaire*, et donc le recrutement de précurseurs, Dang (2004) ont montré que la daïdzéine régule de façon dose dépendante la transcription des PPARs et de Ers, dont la proportion respective détermine la voie de différenciation de cellules ostéoprogénitrices KS483 vers l'ostéogenèse ou l'adipogenèse.

L'intervention du système IGF dans la transmission des effets osseux des isoflavones a également été évoquée par Lieberherr (2003), toutefois, sans réelle preuve.

Enfin, les phyto-estrogènes sont non seulement capables d'engager le phénotype ostéoblastique, mais ils peuvent aussi limiter l'ostéoclastogenèse, donc la résorption, en induisant la sécrétion ostéoblastique de molécules inhibitrices. La génistéine et la daïdzéine diminuent significativement la production d'une cytokine, l'IL6, de façon dose dépendante de 30 à 40% dans les cellules de type ostéoblastique hFOB1.19 et de 40 à 60% dans les hFOB/ER9 (transfectées par le récepteur  $E\alpha$ ) Chen (2002). Dans ces conditions expérimentales, ainsi que sur culture d'ostéoblastes matures humains (Viereck 2004), la production d'ostéoprotégérine<sup>32</sup> est également accrue, ce qui permet de neutraliser le facteur de différenciation des ostéoclastes, le RANKL. Ce processus n'exclut toutefois pas une interaction directe avec les ostéoclastes, cellules responsable de l'activité catabolique (résorption).

### IV-2-2 Au niveau des ostéoclastes

Il semble, qu'au niveau ostéoclastique, les différents phyto-estrogènes ne soient pas équivalents. En effet, sur cellules murines en culture sur des plaques de dentine, Tobe (1997) ont montré l'induction d'une réduction du nombre de cavités de résorption par la daïdzéine mais pas par la génistéine. A l'inverse, sur culture d'ostéoclastes aviaires, Blair (1996) ont mis en évidence l'efficacité de la génistéine, mais pas de la daïdzéine.

---

<sup>32</sup> Ostéoprotégérine : molécule impliquée dans la régulation de la différenciation ostéoblastique

En ce qui concerne les mécanismes mis en jeu, une diminution du recrutement des précurseurs est impliquée. Gao (1999) ont ainsi obtenu une inhibition de la formation de cellules mononuclées de type ostéoclastique par la voie de l'AMPC, alors que les phyto-estrogènes sont inefficaces sur la différenciation ostéoclastique impliquant la protéine kinase. De la même façon, Rassi (2002) ont diminué la formation *in vitro* d'ostéoclastes induite par la vitamine D dans des cellules porcines issues de la moelle osseuse.

Une inactivation des cellules matures intervient également. La daïdzéine diminue effectivement de 51% le nombre d'ostéoclastes en induisant le clivage de la caspase-8 et caspase-3, ainsi que la fragmentation de l'ADN, ce qui se traduit par une réduction des surfaces de résorption par les ostéoclastes matures (Rassi 2002).

D'autre part, une moindre adhésion cellulaire a été observée (Gao 1999).

Les capacités d'acidification, essentielles à la première étape du processus de résorption de dissolution du minéral, sont aussi altérées par la génistéine (mais pas la daïdzéine), par le biais d'un ralentissement du transport d'HCl (effet via inhibition de la tyrosine kinase) (Williams 1998).

Enfin, une induction de l'apoptose a pu être identifiée par Gao (1999, 2000) et Rassi (2002). La génistéine peut effectivement moduler la progression du cycle cellulaire et notamment l'entrée en phase S en induisant l'arrêt en G2/M (Matsukawa 1993). Ce procédé implique une modulation de la dépolarisation membranaire qui ferait intervenir une accumulation du calcium intra-cellulaire (Kajiya 2000 ; Okamoto 2001).

#### **IV-2-3 Résumé**

Les études *in vitro* suggèrent que les phyto-estrogènes tels que la génistéine peuvent stimuler l'activité ostéoblastique et inhiber le recrutement et la fonctionnalité des ostéoclastes dans une gamme de concentration de  $10^{-5}$  à  $10^{-7}$  M. L'effet de la daïdzéine sur la fonction résorbante, via une modulation directe des ostéoclastes, semble plus controversée. En outre, la forme glycosylée, qui d'ailleurs ne franchit pas la barrière intestinale, est inefficace (Okamoto 2001). Les isoflavones agissent en modulant la voie de signalisation via le récepteur œstrogène, puisque, bien qu'ils soient environ 100 à 1000 fois moins exprimés au niveau des organes périphériques, les deux types ont été décelés sur les ostéoblastes et ostéoclastes (Hoyland 1997 ; Onoe 1997 ; Kusec 1998 ; Braidman 2001). Une voie non génomique via la tyrosine kinase, notamment pour freiner la résorption peut aussi être mise en jeu (Akiyama 1987 ; Blair 1996). Enfin, les propriétés anti-oxydantes des phyto-estrogènes ont aussi été évoquées pour expliquer leurs effets ostéoprotecteurs (Anderson, 1997 ; Coxam, 2000), processus qui reste à démontrer.

#### **Conclusion**

Il ressort de l'ensemble de ces données une potentialité des phyto-estrogènes pour la prise en charge de la femme ménopausée dans un objectif de prévention de l'ostéoporose. Toutefois, si l'expérimentation animale (majoritairement conduite chez la rate ovariectomisée, modèle de l'ostéoporose postménopausique), a fourni les preuves d'une certaine efficacité pour la prévention de la perte osseuse liée à la suppression de la synthèse des estrogènes, les investigations chez l'Homme sont moins consensuelles.

Même si les études d'observation témoignent de l'existence d'une association entre la masse osseuse et le niveau de consommation chez la femme ménopausée, elles démontrent qu'une exposition minimale est nécessaire, c'est à dire qu'elle soit au moins équivalente à celle atteinte par les populations asiatiques. En fait, si cette association existe chez les Orientales, il n'est pas certain qu'elle résulte uniquement du niveau d'apport. Il est possible qu'une consommation pendant toute la vie, ou à un stade physiologique précis, ou encore que le profil alimentaire et le style de vie dont participe cette consommation soient également déterminants. En ce qui concerne les essais d'intervention, les études à court terme sont très controversées. En outre, elles ne permettent que la mesure d'une orientation métabolique à un instant (formation ou résorption), non systématiquement représentative de

la qualité du squelette en termes de propriétés biomécaniques. Les études de supplémentation pendant un minimum de 6 mois témoignent d'un impact, certes statistiquement significatif de ces molécules sur la masse osseuse, mais marginal en terme clinique. Il est donc très prématuré d'extrapoler des recommandations sur ce seul critère dans la mesure où les propriétés de résistance du squelette sont aussi tributaires de la micro-architecture trabéculaire, non évaluée par de telles pratiques. Il est par conséquent urgent de multiplier ces études en étant très vigilant sur la qualité des protocoles. Un programme européen, reposant sur une étude d'intervention multi-centrique (PHYTOS), est d'ailleurs engagé dans ce sens. De plus, la décision ultime en termes de prescription ne pourra être prise que lorsque la réelle démonstration d'une réduction du risque fracturaire sera établie.

Si certains mécanismes cellulaires commencent à être appréhendés et que des effets significatifs sont obtenus *in vitro* avec une exposition compatible avec les niveaux de consommation usuels, de grandes incertitudes persistent, notamment à l'échelle moléculaire. Il reste également à préciser les doses utiles, en intégrant la notion de biodisponibilité qui dépend, entre autres, des interactions alimentaires. Il est aussi important d'élucider la question d'une meilleure efficacité potentielle chez les personnes capables de métaboliser l'équol, telle qu'évoquée très récemment par Setchell (2002). Le schéma précis de supplémentation reste également à définir, tant sur le plan cinétique que durée.

Enfin, ces résultats sont à intégrer dans la physiologie générale et avant toute recommandation, il est indispensable de valider l'innocuité de ces molécules sur d'autres cibles, même si aucun effet néfaste n'a été mis en évidence sur la sphère osseuse. Ce point ne pourra être résolu que par des études de toxicologie en utilisant des méthodologies à haut débit, pour assurer une approche systématique et suffisamment précoce.

En conclusion, les phyto-estrogènes ouvrent des perspectives intéressantes pour la prise en charge préventive de l'ostéoporose chez la femme ménopausée, mais le dossier scientifique doit être encore considérablement étoffé avant que l'on puisse affirmer leur efficacité.

## Points clés et recommandations

### Points clés

#### **Risque de fracture**

- ❖ Aucune étude clinique ciblant l'impact des phyto-estrogènes sur le risque fracturaire n'est actuellement disponible.

#### **Densité minérale osseuse**

- ❖ Dans les populations asiatiques, les études épidémiologiques d'observation montrent qu'une consommation importante d'isoflavones de soja est associée à une densité minérale osseuse élevée. Cette donnée doit toutefois être considérée avec précaution du fait de l'existence probable de facteurs de confusion (profil alimentaire, activité physique, stature, etc.).
- ❖ L'apport en isoflavones de soja permet d'éviter les processus de déminéralisation démontrés dans des situations de carence estrogénique (cas des études d'intervention chez la femme ménopausée, données issues de l'expérimentation animale conduite sur rates ovariectomisées). Les doses quotidiennes testées sont de l'ordre de 50-100 mg. Toutefois, aucune information sur l'impact à long terme n'est disponible.
- ❖ Il existe un certain nombre d'arguments en faveur d'une efficacité supérieure des isoflavones chez les personnes capables de bioconvertir l'équol à partir de son précurseur la daidzéine (notion de répondeur)

#### **Remodelage osseux**

- ❖ Les études *in vitro* indiquent que les mécanismes mis en jeu impliquent simultanément les ostéoblastes et les ostéoclastes, ce qui traduit une inhibition de la résorption osseuse associée à une stimulation de l'accrétion.
- ❖ Cependant, les études cliniques de courte durée ne fournissent aucune preuve convaincante de l'effet des phyto-estrogènes sur les marqueurs du remodelage osseux, qu'il s'agisse de l'activité ostéoblastique impliquée dans l'élaboration de la trame organique et sa minéralisation, ou des paramètres de résorption.

### Recommandations

#### **1 - Recommandations à visée de connaissances et de recherche**

- ❖ Il est indispensable de pouvoir disposer de données relatives à l'impact des phyto-estrogènes sur le risque fracturaire.
- ❖ Il est important de pouvoir explorer l'impact de la biodisponibilité de ces molécules sur leurs effets biologiques, de façon à mieux comprendre la relation dose-effet.

#### **2- Recommandations de santé publique**

- ❖ Bien que les études cliniques suggèrent un effet favorable des phyto-estrogènes sur les paramètres de masse osseuse, il est prématuré de recommander ces molécules pour une prise en charge préventive de l'ostéoporose car aucune information relative à la réduction du risque de fracture n'est actuellement disponible.

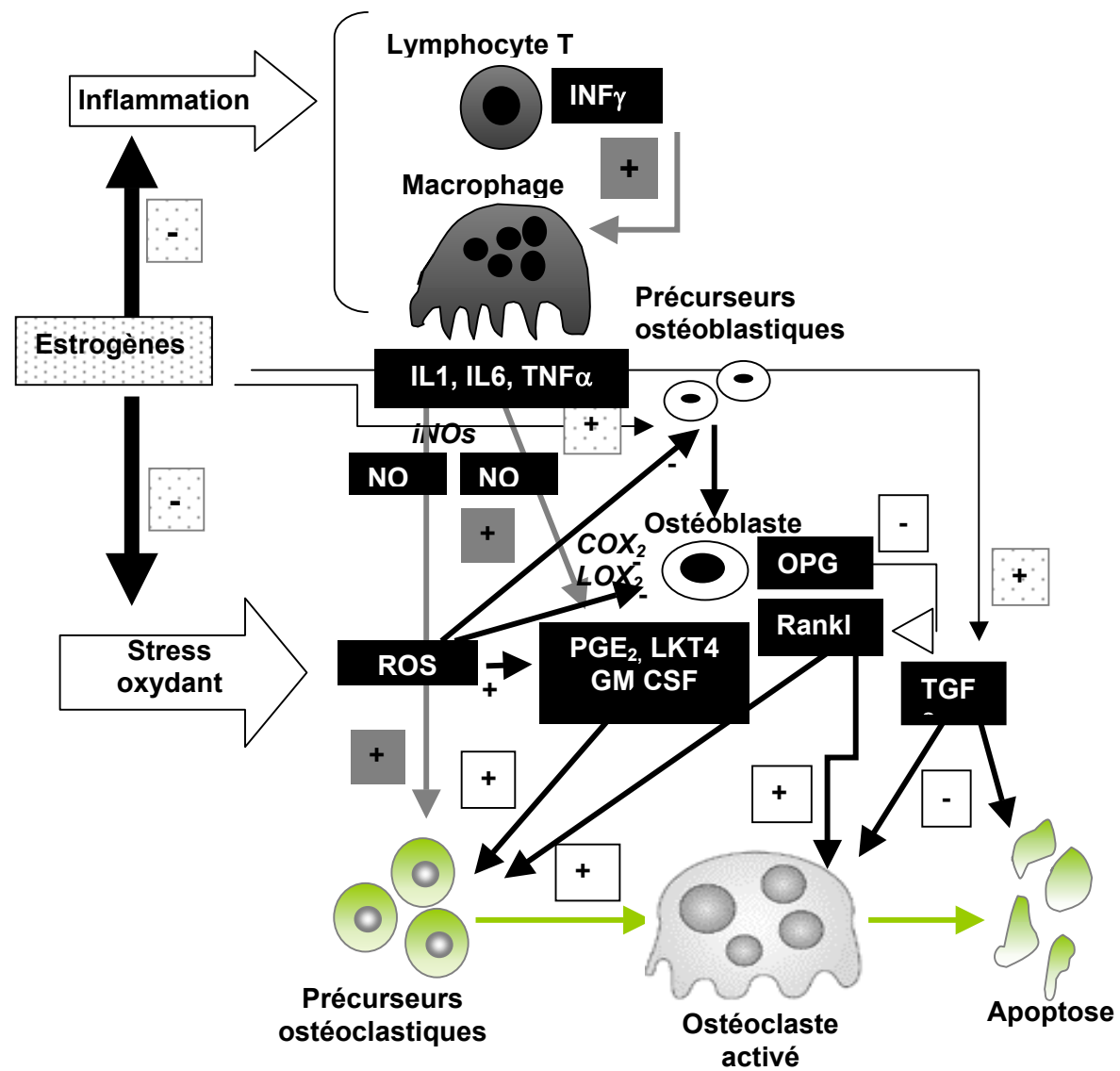


Figure 1. Mécanismes d'action des oestrogènes sur le métabolisme osseux. Théorie cellulaire de cette protection (d'après Coxam 2004)

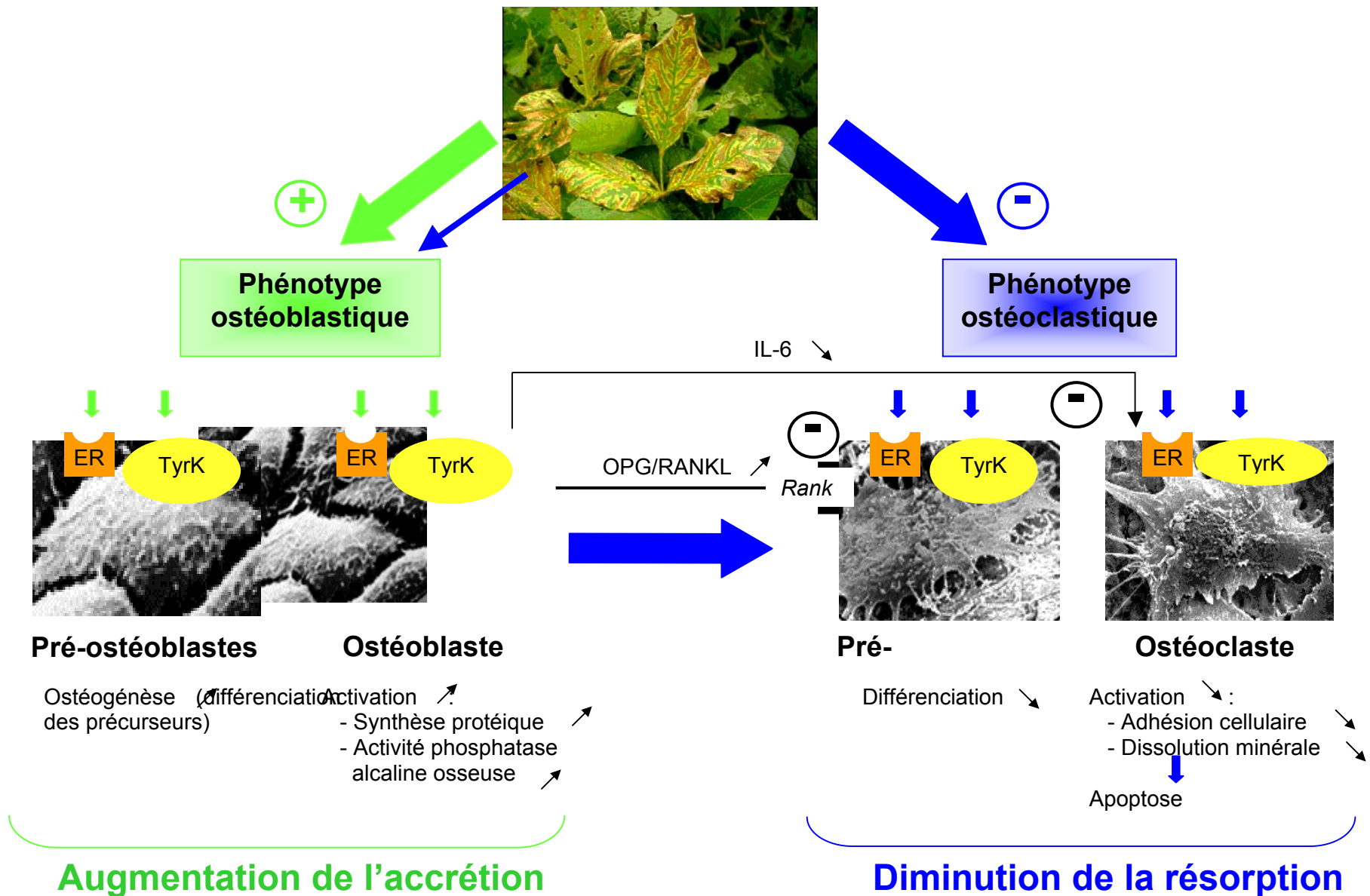


Figure 2. Effets cellulaires des phyto-oestrogènes sur les ostéoblastes et les ostéoclastes (OPG : ostéoprotégérine, inhibiteur compétitif du facteur de différenciation des ostéoclastes (RANKL) vis à vis du récepteur RANK) (IL6, cytokine inflammatoire connue pour ses propriétés de stimulation de la résorption) (ER, récepteur aux oestrogènes ; TyrK, activité tyrosine kinase)



**Légende :** dans les tableaux, ne sont présentées que les études retenues pour leur critères de méthodologie, d'autres études pourront avoir toutefois être discutées dans le texte.

**Tableau 1 : Etudes épidémiologiques (chez la femme ménopausée)**

Référence	Population	Méthode d'évaluation de l'ingestion de soja ou d'isoflavones	Site et méthode d'évaluation du système osseux	Principaux résultats - Comparaison des marqueurs en fonction de la consommation	Remarques
Kritz-Silverstein & Goodman-Gruen 2002	Californiennes Origine multi-ethnique N=208 Age=45-74 ans multi-ethnique	Questionnaire de fréquence alimentaire sur l'année précédente	Biomarqueur de résorption osseuse (NTX), DMO vertébrale	Consommation en 3 classes 0, M, H Génistéine (mg) : 0, 0.210 , 4.436 Daidzéine 0, 0.063, 1.420 NTX urinaire G, H : 38nmoles collagène/m mole créatinine vs 0 : 42 (p=0.01). An. multivariée – ↓ 8% (G, p=0.08) et 16% (D, p=0.09) N-Tx	
Ho 2001	Chinoises N=116 Age : 30-40 ans	Questionnaire de fréquence alimentaire de la consommation d'isoflavones		An multivariée Explique 12.8 %des taux de DMO	
Tsuchida 1999	Japonaises N=995 Age : 40-49 ans		DMO mesurée au niveau de la 2 <sup>e</sup> métacarpe	DMO mesurée est le reflet d'un gradient indépendant du niveau d'isoflavones après ajustement de l'âge et du niveau d'apport de calcium hebdomadaire	
Greendale 2002	Américaines Non ménopausées ou péri-ménopausées  (Caucasiennes = 1003) (Noir américaines = 497)  (Japonaises = 227)  (Chinoises = 200) Age : 45-52 ans	Questionnaire de fréquence alimentaire de la consommation de génistéine :  0.5-1.4 mg/j (2 groupes)  10.9mg/j  5.8mg/j	DMO vertébrale et fémorale	Pas de corrélation DMO et génistéine  Effet dose réponse chez non ménopausées (7.7% vertébral et 12% femoral)  Pas de corrélation DMO et genistéine	
Mei 2001	Chinoises ménopausées N=357 Age : 63±8,3 ans	Questionnaire de fréquence alimentaire (33 items dont 9 sojas et dérivés) et interview	DMO vertébrale et fémorale, biomarqueurs d'accrétion (OC) et de résorption (N-telopeptide) (sur 100 sujets)	fl intake H (53.3 ± 52.2) vs L (2.1 ± 1.6) DMO > , p<0.02 Biomarqueurs d'accrétion et de résorption < , p=0.05.	
Somekawa 2001	Japonaises ménopausées N=478 44-80 ans	Questionnaire de fréquence alimentaire, excrétion urinaire d'isoflavones (HPLC) corrélation : 0.47	DMO vertébrale	DMO H (65mg/j) > L (35mg/j) (p<0,01) ; pearson corrélation : r=0.16	
Kim. 2002	Coréennes ménopausées N=75 Post-M Age : 52 à 65 ans 3 classes : T : Tscore >-1 ; ostéopénie : ≤-1 - ≤ 2.5 ostéoporose > -2.5	Rappel des 24h, excrétion urinaire de phyto-estrogènes sur 24h (GC-MS)	DMO vertébrale et fémorale	Corrélation positive de l'excrétion d'entérolactone avec la DMO vertébrale (r =0.388 p<0,01) et la DMO fémorale (r=0.271 p<0,05). Deviens NS en multivariée pour DMO lombaire	Excrétion urinaire d'entérolactone supérieure à celle en daidzéine, contrairement aux données chez les occidentales (non)
Nagata 2002	403 Japonaises (hôpital) N=87	Questionnaire de fréquence alimentaire 169 items, 9 items produits soja. taux sériques génistéine , daidzéine , estradiol et SHBG	DMO calcaneum b-PAL génistéine et daidzéine plasma (HPLC)	Pas de corrélation avec taux sérique daidzéine (162nmol± 204), génistéine ( 414 ±644), équal (39.5 ± 96.9) ni avec l'apport alimentaire mais corrélation 0.38 estradiol et -0.38 SHBG p<0.01	Corrélation entre BMD et taux d'oestradiol Pas de corrélation entre BMD et taux d'isoflavones (connu pour effet estrogénique)

**Tableau 2. Etudes d'intervention**

Référence	Sujets	Intervention	Durée de l'étude	Marqueurs	Principaux résultats	Remarques
Scambia 2000	N=39	Apport journalier de 50 mg d'isoflavones	1,5 mois		Pas de modification de l'ostéocalcinémie	
Wangen 2000	Minnéapolis 14 Femmes préM 17 PostMn	Randomisé, protocole croisé poudre supplémentée en IF Témoins : 0.15+0.01 mg/kg/j (7+1.1mg IF aglycones/j) Faible 1.01+.04mg/kg/j Fort : 2.00+.02mg/kg/j Ifl témoin 0.13, L : 1.0, H 2 mg/Kg soit 8, 65 ou 130 mg d'isoflavones/j.	3 mois	OC, IGF1, IGFBP3  DPD,CTx  BAP pour post ménopausées (en plus)	Pas de différence des biomarqueurs osseux  Prém : IGF1, IGFBP3 augmentent avec faible dose DPD augmente avec faible et forte dose suivant phases du cycle menstruel  PostM : BAP diminue avec faible et forte dose IGF1 et IGFBP3 augmentent avec consommation d'IF	Marqueurs varient en fonction d'IF, cependant de faible amplitude, non significatif pour un effet positif sur remodelage osseux
Upmalis 2000	Etude multicentrique (15sites) 177 femmes ménopausées - Age : 55 ans (>5 bouffées de chaleur/j)	Extrait d'IF de soja en comprimés : 50 mg/j de génistine et de daidzine	3 mois	OC, NTx	Pas de modification des teneurs sériques en ostéocalcine et de l'excrétion urinaire de NTX	Absence d'effet sur l'endomètre
Dalais 1998	N=52 Age : 45 à 65 ans	Etude randomisée, contrôlée en double aveugle à protocole croisé Pain apportant 45 g/j de soja, de lin ou de blé dosage marqueurs d'adhésion	3 mois		Augmentation de 5,2% du contenu minéral osseux ; BMD NS	Etude calculée pour effet sur critère confort de la ménopause Effet sur CMO surprenant sur 1 période aussi courte
Lucas 2002	36 femmes ménopausées Age : 65 ans	Graines de lin(40g/j) Supplémentées avec Ca(1g)et 400UI vit D	3 mois	Igf1,IGFBP3,BSAP DPD	Marqueurs osseux non affectés par le traitement	Diminue le cholestérol total et l'apoB(connus pour risques cardiovasculaires)
Khalil 2002	64 hommes Age : 59.2+17.6 ans	Poudre de lait (caséine)=témoins(sans IF) Soja (protéines) = 40g (88mg IF/j)	3 mois	IGF1,BSAP DPD	IGF1 est > dans groupe soja, associé avec taux supérieur de formation osseuse  Marqueurs osseux non affectés par le traitement soja	Effet positif de soja sur IGF1 et os chez l'homme(étude plus longue doit être effectuée pour voir effets sur les marqueurs osseux et DMO)
Uesugi 2002	33 femmes périM Age : 40-62 ans	61.8 mg IF/j	1 mois	DPD	Diminution de DPD chez femmes recevant 61.8 mg IF	

Yamori 2002	Femmes japonaises N=40	Etude randomisée, contrôlée (20+20) en double aveugle germes soja+sésames 6g/j, soit 37,3 mg d'isoflavones marqueurs d'adhésion dosage	2,5 mois	DPD BMD (ultrasons)	Amélioration des marqueurs dans le groupe traité (DPD et pyridinoline p<0.05) Diminution des teneurs urinaires en DPD (4.8 vs 5.9 nmol/m mole, p<0.05) par rapport au groupe placebo Pas de différence pour DMO entre les groupes et au cours de l'étude	
Arimandi 2003	71 femmes postM  Age : 62.4+2.4 = soja 61.8+2.4 = lait (N=42)	Etude randomisée, contrôlée en double aveugle avec ou sans HRT : 40 g de protéines de soja/j (88,4mg total IF) (20) et protéines de lait (22) marqueur d'adhésion questionnaire	3 mois	IGF1,BSAP, DPD,Ca	↓DPD (P soja :-3.7 nmol/mmol créatinine) vs P lait : -1.7) seulement chez femmes sans THS avec soja sans HRT : IGF1 augmente, DPD diminue avec lait : augmentation excretion urinaire de Ca (33%) ; pas effet avec soja	71 sujets au départ, 41 % d'abandon Nbre de sujets dans la sub-analyse non donné Protéines de soja efficaces chez les femmes sans HRT
Potter 1998	Femmes hypercholestérolémiques N=66 Age : 41-83 ans	Etude randomisée, contrôlée en double aveugle Groupe 1-isp56 : 40g protéines/j (1.39mgIf/g protéines) Groupe 2-isp90 : 40g protéines/j (2.25mgIf/g protéines)	6 mois	BMD	BMD vertébrale augmente dans groupe 2(isp90) ↑ CMO (49.6±8.3 vs 50.8 ± 8.7, p<0.05)et de la DMO vertébrale (0.892 ± 0.114 vs 0.912 ± 0.119) dans le groupe ISP 90 ↓ NS dans les autres groupes	Prise de soja pdt 6 mois diminue les risques cardiovasculaires Seule prise 2.25mg IF/g protéines ; 40g/j de protéines) protège contre la perte osseuse
Alekel 2000	Femmes périM : N=69 Age moyen : 50,6 ans	Etude randomisée, contrôlée en double aveugle 3 groupes (40g protéines/j) Témoin : (n=21) Spi+ = 80.4mgIF aglycones/j (n=24) Spi- = 4.4mgIF aglycones/j (n=24)	6 mois	BMD,BMC NTx, BSAP	TEMOINS : BMD diminue Spi+ spi- : pas de variation de BMD SBAP est corrélée négativement avec BMD Comparaison intra-groupes :perte de DMOet CMO lombaires significative dans T Comparaison intergroupe :seul CMO ↑ significative (IfI+ : 58.4± 10.9vs 58.2 ± 11.3 ; T 57.6 ± 10.1 vs 56.6 ± 9.7 ; p=0.02)	IF de soja atténue la perte osseuse lombaire chez les périM (perte osseuse est de 2-3%/an) important pour femmes sans HRT
Chiechi 2002	Femmes ménopausées N=187 Age : 39-60 ans	3 groupes : témoin HRT Soja (lait,miso...) = 47 mg/j d'isoflavones	6 mois	OC,NTx Ohproline BMD	Pas de baisse de la DMO démontrée chez le groupe contrôle BMD diminue chez temoins Ostéocalcine sérique accrue avec soja	

Chen 2003	Population chinoise N=203 Age : 48 à 62 ans	3 groupes <b>témoins</b> : 1g amidon ; n=67 <b>dose1</b> : .5g amidon+ 0.5g soja+40mg IF ; n=68 <b>dose2</b> : 1g soja+80mg IF ; n=68 40 ou 80 mg/j d'isoflavones 500 mg Ca, 125 UI de vitamine D	1 an	BMD , BMC Vertèbres hanche	Evolution favorable du CMO au niveau de la hanche et du trochanter chez les sujets (forte dose soja) mais ayant une valeur basale faible BMC	IF du soja ont un effet sur le maintien de la BMC de la hanche chez celles ayant au départ une faible masse osseuse
Lydeking-Olsen 2002	N=108	500 mL de lait de soja/j riche en isoflavones (85 mg/j en équivalents aglycones) ou non (<1 mg/j)	2 ans		Augmentation de 1,1% de DMO et 2,2% de CMO dans le groupe isoflavones contre une diminution de 4,2% et 4,3% respectivement dans le groupe placebo.	
Vitolins 2002	N=172	25 g de protéines de soja à teneur en isoflavones de 5, 2 et 58 mg	2 ans		Effet protecteur au niveau de la DMO totale, indépendamment de la teneur en isoflavones	
Morabito 2002	Femmes en ambulatoire N=90 Age : 47 à 57 ans BMD col du fémur <0.795 cm <sup>2</sup>	3 groupes -54 mg/j de génistéine (30) , - THS (30) -ou placebo (30)	1 an	BMD DPD, PYR OC, B-ALP PTH, Ca 1.25(OH)2D,	Supplémentation en génistéine est associée à ↓ significative de l'excrétion de DPD, à ↑ significative des indicateurs de l'activité ostéoblastique (B-ALP, BGP) et ↑ de la DMO au niveau lombaire et fémoral. A. multivariée montre effet génistéine sur activité ostéoblastique B-ALP 43%, NS pour THS	Cette étude confirme l'effet positif de la génistéine sur la perte osseuse Phyto_oestrogènes ↘ la résorption et augmentent la formation

**Tableau 3 : Etudes chez l'animal**

Référence	Modèle	Traitement	Principaux résultats
Arjmandi 1996	Rates ovariectomisées de 90 jours	Protéines de soja (22,7%) pendant 30 j et caséine (contrôle)	Augmentation de 15% de la DMO par rapport au groupe contrôle
Harrison 1998	Rates ovariectomisées de 1 mois	22% de protéines de soja pendant 4 semaines	Augmentation du contenu calcique fémoral et tibial Pas de modulation du remodelage osseux.
Goyal 1995	Rates ovariectomisées de 95 jours	Protéines de soja (22,7%) pendant 1 mois avec ou sans isoflavones	DMO supérieure aux témoins castrés pour les animaux ayant consommé les protéines non dépliées en phyto-oestrogènes
Jeffery 2000	Rates ovariectomisées de 4 mois	Caséines enrichies en isoflavones, avec des protéines de soja, ou avec des protéines de soja dépourvues d'isoflavones pendant 2 mois	Prévention de la perte osseuse avec le régime caséine enrichi en isoflavones (0,8%)
Picherit 2001	Rates ovariectomisées de 195 jours	348 mg d'isoflavones/j (génistéine 159 mg, daidzine 156 mg, glycitine 33 mg) aux doses de 20, 40 ou 80 mg/kg pendant 3 mois	Prévention de l'ostéopénie induite par carence hormonale. Augmentation de l'ostéocalcinémie.
Anderson 1995	Rates ovariectomisées lactantes	0,5-1,6 ou 5 mg/j de génistéine pendant 14 jours	Maintien plus efficace de la masse osseuse par rapport aux animaux témoins castrés – Poids des fémurs augmenté de 15%.
Blair 1996	Rates ovariectomisées	44 µmol/j de génistéine pendant 30j	Augmentation de 12% du poids des fémurs (p=0,07).
Fanti 1998	Rates ovariectomisées de 2 mois	Injection journalière sous-cutanée de 1, 5 ou 25 µg/g de génistéine pendant 21 jours	Prévention de la perte osseuse trabéculaire et corticale pour 5µg/g de génistéine. Taux d'accrétion supérieur. Pas de modification des paramètres de résorption
Ishimi 1999	Souris ovariectomisées	0,1 ou 0,7 mg/j de génistéine en sous-cutané pendant 2 à 4 semaines	Restauration du volume d'os trabéculaire au niveau de la métaphyse fémorale distale
Picherit 2000	Rates ovariectomisées de 12 mois	10 µg/g de poids corporel de génistéine et daidzine pendant 3 mois	DMO vertébrale et fémorale similaire aux animaux pseudo-opérés pour le groupe traité à la daidzine. Seule la DMO métaphysaire est identique aux témoins avec la génistéine : la daidzine serait plus efficace que la daidzine.
Ishida 2000	Rates ovariectomisées de 11 semaines	50 mg/kg/j de daidzine, génistéine ou glycitine	Prévention de la déminéralisation et de la détérioration des propriétés biomécaniques par la daidzine et la glycitine mais pas par la génistéine.

- Akiyama T, Ishida J, Nakagawa S, Ogawara H, Watanabe S, Itoh N, Shibuya M & Fukami Y (1987) Genistein, a specific inhibitor of tyrosine-specific protein kinases. *J Biol Chem*, 262, 5592-5595.
- Anderson JJ, Chen X, Boass A *et al.* (2002) Soy isoflavones : no effect on bone mineral content and bone mineral density in healthy, menstruating young adult women after one year. *J Am Coll Nutr*, 21, 388-393.
- Anderson JJ, Ambrose WW & Garner SC (1998) Biphasic effects of genistein on bone tissue in the ovariectomized, lactating rat model. *Proc Soc Exp Biol Med*, 217, 345-350.
- Alekel DL, St Germain A, Peterson CT, Hanson KB, Stewart JW & Toda T (2000) Isoflavone-rich soy protein isolate attenuates bone loss in the lumbar spine of perimenopausal women. *Am J Clin Nutr*, 72, 844-852.
- Alexandre C (1989) Physiopathologie des maladies osseuses. Dans: *Le tissu osseux*; Teot L, Vidal J & Dossa J (eds) ; pp. 163-169 ; Sauramps Médical, Montpellier, France.
- Anderson JJ, Ambrose WW & Garner SC (1998) Biphasic effects of genistein on bone tissue in the ovariectomized, lactating rat model. *Proc Soc Exp Biol Med*, 217, 345-350.
- Anderson JJB, Chen XW & Garner SC (2000) Effects of genistein on MC3T3-E&, an osteoblast-like cell in relation to expression of estrogen receptors and during cell differentiation. *J Nutr*, 130, 666S-667S.
- Anderson JJB & Garner SC (1997) The effect of phytoestrogens on bone. *Nutr Res*, 20, 220-224.
- Arjmandi BH, Alekel L, Hollis BW, Amin D, Stacewicz-Sapuyntzakis M, Guo P & Kukreja SC (1996) Dietary soybean protein prevents bone loss in an ovariectomized rat model of osteoporosis. *J Nutr*, 126, 161-167.
- Arjmandi BH, Birnbaum R, Goyal NV, Getlinger MJ, Juma S, Alekel L, Hasler CM, Melinda LD, Hollis B & Kukreja SC (1998) Bone-sparing effect of soy protein in ovarian hormone-deficient rats is related to its isoflavone content. *Am J Clin Nutr*, 68 (suppl), 1364S-1368S.
- Arjmandi BH, Getlinger MJ, Goyal NV, Alekel L, Hasler CM, Juma S, Drum S, Hollis B & Kukreja SC (1998). Role of soy protein with normal or reduced isoflavone content in reversing bone loss induced by ovarian hormone deficiency in rats. *Am J Clin Nutr*, 68 (suppl), 1358S-1363S.
- Arjmandi BH, Khalil DA & Hollis BW (2002) Soy protein : its effects on intestinal calcium transport, serum vitamin D and insulin-like growth factor-I in ovariectomized rats. *Calcif Tissue Int*, 70, 483-487.
- Arjmandi BH, Khalil DA, Smith BJ, Lucas EA, Juma S, Payton ME & Wild RA (2003) Soy protein has a greater effect on bone in postmenopausal women not on hormone replacement therapy, as evidenced by reducing bone resorption and urinary calcium excretion. *J Clin Endocrinol Metab*, 88, 1048-1054.
- Armour KE, Van'T Hof RJ, Grabowski PS, Reid DM & Ralston SH (1999) Evidence for a pathogenic role of nitric oxide in inflammation-induced osteoporosis. *J Bone Miner Res*, 14, 2137-2142.
- Ayers M, Prince M, Ahmadi S & Baran DT (2000) Reconciling quantitative ultrasound of the calcaneus with X-ray based measurements of the central skeleton. *J Bone Miner Res*, 15, 1850-1855.
- Blair HC, Jordan SE, Peterson TG & Barnes S (1996) Variable effects of tyrosine kinase inhibitors on avian osteoclastic activity and reduction of bone loss in ovariectomized rats. *J Cell Biochem*, 61, 629-637.
- Braidman IP, Hainey L, Batra G, Selby PL, Saunders PTK & Hoyland JA (2001) Localization of estrogen receptor  $\alpha$  protein expression in adult human bone. *J Bone Miner Res*, 16, 214-220.
- Branca F (2003) Dietary phyto-oestrogens and bone health. *Proc Nutr Soc*, 62, 877-887.
- Chen XW, Garner SC & Anderson JJB (2002) Isoflavones regulate interleukin-6 and osteoprotegerin synthesis during osteoblast cell differentiation via an estrogen-receptor-dependent pathway. *Biochem Biophys Res Com*, 295, 417-422.
- Chen YM, Ho SC, Lam SSH, Ho SSS & Woo JLF (2003) Soy isoflavones have a favorable effect on bone loss in chinese postmenopausal women with lower bone mass : a double-blind, randomized, controlled trial. *J Clin Endocrinol Metab*, 88, 4740-4747.
- Chiechi LM, Secreto G, D'Amore M, Fanelli M, Venturelli E, Cantatore F, Laselva G & Loizzi P (2002) Efficacy of a soy rich diet in preventing postmenopausal osteoporosis : the Menfis randomised trial. *Maturitas*, 42, 295-300.
- Choi EM, Suh KS, Kim YS, Choue RW & Koo SJ (2001) Soybean ethanol extract increases the function of osteoblastic MC3T3-E1 cells. *Phytochemistry*, 56, 733-739.
- Chow J, Tobias JH, Colston KW & Chambers TJ (1992) Estrogen maintains trabecular bone volume in rats not only by suppression of bone resorption but also by stimulation of bone formation. *J Clin Invest*, 89, 74-78.
- Clifton-Bligh PB, Baber RJ, Fulcher GR, Nery ML & Moreton T (2001) The effect of isoflavones extracted from red clover (Rimostil) on lipid and bone metabolism. *Menopause*, 8, 259-265.
- Cohen-Solal ME, Graulet AM, Denne *et al.* (1993) Peripheral monocyte culture supernatants of menopausal women induce bone resorption : involvement of cytokines. *J Clin Endocrinol Metab*, 7, 1648.
- Consensus Development Conference :diagnosis prophylaxis and treatment of osteoporosis. *JAMA*, 94: 646-650.
- Cooper C, Campion G & Melton LJ (1992) Hip fractures in the elderly : a world-wide projection. *Osteoporos Int*, 2, 285-289.
- Cooper C & Melton LJ (1992) Epidemiology of osteoporosis. *Trends Endocrinol Metab*, 314, 224-229.
- Coxam V (2000) Les phyto-estrogènes, des molécules prometteuses ? *NAFAS*, 2, 31-46.
- Coxam V (2003) Prevention of osteopenia by phyto-oestrogens : animal studies. *Br J Nutr*, 89 (suppl), S75-S85.
- Coxam V & Horcajada MN (2004) Prévention nutritionnelle de l'ostéoporose. pp 1-166, Lavoisier éditions.
- Cummings SR, Karpf DB, Harris F, Genant HK, Ensrud K, La Croix AZ & Black DM (2002) Improvement in spine bone density and reduction in risk of vertebral fractures during treatment with antiresorptive drugs. *Am J Med*, 112, 281-289.

Cummings SR, Nevitt MC, Browner WS, Stone K, Fox KM, Ensrud KE, Cauley J, Black D & Vogt TM (1995) Risk factors for hip fracture in white women. Study of the osteoporotic fractures research group. *N Engl J Med*, 332, 767-773.

Dalais FS, Ebeling PR, Kotsopoulos D, McGrath BP & Teede HJ (2003) The effects of soy protein containing isoflavones on lipids and indices of bone resorption in postmenopausal women. *Clin Endocrinol*, 58, 704-709.

Dalais FS, Rice GE, Wahlqvist ML, Grehan M, Murkies AL, Medley G, Ayton R & Strauss BJG (1998) Effects of dietary phytoestrogens in postmenopausal women. *Climacteric*, 1, 124-129.

Dang ZC & Löwik WGM (2004) The balance between concurrent activation of ERs and PPARs determines daidzein-induced osteogenesis and adipogenesis. *J Bone Min Res*, 19, 853-861.

Das U (2002) Nitric oxide as the mediator of the antiosteoporotic actions of estrogen, statins, and essential fatty acids. *Exp Biol Med Vol*, 227, 88-93.

De Kleijn MJJ, van der Dhouw YT, Wilson PWF, Adlercreutz H, Mazur W, Grobbee DE & Jacques PF (2001) Intake of dietary phytoestrogens is low in postmenopausal women in the United States : the Framingham study. *J Nutr*, 131, 1826-1832.

Dennison E, Yoshimura N, Hashimoto T & Cooper C (1998) Bone loss in Great Britain and Japan : a comparative longitudinal study. *Bone*, 23, 379-382.

Di Leo C, Tarolo GL, Bestetti A, Tagliabue L, Del Sole A, Aliberti O, Cestaro B & Pepe L (2000) Osteoporosis and phytoestrogens : an assessment of bone mineral density via quantitative peripheral computed tomography in milk-egg-vegetarian women in the premenopause. *Radiol Med*, 99, 250-257.

Dodge JA, Glasbrook AL, Magee DE, Phillips DL, Sato M, Short LL & Bryant HU (1996) Environmental estrogens : effects on cholesterol lowering and bone in the ovariectomized rat. *J Steroid Biochem Molec Biol*, 59, 155-161.

Draper CR, Edel MJ, Dick IM, Randall AG, Martin GB & Prince RL (1997). Phytoestrogens reduce bone loss and bone resorption in oophorectomized rats. *J Nutr*, 127, 1795-1799.

Fanti O, Faugere MC, Geng Z, Schmidt J, Morris PE, Cohen D & Malluche HH (1998) The phytoestrogen genistein reduces bone loss in short-term ovariectomized rats. *Osteoporos Int*, 8, 274-281.

Food and Drug Administration (1994). "Guidelines for preclinical and clinical evaluation of agents used in the prevention or treatment of postmenopausal osteoporosis".

Fujita T & Fukase M (1992) Comparison of osteoporosis and calcium intake between Japan and the United States. *Proc Soc Exp Biol Med*, 200, 149-152.

Gao YH & Yamaguchi M (1998) Zinc enhancement of genistein's anabolic effect on bone component in elderly female rats. *Gen Pharmacol*, 31, 119-202.

Gao YH & Yamaguchi M (1999) Inhibitory effect of genistein on osteoclast-like cell formation in mouse marrow cultures. *Biochem Pharmacol*, 58, 767-772.

Gao YH & Yamaguchi M (1999) Suppressive effects of genistein on rat bone osteoclasts : apoptosis is induced through Ca<sup>2+</sup> signaling. *Biol Pharm Bull*, 22, 805-809.

Gao YH & Yamaguchi M (2000) Suppressive effect of genistein on rat bone osteoclasts : involvement of protein kinase inhibition and protein tyrosine phosphatase activation. *Int J Mol Med*, 5, 261-267.

Garnero P & Delmas PD (1999). Utilité clinique des marqueurs du remodelage osseux dans l'ostéoporose. In: *Ostéoporose: progrès dans le diagnostic et la prise en charge*; Meunier PJ (ed); pp. 79-101; Marlin Dunitz, London, U.K.

Gerdhem P, Ivaska KK, Alatalo SL, Halleen JM, Hellman J, Isaksson A, Pettersson K, Väänänen HK, Akesson K & Obrant KJ (2004) Biochemical markers of bone metabolism and prediction of fracture in elderly women. *J Bone Min Res*, 19, 386-393.

Goyal N, Gettlinger MJ, Sun., Alekel L, Hasler C & Kukreja S (1995). Effect of soy protein with and without isoflavonoids on bone in ovariectomized rats. *J Bone Min Res*, 10 (suppl), S453.

Greendale GA, FitzGerald G, Huang MH, Sternfeld B, Gold E, Seeman T, Sherman S & Sowers MF (2002) Dietary soy isoflavones and bone mineral density : results from the study of Women's Health Across the Nation. *Am J Epidemiol*, 155, 746-754.

Gullberg B, Johnell O & Kanis JA (1997) World-wide projections for hip fracture. *Osteoporos Int*, 7, 407-413.

Hadfield P (1995). Japanese swallow Western diseases. *New Scientist*, 2, 5.

Hansard SL & Crowder HM (1957). The physiological behavior of calcium in the rat. *J Nutr*, 62, 325-339.

Harris S & Dawson-Hughes B (1992) Rates of change in bone mineral density of the spine, heel, femoral neck and radius in healthy postmenopausal women. *Bone Miner*, 17, 87-95.

Harrison E, Adjei A, Ameho C, Yamamoto S & Kono S (1998) The effect of soybean protein on bone loss in a rat model of postmenopausal osteoporosis. *J Nutr Sci Vitaminol*, 14, 257-268.

Ho SC, Gaen Chan S, Yi Q, Wong E & Leung PC (2001) Soy intake and the maintenance of peak bone mass in Hong-Kong Chinese women. *J Bone Min Res*, 16, 1363-1369.

Horcajada-Molteni MN, Crespy V, Coxam V, Davicco MJ, Remesy C & Barlet JP (2000) Rutine inhibits ovariectomy-induced osteopenia in rats. *J Bone Miner Res*, 15, 2251-2258.

Horcajada-Molteni MN, Davicco MJ, Lebecque P, Coxam V, Miller SC, Rémésy C & Barlet JP (2000) Effect of lignans on ovariectomy-induced bone loss in rats. *J Bone Min Res*, 15 (suppl), S553.

Horiuchi T, Onouchi T, Takahashi M, Ito H & Orimo H (2000) Effect of soy protein on bone metabolism in postmenopausal women. *Osteoporos Int*, 11, 721-724.

Hoyland JA, Mee AP, Baird P, Braidman IP, Mawer EB & Freemont AJ (1997) Demonstration of estrogen receptor mRNA in bone using *in situ* reverse-transcriptase polymerase chain reaction. *Bone*, 20, 87-92.

Hsu CS, Shen WW, Hsueh YM & Yeh SL (2001) Soy isoflavone supplementation in postmenopausal women. *J Reprod Med*, 42, 221-226.

Iki M, Kagamimori S, Kagawa Y, Matsuzaki T, Yoneshima H & Marumo (2001) Bone mineral density of the spine, hip and distal forearm in representative samples of the Japanese female population : Japanese Population-based Osteoporosis (JPOS) Study. *Osteoporos Int*, 12, 529-537.

INSERM, Expertise collective (1996) *Ostéoporose, stratégies de prévention et de traitement*. Paris, ISBN 2-85598-676-1, ed INSERM.

- Ishida H, Uesugi T, Hirai K, Toda T, Nukaya H, Yokotsuka K & Tsuji K (1998) Preventive effects of the plant isoflavones, daidzin and genistin, on bone loss in ovariectomized rats fed a calcium-deficient diet. *Biol Pharm Bull*, 21, 62-66.
- Ishida H, Uesugi T, Toda T & Tsuji K (2000) Effects of soy isoflavones, daidzein, genistein and glycitein, on bone loss and lipid metabolic pathway in ovariectomized rats. *J Nutr*, 130 (suppl), 685S.
- Ishimi Y, Miyaura C, Ohmura M, Onoe Y, Sato T, Uchiyama Y, Ito M, Wang X, Suda T & Ikegami S (1999) Selective effects of genistein, a soybean isoflavone, on B-lymphopoiesis and bone loss caused by estrogen deficiency. *Endocrinology*, 140, 1893-1900.
- James P, Sabatier JP, Bureau F, Laroche D, Jauzac P & Arhan P (2002) Influence of dietary protein and phyto-oestrogens on mineralization in the young rat. *Nutr Res*, 22, 385-392.
- Jayo MJ, Anthony MS, Register TC, Rnkin SE, Vest T & Clarkson TB (1996) Dietary soy isoflavones and bone loss : a study in ovariectomized monkeys. *J Bone Min Res*, 11 (suppl), S228.
- Jeffery EH, Walsh J, Rivera A, Jarrell V, Black M, Evans G, Turner R & Bahr J (2000) Soy isoflavones may enhance bone density in ovariectomized rats. *J Nutr*, 130 (suppl), 667S.
- Jia TL, Wang HZ, Xie LP, Wang XY, Zhang RQ, Zhou S, Turgeman G, Harris SE, Leitman DC, Komm BS, Bodine PV & Gazit D (2003) Daidzein enhances osteoblast growth that may be mediated by increased bone morphogenetic protein (BMP) production. *Biochem Pharmacol*, 65, 709-715.
- Johnell O, Gullberg B, Allander E, Kanis JA. & the MEDOS study group (1998) The apparent incidence of hip fracture in Europe : a study of national register sources. *Osteoporos Int*, 2, 298-302.
- Juma S, Sohn E, Bapna MS, Haley-Zitlin V & Arjmandi BH (1996) Effects of soy protein on mechanical properties of bone in gonadal hormone deficiency. *J Bone Min Res*, 11 (suppl), S228.
- Kalhil DA, Lucas EA, Juma S, Smith BJ, Payton ME & Arjmandi BH (2002) Soy protein supplementation increases serum insulin-like growth factor-I in young and old men but does not affect markers of bone metabolism. *J Nutr*, 132, 2605-2608.
- Kalu DN (1991) The ovariectomized rat model of postmenopausal bone loss. *Bone Miner*, 15, 175-192.
- Kalu DN (1999) Animal models of the aging skeleton. In: *The aging skeleton*. Rosen C.J., Glowacki J. & Bilezikian J.P. eds. Pp 37-50.
- Kalu DN, Liu CC, Hardin RR & Hollis BW (1989) The aged rat model of ovarian hormone deficiency bone loss. *Endocrinology*, 124, 7-16.
- Kalu DN, Masoro EJ, Byung PB, Hardin RR & Hollis BW (1988) Modulation of age-related hyperparathyroidism and senile bone loss in fisher rats by soy protein and food restriction. *Endocrinology*, 122, 1847-1854.
- Kardinaal AFM, Morton MS, Brüggemann-Rotgans IEM & Van Beresteijn ECH (1998) Phyto-oestrogen excretion and rate of bone loss in postmenopausal women. *Eur J Clin Nutr*, 52, 850-855.
- Kim MK, Chung BC, Yu VY, Nam JH, Lee HC, Huh KB & Lim SK (2002) Relationship of urinary phyto-oestrogen excretion to BMD in postmenopausal women. *Clin Endocrinol*, 56, 321-328.
- Kimmel DB (1991). Quantitative histologic changes in the proximal tibial growth cartilage of aged female rats. *Cells and Materials*, suppl 1, 11-18.
- Kreijkamp-Kaspers S, Kok L, Grobbee DE, De Haan EHF, Aleman A, Lampe JW & Van der Schouw YT (2004). Effect of soy protein containing isoflavones on cognitive function, bone mineral density, and plasma lipids in postmenopausal women. A randomized controlled trial. *JAMA*, 292, 65-74.
- Kritz-Silverstein D & Goodman-Gruen DL (2002) Usual dietary isoflavone intake, bone mineral density, and bone metabolism in postmenopausal women. *J Womens Health Gend Based Med*, 11, 69-78.
- Kusec V, Virdi AS, Prince R & Triffitt JT (1998) Localization of estrogen receptor- $\alpha$  in human and rabbit skeletal tissues. *J Clin Endocrinol Metab*, 83, 2421-2428.
- Lau EMC & Cooper C (1996). The epidemiology of osteoporosis. *Clin Orthopaed Rel Res*, 323, 65-74.
- Lees CJ & Ginn A (1998) Soy protein isolate diet does not prevent increased cortical bone turnover in ovariectomized macaques. *Calcif Tissue Int*, 62, 557-558.
- Li Z, Meredith MP & Hoseyni MS (2001) A method to assess the proportion of treatment effect explained by a surrogate endpoint. *Stat Med*, 20, 3175-3188.
- Lieberherr M, Cournot G & Robins SP (2003) Guidelines for using *in vitro* methods to study the effects of phyto-oestrogens on bone. *Br J Nutr*, 89 (suppl), S59-S73.
- Lydeking-Olsen E, Jensen JBE, Setchell KDR, Damhus M & Jensen TH (2002) Isoflavone-rich soymilk prevents bone-loss in the lumbar spine of postmenopausal women. A 2 year study. *J Nutr*, 132, 581S.
- Ling X, Cummings SR, Mingwei Q, Xihe Z, Xiaoashu C, Nevitt M & Stone K (2000) Vertebral fractures in Beijing, China : the Beijing Osteoporosis Project. *J Bone Min Res*, 15, 2019-2025.
- Lucas EA, Wild RD, Hammond LJ, Khalil DA, Jum S, Daggy BP, Stoecker BJ & Arjmandi BH (2002) Flaxseed improves lipid profile without altering biomarkers of bone metabolism in post-menopausal women. *J Clin Endocrinol Metab*, 87, 1527-1532.
- Luckey MM, Wallenstein S, Lapinski R & Meier DE (1996) A prospective study of bone loss in African-American and white women— a clinical research center study. *J Clin Endocrinol Metab*, 81, 2948-2956.
- Manolagas SC (2000) Birth and death of bone cells : basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis. *Endocr Rev*, 21, 115-137.
- Markiewicz L, Garey J, Adlercreutz H & Gurdip E (1993) *In vitro* bioassays of non-steroidal phytoestrogens. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 45, 399-405.
- Mathey J, Katicoulibaldi S, Puel C, Bennetau C, Lebecque P, Davicco MJ, Horcajada MN, Garel JM & Coxam V (2003) Dietary fructooligosaccharides improve soy-osteopenia prevention in the ovariectomised rat. *J Bone Miner Res* 18 (suppl), S266.
- Matsukawa Y, Marui N, Sakai T, Satomi Y, Yoshida M, Matsumoto K, Nishino H & Aoike A (1993) Genistein arrests cell cycle progression at G2M. *Cancer Res*, 53, 1328-1331.

- Mei J, Yeung SSC & Kung AWC (2001) High dietary phytoestrogen intake is associated with higher bone mineral density in postmenopausal but not premenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab*, 86, 5217-5221.
- Melton LJ (1995) Epidemiology of fractures. *Osteoporos Int*, 8, 225-247.
- Melton LJ III, Chrischilles EA, Cooper C, Lane AW & Riggs BL (1992) How many women have osteoporosis? *J Bone Miner Res*, 7, 1005-1010.
- Miller PD, Baran DT, Bilezikian JP, Greenspan SL, Lindsay R, Riggs L & Watts N (1999) Practical clinical application of biochemical markers of bone turnover. Consensus of an expert panel. *J Clin Dens*, 2, 323-342.
- Miyamoto M, Matsushita Y, Kiyokawa A, Fukuda C, Lijima Y, Sugano M & Akiyama T (1998) Prenylflavonoids : a new class of non steroidal phytoestrogen (part 2). Estrogenic effects of 8-isopentenylaringenin on bone metabolism. *Planta Med*, 64, 516-519.
- Morabito N, Crisafulli A, Vergara C, Gaudio A, Lasco A, Frisina N, D'Anna R, Corrado F, Pizzoleo MA, Cincotta M, Alta Villa D, Ientile R & Squadrito F (2002) Effects of genistein and hormone-replacement therapy on bone loss in early postmenopausal women : a randomized double-blind placebo-controlled study. *J Bone Min Res*, 17, 1904-1912.
- Murkies AL, Lombard C, Strauss BJG, Wilcox G, Burger HG & Morton MS (1995) Dietary flour supplementation decreases postmenopausal hot flashes : effect of soy and wheat. *Maturitas*, 21, 189-195.
- Nagata C, Shimizu H, Takami R, Hayashi M, Takeda N & Yasuda K (2002) Soy product and serum isoflavonoid and estradiol concentrations in relation to bone mineral density in postmenopausal Japanese women. *Osteoporos Int*, 13, 200-204.
- Nilas L & Christiansen C (1988) Rates of bone loss in normal women : evidence of accelerated trabecular bone loss after the menopause. *Eur J Clin Invest*, 18, 529-534.
- Okamoto F, Okabe K & Kajiya H (2001) Genistein, a soybean isoflavone, inhibits inward rectifier K<sup>+</sup> channels in rat osteoclasts. *Jpn J Physiol*, 51, 501-509.
- Omi N, Aoi S, Murata K & Ezawa I (1992) The effect of soybean milk on bone mineral density and bone strength in ovariectomized osteoporotic rats. *J Home Econ Jpn*, 44, 549-554.
- Omi N, Aoi S, Murata K & Ezawa I (1994) Evaluation of the effect of soybean milk and soybean milk peptide on bone metabolism in the rat model with ovariectomized osteoporosis. *J Nutr Sci Vitaminol*, 40, 201-211.
- Onoe Y, Miyaura C, Ohta H, Nozawa S & Suda T (1997) Expression of estrogen receptor  $\alpha$  in rat bone. *Endocrinology*, 128, 4509-4512.
- Pacifici R (1996) Estrogen, cytokines, and pathogenesis of postmenopausal osteoporosis. *J Bone Min Res*, 11, 1043-1051.
- Picherit C, Bennetau-Pelissero C, Chanteranne B, Lebecque P, Davicco MJ, Barlet JP & Coxam V, (2001a) Soybean isoflavones dose-dependently reduce bone turnover but do not reverse established osteopenia in adult ovariectomized rats. *J Nutr*, 131, 723-728.
- Picherit C, Chanteranne B, Bennetau-Pelissero C, Davicco MJ, Lebecque P, Barlet JP & Coxam V, (2001b) Dose-dependent bone sparing effects of dietary isoflavones in the ovariectomised rat. *Br J Nutr*, 85, 307-316.
- Picherit C, Coxam V, Bennetau-Pelissero C, Kati-Coulibaly S, Davicco MJ, Lebecque P & Barlet JP (2000) Daidzein is more efficient than genistein in preventing ovariectomy-induced bone loss in rats. *J Nutr*, 130, 1675-1681.
- Potter SM, Baun JA, Teng H, Stillman RJ, Shay NF & Erdman JW (1998) Soy protein and isoflavones : their effects on blood lipids and bone density in postmenopausal women. *Am J Clin Nutr*, 68, 1375-1379.
- Pouilles JM, Tremollières F & Ribot C (1995) effect of menopause on femoral and vertebral bone loss. *J Bone Min Res*, 10, 1531-1536.
- Rapport de la Communauté Européenne (1999) Building strong bones and preventing fractures. Summary report on osteoporosis in the European Community - Action for prevention. ISBN 92-828-5334-9.
- Rassi CM, Lieberherr M, Chaumaz G, Pointillart A & Cournot G (2002) Down-regulation of osteoclast differentiation by daidzein via caspase 3. *J Bone Min Res*, 17, 630-638.
- Rickard DJ, Monroe DG, Ruesink TJ, Khosla S, Riggs BL & Spelsberg TC (2003) Phytoestrogen genistein acts as an estrogen agonist on human osteoblastic cells through estrogen receptor alpha and beta. *J Cell Biochem*, 89, 633-646.
- Riggs BL, Khosla S & Melton III LJ (2002) Sex steroids and the construction and conservation of the adult skeleton. *Endocrine Rev*, 23, 279-302.
- Riggs BL & Melton III LJ (1983) Evidence for two distinct syndromes of involutional osteoporosis. *Am J Med*, 75, 899-901.
- Ross PD, Norimatsu H, Davis JW, Yano K, Wasnich RD, Fujiwara S, Hosoda Y & Melton LJ (1991) A comparison of hip fracture incidence among native Japanese, Japanese American, and American Caucasians. *Am J Epidemiol*, 133, 801-809.
- Roux C (2003) Méthodes non invasives de mesure de la densité minérale osseuse. *Med Sci*, 19, 231-238.
- Sarkar S, Mitlak BH, Wong M, Stock JL, Black DM & Harper KD (2002) Relationships between bone mineral density and incident vertebral fracture risk with raloxifene therapy. *J Bone Min Res*, 17, 1-10.
- Scambia G, Mango D, Signorile PG, Angeli RA, Palena C, Bombardelli E, Morazzoni P, Riva A & Mancuso S (1999) Clinical effects of a standardised soy extract in postmenopausal women : a pilot study. *Menopause*, 6, 233-241.
- Scheiber MD, Liu JH, Subbiah MTR, Rebar RW & Setchell K (2001). Dietary inclusion of whole soy foods results in significant reductions in clinical risk factors for osteoporosis and cardiovascular disease in normal postmenopausal women. *Menopause*, 8, 384-392.
- Scheiber MD & Rebar RW (1999) Isoflavones and postmenopausal bone health : a viable alternative to estrogen therapy? *Menopause*, 6, 233-241.
- Setchell KD, Brown NM & Lydeking-Olsen E (2002) The clinical importance of the métabolite equol-a clue to the effectiveness of soy and its isoflavones. *J Nutr*, 132, 3577-3582.
- Setchell KD & Lydeking-Olsen E (2003) Dietary phytoestrogens and their effect on bone: evidence from *in vitro* and *in vivo*, human observational, and dietary intervention studies. *Am J Clin Nutr*, 78 (Suppl), 593S-609S.
- Somekawa Y, Chiguchi M, Ishibashi T & Aso T (2001) Soy intake related to menopausal symptoms, serum lipids, and bone mineral density in postmenopausal Japanese women. *Obstet Gynecol*, 97, 109-115.
- Sugimoto E & Yamaguchi M (2000) Anabolic effect of genistein in osteoblastic MC3T3-E1 cells. *Int J Mol Med*, 5, 515-520.
- Sugimoto E & Yamaguchi M (2000) Stimulatory effect of daidzein in osteoblastic MC3T3-E1 cells. *Biochem Pharmacol*, 59, 471-475.
- Tobe H, Komiyama O, Komiyama Y & Maruyama HB (1997) Daidzein stimulation of bone resorption in pit formation assay. *Biosc Biotech Biochem*, 61, 370-371.



- Toda T, Uesugi T, Hirai K, Nukaya H, Tsuji K & Ishida H (1999) New 6-O acyl isoflavone glycosides from soybeans fermented with *Bacillus subtilis* (natto). I. 6-O-succinylated isoflavone glycosides and their preventive effects on bone loss in ovariectomized rats fed a calcium-deficient diet. *Biol Pharm Bull*, 22, 1193-1201.
- Tsuchida K, Mizushima S, Toba M & Soda K (1999) Dietary soybeans intake and bone mineral density among 995 middle-aged women in Yokohama. *J Epidemiol*, 9, 14-19.
- Tsunenari T, Yamada S, Kawakatsu M, Negishi H & Tsutsumi M (1995) Menopause-related changes in bone mineral density in Japanese women : a longitudinal study on lumbar spine and proximal femur. *Calcif Tissue Int*, 56, 5-10.
- Tsustumi N (1995) Effect of coumestrol on bone metabolism in organ culture. *Biol Pharmaceut Bull*, 18, 1012-1015.
- Uehara M, Ohta A, Ishimi Y *et al.* (2002) Combination of dietary isoflavone conjugates and fructooligosaccharides increases femoral bone mineral density and enhances production from daidzein in ovariectomized mice and gastrectomized rats. *J Nutr*, 132, 616S-617.
- Uehara M, Ohta A, Sakai K, Suzuki K, Watanabe S & Adlercreutz H (2001) Dietary fructooligosaccharides modify intestinal bioavailability of a single dose of genistein and daidzein and affect their urinary excretion and kinetics in blood of rats. *J Nutr* 131, 787-95.
- Uesugi T, Fukui Y & Yamori Y (2002) Beneficial effects of soybean isoflavone supplementation on bone metabolism and serum lipids in postmenopausal Japanese women : a four-week study. *J Am Coll Nutr*, 21, 97-102.
- Upmalis DH, Lobo R, Bradley L, Warren M, Cone FL & Lamia CA (2000) Vasomotor symptom relief by soy isoflavone extract tablets in postmenopausal women : a multicenter, double blind, randomized, placebo-controlled study. *Menopause*, 7, 236-242.
- Valtuna S, Cashman K, Robins SP, Cassidy A, Kardinaal A & Branca F (2003) Investigating the role of natural phyto-oestrogens on bone health in postmenopausal women. *Br J Nutr*, 89 (suppl), S87-S99.
- Van Erp-Baart MAJ, Brants HAM, Kiely M, Mulligan A, Turrini A, Sermoneta C, Kilkinen A & Valsta L (2003) Isoflavone intake in four different European countries : the VENUS approach. *Br J Nutr*, 89, S25-S30.
- Viereck V, Grundker C, Blaschke S, Siggelkow S, Emons G & Hofbauer L (2002) Phytoestrogen genistein stimulates the production of osteoprotegerin by human trabecular osteoblasts. *J Cell Biochem*, 84, 725-735.
- Vitolins M, Anthony M, Lenschik L, Bland DR & Burke GL (2002) Does soy protein and its isoflavones prevent bone loss in peri- and postmenopausal women ? Results of a two year randomized clinical trial. *J Nutr*, 132, 582S.
- Wangen KE, Duncan AM, Merz-Demlow BE, Xu X, Marcus R, Phipps WR & Kurzer MS (2000) effects of soy isoflavones on markers of bone turnover in premenopausal and postmenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab*, 85, 3043-3048.
- Washburn S, Burke GL, Morgan T & Anthony M (1999) Effect of soy protein supplementation on serum lipoproteins, blood pressure, and menopausal symptoms in perimenopausal women. *Menopause*, 6, 7-13.
- Williams JP, Jordan SE, Barnes S & Blair HC (1998) Tyrosine kinase inhibitor effects on osteoclastic acid transport. *Am J Clin Nutr*, 68, 1369S-1374S.
- Wronski TJ, Dann LM, Scott KS & Cintron M (1989) Long term effects of ovariectomy and ageing on the rat skeleton. *Calcif Tissue Int*, 45, 360-366.
- Wronski TJ & Yen CF (1991) The ovariectomized rat as an animal model for postmenopausal bone loss. *Cells Mat*, suppl 1, 69-74.
- Xu X, Wang HJ, Murphy PA, Cook L & Hendrich S (1994) Daidzein is a more bioavailable soymilk isoflavone than is genistein in adult women. *J Nutr* 124(6), 825-32.
- Yamaguchi M & Gao YH (1997) Anabolic effect of genistein on bone metabolism in the femoral-metaphyseal tissues of elderly rats is inhibited by the anti-estrogen tamoxifen. *Res Exp Med*, 197, 101-107.
- Yamaguchi M & Gao YH (1998) Inhibitory effect of genistein on bone resorption in tissue culture. *Biochem Pharmacol*, 55, 71-76.
- Yamaguchi M & Gao YH (2000) Stimulatory effect of genistein and daidzein on protein synthesis in osteoblastic MC3T3-E1 cells : activation of aminoacyl-tRNA synthetase. *Mol Cell Biochem*, 214, 97-102.
- Yamaguchi M & Sugimoto E (2000) Stimulatory effect of genistein and daidzein on protein synthesis in osteoblastic MC3T3-E1 cells : activation of aminoacyl-tRNA synthetase. *Mol Cell Biochem*, 214, 97-102.
- Yamori Y, Moriguchi EH, Teramoto T, Miura A, Fukui Y, Honda K, Fukui M, Nara Y, Taira K & Moriguchi Y (2002) Soybean isoflavones reduce postmenopausal bone resorption in female Japanese immigrants in Brazil : a ten-week study. *J Am Coll Nutr*, 21, 560-563.
- Young R, May H, Murphy S, Grey C & Compston JE (1996) Rates of bone loss in peri- and postmenopausal women : a 4-year, prospective, population-based study. *Clin Sci*, 91, 307-312.
- Zittermann A, Geppert J, Baier S, Zehn N, Gouni-Berthold I, Berthold HK, Reinsberg J, Stehle P (2004) Short-term effects of high soy supplementation on sex hormones, bone markers, and lipid parameters in young female adults. *Eur J Nutr*, 43, 100-8.



# Effets des phyto-estrogènes sur le système nerveux central, les fonctions cérébrales et cognitives

Michel Pugeat, Catherine Bennetau, Mariette Gerber

Les récepteurs des estrogènes sont largement distribués dans le système nerveux central (Kuiper 1998; Shughrue 1997). Chez le rongeur les estrogènes exercent des effets sur le comportement, le mouvement, la reconnaissance et la perception de la douleur. Ils semblent également limiter le développement des processus dégénératifs (McEwen 1999). Les phyto-estrogènes qui possèdent une affinité de liaison significative pour le récepteur des estrogènes, en particulier le récepteur  $\beta$  ( $ER\beta$ ) et l'hypothèse de leur capacité à exercer chez l'Homme un effet sur le système nerveux central et les fonctions cognitives est donc posée.

Ce chapitre rapporte les arguments expérimentaux, les études épidémiologiques et les études d'intervention qui ont recherché un effet des phyto-estrogènes sur les fonctions cognitives et le vieillissement des grandes fonctions du système nerveux central (SNC)). Il présente également les effets des phyto-estrogènes (essentiellement isoflavones et coumestrol) sur la fonction hypothalamique et hypophysaire y compris sur le noyau sexuellement dimorphique de l'aire pré-optique de l'hypothalamus connue pour son rôle dans le contrôle du comportement sexuelle.

## I - Transfert des phyto-estrogènes dans le SNC

### I – 1. Données chez l'homme

Chez l'Homme, il n'existe pas de travaux qui ont étudié le transfert des phyto-estrogènes dans le SNC. Cependant, contrairement aux rongeurs, la barrière cérébro-méningée n'est pas développée pendant la vie fœtale et pour cette raison le SNC pourrait être plus vulnérable à l'effet des phyto-estrogènes pendant la vie intra utérine. Par ailleurs les effets sur l'axe hypothalamo-hypophysaire peuvent être plus marqués dans la mesure où ces tissus neuro-endocrines communiquent avec le reste de l'organisme via un système vasculaire porte tout à fait particulier.

### I – 2. Données chez le modèle de laboratoire

Chez le rat, l'étude de Lephart. (2000) a rapporté des concentrations d'isoflavones 37 fois inférieures dans le SNC que dans le sang circulant, après l'administration d'isoflavones (600 mg/kg d'aliment soit 15 mg/j soit 60mg/kg pc/j) pendant 35 jours. Une étude de Chang (2000) a comparé les concentrations de génistéine dans le sang périphérique et les tissus après une exposition *in utero*, soit par le lait maternel soit par un apport alimentaire de doses croissantes de génistéine aglycone (0 à 500 mg/kg de nourriture soit 0, 0,5, 10 et 50mg/kg pc/j) pendant toute la gestation et jusqu'à 3 heures avant le sacrifice pour les mesures faites. Les données concernent des individus sacrifiés au sevrage (21 jours) et à 140 jours post-natal. Les résultats montrent que les concentrations circulantes de génistéine n'étaient pas différentes chez les femelles et chez les mâles au sevrage et à 140j (exemple des données obtenues pour 50mg/kg pc/j 2 vs 1,9 au sevrage et 6 vs 8 micromol/L à 140j pour les mâles et les femelles respectivement) mais que les concentrations dans le cerveau étaient différentes chez les femelles et les mâles, le cerveau des femelles contenant 50% d'aglycones alors que celui des mâles ne contenait que des aglycones. Les valeurs mentionnées étaient de 0,04 pmole/mg de protéine pour les mâles et 0,03 pmole/mg de protéine pour les femelles. Ces valeurs sont à comparées à celles mesurées dans d'autres tissus. Chez les mâles l'organe contenant le plus d'isoflavone (conjuguées ou non) était la prostate avec 1,09 pmole/mg de protéine et celui qui en contenait le moins était la thyroïde avec 0,41 pmole/mg de protéine. Chez la femelle l'organe en contenant le plus était le foie avec 7,33 pmole/mg de protéine et celui en contenant le moins était l'ovaire avec 1,07 pmole/mg de protéine.

## **II - Mécanisme moléculaire des effets des phyto-estrogènes sur le système nerveux central**

Les mécanismes moléculaires en cause, ont été rapportés dans le chapitre « effets non génomiques des phyto-estrogènes ». Nous distinguons ici les effets possiblement impliqués dans les processus dégénératifs et la cognition d'une part et ceux ayant trait à la fonction hypothalamo-hypophysaire d'autre part.

### **II - 1 Phénomènes possiblement impliqués dans les processus cognitifs :**

On note :

- une augmentation de l'expression du « brain-derived neurotrophic factor » (BDNF) chez les femelles de rats castrées supplémentées en phytoestrogènes pendant 8 semaines (Pan 1999a; 1999b)
- une réduction de la concentration de protéines impliquées dans la mort des neurones comme la calbindine et la calrétinine, deux protéines de liaison du calcium impliquées dans un effet protecteur des maladies neuro dégénératives après exposition pendant 5 semaines à un apport de 600 mg/kg d'aliment (soit 60 mg/kg pc/j) chez le rat adulte mâle (Lephart 2000). Cet effet de diminution de la calbindine a été retrouvé chez les fœtus femelles mais pas chez les mâles après exposition *in utero* (200 mg/kg d'aliment chez les mères) (Taylor 1999)
- une réduction de la phosphorylation de la protéine tau, une protéine des microtubules dont la phosphorylation est associée aux mécanismes neurodégénératifs, après une exposition prolongée aux phytoestrogènes chez le singe cynomolgus (Kim 2000)
- une augmentation de la cyclo-oxygénase (COX-2) dans le cortex frontal une enzyme impliquée dans la réponse inflammatoire et dans l'évolution des maladies dégénératives du cerveau, après supplément de 600 mg d'isoflavones/kg d'aliment (soit 60mg/kg pc/j) pendant la lactation et la vie adulte (Lund 2001a).

### **II-2 Phénomènes impliqués plutôt dans le contrôle hypothalamo-hypophysaire**

On note l'absence d'effet sur l'aromatase du cerveau médiobasal et de l'aire sexuellement dimorphique de l'aire préoptique et l'absence d'effet sur la concentrations des hormones stéroïdes sexuelles du cerveau après un supplément alimentaire de 600 mg de phyto-estrogènes/kg d'aliment (soit 60 mg/kg pc/j) pendant 29 jours chez le rat (Weber 2001).

Il n'y a pas de preuves expérimentales que ces effets des phyto-estrogènes sur les protéines de liaison du calcium et sur l'inflammation observées chez l'animal soient également observés chez l'Homme.

## **III - Effets comportementaux des phyto-estrogènes chez l'animal**

Là encore on peut distinguer des effets portant plutôt sur la fonction hypothalamo-hypophysaire et le comportement sexuel et des effets traduisant une action sur les processus cognitifs ou d'apprentissage.

### **III – 1 Effets sur l'axe hypothalamo-hypophysaire :**

Plusieurs effets des phyto-estrogènes ont été rapportés sur le comportement sexuel des animaux :

- *La réduction de la lordose apprécié comme index de capacité d'accouplement a été étudiées chez des femelles de rates castrées recevant 46 mg/kg d'isoflavones per os pendant 5-6 jours après un traitement d'estradiol. Ce comportement de lordose est un comportement d'acceptation du mâle chez la femelle en chaleur. Il résulte de la forte sécrétion d'estradiol par le follicule mûr dit de Graaf quelques heures avant l'ovulation. Cet effet est génomique et passe par l'Er $\alpha$ . L'estradiol naturellement diminue la concentration d'ER $\beta$  dans le noyau paraventriculaire de l'hypothalamus*

alors que dans le noyau ventromédian il augmente la production du récepteur de l'ocytocine par un processus purement génomique passant par  $ER\alpha$ . Dans une première étude (Patisaul 2001) travaillent sur des rates castrées auxquelles ils injectent ou non des doses physiologiques d'estradiol pour induire le comportement de lordose. Ils examinent ensuite les effets d'un traitement en isoflavones (génistéine + daïdzéine) sur le comportement d'accouplement, l'expression du récepteur à l'ocytocine dans noyau ventromédian de l'hypothalamus et l'expression des ARNm du  $Er\beta$  dans le noyau paraventriculaire de l'hypothalamus. Ils montrent que les phytoestrogènes diminuent le comportement d'accouplement en association avec l'estradiol, augmentent la concentration des ARNm du  $ER\beta$  dans le noyau paraventriculaire lorsqu'ils sont administrés seuls et diminuent légèrement la synthèse des récepteurs à l'ocytocine dans le noyau ventromédian. L'estradiol quant à lui, seul ou en combinaison avec les isoflavones a l'effet inverse. Les auteurs suggèrent donc un effet anti-estrogénique de l'apport d'isoflavones. Dans une deuxième étude (Patisaul 2002) les auteurs testent cette fois la génistéine seule à 100 et 500 ppm vs un aliment témoin dans les mêmes conditions que précédemment. Là encore ils analysent les mêmes critères. Cette fois ils n'observent pas d'effet sur le comportement d'accouplement ni sur la synthèse du récepteur à l'ocytocine en revanche la synthèse des ARNm de  $Er\beta$  du noyau paraventriculaire est augmentée. Ils en déduisent que la génistéine a un effet anti-estrogénique essentiellement via  $Er\beta$  alors qu'elle n'a pratiquement pas d'effet via  $ER\alpha$ . Le rapprochement de ces deux études suggérerait, sans toutefois le démontrer complètement, que le mélange des isoflavones sériques issues de la consommation de soja (génistéine, daïdzéine et équol) n'a pas la même action que la génistéine seule et que des interactions avec  $ER\alpha$  sont possibles avec le mélange.

- *l'apprentissage de la mémoire spatiale visuelle* explorée dans un système de labyrinthe, a permis de montrer que cet apprentissage est lié au sexe. Les mâles exposés de façon prolongée à 600 mg d'isoflavones/kg d'aliments (soit 60 mg/kg pc/j) pendant la vie fœtale et ensuite ont une réduction de leur capacité d'apprentissage au contraire des femelles qui améliorent leur capacité avec le même apport d'isoflavones (Lund 2001a). Cet effet des phytoestrogènes, facilitant chez les femelles ou délétère chez les mâles, suggère un effet direct des phytoestrogènes par l'intermédiaire des récepteurs des estrogènes et un effet de l'imprégnation estrogénique. Cet effet est réversible après l'arrêt de l'exposition aux phytoestrogènes.
- *Le coumestrol à dose alimentaire perturbe le comportement sexuel de jeune rat mâles exposés en néonatal via le lait maternel* (Whitten, 1995). Les mères reçoivent 100 ppm après la mise bas et pendant la durée de la lactation. Les résultats obtenus sur les petits exposés via le lait maternel sont résumés ci-dessous. Il faut noter que c'est l'une des premières études qui montre une atteinte de la fonction de reproduction des mâles liée à l'absorption de phyto-estrogènes.

Tableau 1.

Tests réalisés	Durée du traitement	% du témoin
<b>Fonction gonadotrophique femelle</b>		
mise en place d'un œstrus persistant	D1-D10	100% ns
	D1-D21	49%
Pic de LH induit par E <sub>2</sub> et P	D1-D21	13%
<b>Comportement sexuel du mâle</b>		
Latence avant l'accouplement	D1-D10	325%
Latence avant l'éjaculation	D1-D10	777%
Taux d'accouplement	D1-D10	30%
Taux d'éjaculation	D1-D10	24%
taille du testicule	D1-D10	93% ns
Taux plasmatique de testostérone	D1-D10	76% ns

### III - 2 Effet sur les processus cognitifs

Peu d'études en comparaison sont disponibles à ce jour sur l'effet des phyto-estrogènes sur ces processus *in vivo* chez l'animal.

*l'apprentissage de la mémoire spatiale visuelle* explorée dans un système de labyrinthe, a permis de montrer que cet apprentissage est lié au sexe. Les mâles exposés de façon prolongée à 600 mg d'isoflavones/kg d'aliments (soit 60 mg/kg pc/j) pendant la vie fœtale et ensuite ont une réduction de leur capacité d'apprentissage au contraire des femelles qui améliorent leur capacité avec le même apport d'isoflavones (Lund 2001a). Cet effet des phyto-estrogènes, facilitant chez les femelles ou délétère chez les mâles, suggère un effet direct des phyto-estrogènes par l'intermédiaire des récepteurs des estrogènes et un effet de l'imprégnation estrogénique. Cet effet est réversible après l'arrêt de l'exposition aux phyto-estrogènes.

### III - 3 Effet sur les territoires cérébraux de la locomotion

*Le coumestrol n'exerce pas d'effet locomoteur* chez les femelles de souris castrées après exposition au coumestrol par injection sous-cutanée (10 µg/kg /jour) pendant 12 jours, contrairement à l'effet de l'estradiol qui dans ce modèle augmente l'activité locomotrice (Garey 2001). En revanche le coumestrol inhibe l'effet du benzoate d'estradiol. On observerait donc un effet anti-estrogénique. Ce sont dans ce cas la région médiane de l'aire pré-optique et l'amygdale qui seraient impliquées.

### IV - Effets anatomiques et endocriniens des phyto-estrogènes chez l'animal

Les effets des estrogènes sur la fonction sexuelle cérébrale et par suite sur le comportement et le fonctionnement de l'axe hypothalamo-hypophysaire reposent essentiellement sur l'étude morphologique du noyau sexuellement dimorphique de l'aire pré-optique de l'hypothalamus et sur la sécrétion de LH suite à une injection de GnRH ou LHRH. Dans ce domaine de nombreuses études convergent pour montrer une diminution du pic de LH par des doses alimentaires de coumestrol (Whitten 1998). Avec la génistéine les doses nécessaires pour obtenir cet effet sont plus importantes et relèvent généralement de la pharmacologie (Whitten 1998).

La taille du noyau sexuellement dimorphique de l'aire pré-optique de l'hypothalamus présente un dimorphisme sexuel (noyau plus important en taille chez les mâles que chez les femelles) et dépend de l'exposition aux hormones stéroïdes sexuelles chez le rongeur. Cette zone convertit les androgènes en estrogènes par le biais de l'aromatase et contrôle la sécrétion des gonadotrophines. Les estrogènes sont responsables du développement du noyau sexuellement dimorphique de l'aire pré-optique de l'hypothalamus pendant une phase limitée dans le temps essentiellement prénatale chez le rongeur et néonatale chez les

primates. L'étude des variations de taille du noyau sexuellement dimorphique de l'aire pré-optique de l'hypothalamus est considérée comme un bon modèle d'étude de l'effet des estrogènes chez les rongeurs (Rhees 1999).

Les rongeurs ne semblent pas des modèles très pertinents pour une extrapolation à l'Homme car la structure du noyau sexuellement dimorphique de l'aire pré-optique serait différente entre les deux espèces (Byne 1998) et la sexualisation du cerveau ne semble se terminer qu'après la naissance au cours des six premiers mois de la vie, notamment du fait de la forte activité de sécrétion de testostérone par les testicules (Forest 1975). C'est pour cela que certains auteurs préfèrent étudier les primates.

#### **IV -1-1 Isoflavones**

*L'exposition néonatale par des doses croissantes de génistéine* (0 à 1000 µg par jour) chez la rate castrée augmente le volume du noyau sexuellement dimorphique de l'aire pré-optique de l'hypothalamus mais seulement aux doses les plus fortes (Faber 1993). La génistéine diminue la réponse de la sécrétion de LH par l'hypophyse après stimulation par l'hormone hypothalamique GnRH avec un effet dose dépendant pour des doses comprises entre 0 et 100 µg par jour de génistéine.

*L'administration sous cutanée de génistéine* (0,2 à 4 mg/kg de poids et par jour) chez les femelles de rat pendant les 6 premiers jours de la vie puis par voie orale (40 mg de génistéine par kg de poids et par jour) du 7<sup>ème</sup> au 21<sup>ème</sup> jour post natal augmente de façon modeste la taille des noyaux sexuellement dimorphiques de l'aire pré-optique mesuré entre les jours 44 et 57 de la vie, mais seulement pour les plus fortes doses de génistéine, et sans effet significatif en comparaison des mâles du même âge (Lewis 2002). Chez les mâles aucun effet n'est observé à ces doses de génistéine administrées en sous cutané. Cet effet de la génistéine est interprété comme un effet de type estrogène sur le SNC. Il pourrait s'interpréter comme une masculinisation des femelles.

Dans une autre étude, l'exposition à la dose de 600 mg d'isoflavones par kg d'aliment (soit 60 mg/kg pc/j), *in utero*, puis pendant la période de lactation et les 120 premiers jours de vie chez les rats, augmente les concentrations d'isoflavones à 15 µM, et, uniquement chez les mâles mais pas chez les femelles, augmente la taille du noyau sexuellement dimorphique de l'aire pré-optique de l'hypothalamus en comparaison à un groupe non exposé aux phyto-estrogènes (Lund 2001b). Cette fois on a plutôt une « hypermasculinisation » des mâles et une absence d'effet chez les femelles.

Les données pourraient paraître contradictoires mais les doses utilisées n'étant pas les mêmes et les moments d'exposition étant différents on peut aussi supposer que les différences observées entre ces études sont liées à la variation de ces deux facteurs. Rappelons pour mémoire qu'*in utero* les fœtus sont confrontés aux estrogènes maternels qui sont présents à fortes concentrations. Ce n'est plus vrai au cours de l'exposition néonatale.

#### **IV-1-2 Coumestanes**

Le coumestrol, administré pendant la vie utérine aux doses de 0,1, 1 et 10 µg par jour n'entraîne aucun effet sur la taille des noyaux pré optiques mais une réduction de la réponse de LH induite par injection de GnRH, aux doses les plus élevées et uniquement chez les femelles (Register 1995).

#### **IV - 2 Le modèle du primate**

Une étude chez les primates (Shively 2003) a étudié l'influence des hormones stéroïdes sur la réponse au stress et comparé l'effet à long terme l'effet de l'administration d'estrogènes équin ou de protéines de soja (contenant 129 mg/jour d'isoflavones aglycones) chez des femelles primates de cynomolgus castrées. Les activités de la tryptophane hydroxylase (TPH) et de la protéine de transport de capture de la sérotonine (SERT) et la dégradation de cette protéine qui conditionnent les niveaux de sérotonine a été étudiée *in vitro* sur différents prélèvements du SNC. Cette étude montre que l'effet de l'état de soumission des femelles, qui est associé à une diminution du contenu en SERT, est indépendant du statut hormonal, mais qu'en revanche les estrogènes et les phyto-estrogènes atténuent ce comportement et s'opposent à la diminution du contenu en SERT

indépendamment du statut social, avec un effet plus marqué chez les femelles castrées. La diminution de la sérotonine chez les femelles dominées et carencées en estrogènes pourrait contribuer à une plus grande vulnérabilité à la dépression et l'anxiété, et, chez les primates, les estrogènes ou les phytoestrogènes pourraient améliorer cette situation indépendamment des contraintes sociales.

## **V - Effets des phyto-estrogènes chez l'Homme**

### **V - 1 Estrogènes et fonctions cognitives**

Dans la perspective, toujours évoquée, de la mise en parallèle du THS et de l'apport complémentaire d'isoflavones, un rappel de l'état des connaissances sur la relation estrogènes fonctions cognitives et risque de démence chez la femme âgée ménopausée paraît nécessaire.

- ❖ La revue générale de la littérature publiée par Yaffe en 1998 est une méta analyse de 10 études qui ont recherché à montrer un effet de l'administration d'estrogènes sur les fonctions cognitives et le risque de démence chez la femme ménopausée. Ce travail a souligné la contradiction des résultats et les problèmes méthodologiques qui ne permettaient pas de conclure à un effet préventif significatif. En tout état de cause ces données ne permettaient pas de recommander la prescription d'estrogènes pour la prévention de la maladie d'Alzheimer ou d'autres démences associées au vieillissement. Toutefois, ce domaine de recherche est actuellement en plein essor et cette conclusion ne doit pas être jugée comme définitive.
- ❖ La Women's Health Initiative Memory Study (WHIMS) est un bras ancillaire de la WHI qui par une étude contrôlée en double aveugle contre placebo a recherché les effets du traitement par les estrogènes équin (0,625 mg/j) associés ou non à la médroxyprogestérone (2,5 mg/j) sur la dégradation des fonctions cognitives et le risque de développer une démence, dans une cohorte de femmes âgées de 65 à 79 ans. Cette étude a été arrêtée en juillet 2002 du fait de l'augmentation significative du nombre d'événements cardiovasculaires, et notamment d'accidents vasculaires cérébraux dans le groupe recevant des estrogènes seuls ou associés au progestatif. Les résultats de la WHIMS ont été publiés par Shumaker et al (2004) et rapportent 47 événements de démence dans le bras estrogène seul (n=2947) contre 19 dans le groupe placebo (hazard ratio de 1,49 ; pour un intervalle de confiance à 95% de 0,83-2,66) sans différence significative dans le groupe estrogène associé à la médroxyprogestérone (n=4532). La dégradation des fonctions cognitives était également plus élevée dans le groupe traité que dans le groupe placebo (76 vs 58 événements). Cette étude a montré que le traitement hormonal substitutif n'est pas recommandé pour la prévention de la démence et de l'altération des fonctions cognitives après 65 ans.
- ❖ L'effet des estrogènes sur les fonctions cognitives a été rapporté dans un deuxième travail par la WHIMS (Espeland 2004) qui a étudié en double aveugle 1387 femmes recevant un estrogène équin (0,625 mg/jour) contre un groupe placebo de 1421 femmes âgées de 65 à 79 ans. Elle montre que les fonctions cognitives évaluées par le « Modified Mini-Mental State Examination » (3MSE) se dégradent de façon plus significative sous estrogènes que sous placebo avec un risque de perdre 10 points sur le score de la 3MSE de 1,47 (IC à 95% 1,04-2,07) sur une période moyenne de 5,4 ans.

## **V - 2 Fonctions cognitives**

### **V – 2-1 Etudes épidémiologiques**

En ce qui concerne les phyto-estrogènes une seule étude d'épidémiologie analytique, a été rapportée la cohorte longitudinale de Honolulu Heart Program. Elle rapporte l'association de consommation de tofu avec la détérioration des fonctions cognitives estimées par un score composite (CASI) et l'atrophie cérébrale (White 2000). Mais elle souffre de biais



méthodologiques importants dans l'évaluation de l'apport alimentaire et l'analyse statistique. En outre, l'âge, l'éducation, les caractéristiques socio-économiques, le temps de vie au Japon sont des facteurs importants de la détérioration cognitive, co-variables de la consommation de tofu. Nous ne retenons donc pas cette étude pourtant très médiatisée aux USA.

## **V - 2 - 2 Etudes d'intervention**

L'étude de *File (2001)* est réalisée dans une population d'étudiants volontaires âgés de 22 à 30 ans (12 filles et 15 garçons) des effets de l'administration pendant 10 semaines en double aveugle contre placebo de protéines de soja traitées à l'alcool pour extraire les isoflavones puis enrichies en 0,5 (phyto-low) ou 100 mg (phyto-rich) d'isoflavones. Les tests de la fonction cognitive comportaient des tests d'attention, de mémorisation des événements récents ou anciens, et d'humeur. Dans le groupe recevant la plus forte dose d'isoflavones, une amélioration des tests de mémorisation ( $p < 0,05$ ), de flexibilité mentale ( $p < 0,05$ ) et d'humeur était observée uniquement chez les femmes faisant comme précédemment ressortir une potentialisation de l'effet des isoflavones par l'imprégnation oestrogénique.

Celle de *Duffy (2003)* rapporte les effets d'un complément alimentaire administré pendant 12 semaines, en deux fois 30 mg (matin et soir) « d'équivalents-isoflavones » (Solgen 40) dans un essai contrôlé, randomisé et en double aveugle sur 36 femmes ménopausées âgées de 50 à 65 ans, dont l'apport nutritionnel était contrôlé. Ils montrent que ce traitement de courte durée améliore significativement la mémoire épisodique, la flexibilité mentale évaluée sur la base des 5 premiers items du test IDED et impliquant le lobe frontal et les tests d'attention soutenue (PASAT) impliquant le lobe frontal et le thalamus (deux aires cérébrales présentant des Erβ). Le traitement n'a pas eu d'effet sur les tests d'anxiété, l'endormissement, l'agressivité et les troubles climatiques.

La dernière *Kritz-Silverstein (2003)* rapporte 6 mois de traitement avec 110 mg d'isoflavones extraites du soja en complément alimentaire, dans un essai contrôlé, randomisé et en double aveugle sur 53 femmes ménopausées. La méthodologie est moins rigoureuse que dans la précédente (pas de contrôle de l'apport nutritionnel, batterie de tests moins complète et moins spécifique). La fonction est évaluée entre autre par des tests d'attention visuelle, d'aisance catégorielle, de mémoire logique et de souvenir avant l'apport de phyto-estrogènes vs placebo et après 6 mois de traitement. Seul le test d'aisance catégorielle est significativement amélioré par rapport au score de départ mais aussi par rapport au groupe placebo. Les autres tests montrent également une amélioration mais non significative.

Ces études d'intervention suggèrent un effet favorable des isoflavones sur les fonctions cognitives. Toutefois, les données sont fragmentaires et les essais cliniques n'ont, à ce jour, porté que sur des durées courtes qui ne permettent pas l'observation d'effets sur la dégradation réelle des processus cognitifs.

## **V - 3 Risque de démence**

Aucune étude n'a étudié le risque de démence associée à la consommation d'isoflavones. En revanche une étude française a montré dans une cohorte de 1367 sujets âgés de plus de 65 ans et suivis sur 5 ans que le risque de démence ajusté pour l'âge, la consommation de vitamine C, le sexe et le niveau culturel était inversement associé à la consommation de flavonoïdes avec un RR de 0,49 entre le tertile de plus faible consommation vs les tertiles de plus forte consommation (*Commenges 2000*).

## **Conclusion**

### **Effet des phyto-estrogènes sur l'axe hypothalamo-hypophysaire**

Bien que des effets de type hormonal soient observés chez l'animal sur l'axe hypothalamo-hypophysaire, des données manquent notamment sur l'incidence chez l'Homme d'une exposition néonatale à des concentrations importantes de phyto-estrogènes (cas des nourrissons). Rappelons tout de même l'étude de (*Sharpe 2002*) (citée dans le chapitre

concernant les nourrissons) réalisée chez le singe marmoset nouveau-né. Ce modèle de primate est considéré comme correct pour évaluer les conséquences de l'effet de perturbateurs endocriniens chez l'Homme. Cette étude montre une perturbation de la sécrétion néonatale de testostérone chez les petits mâles attribuée à une perturbation de l'axe hypothalamo-hypophysaire.

Sans faire d'analogie à la situation humaine, il paraît essentiel de se poser la question des conséquences de l'exposition néonatale aux phyto-estrogènes sur la fonction gonadique.

#### **Effets sur la fonction cognitive.**

Les études chez l'Homme quoique peu nombreuses, de courte durée, et portant sur des effectifs faibles, suggèrent un effet favorable de la consommation de phyto-estrogènes sur les fonctions cognitives des adultes jeunes et de la femme ménopausées. Ces résultats demandent confirmation.

## Points clés et recommandations

### Points clés

- ❖ Le transfert des phyto-estrogènes à travers la barrière cérébro-méningée semble minime chez l'Homme sauf peut être pendant la période fœtale avant la mise en place de cette barrière méningée.
- ❖ Les effets rapportés sur l'inflammation et sur les protéines impliquées dans les mécanismes de neuro-dégénérescence rapportés chez les rongeurs restent à démontrer chez l'humain
- ❖ Les effets anatomiques des phyto-estrogènes sur le noyau sexuellement dimorphique de l'aire pré-optique de l'hypothalamus des rongeurs qui traduisent un effet des isoflavones sur l'axe hypothalamo-hypophysaire ne semblent significatifs que pour une exposition pharmacologique *in utero* alors qu'en néonatal des doses alimentaires peuvent être actives. Si les données obtenues chez les rongeurs sont difficilement extrapolables directement à l'espèce humaine celles sur les marmosets nouveau-nés posent question.
- ❖ Les études cliniques disponibles suggèrent un effet favorable des isoflavones sur les fonctions cognitives, mais elles sont insuffisantes en nombre et en effectif pour constituer une preuve solide.

### Recommandations

#### 1/ Recommandations à visée de connaissance et de recherche

- ❖ L'étude du transfert des phyto-estrogènes à travers la barrière cérébro-méningée et les concentrations résultantes libres ou conjuguées des phyto-estrogènes dans le cerveau en comparaison des concentrations d'estrogènes endogènes devrait faire l'objet d'une étude plus documentée
- ❖ Si les études d'épidémiologie analytique apparaissent difficile à mettre en oeuvre, on peut cependant faire des études de suivi sur les populations consommant des phyto-estrogènes dans des conditions fiables de doses et de durée, en partenariat avec le réseau des prescripteurs.
- ❖ Concernant les effets des phyto-estrogènes sur l'hypothalamus et l'hypophyse en exposition néonatale, les recherches doivent être encouragées.

#### 2/ Recommandations à visée d'information du consommateur.

- ❖ Dans l'état actuel de nos connaissances, dans l'attente d'étude d'intervention contrôlée qu'il faut encourager, aucune étude humaine pertinente ne permet d'autoriser d'allégation de prévention de la dégradation des fonctions cognitives chez la femme aux dérivés du soja ou aux suppléments d'isoflavones.
- ❖ Comme déjà mentionné il faut être prudent quant à l'utilisation des formules infantiles à bases de protéines de soja chez le nourrisson.

- Byrne W. The medial preoptic and anterior hypothalamic regions of the rhesus monkey: cytoarchitectonic comparison with the human and evidence for sexual dimorphism. *Brain Res.* 1998, 793:346-350.
- Chang HC, Churchwell MI, Delclos KB, Newbold RR, Doerge DR. Mass spectrometric determination of genistein tissue distribution in diet-exposed Sprague-Dawley rats. *J Nutr.* 2000, 130:1963-1970.
- Commenges D, Scotet V, Renaud S, Jacqmin-Gadda H, Barberger-Gateau P, Dartigues JF. Intake of flavonoids and risk of dementia. *Eur J Epidemiol* 2000 16:357-363.
- Duffy R, Wiseman H, File SE Improved cognitive function in postmenopausal women after 12 weeks of consumption of a soya extract containing isoflavones. *Pharmacol Biochem Behav*, 2003;75:721-9.
- Espeland MA, Rapp SR, Shumaker SA, Brunner R, Manson JE, Sherwin BB, Hsia J, Margolis KI, Hogan PE, Wallace R, Daley M, Freeman R, Hays J. Conjugated equine estrogens and global cognitive function in post menopausal women. Women's Health Initiative Memory Study. *JAMA* 2004 ; 291 :2959-2968.
- Faber KA, Hughes CL Jr. Dose-response characteristics of neonatal exposure to genistein on pituitary responsiveness to gonadotrophin releasing hormone and volume of the sexually dimorphic nucleus of the preoptic area (SDN-POA) in postpubertal castrated female rats. *Reprod Toxicol.* 1993, 7:35-39.
- File SE, Jarrett N, Fluck E, Duffy R, Casey K, Wiseman H. Eating soya improves human memory. *Psychopharmacol.* 2001, 157:430-436.
- Flynn KM, Ferguson SA, Delclos KB, Newbold RR. Effects of genistein exposure on sexually dimorphic behaviors in rats. *Toxicol Sci.* 2000, 55:311-319.
- Forest MG, Cathaird AM. Pattern of testosterone and 14-androstenedione in normal newborns: evidence for testicular activity at birth. *J Clin Endocrinol Metab* 1997;41:977-980.
- Garey J, Morgan MA, Frohlich J, McEwan BS, Pfaff DW. Effects of the phytoestrogen coumestrol on locomotor and fear-related behaviours in female mice. *Horm Behav.* 2001, 40:65-76.
- Goddard, I. W. Soy-induced brain atrophy? *J Anti Aging Med*, 2003;6:335-6.
- Jacob DA, Temple JL, Patisaul HB, Young LJ, Rissman EF. Coumestrol antagonizes neuroendocrine actions of estrogen via the estrogen receptor alpha. *Exp Biol Med.* 2001, 226:301-306.
- Kritz-Silverstein, D., Von Muhlen, D., Barrett-Connor, E. & Bressel, M. A. (2003) Isoflavones and cognitive function in older women: the SOY and Postmenopausal Health In Aging (SOPHIA) Study. *Menopause*, 2003; 10:196-202.
- Kuiper GG, Lemmen JG, Carlsson B, Corton JC, Safe SH, van der Saag PT, van der Burg B, Gustafsson JA. Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor beta. *Endocrinology.* 1998,139:4252-4263.
- Lephart ED, Thompson JM, Setchell KDR, Adlercreutz H, Weber KS. Phytoestrogens decrease brain calcium binding proteins but do not alter hypothalamic androgen metabolising enzymes in adult male rats. *Brain Res.* 2000, 859:123-131.
- Lephart ED, West TW, Weber KS, Rhees RW, Setchell KDR, Adlercreutz H, Lund TD. Neurobehavioral effects of dietary soy phytoestrogens. *Neurotox Teratol.* 2002, 24:5-16.
- Lund TD, Rhees RW, Setchell KDR, Lephart ED. Altered sexually dimorphic nucleus of the preoptic area (SDN-POA) volume in adult Long-Evans rats by dietary soy phytoestrogens. *Brain Res.* 2001, 914:92-99.
- Lund TD, West TW, Tian LY, Bu LH, Simmons DL, Setchell KDR, Adlercreutz H, Lephart ED. Visual spatial memory is enhanced in female rats. *BMC Neurosci.* 2001, 2:1-13.
- McEwan BS. Clinical review 108: The molecular and neuroanatomical basis for estrogen effects in the central nervous system. *J Clin Endocrinol Metab.* 1999, 84:1790-1797.
- Pan Y, Anthony M, Clarkson TB. Effect of estradiol and soy phytoestrogens on choline acetyltransferase and nerve growth factor mRNAs in the frontal cortex and hippocampus of female rats. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1999b, 221:118-125.
- Pan Y, Anthony M, Clarkson TB. Evidence for up-regulation of brain-derived neurotrophic factor mRNA by soy phytoestrogens in the frontal cortex of retired breeder female rats. *Neurosci Lett.* 1999a, 261:17-20.
- Patisaul HB, Dindo M, Whitten PL, Young LJ. Soy isoflavone supplements antagonize reproductive behavior and estrogen receptor alpha- and beta-dependent gene expression in the brain. *Endocrinol.* 2001, 142:2946-2952.
- Patisaul, H.B., Melby, M., Whitten, P.L., Young, L.J. (2002) Genistein affects ER beta- but not ER alpha-dependent gene expression in the hypothalamus. *Endocrinology*, 143, pp.2189-97.
- Rhees, B.K., Ernst, C.A., Miao, C.H., Atchley, W.R. (1999) Uterine and postnatal maternal effects in mice selected for differential rate of early development. *Genetics*, 153, pp.905-17.
- Rhees, R.W., Al-Saleh, H.N., Kinghorn, E.W., Fleming, D.E., et al. (1999) Relationship between sexual behavior and sexually dimorphic structures in the anterior hypothalamus in control and prenatally stressed male rats. *Brain Res Bull*, 50, pp.193-9.
- Register B, Bethel MA, Thompson N, Walmer D, Blohm P, Ayyash L, Hughes Jr C. The effect of neonatal exposure to diethylstilboestrol, coumestrol, and 17-sitosterol on pituitary responsiveness and sexually dimorphic nucleus volume in the castrated adult rat. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1995, 208:72-77.
- Sharpe, R. M., Martin, B., Morris, K., Greig, I., McKinnell, C., McNeilly, A. S. & Walker, M. Infant feeding with soy formula milk: effects on the testis and on blood testosterone levels in marmoset monkeys during the period of neonatal testicular activity. *Hum Reprod*, 2002, 17 (7):1692-1703.
- Shively CA, Mirkes SJ, Lu NZ, Henderson JA, Bethea. Soy and social stress affect serotonin neurotransmission in primates. *The Pharmacogenomics Journal* 2003; 3:114-121.

Shughrue PJ, Lane MV, Merchenthaler I. Comparative distribution of estrogen receptor-alpha and -beta mRNA in the rat central nervous system. *J Comp Neurol*. 1997, 388:507-525.

Shumaker SA, Legault C, Kuller L, Rapp SR, Thal L, Lane DS, Fillit H, Stefanick MI, Hendrix SL, Lewis CE, Masaki K, Coker LH. Conjugated equine estrogens and incidence of probable dementia and mild cognitive impairment in post menopausal women. Women's Health Initiative Memory Study. *JAMA* 2004 ; 291 :2947-2958.

Taylor H, Quintero EM, Iacopino AM, Lephart ED. Phytoestrogens alter hypothalamic calbindin-D28k levels during prenatal development. *Brain Res Develop Brain Res*. 1999, 114:277-281.

Weber KS, Setchell KD, Lephart ED. Maternal and perinatal brain aromatase: effects of dietary soy phytoestrogens. *Develop Brain Res*. 2001, 126:217-221.

White LR, Petrovitch H, Ross GM, Masaki K, Hardman J, Nelson J, Davis D, Markesbery W. Brain ageing and midlife tofu consumption. *J Am Coll Nutr*. 2000, 19:242-255.

Whitten PL, Lewis C, Russell E, Naftolin F. Phytoestrogen influences on the development of behavior and gonadotropin function. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1995 ;208(1):82-86.

Whitten PL, Naftolin F. Reproductive actions of phytoestrogens. *Baillieres Clin Endocrinol Metab*. 1998, 12(4):667-690.

Yaffe K, Sawaya G, Lieburg I, Grady D. Estrogen therapy in postmenopausal women. Effects on cognitive function and dementia. *JAMA* 1998;279:688-695.



# Effet des phyto-estrogènes sur les cancers

Mariette Gerber, Marie-Chantal Canivenc-Lavier, Thierry Maudelonde

Les cancers sont la deuxième cause de mortalité en France, après les maladies cardiovasculaires. Chez la femme avant 65 ans, ils sont même la première cause de mortalité. Malgré les progrès, la thérapeutique reste bien souvent impuissante à endiguer le processus de cancérogenèse, et les avancées sont largement dues aux pratiques de diagnostic précoce. C'est dire l'importance de la prévention primaire par l'identification et la prise en compte des facteurs de risque, que l'on tentera d'éliminer, et des facteurs de protection (ou de réduction de risque) que l'on favorisera.

Il a été dit depuis plusieurs années que des changements favorables dans les habitudes alimentaires pourraient réduire l'incidence des cancers de 35% (Doll 1981), chiffre réactualisé par le World Cancer Research Fund (1997) avec le chiffre de 23% uniquement pour la prévention par les fruits et légumes.

Les phyto-estrogènes font partie de ces microconstituants végétaux susceptibles de participer à la prévention des cancers d'une part à cause de leurs propriétés, décrites dans les chapitres précédents, d'autre part à cause des observations des études écologiques sur les incidences des cancers dans les pays asiatiques où les aliments riches en phyto-estrogènes sont largement consommés, comparés aux pays dont l'alimentation est de type occidental. Les phyto-estrogènes les plus souvent étudiés sont les isoflavones de soja, dans les populations asiatiques, et ce en regard du cancer du sein.

Nous analyserons les données sur les cancers pour lesquels les études épidémiologiques ont étudié la relation avec la consommation de phyto-estrogènes, évaluée soit par questionnaire, soit par biomarqueurs. Les données expérimentales viendront compléter cette étude. L'accent sera mis sur les études chez l'animal : les études mettant en évidence un effet indésirable décrites dans le chapitre « Sécurité » seront simplement abordées ici. Les mécanismes seront également évoqués sur la base de données biochimiques et/ou de données d'études *in vitro* présentées au sein de ce chapitre dans le volet « mécanisme des phyto-estrogènes ».

## I - Rappel des étapes et mécanismes de la cancérogenèse

### I-2 Définition

Les cancers surviennent dans des organismes dont les tissus se renouvellent constamment. Ils correspondent à l'acquisition progressive de propriétés anormales représentant le phénotype cancer et qui permettent aux cellules impliquées de former des tumeurs qui peuvent tuer l'organisme. Le phénotype malin acquis par les cellules qui deviennent cancéreuses comporte les caractéristiques suivantes :

- perte du contrôle de la croissance ;
- résistance à l'apoptose ou mort cellulaire programmée ;
- une multiplication cellulaire à l'infini (immortalité) ;
- la faculté de créer un réseau vasculaire (angiogenèse tumorale) ;
- la faculté d'envahir les tissus voisins ;
- la propriété de pouvoir coloniser et de survivre dans un environnement ectopique (métastases).

### I-3 Physio-pathologie de la cellule cancéreuse

Il s'agit d'une maladie du génome (Volgestein 1998) le plus souvent acquise par la création d'altération de la structure de l'ADN par des agents mutagènes ou carcinogènes. Il peut exister des facteurs génétiques à transmission germinale.

Deux grandes familles de gènes sont impliquées dans les mécanismes de la cancérogenèse :

- les *oncogènes* qui sont normalement présents dans la cellule mais dont l'expression est normalement réprimée ou régulée. L'apparition de mutations ou d'une dérégulation de leur expression par des agents carcinogènes provoque des altérations cellulaires retrouvées

dans les cellules cancéreuses. La fréquence des mutations spontanées survenant lors de la replication de l'ADN ( $10^{-6}$ - $10^{-7}$  par gène et par génération) (Drake 1998) est insuffisante à expliquer l'incidence des cancers (Loeb 1991). De nombreux agents, dits carcinogènes ou agents mutagènes, sont capables de provoquer des lésions de l'ADN et d'augmenter la fréquence de mutation. Ils s'agit de virus, de substances environnementales telles que les radiations UV, le tabac ou bien des produits du métabolisme normal de la cellule tels que les agents du stress oxydant (anions superoxydes, les radicaux hydroxylés ) (Cadet 1997, Hoeijmakers 2001) ;

- les *gènes suppresseurs* dont les produits répriment le développement du cancer (Sherr 2004). On peut définir deux grandes catégories de gènes suppresseurs (Kinsler 1997):

- Ceux codant pour les protéines qui préviennent ou réparent les altérations génétiques (les caretakers) et protègent le génome des mutations acquises de type oncogénique. Ils agissent en préservant l'intégrité de la cellule et sa survie. Ils codent donc pour des protéines telles que celles qui sont impliquées dans le remplacement de l'ADN endommagé ou dans les erreurs de la réplication de l'ADN ainsi que celles qui maintiennent la longueur des télomères. Ce sont des gènes qui ont été hautement conservés dans la chaîne de l'évolution;
- L'autre catégorie de gènes suppresseurs empêche le développement des cellules potentiellement cancéreuses (gatekeepers) dans le cadre d'une régulation au niveau du tissu ou de l'organisme en bloquant la prolifération ou en induisant la mort cellulaire afin de protéger l'organisme. Ce sont des gènes qui contrôlent les réponses cellulaires de la mort cellulaire programmée ou du vieillissement (Kirkwood 2000).

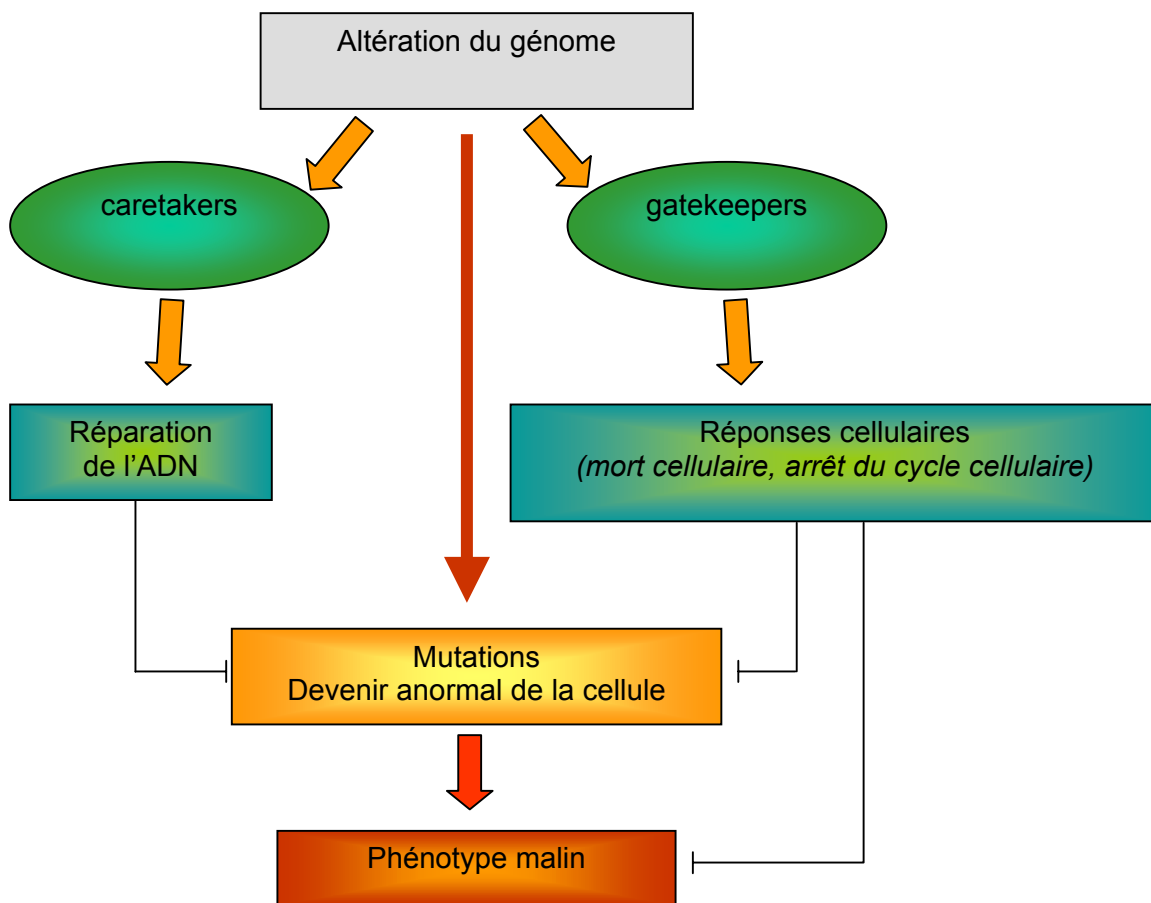


Figure 1. Mécanismes de suppression de tumeur, d'après Campisi (2003)



### **I-3 Initiation et progression des cancers**

La cancérogenèse est un processus à étapes successives qui nécessite l'apparition de plusieurs mutations somatiques. On dissocie classiquement deux étapes : l'initiation qui correspond à la première mutation et la progression qui est l'étape de constitution et de développement de la tumeur (Moolgavkar 1981). Il est aussi bien établi qu'une altération de l'expression d'un ou de plusieurs gènes suppresseurs est une étape précoce et nécessaire à la cancérogenèse (Jones 2002). Plusieurs modèles mathématiques ont tenté d'expliquer la progression du cancer : l'angiogenèse (Anderson 1998), la réponse immune contre les tumeurs (Owen 1999), l'instabilité génétique (Chang 2003, Strauss 1998) et la résistance aux drogues (Goldie 1983). Cependant une prédiction mathématique du devenir des tumeurs passe par une meilleure compréhension des mécanismes biologiques des cancers et des étroites dépendances entre les divers phénomènes précités. Le modèle théorique amenant à une meilleure compréhension de l'évolution des tumeurs est encore à découvrir (Nowak 2004).

### **I-4 Mécanismes moléculaires de la cancérogenèse**

Ils sont schématiquement au nombre de deux :

- l'un est génétique et consiste en une altération de la séquence d'un gène ou d'une partie plus importante d'un chromosome sous l'effet d'agents mutagènes (virus, radiations, produits environnementaux...);
- l'autre est épigénétique et se définit par tout ce qui est héréditaire au niveau cellulaire et qui ne correspond pas à la séquence de l'ADN. Il s'agit de la méthylation de l'ADN, de l'empreinte parentale et de la modification des histones qui sont les protéines nucléaires auxquelles est associé l'ADN pour former les nucléosomes. Des altérations de l'empreinte parentale ont été mises en évidence dans des maladies tel que le syndrome de Wiedemann Beckwith (Mannens 1994) qui s'accompagne d'une augmentation de l'incidence de néoplasie et la tumeur de Wilms (Ogawa 1993). Des hypométhylations des régions promotrices de gènes tel que l'oncogène HRAS (Feinberg 1983), la cycline D2 (Oshimo 2003) ou l'HPV16 dans les cols utérin (Badal 2003) ont aussi été retrouvées dans les cancers entraînant leur hyperexpression. A contrario, des hyperméthylations anormales des régions promotrices de gènes suppresseurs ont été retrouvées dans les cancers (Kane 1997) conduisant à leur hypo-expression.

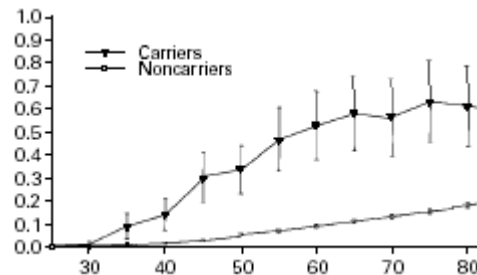
*La transmission germinale de mutation de gènes suppresseurs augmente l'incidence des cancers*

L'expression d'un gène suppresseur ne nécessite la présence que d'un seul allèle de type sauvage pour donner une protéine normalement fonctionnelle. Pour ne plus exprimer la protéine normale il faut une mutation sur chaque allèle ou une hyperméthylation sur celui qui n'est pas muté (Grady 2000). S'il s'agit d'un gène clé pour le contrôle de l'intégrité du génome, le risque de cancer s'en trouve alors très augmenté (Knudson 1971). Par contre la transmission germinale d'une mutation sur un allèle augmente la susceptibilité à faire un cancer. Un seul évènement est alors nécessaire pour augmenter l'incidence des cancers.

*L'hyperméthylation des régions promotrices des gènes suppresseurs est un mécanisme épigénétique qui paraît essentiel dans les stades précoces de la cancérogenèse*

Il existe maintenant de nombreux arguments, *in vitro*, pour penser qu'une baisse de l'expression du gène suppresseur est aussi un mécanisme important dans les formes somatiques (Paz 2003). Cette diminution de l'expression du gène suppresseur se fait, au moins pour partie, par hyperméthylation de sa région promotrice (Esteller 2003) contrastant avec l'hypométhylation générale de l'ADN de la cellule cancéreuse. Des études de plus en plus nombreuses confirment la présence de cette hyperméthylation dans les formes somatiques de cancers (colon : Arai 2004 ; ovaire : Wang 2004 ; sein : Esteller 2000, Staff 2003). La possibilité de détecter cette hyperméthylation dans les cellules tumorales présentes dans le sérum pourrait être un argument pour développer une telle technique (Dulaimi 2004)

Ainsi, dans les formes héréditaires à forte pénétrance (par ex. BCRA 1 et 2 du cancer du sein et de l'ovaire), la première lésion génomique existe déjà dans la cellule, transmise par les cellules germinales. La cellule porteuse de mutation sera donc hautement vulnérable et répondra facilement et précocement aux facteurs génomiques et environnementaux qui la feront progresser vers les étapes suivantes (Struewing 1997)



**Figure 2. Risque de cancer du sein provoqué par les mutations de BRCA1 et BRCA2 et incidence liée à l'âge. D'après Struewing (1997)**

Pour le cancer du colon, les différents stades cliniques et les altérations génomiques correspondantes sont bien décrits ainsi que certains facteurs de risque à chacune des étapes. Pour le cancer de l'estomac, différentes étapes cliniques et les facteurs environnementaux qui y participent sont également connus. Pour le cancer du sein, si certaines étapes cliniques peuvent dans certains cas être décelées par le dépistage précoce, souvent encore, la tumeur clinique est le premier signe d'appel.

Les facteurs alimentaires peuvent jouer un rôle à chacune des étapes et les mécanismes en sont divers. Les aliments peuvent contaminer l'organisme par ingestion de carcinogènes chimiques ou au contraire diminuer les risque de carcinogénèse : c'est le cas des micronutriments végétaux (antioxydants, composés phénoliques) qui pourraient agir à la phase d'initiation par leur action de détoxification des carcinogènes (effet sur les enzymes de phase I et II), en favorisant l'apoptose, et/ou à la phase de promotion en inhibant les messagers secondaires (espèces réactives d'oxygène). Les acides gras alimentaires ne semblent pas être génotoxiques, donc auraient peu ou pas de rôle à la phase d'initiation (Rapport AFSSA-NACRe, 2003). L'effet des acides gras polyinsaturés pourrait s'exercer à la phase de promotion où les dérivés peroxydés pourraient jouer un rôle dans la signalisation cellulaire notamment dans la synthèse des eicosanoïdes par les cyclo-oxygénases (la cyclo-oxygénase 2 est surexprimée dans les cancers colo-rectaux) et certaines protéines kinases. Ils pourraient également à ce stade interférer avec la flore colique pour synthétiser des *sn*-1,2-DG qui activent la PKC et de là favorisent la prolifération cellulaire. Cette activité est plus élevée avec de régimes riches en AG n-6 qu'avec des régimes riches en AG n-3.

Les effets les mieux identifiés s'exercent à la phase de croissance tumorale et de progression avec une activité apoptotique exercée notamment par les acides gras à longue chaîne n-3 et peut-être les CLA. Le mécanisme est lié soit à la peroxydation, soit à l'action sur le gène *Bcl/2*. A ce stade, on retrouve le possible effet délétère des AGPI n-6 et la voie des cyclo-oxygénases pour leur rôle dans l'angiogénèse tumorale. Les acides gras à longue chaîne n-3 s'opposent à ce mécanisme par compétition du substrat.

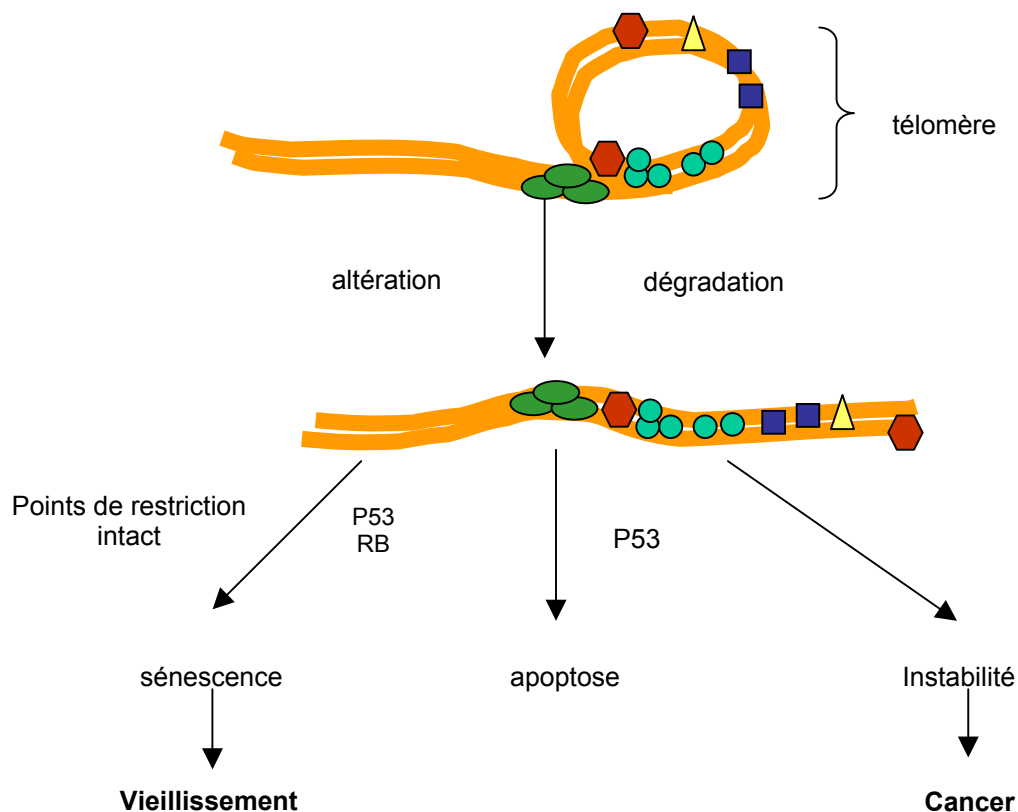
Enfin il faut mentionner le rôle indirect des lipides comme contributeur à l'apport calorifique, à la constitution de l'obésité et au syndrome métabolique, tous trois facteur de risque des cancers colo-rectaux et hormono-dépendants. Certains CLA pourraient jouer un rôle spécifique dans la prévention de l'obésité (Gauillier 2004) ou l'apparition du syndrome métabolique (Riserus 2002 ; Taylor 2004).

## **I-5 Relation entre le vieillissement et le cancer**

### *Le vieillissement pourrait protéger du cancer*

Le vieillissement cellulaire est étroitement lié à la taille de l'ADN. A ses extrémités existent des structures ADN-protéines appelées télomères qui permettent aux enzymes de réparation

de l'ADN de ne pas confondre l'extrémité de l'ADN avec des cassures anormales de l'ADN. La structure des télomères protège donc, de façon mal connue, la dégradation de l'extrémité terminale des chromosomes (Makarov 1997). Dans bon nombre d'organismes, la taille de l'ADN est maintenue constante grâce à la télomérase qui permet, lors de la réplication de l'ADN de reconnaître l'extrémité des télomères. Cette enzyme est présente dans les cellules germinales mais elle ne s'exprime plus dans la plupart des cellules somatiques (Kim 1994). En l'absence de télomérase, lorsque le chromosome se réplique les systèmes de réplication ne peuvent alors aller jusqu'à l'extrémité du chromosome et la taille du télomère se raccourcit. Lorsque le télomère atteint une taille critique, la cellule arrête définitivement de se multiplier et subit des modifications morphologiques ainsi qu'une altération d'un certain nombre de fonctions biologiques que l'on appelle sénescence cellulaire. En culture de fibroblastes humains on assiste à un raccourcissement progressif des télomères (Allsopp 1995). Dans les tissus donnés pour des greffes par des donneurs âgés on remarque une grande fréquence de télomères raccourcis ainsi que des caractéristiques cellulaires de sénescence (Dimri 1995). Cet arrêt du cycle cellulaire tout comme l'apoptose sont sous le contrôle des gènes suppresseurs P53 et RB (Kohn 1999). La P53 qui a un rôle majeur est même appelé gardien de l'intégrité du génome. Il peut induire le vieillissement en cas d'anomalie cellulaire. Il s'agit peut-être là d'une des explications à l'évolution plus lentes des tumeurs chez les personnes âgées.



**Figure 3. Conséquence cellulaire du dysfonctionnement des télomères, d'après Kim (2002)**

*Le vieillissement peut être aussi un facteur de risque de cancer*

L'âge est le premier facteur de risque de cancer et, en pathologie humaine, deux raisons coexistent pour expliquer ce phénomène : d'une part l'accumulation au cours de la vie des facteurs environnementaux qui concourent au développement tumoral et des mécanismes de biologie cellulaire : le syndrome de Werner qui entraîne un vieillissement prématuré de l'individu est associé à une incidence élevée de cancer épithéliaux (Epstein 1966). En culture cellulaire de fibroblastes, le vieillissement entraîne la sécrétion de protéines de la matrice extra cellulaire, des enzymes de dégradation de la matrice, des cytokines inflammatoires et

des facteurs de croissance (Campisi 1996). Dans un organisme âgé, les cellules sénescents sont nombreuses et leurs sécrétions anormales peuvent perturber la physiologie et l'intégrité des tissus (Krtolica 2001). D'autre part, lors du vieillissement cellulaire apparaît une augmentation de la fréquence des aberrations chromosomiques qui a été mise en évidence dans expériences de cultures de cellules embryonnaires humaines (Benn 1976). La réponse « vieillissement » nécessite donc un fonctionnement correct de la P53 et RB au niveau de la régulation du cycle cellulaire et de la réparation de l'ADN endommagé. La cellule peut alors mourir. En cas d'altération des régulations assurées par ces 2 gènes suppresseurs le dysfonctionnement télomérique peut entraîner une instabilité génomique (Campisi 1996). S'il existe une mutation de la P53 dans une cellule vieillissante, l'arrêt de la prolifération cellulaire, au décours du raccourcissement critique des télomères ne se fait plus de même que l'apoptose ce qui favorise l'instabilité génomique et une incidence accrue de cancer. De même, l'instabilité génomique provoquée par le raccourcissement des télomères peut entraîner des mutations de la P53 ou de RB qui peuvent supprimer la réponse « sénescence » au raccourcissement des télomères (Zhang 1999). Le génome devenu instable amène très vraisemblablement à la mort cellulaire. Mais dans quelque cas, la cellule pourrait par un événement épigénétique ou mutationnel stabiliser ses télomères et alors devenir cancéreuse. Le moyen le plus courant pour stabiliser est de ré-exprimer la télomérase et plus spécifiquement sa composante catalytique (Kim 1994). La cellule devient alors immortelle en maintenant la taille de ces télomères.

*Il existe une relation entre le raccourcissement des télomères et l'apparition d'une instabilité génomique*

De nombreux arguments ont été retrouvés chez les animaux de laboratoire et en pathologie humaine suggérant fortement cette relation entre vieillissement et cancer. Des expériences d'inactivation du gène de l'ARN de la télomérase (mTR) chez la souris ont montré que le raccourcissement du télomère pouvait induire une instabilité chromosomique (Blasco 1997) (Hemann 2001). Cette observation a été confirmée par des travaux chez la levure qui ont montré que les levures déficientes en télomérase, ont un raccourcissement du télomère et une augmentation du nombre de réarrangements chromosomiques (Hackett 2001). Les données sont seulement indirectes chez l'humain. En effet, la télomérase, présente dans les cellules germinales humaines disparaît dans les cellules somatiques et Harley (1990) Il ont montré que les télomères des fibroblastes en culture se raccourcissaient au fil des divisions cellulaires et de leur vieillissement. Dans des études utilisant une technique d'hybridation *in situ*, un raccourcissement des télomères a été montré dans la quasi-totalité des néoplasies pancréatiques *in situ* analysées (Van Heek 2002), dans 96% des néoplasies intra épithéliales prostatiques de haut grade étudiées (Meeker 2002) et dans 97% des lésions pré-invasives en général (Meeker 2004).

*L'instabilité chromosomique arrive précocement dans la cancérogenèse et est associée à un raccourcissement des télomères*

Un dysfonctionnement du télomère peut être induit par des mutations dans des gènes particuliers qui causent des syndromes de prédisposition au cancer tel que la dyskératose congénitale, le syndrome de Bloom, le syndrome de Werner et peut-être l'ataxie télangiectasie. D'autre part, beaucoup de cellules cancéreuses subissent un raccourcissement du télomère sans mutation des gènes qui codent pour des composants de la télomérase qui conduiraient aussi à une instabilité chromosomique. Lorsque la souris Apc+/- qui va développer des néoplasies intestinales multiples lors de la perte de l'allèle Apc restant, a aussi une inactivation de la télomérase, elle développe de façon plus précoce des micro adénomes coliques (Rudolph 2001). Mais en l'absence de possibilité d'activation de la télomérase, la progression de ces adénomes vers le cancer est bloquée

*L'instabilité génomique doit être limitée pour que la cellule cancéreuse puisse se multiplier.*

L'instabilité génomique donne à une tumeur sa grande diversité génétique. Parmi ces cellules cancéreuses certaines vont acquérir la possibilité de proliférer sans contrôle (Teixeira da Costa 2002). Cependant trop d'aberrations génétiques peut nuire à la croissance tumorale (Cahill 1999). Si l'instabilité génétique est liée au raccourcissement des

télomères, alors la réactivation de la télomérase (Kim 1994) pourrait, en allongeant la taille des télomères, limiter l'instabilité génomique (Hackett 2002). Une expression de la télomérase a été effectivement retrouvée dans de nombreux cancers (Shay 1997) (Chadenneau 1995) et pourrait ainsi favoriser la prolifération cellulaire.

#### *Scénario en fonction de l'âge*

L'arrêt de la croissance associé à un vieillissement cellulaire peut être un mécanisme de protection dans un organisme jeune. Isolée au milieu de cellules jeunes, il est probable que ces effets sont négligeables. Par contre, dans un organisme âgé, les cellules sénescents sont nombreuses et leurs sécrétions anormales peuvent perturber la physiologie et l'intégrité des tissus (Krtolica 2001). L'âge pourrait ainsi favoriser l'émergence de cancer par 2 mécanismes. L'accumulation de mutations qui peuvent aboutir à l'inactivation de gènes suppresseurs et la diminution des contrôles normalement assurés par le micro environnement tissulaire provoquée par les cellules sénescents.

## **II- Méthodologie**

### **II-1 Etudes épidémiologiques**

Selon les critères détaillés dans le chapitre « Méthodologie », 2 sur 13 études cas-témoins sur le cancer du sein ont été exclues : celle de Greenstein (1996) pour insuffisance de la mesure de l'apport alimentaire, (consommation oui/non de tofu et autres produits à base de soja), et celle de Witte (1997) portant sur un échantillon de population très particulier (140 cancers bilatéraux et 222 témoins qui étaient des sœurs) avec un questionnaire auto-administré insuffisant (pas de consommation de tofu et autres produits à base de soja versus 1 fois/semaine). Trois (Hirayama 1990, Key 1999, Hulten 2002) sur 7 études prospectives portant sur le cancer du sein ont été exclues pour insuffisance de données sur la mesure de l'exposition pour les deux premières, et difficultés méthodologiques pour la dernière (cas et témoins issus de diverses cohortes initiées à différents temps, ajustement sur les facteurs de risque classique du cancer du sein incomplet) induisant en des résultats incohérents. Une sur 2 études cas-témoin sur le cancer de la prostate a été éliminée (Strom 1999) pour faible effectif (83/107) et insuffisance qualitative et quantitative du questionnaire.

Toutes ces études (cancers du sein et de la prostate) montraient une diminution du risque pour la catégorie la plus élevée de tofu/soja, ou pour la dernière étude, de daïdzéine ou coumestrol, à la limite de la significativité et avec de larges IC, à l'exception de l'étude de Key (1999) où la réduction de risque associée à la consommation de soupe au miso est non significative.

### **II-2 Etudes expérimentales**

La littérature est riche d'études expérimentales dont l'objectif est de démontrer, tant *in vitro* qu'*in vivo*, les effets des phyto-estrogènes sur les mécanismes de cancérogenèse. Cependant, une attention particulière est donnée aux études *in vivo* qui, outre le fait qu'elles permettent de spécifier l'effet des molécules sur les différentes étapes de la cancérogenèse (initiation, promotion, angiogenèse,...), mettent en évidence l'effet des composés estrogéniques sur la morphogenèse des tissus cibles, laquelle joue un rôle tout aussi important dans la prédisposition aux cancers. L'analyse bibliographique a donc été orientée prioritairement sur les études expérimentales *in vivo*, en sélectionnant les études présentant des effets statistiquement validés ou des études histologiques déterminantes. Cette analyse a été complétée par des données d'études *in vitro* qui apportent des informations quant aux mécanismes sous-jacents aux effets observés *in vivo* et qui peuvent appuyer des hypothèses émises par les auteurs. Ces données expérimentales sont systématiquement présentées à la suite des études épidémiologiques pour chacun des cancers considérés. Pour chaque cancer, une première conclusion sera portée en fonction des deux types de données, épidémiologiques et expérimentales.

## **III- Cancer du sein**

Il est le cancer le plus fréquent de la femme avec plus de 40 000 nouveaux cas par an, plus de 11 000 décès (2000) et un taux de 107.7/100 000 (standardisé pour l'Europe, année 1998). En

2000, le taux d'incidence et de mortalité /100 000 standardisé sur la population mondiale était respectivement de 83.19 et 21.41 pour la France et 31.38 et 7.72 pour le Japon.

### **III-1 Facteurs de risque**

La cancérogénèse mammaire est particulièrement complexe (voir paragraphe sur les mécanismes ci-dessus et la figure 4).

*A l'étape de l'induction de la cancérogénèse*, la mutation des gènes suppresseurs BCRA 1 et 2 rend compte des cancers familiaux à forte pénétrance (4 à 8 % des cancers du sein). Une susceptibilité génétique, liée à un polymorphisme génétique d'enzymes de phase 1 et 2 pourrait également jouer un rôle en interaction avec divers facteurs environnementaux (Saintot 2003 et 2004) mais les radiations ionisantes sont le seul facteur environnemental clairement associé au cancer du sein. Il est également fortement suspecté que les cathéchols-estrogènes mutagènes puissent jouer un rôle lors de l'induction de la cancérogénèse. Il est aussi maintenant admis que l'état de différenciation de l'épithélium mammaire modifie le risque de cancer du sein à cette étape (Clavel-Chapelon 2002) : une grossesse précoce entraîne une différenciation cellulaire du tissu mammaire qui augmente la résistance au processus de cancérogénèse, à l'inverse la nulliparité en augmente le risque.

*Lors de la promotion et la progression*, les hormones jouent un rôle essentiel, par leur effet autocrine et paracrine sur la prolifération des cellules mammaires. Tous les facteurs associés et/ou intervenant avec ce métabolisme doivent donc être considérés comme des facteurs de risque de cancer du sein. Ce sont les facteurs liés à la vie génitale (âge précoce aux premières règles et âge tardif à la ménopause, qui assure une plus longue imprégnation estrogénique, mais peut-être également une imprégnation estrogénique à des moments où les tissus présentent une sensibilité particulière (ex : puberté). Ce sont aussi les facteurs liés au mode de vie : l'activité physique intense à l'adolescence qui réduit l'activité gonadale, les facteurs alimentaires qui favorisent la synthèse des estrogènes, ou une modification de leur régulation, ou encore la synthèse d'autres facteurs de croissance (IGF-1). Le rôle des facteurs alimentaires peut directement influencer le taux d'estrogènes circulant (cas de l'alcool), ou indirectement, au travers de l'obésité abdominale, (apport calorique important, apport de fibres insuffisant, et activité physique insuffisante). De plus, on peut noter que le tissu adipeux stocke des cancérogènes, dont des perturbateurs endocriniens, qui peuvent favoriser le cancer du sein (Saintot 2004).

Dans ces conditions, on comprend les difficultés des études épidémiologiques essayant d'isoler l'effet d'un seul de ces facteurs en relation au risque de cancer du sein. Ceci est particulièrement vrai pour les facteurs alimentaires, qui associent une estimation entachée d'erreur à la présence de nombreux facteurs de confusion.

### **III-2 Etudes épidémiologiques**

Les études cas-témoins et prospectives sont classées selon l'origine ethnique de la population considérée, la méthode de mesure de l'exposition, et enfin la période de la vie à laquelle celle-ci a été mesurée. Les différentes familles de phyto-estrogènes, isoflavones et lignanes, sont également considérées.

#### **III-2-1 Etudes cas témoins**

Ces études cas-témoins sont détaillées dans les tableaux 1 (en référence à l'apport alimentaire) et 2 (en référence aux biomarqueurs). Seize études ont été conduites, 9 chez des femmes asiatiques, 1 chez des Indiennes et 6 chez des occidentales (2 sur des femmes nord-américaines caucasiennes, une en Australie, une en Finlande, une sur des Allemandes et une en Grèce). La plupart des études ont estimé l'exposition aux phyto-estrogènes sur l'apport alimentaire mesuré par un questionnaire de fréquence de consommation, plus rarement par biomarqueurs (dosage urinaire ou plasmatique des isoflavones et des lignanes ou de leurs métabolites) : 7 contre 3 chez les asiatiques et 4 vs 2 chez les occidentales.

Par ailleurs, la première étude de Wu (1996, 1998) a fait l'objet de 2 publications différentes, la première portant sur le risque associé à une consommation de tofu et l'autre portant sur l'ensemble des produits dérivés du soja. Elle était conduite dans les deux cas chez des femmes asiatiques vivant aux USA. L'étude chinoise, issue de l'une des études cas-témoins basées sur questionnaire (Dai 2001), a donné lieu à une étude ancillaire portant sur l'alimentation dans l'adolescence (Shu 2001) et à 3 autres différentes publications (Zheng 1999, Dai 2001, Dai 2003) mesurant l'exposition par dosage urinaire. Une des 2 études occidentales (Pietinen 2001) n'a étudié que les métabolites des lignanes par dosage sérique.

**Les études chez les femmes asiatiques**, qui concernent cinq des six études cas-témoins *par questionnaire* et trois études avec *biomarqueurs (dosage urinaire)*, montrent un risque de cancer du sein diminué par le quantile le plus élevé d'exposition aux phyto-estrogènes (issues des produits dérivés du soja). Un test de tendance calculé et significatif a été réalisé dans quatre des études. L'étude de Yuan (1995) ne montre pas de réduction de risque, mais on doit noter que le questionnaire alimentaire utilisé dans l'étude est limité et probablement inapte à mettre en évidence des variations de consommation suffisantes.

Les 2 études qui ont fait porter le questionnaire *sur l'adolescence* (Shu 2001, Wu 2002) montrent que les femmes asiatiques migrantes ayant consommé le plus de produits dérivés du soja à cette époque de leur vie ont un risque de cancer du sein diminué. Dans les rapports de la première enquête de Wu (1996, 1998), la réduction de risque est significative seulement pour les femmes ayant migré adulte aux USA .

Des 4 études qui ont analysé séparément *les femmes non ménopausées et ménopausées* asiatiques, 3 études (dont la mesure de l'exposition est basée sur questionnaire) observent une réduction de risque significative chez les femmes non ménopausées seulement. Celle qui observe une réduction de risque significative chez les femmes ménopausées a utilisé le dosage urinaire comme mesure de l'exposition (Dai 2003). Dans cette étude, des dosages hormonaux montrent que la réduction de risque est retrouvée chez les femmes présentant les taux hormonaux les plus élevés. Une étude trouve une réduction de risque comparable dans les deux classes non ménopausées et ménopausées (Shu 2001).

**L'étude chez les femmes indiennes** en Grande Bretagne fait également apparaître une diminution de risque associée à un apport modéré d'isoflavones et de lignanes (dos Santos-Silva 2004). La plus grande réduction de risque chez les femmes non ménopausées est indiquée pour les lignanes seulement.

**Les études chez les femmes occidentales**, nord-américaines caucasiennes (Horn-Ross 2001, Mac Cann 2004, Linseisen 2004) ou grecques (Peterson 2003), montrent que l'exposition aux isoflavones est très faible : 3.3 mg/jour d'isoflavones totales dans le quantile le plus élevé de l'étude de Horn-Ross ( 2001), comparé à 286.3 mg dans l'étude de Qi Dai (2001). Ce niveau d'apport n'est pas associé à une réduction du risque, sauf dans l'étude de Horn-Ross (2001) : quand l'analyse est stratifiée sur la consommation de jus (« lait ») de soja ou de soyburger (oui/non) , on observe une diminution de risque significative. Notons que le pourcentage de consommatrices est très faible. Au contraire, Linseisen (2004), en Allemagne, malgré des apports également faibles, montre une réduction de risque associée à l'apport le plus élevé d'isoflavones, de matairesinol et d'entérolignanes. Les deux études utilisant les biomarqueurs urinaires<sup>33</sup> chez des femmes australiennes (Ingram 1997) et sériques chez des femmes finlandaises (Pietinen 2001,) montrent des réductions de risque significatives, ainsi que des tests de tendance significatifs.

*En ce qui concerne la relation à la ménopause*, l'étude de Mc Cann (2004) montre que la réduction de risque associée à la consommation de lignanes est significative seulement chez les non ménopausées. L'étude allemande (Linseisen 2004) conduite chez les femmes seulement non-ménopausées montre une réduction du risque limitée aux femmes dont la

---

<sup>33</sup> Il est impossible de comparer les taux urinaires des femmes chinoises et australiennes étant donné l'incompatibilité dans l'expression des résultats.

tumeur est ER+. On peut également supputer que dans l'étude de Pietinen (2001), la réduction de risque observée dans l'échantillon total, constitué de 70 % de femmes ménopausées, est essentiellement due au sous-échantillon des femmes non ménopausées, puisque l'analyse séparée donne des résultats non significatifs pour les deux catégories.

**En résumé**, il semble qu'en ce qui concerne les études cas-témoins, une réduction de risque s'observe chez les femmes asiatiques (y compris les migrantes) quelle que soit la méthode de mesure de l'exposition. Chez les femmes occidentales l'apport de lignanes mesuré par questionnaire ou par dosage pourrait être associé également à une réduction de risque mais les études sont encore rares. Dans les deux populations, l'ensemble des résultats suggère que l'effet de réduction du risque se manifeste dans un état physiologique en situation d'activité estrogénique.

### III-2-2 Etudes prospectives

#### III-2-2-1 Les études

Parmi les sept études prospectives retenues et présentées dans le tableau 3, une a été conduite chez des femmes japonaises (Yamamoto 2003, basée sur un questionnaire alimentaire), et six chez des femmes occidentales : Horm-Ross (2002) et Keinan-Boker (2004) par questionnaire, Grace (2004) par questionnaire et biomarqueurs, et enfin den Tonkelaar (2001), Zeleniuch-Jacquotte (2004) et Kilkkinen (2004) par biomarqueurs.

*L'étude japonaise* par questionnaire (Yamamoto 2003) montre une réduction de risque significative pour la plus forte exposition, exprimée en consommation de soupe miso ou d'isoflavones totales (genistéine). Cette réduction de risque est plus importante chez les femmes ménopausées (68% vs 34%).

**Chez les femmes occidentales**, des six études conduites qui ont recherché l'exposition aux *isoflavones*, trois n'ont pas montré d'association avec le cancer du sein (Horm-Ross 2002, Keinan-Boker 2004, den Tonkelaar 2001) et une montre un risque augmenté, à la limite de la significativité mais avec un test de tendance significatif pour les taux les plus élevés d'équol urinaire et sérique, et pour la daidzéine sérique (Grace 2004).

En ce qui concerne une exposition aux *lignanes* chez les femmes occidentales, l'étude conduite aux Pays-Bas (Keinan-Boker 2004) montre une réduction de risque et un test de tendance à la limite de la significativité associé à l'apport d'enterodiol et entérolactone. Mais dans cette étude la base de données est réalisée à partir de « scores » et non de valeurs mesurées, en particulier celui de l'estimation de l'entérodol et entérolactone, qui peut poser problème). Dans l'étude de Grace (2004), il n'y a pas d'association entre les lignanes et le cancer du sein, que l'exposition soit estimée sous forme d'apport de fibres ou au moyen de dosages urinaire ou sérique. Au contraire les 3 études par biomarqueurs montrent un risque non significativement augmenté pour les quantiles élevés d'entérolactone urinaire ou sérique. Dans l'étude de Kilkkinen (2004), il semble que ce serait les femmes ménopausées qui seraient à risque, alors que les pré-ménopausées bénéficieraient d'une réduction de risque. Mais ces OR sont non significatifs.

#### III-2-2- 2 Au sujet des apports et des dosages

*Les apports mesurés par questionnaire* dans ces études prospectives, montrent encore une très forte différence : la moyenne d'apport du plus faible quartile étant de 6.9 mg  $\pm$  2.6 chez les Japonaises et celle des Californiennes de 1.78 mg (2mg au 80<sup>ème</sup> percentile).

On peut comparer *les dosages urinaires* d'isoflavones et de lignanes de l'étude chinoise cas-témoins (Dai 2003) avec ceux de l'étude hollandaise (den Tonkelaar 2001). Ces deux études portent sur des femmes post-ménopausées, mais avec des méthodologies différentes : transversale cas-témoins pour la première, prospective pour la seconde. On observe comme attendu, que l'excrétion de génistéine est plus élevée chez les Chinoises que chez les Hollandaises (656.1  $\mu$ mole/mole de créatinine vs 110.9  $\mu$ mole/mole de créatinine). Cette



valeur est inférieure à celle observée chez des chinoises atteintes de cancer du sein : 273.7 µmole/mole de créatinine) alors que celle des lignanes y est inférieure (32.8 µmole/mole de créatinine vs 568.9 µmole/mole de créatinine).

En ce qui concerne *les valeurs sériques* d'entérolactone, on observe dans le groupe témoin une moyenne de 25.9 ± 21.9 nmol/L chez des Finlandaises et de 17.2±15.7 chez les américaines (New-York). Il existe une grande variabilité inter-individuelle dans les deux groupes.

### III-2-2-3 Conclusion

*Chez les femmes asiatiques*, la seule étude prospective conduite tend à conforter les résultats des études cas-témoins dans cette population. Chez les femmes occidentales, on constate encore le faible apport d'isoflavones et l'absence d'effet, ou une faible augmentation de risque.

*En ce qui concerne les lignanes* pour lesquelles la consommation est plus conséquente, les résultats sont contradictoires entre les études prospectives et les études cas témoins. Les 4 études cas-témoins qui ont dosé les entérolignanes dans le sérum ou les urines montrent une réduction du risque, alors que les deux études prospectives montrent une augmentation non significative du risque. Les études par apport alimentaire indiquent soit une augmentation de risque à la limite de la significativité (Horn-Ross 2001 et 2002) soit une diminution de risque selon une tendance inversée (Mac Cann 2004) (dos Santos-Silva 2004), soit un risque augmenté (NS) avec l'apport en lignanes et diminué avec l'apport en entérolignanes estimé par les tables de composition (Linseien 2004). La difficulté majeure provient du fait que les lignanes sont des composés très largement répandus dans le monde végétal. Cela s'accompagne quasi-obligatoirement d'une insuffisance des tables de composition en lignanes, et plus encore en entérolignanes, mais le dosage des biomarqueurs devrait pallier cette difficulté. D'autre part, puisque de très nombreux aliments en contiennent, les lignanes sont également présents dans des apports alimentaires pouvant par ailleurs être nocifs. C'est le cas des boissons alcoolisées, facteur de risque pour le cancer du sein : en effet, après ajustement sur la consommation d'alcool, l'association positive avec le secoisolaricirésinol disparaît (Horn-Ross 2002).

### III-2-3 Etudes d'intervention

On admet généralement que seules les études d'intervention peuvent affirmer une relation de cause à effet entre un facteur de risque et une pathologie, bien que l'interprétation de leurs résultats soit soumise aux limites du « design » de l'étude. Etant donné la complexité et le nombre des facteurs de risque du cancer du sein, une étude d'intervention basée sur le critère de l'apparition de la maladie demanderait un effectif très large. Il n'existe pas de marqueurs intermédiaires bien caractérisés (comme par exemple les adénomes dans le cancer du colon).

Les dosages hormonaux, s'ils montrent un taux élevé d'estrogène en réponse à la prise de compléments alimentaires à base d'isoflavones, peuvent suggérer l'existence d'un risque de cancer du sein. Plusieurs études ont suivi cette approche pour analyser l'effet biologique des phyto-estrogènes (Voir chapitre « Effets hormonaux»). Trois autres marqueurs ont été proposés : la cytologie du liquide de sécrétion mammaire, la cytologie de l'épithélium mammaire (épithélium lobulaire), et la densité mammographique. Chacun de ces marqueurs a fait l'objet d'une étude détaillée ci-dessous (Petraakis 1996, McMichael-Phillips 1998, Atkinson 2004).

**La cytologie du liquide de sécrétion mammaire** n'a été utilisée que par son concepteur (Petraakis 1988). C'est ainsi qu'il a montré que des anomalies cytologiques de ce fluide étaient associées à la constipation (et la constipation au cancer du sein, suggérant la nécessité d'un apport important de fibres). Les anomalies cytologiques consistent en une hyperplasie (augmentation de la prolifération) et/ou une atypie cellulaire<sup>34</sup>. Une étude épidémiologique prospective utilisant ce marqueur sur 2700 femmes de 30 à 58 ans a

---

<sup>34</sup> Seule l'hyperplasie atypique est considérée comme un état précancéreux

montré que l'hyperplasie était associée avec un risque modeste de cancer du sein comparé à celui lié à la présence d'atypie (Wrensch 1992). L'étude de Pétrakis (1996) porte sur 24 femmes, dont 14 non-ménopausées et 10 ménopausées ; une aspiration de la sécrétion mammaire est pratiquée chaque mois pendant 12 mois. Les participantes reçoivent une supplémentation de 38g d'isolat de protéine de soja contenant 38mg de génistéine du 4<sup>ème</sup> au 9<sup>ème</sup> mois de l'étude. 7 femmes non ménopausées sur l'ensemble des 24 ont présenté une hyperplasie au moins lors d'un examen entre le 4<sup>ème</sup> mois et la fin de l'étude, mais jamais d'atypie. Quatre des 10 femmes ménopausées utilisaient un THS. Elles n'ont pas montré d'anomalie de la sécrétion mammaire, ce qui étant donné le risque de cancer du sein associé à ce traitement ne plaide pas pour la validité du marqueur. La protéine GCDPF-15 (glycoprotéine sécrétée par l'épithélium canalaire mammaire, et qui est élevée dans les cas de mastose) est significativement diminuée par le traitement chez les femmes non-ménopausées. Les lacunes méthodologiques de l'étude (absence de randomisation, de placebo, petit effectif, absence de contrôle de l'apport alimentaire et de la constipation) enlève de la validité à des résultats déjà difficilement interprétables.

**La cytologie de l'épithélium mammaire (par biopsie):** l'étude de McMichael-Phillips (1998) a également étudié la réponse proliférative à la prise de compléments alimentaires à base d'isoflavones. Cependant, pour d'évidentes raisons éthiques, cette étude a été conduite sur 48 femmes non-ménopausées présentant une maladie du sein bénigne ou maligne. 29 (âge 30.66±8.00) ont consommé un complément soja de 60g, soit 45mg d'isoflavones pendant 14 jours. Le groupe témoin (19, âge 33.55±8.09) ne recevait simplement pas de complément. L'épithélium lobulaire « sain » a été examiné pour mesurer le nombre de cellules en phase S (par l'utilisation de la thymidine tritiée), présentant l'antigène Ki 67 et le récepteur à la progestérone. Après 14 jours, le taux moyen de génistéine était de 500 ± 500 nanoM/L chez les 19 patientes du groupe expérimental. Les marqueurs mesurés paraissent plus élevés dans le groupe expérimental, et le % de cellules marquées à la thymidine était de 1.74±1.72 versus 0.91±0.90 ; de même, le nombre de récepteurs à la progestérone, mesurés par histochimie, étaient significativement supérieur après ajustement sur l'apport alimentaire et la semaine du cycle. Cependant, ces résultats sont si peu convaincants, en particulier à cause de la grande variabilité des taux sériques des patientes (qui peut dépendre de l'âge) du groupe expérimental, mais aussi du protocole de l'étude, que les auteurs les minimisent et préfèrent discuter le possible effet antagoniste de la prise de soja à long terme réduisant ainsi le risque de cancer du sein. Il faut également noter que l'augmentation significative des taux de récepteur à la progestérone signe un effet estrogénique génomique.

**La densité du sein à la mammographie** a fait l'objet de plusieurs études depuis que Boyd (1998) l'ont décrite comme marqueur intermédiaire du risque de cancer. On sait aussi que les femmes ménopausées utilisant le THS présentent une densité mammographique augmentée (Rutter 2001). Une étude préliminaire (Maskarinec 2003) sur 30 femmes a montré l'absence de changement significatifs de la densité mammaire après un an de traitement par 100mg de mélange d'isoflavones correspondant à 76mg d'aglycones ou un placebo. Un essai randomisé, en double aveugle, avec placebo a été conduit sur 177 femmes (Atkinson 2004). Les participantes du groupe expérimental recevaient pendant 12 mois des isoflavones dérivées du trèfle rouge (Promensil®, 26 mg biochanine A, 16 mg de formonétine, 1mg de génistéine et 0.5 mg de daïdzéine). Ce traitement n'a pas induit de modification de la densité du sein à la mammographie. Il n'a pas eu non plus d'influence sur les taux hormonaux ni sur les bouffées de chaleur.

On ne peut conclure à partir des résultats de ces 3 études que des compléments en phytoestrogènes modifient les marqueurs de risque de cancer du sein, et ce quel que soit le statut ménopausal. En revanche il semble y avoir un léger effet estrogénique chez la femme préménopausée. Par contre une étude d'intervention nutritionnelle DIANA a comparé un apport de soja, de graines de lin et autres céréales complètes sur fond macrobiotique à un régime seulement riche en fruits et légumes), chez des femmes post-ménopausées avec un taux sérique de testostérone >0.38 ng , facteur de risque de cancer du sein (Berrino 2001).

Les auteurs ont montré une réduction significative, comparé au témoin, de la biosynthèse et de la biodisponibilité de l'estradiol et de la testostérone, mais également une diminution de l'IMC et des indicateurs d'insulino-résistance dans le groupe expérimental. Ainsi, une approche nutritionnelle globale, riche en isoflavones, lignanes et fibres diminuerait l'intensité des facteurs de risque de cancer.

### **III-3 Données expérimentales**

#### **III-3-1 Les modèles expérimentaux *in vivo***

La cancérogenèse mammaire est surtout étudiée chez les rongeurs. La souris semble le modèle le plus utilisé pour étudier des effets sur la promotion tumorale tandis que le rat est surtout utilisé pour étudier l'effet des molécules sur les différentes étapes de la cancérogenèse (initiation, promotion). Les études de morphogenèse sont rencontrées sur des modèles rats ou souris.

On distingue deux types de cancérigènes utilisés pour initier le développement de tumeurs mammaires. Les agents alkylants directs, tel que le MNU, qui forment directement des adduits à l'ADN, engendrant des altérations génomiques qui, si elles ne sont pas réparées ou si elles sont mal réparées vont conduire à des mutations cellulaires et à l'initiation du cancer. D'autres cancérigènes chimiques sont bioactivés au travers d'un métabolisme oxydatif catalysé par des mono-oxygénases à cytochrome P450. C'est de cas du PhIP et du DMBA. Ce dernier est également biotransformé en composés estrogéniques (Morreal 1979). A noter que les isoformes des CYP 450 impliquées sont les mêmes que celles qui interviennent dans la l'oxydation du 17- $\beta$  estradiol en formes génotoxiques (Coumoul 2002, revue). Ces cancérigènes engendrent tous des cancers hormonaux-dépendants. Après initiation, les tumeurs mammaires se développent rapidement dans les 5 à 6 semaines qui suivent.

#### **III-3-2 Effets des isoflavones**

Les travaux les plus nombreux concernent l'étude des isoflavones chez les rongeurs et sur cultures de cellules issues de tumeurs mammaires d'origine humaine. Ils ont d'abord consisté à discriminer l'effet de type estrogénique des autres effets des isoflavones. Ils ont également exploré l'impact des molécules en fonction des périodes d'exposition, et des modèles de cancérogenèse chimique.

##### **III-3-2-1 Identification d'un effet de type estrogénique en relation avec le cancer**

Les isoflavones ayant différentes cibles cellulaires dont certaines sont indépendantes d'un effet estrogénique (cf chapitre "Mécanismes") les premiers auteurs ont eu le souci de démontrer que l'effet des isoflavones sur la cancérogenèse mammaire résultaient bien d'un effet de type estrogénique.

Lamartinière en 1995 constate les bénéfices d'une exposition néonatale (J2, J4 et J6) en génistéine (500mg/kg pc /rats, sous-cutanée, doses très importantes) sur la cancerogénèse mammaire chimio-induite par le DMBA. Il relie ces effets à des phénomènes d'estrogénicité: ouverture vaginale précoce, uterotrophie, à la diminution du nombre de bourgeons terminaux (TEBs, cibles de la cancerogénèse) de la glande mammaire sur des animaux âgés de 21jours (sevrage) (Lamartinière 1995). Ces effets estrogéniques sur la morphogenèse de la glande mammaire s'expriment également lors d'une exposition prépubertaire (J18, 19 et 20) (Murrill, 1996) avec les même doses extraphysiologiques et sont supprimés en présence de ICI 182 780, un anti-estrogène (Cotronéo 2002). De tels effets sont également décrits avec la formononétine (Wang 1995).

Constatinou (1996) montre que la génistéine et la daidzéine diminuent la multiplicité et de l'incidence des tumeurs lors d'une exposition de 6 mois à partir de J35 (jour où la cancerogénèse mammaire a été initiée par un traitement à la MNU) et que ces effets sont à dissocier de la spécificité de ces molécules à inhiber la topoisomérase II, ou les protéinases kinases PKC, la surexpression de ces protéines dans les tumeurs n'étant pas affectées par le traitement.

La relation phyto-estrogènes/récepteur ER, confirmant l'action de type estrogénique, a été définitivement démontrée par l'utilisation de souris transgéniques : la génistéine augmente la cancérogenèse induite par le DMBA, cancérogène estrogéno-dépendant incapable d'initier des tumeurs dans des souris ERKO n'exprimant pas le récepteur aux oestrogènes (Day 2001).

### **III-3-2-2 Importance de la période et des conditions d'exposition**

Les effets de cette activité estrogénique apparaissent dépendants du moment et de la durée de l'exposition. Les études expérimentales distinguent la période *in utero* (du 15<sup>ème</sup> au 20<sup>ème</sup> jour de gestation) et périnatale (J0 à J8), de la période prépubertaire (18 à 20 jours), pubertaire (25 à 35 jours), et de l'adulte qui est à maturité sexuelle (supérieur à J45). Le statut ménopausal est obtenu par ovariectomies d'animaux matures.

#### ***Exposition in utero et /ou néonatale***

Dans une étude récente portant sur l'impact d'une exposition *in utero* ou prépubertaire de génistéine (administration sous cutanée) à des doses physiologiques (1,5 mg/kg/j) ou pharmacologiques (30 mg/kg/J) chez des rats sur la cancérogenèse induite par le MNU, la génistéine exercerait un effet protecteur (Pei 2003). Elle montre un nombre inférieur de tumeur d'un diamètre supérieur ou égale à 1 cm chez les femelles traitées en prépubertaire avec la faible dose. Dans les autres cas la différence n'est pas significative. Ces effets bénéfiques sont à rapprochés de ceux décrits par Lamartinière, en 1995, qui met en évidence les bénéfices de l'apport en génistéine (500 de génistéine mg/kg pc, sous-cutanée) sur la cancérogenèse mammaire chimio-induite par le DMBA lors d'une exposition néonatale (J2, J4 et J6). Bien qu'aucun effet n'ait été observé sur le développement de la glande mammaire (même nombre de bourgeons terminaux (TEBs) à la périphérie de la glande mammaire), Pei (2003) constate que les bourgeons terminaux des animaux traités à la génistéine présentent i) moins des cellules ER $\alpha$  (+) et PR (+), ii) moins de cellules exprimant la protéine P63 (impliqué dans le renouvellement des cellules tumorales) et iii) un plus faible taux de PCNA, (protéine nécessaire à la prolifération cellulaire). Aux vues de ces travaux, cet effet ne semble donc pas résulter d'une action sur la morphogénèse mammaire, mais cette étude ne comporte pas d'analyse immuno-histochimique au niveau des bourgeons alvéolaires qui permettent de conclure tandis que d'autres travaux, étudiant les effets d'expositions plus longues, apportent des informations opposées. Ainsi, une exposition *in utero* et périnatale à des doses pharmacologiques de génistéine (80  $\mu$ g/kg pc, 400  $\mu$ g/kg pc et 1300  $\mu$ g/kg pc en injection sous-cutanée chez la mère en gestation entraînent une plus grande sensibilité de la progéniture au DMBA (Hilakivi-Clarke 1999a, 1999b, 1999c). (You 2002) ou à la MNU (Yang 2000). Chez des mâles et des femelles exposés *in utero* et au cours de l'allaitement à 30 ou 80 mg/kg pc, sans induction de tumeur, on observe un développement de la glande mammaire plus important significativement chez les mâles que chez les femelles et ce par rapport aux animaux non traités (You 2002) suggérant ici un effet nefaste. Ces effets sont associés à une plus forte représentation du tissu mammaire indifférencié (bourgeons terminaux ; TEBs) au dépend du tissu mammaire différencié (bourgeons alvéolaires) et les glandes mammaires expriment plus fortement les récepteurs ER alpha et plus faiblement la PKC. Ils sont également reliés à la surabondance sérique de dérivés estrogéniques au cours de la gestation, les taux d'estrogènes étant environ 30% plus élevés que chez les témoins. (Hilakivi-Clarke 1994 1998 ; 2001, 2002).

Ces effets rappellent ceux d'une exposition *in utero* au tamoxifène (anti-estrogène partiel) qui entraîne également une plus grande sensibilité de la progéniture femelle aux effets cancérogènes du DMBA associée à une diminution du niveau de différenciation de la glande mammaire (histopathologie) (cf chapitre "Sécurité", Hilakivi-Clarke 2000).

Par ailleurs, d'autres travaux soulignent les risques liés à une multiexposition en composés de type estrogénique sur la morphogénèse de la glande mammaire mâle et femelle (cf chapitre "Sécurité") à ce stade (Foster 2004, You 2002b). Certains auteurs soulignent également l'influence de la dose d'exposition et de la biodisponibilité des molécules. Ainsi, à des doses de 19 mg/kg pc, la daidzeine n'empêche pas le développement de tumeurs mammaires induites par le DMBA (Lamartinière 2002) tandis qu'à des doses physiologiques

(<250 ppm), la génistéine favorise la différenciation et le développement de la glande mammaire, lui conférant une plus grande maturation et donc une moins grande sensibilité aux cancérigènes (Fritz 1998).

Ainsi 5 des 8 études retenues suggèrent un risque lié à une exposition *in utero* ou néonatale en phyto-estrogènes en liaison possible avec leurs effets sur la morphogenèse mammaire (augmentation des TEBs).

#### **Exposition prépubertaire**

A ce stade (J15 à J21), la génistéine aurait un effet préventif via une accélération de la maturation des canaux mammaires (Murril 1996, Lamartinière 1998). L'exposition se traduit par une répression de l'expression du ER  $\alpha$  et du PR, mais à une élévation du ER  $\beta$  dans la glande mammaire (Hilakivi-Clarke 2001) Des résultats similaires ont été retrouvés sur ces derniers paramètres avec du soja sans données précises sur les teneurs en génistéine et daidzéine (Gallo 2001) Mais dans ce cas l'effet sur la multiplication des tumeurs n'est pas très net ; il s'agit surtout d'un ralentissement du processus induit par le DMBA. Des études plus récentes montrent que, cet effet résulterait d'un effet estrogénique puisqu'une exposition prépubertaire en E2 (10  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{j}$  ; J9 à J20) réduit aussi l'incidence des tumeurs induites par le DMBA, et qu'à faible dose, et que ces deux molécules (génistéine 50 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{j}$ ) diminuent la surface de l'épithélium mammaire et le nombre de TEBs mais augmentent la densité des structures lobulo-alvéolaires, suggérant que ces expositions entraînent l'élimination des cibles cellulaires impliquées dans la cancérisation. Ces effets protecteurs sont à relier à une induction persistante de l'expression du gène BCRA1 par ces deux molécules, gène suppresseur de tumeur qui participe à la réparation des altérations génomiques et à la différenciation cellulaire, mais qui réprime également l'expression du ER $\alpha$  (Cabanès 2004).

#### **Exposition à l'âge adulte (>J35)**

La maturité sexuelle apparaît vers la cinquième semaine d'âge chez le rat (J35). Or, les études concernant l'effet des isoflavones lors d'une exposition à l'âge adulte sont peu nombreuses. La génistéine et la daidzéine, administrée à partir de J21 pendant 28 semaines, ont un effet protecteur vis-à-vis de la cancerogenèse mammaire chimio-induite par le DMBA à J50, effet qui s'accompagne avec du soja entier d'une diminution de l'expression du récepteur ER  $\alpha$  et du récepteur de la progestérone (Gallo 2001). Cet effet protecteur vis-à-vis du DMBA est également constaté lors d'une exposition similaire avec de la daidzéine ou des protéines de soja (Constantinou 2001). Cet effet protecteur est également décrit lorsque ces mêmes isoflavones sont administrées à partir du jour J35 (jour d'initiation de la cancerogenèse mammaire par un traitement à la MNU, un cancerogène direct) pendant 6 mois Constantinou (1996) ou en exposant des animaux dans des conditions comparables (4,5 mois à partir de J35) à des extraits de soja (10% du régime), ou à de la Biochanine A (50  $\text{mg}/\text{kg}/\text{J}$  ; dose pharmacologiques). Dans ce cas, les tumeurs développées en présence d'isoflavones ont un indice de prolifération beaucoup plus bas. (Gotoh 1998).

#### **Exposition sur des animaux ovariectomisés (statut ménopausal)**

Les travaux qui décrivent les effets des isoflavones sur des modèles mimant le statut ménopausal sont récents et peu nombreux.

Ueda (2003) montrent qu'une exposition en génistéine pendant 36 semaines sur des animaux ovariectomisés après l'apparition des tumeurs chimio-induites par le DMBA augmente le volume la croissance des tumeurs à faible dose (25 ppm) et tend à la diminuer à forte dose (250 ppm), mais cet effet n'apparaît pas hautement significatif. Cependant, cet effet inhibiteur sur la croissance des tumeurs apparaît proportionnel à la dose de génistéine sur les tumeurs qui apparaissent après l'ovariectomie (Ueda 2003), suggérant un effet à anti-estrogénique.

Dans une étude similaire menée avec la MNU, Allred montre que la génistéine (750ppm) augmente la masse et l'indice de prolifération des adénocarcinomes estrogéno-dépendants (tumeurs ER(+)) chimio-induits. Ces effets s'accompagnent d'un fort taux de cellules prolifératives dans les tumeurs et d'un effet utéro-trophique significatif, indices d'une dose estrogénique. Le taux de génistéine retrouvé dans le plasma étant du même ordre que celui

observé chez des femmes consommant du soja, les auteurs soulignent le fait que la génistéine puissent agir comme un promoteur de la cancérogenèse mammaire lors de la ménopause (Allred 2004). Ces mêmes auteurs ont aussi montré un effet proliférateur de la génistéine à des doses physiologiques (<1mg/kg) ou d'extraits de soja (<300ppm) sur la progression de tumeurs en utilisant des souris nudes ovariectomisées implantée avec des cellules tumorales d'origine humaine ; Dans les deux cas, l'analyse biochimique des tumeurs montre un enrichissement en pS2, un protéine tumorale estrogénique (Ju 2001, Allred 2001)

Outre des effets résultants de leurs propriétés estrogéniques (cf chapitre "Mécanismes"), récents travaux *in vitro* suggèrent que les isoflavones puissent protéger des cancers induits par les hydrocarbures polycycliques (dont le DMBA) par action sur les enzymes impliquées dans la bioactivation des cancérigènes, en particulier des cytochromes P450 1A1 et 1B1 : des effets inhibiteurs de la Baicaleine, de la Biochanine A ou de la génistéine ont été mis en évidence dans les cultures de cellules MCF-7 (Chan., 2002, 2003a), et sur des modèles recombinants humains (Chan 2003b), la daidzeine étant sans effet. Cependant, il faut rester très prudent car la génistéine inhibe les P450 1A et 2E *in vitro* sur fractions microsomales hépatiques de souris (Helsby 1998), mais *in vivo* (0.4 à 40 mg/J, ip X 4 jours) elle est sans effet sur les mêmes mono-oxygénases hépatiques (Helsby 1997). Même si plusieurs travaux, y compris chez l'Homme, constatent que l'absorption d'isoflavones du soja entraîne une modification du métabolisme de l'estradiol qui suggère l'intervention des CYP 1A (Xu 1997, 1998), cette hypothèse n'est pas démontrée expérimentalement.

**En résumé** la littérature fait ressortir deux périodes pour lesquelles une exposition en isoflavones serait défavorable: la période *in utero* et/ou néonatale, et la ménopause. Cependant les mécanismes restent multiples (cf chapitre mécanismes), les isoflavones ayant aussi de nombreux effets non-estrogéniques (cf chapitre "Effets non genomiques...").

L'action des isoflavones sur le cancer mammaire pourrait dépendre conjointement de la période et de la dose d'exposition. A faibles doses, l'action des molécules est de type estrogénique et se traduit par un effet morphogène et promoteur qui concerne surtout les tissus en voie de développement. A forte dose, on peut concevoir que les phyto-estrogènes agissent comme des estrogènes en excès: on sait depuis longtemps que, du moins chez le rat, de fortes doses d'oestrogènes conduisent à une régression des tumeurs induites par le DMBA, et que ce phénomène s'accompagne d'une régression de l'expression des récepteurs des oestrogènes et de la prolactine et à une augmentation des récepteurs à la progestérone dans les tumeurs (Shigaki 1987). Rappelons que les études *in vitro* (E-Screen) rapportent également des effets biphasiques de la génistéine sur la prolifération de cellules mammaire dotées du récepteur ER, stimulant la prolifération pour des doses <10 $\mu$ M et l'inhibant pour des doses >10 $\mu$ M, évoquant un effet agoniste et antagonistes (cf Chapitre mécanismes). Ce dernier effet est observable sur des cellules ER-, suggérant un mécanisme indépendant du récepteur, qui passerait par la capacité à bloquer la prolifération en phase G2/M et à induire l'apoptose. Cependant cet effet n'est observé que pour des doses >10 $\mu$ M, qui ne sont pas atteintes dans le plasma par l'apport alimentaire, et ne peut donc être retenu pour expliquer la possible réduction de risque de cancer du sein. Il en est de même pour l'action anti-oxydante ainsi que pour les effets sur la tyrosine kinase et la topoisomérase II. Il faut se tourner vers des effets mettant en jeu un effet sur les enzymes qui régulent la synthèse et la disponibilité des hormones stéroïdiennes comme l'aromatase comme la 17 $\beta$  et 3 $\beta$ -hydroxydehydrogenase (cf chapitre "Mécanismes"). Plusieurs études d'intervention conduites chez des femmes ménopausées et non ménopausées apportent également des arguments supportant l'effet des phyto-estrogènes, des isoflavones en particulier, sur la biosynthèse et le métabolisme des estrogènes.

### III-3-3 Effets des lignanes

Des extraits riches en lignanes (grains de lin) et des molécules isolées dont l'entérolactone (ENL), l'entérodiol (END), et le secoisolariciresorcinol diglucoside (SDG), ont été étudiés à des doses physiologiques sur différents modèles expérimentaux.

**Lors d'une exposition in utero et /ou neonatale**, ces molécules entraînent une puberté précoce et stimulent le développement de la glande mammaire: peu de bourgeons terminaux et beaucoup de bourgeons alvéolaires, phénomène susceptible réduire le risque de tumeur mammaire, tandis qu'une exposition après le sevrage est sans effet (Tou 1999, Thompson 1999).

**Une exposition strictement lactationnelle** en extrait de lin ou en secoisolariciresorcinol diglucoside, composé majeur issu des graines de lin, diminue effectivement l'incidence des tumeurs chimio-induites (Chen 2003a). Ces effets morphogéniques sur la glande mammaire se traduisent par une augmentation du nombre de cellules épithéliales en prolifération, et s'accompagnent d'une augmentation de la synthèse de facteurs de croissance (EGF) dans les fibroblastes (stroma), mais aussi par une diminution de l'expression ER-béta dans l'épithélium glandulaire (Tan 2004).

**Chez l'animal adulte**, plusieurs travaux font aussi état d'un effet inhibiteur sur la croissance des tumeurs chimio-induites (Serraino 1991), (Hirose 1992, Thompson 1996), (Hirose 2000). Ces effets concordent avec les propriétés antiestrogéniques identifiées *in vitro* (cf chapitre "Mécanismes"). Cependant, chez le rat, l'enterolactone inhibe la croissance des tumeurs chimio-induites (DMBA) à des doses physiologiques (1 à 10 mg/kg/.j) mais n'inhibe pas l'aromatase placentaire ce qui ne permet pas de relier cet effet antiproliférateur à un effet anti-estrogénique (Saarinen 2002).

Par conséquent, aux vues des données actuelles, les lignanes exerceraient un **effet protecteur** sur le cancer mammaire, et ce quelles que soient les périodes d'expositions. Cependant, il est difficile de relier cet effet à un effet directement estrogénique. En effet, les lignanes étant de faibles ligands des récepteurs ERs comparativement aux isoflavones (cf chapitre "Mécanismes").

Des effets mettant en jeu une action sur les enzymes qui régulent la synthèse et la disponibilité des hormones stéroïdiennes comme l'aromatase comme la 17 $\beta$  et 3 $\beta$ -hydroxydehydrogenase est également possible, les lignanes pouvant aussi agir sur ces enzymes, à des doses physiologiques, réalisables par un apport alimentaire. Une orientation du métabolisme des estrogènes vers les formes 2-OH au dépend des 4-OH, décrites comme mutagènes, est également observée (Haggans 1999) (Haggans 2000). Certains auteurs mettent en évidence d'autres effets dont l'aptitude de ces molécules à induire des SHBG, tout simplement à avoir une action anti-oxydante (Wang 2002, Revue). Des études *in vitro* montrent que les lignanes, associées ou non au tamoxifène, réduisent l'adhésion, l'invasion et la migration de cellules tumorales mammaires humaines à des doses physiologiques (< 1 $\mu$ M), suggérant un éventuel effet sur l'invasion tumorale (Chen 2003b)

### III-3-3 Effets des coumestanes

Les études expérimentales *in vivo* sont peu nombreuses. Administré par voie orale, le coumestrol est sans effet sur l'incidence de tumeurs DMBA-chimio-induites chez le rat. (Verdeal 1980). Cependant, plusieurs travaux décrivent à des effets estrogéniques associés à une forte aptitude à se fixer sur les deux récepteurs aux estrogènes (Han 2002, Bentrem 2003, Mueller 2004). Des études *in vitro* sur la lignée tumorale MCF-7 mettent en évidence des effets estrogéniques supérieurs à ceux des isoflavones et comparables à ceux de l'oestradiol (cf chapitre mécanismes): induction de la prolifération cellulaire, diminution de l'expression des ER $\alpha$  et AR, mais augmentation de celle du récepteur à la progestérone (Diel 2001a, 2002). Mais les données expérimentales ne permettent pas d'émettre un avis sur un éventuel effet sur la cancérogenèse mammaire.

### III-4 Conclusion sur le cancer du sein

**D'après les études épidémiologiques**, il semble donc que les phyto-estrogènes puissent exercer un effet favorable sur le risque de cancer du sein.

Un point reste à considérer : pourquoi cet effet est-il retrouvé chez les femmes asiatiques seulement ? Il faut ici faire appel à la dose et au temps d'exposition : on l'a vu, l'apport est

environ dix fois plus important (voir chapitre « Estimation des apports ») en ce qui concerne les isoflavones, et cette exposition existe depuis l'enfance ou l'adolescence, comme souligné par les études de Shu (2001) et de Wu (2002). Ces études montrent que le risque de cancer est plus fortement diminué chez les femmes ayant migré à l'âge adulte, qui ont conservé les habitudes alimentaires de leur pays d'origine, alors que les migrantes de deuxième génération voient diminuer leur consommation de phyto-estrogènes (essentiellement isoflavones) (voir chapitre « Estimation des apports »).

Actuellement on ne peut pas affirmer que cette réduction du risque est spécifiquement liée aux phyto-estrogènes. Seules les études de Wu (2002) de Yamamoto (2003), et de dos Santos-Silva (2004), ont ajusté sur les facteurs nutritionnels autres que l'énergie. Mais on ne peut éliminer complètement la possibilité d'un facteur de confusion résiduel lié aux habitudes alimentaires ou au style de vie. On a montré chez le rat, qu'une alimentation enrichie en acides gras n-3 pendant la gestation augmente le nombre de lobules de la glande mammaire et diminue la sensibilité de la progéniture au DMBA (Hilakivi-Clarke 2001). L'alimentation des Asiatiques, riche en ces nutriments, pourrait ainsi leur conférer une protection liée au développement *in utero* de la glande mammaire. A l'opposé, on peut donc penser que l'apport de compléments alimentaires à base d'isoflavones plaqués sur des habitudes alimentaires et un style de vie occidental n'aurait pas d'effet protecteur sur le risque de cancer du sein.

D'une manière générale, *les études expérimentales chez le rongeur* tendent à mettre en évidence un effet protecteur des phyto-estrogènes vis-à-vis de la cancérogenèse mammaire, Mais il faut rappeler les données du chapitre « Sécurité », paragraphe IV-2-1, point 2 « Tumeurs hormonodépendantes » : trois études *in vitro* montrent que la génistéine peut stimuler la prolifération de lignées de cellules tumorales mammaires estrogéno-dépendantes implantées chez la souris Nude. Une vigilance s'impose donc pour l'apport de phyto-estrogènes chez les femmes qui présenteraient un cancer du sein ER+. Par ailleurs chez le rongeur, l'action des isoflavones sur la tumeur mammaire pourrait dépendre de la période d'exposition. En effet si les études portant sur l'exposition pré-pubertaire et à l'âge adulte concordent dans le sens d'un effet protecteur, la plupart des études indiquent que l'exposition *in utero* et néo-natale aux phyto-estrogènes comporte un risque de développement de tumeur mammaire. Il en est de même dans le cas l'exposition des souris ovariectomisées mimant le statut ménopausal. Ces résultats doivent inciter à la prudence quant à l'apport de phyto-estrogène à ces périodes de la vie.

## **IV- Cancer de l'endomètre**

### **IV-1 Facteurs de risque**

Le cancer de l'endomètre présentait en France, en 2000, des taux d'incidence et de mortalité les plus faibles d'Europe (taux pour 100 000 standardisés sur la population mondiale) respectivement 9.60 et 2.06 ; mais plus élevé qu'au Japon, 4.45 et 1.25.

Le cancer de l'endomètre affecte de façon prédominante la femme ménopausée. L'obésité est le facteur le plus clairement associé à cette tumeur.

L'hyper-estrogénie, absolue ou relative par rapport au taux de progestérone, apparaît comme le facteur de risque sous-tendant le développement du cancer de l'endomètre. Cette hyper-estrogénie peut être liée à une altération du métabolisme des estrogènes se traduisant par une endométriose également retrouvée comme facteur de risque. Lors de la ménopause, l'obésité joue un rôle majeur au travers de la synthèse extra-gonadale des estrogènes, et dans le cas de l'obésité abdominale et de l'insulino-résistance, par une altération de la régulation du métabolisme endocrinien et la sécrétion de facteurs de croissance

Plus récemment, depuis le traitement estrogénique de la ménopause, on a constaté l'apparition de cancers de l'endomètre associés à la prise d'estrogènes sans association aux progestatifs.

### **IV- 2 Etudes épidémiologiques**

Trois études cas témoin ont étudié la relation entre apport de phyto-estrogènes et cancer de l'endomètre (tableau 4), deux conduites aux USA sur des échantillons de femmes multi-ethniques, mais l'une sans femmes asiatiques (Horn-Ross 2003), la troisième en Chine. Les



trois études montrent une diminution de risque associée à la consommation soit i) d'aliments riches phyto-estrogènes mais aussi, en fibres et vitamine C, sans ajustement mutuel sur les différents microconstituants ou aliments (Goodman 1997), ii) soit de phyto-estrogènes (Horn-Ross 2003), iii) soit d'isoflavones, de protéines et de fibres de soja (Xu 2004) sans que l'on puisse faire des ajustements mutuels, ces 3 constituants du soja étant très fortement corrélés.

Chacune des deux études américaines apporte des renseignements particuliers. Dans les deux études les apports d'aliments riches en lignanes ont un effet comparable à ceux des dérivés du soja. Dans la première étude (Goodman 1997), il est montré que l'apport en phyto-estrogènes ne modifie pas le risque de cancer de l'endomètre associé à l'utilisation d'estrogènes sans progestérone. Dans la seconde, (Horn-Ross 2003), l'effet des isoflavones et des lignanes est plus marqué chez les femmes ménopausées, et les femmes obèses consommant peu de ces phyto-estrogènes sont plus à risque.

Ce dernier point associé au fait que l'obésité est un facteur de risque majeur du cancer de l'endomètre, évoque la possibilité d'un mécanisme associé dans ce type de cancer : l'effet sur la masse grasseuse (et sa capacité à synthétiser des estrogènes via l'aromatase) et/ou sur l'insulino-résistance. Dans leur étude d'intervention nutritionnelle DIANA (apport d'isoflavones, lignanes sur fond végétarien comparé à régime seulement riche en fruits et légumes), chez des femmes post-ménopausées avec un taux sérique de testostérone >0.38 ng, Berrino (2001) ont montré un effet significativement différent sur la biosynthèse et la biodisponibilité de l'estradiol et de la testostérone, mais également sur le BMI et les indicateurs d'insulino-résistance (facteurs de risque de ce cancer), tous diminués, dans le groupe expérimental comparé au témoin.

#### **IV-3 Données expérimentales**

Les données expérimentales concernant l'effet des phyto-estrogènes sur les tumeurs de l'endomètre sont surtout réalisées chez l'adulte.

**Chez des animaux adultes**, une expérience de cancérogenèse chimio-induite par injection de MNU dans les cornes utérines (10 mg/kg) montre qu'une exposition prolongée de 30 semaines en isoflavones (10 mg/kg) **diminue** l'incidence d'adenocarcinomes de l'endomètre (Lian 2001). Une exposition (28 jours, 50mg/kg) sur des rats DA/Han syngéniques inoculés avec cellules issues d'adénocarcinomes de l'endomètre (RUCa I) est sans conséquence sur la croissance de ces tumeurs mais diminue l'expression des gènes c-jun et TNF  $\beta$  (Diel 2001b). Dans le même sens, des lignanes et leurs dérivés exercent aussi des effets préventifs sur le cancer de l'endomètre chez le rat: l'hydroxymatairesorcinol (ou l'un de ses métabolites, l'enterolactone et l'hydroxy-entérolactone) incorporé dans un régime non dépourvu de soja (200 et 600 ppm) pendant plus d'un an réduit de manière dose dépendante l'incidence de carcinomes utérins chimio-induits chez le rat (Katsuda, 2004).

**Chez la souris ovariectomisée adulte**, la génistéine (33 mg/kg de poids corporel, 2 semaines) s'oppose aux effets inducteurs du 17 beta estradiol sur l'expression des gènes C-jun, TNF-béata, tandis que la daidzéine inhibe l'induction de l'expression du c-fos et de IL-alpha de l'endomètre, suggérant également un effet protecteur (Lian 2001).

Cependant, une étude de carcinogénicité menée chez la souris dans des conditions d'exposition maximalisées de 50 mg/kg/pc induit une incidence d'adénocarcinome utérin dans la progéniture comparable à celle obtenue avec 1 $\mu$ g/kg de DES (voir chapitre « Sécurité »)

#### **IV- 4 Conclusion**

*A partir des études épidémiologiques* chez la femme, il est difficile dans l'état actuel des connaissances sinon impossible, d'attribuer un rôle spécifique aux phyto-estrogènes basé sur leurs propriétés métaboliques dans la protection contre le cancer de l'endomètre. On peut seulement dire qu'un profil alimentaire basé sur des produits végétaux apportant des

phyto-estrogènes (lignanes notamment, dans les céréales et légumineuses), tendant à diminuer l'obésité, et en particulier l'obésité viscérale, apparaît protecteur (Berrino 2001).

*Les études dans les modèles animaux* sont très peu nombreuses. Une étude montre un effet protecteur, une étude ne montre pas d'effet. Cependant, nous rappelons qu'une étude de carcinogénicité menée chez la souris (voir plus haut chapitre « Sécurité ») montre qu'une exposition néonatale pour une dose forte (50 mg/kg, J1-J5) induit une incidence de cancer de l'endomètre égale à celle obtenue avec le DES, dont on connaît les effets délétères chez la femme (apparition de cancers du vagin et du col de l'utérus chez les femmes traitées par DES pendant la grossesse).

## **V- Cancer de l'ovaire**

### **V-1 Facteurs de risque**

En 2000, le taux d'incidence et de mortalité /100 000 standardisé sur la population mondiale était respectivement de 9.16 et 5.97 pour la France et 6.57 et 3.69 pour le Japon. Sa prévalence tend à s'uniformiser dans le monde avec une diminution dans les pays développés et une augmentation dans les pays en développement .

Les facteurs de risque sont essentiellement liés aux facteurs hormonaux et à la vie reproductive, comme pour le cancer du sein. Des facteurs environnementaux comme l'exposition au talc ou à l'amiante ont été rapportés dans certaines études. L'hypothèse selon laquelle la consommation de produits laitiers en persistance de lactase serait un facteur déterminant du cancer de l'ovaire a été abandonnée (Cramer 1989). L'hypothèse qui fait actuellement l'objet de recherche est celle du syndrome métabolique qui pourrait être un facteur de risque (Bjontorp 2000). Enfin des mutations du gène BCRA-1 sont présentes dans les familles avec une forte incidence de cancer de l'ovaire

### **V-2 Etudes épidémiologiques**

Une seule étude (Mc Cann 2003, tableau 5), cas-témoin, chez des femmes ménopausées montre un OR = 0.43 (IC : 0.21-0.85) pour des femmes consommant >708µg de précurseurs des *lignanes* comparées à celles consommant <304µg avec un test de tendance =0.05. Il faut noter que fruits et légumes ont un effet comparable, mais qui apparaît indépendant dans l'analyse multi-variée.

### **V- 3 Données expérimentales**

Il existe peu de données sur l'effet des phyto-estrogènes sur le cancer de l'ovaire. La génistéine, incorporée dans le régime (25 à 250 ppm pendant 50 semaines) diminue de manière dose dépendante l'incidence de adénocarcinomes ovariens induits par une simple injection locale de DMBA chez le rat (86% et 100% respectivement). Contrairement aux tumeurs développées chez les animaux traités par le DMBA seul, ces adénocarcinomes présentent un indice de prolifération très faible et n'expriment plus les récepteurs hormonaux (ER, AR, et PR), lesquels sont impliqués dans les mécanismes de prolifération (Tanaka 2002). Ces données sont soutenues par des études *in vitro* qui montrent que les isoflavones inhibent la prolifération de cellules tumorales ovariennes (Chen 2001, Gercel-Taylor 2004). Cependant des travaux récents montrent que ces effets ne sont pas tous en relation avec un effet de type estrogénique, mais résulteraient d'une inhibition des urokinases (Kobayashi 2004 )

### **V-4 Conclusion**

*Les études épidémiologiques* sont insuffisantes, mais si l'on retient le rôle du syndrome métabolique on peut faire l'hypothèse de l'effet favorable des lignanes sur les marqueurs de ce syndrome, comme évoqué pour le cancer de l'endomètre et suggéré par l'étude DIANA (Berrino 2001). *Les données expérimentales* suggèrent un effet protecteur mais qui doit être confirmé par d'autres études *in vivo*.

## VI- Cancer de la prostate

### VI-1 Facteurs de risque

Le cancer de la prostate est devenu le premier cancer chez les hommes avec 40 000 nouveaux cas en France (soit avec 10000 décès (année 2000) et un taux de 87.1/100 000 (standardisé pour l'Europe, année 1998). Cette incidence a plus que triplé en 14 ans et cette augmentation existe pour toutes les tranches d'âge à partir de 55-59 ans. En 2000, le taux d'incidence et de mortalité /100 000 standardisé sur la population mondiale était respectivement de 56.45 et 19.23 pour la France et 11.05 et 5.47 pour le Japon.

Ce qui est le plus marquant c'est la similarité des taux de cancers latents observés *post-mortem* à travers le monde alors que le taux de cancers cliniquement diagnostiqués varie de façon importante, suggérant l'importance de l'exposition aux facteurs de risque lors de la phase de promotion. L'augmentation de ces cancers avec l'âge soutient cette hypothèse. Cependant l'explosion des taux de cancers de la prostate observés ces dernières décennies dans les pays développés est largement lié à la détection de l'antigène PSA.

Puisque les facteurs de risque de la phase de promotion apparaissent particulièrement importants, on peut en déduire que les facteurs nutritionnels tiennent un place prépondérante et en premier lieu un excès d'apport calorique, notamment de produits animaux, et de graisses saturées. Les produits laitiers ont été incriminés, notamment en relation avec les taux circulants d'IGF-1 (Signorello 1999), ou l'altération de ses protéines de régulation IGF1BP-1 et 3 (Yu 2000). Plusieurs études ont aussi décrit l'augmentation de risque avec l'apport d'acide  $\alpha$ -linoléique, mais qui pourrait être un marqueur de produits animaux (Rapport Afssa, Acides gras alimentaires et cancers 2003), et la diminution du risque avec l'apport de vitamine E (Helzlsouer 2000).

### VI-2 Etudes épidémiologiques

Elles sont détaillées dans le tableau 6. Ce sont les observations d'épidémiologie écologique qui actuellement suggèrent le mieux une relation entre cancer de la prostate et phyto-estrogènes.

Si l'existence de cancers latents de la prostate ou l'incidence de cancers non-infiltrants est comparable entre le Japon et les pays occidentaux, le taux de cancers avancés et de mortalité est bien supérieur en Occident, indiquant l'importance de facteurs environnementaux, y compris alimentaires, dans la progression de la cancérogénèse. Or, l'on sait que les taux plasmatiques d'isoflavonoïdes sont plus élevés chez les Japonais que ceux des Finlandais. Les études des migrants aux USA confirment l'importance de l'environnement (incluant l'apport nutritionnel) dans l'augmentation de l'incidence du cancer de la prostate chez les immigrants Japonais.

On a peu d'études d'épidémiologie analytique valides : l'étude de Kolonel (2000) est une de celles-ci avec une population multiethnique (Hawaï) 1619 cas et 1618 témoins, un bon questionnaire et une analyse statistique rigoureuse. Un apport de 39.4 g/j de produits dérivés du soja confère une réduction de risque de 38% (OR : 0.62, IC : 0.44-0.89 ; test de tendance : 0.06) comparé à l'absence de consommation. Les légumes jaune-orange et les crucifères (tous riches en lignanes) sont associés au cancer de la prostate avec un OR très voisin (pas d'ajustement mutuel). La protection est plus marquée chez les Caucasiens et dans les cancers avancés.

Deux études prospectives ont été rapportées. L'une aux USA (Jacobsen 1998), chez des Adventistes présente un nombre de cas assez important 225 sur une cohorte de 12 395, mais avec une mesure d'exposition insuffisante, (questionnaire limité seulement au lait de soja, estimation quantitative réduite, 1 fois/jour, plusieurs fois/jour versus jamais) et un OR calculé sur 3 cas = 0.3 (IC : 0.3-0.9) ; test de tendance 0.02.

L'autre étude prospective Stattin (2002), multicentrique, a été conduite en Europe du Nord (Norvège, Finlande, Suède), où la Norvège qui représente le plus important effectif dans l'étude, a aussi l'exposition la plus faible en phyto-estrogènes. Celle-ci est mesurée par le dosage d'entérolactone dans le sérum : 8.5 nmol/L pour la Norvège (dans l'étude de Pietinen

(2001) sur les femmes finlandaises le quantile de référence correspond à un taux plasmatique <6.19 nmol/L), alors qu'il est de 15.6 pour la Suède et 18.6 pour les Finlandais (le plus fort quantile des femmes finlandaises était de  $\geq 34.8$  nmol/L). On n'est donc pas dans de bonnes conditions pour observer un effet (OR : 1.08 ; IC : 0.83-1.39).

Il faut signaler que nombre d'études sur la relation alimentation-prostate a montré l'effet réducteur de risque d'aliments riches en lignanes (légumineuses, crucifères, céréales complètes).

Dans *une étude clinique* portant sur 25 patients attendant une prostatectomie pour cancer de la prostate (Demark-Wahnefried 2001), les patients recevaient 30g/jour de graines de lin (riches en lignanes et acide alpha linoléique) dans un régime apportant moins de 20% de calories lipidiques. A l'intervention on a constaté une apoptose importante au niveau de la tumeur. De plus, le taux de testostérone était significativement plus faible, mais il n'y avait pas d'effet sur le taux de PSA (antigène spécifique prostatique synthétisé par l'épithélium prostatique et glandulaire périurethral). Les études d'intervention utilisant comme critère la mesure de ce taux ont rapporté des résultats contradictoires.

### VI-3 Données expérimentales

Les données expérimentales concernant l'effet des phyto-estrogènes sur le cancer de la prostate font l'objet de nombreuses revues. Il est bien démontré qu'un régime enrichi en soja inhibe la prolifération de tumeurs prostatiques spontanées, chimio-induites ou transplantables (Davis 1999, Brandi 1997, Fritz 2002a). Les extraits d'isoflavones diminuent aussi la taille de tumeurs transplantables d'origine humaine ou de rongeur (Arosen 1999, Zhou 1999) suggérant **un effet anti-promoteur**. De plus, chez le rat, la consommation de soja **chez le jeune** a un effet préventif vis-à-vis du cancer de la prostate à l'âge adulte (Pollard 1999). Un effet antiproliférateur est également décrit sur des tumeurs implantées (Landstrom 1998). De même, l'incorporation de génistéine dans le régime inhibe de manière dose dépendante le développement d'adenocarcinomes invasifs induits par des cancerigènes chez le rat (Onozawa 1999, Wang 2002) Cet effet protecteur s'exprime également sur l'incidence de tumeurs faiblement différenciées dans des modèles de souris transgénique (Mentor-Marcel 2001). Des études montrent que ces molécules inhibent la croissance des tumeurs et le développement de métastases chez la souris et qu'elles induisent l'apoptose et diminue la vascularisation des tumeurs prostatiques (Zhou 2002).

Les phyto-estrogènes peuvent agir sur différentes voies. Nombreux sont les phyto-estrogènes (isoflavones, flavonoïdes hydroxylés, zearalénone) qui inhibent *in vitro* l'activité 5-alpha réductase impliquée dans l'hydroxylation de la testostérone (cf chapitre mécanisme) et dont on suppose qu'elle joue un rôle clé dans la différenciation sexuelle mâle et dans l'apparition de tumeurs bénignes ou malignes de la prostate (Hiipakka 2002). Ces mêmes molécules, diminue l'expression de la PSA dans plusieurs lignées tumorales d'origine prostatique *in vitro* (Rosenberg 2002), Ces effets peuvent s'expliquer par une action répressive sur l'expression des récepteurs hormonaux puisque, dans des conditions d'exposition chronique (G0 à J70 ou J56 à J70) à des doses pharmacologiques (de 25 et 1000 mg/kg/j), la génistéine entraîne une repression de l'expression des gènes AR, ER alpha et bêta dans la prostate ventrale quelque soit la période d'administration alors qu'aucun effet n'est relevé sur le poids et l'histologie des organes reproducteurs (Fritz 2002b).

### VI- 5 Conclusion

Chez l'Homme, *les études écologiques* apparaissent actuellement comme le meilleur argument pour soutenir l'hypothèse d'une réduction de risque du cancer de la prostate sous l'effet des phyto-estrogènes. Mais on connaît les limites de ce type d'étude, (impossibilité à éliminer les facteurs de confusion) qui incite à considérer dans la même perspective les études portant sur les aliments réducteurs de risque et l'étude d'intervention de Demark-Wahnefried (2001). Dans ce contexte d'alimentation prise dans sa globalité, les études humaines ne permettent pas de dire si les phyto-estrogènes sont seuls potentiellement

réducteurs du risque de cancer de la prostate, ou si, à côté du profil alimentaire (faible apport lipidique, apport en acides gras n-3, en fibres, en autres composés phénoliques et autres modulateurs d'enzyme), ils jouent une partie du rôle. Mais *les études animales* suggèrent un effet protecteur puisque, prises globalement, elles tendent à montrer un effet favorable des phyto-estrogènes sur le cancer de la prostate .

## **VII- Cancer du testicule**

### **VII-1 Facteurs de risque**

Ce cancer est relativement rare. En 2000, le taux d'incidence et de mortalité /100 000 standardisé sur la population mondiale était respectivement de 6.26 et 0.35 pour la France et 1.32 et 0.15 pour le Japon. Cependant, il touche préférentiellement les hommes jeunes entre 15 et 35 ans, chez qui il est la première cause de mortalité par cancer ; à l'inverse, il est très rare après 50 ans. En 1995, des données épidémiologiques s'élevèrent 1790 cas nouveaux par an en France, avec un nombre de décès de 96/an (Houlgatte 2002).

Cependant, une augmentation de l'incidence a été rapportée dans plusieurs pays occidentaux (Toppari 1995). Elle aurait augmenté de 2.2% de 1980 à 1999. Les données Eurocan ([www.iarc.fr](http://www.iarc.fr)) ne montrent pas d'augmentation entre 1995 et 1998 ni en France, ni en Europe. Cependant il existe des facteurs favorisants : l'atrophie testiculaire, obtenue à la suite d'un traumatisme ou après les oreillons, et surtout la cryptorchidie et l'hypospadias (Lutke Holzik 2004), (Skakkebaek 2003) Ces dernières anomalies ont été associées à une exposition *in utero* en composés de types oestrogéniques présents dans notre environnement (Hardell 2003, Safe 1997, Safe 2002, revue). L'hypothèse d'une relation entre cancer du testicule et exposition aux perturbateurs endocriniens a été proposée (Toppari 1996). Une étude cas-témoin récente montre une association significative entre les taux sanguins d'un chlordanes et le cancer du testicule, mais aussi, entre les taux sanguins des PCB et de la plupart des chlordanes observés chez les mères et le fait d'avoir un fils porteur d'un cancer du testicule (Hardell 2003). Compte tenu que les fils ont autour de 30 ans et que ces polluants peuvent persister aussi longtemps dans l'organisme, il n'est pas impossible qu'une exposition à ces polluants soit advenue *in utero*. Les auteurs soulignent eux-même la nécessité de reproduire ces observations dans de meilleures conditions de mesure de l'exposition mais ces résultats confortent l'hypothèse selon laquelle une exposition aux perturbateurs endocriniens *in utero* , et plus particulièrement à des xeno-estrogènes, est délétère (voir chapitre "Sécurité").

### **VII-2 Etudes épidémiologiques**

Une étude épidémiologique cas-témoins (tableau 7) conduite aux USA sur 159 cas et 136 témoins appariés sur l'âge et l'ethnie n'a montré aucun effet (Walcott 2002). Cependant l'apport total en phyto-estrogènes n'atteignait pas 2 mg.

Bien qu'unique et de peu de puissance, il faut noter une étude menée sur une population occidentale qui montrent un risque augmenté de d'hypospadias du testicule à l'âge adulte chez les nouveaux nés mâles des femmes ayant consommé une alimentation végétarienne au moins pendant les 2 premiers mois de grossesse (OR : 4.90 ; CI 2.10-11.88). La consommation de produits dérivés de soja entraîne également une augmentation de risque mais non significative. Ce résultat est basé sur 7 femmes végétariennes et consommatrices de soja. Outre l'association avec le végétarisme, il existe une association avec une histoire grippale chez la mère et une interaction peu claire avec la supplémentation en fer. (North 2000). Cette étude est insuffisante pour indiquer un risque, mais demande la conduite d'études similaires étant donné la corrélation rapportée entre hypospadias et exposition aux perturbateurs endocriniens (Aschim 2004, Skakkebaek 2003).

### **VII-3 Données expérimentales**

Il n'existe pas, à notre connaissance, d'études expérimentales *in vivo* qui permettent de montrer un effet des phyto-estrogènes sur le cancer du testicule. Cependant, il faut garder à

l'esprit les effets délétères de la génistéine lors d'une exposition néonatale et périnatale associée à d'autres perturbateurs endocriniens(cf chapitre sécurité) et qui peuvent augmenter les risques de malformation du tractus génital (Eustache 2003). De plus, des souris transgéniques surexprimant l'aromatase testiculaire sont infertile et développent des anomalies du tractus génital ; l'analyse histologique identifie des tumeurs au niveau des cellules de Leidig et une surexpression de gènes estrogène-dépendants impliqués dans le cycle cellulaire (Fowler 2000). Les phyto-estrogènes pourraient exercer un effet protecteur en agissant sur ces paramètres biochimiques, plusieurs études montrant qu'ils diminuent l'expression des récepteurs hormonaux ER et AR au niveau du testicule (Adachi 2004, Wang 2004) et qu'ils inhibent l'aromatase (cf chapitre "Mécanismes"), dont l'aromatase testiculaire également possible (Robertson 2002). Dans le cas particulier des isoflavanones, un effet anti-androgénique, démontré *in vivo* chez le rat, est également suspecté (Weber 2001).

## **VII-4 Conclusion**

Le manque de données, tant d'un point de vue épidémiologique qu'expérimental ne nous permet pas de conclure quant à un quelconque effet des phyto-estrogènes sur le cancer du testicule. Toutefois, les données expérimentales évoquées ci-dessus indiquent le risque d'une exposition en phyto-estrogènes sur la morphogenèse des testicules et sur le développement du tractus génital mâle lors d'une surexposition *in utero* (cf chapitre "Sécurité" ou "Effets hormonaux"). Il n'existe pas d'études humaines permettant d'affirmer qu'il pourrait en être de même chez l'homme, mais de nombreux travaux faisant état de telles perturbations en présence de xéno-estrogènes de l'environnement nous amènent à être prudent et à suggérer la période de grossesse comme une fenêtre à risque pour l'embryon.

## **VIII- Cancer du colon**

### **VIII-1 Facteurs de risque**

En 2000, le taux d'incidence et de mortalité /100 000 standardisé sur la population mondiale tous sexes confondus était respectivement de 43.15 et 17.63 pour la France et 39.81 et 18.33 pour le Japon. L'incidence est plus élevée chez l'homme que chez la femme.

Il existe des gènes dont les mutations augmentent le risque de cancer du colon : gènes APC (polypose familiale) et gènes impliqués dans la réparation de l'ADN.

D'autres facteurs de risque tels la colite ulcéreuse, l'infection par *Schistosoma* sont également documentés. Le tabagisme favoriserait la progression de petit adénome vers le gros adénome et l'alcool, de gros adénome vers la tumeur maligne.

L'alimentation est fortement suspectée de jouer un rôle dans le cancer du colon de différentes façons. C'est d'abord l'observation par Burkitt de la faible incidence de cancer du colon dans les pays où la consommation de fibres est élevée. Cette observation est maintenant soutenue par la majorité des résultats des études épidémiologiques analytiques, notamment par les derniers résultats de l'étude prospective multi-centrique EPIC (Bingham 2003). La viande est également considérée comme facteur de risque, mais il semble que c'est surtout la charcuterie qui est responsable de l'augmentation du risque (Norat 2002). L'effet de ces aliments passerait soit par l'effet sur le métabolisme de sels biliaires (sels biliaires secondaires mutagènes favorisés par un régime riche en viande et pauvre en fibres), soit par la synthèse d'acides gras à chaîne courte ayant un effet bénéfique sur les colonocytes (favorisée par un régime riche en fibres et pauvre en viande). Le fer héminique apporté par les viandes seraient également un facteur de risque. Les composés nitrosés présents dans les produits transformés (charcuterie, aliments fumés et saumurés) sont fortement suspectés d'augmenter le risque. Ceci expliquerait la forte prévalence de cancers coliques au Japon, malgré un profil alimentaire favorable : en effet une susceptibilité génétique lié à un polymorphisme des enzymes de phase II les rendraient particulièrement sensibles à l'effet des composés nitrosés .

Certains auteurs ont suggéré que des facteurs hormonaux pourraient jouer un rôle dans le cancer du colon (Potter 1995). Cependant cette hypothèse n'est actuellement pas confirmée.

## VIII-2 Etudes épidémiologiques

En 1998, Messina et Bennink constataient dans une revue que les études consacrées à la recherche d'un lien entre cancer du colon et consommation de phyto-estrogènes, la plupart conduites chez des femmes asiatiques, apportaient peu de soutien à l'hypothèse d'un effet protecteur des phyto-estrogènes. Ils notaient cependant que la méthodologie de ces études était insuffisante. Il n'existe pas à notre connaissance de nouvelles études depuis cette date.

## VIII-3 Données expérimentales

Les quelques études expérimentales qui concernent l'effet de phyto-estrogènes sur le cancer du colon sont réalisées sur des animaux adultes. Des études expérimentales animales basées sur un apport alimentaire d'aliments riches en lignanes, son de seigle, graines de lin, (mais aussi en d'autres nutriments, fibres, acides gras n-3 à longue chaîne) ont montré une réduction de risque de tumeur du colon chimio-induite chez le rat (Davies., 1999). Si effet il y a, il est difficile de le dissocier d'un profil alimentaire riche en fibres et/ou acides gras n-3., même s'il est montré que la génistéine en particulier diminue le nombre de cryptes aberrantes induites par l'azoxyméthane chez le rat (Peirrer 1994). En effet, une exposition à différents produits issus du soja (12 semaines), réduit également la cancérogenèse induite par l'azoxyméthane, mais l'effet est inversement proportionnel à la teneur en génistéine (0,050 et 0,15%) contenue dans ces aliments (Thaigarajan 1998). De plus (cf chapitre "Sécurité"), une longue exposition en forte teneur génistéine (52 semaines, 250 ppm) augmente la cancérogenèse chimio-induite par l'azoxyméthane (Rao., 1997). Il est tout aussi difficile d'attribuer les effets de la génistéine à un effet de type estrogénique : des études *in vitro* menées sur des cultures de cellules de muqueuses coliques surexprimant le récepteur ER beta montrent que leur croissance n'est affectée ni par les estrogènes ni par la génistéine à 10µM, dose qui était proliférative sur les cellules MCF-7 (ER alpha +).

Indépendamment de ces travaux, l'équipe de Kallay (2002) montre que chez la souris, les phyto-estrogènes induisent l'expression du CYP 27B1 impliqué dans l'hydroxylation de la vitamine D3 et augmentent les taux de 1,25 di-hydroxyvitamine D3 au niveau intestinal, molécule à effet antimotique et dont la synthèse est fortement associée à un effet antioxydant et anticancérigène au niveau de l'intestin (Kallay 2002). Une autre étude montre un effet inhibiteur sur la quinone réductase intestinale, une enzyme estrogéno-dépendant dont l'expression est souvent associée à un effet protecteur (Wang 1998).

## VIII-4 Conclusion

Prises dans leur ensemble, les données issues de *l'expérimentation animale* tendent à montrer un effet préventif des phyto-estrogènes sur le cancer du colon, mais il ne faut pas écarter l'étude qui montre des effets inverses (cf chapitre sécurité). Elles demandent donc à être confirmées et également complétées par des études épidémiologiques, jusqu'à maintenant absentes.

## IX- Cancer de la thyroïde

### IX-1 Facteurs de risque

En 2000, le taux d'incidence et de mortalité /100 000 standardisé sur la population mondiale était respectivement de 1.40 et 0.37 pour la France et 1.40 et 0.35 pour le Japon. Le taux est 2 à 3 fois plus élevé chez les femmes que chez les hommes, suggérant une influence hormonale. Les radiations ionisantes sont la cause la mieux connue. L'irradiation accidentelle ou iatrogène, surtout pendant l'enfance induit la cancérogenèse thyroïdienne. L'inhalation et/ou la consommation d'aliments contaminés par de l'iode radioactif constitue aussi un facteur de risque accidentel du cancer de la thyroïde.

L'insuffisance d'apport est un facteur de risque par l'augmentation de TSH qui stimule la prolifération de la thyroïde ; l'alcool augmenterait également la synthèse de TSH.

Quelques études suggèrent qu'un IMC élevé et un faible apport de produits végétaux augmenterait le risque .

## **IX-2 Etudes épidémiologiques**

Horn-Ross (2002) ont étudié la relation entre les phyto-estrogènes et le cancer de la thyroïde dans une population de femmes blanches et asiatiques portant sur 608 cas et 558 témoins (tableau 8). Les isoflavones et les lignanes ont un effet de réduction du risque comparable et à la limite de la significativité, alors que le secoisolaricirésinol seul montre un effet de réduction du risque significatif, avec un test de tendance, également significatif. Curieusement, si l'on regarde les aliments, la réduction du risque apparaît plus importante chez les femmes blanches, mais la comparaison est rendue difficile par la différence d'apports entre les deux populations. Dans cette même population, on a mis en évidence une relation entre hormones sexuelles et cancer de la thyroïde (Sakoda 2002) suggérant un mécanisme possible pour l'effet des phyto-estrogènes, peut-être via les modes d'action évoqués lors des études expérimentales (inhibition des tyrosines kinases).

## **IX-3 Données expérimentales**

Il n'y a pas encore d'études qui montrent un effet direct sur le cancer de la thyroïde *in vivo*. Une étude menée chez le rat mâle n'a pas montré d'effet des phyto-estrogènes sur le développement de tumeurs de la thyroïde chimio-induites (Son 2000) mais une alimentation riche en produits dérivés du soja entraîne, chez le chat, une diminution du ratio T3/T4, qui s'explique par l'inhibition de la 5'-iodothyronine deiodinase ou par l'augmentation de la clearance de la T3 (White 2004, cf chapitre mécanisme).

Les études *in vitro* montrent une action anti-proliférative de la génistéine sur des cellules tumorales thyroïdiennes qui résulterait d'un effet inhibiteur sur les tyrosines kinases, lesquelles sont surexprimées dans les carcinomes médullaires de la thyroïde (Cohen 2002).

## **IX-4 Conclusion**

Si il semble bien exister une relation entre phyto-estrogènes et fonctionnement thyroïdien (voir chapitres nourrissons et thyroïde), la relation avec le cancer de la thyroïde n'est pas démontrée. De plus les phyto-estrogènes peuvent seulement représenter un marqueur de profil alimentaire faible en densité énergétique et riche en produits végétaux.

## **X- Cancer de la vessie**

### **X-1 Facteurs de risques :**

Le cancer de la vessie est cinquième cancer en Europe et représente 5% de tous les cancers diagnostiqués. On dénombre chaque année en France 10.000 nouveaux cas. Les hommes sont trois fois plus touchés, mais depuis 1985, la mortalité chez les femmes est en nette augmentation. Ce phénomène est attribué à la hausse du tabagisme féminin, le tabagisme étant fortement associé à l'incidence de ce cancer. (Sengupta 2004). Plusieurs études montrent que ce cancer serait étroitement corrélé au polymorphisme génétique de certaines enzymes du métabolisme des toxiques dont des acétylases (Marcus 2000), des glutathion transférases (Toruner 2001), et des sulfotransférases (Zheng 2003).

### **X-2 Données épidémiologiques**

Deux études prospectives conduites par la même équipe (Sun 2002 ; 2004) ont examiné la relation entre cancer de la vessie et consommation de soja dans deux populations, Singapour et Shanghai) et décrivent une augmentation de risque liée à cette consommation (OR : 4.61 ; IC1.57-13.51, test de tendance 0.004, pour une consommation quotidienne comparée à une consommation inférieure à 1 fois/semaine). Les études sont de faible puissance (une cinquantaine de cas), mais l'hypothèse évoquée est celle de contaminants environnementaux : il s'agirait de la présence de MX ou 3-chloro4(dichlorométhyl)-5hydroxy-2(5H)-furanone qui pourrait être produit par le contact prolongé du soja avec l'eau javéalisée lors de la préparation du tofu.



### **X-3 Données expérimentales.**

Les données expérimentales concernant l'effet de phyto-estrogènes sur le cancer de la vessie sont peu nombreuses. Des études *in vitro* menées sur des lignées cellulaires issues de tumeurs humaines de vessie mettent en évidence l'effet des isoflavones sur la croissance cellulaire, la synthèse de DNA et l'alteration du cycle cellulaire et l'induction de l'apoptose (Zhou 1998; Su 2000). Ces mêmes auteurs complètent leurs études *in vitro* par des études *in vivo* chez la souris, les premiers regardant l'effet d'un apport alimentaire sur la progression de tumeurs de la vessie transplantées chez des souris, et les deuxièmes montrent que la présence de génistéine ou d'un mélange d'isoflavones exerce de manière significative un effet supresseur de tumeur de la vessie chez la souris. Dans les deux cas, un effet supresseur de tumeur est observé. Les analyses biochimiques confirment un effet direct sur les cellules tumorales (induction de l'apoptose, inhibition de la croissance cellulaire) ainsi qu'une inhibition de l'angiogenèse.

### **X-4 Conclusion**

L'absence de données épidémiologiques et expérimentales ne permet pas de conclure sur un effet des phyto-estrogènes sur le cancer de la vessie. Aux vues des données expérimentales, les effets observés chez l'homme ne sont probablement pas imputables aux isoflavones.

### **Conclusion générale**

Elle se doit d'énoncer les limites du chapitre sur l'étude de la relation entre phyto-estrogènes et cancer :

- Faible nombre d'études épidémiologiques, sauf pour le cancer du sein
- Difficultés de la mesure de l'exposition :
  - Erreurs inhérentes aux questionnaires
  - Erreurs liées à la non exhaustivité des tables de composition, notamment en ce qui concerne les lignanes
  - Valeur des biomarqueurs : ont-ils un sens dans une étude transversale ? seulement si on peut être certain de la permanence des habitudes alimentaires dans les années qui précèdent
  - Difficulté de comparaison de l'exposition entre les différentes études (tables de composition, unités ...)
- Difficulté d'identifier les facteurs de confusion potentiels.

De ce fait les critères de Hill (1965) : constance et force de l'association, relation dose-effet, temporalité, plausibilité biologique et données expérimentales en accord avec les observations épidémiologiques ne vont réellement pouvoir s'appliquer qu'au cancer du sein. Les études animales sont également peu nombreuses pour la plupart des tumeurs, sauf les tumeurs mammaires et prostatiques. Les résultats sont souvent contradictoires et la question de la pertinence des modèles animaux se pose régulièrement. Cependant, ces études *in vivo* permettent l'étude spécifique du moment de l'exposition dans la vie de l'animal, aspect difficilement repérable chez l'Homme et qui paraît revêtir une importance particulière quant au développement des cancers hormono-dépendants.

En dehors de cet aspect, les phyto-estrogènes alimentaires n'apparaissent pas comme des facteurs de risque de cancers. Si les études épidémiologiques, dans les limites rappelées plus haut, suggèrent pour certains cancers (sein, endomètre, à un moindre degré, prostate) une réduction de risque associée à leur consommation dans un profil alimentaire bien particulier, il est encore difficile de leur attribuer un effet spécifique. Cette réduction de risque est cependant soutenue par le résultat de certaines études animales, alors que d'autres font état d'une augmentation de la prolifération de cellules tumorales hormono-dépendantes.

## Points clés et recommandations

### Points clés

- ❖ La consommation de produits dérivés du soja ainsi que celle d'isoflavones réduit **le risque de cancer du sein** de façon significative chez les femmes asiatiques. Cette réduction de risque correspond à un niveau d'apport entre 30 et 40mg/jour dès l'adolescence et dans un contexte alimentaire favorable (apport important de produits végétaux, d'acides gras de la série n-3, peu de lipides saturés). Cet effet paraît plus net chez les femmes avant la ménopause, suggérant un mécanisme hormonal. Cependant, un certain nombre d'autres facteurs associés au style de vie sont difficilement dissociables de l'effet des phyto-estrogènes et empêche de conclure à la spécificité de leur effet.
- ❖ Ces observations sont corroborées par les expérimentations animales réalisées en période prépubertaire et à l'âge adulte. Cependant, lors d'une exposition *in utero* et/ou néonatale, les isoflavones augmentent la sensibilité de la progéniture (mâle ou femelle) aux cancérogènes mammaires. Chez des animaux ovariectomisés (mimant le statut ménopausal), les isoflavones peuvent favoriser le développement de tumeurs chimio-induites, à l'image de ce qui est également observé dans des modèles d'implantation de cellules tumorales humaines hormono-dépendantes dont la prolifération est augmentée par les isoflavones.
- ❖ Les études sont moins nombreuses mais concordantes à montrer une réduction de risque pour le **cancer de l'endomètre**. Cependant, les isoflavones apparaissent sans effet chez les femmes occidentales soit que la dose habituellement consommée soit trop faible, et/ou que ces femmes ont des habitudes alimentaires et un style de vie favorable au développement du cancer. Quand au **cancer de la prostate**, il existe peu d'études épidémiologiques analytiques concluantes, mais les études animales convergent globalement vers une réduction du risque. Pour ces deux cancers, la réduction de risque peut-être qualifiée de possible dans les conditions d'exposition des populations asiatiques.
- ❖ Aucune étude épidémiologique ne permet de prouver l'effet des phyto-estrogènes sur le **cancer du testicule**, mais les données expérimentales montrent que les isoflavones peuvent exercer leur effet estrogénique *in utero* résultant en des anomalies génitales, facteurs de risque de ce cancer.
- ❖ En ce qui concerne **les autres cancers**, les données, tant épidémiologiques qu'expérimentales, sont insuffisantes pour conclure.
- ❖ Quant aux lignanes, elles pourraient jouer un rôle chez les femmes occidentales puisqu'elles représentent la majorité des phyto-estrogènes ingérés chez les femmes occidentale. Cependant, leur ubiquité des lignanes dans le règne végétal et la quasi absence de table de composition complète et validée rendent difficiles l'interprétation des résultats. Les études par biomarqueurs qui devraient apporter des résultats plus fiables sont, en l'état actuel des connaissances sur la biodisponibilité des lignanes, également difficilement interprétables.

Ainsi l'apport d'isoflavones se démarque de l'apport d'estrogènes en ce qui concerne le risque de cancers, mais les études animales amènent à prendre en considération certaines situations :

- *La grossesse*: les études animales indiquent qu'une exposition aux isoflavones lors de la période de gestation entraîne une modification du développement de la glande mammaire de la progéniture femelle, et du testicule de la progéniture mâle entraînant une augmentation de risque respectivement de cancer du sein et de cancer du testicule .
- *La présence de tumeur hormono-dépendante* : chez la femme ménopausée l'exposition aux phyto-estrogènes pourraient favoriser la prolifération et la croissance tumorale à l'instar de ce qui est observé chez la rate ovariectomisée présentant une tumeur chimio-induite.

## Recommandations

### 1- Recommandations à visée de connaissance et de recherche

#### Epidémiologie

- ❖ La réalisation d'une table de composition complète et fiable des aliments consommés en Europe est l'étape nécessaire préalable à toute recherche épidémiologique. A la suite, les données de consommation des cohortes nationales (E3N, SU.VI.MAX) et européenne (EPIC) seront mises en relation avec l'incidence des cancers dans ces cohortes pour évaluer une possible relation. Le cas des lignanes demandera une attention particulière pour éventuellement séparer leur effet spécifique de celui des différents aliments vecteurs.
- ❖ Etant donné l'absence de marqueurs intermédiaires pertinents, des études d'intervention ne paraissent pas faisables. Mais on pourrait envisager un suivi des femmes consommant des compléments alimentaires à base de soja dans des conditions fiables de doses et de durée, en partenariat avec le réseau des phytothérapeutes. Un suivi pourrait s'appliquer également aux femmes présentant un cancer du sein et consommant par une démarche volontaire des compléments alimentaires contenant des isoflavones après ovariectomie et/ou traitement par le tamoxifène.

#### Etudes expérimentales *in vivo*

- ❖ Elles demandent des modèles éventuellement extrapolables à l'Homme en terme de doses et des différents composés actifs.
- ❖ Alors que les études expérimentales sont bien documentées quant au risque lié à une exposition en début de vie, celles concernant le stade ménopausal sont encore trop peu nombreuses et un effort en ce sens est nécessaire afin de discriminer le risque chez des sujets sains et chez des sujets déjà atteints de cancer. D'autre part, quelques études expérimentales font état des risques d'interaction entre phyto-estrogènes et xéno-estrogènes. Des études mécanistiques en ce sens mériteraient d'être développées, en particulier des risques d'interaction avec des pesticides ou des migrants d'emballages présents dans notre alimentation, mais également avec des produits pharmaceutiques (pilule contraceptive, hormonothérapie).

### 2- Recommandations de Santé Publique

- ❖ Les aliments à base de soja, tels le tonyu, le tofu, peuvent être adoptés sans excès, par les adultes, puisqu'ils diminuent l'apport en graisses saturées animales, **et dans le cadre d'une alimentation équilibrée et diversifiée**, en accord avec les recommandations de santé publique (PNNS). Cette dernière recommandation concernant une alimentation équilibrée s'applique notamment aux personnes qui penseraient prévenir le risque de cancer en consommant des compléments alimentaires à base d'isoflavones plaqués sur des habitudes alimentaires et un style de vie occidentale.
- ❖ Certaines fenêtres d'exposition apparaissent comme des fenêtres à risque. Ainsi, un apport élevé (> 1mg/kg) en phyto-estrogène pendant la grossesse ou après un cancer du sein ne peut être recommandé. Dans le premier cas car cette consommation pourrait ne pas être sans risque sur le développement du tractus génital et éventuellement augmenter le risque de cancers du testicule et du sein dans la progéniture. Dans le deuxième cas, un risque d'augmentation de la prolifération des cellules tumorales ne peut-être écarté. Une même dose est à respecter chez les femmes ménopausées

### 3- Recommandations à visée d'information du consommateur

- ❖ L'étiquetage doit préciser la teneur en phyto-estrogènes, exprimée en équivalents aglycone, notamment sur les aliments à base de soja et les compléments alimentaires. Ce qui signifie un contrôle des doses par les industriels à chaque fabrication avec un nouveau lot de soja.
- ❖ Une contre-indication devrait être mentionnée concernant l'utilisation de ces compléments pour une exposition *in utero*, et la présence de cancers hormonodépendants

**Tableau 1- Phyto-estrogènes et cancer du sein- Etudes cas témoins (apport alimentaire)**

Auteurs et pays	Sujets	Mesure de l'exposition	OR	T	Remarques
Lee 1991 Singapour	200/420 Chinoises PréM 129/207 post- M 91/213	Entretiens, FFQ, 90 items, photos	Pré-M, Tous produits soja : H(48g) vs L(17g) 0.44 (0.24-0.81) soja./protéine totale : H(0.08) vs L(0.04) 0.29 (0.15-0.57) PostM NS (non donnés)	0.01	Ajustement+ soja./protéine totale : OR : 0.39 (0.15-0.94) indépendant de protéine animale, viande rouge, β-carot,
Hirose 1995 Japon	Pré-M 607 /14884 Post-M 445/6192	Aliments tofu, miso	Pré-M tofu : H(≥3/sem) vs L(<1/sem) 0.78 (0.60-1.00)  Miso : rarement ou jamais 1.2 (1.0-1.4)  PostM tofu : H(≥3/sem)vs L(<1/sem) 1.0 (0.7-1.3) Miso : rarement ou jamais 1.0 (0.8-1.12)	-	
Yuan, 1995, Chine	Pré+post-M Shangai : 834 Tianjin : 300	FFQ produitssoja 64 items 68 items	Per 18g/jour :1.0 (0.7-1.4)	-	FFQ insuffisant Variation de consommation ?
Wu 1996, USA	30-55 ans 597/966 asiatiques	50 items	Tofu: H(≥55/an) vs L(≤12/an) combiné:0.67; pour/1+/sem 0.83 (0.72-0.95) (0.4-1.8); Pré-M: 0.67;/1/sem0.84 (0.70-0.99) (0.4-1.8); post-M 0.70 NS, ; /1/sem 0.86 (0.66 –1.13)	-	Ajusté sur apport alimentaire 0.93(0.73-1.18) pour la 1 <sup>ère</sup> génération 0.79 (0.66-0.94) pour les migrantes
Wu 1998, USA	30-55 ans 597/966 asiatiques	50 items	Produits soja : H(≥120/an) vs L(<13/an) 1 <sup>ère</sup> génération 0.8 (0.4-1.8) Migrantes : 0.5 (0.3-0.8)		Combiné 0.7 (0.4-1.0)
Wu 2002, USA	25-74 ans 501/594	Entretiens  Adolescent :tofu fréquence Adultes :T lfl	Combiné, Ados: : H(≥4/sem) vs L(<1/mois)0.51(0.31-0.84) Aj légumes verts 0.65 (0.38-1.10) Combiné, Adulte : H(≥12.7mg/1000 kcal) vs L(≤1.8) 0.51(0.33-0.78)  Aj légumes verts 0.61(0.39-0.97)	0.002 :0.04  0.003: 0.03	L ado et H adulte : 1.02 ; H ado et L adulte : 0.88 (0.58-1.36) ; H+H : 0.65(0.43-0.97) Tend :0.03
Dai 2001 Chine (Shangai)	25-64 ans 1459/1556 sans chang. 1104/1232	FFQ ,entretien  Aliments soja (contr: 90%)M :948g/s, en protéine soja totale Moy: 72 .1g #lfl: 286.3mg,	H(91g/s) vs L( occasionnellement) 0.66 (0.43-1.02) Sans chang.alimentation : 0.56 (0.32-1.00) En deciles: H (>139.1g/s) vs L≤18.60.46(0.28-0.75)	0.10  0.02 0.02	High BMI 0.30 (0.10-0.94) 0.21 (0.06-0.77) T0.03 ER+ PR+0.44 (0.25-0.78) T0.05 0.28 (0.13-0.57) T0.004
Shu 2001 Chine, (Shangai)	25-64 ans 1459/1556	Ado : 17 items	total aliments soja H(>11g/j) vs L (2.2) Combiné : 0.51 (0.40-0.65) Pré-M 0.53 (0.39-0.72) Post-M 0.49 (0.33-0.74)	<0.01 <0.01 <0.01	Conso ado des mères des femmes < 40 ans 0.35 (0.21-0.60) Tend : <0.01

Horn-Ross 2001, USA (Bay area study)	35-79 ans 1326/1657 Caucasiens	FFQ, entretien	Isoflavones totales H( $\geq 2.80$ mg/j) vs L( $< 1.05$ ) 1.0 (0.79-1.30) Génistéine : H( $\geq 1.44$ mg/j) vs L( $< 0.48$ ) 0.92 (0.72-1.20) Daidzéine : H( $\geq 1.22$ mg/j) vs L( $< 0.47$ ) 1.1 (0.85-1.40) Biochanine A H( $\geq 83$ µg/j) vs L( $< 22$ ) 1.2 (0.85-1.50) Formononetine: H( $\geq 40$ µg/j) vs L( $< 9$ ) 1.01 (0.99-1.02) Lignanes totales: H( $\geq 224$ µg/j) vs L( $< 104$ ) 1.3 (1.0-1.6) Matairesinol H( $\geq 50$ µg/j) vs L( $< 18$ ) 1.1 (0.89-1.5) Secoisolariciresinol ( $\geq 176$ µg/j) vs L( $< 75$ ) 1.3 (1.0-1.6) Coumestrol H( $\geq 277$ µg/j) vs L( $< 119$ ) 1.4 (1.1-1.7)		Lait de soja : Cons vs 0 : 0.57 (0.38-0.85) C :3%, T :5% Soyburger : Cons vs 0 : 0.74 (0.55-0.99)
Peterson 2003 Grèce	Cas : 820 T : 1548	FFQ auto-administré 115 items Base données USDA	Isoflavones : continu /800 µg/j) 1.07 (0.97-1.18)	NS	Age Cas 56.4 $\pm$ 0.43 age T 54.4 $\pm$ 0.32 Ajusté sur fruits et légumes et autres flavonoïdes
Linseisen 2004, Allemagne	24-52 ans 278/666 Non Ménop.	FFQ auto-administré 176 items, base de données : aglycons et enterodio/enterolactone	Génistéine : H ( $\geq 69.6$ µg/j) vs L( $\leq 28.2$ ) 0.47(0.29-0.74) Daidzéine : H ( $\geq 189.6$ µg/j) vs L( $\leq 50.8$ ) : 0.62(0.40-0.95) Biochanine A H( $\geq 19.2$ µg/j)vs L( $< 7.1$ ) 0.85 (0.53-1.38) Formononetine: H( $\geq 156.2$ µg/j) vs L( $< 47.6$ ) 1.14 (0.72-1.82) Lignanes totales: H( $\geq 1428$ µg/j)vs L( $< 302.5$ ) 1.10 (0.72-1.70) Secoisolaricires( $\geq 1409$ µg/j)vs L( $< 275$ ) 1.12 (0.73-1.73) Matairésinol : H ( $\geq 37.6$ µg/j) vs L( $\leq 19.5$ ) 0.58 (0.37-0.94) enterodiol H( $\geq 555$ µg/j)vs L( $< 2$ ) 0.61 (0.39-0.98) enterolactone H( $\geq 446$ µg/j)vs L( $< 227$ ) 0.57 (0.35-0.92) Coumestrol H( $\geq 2.60$ µg/j)vs L( $< 7.6$ ) 0.92 (0.59-1.44)	0.002 0.065 NS NS NS NS NS 0.025 0.034 0.008 NS	Phyto-oestrogènes totaux (sans enterolignanes H( $\geq 1768$ µg/j)vs L( $< 571$ ) 0.83 (0.53-1.84) tend NS Somme entérolignanes H( $\geq 1110$ µg/j)vs L( $< 470$ ) 0.61 (0.39-0.98) Tend 0.034 Génist+Daidzéine NS pour ER - Entérodol : H ( $\geq 554.9$ µg/j) vs L( $\leq 235.2$ ) 0.61 (0.39-0.98) T : 0.008 Entérolactone : H ( $\geq 445.7$ µg/j) vs L( $\leq 26.9$ ) 0.57 (0.35-0.92) T : 0.034
Mc Cann 2004, USA	35-79 ans 1122/2036	FFQ auto-administré NCl modifié, base données USDA,	sécoisolarici +matairésinol Pré-M :H( $> 673$ µg/j) vs L ( $< 329$ ) : 0.66 (0.44-0.98) Post M H( $> 713$ µg/j) vs L( $< 337$ ) 0.93 (0.71-1.22)		Ajustement sur énergie folates, caroténoïdes et fibres Q : 329-472, OR 0.60(0.40-0.89)
Dos Santos-Silva 2004, UK	$< 75$ ans 240/477 Indiennes	FFQ, 207 items, entretiens, validé. Base de données Dunn institute (S Bingham)	Génistéine : H ( $\geq 232$ µg/j) vs L( $< 78.$ ) 0.62(0.36-1.06) Daidzéine : H ( $\geq 236$ µg/j) vs L( $< 50$ ) : 0.57(0.33-0.99) Isoflavones totales H( $\geq 470$ µg/j) vs L( $< 125$ ) 0.58 (0.33-1.00) Secoisolaricires( $\geq 225$ µg/j)vs L( $< 80$ ) 0.62 (0.39-1.00) Matairésinol : H ( $\geq 13.3$ µg/j) vs L( $< 4.9$ ) 0.69 (0.42-1.13) Lignanes totales: H( $\geq 236$ µg/j)vs L( $< 85$ ) 0.66 (0.41-1.07)	0.10 0.09 0.08 0.08 0.16 0.09	polysaccharides non amylacés OR 0.61 (0.37-1.02) T0.02 Ajustement sur PNA : OR#, mais NS pour isofl, ↓ pour lignanes. Lignanes et non-M : Q2 : 0.40 (0.20-0.79) Q3 : 0.61 (0.32-1.15) Q4 : 0.64 (0.34-1.21) Post-M : Q2 : 1.11 (0.61-2.00) Q3 : 1.03 (0.58-1.84) Q4 : 0.83 (0.45-1.53)

**Tableau 2- Phyto-estrogènes et cancer du sein - Etudes cas témoins (biomarqueurs)**

Auteurs et pays	Sujets	Mesure de l'exposition	OR	T	Remarques
Zheng 1999 Chine (Shangai)	60/60 25-64 ans	Dosage urinaire isoflavonoïdes. HPLC photodiode (cv 10.5%)	Combiné : H( $\geq$ 18.66 nanomole/mg créatinine)vs L(< 5.58) 0.50 (0.19-1.31) Glycitéine : ( $\geq$ 2.15 nanomole/mg créatinine)vs L(< 0.63) 0.41 (0.15-1.11)	0.11    0.06	H( $\geq$ 10.96 isofl + $\geq$ 6.87µmole phenol) vs L(< 10.96+<6.87) 0.14 (0.02-0.88) méthode de Folin
Dai 2002 Chine (Shangai)	250/250 Pré et post-M	FFQ auto-administré 110 items +Dosage urinaire CL/MS	Génistéine H(>11.43 nanomole/mg créatinine) vs L(<0.78) 0.65 (0.41-1.03) Daidzéine H(>21.) vs L(<3.03) 0.54 (0.34-0.85) Glycitéine H(>2.90) vs L(<0.28) 0.42 (0.25-0.70) Entérolactone H(>7.) vs L(<0.50) 0.42 (0.25-0.69) Entérodiol H(>0.83) vs L(<0.11) 0.43 (0.26-0.71)	0.07  <0.01  <0.01  <0.01  <0.01	
Dai 2003 Chine (Shangai)	117/117 Post-M	FFQ auto-administré 110 items +Dosage urinaire CL/MS	Total Ifl: H ( $\geq$ 63.32 nanomole/mg créatinine) L ( $\leq$ 5.36) 0.46 (0.22-0.95) Total lignanes H ( $\geq$ 7.01 nanomole /mg créatinine) L ( $\leq$ 0.32) 0.50(0.23-1.10)	0.04  0.09	WHR <0.84 NS ; WHR $\geq$ 0.84 0.18 (0.05-0.68) Tend 0 WHR <0.84 NS ; WHR $\geq$ 0.84 0.17 (0.04-0.71) Tend. 0
Ingram, 1997 Australie	144/144	Dosage urinaire d'équol,(cv20.5%) entérolactone et entérodiol GC-MS	Combiné: Daidzéine( $\geq$ 1300 nanomole/24h) vs ( $\leq$ 600) 0.47 (0.17-1.33) Equol H( $\geq$ 185 nanomole/24h) vs L ( $\leq$ 70) 0.27(0.10-0.69) Enterodiol H( $\geq$ 480) vs L ( $\leq$ 170) 0.73(0.33-1.64) Entérolactone: H( $\geq$ 5250) vs L ( $\leq$ 1450) 0.36(0.15-0.86) Mataires. H( $\geq$ 42) vs L ( $\leq$ 17 2.18 (0.83-5.76))	NS  0.009 NS  0.013 NS	
Pietinen 2001 Finlande	194/208 70 %Post-M	FFQ auto-administré 110 items +Dosage sérique d'entérolactone (cv 10.5%) Fluoro-immunoassay	H(>34.80nanomole/L)vs L(< 6.19) 0.38 (0.18-0.77)	0.03	Ajustement + corrélation thé, fibres et vit E Pré et post M séparées NS

**Tableau 3- Phyto-estrogènes et cancer du sein - Etudes prospectives**

Auteurs et pays	Sujets	Mesure de l'exposition	RR	T	Remarques
Yamamoto S 2003, Japon	Pré+post-M 40-59 ans 179/21852	FFQ auto-administré, 38 questions: soupe miso (100ml=2.9mg génistéine) et soy foods (tofu, soybeans, 55g=17.3 mg génistéine)	Miso H(≥3 tasses /j) vs L (<1) 0.60 (0.34-1.1) Soyfoods Miso H( tous les j) vs L (<2/sem.) 0.81 (0.49-1.3) Ifl, H(25.3±2.2) vs L(6.9±2.6) 0.46 (0.25-0.84)	0.04  NS  0.04	Ifl: Pré-M : H(25.3±2.2) vs L(6.9±2.6) 0.66 (0.25-1.70) T: NS Post-M : H(25.3±2.2) vs L(6.9±2.6) 0.32 (0.14-0.71) T: 0.006
Horn-Ross 2002, USA	711/ 111 526 21 à 103 ans multiethnique	FFQ 103 items	Génistéine: H(>1100µg /j) vs L(<290 µg/j) 1.0 (0.7-1.3) Daidzéine H(>906)vs L(<301) 0.9 (0.7-1.2) Biochanine A H( 37) vs L(9) 1.0 (0.8-1.3) Formononetine H (42) vs L (5) 1.1 (0.8-1.4) Coumestrol H (157) vs L (64) 1.1 (0.9-1.5) Matairesinol. H(33 µg/j) vs L (12) 1.1 (0.8-1.4) Secoisolariciresinol H( 121) L (48) 1.2 (0.9-1.6)		L'association positive avec le Secoisolariciresinol disparaît après ajustement sur la consommation d'alcool.
Keinan-Boker 2004, Pays-Bas	EPIC-NL 280/15555 (49-70)	FFQ auto-administré 178 items. Base de données : scores non valeurs exactes	Ifl : H (≥0.54 microg/jour) vs L (≤0.26) : 0.98 (0.65- 1.48) Lignanes (E+E):H(≥0.83 microg/jour) vs L (≤0.53) 0.70 (0.46-1.09)	NS  0.06	lignanes précurseurs HR >1, (NS,non donnés)
Grace P 2004-08-17 UK	EPIC - UK Alim. :114/1674 Urines 114/219 Serum: 97/187 45-75 NS	Semainier (A) Echantillon ponctuel (U) Id (S)	Continu pour doublement A(Médiane)Daidzéine 205.5 µg/jour) 1.176 (0.933-1.482) Génistéine : 247.2 µg/jour 1.165 (0.938-1.447) Continu pour doublement taux U (Médiane)Daidzéine (17.2 µg/mmol creatinine ) 1.148 (0.930-1.417) Génistéine : (7.9) 1.162 (0.973-1.387) Glycitéine (2.5) 1.076 (0.869-1.133) O-DMA : (0.2) 1.148 (0.93-1.417) Equol (0.1) 1.344 (1.063-1.699) Entérodol : (7.8) 1.015 (0.840-1.227) Entérolactone: (93.5) 0.980 (0.850-1.130) Continu pour doublement taux S (Médiane) Daidzéine (2.2 ng/ml) 1.220 (1.005-1.481) Génistéine : (3.5) 1.237 (0.976-1.569) Glycitéine (0.0) 1.226 (0.946-1.588) O-DMA : (0.0) 1.140 (0.933-1.393)	NS  0.10 NS NS 0.013 NS NS  0.044 0.077	Bonne validation des biomarqueurs Echantillon « spot urine » Reflet sur le long terme des 3 évaluations ?

			Equol (0.1) 1.455 (1.051-2.017) Entérodol : (0.3) 0.912 (0.738-1.126) Entérolactone: (4.5) 0.996 (0.824-1.202)	NS NS 0.024 NS NS	
Den Tonkelaar 2001, Pays-Bas	Post-M 14 697 88/268	Dosage Urines 2 échantillons collectés 1 à 9 ans avant Δ Méthode Time Resolv. –Fluoro- immuno-essai	Entérolactone (H 969.9 μmole/mole créatinine) vs L 235.6) 1.43 (0.79-2.59 généistéine H (196.6) vs L( 48.4) 0.83 (0.46-1.51)	NS	
Zeleniuch-Jacquotte 2004, USA	NYU study, 34- 65ans14275 189/189 Pré-M 228/228 Post-M	Dosage sérique entérolactone (Fluoro- immuno-essai)	Pré-M : H (≥24.10 nmole/L) vs (4.98), 1.6 (0.7-3.4) Post-M : H (≥24.10 nmole/L) vs (4.98), 1.0 (0.5-2.1)	0.07 0.04	Critère d'exclusion : prise d'AB 4 sem avt prise sang chez les post-M la tendance est inversée depuis premier quintile Corrélation SHBG : C : 0.13, T : 0.26
Kilkinen 2004-08-17 Finlande	Cas-témoin niché dans étude nationale périodique 206/215 31-82 ans 2/3 Post-M	Dosage sérique entérolactone (Fluoro-immuno-essai)	Total : H (≥45.4 nmole/L) vs (5.3), 1.3 (0.73-2.31) Pré-M H (≥39.8) vs (7.4), 0.73 (0.34-1.59) Post-M : H (≥38.5) vs (6.9), 1.22 (0.69-2.16)	NS NS NS	Pas d'ajustement sur facteurs de risque classiques Pas d'info sur prise d'antibiotiques



**Tableau 4- Phyto-estrogènes et cancer de l'endomètre - Etudes cas-témoins**

Auteurs et pays	Sujets	Mesure de l'exposition	OR	T	Remarques
Goodman 1997, Hawaï, USA	341/511, multi-ethnique	FFQ 250items entretien	Produits dérivés du soja H( $\geq 22g$ ) vs L( $< 0.05$ ) 0.46 (0.26-0.83)	0.01	Ajustement + y compris calories. Céréales complètes, fruits, légumes (mais pas jus) OR#
Horn-Ross 2003, USA	500 /470 appariés âge et ethnique	FFQ entretiens 100 items,	Isoflavone H ( $\geq 2.73mg/j$ )vs L ( $< 1.15$ ) 0.59(0.37-0.93) PostM 0.40(0.26-0.77) Lignanes H ( $\geq 239$ microg/jour) vs L ( $< 121$ ) 0.68 (0.44-1.1) PostM 0.57 (0.34-0.97)		Obèses avec faible consom. de isoflavonoïdes L(1.5mg/j) vs H ( $\geq 1.5$ ) 6.9 (3.3-14.5) faible consom. Lignanes L(177microg/j) vs H ( $\geq 177$ ) 4.7 (2.4-9.0)
Xu 2004, Chine	30-69 ans 832/846	FFQ entretiens Items ?	Isoflavone H ( $> 63$ mg/j)vs L ( $\leq 22.7$ ) 0.77 (0.56-1.05) Fibre soja H ( $> 2.0$ mg/j)vs L ( $\leq 0.4$ ) 0.69 (0.51-0.94) Protéine soja : H ( $> 16.0$ mg/j)vs L ( $\leq 5.9$ ) 0.67 (0.48-0.92)	0.05 0.02 0.01	tous aliments spécifiques # 1, sauf soja frais : 0.63 (0,46-0.84) Tend : 0.01 ajusté sur fruits et légumes protéine, fibres soja et isoflavones très corrélées

**Tableau 5- Phyto-estrogènes et cancer de l'ovaire - Etude cas-témoin**

Auteurs et pays	Sujets	Mesure de l'exposition	OR	T	Remarques
Mc Cann, 2003, NY, USA	124/696 Pré et Post M	FFQ nb items entretien USDA tables	Précurseurs des lignanes H ( $> 708;g/jour$ ) vs L ( $< 304$ ) 0.43 (0.21-0.85)	0.05	Fibres et légumes même effet mais indépendant

**Tableau 6- Phyto-estrogènes et cancer de la prostate**

Auteurs et pays	Sujets	Mesure de l'exposition	OR	T	Remarques
Kolonel 2000, Hawaï, USA	Cas-témoins : 1619/1618 multiethnique	FFQ entretien 147 items	H (> 39.4g/jour) vs > L (0) 0.62 (0.44-0.89)	0.06	Légumes jaune-orange et crucifères# Protection plus marquée pour cancers avancés et chez les caucasiens
Jacobsen 1998, Ca, USA	Prospective 225/12 395 Adventistes	FFQ 65 items autoadministré	H (> 1 fois/jour) vs > L (jamais) 0.3 (0.3-0.9)	0.02	Seulement jus de soja dans le questionnaire Résultats sur 3 cas
Stattin 2002 Multicentrique, Norvège, Suède Finlande	Prospective 572/160 000 86/30000 136/19 000 suivi 14 ans pour 75 %	Dosage entérolactone	H(≥15.56) vs L(<4.32) 1.08 (0.83-1.39)		Norvège le plus de poids dans l'étude et taux faibles : 8.5 nanomoles/L vs 15.6 (S) et 18.6 (F) et majorité des serums >19 ans

**Tableau 7- Phyto-estrogènes et cancer du testicule - Etude cas-témoins**

Auteurs et pays	Sujets	Mesure de l'exposition	OR	T	Remarques
Walcott 2002, USA	159/136	FFQ 152 items auto-administré litterature data-base	NS	NS	Apport de isoflavones, preignanes et lignanes, coumestrol

**Tableau 8- Phyto-estrogènes et cancer de la thyroïde - Etude cas-témoins**

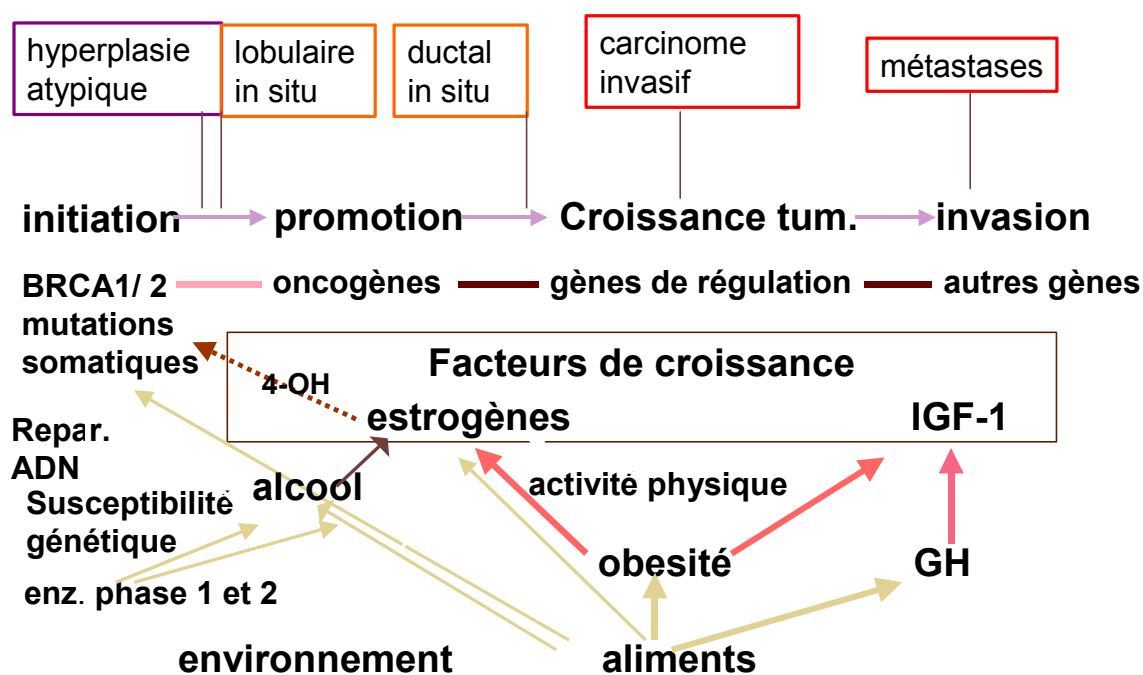
Auteurs et pays	Sujets	Mesure de l'exposition	OR	T	Remarques
Horn-Ross 2002, USA	608/558 femmes 20-74 multi-ethnique	FFQ entretien	Tofu H(≥50 g /jour) vs L (0) 0.50 (0.30-0.84) Germe d'alfalfa H(≥1)vs L(0) 0.62 (0.41-0.93)		Total Ili H( ≥7286µg/j) vs L(<1046µg/j) 0.65 (0.41-1.0) Secoisolaricirésinol H ≥107)vs L(<42) 0.56 (0.35-0.89) semble plus parqué chez femmes blanches

**Tableau 9. Récapitulatif de l'effet des isoflavones *in vivo* chez les rongeurs à différents stades de la vie**

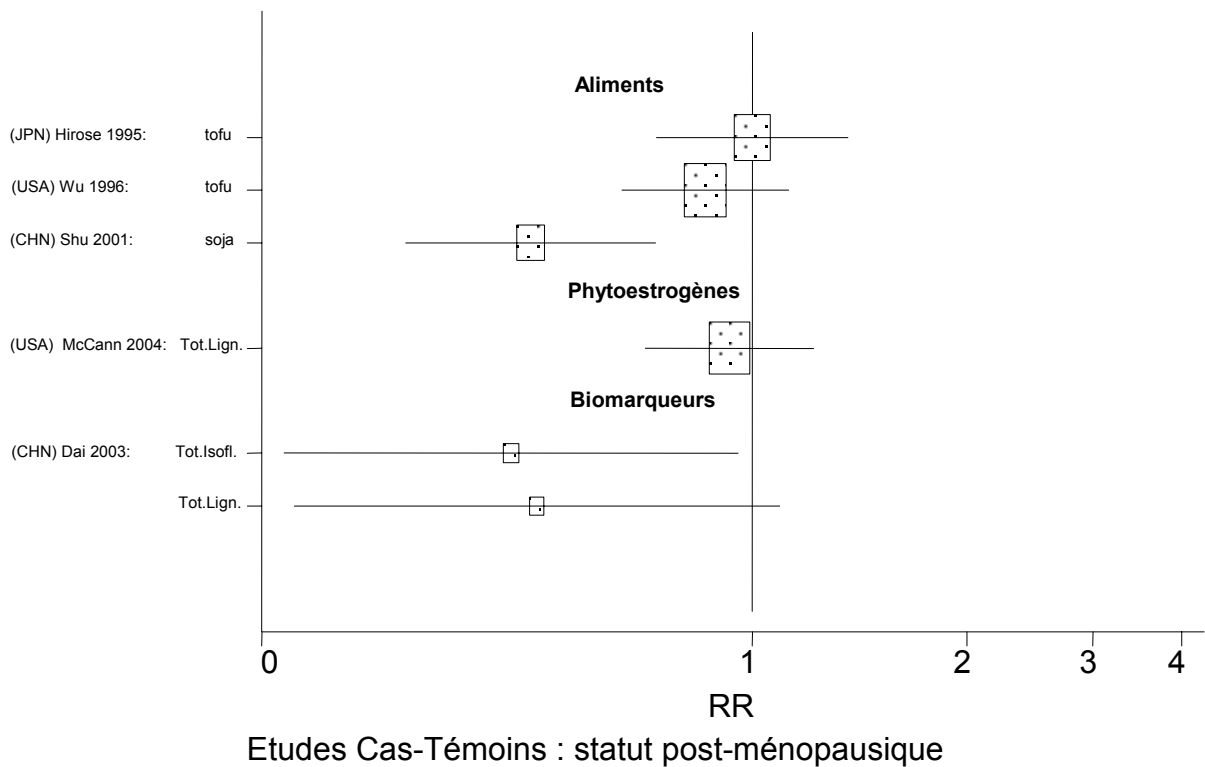
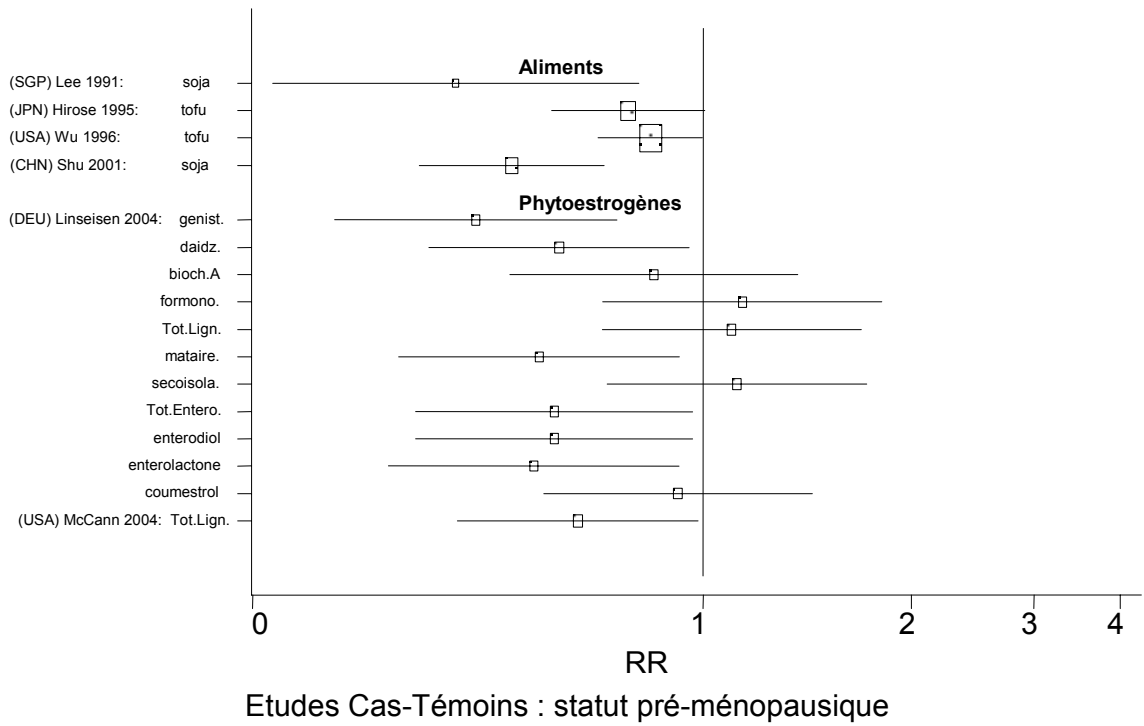
Modèle	Exposition	Composé & dose	Type de tumeur	Effet	Référence
<b>Exposition in utero et néonatale</b>					
Rate	<i>In utero</i>	Génistéine 1,5 mg/kg pc 30 mg/kg pc injections ssc	Induite au MNU à J28	Pas d'effet significatif	Pei 2003
Rate et rat	<i>In utero</i> J 15 à J20	Génistéine 0,08 mg/kg pc 0,4 mg/kg pc 1,3 mg/kg pc en injection ssc	Induite au DMBA chez les femelles F1	↗ du nombre de tumeur dose dépendante chez les F1	Hilakivi Clarke 1999
Rate	<i>In utero</i> J 16 à J20	Génistéine 20 mg/kg pc 100 mg/kg pc en injection ssc	Induite au MNU A J 35	↗ du nombre de tumeur dose dépendante chez les F1	Yang 2002
Rate	<i>In utero</i> et allaitement jusqu'à J21	Génistéine 25 mg/kg pc 250 mg/kg pc	Induite au DMBA à J 50	↘ du nombre de tumeurs dose dépendante chez les F1	Fritz 1998
Rate	Néonatale J2, J4, J6 Avant induction de la tumeur	Génistéine 500 mg/kg pc en injection ssc	Induite au DMBA à J50	↘ du nombre de tumeur induite	Lamartinière 1995
<b>Exposition prépubertaire</b>					
Souris ERKO	Du sevrage jusqu'au sacrifice	Génistéine 100 mg/kg pc per os	Induite au DMBA	↗ du nombre de tumeur ERKO vs WT Gen vs Alim témoin	Day 2001
Rate	Prépubertaire J16, J18, J20 Avant induction de la tumeur	Génistéine 500 mg/kg pc en injection ssc	Induite au DMBA à J50	↘ du nombre de tumeur induite	Murrill 1996
Rate	Prépubertaire Du 15 <sup>ème</sup> au 19 <sup>ème</sup> jour	Génistéine 1,5 mg/kg pc 30 mg/kg pc injections ssc	Induite au MNU à J28	↘ de la taille des tumeurs induites pour la dose faible. Pas d'effet avec 30 mg/kg pc	Pei 2003
Rate	Pépubertaire Du 15 <sup>ème</sup> au 18 <sup>ème</sup> jour	Génistéine 20 mg/kg pc 200 mg/kg pc en injection ssc	Induite au MNU A J 35	↗ du nombre de tumeur dose dépendante	Yang, 2002
Rate	De -14j avant la conception jusqu'à 50j post-partum	Daidzéine 19 mg/kg pc 66 mg/kg pc	Induite au DMBA à J 50	Pas d'effet dans la génération F1	Lamartinière 2002
<b>Exposition au stade adulte</b>					
Rate	Pendant 6 mois à partir de J35 Pendant l'induction des tumeurs	Génistéine et Daidzéine 10 mg/ kg pc per os	Induite au MNU à J35	↘ du nombre de tumeur induite	Constantinou 1996
Rate	Adulte J35 à J 162	Génistéine 20mg/kg pc Daidzéine 20mg/kg pc Gen + Daid 20 mg/kg pc 50%- 50%	Induite au DMBA à J 42	↘ du nombre de tumeurs dose avec Daidzéine	Constantinou 2001
Rate	Adulte J35 à J 162	Idem mais les isoflavones sont ajouté dans un aliment à base de soja avec un peu d'IF	Induite au DMBA à J 42	↘ du nombre de tumeurs dose avec Daidzéine	Constantinou 2001
Rate	Adulte de 7 semaine (50J) à 18 semaine	Biochanine A 10mg/kg pc 50mg/kg pc per os	Induite au MNU à J50	↘ du nombre de tumeurs	Gotoh 1998

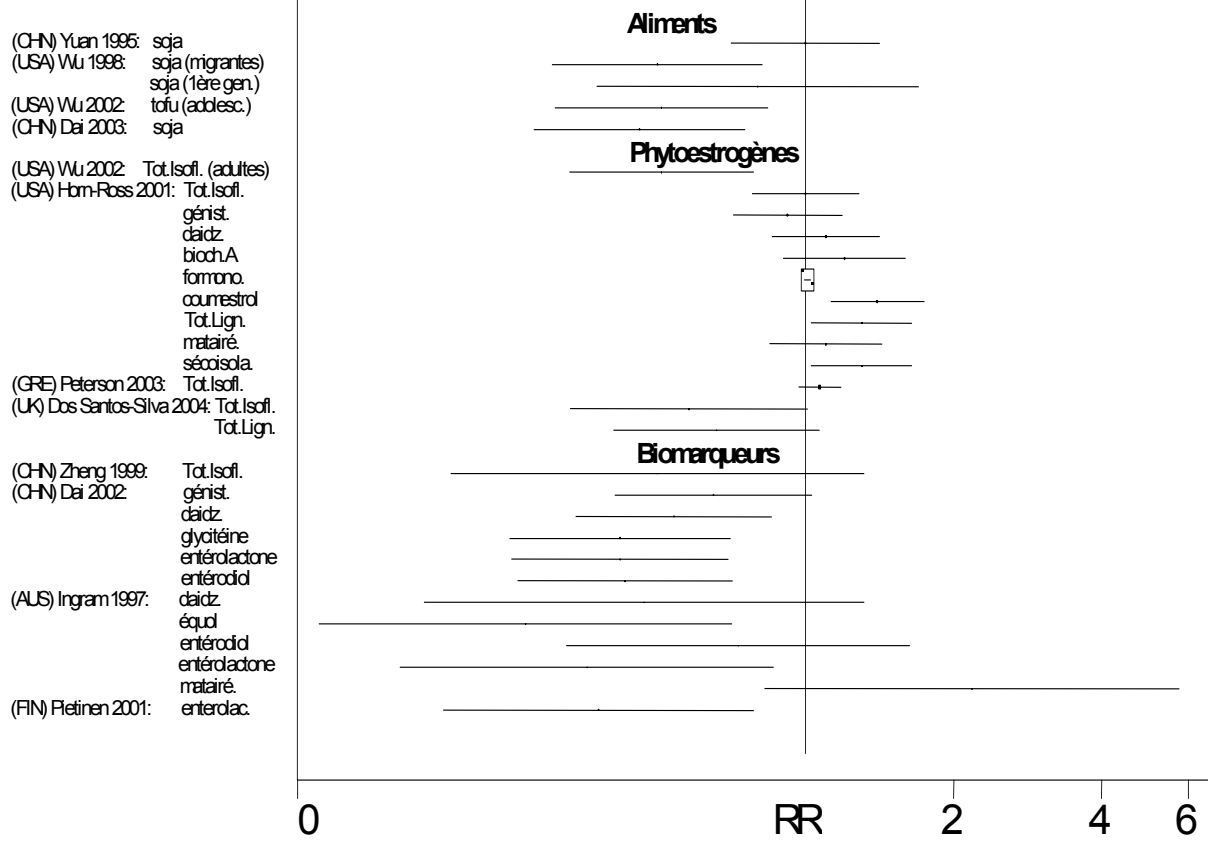
Modèle	Exposition	Composé & dose	Type de tumeur	effet	Référence
<b>Femelle ovariectomisée modèle de la ménopause</b>					
Rate	Ovariectomisée 7 à 36 semaines	Génistéine 2,5 mg/kg pc 25 mg/kg pc	Induite au DMBA	↘ du nombre de tumeurs avec les faibles doses uniquement	Ueda 2003
Rate	Ovariectomisée	Génistéine 2,5 mg/kg pc 25 mg/kg pc per os	Induite au MNU	↗ du nombre de tumeur dose dépendante	Allred 2004
Souris nude	Ovariectomisée	Génistéine Doses allant de 12,5 mg/kg pc à 100 mg/kg pc	MCF-7 implantées	↗ du nombre de tumeur dose dépendante	Yu 2001
Souris nude	Ovariectomisée	Extraits de soja avec Gen 1,5 mg/kg pc 15 mg/kg pc et 30 mg/kg pc Daid pas dosée	MCF-7 implantées	↗ du nombre de tumeur dose dépendante	Allred 2001

Figure 4. Histoire naturelle du cancer du sein

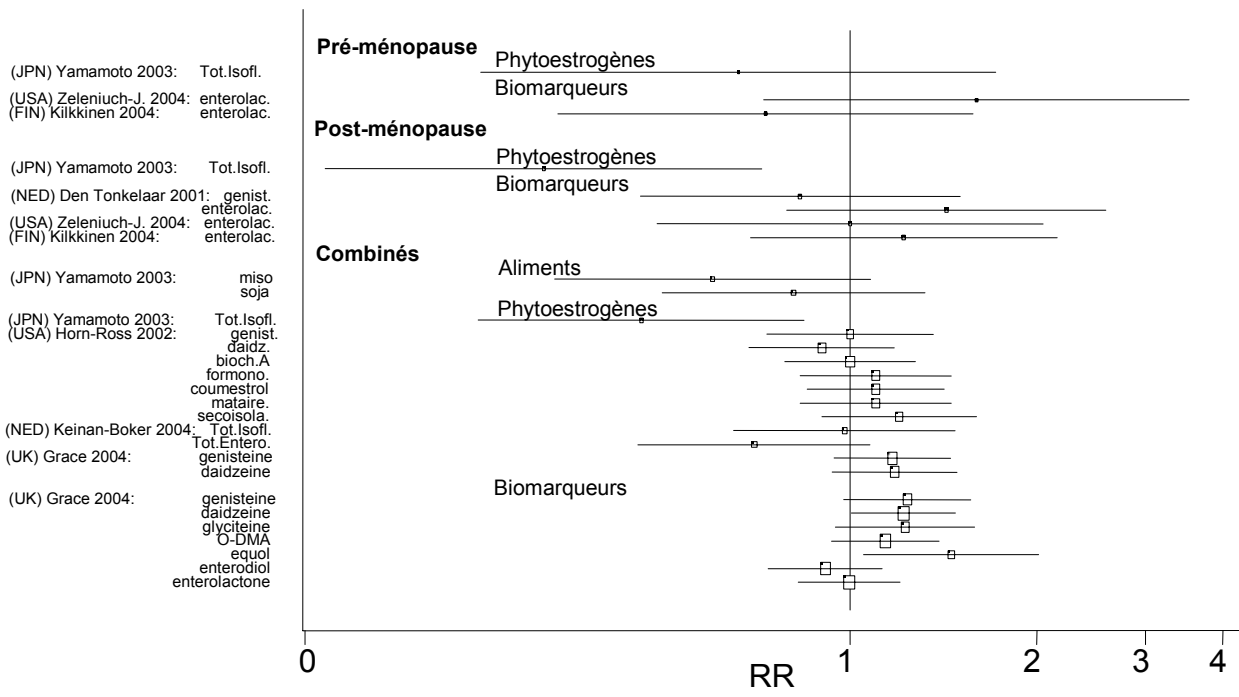


**Figure 5.**





**Etudes Cas-Témoins : statuts combinés**



**Etudes Prospectives**

- Akaza H, Miyanaga N, Takashima N, Naito S, Hirao Y, Tsukamoto T, Fujioka T, Mori M, Kim WJ, Song JM, Pantuck AJ. (2004) Comparisons of percent equol producers between prostate cancer patients and controls: case-controlled studies of isoflavones in Japanese, Korean and American residents. *Jpn J Clin Oncol*. 34, 86-9
- Atkinson C, Warren RML, Sala E et al (2004) Red clover isoflavones and mammographic breast density: a double-blind randomized placebo-controlled trial. *Breast Cancer Res*. 6, ppR170-R178.
- Berrino F., Bellati C., Secreto G., et al (2001). Reducing bioavailable sex hormones through a comprehensive change in diet: the diet and androgens randomized trial. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, 10, pp 25-33.
- Bingham SA, Day NE, Luben R et al, (2003) , Dietary fibre in food and protection against colorectal cancer in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC): an observational study. *Lancet*. 361, pp1496-501
- Bjorntorp P, Rosmond R, (2000) The metabolic syndrome, a neuroendocrine disorder, *Br J Nutr*, 83S1, pp -57
- Boyd NF, Lockwood GA, Martin IJ et al (1998) Mammographic densities and breast cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 7, pp 1133-1144
- Cassidy A, Bingham S, Setchell K (1995) Biological effects of isoflavones in young women: importance of the chemical composition of soybean products, *Br J Nutr*, 74, pp. 587-601.
- Clavel-Chapelon F, Gerber M. , (2002) Reproductive factors and breast cancer risk. Do they differ according to age at diagnosis? *Breast Cancer Res. and Treatment*, 72, pp107-115
- Cramer DW (1989) Lactase persistence and milk consumption as determinants of ovarian cancer risk. *Amer J. Epidemiol*, 130, pp 904-910.
- Dai Q, Shu XO, Jin F et al (2001) Population based case-control study of soyfood intake and breast cancer risk in Shanghai. *Br J Cancer*, 85, pp. 372-378
- Dai Q, Franke AA, Jin F et al (2002) Urinary excretion of phytoestrogen and risk of breast cancer among Chinese women in Shanghai, *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev*, 11, pp. 815-821.
- Dai Q, Franke AA, Yu H et al, (2003) Urinary excretion of phytoestrogen and breast cancer risk: evaluating potential effect modifiers endogenous estrogens and anthropometrics, , *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev*, 12, pp 497-502.
- Demark-Wahnefried W, price D, Polascik T et al, (2001), Pilot study of dietary fat restriction and flaxseed supplementation in men with prostate cancer before surgery: exploring the effects on hormonal levels, prostate specific antigen, and histopathologic features, *Urology*, 58, pp. 47-52.
- Den Tonkelaar, Keinan-Boker L, Van't Veer P et al (2001) Urinary phytoestrogen and postmenopausal breast cancer risk, *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev*, 10, pp. 223- Duncan AM, Underhill KE, Xu X et al, (1999), modest hormonal effects of soy isoflavones in postmenopausal women, *J Clin Endocrinol Metab*, 84, pp.3479-3484228.
- Duncan AM, Underhill KE, Xu X et al, (1999), modest hormonal effects of soy isoflavones in postmenopausal women, *J Clin Endocrinol Metab*, 84, pp.3479-3484.
- Doll R & Peto R (1981) The causes of cancer, *J Natl Cancer Inst*, 66,pp.1191-1208
- Gerber M. Micronutriments et microconstituants végétaux protecteurs dans le cancer du sein. (2001) *Bull. Cancer* , 88, pp 943-953
- Gerber M, Boutron-Ruault M-C, Hercberg S, Riboli E, Scalbert A, Siess M-H (2001) Actualités en cancérologie : fruits, légumes et cancers. Une synthèse du réseau Nacre. *Bull. Cancer* , 89, pp 293-312
- Fritz W, Wang J, Elkoum I & Lamartiniere (1998) Dietary genistein down-regulates androgen and estrogen receptor expression in the rat prostate. *Mol Cell Endocrinol*, 186, pp. 89-99.
- Goodman MT, Wilkens LR, Hankin JH et al (1997) Association of soy and fiber consumption with the risk of endometrial cancer, *Amer J Epidemiol*, 146, pp. 294-306.
- Grace PB, Taylor JI, Low YL et al (2004) Phytoestrogen concentrations in serum and spot urine as biomarkers for dietary phytoestrogen intake and their relation to breast cancer risk in European Prospective investigation of cancer and nutrition-Norfolk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 13 pp698-708
- Greenstein J, Kushi L, Zheng et al. (1996) Risk of breast cancer associated with intake of specific foods and food groups. *Amer J Epidemiol*, 145, pp S36
- Haggans CJ, Hurchins AM, Olson BA et al (1999) Effect of flaxseed consumption on urinary estrogen metabolites in postmenopausal women, *Nutr cancer*, 33, pp. 188-195.
- Haggans CJ, Travelli E, Thomas W et al (2000) Effect of flaxseed and wheat bran consumption on urinary estrogen metabolites in postmenopausal women, *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev*, 9, pp. 719-725.
- Hill A.B., (1965). The environment and disease: association or causation? *Proc. R. Soc. Med.*, 58, pp295-300
- Hirayama T (1990) Life-style and mortality: a large-scale census-based cohort study in Japan. IN Wahrendorf J ed. *Contribution to epidemiology and biostatistics*, Basel, Karger.
- Hsieh C-Y, Santell RC, Haslam SZ, Helferich WG. Estrogenic effects of genistein on the growth of estrogen receptor-positive human breast cancer (MCF-7) cells in vitro and in vivo. *Cancer Res* 1998 ; 58, pp. 3833-8.
- Hom-Ross P, John E, Lee M et al (2001) Phytoestrogen consumption and breast cancer risk in a multiethnic population . The bay area breast cancer study, *Amer J Epidemiol*, 154, pp. 434-441.
- Hom-Ross P, Hoggat KJ, West DW et al (2002) Recent diet study and breast cancer risk: the California teachers study, *Cancer causes and control*, 13, pp.407-415.
- Hom-Ross P, John E, Canchola AJ et al (2003) Phytoestrogen intake and endometrial cancer risk, *J Natl. Cancer Inst*, 95,pp.1158-1164

Hulten K, Wkqvist A, Lenner p et al(2002). An incident case-referent study on the lignan enterolactone and breast cancer. *Eur J Nutr*, 41, pp168-176.

Ingram D, Sanders K, Kolybaba M, Lopez D (1997). Case-control study of phyto-oestrogens and breast cancer. *The Lancet* , 350,pp. 990-94.

Jacobsen B, Knutsen S & Fraser G (1998), Does soymilk intake reduce prostate cancer incidence? The Adventist Health Study (United States), *Cancer Causes Control*, 9, 553-557.

Keinan-Boker L, van der Schouw Y T, Grobbee D E, Peeters P H M (2004) Dietary phytoestrogens and breast cancer risk *Am J Clin Nutr*, 79, pp282-288.

Key TJ, Sharp GB, Appleby PN, et al. (1999) Soya foods and breast cancer risk: a prospective study in Hiroshima and Nagasaki, Japan. *Br J Cancer*; 81, pp. 1248-1256.

Kilkinen A, Virtamo J, Vartainen E et al (2004) serum enterolactone concentration is not associated with breast cancer risk in a nested case-control study *Int. J. Cancer*, 108, pp277—280.

Kolonel LN, Hankin JH, Whittemore AS et al (2000), Vegetable, fruits, legumes and prostate cancer: a multiethnic case-control study, *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 9, pp. 795-804.

Lee HP, Gourley L, Duffy SWX, (1991). Dietary effects on breast cancer risk in Singapore. *The Lancet*, 337, pp. 1197-1200.

Linseisen J, Piller R, Herman S, Chang-Claude J (2004) Dietary phytoestrogen and premenopausal breast cancer risk in a German case-control study. *Int J Cancer*, 110, pp 284-290.

Maskarinec G, Williams AE and Carlin L (2003) Mammographic densities in one-year isoflavone intervention. *Eur. J. Cancer Prev*. 12, pp 165-169.

MacMichael-Phillips

McCann SE, Freudenheim JL, Marshall JR, Graham S (2003) Risk of human ovarian cancer is related to dietary intake of selected nutrients, phytochemicals and food groups. *J Nutr*, 133, 1937-1942.

McCann SE, Mutti P, Vito D et al (2004) Dietary lignanintakes and risk of pre- and postmenopausal breast cancer *Int J Cancer*, 111, pp440-443

Messina M, Bennink M. (1998)Soyfoods isoflavones and risk of colonic cancer: a review of the in vitro and in vivo data. *Baillères Clin Endocrinol Metab*, 12, pp707-728

Nagata C, Takatsuka N, Inaba et al (1998). Effect of soymilk consumption on serum estrogen concentrations in premenopausal Japanese women. *J Natl Cancer Inst*, 90, pp. 1830-1835.

Norat T, Lukanova A, Ferrari P and Riboli E. (2002) Meat consumption and colorectal cancer risk: dose-response meta-analysis of epidemiological studies. *Int. J. Cancer*, 98, 241-256

Petrakis NL, King EB (1988). Cytological abnormalities in nipple aspirates of breast fluid from women with severe constipation. *Lancet*, II, pp 1203

Petrakis NL, Barnes S, King EB et al (1996) Stimulatory influence of soy protein isolate on breast secretion in pre- and post-menopausal women. *Cancer Epidemiol. Biomarkers. Prev*. 5, 785-794.

Phipps WR, martini MC, Lampe JW et al. (1993). Effect of flaxseed ingestion on the menstrual cycle. *J. Clin Endocrinol Metab* 77, pp 1215-1219

Pietinen P, Stumpf K, Mannisto S (2001) Serum enterolactone and risk of breast cancer: a case-control study in Eastern Finland, *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 10, pp. 339-344.

Potter JD (1995) Hormones and colon cancer, *J.NatlCancer Inst*, 87, 1039-1040

Rutter CM, Mandelson MT, Laya MB et al (2001) Changes in breast density associated with initiation, discontinuation and continuing use of hormone replacement therapy. *JAMA*, 285, pp 171-176.

Saintot M, Malaveille C, Hautefeuille A, Gerber M (2003). Interaction between genetic polymorphisms of Cytochrome P450-1B1, sulfotransferase 1A1, catechol-O-methyl transferase, and tobacco exposure on breast cancer risk. *Int. J. Cancer*, , 107, pp652-7

Saintot M, Malaveille C, Hautefeuille A, Gerber M. (2004) ,Interactions between genetic polymorphism of cytochrome p450-1B1 and environmental contaminants in breast cancer risk. *Eur. J. Cancer Prev*. 13,pp 83-6

Sakoda LC, Horn-Ross P L (2002) reproductive and menstrual history and papillary thyroid cancer risk: The san Francisco Bay area study, *. Cancer Epidemiol, Biomarkers, Prev*, 11, pp51-57

Shao Z-M, Wu J, Shen Z-Z, Barsky SH. Genistein exerts multiple suppressive effects on human breast carcinoma cells. *Cancer Res* 1998 ; 58: 4851-7.

Shu XO, Jin F, Dai Q (2001) Soyfoodintake during adolescence and subsequent risk of breast cancer among Chinese women, *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 10, pp. 483-488.

Stattin P, Alderkreutz H, Tenkanen L, et al (2002) Circulating enterolactone and prostate cancer risk: a Nordic nested case-control study, *Int J Cancer*, 99, 124-129.

Strom S, Yamamura Y, Duphorne C et al (1999). Phytoestrogen intake and prostate cancer: a case-control study using a new data base. *Nutr Cancer*, 33, pp.20-25.

Sun CL, Yuan JM, Wang XL, Gao YT, Ropps RK, Yu, MC (2004) Dietary soy and increased risk of bladder cancer: a prospective cohort study of men in Shanghai, China *Int J Cancer*, 112,319-323.

Den Tonkelaar I, Keinan-Boker L, Van't Veer P et al (2001) urinary phytoestrogens and post-menopausal breast cancer risk. *Cancer Epidemiol, Biomarkers, Prev*, 10, pp223-228

Walcott FL, Hauptmann M, Duphorne CM, et al (2002) A case-control study of dietary phytoestrogens and testicular cancer risk, *Nutr Cancer*, 44, pp.44-51

Witte JS, Ursin G, Siematycki J et al ( 1997) Diet and premenopausal bilateral breast cancer: a case-control study. *Breast Cancer Res. Treat*, 42, pp. 243-251

White Book (2000). The antioxidants in tomatoes and tomato products and their health benefits. European network FAIR CT 97 32 33, Avignon, France, Amitom



World Cancer Research Fund (1997). Food, Nutrition and the Prevention of Cancer: a global perspective. World Cancer Research Fund with the American Institute for Cancer Research. Menasha, USA, Banta Book Group.

Wrensch MR, Petrakis NL, King EB et al, (1991). Breast cancer incidence in women with abnormal cytology in nipple aspirates of breast fluid. *Amer J Epidemiol*, 135, pp 130-141

Wu AH, Ziegler RG, Horn-Ross P L et al (1996) Tofu and risk of breast cancer. *Cancer Epidemiol, Biomarkers, Prev*, 5, pp901-906

Wu AH, Ziegler RG, Nomura A M Y (1998) Soy intake and risk of breast cancer in Asians and Asian-Americans. *Am J Clin Nutr*, 68 (suppl), pp1437S-1443S.

Wu AH, Wan P, Hankin J (2002) Adolescent and adult soy intake and risk of breast cancer in Asian-Americans *Carcinogenesis*, 23, pp1491-1496.

Xu X, Duncan AM, Wangen KE, Kurzer MS (2000) Soy consumption alters endogenous estrogen metabolism in post-menopausal women, *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev*, 9, pp. 781-786.

Yamamoto S, Sobue T, Kobayashi M et al (2003) Soy, isoflavones and breast cancer risk in Japan, *J Natl Cancer Inst*, 95, pp. 906-913.

Zeleniuch-Jacquotte A, Alderkreutz H, Shore RE et al (2004) Circulating enterolactone and risk of breast cancer: a prospective study in New York. *British J Cancer*, 91 pp99-105.

Zheng W, Dai Q, Custer L J et al (1999) urinary excretion of isoflavonoids and the risk of breast cancer *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev*, 8, pp. 35-40.



# Effet des phyto-estrogènes sur les maladies cardio-vasculaires

Claude Louis Léger, Mariette Gerber

L'athérosclérose est la cause majeure de la mortalité cardiovasculaire. D'après les statistiques disponibles à l'American Heart Association, on peut estimer que l'athérosclérose<sup>35</sup> représente les trois quarts des décès attribués aux maladies cardiovasculaires (MCV). La seule ischémie cardiaque — directement liée à l'athérosclérose coronarienne (AC) — représente 54 % des décès dus aux MCV. En Europe, si l'on examine la situation de la Suède et de la France pour lesquelles la mortalité par MCV chez l'Homme représente respectivement la plus grande et la plus faible part de la mortalité totale (47 % et 28 %) (Eurostat 2002) on estime que l'ischémie fatale (cardiaque et cérébrale) représente à elle seule 72 % et 57 % de la mortalité cardio-vasculaire. L'évaluation de la morbi-mortalité ayant pour cause un processus athérosclérotique revient à évaluer, avec une bonne approximation, la morbi-mortalité cardio-vasculaire totale. Il a été observé par exemple que la diminution du cholestérol plasmatique, un marqueur intermédiaire de risque majeur, a des répercussions comparables sur les deux types de morbi-mortalité (voir les grandes études épidémiologiques en prévention primaire sur les statines) (Sacks 1996, Downs 1998).

L'étude de l'effet des phyto-estrogènes sur les MCV a pour raison première la proximité structurale de ces molécules et des estrogènes (voir le chapitre "Mécanismes"), hormones naturellement sécrétées chez la femme avant la ménopause et auxquelles on attribue un rôle athéroprotecteur. A contrario, la protection contre les complications cliniques de l'athérosclérose est progressivement perdue chez la femme dans les années qui suivent la ménopause. Ce constat a motivé la recherche et la mise au point d'un THS dont l'un des objectifs originels consistait à abaisser le risque cardio-vasculaire.

Aux Etats-Unis, la FDA a approuvé en 1999 le principe des allégations relatives aux effets des protéines de soja sur les MCV ([www.cfsan.fda.gov/~dms/lab-ssa.html](http://www.cfsan.fda.gov/~dms/lab-ssa.html)). Les mécanismes qui permettraient d'expliquer les effets observés dans les études scientifiques ayant servi de base à ces allégations (Anderson 1995) sont loin d'être élucidés. L'une des questions importantes que l'on se posera dans ce chapitre sera de savoir quelle part jouent les phyto-estrogènes (en l'espèce les isoflavones) dans l'action protectrice vis à vis des MCV attribuée aux protéines de soja.

Après un rappel sur la pathogénie de l'athérosclérose et sur les marqueurs de risque ainsi qu'un rappel sur le rôle et les mécanismes d'action des estrogènes strictement liés à l'athérosclérose, nous envisagerons successivement les études épidémiologiques, cliniques – en séparant les études réalisées à l'aide de phyto-estrogènes purifiés et celles réalisées à l'aide de protéines de soja –, et chez l'animal, faisant état d'une relation entre biomarqueurs de l'athérosclérose et prise orale de phyto-estrogènes. Les mécanismes potentiellement capables d'expliquer les relations observées seront ensuite examinés à la lumière des résultats des études *in vitro*.

## I- Rappels concernant l'athérosclérose, la pathogénie et les marqueurs de risque

### I-1 Importance de l'athérosclérose dans l'étiologie des MCV

Les MCV sont les maladies de l'ensemble de l'appareil circulatoire (coeur, artères, capillaires, veines). L'athérosclérose affecte la paroi des grosses et moyennes artères. Il s'agit pour l'essentiel d'un processus prenant place dans l'intima de la paroi, aboutissant à la formation d'un massif (une plaque) lipido-fibro-cellulaire, entraînant un épaississement de celle-ci et un rétrécissement (ou sténose) concomitant de la lumière du vaisseau. Lorsque l'artère coronaire est atteinte, une pathologie cardiaque se développe. L'athérosclérose de la

---

<sup>35</sup> Athérosclérose coronarienne (AC), congestion cérébrale de type ischémique (80 % des cas de congestion), et l'insuffisance cardiaque (l'AC en est la première cause dans 70 % des cas)

coronaire est responsable non seulement des phénomènes ischémiques et de leur conséquence ultime, l'infarctus du myocarde, mais aussi de l'angine de poitrine instable, d'une part importante des problèmes liés à l'arythmie cardiaque et à ses formes aggravées (fibrillation ventriculaire, arrêt cardiaque), ainsi qu'à l'insuffisance cardiaque (Bourdarias 1998).

D'autres grosses artères peuvent être affectées (l'aorte, les artères conduisant le sang au tissu nerveux central...). Les lésions qui en résultent sont à l'origine de manifestations cliniques *in situ* (cas des grosses artères), ou à distance. Dans ce dernier cas les événements sont dus à la rupture d'une plaque athérosclérotique dans la paroi d'une grosse artère (voir paragraphe suivant). La rupture de plaque peut également entraîner la thrombose (formation d'un thrombus) à laquelle les phénomènes de coagulation et d'agrégation plaquettaire contribuent grandement. Mais toute rupture de plaque ne s'accompagne pas d'une thrombose, celle-ci dépendant étroitement de nombreux facteurs qui déterminent la « thrombogénicité » de la plaque.

Les éléments issus de la rupture de plaque sont entraînés par le flux sanguin et forment un thrombus secondaire dès qu'ils atteignent des vaisseaux de plus faibles diamètres ou préalablement sténosés. Ils occasionnent des événements thrombo-emboliques (congestion cérébrale de type ischémique, thrombo-embolie pulmonaire ou des membres inférieurs). La mort subite est causée par des événements liés pour l'essentiel à une évolution péjorative de la lésion athérosclérotique<sup>36</sup>.

## **I-2 La pathogénie**

La pathogénie de l'athérosclérose est un processus évolutif. En France, la mortalité due à l'athérosclérose coronarienne et aux maladies cérébro-vasculaires est négligeable à 54 ans, s'élève à 200 décès par 100 000 habitants dans la tranche d'âge 65-74 ans, et est multipliée par 10 au delà (World Health Statistic Annual 1997). Son évolution en fonction de l'âge revêt une forme quasi-exponentielle.

### **I-2-1 Les différents stades du processus athérosclérotique**

Cette pathogénie est complexe. On la divise habituellement en trois stades pré-cliniques et trois stades cliniques (Stary 1994 et 1995). Les trois premiers stades se caractérisent essentiellement par un état inflammatoire chronique faisant intervenir une accumulation croissante de lipides intracellulaires (principalement des esters de cholestérol) dans les macrophages, aboutissant à la formation de cellules spumeuses et de stries lipidiques au niveau de l'intima.

Lors des trois derniers stades, aux phénomènes précédents s'ajoutent des phénomènes fibro-prolifératifs, apoptotiques et de calcification aboutissant à la formation d'une plaque fibro-lipido-cellulaire plus ou moins chargée en débris cellulaires et en dépôts calcifiés. L'instabilité de la plaque est directement liée à l'importance de la part des lipides par rapport aux autres constituants fibro-cellulaires et détermine en grande partie le risque de rupture de plaque, à l'origine des événements ischémiques et emboliques. Dans la phase clinique de la pathogénie, la formation d'un « clou » plaquettaire ou d'un thrombus intervient souvent (voir plus haut). On parle alors d'une évolution thrombo-athérogénique.

### **I-2-2 Le rôle des cellules endothéliales, des cellules musculaires lisses vasculaires, et des macrophages dans la formation de la plaque au niveau de l'intima**

Au cours de la phase précoce de la formation de la plaque, les cellules au contact du sang circulant (les cellules endothéliales) connaissent un « basculement » métabolique qui conduit à la dysfonction endothéliale, caractérisée en particulier par (1) la diminution de la production basale d'un puissant vasodilatateur, le monoxyde d'azote NO, (2) une production accrue de cytokines de l'inflammation, de facteurs de croissance (notamment pour les monocytes et les

---

<sup>36</sup> Il s'agit de l'arrêt cardiaque, l'embolie pulmonaire, la rupture de l'aorte et l'hémorragie intra-cranienne

macrophages) et d'espèces réactives de l'oxygène et de l'azote<sup>37</sup>, (3) une altération de la synthèse des eicosanoïdes et (4) l'apparition de protéines d'adhésion ou chimioattractantes dont l'activité prélude à la trans-migration des monocytes vers l'espace sous-endothélial, étape indispensable à leur recrutement dans l'intima et à leur transformation en macrophages puis en cellules spumeuses.

Face à l'endothélium des vaisseaux, l'intima est bordée par la média, constituée de cellules musculaires lisses dont la dé-différenciation et la prolifération va entraîner leur migration dans l'intima, et mener à la formation d'une autre famille de cellules spumeuses. La formation des cellules spumeuses (principalement macrophagiques) constitue l'étape 3 (formation des stries lipidiques), préliminaire à l'étape 4 au cours de laquelle l'accumulation des lipides intra- et extra-cellulaires s'amplifie et aboutit à la formation de la plaque athéromateuse. L'infiltration des cellules musculaires lisses dans l'intima et la sécrétion de la matrice extra-cellulaire par les cellules musculaires et les macrophages sont impliquées dans la constitution de la partie fibro-cellulaire de la plaque.

### **I-2-3 Les processus oxydatifs et les LDL oxydées**

La lésion d'athérosclérose ayant une origine inflammatoire, des processus oxydatifs et des produits d'oxydation jouent un rôle majeur dans la pathogénie (Ross 1993). Les produits d'oxydation des lipides se retrouvent principalement dans les LDL oxydées (LDLox) qui agissent à leur tour dans la paroi vasculaire sur différentes cibles cellulaires (endothéliales, macrophagiques et musculaires), contribuant au déclenchement et à l'amplification des phénomènes inflammatoires et prolifératifs (Steinberg 1989). Des formes oxydées des chylomicrons et des VLDL pourraient également jouer un tel rôle.

### **I-2-4 Rôle des antioxydants**

Les antioxydants ont été initialement considérés comme des substances pouvant s'opposer à l'oxydation des LDL *in vivo*, donc potentiellement capables de prévenir ou freiner les processus athérosclérotiques dépendants des LDLox. Il existe aujourd'hui une tendance marquée à minimiser ce rôle (au moins pour certains d'entre eux, en raison de leurs concentrations circulantes trop faibles pour expliquer cette action) et à considérer davantage leurs niveau cellulaire, notamment sur l'activité ou l'expression de protéines (enzymes, récepteurs, facteurs de transcription...) impliquées dans l'athérosclérose (De Nigris 2001).

### **I-2-5 Le cholestérol circulant: un facteur de risque crucial dans l'athérosclérose**

Les études épidémiologiques d'observation ont établi depuis longtemps que des teneurs plasmatiques élevées en cholestérol total (CT) et cholestérol des LDL (C-LDL) et de faibles teneurs en cholestérol des HDL (C-HDL) étaient des marqueurs fiables de risque cardiovasculaire (Castelli 1986, Wilson 1991). Ce sont des marqueurs fondés sur le statut du cholestérol (FSC). Il semble aujourd'hui prouvé que le principal « facteur déclenchant » du processus athérosclérotique est une cholestérolémie élevée. Il faut citer pour preuve les études épidémiologiques d'intervention en prévention primaire préalablement citées (p. 2), en prévention secondaire (Farnier 2003) et des études mécanistiques récentes effectuées chez l'Homme (Sanpietro 1997). Le cholestérol plasmatique est un marqueur de risque intervenant dans la chaîne causale d'évènements menant à la lésion.

### **I-2-6 Des marqueurs de risque de l'athérosclérose indépendants du cholestérol**

Des marqueurs de risque indépendants de l'hypercholestérolémie, c'est à dire non fondés sur le statut du cholestérol (NFSC), doivent être pris en compte dans l'évaluation des risques cardiovasculaires. Certains sont reconnus pour leur valeur (fiabilité) descriptive ou pronostique, d'autres sont plus discutés.

---

<sup>37</sup> Les ions superoxyde et peroxy-nitrite, produits par des systèmes enzymatiques spécifiques : oxydases, NO synthétase et NO synthétase dite « découplée ».

L'hypertriglycéridémie chronique et/ou un pic post-prandial élevé de la triglycéridémie (impliquant des niveaux élevés de lipoprotéines riches en triglycérides) sont de bons exemples de tels marqueurs (Hennig 2001).

Une triglycéridémie élevée est souvent associée à des marqueurs de risque impliqués dans le syndrome métabolique selon le rapport du National Cholesterol Education Program (2001) (l'insulino-résistance, la glycémie à jeun  $\geq 1,10$  g/l, l'hypertension, l'obésité abdominale, l'hyperbétalipoprotéïnémie et de faibles taux de HDL) qui est lui-même un marqueur de risque important (Lamarche 1998, Grundy 1999). Deux paramètres anthropométriques (le tour de taille et le rapport [tour de taille]/[tour de hanche] (RTH)) sont souvent utilisés comme indicateur d'un syndrome métabolique.

Le diabète, limité à sa définition stricte (glycémie à jeun  $\geq 1,26$  g/l), quelle que soit sa forme, et en particulier le diabète de type 2 (non insulino-dépendant), sont des facteurs de risque coronarien bien connus (Haffner 1998). L'hyper-insulinémie est un facteur de risque indépendant de cardiopathies ischémiques. La présence d'un syndrome métabolique chez des diabétiques de type 2 est fréquente et est associée à une augmentation du risque cardio-vasculaire (Bonora 2004). C'est la raison pour laquelle un paragraphe sera consacré ici au traitement du diabète.

Il existe d'autres marqueurs de risque indépendants : la Lp(a), l'hyperhomocystéïnémie, des marqueurs du statut fibrinolytique (par exemple le plasminogen activator inhibitor de type 1 ou PAI-1), ainsi que des marqueurs circulants positifs ou négatifs de l'inflammation : positifs pour TNF $\alpha$  (tumor necrosis factor alpha), la protéine C réactive ou CRP, l'interleukine-6 ou IL-6 et la céruloplasmine, négatif pour TGF $\beta$  (transforming growth factor bêta) qui est également pro-fibrosante. Les marqueurs positifs de l'inflammation sont fiables si l'hypothèse de foyers inflammatoires non liés à l'athérosclérose a été préalablement levée. Néanmoins, la CRP et dans une moindre mesure l'IL-6 ont été reconnues comme marqueurs prédictifs de risques cardio-vasculaires majeurs chez la femme post-ménopausée (Ridker 2000).

Des indicateurs d'oxydation ont été proposés comme marqueur de risque cardio-vasculaire en se fondant sur la relation positive existant entre oxydation des LDL et athérosclérose. En fait, deux problèmes sont posés : la fiabilité de l'indicateur d'oxydation et sa valeur pronostique dans l'évaluation du risque. Les isoprostanes, les oxystérols, les anticorps anti-LDL oxydées sont des indicateurs fiables d'oxydation, mais leur valeur pronostique n'a pas été réellement validée. En revanche, les mesures des diènes conjugués et des TBARS (thiobarbituric acid reactive substances, parmi lesquelles se trouvent le malondialdéhyde ou MDA) des LDL circulantes ou du plasma sont largement contestées. Elles ne satisfont pas à des critères de spécificité en raison de nombreuses interactions possibles. La mesure de l'oxydation des LDL réalisée *ex vivo* en présence de cuivre (permettant d'apprécier « l'oxydabilité » des LDL) n'est pas un indicateur fiable de l'oxydation des LDL *in vivo* et n'a pas de pertinence physiologique. Elle est également contestée en tant que marqueur de risque cardio-vasculaire (Steinberg 2002, Salonen 2000, Okumura 2002).

Récemment des tests permettant de mieux cerner le statut de la paroi vasculaire ont été utilisés. Il s'agit de la compliance systémique artérielle (systemic arterial compliance ou SAC), de la vaso-réactivité de l'artère brachiale (brachial artery reactivity testing ou BART) (Redberg 2003) et de la vélocité de l'onde de pouls (pulse wave velocity ou PWV). Tous ces paramètres permettent d'évaluer la « souplesse » et la vaso-réactivité des artères et apprécient indirectement la fonction endothéliale et son altération (la dysfonction endothéliale). La perte de compliance artérielle a pour signification une augmentation de la rigidité artérielle et témoigne spécialement d'une atteinte des grosses artères. La rigidité artérielle est un facteur de risque cardiovasculaire indépendant (Laurent 2001). Ces mesures non invasives seraient évocatrices de stades précliniques (Celemajer 1992).

## II- Méthodologie

Nous examinerons dans un premier temps les résultats des études épidémiologiques, puis ceux des études cliniques d'intervention. Seules seront retenues celles qui fournissent des informations suffisantes sur (1) la nature des produits testés, (2) la consommation de ces produits au cours de l'étude (évaluée soit par enquête ou contrôle direct, soit par le suivi de

biomarqueurs plasmatiques ou urinaires) et (3) le statut clinique des sujets soumis à l'étude. En ce qui concerne les études cliniques, nous avons choisi pour la clarté de l'exposé d'examiner d'abord les résultats utilisant les phyto-estrogènes seuls, puis celles utilisant les PS ou les isolats de PS. Enfin nous examinerons les études portant sur des modèles expérimentaux animaux et cellulaires. Celles-ci peuvent apporter, par les mécanismes d'action qu'elles sont susceptibles de suggérer, des explications utiles aux observations des études épidémiologiques ou cliniques. Nous verrons que l'apport des modèles animaux dans ce domaine est limité. Enfin, il est par ailleurs important de noter que les études épidémiologiques d'observation ou analytiques et les études cliniques d'intervention ont souvent considéré ou utilisé non les PE seuls, mais la forme d'apport la plus commune dans les pays fortement consommateurs, les protéines de soja (PS) ou des isolats de PS, qui peuvent associer les effets de la partie protéique et des PE (voir tableaux 2 et 3). Ce facteur de confusion sera considéré.

### III- Les résultats des études épidémiologiques

La consultation des bases de données bibliographiques montre qu'il n'existe aujourd'hui que trois études épidémiologiques portant sur l'association entre consommation alimentaire de phyto-estrogènes et indicateurs de risque cardio-vasculaire.

**La première** (Vanharanta 1999) **est nichée dans la cohorte « Kuopio ischaemic disease risk factor study »**. C'est une étude prospective analysée sous la forme cas-témoin (témoins appariés sur âge et résidence) et basée sur le dosage sérique d'entérolactone, un biomarqueur de consommation de lignanes. L'effectif final de la cohorte, après élimination des sujets présentant une maladie coronarienne (MC) au moment de l'enrôlement dans la cohorte, était de 2005 hommes recrutés aléatoirement dans la population de Kuopio (Finlande) et les communautés rurales avoisinantes. Le suivi était de 10 ans en moyenne. Les événements aigus de MC ont été enregistrés selon les critères de l'étude MONICA dont faisait partie cette cohorte. Les sérums ont été prélevés au début de l'étude et ont été conservés à  $-20^{\circ}\text{C}$  pendant 11.9 ans en moyenne. Le dosage était effectué par immunofluorescence et marquage à l'euprotium. La fiabilité du dosage a été testée par rapport à la méthode de référence, la spectrométrie de masse (corrélation entre les deux méthodes : 0.82). Sa sensibilité est compatible avec les valeurs sériques à mesurer. L'apport alimentaire a été évalué en même temps que la prise de sang par un enregistrement de 4 jours. Les témoins ont un taux d'entérolactone sérique significativement plus élevé ( $23.5 \pm 18.2$  vs  $18.2 \pm 21.1$  nmol/L). Le risque de MC est diminué de 65% (0.35, IC 0.14-0.88) après ajustement sur les autres facteurs de risque pour un taux  $> 30.10$  nmol/L comparé à un taux  $< 15.10$  nmol/L. Par ailleurs un taux élevé d'entérolactone est inversement associé à la pression artérielle systolique et diastolique, mais pas avec les marqueurs FSC. L'intérêt de cette étude repose sur son caractère prospectif. On doit cependant noter la grande variance des taux d'entérolactone, l'importance des IC et l'absence de recherche de corrélation entre le taux sérique et l'apport alimentaire.

**La seconde étude** (De Kleijn 2001) **porte sur les descendants de l'étude de Framingham**. C'est une étude transversale réalisée au cours du 4<sup>ème</sup> cycle d'examen de la cohorte des descendants. Elle inclut 939 femmes ménopausées ( $\geq 1$  an après les dernières règles), d'un âge moyen de  $59 \pm 7,5$  ans, dont la consommation alimentaire a été évaluée par un questionnaire de fréquence de consommation. Plutôt que d'utiliser des tables de composition incertaines quant au contenu en phyto-estrogènes des aliments, les auteurs ont classé les aliments en 7 catégories croissantes selon leur contenu (obtenu par une revue de la littérature) en isoflavones (biochanine A, génistéine, formononétine, daïdzéine, couméstrol), et lignanes (sécoisolaricirésinol et mataïrésinol). Quand la teneur en lignanes d'un aliment était manquante, les auteurs la calculaient en partant des métabolites actifs (entérodol et entérolactone) obtenus après consommation de cet aliment et rapportés dans la littérature (Thompson 1991), ou utilisaient celle d'aliments similaires. La valeur zéro était retenue en cas d'absence totale de données. En même temps, un examen clinique et

paraclinique a renseigné sur les facteurs de risque. Un score établissant la gravité du syndrome métabolique a été calculé selon les définitions préalablement publiées (Alberti 1998) intégrant les pressions diastolique et systolique ( $\geq 160$  et  $\geq 90$  mm Hg), la prise d'anti-hypertenseurs, la triglycéridémie ( $\geq 1,7$  mmol/L), la prise d'hypocholestérolémiants, le C-HDL ( $\leq 1,0$  mmol/L), ainsi que des paramètres anthropométriques d'obésité (RTH  $> 0,85$  ; IMC  $> 30$  Kg/m<sup>2</sup>). L'analyse statistique a classé les femmes en quartiles selon leur consommation en phyto-estrogènes (moyenne des isoflavones totales :  $0.779 \pm 4.413$  mg/j; moyenne des lignanes totales  $0.645 \pm 0.364$  mg/j). La moyenne des marqueurs FSC, de la tension artérielle, du RTH et du score affecté au syndrome métabolique a été calculée avec leur IC95% pour chacun des quartiles de consommation, ainsi que leur différence entre des quartiles extrêmes après ajustements par analyse multivariée sur la consommation en fibres, l'énergie totale, les graisses saturées, l'âge, le tabagisme, la prise d'un traitement hormonal substitutif (THS) et le potassium dans les cas des analyses portant sur la pression artérielle. Les résultats significatifs sont présentés dans le Tableau 4. La comparaison des quartiles de consommation extrêmes d'isoflavones ne montre pas de différence en ce qui concerne la moyennes des pressions artérielles (diastolique et systolique), du RTH, du CT, C-HDL et C-LDL. La différence des moyennes des triglycérides entre les quartiles extrêmes est faible. La différence des moyennes des scores caractérisant le syndrome métabolique est plus élevée. Comme dans le cas des isoflavones, la consommation de lignanes n'est pas associée à une modification de la pression artérielle, du CT, C-HDL et C-LDL, mais elle est significativement associée au RTH, aux triglycérides et au score du syndrome métabolique. En conclusion, il apparaît que les marqueurs de risque FSC ne sont pas affectés par une consommation élevée d'isoflavones ou de lignanes. Il en est de même pour la pression artérielle, témoin de la vaso-tonicité de la paroi vasculaire. En revanche la consommation élevée de lignanes est liée à un RTH et à une triglycéridémie plus faibles, suggérant ainsi que la consommation de lignanes pourrait s'opposer à certains effets connus de la ménopause (élévation des TG circulants, apparition d'une obésité de type androïde). Il est intéressant de remarquer que la consommation d'isoflavones ou de lignanes est associée à un abaissement du score du syndrome métabolique (jusqu'à 32 %) avec un test de tendance à  $p = 0,0001$ . Ce résultat conforte ceux obtenus avec certaines des composantes du syndrome métabolique (triglycéridémie) et suggère des effets cumulés bénéfiques avec la PA et le C-HDL. Le score du syndrome métabolique est significativement associé à la consommation d'isoflavones. Cette association existe malgré les faibles niveaux de consommation (en moyenne  $< 1$  mg/j pour chacune des deux classes). Cette étude présente cependant de sérieuses limites, dont 2 sont évoquées par les auteurs : la mesure de l'exposition aux phyto-estrogènes est assez rudimentaire (on s'attendrait à ce que l'apport de lignanes soit plus important que celui d'isoflavones), et la possibilité existe d'un facteur résiduel de confusion lié à la consommation des aliments riches en phyto-estrogènes. En outre, c'est une étude transversale et l'antériorité des habitudes alimentaires n'est pas précisée. Enfin l'analyse statistique n'est pas classique puisque le risque relatif calculé (OR) n'est pas estimé.

La troisième étude (Van Der Schouw 2002) porte sur l'une des deux cohortes hollandaises participant à l'étude EPIC (European Prospective Investigation Into Cancer and Nutrition), recrutée pour l'étude PROSPECT. Les 403 femmes, en bonne santé, sont réparties en 2 groupes d'effectifs comparables : l'un est constitué des femmes présentant la plus courte durée de vie ménopausée (8 – 12 ans), l'autre la plus longue (20 – 30 ans). L'étude a été réalisée avec la même base de données et le même questionnaire de fréquence de consommation que l'étude précédente. Afin d'éviter les biais dus au style de vie et à la consommation accrue de fibres chez les consommateurs de phyto-estrogènes, les auteurs ont ajusté les analyses statistiques sur l'IMC, le tabagisme, l'activité physique et la consommation de fibres. La comparaison des quartiles de consommation montre que les phyto-estrogènes n'ont aucune influence sur les constantes lipidiques plasmatiques. L'élasticité des vaisseaux est meilleure (PWV est plus bas) pour les apports les plus élevés en isoflavones ( $> 0,24$  mg/j) et en lignanes ( $> 0.87$  mg/j) que celle obtenue pour les apports



les plus faibles (respectivement  $\leq 0.09$  et  $\leq 0.33$  mg/j). Cependant l'analyse en sous-groupe (femmes ménopausées depuis 8-12 ans vs femmes ménopausées depuis 20-30 ans) montre que cette diminution plus importante et accompagnée d'un test de tendance significatif, n'est obtenue que dans le groupe des femmes ménopausées depuis 20 – 30 ans pour des consommations supérieures à 0,14 mg/j d'isoflavones et 0,63 mg/j de lignanes (Figure 4). Les auteurs s'interrogent sur l'origine de la différence des résultats entre femmes ménopausées depuis 20-30 ans et femmes ménopausées depuis 8-12 ans et soulignent justement que la durée de la période ménopausée est une co-variable de l'âge. De ce fait, les femmes plus âgées pourraient avoir au moment de l'étude une PWV supérieure aux plus jeunes, permettant plus facilement la mise en évidence d'un effet protecteur, malgré un apport en phyto-estrogènes moins important. Mais on peut également supposer qu'une exposition plus longue aux phyto-estrogènes est nécessaire pour montrer un effet.

**Concernant les effets de la consommation de phyto-estrogènes chez des sujets diabétiques**, aucune étude épidémiologique n'est disponible.

**En conclusion**, les études épidémiologiques sont peu nombreuses, souffrent de sérieuses limites notamment concernant la mesure de l'exposition. On peut retenir une absence d'effet des phyto-estrogènes sur les paramètres lipidiques et un effet possible des lignanes sur le syndrome métabolique. Concernant l'association de la consommation de phyto-estrogènes à l'incidence de la maladie coronarienne, l'étude prospective finlandaise, en mesurant l'entérolactone plasmatique (métabolite issu d'un lignane) apporte des résultats intéressants mais qui demandent confirmation.

#### **IV- Les résultats des études cliniques d'intervention en double insu avec placebo**

##### **IV-1 Influence d'apports de phyto-estrogènes purifiés**

Ces études utilisent les isoflavones. Il s'agit généralement des formes purifiées suivantes : génistéine, daïdzéine, glycitéine, biochanine A et formononétine, dans des proportions qui dépendent de l'origine de l'extrait. Les 14 études que nous avons retenues (tableau 5), publiées de 1997 à 2003, suivaient l'évolution des marqueurs de risque FSC chez des sujets sains, dans certains cas modérément hyper-cholestérolémiques. Une étude était multicentrique (Upmalis 2000). Toutes comportaient soit un contrôle de consommation alimentaire, soit des indications précises sur le type d'aliment consommé, en sorte que la consommation alimentaire de base était soit pauvre, soit dénuée d'isoflavones. Une seule faisait exception (Uesugi 2002), elle sera l'objet d'une attention particulière (voir paragraphe IV-1-1). Onze études incluaient un biomarqueur de consommation, le plus souvent le taux d'isoflavones urinaires, et dans 3 études (Simon 2000, Squadrito 2002, Squadrito 2003), le taux plasmatique était mesuré.

##### **IV-1-1 Influence sur les marqueurs FSC**

Parmi les 13 études, 11 ne montraient aucune action des phyto-estrogènes aux doses administrées — en général de 40 à 85 mg/j — qui s'avèrent légèrement plus élevées que celle de la consommation alimentaire de la population japonaise (voir chapitre « estimation des apports »). Parmi les deux études ayant un effet, une (Clifton-Bligh 2001) montrait des modifications bénéfiques de C-HDL et de l'apo B (un indicateur de la teneur en C-LDL si l'on admet qu'il existe a priori un parallélisme entre les variations de l'apo B et du C-LDL qui n'a pas été vérifié dans cette étude), mais celles-ci s'avéraient indépendantes de la dose administrée (de 28 à 85 mg/j d'isoflavones totales de trèfle rouge) et du biomarqueur urinaire de consommation (corrélé par ailleurs à la dose administrée). En revanche, l'étude de Uesugi (2002) présentait une diminution du CT et du C-LDL malgré, d'une part, une consommation basale élevée (proche de 30 mg/j) due à l'absence de consigne alimentaire particulière délivrée aux groupes supplémentés et placebo et, d'autre part, un apport d'isoflavones totales purifiées (61,8 mg; daïdzine > glycitéine > génistéine) peu élevé chez les

volontaires supplémentés rapporté à celui du groupe placebo, en sorte que la différence de consommation entre les deux groupes est faible (le rapport est de 3/1). Ceci est parfaitement reflété par le faible écart des taux urinaires d'isoflavones excrétées (à peine doublés pour la daïdzéine totale, non significativement différents pour la génistéine), alors que les taux urinaires sont multipliés par 5 à 20 dans les autres études de supplémentation.

L'état physiologique des sujets et la nature des phyto-estrogènes administrés interviennent-ils comme facteurs explicatifs de ces divergences? L'absence d'effet est constatée aussi bien chez des femmes post-ménopausées, au stade de la péri-ménopause, normo- ou modérément hyper-cholestérolémiques (tableau 5). La nature et le mode de préparation des produits administrés (pilules ou gélules) sont généralement mal définis. Il s'agit soit d'extraits de PS ou de trèfle rouge ayant une composition qui est le plus souvent exprimée en équivalent aglycone, mais dont on ignore dans certains cas les proportions aglycone/glycoside (Simons, 2000 ; Howes 2000), soit d'extraits de trèfle rouge — *Trifolium subterraneum* ou *T. pratense* — présentés sous forme de préparations commerciales (Novogen Laboratories) (Hodgson 1998), (Samman 1999), (Blakesmith 2003) dont seule la composition en formes aglycones est connue. Dans deux études, les extraits de *Trifolium* et de PS préparés par la même firme ont été utilisés (Nestel 1999 ; Nestel 1997) mais leur préparation incluait une étape d'hydrolyse assurant la seule présence d'aglycones d'isoflavones. Par ailleurs, les substances accompagnant les phyto-estrogènes dans les préparations à tester sont rarement indiquées.

L'étude de Uesugi (2002) déjà mentionnée présente les particularités suivantes : la préparation — un extrait « semi-purifié » — et la composition en isoflavones de l'extrait de graines de soja utilisé pour l'expérimentation sont correctement décrites et la quantité de protéines restant dans l'extrait est mentionnée. Toutefois celle-ci représente un faible apport journalier (16,4 mg) dans les conditions de l'expérimentation, difficilement compatible avec une intervention de la fraction protéique dans le résultat expérimental. En revanche, du fait que les volontaires de cette étude n'avaient aucune consigne d'exclure de leur consommation les PS habituellement consommées, les effets bénéfiques observés peuvent être attribués à une interaction entre protéines et isoflavones, ce qui assimile cette étude à celles dont le protocole expérimental utilise une supplémentation à l'aide de PS ou d'isolats de PS (voir plus loin). L'ensemble des commentaires défavorables que suscite cette étude nous conduira à ne pas la prendre dorénavant en compte

**En conclusion**, les préparations commerciales d'isoflavones purifiées n'ont aucun effet sur les marqueurs de risque FSC à des doses comparables, voire supérieures à celles qu'une alimentation japonaise peut naturellement apporter. Ni l'origine végétale de l'extrait, ni le statut physiologique des femmes soumises à l'expérimentation ne permettent d'expliquer les résultats positifs non dose-dépendants enregistrés dans une seule étude. Dans cette même étude en revanche, l'hypothèse d'une interaction bénéfique entre protéines et isoflavones de soja ne peut être écartée. Enfin, il est nécessaire de souligner que les études sont effectuées à l'aide d'extraits dont teneur, composition en isoflavones et mode de préparation ne sont généralement pas définis avec précision.

#### **IV-1-2 Influence sur les marqueurs NFSC**

**Sur les cinq études incluant l'évaluation de la fonction endothéliale**, quatre concluent à un effet positif (Squadrito 2002, Squadrito 2003, Nestel 1999, Nestel 1997), une ne montre aucun effet mais les résultats montrent une tendance à l'amélioration de la fonction (Simons 2000). La mise en évidence d'effets positifs a impliqué aussi bien des paramètres complexes rendant compte de la capacité de l'endothélium à s'adapter au flux sanguin (FMD et SAC) que des indicateurs indirects de la fonction vaso-motrice de l'endothélium (taux sanguins d'un vasoconstricteur, ET-1, ou dérivés chimiques d'un vasodilatateur, NO). On peut retenir que l'effet positif est obtenu à des niveaux d'apport égaux ou supérieurs à 45 mg/j.

**Huit études évaluent la triglycéridémie.** Elles conduisent toutes à la conclusion que les extraits d'isoflavones purifiées n'ont aucune influence sur les triglycérides circulants.

Seules deux études ont mesuré l'effet des isoflavones sur l'oxydabilité au cuivre des LDL. Aucune ne met en évidence un effet antioxydant protecteur. Les autres observations (PA, insulino-résistance et Lp(a)) sont en nombre insuffisant pour être commentées.

**En conclusion,** la prise d'isoflavones purifiées affecte de façon bénéfique les marqueurs de risque NFSC liés à la vaso-tonicité de la paroi artérielle à partir d'une dose de l'ordre de 45 mg de génistéine ou de la somme génistéine + biochanine A (Tableau 5). En revanche, la prise d'isoflavones n'a aucun effet sur les triglycérides circulants. L'absence d'effet sur les formes de cholestérol et sur les triglycérides circulants suggère fortement que ces substances n'ont aucun rôle dans la modulation des lipides plasmatiques.

## **IV-2 Influence d'apports de phyto-estrogènes sous la forme de préparations de protéines de soja**

### **IV-2-1 Méthodologie**

Sur une trentaine d'études effectuées de 1992 à 2003, 25 ont été retenues. Dans un but d'homogénéité avec le paragraphe précédent, les critères de sélection suivants ont été utilisés : un nombre supérieur à 10 sujets pour le groupe supplémenté, une durée d'exposition supérieure ou égale à 4 semaines (2 semaines en cas de croisement des traitements) et l'existence de l'un des deux contrôles suivants: soit l'enregistrement et/ou le contrôle de la consommation alimentaire, soit le suivi d'un bio-marqueur de consommation plasmatique ou urinaire. Les protéines seront caractérisées par leur origine et, si possible, par leur traitement. Les apports en poids de phyto-estrogènes seront exprimés en forme aglycone.

Les premiers travaux que nous allons rapporter, au nombre de 9, présentent des critères de fiabilité élevée (voir tableau 6). Ils incluent simultanément un suivi de consommation alimentaire, la mesure d'un bio-marqueur de consommation plasmatique ou urinaire (montrant en particulier la bonne adhésion des sujets au protocole) et un traitement croisé des groupes de sujets constitués.

### **IV-2-2 Résultats des 9 études cliniques dont la méthodologie est la plus fiable**

**En 2000, la publication de l'équipe de Jenkins (2000a)** est conçue selon le protocole suivant : après une période pré-expérimentale durant laquelle un régime hypocholestérolémiant est administré, les sujets — hommes et femmes ménopausées hypercholestérolémiques — reçoivent alternativement pendant 2,3 semaines soit 36 g/j de PS dégraissées à l'hexane représentant un apport de 180 mg/j/2000 Kcal d'isoflavones (daïdzéine > genistéine > glycitéine), soit 8 g de protéines de blé (PB), le complément en énergie étant apporté par des glucides. Le rapport protéines animales sur protéines végétales (PA/PV) est de 0,6 pour le régime PS et 1,3 pour le régime contrôle. L'excrétion urinaire est de 80 mg/24 h d'isoflavones avec PS, indétectable quand PS n'est pas administré. Aucune modification des marqueurs FSC (CT, C-LDL, C-HDL) n'est observée entre PS et PB permettant de conclure qu'il n'existe pas d'effet isoflavones, ni d'effet PS par rapport à PB. La triglycéridémie n'est pas non plus affectée. En revanche, il semble exister un effet antioxydant sur les LDL chez les sujets non supplémentés en vitamine E, mais la mesure par les diènes conjugués formés est peu fiable.

**Dans la même année, Jenkins (2000b) publie un travail suivant un protocole comparable** (même durée, critères d'inclusion des sujets identiques), dans lequel l'apport de PS (33 g/j) est comparé à l'apport de protéines végétales et animales (lait et oeufs) dépourvues d'isoflavones. Le régime PS apporte 86 mg/j/2000 Kcal d'isoflavones glycosylées ou non (génistéine > daïdzéine > glycitine), avec un rapport PA/PV de 0,07 contre 3,5 pour le régime contrôle. L'apport en isoflavones exprimé en formes aglycones peut être

estimé à 42 mg/j/2000 Kcal. L'excrétion urinaire dans le cas du régime PS est de 0,8 mg/24 h pour la génistéine et 3 mg/24 h pour la daïdzéine, nulle avec le régime contrôle. Les marqueurs FSC (CT et C-LDL) sont abaissés par le régime PS, mais C-HDL n'est pas affecté. Comme dans l'étude précédente, la triglycéridémie n'est pas modifiée et l'oxydation des LDL (même méthode de mesure que précédemment) est diminuée avec PS même chez les sujets supplémentés en vitamine E.

**Un troisième travail de Jenkins (2002a)** fait l'objet de deux publications, l'une orientée sur les marqueurs FSC, NFSC et certaines caractéristiques lipoprotéiques des sujets, l'autre sur des marqueurs de l'inflammation (Jenkins, 2002b). Deux niveaux d'ingestion d'isoflavones sont testés : 10 et 73 mg/j, soit 11,4 et 76,6 mg/j/2000Kcal), apportés par des quantités comparables de PS (52 et 50 g/j, respectivement). Ils sont comparés à une alimentation contrôle dans laquelle les protéines proviennent pour l'essentiel de produits lactés et d'oeufs. L'apport total de protéines est comparable dans les trois régimes avec un rapport PA/PV de 0,05, 0,05 et 2,1. L'apport faible d'isoflavones est obtenu grâce à l'utilisation de PS appauvries en isoflavones par traitement à l'alcool. L'excrétion urinaire d'isoflavones totales est respectivement de 11,3, 41,3 et 2,1 mg/24 h pour les sujets recevant les régimes pauvres, riches en isoflavones et sans PS. Il n'existe aucune modification des marqueurs FSC entre les deux régimes avec PS (CT, C-LDL et C-HDL ne sont pas modifiés). Ces résultats sont confirmés par les niveaux plasmatiques des apoprotéines caractéristiques respectivement des LDL et des HDL, l'apoB et l'apoA1, et l'absence de modification du rapport apoB/apoA1. Aucun changement dans l'oxydation des LDL, la triglycéridémie et l'homocystéinémie n'est mis en évidence. En revanche, la comparaison du régime sans PS aux deux régimes PS met en évidence un effet bénéfique des PS, indépendant de leur niveau en isoflavones. Les marqueurs FSC (CT et C-LDL), les rapports CT/C-HDL, C-LDL/C-HDL et apoB/apoA1, ainsi que l'apoB sont abaissés. Par ailleurs, le marqueur NFSC représenté par l'homocystéinémie, l'oxydation des LDL (estimée par les diènes conjugués) et la pression artérielle systolique (seulement chez les sujets masculins) sont diminués. La triglycéridémie n'est pas affectée.

**En conclusion**, les publications de Jenkins sont en faveur d'un effet bénéfique des PS — indépendant des isoflavones — sur les facteurs de risque cardiovasculaire (FSC et NFSC) lorsque celles-ci remplacent des protéines animales. Il faut noter que le calcul des apports alimentaires ne permet pas d'attribuer cet effet à une modification du profil des acides gras ingérés, et en particulier à une modification des teneurs en acides gras saturés pro-athérogènes. Les auteurs relèvent que l'ensemble de ces résultats pose la question du rapport optimal devant exister entre protéines animales et végétales pour aboutir à un effet maximal des PS. En tout état de cause, un rapport PA/PV de 1/2 est insuffisant pour montrer un effet sur les facteurs de risque (Jenkins 2000a).

**La publication de Jenkins (2002b) traitant du volet inflammatoire** ne montre aucune modification de la CRP et de TNF $\alpha$ . La cytokine IL-6 augmente chez les femmes ménopausées de l'effectif étudié avec le régime apportant les PS riches en isoflavones par comparaison avec le régime sans PS et avec le régime PS pauvre en isoflavones. Puisque les deux régimes PS, pauvre et riche en isoflavones, réalisent les mêmes apports en protéines de soja *per se* (50 g/j), l'augmentation de l'IL-6 ne semble pas être attribuable à la fraction protéique du soja, mais plutôt aux isoflavones totales (73 mg/j ; la composition en isoflavones n'est pas donnée). Cet effet ponctuel sur le statut inflammatoire enregistré uniquement chez les femmes et attribuable aux isoflavones — que les auteurs jugent bénéfiques dans une optique de prévention du cancer — doit être considéré avec précaution et mériterait d'être confirmé. Il n'est probablement pas sans intérêt de remarquer que cette action statistiquement significative sur l'IL-6 s'accompagne d'un accroissement non significatif des niveaux circulants de deux autres indicateurs de l'inflammation (la CRP et l'amyloïde A sérique).

**Le travail de Lichtenstein (2002)** est construit sur un protocole expérimental proche de celui de Jenkins (2002b). Les sujets sont par ailleurs sélectionnés selon des critères similaires lors de l'inclusion dans l'étude. Les régimes proposés sont composés de PS (50 g/2000 Kcal) ou de protéines animales. Les PS sont enrichies ou appauvries en isoflavones (génistéine > daïdzéine > glycitéine) conduisant à deux régimes PS (PS<sup>+</sup> et PS<sup>-</sup>) apportant respectivement 92 et 2,5 mg/j/2000 Kcal d'isoflavones totales. Les deux régimes à base de protéines animales (PA) sont conçus, l'un (PA<sup>-</sup>) comme un modèle d'alimentation « non optimale » pour des sujets hypercholestérolémiques, l'autre (PA<sup>+</sup>) comme un régime mimant les apports en isoflavones du régime PS enrichi en isoflavones. Ils réalisent respectivement un apport soit indétectable, soit de 104 mg/j/2000 Kcal d'isoflavones. Le régime PA<sup>+</sup> représente l'originalité de ce protocole comparé à ceux des travaux précédemment cités. Comme pour les études de l'équipe de Jenkins, les profils d'acides gras fournis par l'alimentation, et spécialement d'acides gras saturés, ont été uniformisés sur l'ensemble des quatre régimes. A jeun, les niveaux plasmatiques circulants de génistéine sont en moyenne de 0,05 µmol/L pour PA<sup>-</sup>, 0,61 µmol/L pour PA<sup>+</sup>, 0,007 µmol/L pour PS<sup>-</sup> et 0,70 µmol/L pour PS<sup>+</sup> à la fin des 6 semaines de la prise de chaque type d'alimentation. En période postprandiale, ils sont de 0,1, 1,2, 0,056 et 1,3 µmol/L. Les taux circulants sont donc multipliés par un facteur 100 pour PA<sup>+</sup> par rapport à PA<sup>-</sup>, et par un facteur compris entre 20 et 100 pour PS<sup>+</sup> par rapport à PS<sup>-</sup>. Ce travail confirme l'existence d'un effet « protéines » sur les marqueurs FSC (CT et C-LDL) et l'apoB, et l'absence d'effet « isoflavones » quel que soit le type de protéines considéré. Concernant la triglycéridémie, s'il n'existe pas d'effet isoflavones, en revanche un effet protéines bénéfique est visible, opposant ainsi cette étude aux études précédentes.

**En conclusion**, le travail de Lichtenstein (2002) conforte les données concernant les effets bénéfiques des PS (ou des PV par rapport aux PA) sur les marqueurs FSC et le caractère indépendant de ces effets vis à vis des isoflavones.

**Le travail de Wangen (2001)** porte sur les effets comparés d'un apport de 63 g en moyenne de plusieurs PS différant par leurs teneurs en isoflavones. Le mode d'obtention de ces protéines n'est pas indiqué, à l'exception du cas des PS aux teneurs les plus faibles, obtenues par extraction alcoolique. Les sujets inclus dans le protocole (femmes ménopausées normo- ou modérément hypercholestérolémiques) reçoivent ainsi alternativement pendant une période de 13 semaines 7,8, 74 et 148 mg/j/2000Kcal d'isoflavones totales (7,1, 65, 132 mg/j). Les auteurs montrent que seul le C-LDL est diminué et que cette diminution est uniquement observée lorsque l'on compare l'apport le plus bas à l'apport le plus élevé en isoflavones. Cette diminution est accompagnée d'une baisse du rapport C-LDL/C-HDL. L'apoB, l'apoA1 et les triglycérides circulants ne sont pas affectés. Les auteurs comparent également les marqueurs FSC (CT et C-LDL), les taux d'apoB et d'apoA1 et le rapport C-LDL/C-HDL chez les sujets au début et après les 13 semaines de la prise des PS les plus pauvres en isoflavones. Au début de cette période, les sujets s'étaient précédemment conformés à leur alimentation habituelle pendant une période au moins égale à 26 j. La comparaison est donc censée représenter l'effet protéines des PS (ou des PV). Il est montré que le CT, le C-LDL, l'apoB, l'apoA1 et le rapport C-LDL/C-HDL décroissent au cours de la prise de PS. Le même résultat est obtenu lorsque la comparaison est effectuée au cours des périodes de prise de PS plus riches en isoflavones.

**En conclusion**, cette étude est à ce jour la seule qui montre un effet bénéfique des isoflavones sur l'un des facteur de risque cardio-vasculaire, le C-LDL. Mais il faut remarquer que cette étude porte uniquement sur des femmes ménopausées, non ou modérément hypercholestérolémiques et que, surtout, la prise expérimentale des régimes s'étale sur une durée bien plus longue que les autres études présentées dans ce rapport. A cette caractéristique s'ajoute le fait que, à l'exception de l'étude de Jenkins précédemment rapportée mais qui incluait une prise de régime inférieure à 3 semaines, le travail de Wangen et al utilise la dose d'isoflavones la plus élevée (148 mg/2000 Kcal). Enfin ce travail confirme à nouveau l'effet protéines bénéfique des PS (ou des PV), y compris sur l'apoB et le rapport C-LDL/C-HDL.

**L'étude de Sanders** (2002) utilise des protéines texturées. Il s'agit de « burgers » de PS (15 g/j) non traitées ou traitées à l'alcool afin d'obtenir deux niveaux différents d'apport en isoflavones dosées — génistéine et daïdzéine, les isoflavones totales n'étant pas indiquées — sans modification de la nature de l'apport protéique. Les sujets sont des hommes et des femmes ménopausées normo-cholestérolémiques. Ils reçoivent alternativement les deux aliments réalisant respectivement un apport d'isoflavones dosées de 2 et 53 mg/j/2000Kcal. Les marqueurs FSC (CT et le C-LDL) ne sont pas modifiés. En revanche le C-HDL est favorablement affecté. Ce résultat est conforté par l'augmentation du taux d'apoA1 circulant. La triglycéridémie, PAI-1 et TGFβ1 ne sont pas affectés.

**En conclusion**, ce travail confirme à nouveau l'absence d'effet isoflavones sur CT, C-LDL, et la triglycéridémie, mais c'est aussi le seul travail à rapporter une modification favorable des HDL due aux isoflavones,

**La publication la plus récente est celle de Steinberg** (2003). Les auteurs utilisent à nouveau la comparaison « protéines animales/protéines de soja » et PS riches versus PS pauvres en isoflavones. Les protéines testées, administrées à la dose de 25 g/j pendant 6 semaines, sont soit des PS naturellement riches en isoflavones, soit des protéines appauvries en isoflavones par extraction alcoolique, soit des protéines de lait. Les sujets sont uniquement des femmes ménopausées, normo-cholestérolémiques. Leur régime de base est censé être identique pour les trois traitements. Ils reçoivent alternativement les trois aliments PL, PS<sup>-</sup> et PS<sup>+</sup> apportant chacun, respectivement, 0, 2 mg/j et 107 mg/j. Le contrôle des consommations au cours des différents traitements fait apparaître un faible apport de β-carotène et un apport plus élevé en vitamine E avec l'alimentation apportant PS<sup>+</sup> (-50 % et +50 %, respectivement). Les teneurs plasmatiques des isoflavones (daïdzéine, dihydrodaïdzéine, équol, génistéine et ortho -desméthylangolensine) sont rapportées. Elles sont significativement plus élevées avec PS<sup>+</sup> qu'avec PS<sup>-</sup> et PL. La comparaison des trois régimes atteste toute absence d'effet « protéines » et d'effet « isoflavones » sur les marqueurs FSC et la triglycéridémie. Il n'existe aucune variation entre le début et la fin de chacune des 3 interventions, ce qui montre que les effets des régimes testés ne sont pas différents de ceux de l'alimentation habituelle des sujets faisant partie de l'étude<sup>38</sup>. En revanche, les auteurs mettent en évidence qu'un indicateur de la vaso-tonicité des vaisseaux (le PFV, voir ci-dessus) se trouve modifié de façon favorable, mais uniquement entre PL et PS<sup>+</sup> (soit un apport de 107 mg/j d'isoflavones, 55 mg de génistéine et 47 mg de daïdzéine), ceci témoignant soit d'un effet de la partie protéique seule à un niveau faible d'apport (25 g/j), soit, plus vraisemblablement en raison de l'effet des isoflavones purifiées rapporté précédemment (cf IV-1-2), de la nécessité d'un cumul des effets « protéines » et « isoflavones ». Il faut cependant souligner que des facteurs explicatifs de cette action, comme la production de monoxyde d'azote NO ou de l'endothéline 1 (ET-1) par l'endothélium, ne sont pas modifiés, en dépit d'une tendance à l'augmentation pour NO et à la baisse pour ET-1 avec le régime PS<sup>+</sup>.

**En conclusion**, ce travail s'oppose aux résultats précédents en ne montrant aucun effet des protéines sur les marqueurs FSC. Mais il faut considérer que le niveau d'apport de 25 g/j est faible. Il confirme l'absence d'effet des isoflavones à une dose certes élevée (proche de 110 mg/j), mais inférieure à celle de Wangen citée plus haut. Il ne montre aucun effet des isoflavones sur l'amélioration de l'état des vaisseaux à un niveau d'apport considéré comme bénéfique au chapitre IV-1-2 mais confirme que les protéines de soja associées à leurs isoflavones (55 mg de génistéine et 47 mg de daïdzéine) peuvent en revanche procurer cette amélioration.

**L'étude de Wiseman** (2000) s'intéresse à deux indicateurs d'oxydation, différents de ceux utilisés dans les études de Jenkins précédemment citées. L'un, le taux d'isoprostanes plasmatiques totales (les formes libre et estérifiée de la 8-épi-PGF $\alpha$ ), est probablement

---

<sup>38</sup> Cependant, un article de Greany et al (J. Nutr. 2004, 134 :3277) vient d'être publié et n'a pu être pris en considération dans le tableau 6. Il montre qu'un apport de 25 g/j de PS abaisse le CT et le C-LDL, tandis que l'apport en isoflavones est plus faible que dans le travail de Steinberg et al.

aujourd'hui parmi les meilleurs marqueurs d'oxydation des lipides *in vivo*, particulièrement lorsque sa mesure est effectuée — ce qui est présentement le cas — par chromatographie en phase gazeuse couplée à un spectromètre de masse. L'autre, moins pertinente, est la mesure *ex vivo* de la résistance à l'oxydation des LDL en présence de cuivre. Les sujets étudiés sont des hommes et des femmes non ménopausées normo-cholestérolémiques. Les auteurs comparent les effets de la prise journalière, pendant 2,5 semaines, d'un « burger » constitué soit de PS texturées riches en isoflavones PS<sup>+</sup> (niveau d'apport en daïdzéine et génistéine: 60 mg/j), soit de PS sans isoflavones PS<sup>-</sup> (obtenues par traitement à l'alcool). Les teneurs en isoflavones totales des PS ne sont pas données. Les auteurs montrent que les teneurs plasmatiques en génistéine et en daïdzéine sont respectivement de 0,028 et 0,014  $\mu\text{mol/L}$  avec PS<sup>-</sup>, et s'élèvent à 0,779 et 0,317  $\mu\text{mol/L}$  avec PS<sup>+</sup>, et que, parallèlement à cette élévation, il existe une diminution du taux de l'isoprostane 8-*épi*-PGF $\alpha$  et une diminution de l'oxydabilité des LDL. La diminution de l'isoprostane est en faveur d'une protection antioxydante accrue par le régime PS<sup>+</sup>, donc par les isoflavones. Celle-ci prend place au niveau du plasma. Il est regrettable que la mesure des isoprostanes n'ait pas été effectuée également au début du traitement, en sorte que nous ignorons s'il existe un effet des PS indépendant des isoflavones. La diminution de l'oxydabilité des LDL ne permet pas de conclure pour des raisons inhérentes à la mesure (voir plus haut). De plus, il est important d'observer que, si les isoflavones ont un rôle antioxydant protecteur vis à vis des LDL bien établi *in vitro*, le résultat obtenu par les auteurs ne peut être attribué aux isoflavones puisque les taux de génistéine et de daïdzéine présents dans les LDL sont identiques avec les régimes PS<sup>+</sup> et PS<sup>-</sup>. Comme les LDL sont en tout point comparables entre elles (mêmes taux de vitamine E, d'acides gras saturés, mono- et polyinsaturés), la modification de la résistance à l'oxydation des LDL reste inexpliquée.

**En conclusion**, ce travail est en faveur d'un effet anti-oxydant systémique des isoflavones

#### **Conclusion pour les 9 études cliniques :**

Considérés dans leur ensemble, ces travaux indiquent que les préparations de PS, à un niveau d'apport au moins égal à 33 g/j<sup>39</sup>, ont une action bénéfique en termes de risque cardiovasculaire sur le C-LDL, indépendante des isoflavones. Cette action est constatée dans 4 études sur les 7 qui mesurent ce paramètre. Pour le CT, l'action est bénéfique dans 3 études sur 7. Deux études sur 7 relèvent un effet bénéfique sur le C-HDL, mais l'une conclut à un effet dépendant des protéines et indépendant des isoflavones, l'autre à un effet dépendant des isoflavones et indépendant des protéines. Dans les 3 études sur 7 où aucun effet n'est observé sur le C-LDL, 2 études utilisent un apport en PS égal ou inférieur à 25 g/j, tandis que la troisième compare l'effet de PS à celui de protéines de blé.

S'il est vrai que, dans les préparations de protéines de soja utilisées, les isoflavones elles-mêmes ne présentent pas d'effet détectable sur le CT et le C-LDL, on ne peut écarter en revanche l'hypothèse qu'un apport très élevé en isoflavones, supérieur à 110 mg/j, ait un effet bénéfique. Dans ce cas, cependant, l'effet peut être également attribué à un apport élevé de PS, au moins égal à 60 g/j, ou à un effet potentialisateur (une synergie) entre PS et isoflavones.

Les préparations de PS n'ont pas d'action (dépendante ou indépendante des isoflavones) sur la triglycéridémie.

Les préparations de PS semblent posséder un rôle bénéfique sur le risque cardiovasculaire en améliorant la vaso-tonicité des vaisseaux. Il n'est pas clair que cet effet soit attribuable aux isoflavones. Les données sont encore insuffisantes dans ce type d'étude. Il faut en effet avoir présent à l'esprit que, si les isoflavones, et plus spécialement la génistéine associée ou non à la biochanine A, sont susceptibles comme les polyphénols d'agir de façon bénéfique sur la vaso-réactivité de la paroi vasculaire (West, 2001 ; se rapporter également au chapitre IV-1-2), de nombreux autres nutriments (acides gras saturés, acides gras polyinsaturés n-3, L-arginine, vitamine E, C, B9...) ont cette propriété, certains comme la vitamine B9, étant

---

<sup>39</sup> Pour un apport de 25 g/j, nous avons rapporté deux résultats contradictoires : l'un indiquait un effet positif, l'autre une absence d'effet sur le C-LDL.

présents en quantité importante dans les préparations de PS. Ceci montre que des effets vaso-relaxants ne peuvent être attribués aux phyto-estrogènes *en présence de PS* que dans le cadre d'une expérimentation rigoureuse.

L'effet antioxydant montré au niveau systémique est à retenir. Il devra être confirmé. Un effet antioxydant vis à vis des LDL a été quelquefois signalé. Mais la fiabilité méthodologique des résultats est discutable et la signification de ces données en termes de réduction du risque cardiovasculaire n'est pas claire (voir plus haut).

Il faudrait enfin confirmer que les isoflavones à un niveau d'apport supérieur à 70 mg/j augmentent le taux d'IL-6 chez les femmes ménopausées, taux dont on connaît chez ces femmes l'association avec le risque cardio-vasculaire.

#### **IV-2-3 Autres études cliniques concernant les protéines de soja**

Elles n'incluent pas simultanément un suivi de consommation alimentaire, la mesure d'un bio-marqueur de consommation plasmatique ou urinaire et un traitement croisé des groupes de sujets constitués.

Vingt et une études (tableau 7) sont retenues, réalisées entre 1996 et 2003. Parmi celles-ci, 16 études montrent un effet bénéfique sur les marqueurs FSC, sans distinction entre les 3 marqueurs : CT, C-LDL et C-HDL. Il est possible cependant de distinguer parmi elles celles, au nombre de 12, dans lesquelles le C-LDL est abaissé, et celles, au nombre de 6, dans lesquelles le C-HDL est augmenté. Seulement 2 études rapportent une baisse du C-LDL et une augmentation du C-HDL simultanées (Potter, 1998), (Han, 2002).

##### **Les marqueurs FSC**

*Effet chez des sujets normaux ou présentant une faible hypercholestérolémie* – Sur les 17 études mesurant la teneur plasmatique en C-LDL, 12 montrent un effet dépresseur des préparations de protéines de soja (10/19 pour le CT, 12/16 pour CT et/ou C-LDL). Sur 8 études où l'effet dose d'isoflavones a été testé, 4 montrent un effet dépresseur sur le CT et/ou le C-LDL inversement lié à la dose (Merz-Demlow 2000 ; Gardner 2001 ; Crouse 1999 ; Urban 2001) et 4 ne montrent aucun effet dose (Potter, 1998, Mackey, 2000 ; Dent, 2001 ; Tonstad, 2002). Parmi ces 8 études, 5 s'intéressent au C-HDL ; une étude trouve une augmentation indépendante de la dose (Potter, 1998), les 4 autres ne montrent aucun effet (Gardner ; Crouse, 1999 ; Dent, 2001 ; Tonstad, 2002) 2000). Si l'on admet que l'effet sur les marqueurs FSC peut aussi bien être dû à la fraction protéique qu'à la fraction isoflavones, il est légitime de poser l'hypothèse que l'effet isoflavones pourrait se manifester plus visiblement en cas de fortes doses d'apport. Or sur l'ensemble des études, les 3 études utilisant les apports les plus élevés en isoflavones (Mertz-Demlow 2000, Teede, 2001 ; Gardner-Thorpe, 2003) (129, 118 et 120 mg/j) aboutissent à des résultats contradictoires sur les variations de CT et C-LDL. Il est par ailleurs intéressant de remarquer que les études ne montrant aucun effet sur CT et C-LDL sont toutes effectuées sur des groupes d'individus normaux ou des groupes dans lesquels les sujets faiblement hypercholestérolémiques sont minoritaires (Gooderham, 1996, Scheiber, 2001, Dent, 2001, Swain, 2002, Gardner-Thorpe, 2003). Mais sur les 12 études montrant un effet sur C-LDL, 10 portent sur des sujets tous ou pour partie hypercholestérolémiques (Potter, 1998 ; Merz-Demlow, 2000 ; Mackey, 2000 ; Gardner, 2001 ; Teede, 2001 ; Han, 2002 ; Jayagopal, 2002 ; Puska, 2002 ; Dalais, 2003). Il faut aussi relever que, venant potentiellement conforter l'hypothèse d'un effet plus marqué dans le cas des sujets faiblement hypercholestérolémiques, une étude montre que l'effet bénéfique sur le C-HDL est obtenu chez des sujets présentant un CT supérieur à 5,5 mmol/L (Mackey 2000). Concernant enfin le niveau de l'apport en PS et son incidence sur les teneurs plasmatiques en CT et C-LDL, 7 études sur 12 montrent une diminution des deux paramètres plasmatiques pour des apports entre 20 et 52 g/j de PS (5 pour des apports égaux ou supérieurs à 30 g/j), 3 montrent un effet sur l'un des deux paramètres pour des apports entre 40 et 53 g/j, et 2 ne montrent aucun effet sur aucun des deux paramètres pour des apports de 40 g/j, Mais 9 études sur 11 montrent un effet favorable sur CT *et/ou* C-LDL pour des apports égaux ou supérieurs à 30 g/j.



*Dans le diabète de type 2* – La réponse aux PS a été étudiée chez des femmes ménopausées présentant un diabète de type 2 et un index de masse corporel (IMC) révélant une obésité (Jayagopal, 2002) mais sans syndrome métabolique. Un effet bénéfique a été observé sur le CT et le C-LDL avec la dose administrée (30 g/j de PS réalisant un apport de 132 mg/j d'isoflavones) ainsi que sur l'insulinémie et l'hémoglobine glyquée. Confortant cet effet bénéfique, l'étude transversale de Goodman-Gruen (2001) montre que l'insuline est corrélée négativement avec la consommation de génistéine chez des femmes ménopausées ne souffrant que d'un léger surpoids (IMC = 26). En revanche dans deux publications Duncan et al (1999a,1999b) étudient des femmes non diabétiques pré- ou postménopausées et ne montrent aucun effet des PS (jusqu'à 132 mg/j d'isoflavones, pour 53 à 63 g de protéines) sur le niveau d'insuline circulant. Blakesmith et al (2003) ne trouvent aucun effet sur l'insulinémie pour un apport de 60 mg/j de biochanine A + génistéine chez des femmes en bonne santé normo-insulinémiques.

*Effet des lignanes* – Un seul travail a testé l'effet des lignanes (Lemay, 2002). Les traitements comparés étaient un apport de 21 mg/j de lignanes totaux issus de la graine de lin (les substances analysées et la technique d'analyse ne sont pas indiquées) et un THS comportant 0,625 mg/j d'estrogènes conjugués (Premarin®) administrés seuls dans le cas des patientes hystérectomisées, ou avec 100 mg/j de progestérone dans le cas des femmes présentant un utérus intact. Aucune différence n'a été observée sur le C-LDL entre les deux traitements alors que le C-HDL n'était pas modifié dans le cas des lignanes et était augmenté dans le THS. Les lignanes n'ont pas montré d'effets sur C-LDL et C-HDL lié à la durée (8 semaines) de l'intervention.

### **Les marqueurs NFSC**

*Triglycéridémie, vaso-réactivité, Lp(a), statut oxydatif* – A trois exceptions près (Teede 2001, Han, 2002, Dalais, 2003) aucune étude sur les 13 évaluant les triglycérides plasmatiques ne montre un effet des PS sur la triglycéridémie. D'une façon surprenante, le travail de Teede (2001) montre une évolution péjorative de la FMD et de la Lp(a). Il est intéressant d'observer que l'effet sur la FMD est obtenu pour un niveau d'apport de 118 mg/j d'isoflavones (dont 75 mg/j de génistéine), soit à un niveau plus élevé que les niveaux d'apport utilisés dans les autres études se rapportant à la vaso-réactivité. En revanche les paramètres évaluant le statut oxydatif sont améliorés dans toutes les études où ils ont été mesurés (Jenkins, 2000c, Scheiber, 2001, Swain, 2002, Gardner-Thorpe, 2003), ce qui est concordant avec l'amélioration du taux de l'hémoglobine glyquée dans le diabète de type 2 (voir ci-dessus).

*Récepteur des LDL* – L'expression des ARNm du récepteur des LDL a été évaluée dans les cellules mononucléées (Potter, 1998). Les résultats montrent que les PS, quelles que soient leurs teneurs en isoflavones, augmentent ces ARNm par rapport au contrôle constitué de caséine et de poudre de lait délipidé. L'effet sur la protéine elle-même, soit le récepteur aux LDL, n'a pas été recherché. Ces résultats suggèrent un effet des protéines ou de peptides de soja sur l'épuration récepteur-dépendante des LDL ayant pour effet d'abaisser le niveau circulant de C-LDL. Cette hypothèse mériterait d'être confirmée.

*Isoflavones et homocystéinémie - Facteurs de confusion* – Un effet dépresseur sur une homocystéinémie normale est rapporté avec un apport élevé d'isoflavones (188 mg/j) sous la forme de PS et de fibres de cotylédon de soja (Puska, 2002). Le contrôle était constitué de quantités égales de fibres (cellulose). Il ne semble pas que dans ces conditions les auteurs aient pu éviter l'effet hypo-homocystéinémiant des folates présents en grande quantité dans la graine de soja. Nagata et al ont testé les effets respectifs des protéines et des isoflavones de soja chez des femmes non ménopausées et postménopausées (Nagata 2003). Ils ont montré une association inverse, modeste mais significative, aussi bien avec les vitamines B6 et B9 qu'avec les isoflavones. Un effet bénéfique important, indépendant du cholestérol, sur ce marqueur de risque peut donc être associé à plusieurs substances présentes dans la PS.

## **Conclusion**

Considérés dans leur ensemble, ces travaux indiquent que les préparations de PS, à un niveau d'apport au moins égal à 30 g/j, ont une action bénéfique en termes de risque cardiovasculaire sur le statut du cholestérol plasmatique. En revanche aucun argument décisif n'est produit aussi bien en faveur qu'en défaveur d'un effet lié aux isoflavones de soja. En particulier, les plus fortes doses d'apport en isoflavones ne sont pas celles qui présentent les effets les plus marqués et aucun effet de synergie entre isoflavones et partie protéique des PS n'est constaté. Les études sur le diabète de type 2 et sur l'insulinémie de sujets en bonne santé sont insuffisantes pour conclure à un effet. Il n'existe aucun effet sur la triglycéridémie lié à la prise de ces préparations. L'effet sur la vaso-réactivité est négatif pour un apport de 118 mg/j (75 mg/j) d'isoflavones totales (génistéine).

## **V- Les résultats des études sur modèles animaux**

### **V-1 Commentaires sur l'utilisation de ces modèles**

Bien que les modèles animaux soient indispensables dans les recherches sur l'athérosclérose, ils posent le problème de la représentativité de la forme pathologique qu'ils expriment. Il n'existe pas de modèle animal capable de reproduire spontanément l'ensemble des stades athéroscléreux existant chez l'Homme, de la formation des cellules spumeuses à la rupture de la plaque. Une seule exception à cette règle peut être citée à ce jour : la souris apoE<sup>-/-</sup> recevant pendant 14 semaines un régime riche en lipides saturés (Johnson 2001). Cependant, l'athérosclérose spontanée ou induite du singe, du porc, du pigeon et de la poule est plus proche de l'athérosclérose humaine que de celle de tous les autres modèles animaux. Les macaques, comme plus généralement les singes, sont de bons modèles en ce sens qu'ils peuvent donner la forme compliquée de la lésion. Mais leur profil lipoprotéique n'est pas celui que l'on trouve chez l'Homme. Pour une discussion plus complète de la valeur des modèles animaux, on se reportera à Bourdillon (2003).

### **V-2 Les études sur le modèle singe**

Elles utilisent le modèle cynomolgus (*Macaca fascicularis*). Anthony (1997) rapportent en 1997 les effets comparés de régimes faiblement athérogéniques auxquels sont ajoutés soit des PS (contenant des isoflavones ou dépourvus d'isoflavones par extraction alcoolique : respectivement PS<sup>+</sup> et PS<sup>-</sup>), soit des protéines de lait (PL). Ils montrent que des effets bénéfiques sur des marqueurs de risque cardiovasculaire (épaisseur de l'intima et taille des lésions athérosclérotiques) sont obtenus aussi bien par remplacement des PL par PS<sup>-</sup>, que par remplacement de PS<sup>-</sup> par PS<sup>+</sup>. En d'autres termes, les marqueurs dans le cas de PS<sup>-</sup> sont intermédiaires entre PL et PS<sup>+</sup>. Ceci peut être dû aussi bien à la fraction protéique (soja vs lait) qu'à la quantité résiduelle d'isoflavones présente dans PS<sup>-</sup>. Clarkson (2001) utilisent en 2001 des singes femelles, préménopausés recevant un régime faiblement athérogénique. Ils comparent les effets des PS sans isoflavones, d'isoflavones de soja purifiées (125 mg/j), et des estrogènes conjugués (0,625 mg/j de Premarin<sup>®</sup>). Les isoflavones et les estrogènes conjugués ont des effets bénéfiques identiques sur les marqueurs FSC (C-VLDL + C-LDL), mais seuls les estrogènes conjugués ralentissent la progression et diminuent la taille des plaques, tandis que seules les isoflavones ont un effet bénéfique sur le C-HDL et l'apoA1. Les isoflavones ont donc un effet bénéfique sur le profil lipoprotéique des animaux, mais pas d'effet anti-athérosclérotique. Cependant, en 2003, Wagner (2003) utilisent des singes ovariectomisés. En administrant des protéines de lait, de soja, ou des isoflavones de soja, les auteurs montrent que les isoflavones n'ont pas d'effet sur les marqueurs FSC. En revanche les PS seules diminuent l'afflux du C-LDL dans les artères et le dépôt des esters de cholestérol dans la paroi carotidienne.

Wagner (1997) avaient montré en 1997 que chez des femelles ovariectomisées recevant pendant 7 mois 148 mg/j d'isoflavones sous la forme de préparation de PS, que la sensibilité à l'insuline était améliorée, confirmant ainsi les résultats obtenus chez des femmes obèses ou en surpoids de Jayagopal (2002) et Goodman-Gruen (2001) (voir ci-dessus).

**En conclusion**, ces résultats manquent de cohérence. Ils ne permettent pas d'attribuer à l'une ou l'autre des fractions (protéique ou isoflavones) les effets bénéfiques constatés. A ce jour, aucune action directe des isoflavones de soja sur la plaque d'athérome n'a pu être montrée.

### **V-3 Les études sur d'autres modèles animaux**

En 1998, Kirk compare les effets de PS avec et sans isoflavones sur deux souches de souris : la souche C57BL/6, sensible à l'athérosclérose, et une souche invalidée pour le récepteur des LDL. Les stries lipidiques diminuent avec les PS contenant des isoflavones et non avec les PS sans isoflavones, et ceci uniquement chez les souris porteuses du récepteur, suggérant ainsi que les isoflavones pourraient avoir un effet anti-athéromateux en agissant positivement sur l'expression ou l'activité du récepteur. Cet effet anti-athéromateux semble en contradiction avec l'absence d'effet anti-athéromateux constaté par Clarkson (2001) chez le singe (voir ci-dessus). En 2002, Adams montre que les esters de cholestérol sont d'autant moins abondants dans la paroi de l'aorte que les PS sont riches en isoflavones. Ce résultat est obtenu avec deux modèles de souris transgéniques présentant naturellement des statuts lipoprotéiques pro-athérogènes, mais par des mécanismes différents. En effet, l'hyperbétalipoprotéïnémie résulte dans un cas de l'invalidation du récepteur des LDL et de la sur-expression de l'apoB humaine, dans l'autre cas de l'invalidation du gène de l'apoE avec maintien de l'expression naturelle du récepteur des LDL. Ceci permet donc de conclure *a minima* que l'effet anti-athéromateux est indépendant du récepteur des LDL, ce qui est en contradiction avec les résultats de Kirk (2002).

**En conclusion**, ces modèles animaux semblent en faveur d'un effet anti-athéromateux des isoflavones mais sont contradictoires en ce qui concerne la médiation de cet effet par le récepteur des LDL.

## **VI- Mécanismes d'action des phyto-estrogènes : les résultats des études *in vitro***

### **VI-1 Quelques rappels sur le rôle et les mécanismes d'action des estrogènes dans l'athérosclérose (voir récapitulatif tableau 8)**

Les estrogènes sont des hormones naturellement sécrétées par les glandes endocrines stéroïdogènes soit sous une forme immédiatement active, soit sous une forme inactive susceptible d'être transformée localement en forme active. Ils semblent protéger les femmes avant la ménopause des conséquences cliniques de l'athérosclérose. Chez des femmes ménopausées, le traitement hormonal substitutif (THS) par l'association estrogène/progestérone administrée oralement n'a pas abouti aux résultats escomptés (voir l'étude prospective dite Women's Health Initiative Study (Rossouw 2002) et l'annexe 3 de ce rapport).

Il est établi que, d'une façon générale, les estrogènes ont des actions génomiques, directes ou indirectes, médiées par les récepteurs estrogéniques, ou indépendantes de ces récepteurs (voir le chapitre Mécanismes moléculaires et cellulaires des estrogènes). Ce cadre étant défini, quel est le mode d'action des estrogènes dans le processus athérosclérotique ? Un bref rappel des connaissances actuelles sera fait ici, afin d'établir le cadre dans lequel s'inscrivent les mécanismes d'action des phyto-estrogènes. Ces connaissances étant établies *in vitro*, une question cruciale reste toujours posée : existe-t-il une adéquation entre les concentrations des estrogènes testées – ce sera également le cas pour les phyto-estrogènes (voir chapitre "Biodisponibilité") – et les concentrations physiologiques circulantes ? Ceci implique la question essentielle de la portée physiologique réelle des observations.

#### **VI-1-1 Effet du 17 $\beta$ -estradiol au niveau hépatique**

L'action des estrogènes (nous parlerons ici du 17 $\beta$ -oestradiol ou E<sub>2</sub>) sur les facteurs de risque FSC au niveau hépatique est contestée, en raison du fait que l'athéro-protection est maintenue (Marsh 1999, Bourassa, 1996) chez des modèles murins déficients en récepteurs

LDL ou apoE et que les études chez la femme ménopausée ne montrent pas une modification nette du profil lipoprotéique (en particulier du rapport C-LDL/C-HDL) (Ossewaarde 2001, Nerbrand 2002). Il est d'ailleurs intéressant (et d'une certaine façon paradoxal) d'observer que les souris sensibles à l'athérosclérose C57BL/6 présentent des récepteurs ER $\alpha$  et ER $\beta$  plus nombreux, qui ont une activité transcriptionnelle plus élevée, que des souris résistantes (C3H/HeJ) (Potier 2003) au niveau de la paroi aortique et des CMLV.

### **VI-1-2 Effet du 17 $\beta$ -estradiol au niveau de la cellule endothéliale**

L'une des cibles privilégiées de E<sub>2</sub> dans la paroi artérielle est la cellule endothéliale. E<sub>2</sub> protège de l'apoptose les cellules endothéliales soumises à des contraintes physiques occasionnées par le flux sanguin (Spyridopoulos 1997). Dans un modèle murin, E<sub>2</sub> favorise par la voie du récepteur ER $\alpha$  la ré-endothelialisation d'un endothélium préalablement détruit (Broucher 2001). Le mécanisme n'est pas entièrement élucidé, mais il fait probablement intervenir un facteur de croissance des fibroblastes (FGF-2), des récepteurs à tyrosine kinase de FGF et la voie des mitogène-activated protein (MAP) kinases (Kim-Schultze 1998, Arnal 2004). Un rôle bénéfique vis à vis de la fonction endothéliale pourrait donc être attribué à E<sub>2</sub>, d'autant plus important que la formation de stries lipidiques serait fortement diminuée au niveau du site de la ré-endothelialisation (Arnal 2004).

L'implication directe de NO dans la vaso-dilatation est connue. Du fait de la réaction quasi instantanée de NO avec l'ion superoxyde, la quantité de NO disponible dans la paroi repose sur un équilibre entre sa propre production par la NO synthétase endothéliale (eNOS) et la production pariétale de l'ion superoxyde par les oxydases à NADPH. Des résultats montrent clairement que E<sub>2</sub> augmente la biodisponibilité de NO (Thompson, 2000). Dans des conditions physiologiques, E<sub>2</sub> augmente directement la production basale de NO (qui n'est pas affectée dans ces conditions par la production de l'ion superoxyde) par un mécanisme dépendant de ER $\alpha$ . E<sub>2</sub> est potentiellement capable d'augmenter l'expression de eNOS (Kleinert 1998) par une action non génomique prenant place au niveau des cavéoles membranaires (Chambliss 2002). La eNOS ne contient pas d'élément de réponse à E<sub>2</sub> dans son domaine promoteur (Kleinert 1998). E<sub>2</sub> diminue par ailleurs l'expression d'une sous-unité de la NADPH oxydase (la gp91*phox* membranaire) constitutive de la cellule endothéliale (Wagner 2001) par des mécanismes encore mal connus (voir ci-dessous), entraînant une diminution de la production de l'ion superoxyde et une augmentation de NO biodisponible.

Cependant, la voie NO-dépendante n'explique pas l'action athéro-protectrice de E<sub>2</sub> dans différents modèles animaux (Finking 2001, Elhage 1997).

E<sub>2</sub> pourrait également agir sur le volet inflammatoire de l'athérosclérose en diminuant la production endothéliale d'une protéine d'adhésion (VCAM-1) (Gourdy 2003). Le mécanisme ferait intervenir ER, NF- $\kappa$ B et NO (Mukherjee 2003). Des effets inhibiteurs de l'expression des ARNm de MCP-1 et ICAM-1 ont été rapportés sans mention des mécanismes impliqués (Wagner 2001). Ils pourraient avoir pour conséquence une diminution bénéfique de l'adhésion des monocytes à l'endothélium, puis de leur trans-migration vers l'intima. E<sub>2</sub> augmenterait par contre les cytokines pro-inflammatoires (IFN $\gamma$ , IL-1) et diminuerait les cytokines anti-inflammatoires (IL-4, IL-10 et IL-13) (Arnal 2004), ce qui pourrait déstabiliser la plaque d'athérome (Rajavashisth 1999, Mostafa Mtairag 2001) et expliquer l'augmentation des évènements thrombo-emboliques sous THS.

### **VI-1-3 Effets du 17 $\beta$ -estradiol sur les cellules musculaires lisses vasculaires (CMLV)**

Une deuxième cible cellulaire de E<sub>2</sub> au niveau de la paroi vasculaire est constituée par les CMLV. D'une façon générale, E<sub>2</sub> a un effet anti-prolifératif sur ces cellules. En 1997, il est montré que la prolifération des CMLV augmente chez des souris déficientes en ER $\alpha$ , indiquant un rôle antiprolifératif de E<sub>2</sub> (Iafrati 1997). Ultérieurement des effets antiprolifératifs de E<sub>2</sub> ont été observés chez des souris déficientes en ER $\alpha$  et/ou ER $\beta$  (voir notamment Karas 2001). Watanabe et al ont montré plus récemment que ER $\beta$  a une activité anti-proliférative

dominante par rapport à ER $\alpha$  et que ER $\alpha$  n'est pas antagoniste de ER $\beta$  (Watanabe 2003). Enfin, E<sub>2</sub> empêcherait la formation d'un composé sécrété par les CMLV qui serait responsable de la migration intinale des fibroblastes (Li 1999) par un mécanisme dépendant de ER et dose-dépendant. Or la migration et l'infiltration de fibroblastes de l'adventice (tunique externe des artères) vers l'intima est un processus qui prend place dans la sténose et la re-sténose angioplastique. E<sub>2</sub> présenterait donc une action protectrice vis à vis de ce processus.

L'effet de E<sub>2</sub> sur la formation des cellules spumeuses dérivant des CMLV n'est pas connu. La CRP est synthétisée au niveau du foie, mais également au niveau de la paroi artérielle athérogénique par les CMLV (Jabs 2003). Son rôle comme révélateur et agent de phénomènes inflammatoires justifie l'intérêt que l'on porte à son taux circulant. Or la CRP plasmatique augmente chez des femmes ménopausées en bonne santé recevant un THS combiné (E<sub>2</sub> et progestérone) (van Baal 1999) et chez des femmes ménopausées diabétiques recevant E<sub>2</sub> seul (Brussaard 2002).

#### **VI-1-4 Effets du 17 $\beta$ -estradiol sur les monocytes/macrophages**

Une troisième cible cellulaire de E<sub>2</sub> au niveau de la paroi vasculaire athérogénique est constituée par les monocytes/macrophages. En étudiant l'effet de E<sub>2</sub> sur des aortes lésées par dé-endothélialisation chez le lapin New Zealand recevant un régime athérogénique, Finking (2001) montre une diminution de la trans-migration intinale des monocytes et de la transformation des monocytes en macrophages. E<sub>2</sub> diminue par ailleurs l'expression de p47phox (Sumi 2003), une sous-unité indispensable à l'activité de la NADPH oxydase, dans une lignée promonocytaire différenciée en macrophages. La co-incubation de E<sub>2</sub> et de progestérone à des concentrations physiologiques avec des monocytes humains en culture primaire dérivés en macrophages issus de donneurs femmes diminue l'accumulation de lipides intracellulaires, montrant ainsi un effet athéro-protecteur de l'association E<sub>2</sub> + progestérone (McCrohon 1999). Cet effet est lié au sexe puisque aucune modification due à E<sub>2</sub> n'est retrouvée avec des macrophages issus de donneurs hommes. E<sub>2</sub> et la progestérone diminue l'accumulation des esters de cholestérol. Il semble que ce phénomène soit dû non à une modification du nombre de récepteurs, mais à un effet sur l'internalisation du complexe formé entre les LDL modifiées (acétylées) et leurs récepteurs scavenge (McCrohon 1999, Sulistiyani 1997). Il a été également rapporté que E<sub>2</sub> augmente l'expression de la NOS inductible des macrophages (You 2003). Cette action pourrait s'avérer défavorable si elle était associée à une augmentation de la production de l'ion superoxyde. Ceci ne semble pas être le cas puisque E<sub>2</sub> agit négativement sur l'expression des sous-unités p47phox et gp91phox respectivement dans le macrophage et la cellule endothéliale (voir plus haut).

On dispose de peu d'informations sur les récepteurs estrogéniques impliqués. Il a été avancé que ER $\alpha$  est faiblement exprimé par les macrophages (lignée J774A.1), et que l'activation augmente l'expression de ER $\beta$  (Tamir 2002). Dans une culture primaire de macrophages humains dérivés des monocytes il a été récemment confirmé que ER $\beta$  était le seul récepteur détecté (Kramer 2002). Dans des macrophages en culture primaire ou dans une lignée macrophagique (THP-1), E<sub>2</sub> augmente — via ER $\beta$  — l'expression de différents gènes, dont deux codent pour l'antagoniste du récepteur de l'IL-1 et pour LXR $\alpha$  (Kramer 2002), des protéines impliquées respectivement dans les processus anti-inflammatoires et dans l'homeostasie intracellulaire du cholestérol.

Concernant enfin l'activité fibrinolytique dépendante des macrophages, il a été montré que celle-ci était diminuée chez des rattes recevant de l'éthinyl-estradiol (Durand 1996). En fait, des travaux récents sur des femmes ménopausées avec un diabète de type 2 (Brussaard 2002) recevant E<sub>2</sub> montrent que la situation est complexe. Celles-ci présentent un statut de base d'hypercoagulabilité et d'hypofibrinolyse caractéristique d'un risque cardio-vasculaire élevé. Or, par rapport à un groupe placebo, on trouve chez ces femmes une amélioration des marqueurs de la fibrinolyse (une diminution de PAI-1 total et actif et des marqueurs de l'activité fibrinolytique inchangés) tandis que les marqueurs de la coagulation révèlent une

activité chroniquement activée. Il est donc impossible de dire si, sur de tels sujets, le bilan fibrinolyse/coagulation est en faveur d'un effet bénéfique de la prise de E<sub>2</sub>.

### **VI-1-5 Effets du 17β-estradiol sur les plaquettes**

Une dernière cible cellulaire est représentée par la plaquette sanguine, présente en situation pathologique au niveau de l'endothélium ou d'une lésion endothéliale, participant ainsi aux phénomènes thrombotiques. La littérature nous enseigne que le THS (estrogènes équinés + progestagène) augmente les risques de thrombose et d'événements thrombo-emboliques à court terme. Il semble donc que l'activation des plaquettes figure parmi les conséquences d'un THS. Chez des femmes ménopausées, des marqueurs d'activation des plaquettes (P-sélectine, glycoprotéine 53) augmentent en réponse à E<sub>2</sub> ou à la progestérone (Thijs 2002).. Chez des rattes recevant par voie orale de l'éthinyl-oestradiol, l'activité agrégante et la conversion plaquettaire de l'acide arachidonique en eicosanoïdes proagrégants sont plus élevées que chez les rattes non traitées (Durand 1996). En revanche l'agrégation plaquettaire diminue sous traitement par E<sub>2</sub> ou E<sub>2</sub> + progestérone chez la femme ménopausée (Bar 1993). Des publications anciennes montrent que, dans des modèles animaux, les estrogènes sont également capables d'inhiber l'agrégation plaquettaire, mais pas la progestérone (voir par exemple Mitchell 1974). Des données plus récentes décrivent l'effet anti-agrégant *in vitro* de E<sub>2</sub> (Nakano 1998). Celui-ci s'accompagne d'une diminution de l'influx intracellulaire de Ca<sup>2+</sup> (Nakano 2002). Il semble donc que l'acceptation actuelle soit en faveur d'un effet anti-agrégant de E<sub>2</sub>.

La plaquette, cellule anucléée, pose un intéressant problème puisque E<sub>2</sub> ne peut agir dans ce cas sur le génome après liaison à un récepteur nucléaire. Des données suggèrent que l'effet est médié par un récepteur estrogénique dont la fonction serait nécessairement extranucléaire (Bar 2000) et que cet effet passe en partie par un relais membranaire plasmique capable de moduler le flux calcique (Nakano 2002). Il a été récemment signalé que ER $\alpha$  et ER $\beta$  étaient exprimés dans les plaquettes (Jayachandran 2003). On ne dispose d'aucune donnée sur l'interaction de E<sub>2</sub> avec la voie de la PI<sub>3</sub> kinase, impliquée pourtant dans l'agrégation et la poussée respiratoire (production de l'ion superoxyde) des plaquettes. En revanche, il est connu que NO régule l'agrégation et l'adhésion des plaquettes. Il ne faut donc pas écarter la possibilité que l'agrégation plaquettaire soit inhibée par l'augmentation de la production de NO déclenchée par E<sub>2</sub> au niveau des macrophages (voir ci-dessus). Ceci a été démontré sur des segments d'aorte chez le rat (Selles, 2001). Mais, en amont, le métabolisme de l'ion superoxyde et de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> détermine également la biodisponibilité de NO plasmique, et peut donc avoir une influence sur l'effet anti-agrégant NO-dépendant (Freedman 1996). Enfin, NO peut être directement produit par les plaquettes (Radomski 1990) dans lesquelles s'exprime une eNOS (Jayachandran 2003). Or le polymorphisme de eNOS détermine la réponse à E<sub>2</sub> des plaquettes. Ainsi, l'équipe de Freedman a récemment montré que seul le génotype Glu298Asp présente des plaquettes dont l'agrégation (et la production d'ions superoxyde) est accrue en présence de E<sub>2</sub> (Tanus-Santos 2002).

### **VI-1-6 Effet anti-oxydant direct du 17β-estradiol sur les LDL**

Bien que la signification de la diminution de l'oxydabilité *in vitro* et *ex vivo* des LDL en termes d'athéro-protection soit, comme cela a été mentionné, très discutée, on rapporte dans la littérature des effets oxydo-protecteurs directs de E<sub>2</sub> d'un ordre de grandeur comparable à celui de la quercétine (un flavonol des fruits et légumes) (Bhavnani 2001). Mais des travaux montrent que estrogènes et progestatifs ont des effets antioxydants et anti-cytotoxiques opposés (Zhu 1999).

### **VI-1-7 Conclusion**

Ces travaux montrent que E<sub>2</sub> est majoritairement impliqué, via ER $\alpha$  dans les cellules endothéliales, via ER $\beta$  dans les CMLV et les macrophages, probablement via ER $\alpha$  et/ou ER $\beta$  dans les plaquettes, dans des processus vaso-relaxants, athéro-protecteurs, anti-inflammatoires et généralement antioxydants qui concourent à protéger la paroi vasculaire

de l'athérosclérose. La voie non génomique (voir chapitre "Mécanismes"), obligatoire dans le cas des plaquettes, existe également dans les autres cellules. Concernant les phénomènes thrombotiques et thrombo-emboliques, l'influence bénéfique de  $E_2$  est moins claire, corroborant ainsi les résultats des études épidémiologiques laissant entrevoir la possibilité de risques thrombotiques et thrombo-emboliques accrus sous THS. Concernant les phénomènes inflammatoires, les effets de  $E_2$  présentent une composante anti-inflammatoire macrophagique, et une composante pro-inflammatoire au niveau de l'endothélium et des CMLV.

## **VI-2 Action des phyto-estrogènes *in vitro***

Les travaux présentés ici ne tiennent pas compte des formes d'isoflavones réellement biodisponibles. Or nous savons (cf. chapitre "Biodisponibilité"), que les dérivés conjugués de la génistéine par exemple, n'ont pas les propriétés antioxydantes, anti-agrégantes et anti-adhésives de la génistéine (Rimbach 2004) alors qu'ils constituent les formes circulantes les plus abondantes dans le sang. Ce préambule montre d'emblée les limites actuelles de nos connaissances sur les mécanismes d'action *in situ* des phyto-estrogènes.

### **VI-2-1 Action de type estrogénique**

Les isoflavones ont la capacité de se lier aux ER. Leur affinité pour  $ER\beta$  est plus élevée que pour  $ER\alpha$ . Elle est d'un ordre de grandeur comparable à celle de  $E_2$  pour trois isoflavones : le coumestrol, la génistéine et l'équol (métabolite dérivé de la daïdzéine), mais elle est 200 fois inférieure pour la daïdzéine (Morito 2001, Kuiper 1998). L'affinité du coumestrol et de la génistéine pour  $ER\alpha$  est 5 à 25 fois plus faible que celle de  $E_2$ . Les isoflavonoïdes sont donc potentiellement capables d'agir sur les cellules présentes dans la paroi artérielle selon des mécanismes similaires à ceux de  $E_2$ .

Les isoflavones pourraient avoir une action sur la fonction endothéliale. Les observations sur le statut de cytokines pro-inflammatoires ou sur l'augmentation de métabolites de NO (voir les études cliniques) permettent de le supposer. L'amélioration de la bio-disponibilité de NO au niveau de l'endothélium, conséquence pour partie de la diminution de la production de l'ion superoxyde, pourrait être relayée par les récepteurs estrogéniques ( $ER\alpha$  ou  $ER\beta$ ) (Wagner 2001). Mais les preuves directes manquent. En revanche, il a été montré que la génistéine diminue l'expression de l'ARNm de VCAM-1 sous stimulation par  $TNF\alpha$ -ER-dépendant (Mukherjee 2003) (laissant envisager une diminution de l'adhésion des monocytes). Elle diminue par ailleurs la prolifération et la trans-migration intimale des CMLV par un mécanisme  $ER\beta$ -dépendant (Makela 1999)

### **VI-2-2 Action de type non estrogénique**

#### ***Au niveau des cellules endothéliales, des macrophages et des plaquettes***

Les effets de phyto-estrogènes pourraient également s'expliquer par des propriétés non estrogéniques, assimilables à celles des polyphénols dont ils constituent, rappelons-le, une importante famille. Des polyphénols sont capables en effet de diminuer la production de l'ion superoxyde par des macrophages (Aviram 1998, Leger 2000) entraînant une diminution de l'oxydation des LDL (Aviram 1998). On retrouve ce résultat avec une isoflavone des racines de la réglisse, la glabridine (Rosenblat, 1999), et l'équol (Hwang 2003), qui ralentissent l'assemblage, sous sa forme active, de la NADPH oxydase dans des cellules macrophagiques, processus lui-même dépendant de l'activité de la protéine kinase C (PKC) (Cachia, 1998). Or il a été montré que la glabridine diminue l'activité de la PKC (Rosenblat 1999). Un travail récent montre que la génistéine et la daïdzéine abaissent la protéine chimio-attractante MCP-1 induite par  $TNF\alpha$  par un mécanisme non ER-dépendant dans des cellules endothéliales (Gottstein 2003). La génistéine, comme d'autres polyphénols, abaisse de façon dose-dépendante la production de  $TNF\alpha$  dans une lignée macrophagique, alors que la daïdzéine l'augmente (Wang 2002). La génistéine inhibe également la NO synthétase inductible (iNOS) dans les macrophages (Scuro 2004, Sheu 2001), tandis que la daïdzéine et la génistéine inhibent l'agrégation plaquettaire induite par  $TXA_2$  par un mécanisme faisant intervenir le récepteur de  $TXA_2$  (Nakashima 1991). Une activité anti-agrégante a été

également rapportée dans des plaquettes humaines co-incubées en présence de génistéine ou de daïdzéine, activité qui s'est révélée comparable à celle du trans-resvératrol (un polyphénol appartenant à la famille des stilbènes) (Dobrydneva, 2002). Elle a été attribuée au blocage de l'influx calcique, voie d'action déjà évoquée pour les estrogènes (Nakano 2002). Une voie NO-indépendante impliquant un facteur hyperpolarisant dérivé de l'endothélium et faisant intervenir des canaux potassiques a été récemment décrite dans l'aorte de rat (Woodman 2004). Elle serait stimulée par la daïdzéine et expliquerait pour partie son effet vaso-relaxant.

#### **Au niveau des cellules musculaires lisses vasculaires**

La génistéine, comme d'autres polyphénols, est bien connue comme inhibiteur de l'activité tyrosine kinase (Akiyama 1991). Cette propriété explique en particulier ses effets anti-prolifératives (Shimokado 1995) et anti-migratoires (Shimokado 1994) vis à vis des cellules musculaires lisses vasculaire. La génistéine s'oppose de la même façon aux augmentations, angiotensine II-dépendantes, de l'expression de l'ARNm du pro-collagène et de la production de TGF $\beta$  augmentations qui impliquent une activité tyrosine kinase (Ford 1999). Ces différentes actions sont potentiellement anti-athérosclérotiques.

#### **Action anti-oxydante**

Les phyto-estrogènes ont des propriétés antioxydantes *in vitro* comparables à celles des estrogènes. L'équol, métabolite de la daïdzéine, présente l'activité antioxydante la plus élevée (Hodgson 1998). Ces propriétés les rendent potentiellement capables de s'opposer directement à l'oxydation des LDL *in vivo*, donc à l'apparition des LDLox fortement athérogéniques. Il est intéressant de rapporter ici le travail de Tikkanen et Adlercreutz (Tikkanen 2000). Ces auteurs incorporent *in vitro* la génistéine et la daïdzéine dans des LDL sous la forme d'esters d'acides gras pour augmenter leur lipophilicité et accroître ainsi leur incorporation. Les LDL contenant ces esters d'isoflavones sont moins sensibles à l'oxydation. Or on sait par un travail plus récent (Kaamanen 2003) que, après co-incubation en présence de LDL, la génistéine est pour partie associée aux LDL sous forme d'ester d'acides gras, dont la formation serait assurée par la lécithine cholestérol acyl transférase associée aux particules lipoprotéiques. Dans cette étude, les LDL enrichies en isoflavones présentent également des propriétés antiprolifératives vis à vis d'une lignée pro-monocytaire. Un autre travail a permis de montrer que la génistéine pouvait s'opposer à l'oxydation des LDL résultant de l'autoxydation du glucose *in vitro*, (Exner 2001) reproduisant ainsi des phénomènes qui prennent place dans l'hyperglycémie consécutive à un diabète de type 2 (un des facteurs aggravant le risque athérosclérotique). Elle ne s'oppose pas en revanche à la glycation des LDL ou de l'hémoglobine. Ces résultats montrent que des mécanismes permettant d'augmenter l'incorporation des isoflavones dans les LDL existent, alors que ceux-ci ne sont pas connus dans le cas des polyphénols. L'activité antioxydante des isoflavones pourraient donc être *in vivo* plus importante que celle des polyphénols. Ces mécanismes, de plus, diminuent le caractère athérogène des LDL dans différents modèles d'oxydation. En revanche la formation des dérivés glyqués pro-inflammatoires ne serait pas affectée.

#### **Une nouvelle voie d'action : les PPAR ?**

Il est démontré aujourd'hui que les isoflavones peuvent se lier à d'autres récepteurs que les ER. L'un, PPAR $\gamma$  (Dang, 2003), est bien connu pour son rôle dans l'adipogénèse, la dyslipémie, la sensibilité à l'insuline et les phénomènes inflammatoires, l'autre, PXR (Jacobs, 2003), est connu pour sa faible spécificité. Le premier présente un intérêt particulier. Le fait que, à la différence de E<sub>2</sub>, la génistéine active et augmente l'expression de PPAR $\gamma$  qu'elle se lie à PPAR $\gamma$  à des concentrations systémiques supérieures à 1 $\mu$ M et à ER $\beta$  à des concentrations entre 10 et 100 nM, le fait enfin que l'activation de PPAR $\gamma$  par ses ligands connus ait des conséquences bénéfiques sur le profil lipidique et face au développement de la lésion athérosclérotique (dans ses différentes composantes, y compris inflammatoires) chez l'Homme (Barbier 2002), conduisent à penser que la voie d'action par PPAR $\gamma$  joue un rôle protecteur potentiellement non négligeable lors de la prise en quantités élevées



d'aliments à base de soja (Dang 2003). Elle expliquerait l'augmentation de la biodisponibilité de NO par l'effet dépresseur de PPAR $\gamma$  sur la NADPH oxydase endothéliale (Francis, 2003). S'opposant à la voie estrogénique, elle pourrait expliquer en partie les effets anti-estrogéniques de la génistéine. Dernièrement, un effet activateur de PPAR $\alpha$  a été attribué à la daïdzéine, la génistéine et la glycétine (Mezei 2003). En raison de l'absence de modification du profil lipidique plasmatique lors de la prise d'isoflavones dans les études d'intervention, il semble que la voie d'action des isoflavones impliquant PPAR $\alpha$  au niveau hépatique ne soit pas physiologiquement fonctionnelle. Cependant, elle expliquerait l'action bénéfique des isoflavones au niveau endothélial sur des protéines chimio-attractantes et d'adhésion (voir ci-dessus) (Francis 2003).

### **Mécanismes d'action possible dans le diabète de type 2**

Sorenson (1994) est parti des propriétés inhibitrices connues de la génistéine vis à vis des tyrosine kinases pour tester *in vitro* l'effet de cet isoflavone sur des cellules d'îlots de Langerhans en culture. L'exposition des cellules à des concentrations extraphysiologiques (de 10 à 100  $\mu$ M) de génistéine augmente de façon dose-répondante leur sensibilité au glucose. L'action de la génistéine via PPAR $\gamma$  dont on connaît le rôle dans l'amélioration de la sensibilité à l'insuline, peut également être évoquée (voir paragraphe précédent).

### **Les protéines de soja ont une action propre via la $\beta$ -conglycinine**

Bien que ce sujet sorte des limites de ce chapitre, il est important d'examiner les hypothèses permettant d'expliquer les effets positifs de la fraction protéique sur les marqueurs FSC et NFSC. Deux voies s'ouvrent aujourd'hui, l'une impliquant la L-arginine — dont les PS sont riches — comme précurseur du vasodilatateur NO (Clarkson 1996), l'autre impliquant des peptides spécifiques des PS aux nombreuses propriétés potentiellement anti-athérogéniques (Kitts 2003). A notre connaissance la première n'a pas été explorée dans le cas des PS. Pour la deuxième, Adams (2004) a récemment démontré chez la souris invalidée pour l'apoE et le récepteur des LDL qu'une fraction majeure des PS — la  $\beta$ -conglycinine — avait un effet anti-athéromateux qui excédait celui des PS riches en isoflavones. Il y aurait donc lieu d'examiner l'incidence des traitements (spécialement à l'alcool) des PS utilisées couramment lors de la préparation d'isolats sur la structure et, par conséquent, la bio-activité des PS lors des expérimentations que nous avons rapportées dans l'ensemble de ce chapitre. Par ailleurs, le mécanisme d'action de la  $\beta$ -conglycinine n'implique pas dans cette étude une modification du métabolisme des lipoprotéines. Il faudrait donc rechercher les effets « signal » de ce peptide au niveau de la paroi vasculaire.

Enfin, il est utile d'observer que, à notre connaissance, les doses maximales d'apport en fraction protéique de soja utilisées dans les études cliniques n'ont pas dépassé 50 g/j (Jenkins, 2002 ; Tonstad, 2002 ; Puska, 2002).

## **Conclusion générale**

Les études épidémiologiques chez les femmes ménopausées suggèrent l'existence d'un lien statistique entre la consommation d'isoflavones ou de lignanes et l'amélioration du syndrome métabolique, d'une part, et l'élasticité des vaisseaux chez les femmes les plus anciennement ménopausées, d'autre part. Seule la consommation de lignanes semble être associée à une baisse de la triglycéridémie, une baisse de la pression artérielle et une diminution du risque de maladie coronarienne. Enfin, les isoflavones et les lignanes ne sont pas associées à une modification des marqueurs FSC (CT, C-LDL, et C-HDL).

Pour leur part, les études cliniques effectuées à l'aide de préparations purifiées d'isoflavones confirment que la consommation d'isoflavones à des niveaux comparables voire supérieurs à ceux de la population japonaise n'est pas liée à une modification du cholestérol plasmatique ou des marqueurs FSC. Elle est liée en revanche à une amélioration de la vaso-réactivité des vaisseaux pour des apports au moins égaux à 45 mg/j de génistéine (ou biochanine A + génistéine). Ces études cliniques confirment l'absence de lien entre isoflavones ingérées et triglycéridémie déjà suggérée par les études épidémiologiques.

Les études cliniques effectuées à l'aide d'isoflavones apportées par des préparations de PS et à des doses comparables aux précédentes montrent que, contrairement aux isoflavones administrées sous forme purifiée, ces préparations ont un effet dépresseur sur le cholestérol total et/ou le C-LDL qui ne dépend pas des doses d'isoflavones administrées. C'est donc l'apport de la partie protéique de ces préparations qui est déterminant dans cet effet. Cet apport doit être au moins égal à 30 g/j. Il est possible cependant que des niveaux d'apport élevés d'isoflavones, au moins égaux à 150 mg/j/2000Kcal, aient un effet bénéfique potentialisé par la part protéique de la préparation. Ces préparations, comme les préparations purifiées, n'ont aucun effet sur la triglycéridémie. Trop peu d'études se sont encore intéressées aux effets sur la vaso-réactivité, mais une étude confirme l'effet bénéfique observé avec les préparations purifiées d'isoflavones de soja pour un apport de 55 mg de génistéine, tandis qu'une autre indique qu'un apport supérieur à 118 mg/j (75 mg/j de génistéine) a un effet inverse. En revanche, contrairement aux préparations purifiées, des effets antioxydants ont pu être signalés, mais on sait que la signification de ce type d'observation en termes de réduction du risque cardio-vasculaire n'est pas claire et qu'elle est fortement tributaire de la méthodologie employée. Enfin, une réaction inflammatoire a été rapportée pour un apport de 73 mg/j d'isoflavones de soja.

Les résultats des études sur modèles animaux manquent de cohérence. Néanmoins, un effet bénéfique protecteur des isoflavones associées aux PS vis-à-vis des processus athérogéniques se dégage généralement de ces travaux.

Les études *in vitro* montrent que les isoflavones peuvent agir sur les quatre cibles cellulaires présentes au niveau de la paroi artérielle : cellules endothéliales, monocytes/ macrophages, CMLV et plaquettes. De nombreux modes d'action existent. La voie estrogénique pourrait être impliquée au niveau endothélial. Mais la voie non estrogénique, faisant intervenir la nature polyphénolique des isoflavones, semble être majoritairement impliquée dans les actions anti-athérosclérotiques et anti-thrombotiques. Parmi celles-ci, citons l'inhibition de l'adhésion des monocytes (et donc de leur trans-migration intimale), de la formation de la plaque, de l'infiltration des CMLV, de l'agrégation plaquettaire, de la synthèse de  $TNF\alpha$  et de  $TGF\beta$  et iNOS (produisant des quantités pro-oxydantes de NO). Plusieurs d'entre elles peuvent s'expliquer par l'inhibition d'étapes-clés du transfert du signal : la PKC et les récepteurs à tyrosine kinase (TK). Cependant, l'augmentation de la vaso-réactivité qui paraît être clairement établie par les études cliniques et épidémiologiques fait intervenir des mécanismes non entièrement élucidés. L'un de ceux-ci pourrait être l'inhibition de l'activité de la NADPH oxydase, complexe enzymatique producteur de l'ion superoxyde, qui a pour conséquence d'augmenter le NO biodisponible. Ce mécanisme impliquerait soit un blocage de l'activité de la PKC, soit l'activation de  $PPAR\gamma$ . Plus généralement, l'activation des  $PPAR$  ( $\alpha$  et  $\gamma$ ) par la daïdzéine et la génistéine pourrait expliquer, pour partie, leur rôle anti-athéromateux.

L'augmentation de protéines et de cytokines de l'inflammation liée à la prise d'isoflavones résulte probablement de phénomènes complexes mettant en jeu un équilibre entre processus pro- et anti-inflammatoires insuffisamment élucidé.

L'action des isoflavones sur la fonction plaquettaire et sur les phénomènes thrombotiques pourrait dépendre du polymorphisme de eNOS. Cette voie de recherche mériterait d'être approfondie.

Par ailleurs, on peut noter que la génistéine pourrait diminuer l'insulinémie et l'insulino-résistance impliquées dans le diabète de type 2, une pathologie qui est un facteur de risque important dans les MCV. Une augmentation de la sensibilité au glucose *in vitro* a été observée à des doses supra-physiologiques de génistéine (10-100  $\mu$ M). Le rôle de la génistéine *in vivo* chez des sujets en surpoids ou obèses demande à être mieux documenté.

Enfin, les protéines ou des fractions protéiques de la graine de soja sembleraient jouer un rôle protecteur comme molécule(s) signal au niveau de la paroi vasculaire, permettant ainsi d'expliquer la faible concordance des résultats entre isoflavones purifiées et non purifiées.

## Points clés et recommandations

### Points clés

- ❖ les isoflavones purifiés de soja n'ont pas d'effet sur le cholestérol plasmatique circulant, quelle que soit sa forme de transport.
- ❖ En revanche, un effet dépresseur sur le cholestérol total et le cholestérol des LDL, bénéfique en termes de risque cardiovasculaire, est associé aux protéines de soja à un niveau d'apport au moins égal à 33 g/j.
- ❖ les isoflavones de soja purifiées présentent un effet bénéfique sur la vaso-tonicité à partir d'un apport de 45 mg/j de génistéine (ou génistéine + biochanine A). Une étude montre qu'un apport de 118 mg/j d'isoflavones (dont 75 mg/j de génistéine) présente un effet inverse.
- ❖ Un effet pro-inflammatoire a été observé pour un apport de 73 mg/j d'isoflavones de soja.
- ❖ Les études d'intervention ne mettent en évidence aucun effet des isoflavones ou des préparations protéiques sur les triglycérides circulants.
- ❖ Des études épidémiologiques suggèrent en revanche un effet hypotriglycéridémiant dans le seul cas des lignanes et une amélioration du syndrome métabolique et de l'élasticité des vaisseaux dans le cas aussi bien des lignanes et que des isoflavones.
- ❖ De nombreux mécanismes, principalement non estrogéno-dépendants, suggèrent un rapport de causalité entre la prise d'isoflavones (le plus souvent la génistéine) et les effets observés chez l'Homme.
- ❖ L'effet bénéfique des isoflavones sur la vaso-tonicité est la seule propriété qui ait été observée dans les quatre types d'approche : épidémiologique, interventionnelle (mais seulement dans le cas des isoflavones purifiées), mécanistique, fonctionnelle.
- ❖ L'inversion de cet effet pour des apports supérieurs à 110 mg/j, ainsi que l'effet pro-inflammatoire pour des apports de 73 mg/j méritent une attention particulière.
- ❖ Le fait que le statut du cholestérol circulant est amélioré par les protéines de soja et n'est pas modifié par les isoflavones mérite d'être pris en compte dans la formulation des produits. Ceci implique également une meilleure compréhension du mécanisme d'action.
- ❖ Les résultats en faveur d'un effet bénéfique sur l'insulinémie et l'insulino-résistance dans le diabète de type 2, un facteur de risque cardio-vasculaire, sont insuffisants pour conclure à un effet favorable.
- ❖ Les preuves directes d'un effet protecteur des isoflavones et des préparations enrichies en isoflavones sur la morbi-mortalité cardio-vasculaire sont insuffisantes. Les données sur les lignanes sont trop rares pour qu'il soit possible d'émettre une appréciation sur leur action.

### Recommandations

#### 1- Recommandations à visée de connaissance et de recherche

- ❖ Des études permettant de mieux apprécier l'impact sur la morbi-mortalité cardiovasculaire des isoflavones (de PS ou purifiées) et des lignanes sont indispensables dans le contexte de consommation alimentaire de la population française.

- ❖ Ces études devront être accompagnées de l'évaluation des niveaux circulants des marqueurs biochimiques de consommation des phytoestrogènes afin d'établir la teneur circulante minimale protectrice
- ❖ Des études doivent être entreprises sur le syndrome métabolique (en tant que facteur de risque cardiovasculaire) et ses différentes composantes. Il faudrait en particulier rechercher s'il existe un effet sur l'insulino-résistance lié à la prise d'isoflavones ou de lignanes
- ❖ La prise en compte de polymorphismes génétiques sera nécessaire. Une attention particulière devrait être accordée au génotype Glu298Asp de la NO synthétase endothéliale.
- ❖ L'effet défavorable de doses élevées d'isoflavones (ou spécifiquement de génistéine) sur la vasotonie et sur des marqueurs intermédiaires de l'inflammation devra être examiné avec attention
- ❖ L'effet respectif de la fraction protéique et des isoflavones de soja doit faire l'objet de recherches qui pourraient permettre, à terme, une utilisation séparée et différente de ces produits.

## **2- Recommandations de santé publique**

Dans l'état actuel des connaissances, des apports au moins égaux à 30 g/j de protéines de soja et à 45 mg/j de génistéine (ou génistéine + biochanine A) peuvent contribuer à stabiliser, voire améliorer, des marqueurs intermédiaires de risque cardio-vasculaire (cholestérol, vaso-réactivité). Ces apports ne pourront pas dépasser 50 g/j de protéines de soja pour des raisons de confort et ne devront pas dépasser 70 mg/j de génistéine (son précurseur biochanine A inclus) ou d'isoflavones totales de protéines de soja en raison d'une éventuelle inversion des effets sur la vaso-réactivité et d'une réaction inflammatoire possible au-delà de ce niveau d'apport. Dans l'état actuel des connaissances, une surveillance de paramètres biochimiques de l'inflammation (par exemple CRP et IL-6) s'impose dans le cas d'apports continus à des niveaux élevés d'isoflavones.

## **3- Recommandations à visée d'information du consommateur**

- ❖ Le niveau de cholestérol circulant, dont l'augmentation est liée à un risque accru de MCV, peut être abaissé par les préparations de protéines de soja à des doses de 30 g/j.
- ❖ La tonicité vasculaire, dont la diminution accompagne souvent une augmentation du risque cardio-vasculaire, est améliorée par les isoflavones purifiées de soja à des doses de 45 à 55 mg/j de génistéine. Les doses supérieures n'ont pas fait preuve de leur innocuité.
- ❖ L'étiquetage doit préciser la teneur en phyto-estrogènes, exprimée en équivalents aglycone, notamment sur les aliments à base de soja et les compléments alimentaires. Ce qui signifie un contrôle des doses par les industriels à chaque fabrication avec un nouveau lot de soja.

**Tableau 1. Les marqueurs de risque biologiques dans l'athérosclérose<sup>40</sup>**

Marqueurs de risque	Abréviations	Evolution péjorative
Cholestérol total	CT	↑
Cholestérol des LDL	C-LDL	↑
Cholestérol des HDL	C-HDL	↓
Triglycérides	TG	↑
Pression artérielle (systolique et/ou diastolique)	PA(S/D)	↑
Lipoprotéine (a)	Lp(a)	↑
Syndrome métabolique <sup>41</sup>	SYM	Score ↑
Homo-cystéinémie	Hcy	↑
Compliance systémique artérielle (systemic arterial compliance)	SAC	↓
Vélocité de l'onde de pouls (pulse wave velocity)	PWV	↑
Vaso-dilatation endothélium-dépendante médiée par le flux sanguin (flow-mediated, endothelium-dependent vasodilation)	FMD	↓
Vitesse maximale du flux sanguin (peak flow velocity)	PFV	↑
Plasminogen activator inhibitor type 1	PAI-1	↑
Protéine C réactive	CRP	↑
Interleukine-6	IL-6	↑
Tissue necrosis factor $\alpha$	$TNF\alpha$	↑ (?)
Transforming growth factor $\beta$	$TGF\beta$	↓ (?)

<sup>40</sup> Ce sont les marqueurs de risque qui sont utilisés dans les publications rapportées dans le chapitre suivant

<sup>41</sup> Correspond au tableau clinique suivant : PA, CT et C-LDL élevés, C-HDL bas, TG élevés, insulino-résistance, surpoids ou obésité androïde (rapport taille-hanche élevé)

**Tableau 2. Préparations de PE de soja purifiés**

Fabricant	Spécialité	Nature	Référence
Blackmore Ltd, Sydney, Australia	PhytoLife	Isoflavones totales de soja	Simons 2000
Lab. Plants, Messina, Italie	?	Génistéine	Squadrito, 2002 Squadrito 2003
Novogen Pharmaceuticals, North Ryde, Australia	?	Génistéine et daïdzéine	Nestel 1997 Blakesmith 2003 Samman 1999 Hodgson 1998
Novogen Pharmaceuticals, North Ryde, Australia	Promensil	Isoflavones totales de trèfle rouge	Nestel 1999
Novogen Pharmaceuticals, North Ryde, Australia	Rimostil	Isoflavones totales de trèfle rouge	Clifton-Bligh 2001

**Tableau 3. Préparations de protéines de soja enrichies en PE**

Fabricant	Spécialité	Nature	Références
DuPont's Protein Technologies International, St Louis, MO, USA		Isolats de protéines de soja	Wangen 2001, Jenkins 2002, Jenkins 2002, Teede, 2001, Swain, 2002, Dent, 2001 ; Crouse, 1999, Potter 1998, Merz-Demlow 2000, Steinberg 2003, Dalais 2003, Lichtenstein 2002 Puska 2002
	Abacor	Isolats de protéines de soja	
Solban Hatzor Ltd, Ashdod, Israel		Concentré de protéines de soja texturées	Sanders 2002, Wiseman 2000
Essential Nutrition, Brough, UK		Isolat de protéines de soja	Jayagopal 2002
Eugenbio Co. Ltda, Seoul, Corée du Sud		Protéines de soja + isoflavones de soja	Han 2002
ADM Europort, Nederland	Nutrisoy flour	Farine de soja	Gardner-Thorpe 2003

**Tableau 4. Consommation de phyto-estrogènes et distribution de facteurs de risque cardio-vasculaires**

	Taille/hanches	Triglycérides	Système métabolique
<b>Isoflavones</b>			
≤0.100	0.853 0.8420, .863	1.62 1.53, 1.71	1.74 1.55, 1.92
0.101-0.155	0.855 0.845, 0.865	1.48 1.39, 1.56	1.45 1.27, 1.63
0.156-0.236	0.853 0.843, 0.863	1.58 1.50, 1.67	1.46 1.29, 1.64
>0.236	0.847 0.836, 0.856	1.46 1.37, 1.55	1.30 1.11, 1.49
Différence 1-4	-0.005 -0.021, -0.016	-0.16 -0.30, -0.02*	-0.43 -0.70, -0.16*
Test tendance	NS	0.07	0.014
<b>Lignanes</b>			
≤0.407	0.858 0.848, 0.869	1.64 1.55, 1.73	1.76 1.58, 1.94
0.408-0.565	0.854 0.844, 0.864	1.56 1.47, 1.64	1.56 1.39, 1.74
0.566-0.788	0.855 0.845, 0.865	1.54 1.45, 1.63	1.41 1.24, 1.59
>0.788	0.841 0.830, 0.851	1.40 1.31, 1.49	1.21 1.03, 1.39
Différence 1-4	-0.017 -0.030, 0.0016 *	-0.23 -0.37, -0.09*	-0.55 -0.82, -0.28*
Test tendance	0.03	0.001	0.0001

**Tableau 5. Effets des isoflavones purifiées – Travaux comportant un contrôle alimentaire**

\* Marqueur de consommation ; \*\* Pas de différence significative entre les deux traitements

Auteurs	Effectif Durée Quantités testées	H	Fm	Chol <sup>mie</sup>	CT	CLDL	CHDL	Autres marqueurs
Nestel 1997	21 5 SA ; 0/80 mg (45 mg Gé)		X x≈	N	→	→	→	SAC ↑
Hodgson 1998	46H + 13F (P : 30H + 29F) 8 SA ; 0/55 mg (46 mg Bioch+Gé)	x	x	N	→	→	→	TG → MC* urinaire
Nestel 1999	16/16/16 5 SA ; 0/40/80 mg (28/56 mg Bioch+Gé)		x	?	→	→	→	SAC ↑ dose-dépendante MC urinaire
Samman 1999	14 8 SA ; 0/86 mg (60 mg Bioch+Gé)		X ≈	N	→	→	→	TG → Ox LDL Cu →
Simons 2000	20 8 SA ; 0/80 mg IF glycosides de soja (≈ 40 mg Gé+Da)		x	N	→	→	→	PA → TG → FMD → MC plasmatique
Howes 2000	93 5 SA 0/40/80 mg (27/54 mg Bioch+Gé)		X	H	→	→	→	TG → MC urinaire
Upmalis 2000	177 12 SA 50 mg Gé + Da	x			Lipoprotéines →			
Clifton-Bligh 2001	15/16/15 24 SA 28/57/85 mg		X	N			↑ indépendant de la dose	ApoB ↓ Indépendant de la dose MC urinaire
Dewell 2002	20 (P: 16) 24 SA 0/90+60 mg aglycones+glycosides		X	H ≈	→	→	→	
Uesugi 2002	12 (P : 11) 4 SA 0/62 mg		X	H ≈	↓	↓		MC urinaire
Squadrito 2002	30 (P : 30) 24 SA 0/54 mg Gé	x	x	N	→	→	→	TG → NO2/NO3 ↑ ET-1 ↓ FMD ↑ MC plasmatique
Blakesmith 2003	12 (P : 13) 12 SA : 0/86 mg 60 mg Bioch+Gé		non		→	→	→	TG → Lp(a) → Glucose et Insuline → MC urinaire
Squadrito 2003	27 Gé/ 26 THS (P : 26) 1 an 54 mg Gé/1mg E <sub>2</sub>		x	N	Gé →	Gé → THS ↓	Gé → THS ↑	TG →** NO2/NO3 ↑** FMD ↑** MC plasmatique **

**Tableau 6. Effets des protéines de soja - Travaux comportant une évaluation et/ou un contrôle de la consommation alimentaire, un biomarqueur de consommation des isoflavones et un dispositif expérimental avec cross-over**

\* Le chiffre indique la quantité d'IF ingérée pour 2000 Kcal et par jour

† Le chiffre indique la quantité d'IF ingérée quotidiennement

‡ Uniquement chez les sujets à CT > 4,14 mmol/L

Auteurs	Effectif Durée Protéines testées	H	Fm	Chol <sup>mie</sup>	CT	CLDL	CHDL	Autres marqueurs
Jenkins 2000a	25 2,3 SA ; PBIé/PS180 <sup>42</sup> PA/PV = 1,3-0,6 36 g/j de PS	x	x	H	→	→	→	TG → DC des LDL ↓ (non supl VitE)
Jenkins 2000b	31 2,3 SA ; PA+PV/PS86 <sup>42</sup> PA/PV = 3,5-0,07 33 g/j de PS	x	x	H	↓	↓	→	DC des LDL ↓ (y compris supl VitE) TG →
Wiseman 2000	24 2,5 SA ; PS2/PS56	x	non	N				Isoprostanes plasma ↓ Oxyd Cu LDL ex vivo ↓
Wangen 2001	18 13 SA ; PS7,8/PS74/PS148 63 g/j de PS		x	N + H ≈	→	↓ (PS7,8 vs PS148) → (PS7,8 vs PS74 et PS74 vs PS148)	→	TG → apoA1, apoB et Lp(a) →
Sanders 2002	22 2,5 SA ; PS2/PS56 15 g/j de PS	X	X	N	→	→	↑	TG → apoA1 ↑ PAI-1 → TGFβ1 →
Jenkins 2002a	41 4 SA ; PA/PS10/PS73 <sup>43</sup> PA/PV = 2,1-0,05-0,05 50 g/j de PS	X	X	H	↓ PS vs PA → PS73 vs PS10	↓ PS vs PA → PS73 vs PS10	→ PS vs PA → PS73 vs PS10	Hcys ↓ PS vs PA apoB ↓ PS vs PA DC des LDL ↓ PS vs PA Mais → entre PS10 et PS73
Jenkins 2002b	41 4 SA ; PA/PS10/PS73 <sup>43</sup> PA/PV = 2,1-0,05-0,05 50 g/j de PS	X	X	H				IL-6 ↑ chez Fmé seul† CRP → TNFβ →
Lichtenstein 2002	42 6 SA PA/PA104/PS2/PS92 <sup>42</sup> 50 g/j/2000 Kcal	X	X	H ≈	↓ PS vs PA <sup>44</sup> → pour les IF	↓ PS vs PA <sup>44</sup> → pour les IF	↑ PS vs PA → pour les IF	ApoB et TG ↓ PS vs PA ApoB et TG → pour les IF ApoA1 → PS vs PA et IF
Steinberg 2003	28 6 SA ; PA <sup>45</sup> /PS2/PS107 (55 mg Gé ; 47 mg Da) 25 g/j de PS		X	N	→	→	→	TG → PFV → PA vs PS2 PFV → PS2 vs PS107 PFV ↓ PS107 vs PA NO, ET-1, molécules d'adhésion →

§ Protéines de lait

<sup>42</sup> Le chiffre indique la quantité d'IF ingérée pour 2000 Kcal et par jour

<sup>43</sup> Le chiffre indique la quantité d'IF ingérée quotidiennement.

<sup>44</sup> Uniquement chez les sujets à CT > 4,14 mmol/L

<sup>45</sup> Protéines de lait.



**Tableau 7. Récapitulatif des autres études d'intervention**

Auteurs	Effectif Durée Protéines testées	H	Fm	Chol <sup>mie</sup>	CT	CLDL	CHDL	Autres marqueurs
Gooderham 1996	20 4 SA ; Cas/PS 60 g/j de PS	x		N	→		→	Agrégation plaquettaire → Plasma : Gé 0,9 IM ; Da 0,5 IM
Potter 1998	66 (22/22/22) 24 SA ; PS <sup>+</sup> /PS <sup>-</sup> /Cas 90/56/0, 40 g/j de PS		x	H	→	↓ pour PS <sup>+</sup> et PS <sup>-</sup>	↑ pour PS <sup>+</sup> et PS <sup>-</sup>	TG → LDL-R ↑
Washburn 1999	51 6 SA ; PS/Gluc 34/0, 20 g/j de PS		X ≈	N	↓	↓	→	TG → PA <sub>dia</sub> ↓
Merz-Demlow 2000	13 3 cycles menstruels PS10/PS65/PS129, 53 g/j de PS		non	N + H ≈	→	↓ (à l'ovulation pour PS129)		
Jenkins et al, 2000	? 8 SA PL/PS 12 g/j de PS	X	X	H			↑ CT/CHDL ↓	DC des LDL ↓
Urban 2001	34 6 SA ; PS69/PS3,4 20 g/j de PS	X			↓ pour PS69			
Mackey 2000	54 12 SA ; PS65/PS4 28 g/j	X	X	H	↓ avec PS65 et PS4 IF indépend <sup>t</sup>	↓ avec PS65 et PS4 IF indépend <sup>t</sup>		
Gardner 2001	31/33/30 12 SA ; PS <sup>+</sup> /PS <sup>-</sup> /PL 80/0/0 42 g/j de PS		X	H ≈	↓ PS <sup>+</sup> vs PL seulement	↓ pour les 3 (mais ↓↓↓ PS <sup>+</sup> vs PL	→	TG →
Goodman-Gruen 2001	208 Etude transversale Enq. consom <sup>tion</sup> (Gé : 0 contre ≥ 1 mg/j)		X	N + H	→ (pas d'effet taux Chol)	→ (pas d'effet taux Chol)	↑ quand ↑ consom <sup>tion</sup> génistéine	Insuline ↓ quand consom <sup>tion</sup> génistéine ↑
Scheiber 2001	42 12 SA avant/après PS60		X	N	→	→	↑	TG → Oxydabilité LDL ↓
Teede 2001	96 + 83 12 SA ; PS118/Cas (75 mg Gé) 40 g/j de PS	X	X	H ≈	↓ (F) avec PS et Cas	↓ (F) avec PS et Cas		TG ↓ PA ↓ Lp(a) (F) ↑↓ FMD (H) ↓

Tableau 7 (suite)

Auteurs	Effectif Durée Protéines testées	H	Fm	Chol <sup>mie</sup>	CT	CLDL	CHDL	Autres marqueurs
Crouse 1999	156 (5 groupes) 9 SA Cas/PS62/PS37/ PS27/PS3 25 g/j de PS	x	X non	N	↓ pour PS62 seul <sup>t</sup>  (↓↓ si Chol >4,24 mmol/L)	↓ pour PS62 seul <sup>t</sup>  (↓↓ si Chol >4,24 mmol/L)	→	TG →  TG ↓ si Chol >4,24 mmol/L
Dent 2001	24/24/21 24 SA ; PS+/PS-/PL 80/4,4/0 40 g/j ( ? ) de PS		X ≈	N + H ≈	→	→	→	Lp(a) → PAI-1 →
Han 2002	40/40 16 SA PS+IF/PS+gluc 100/0 0,15 g/j de PS		x	H ≈	↓ pour IF vs contrôle	↓ pour IF vs contrôle	↑ (avec les 2 régimes)	TG ↑ (avec les régimes) PA →
Lemay 2002	25 8 SA Graines de lin : 21 mg lignanes/j vs THS		X	H		→ (p.r. THS et t <sub>0</sub> )	↓ (p.r. THS) mais → p.r. à t <sub>0</sub>	TG → PAI-1 → apoA1 ↓
Jayagopal 2002	32 12 SA PS130/cellulose 30 g/j de PS		x	Diab II IMC 32,2	↓	↓	→	TG → Insuline ↓ PA → HbA <sub>1c</sub> ↓
Tonstad 2002	4 groupes de 31-36 16 SA 30 g/j Cas ou PS 50 g/j Cas ou PS	x	x	H ≈	↓ avec PS vs Cas Pas d'effet dose	↓ avec PS vs Cas Pas d'effet dose	→	TG → ApoB → Lp(a) → Hcys ↓
Puska 2002	24/28 6 SA ; PS188/Cas 52 g/j de PS	x	x	H	↓	↓	→	TG → ApoB → Lp(a) → Hcys ↓
Swain 2002	99 12 et 24 SA PS+/PS-/PL 40 g/j de PS		X ≈	N + H	→	→	→	Statut antiox total ↑ avec PS vs PL TG → Lp(a) →
Gardner-Thorpe 2003	20 6 SA ; PS/PBlé 120/0	X		N	→			TG → Oxydabilité LDL ↓ Peroxydes ↓
Dalais 2003	51/55 12 SA PS69/Cas 40 g/j de PS		x	H	→	↓	→	TG ↓

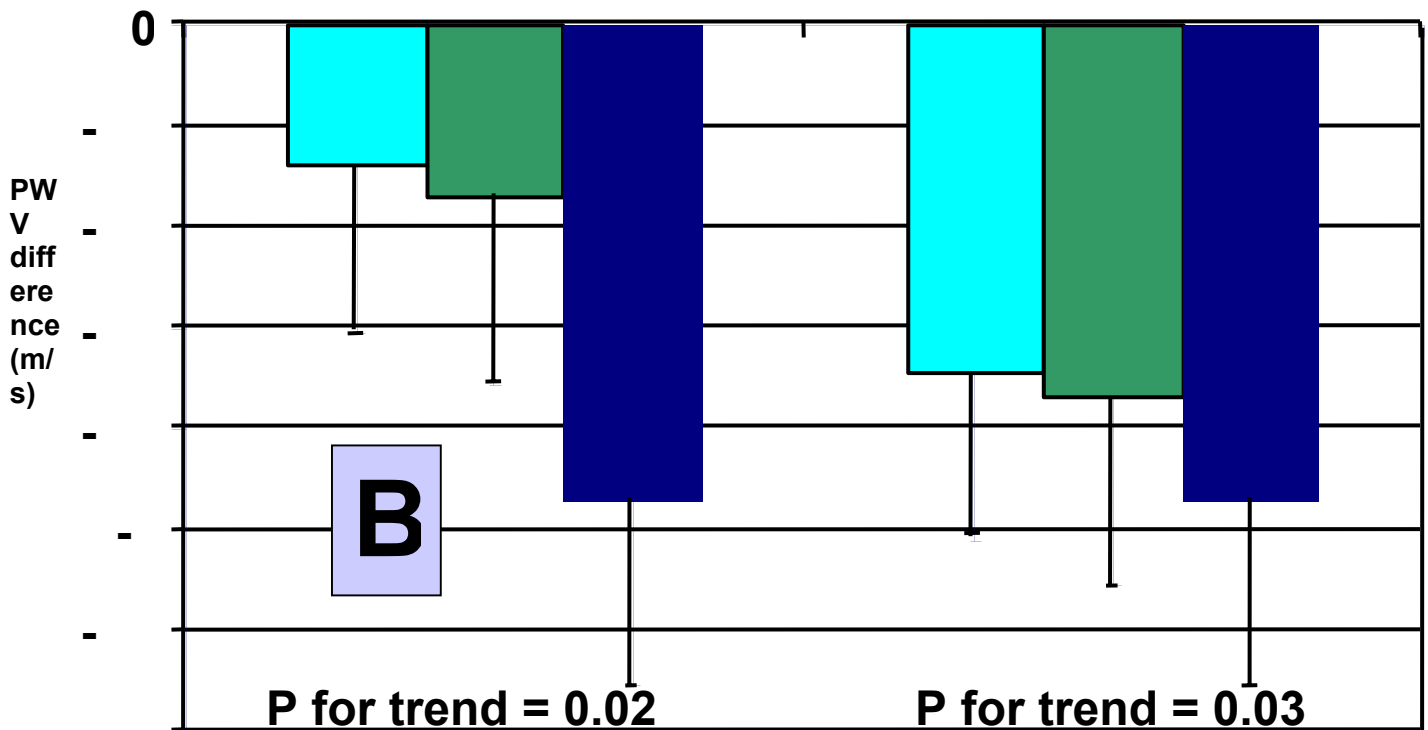
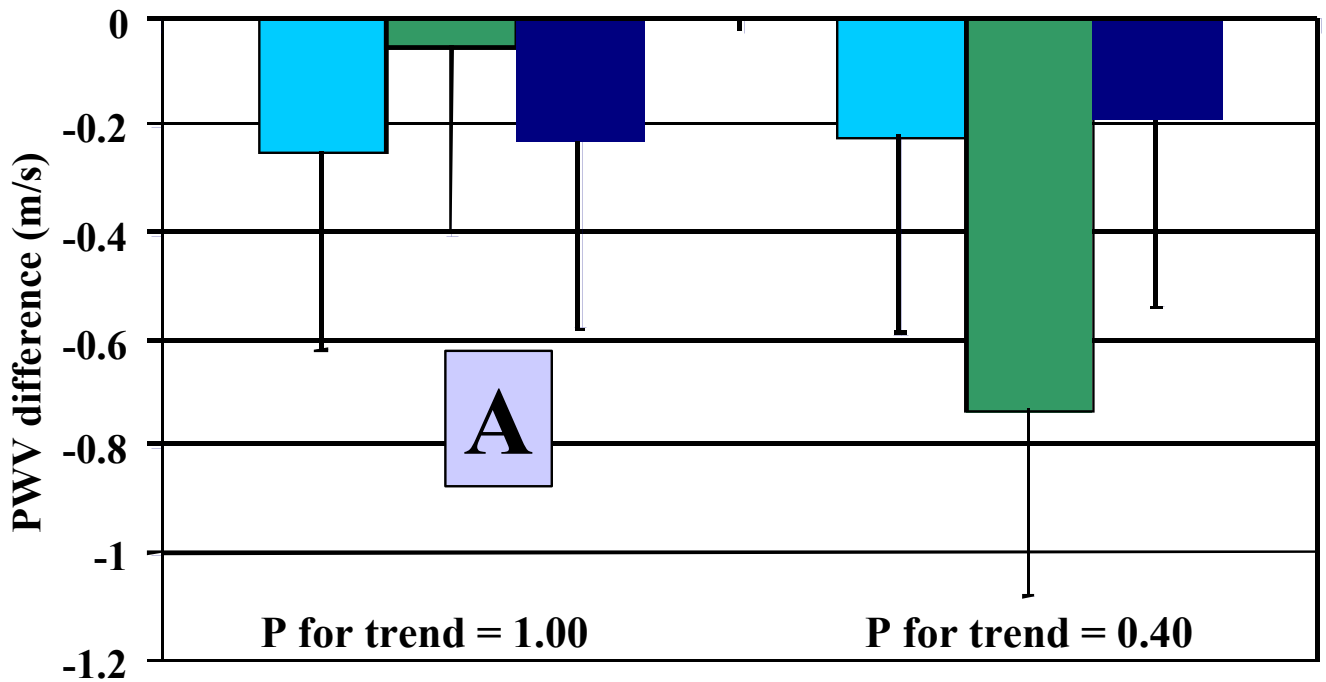
**Tableau 8: Principales actions des estrogènes (E<sub>2</sub>) dans la paroi vasculaire**

Type cellulaire	Type d'action	Effets
Cellule endothéliale	Génomique (ER $\alpha$ ) et non génomique	<ul style="list-style-type: none"> <li>• NO basal <math>\uparrow</math> (ER<math>\alpha</math>)</li> <li>• eNOS <math>\uparrow</math> d'où NO <math>\uparrow</math></li> <li>• O<sub>2</sub><sup>-</sup> <math>\downarrow</math></li> <li>• NO biodisponible <math>\uparrow</math></li> <li>• VCAM-1 <math>\downarrow</math></li> <li>• ARNm de MCP-1 et ICAM-1 <math>\downarrow</math></li> <li>• Cytokines pro-inflammatoires <math>\uparrow</math> et anti-inflammatoires <math>\downarrow</math></li> <li>• Ré-endothélialisation <math>\uparrow</math> et anti-apoptotique dans les contraintes physiques (ER<math>\alpha</math>)</li> </ul>
Cellule musculaire lisse vasculaire	Génomique (ER $\alpha/\beta$ )	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Anti-prolifératif (ER<math>\beta</math>)</li> <li>• Un agent responsable de la migration des fibroblastes <math>\downarrow</math> (ER<math>\beta</math>)</li> <li>• CRP <math>\uparrow</math> (?)</li> </ul>
Monocytes//Macrophages	Génomique (ER $\beta$ ) et non génomique	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Transmigration intinale <math>\downarrow</math></li> <li>• Différenciation monocyte <math>\rightarrow</math> macrophage <math>\downarrow</math> • p47<sup>phox</sup> <math>\downarrow</math> d'où O<sub>2</sub><sup>-</sup> <math>\downarrow</math></li> <li>• iNOS <math>\uparrow</math> d'où NO <math>\uparrow</math></li> <li>• Lipides intracellulaires <math>\downarrow</math> (chez femmes)</li> <li>• Effet sur le complexe LDLmod-R</li> <li>• Expression de l'antagoniste du R de IL-1 <math>\uparrow</math> (ER<math>\beta</math>)</li> <li>• Expression de LXR<math>\alpha</math> <math>\uparrow</math> (ER<math>\beta</math>)</li> </ul>
Plaquette	Non génomique mais ER $\alpha/\beta$ existent	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Marqueurs d'activation <math>\uparrow</math> (P-sélectine, gp53)</li> <li>• Agregation <math>\downarrow</math> (Ca<sup>2+</sup> <math>\downarrow</math>)</li> <li>• Dépendant du polymorphisme de eNOS (type Glu298Asp <math>\uparrow</math> agrégation sous E2)</li> </ul>

**Tableau 9: Principales actions des phyto-estrogènes dans la paroi vasculaire**

Type cellulaire	Type d'action	Effets
<b>Génomique</b>		
Cellule endothéliale	ER	NO biodisponible ↗ ( ? ) ARNm de VCAM-1 ↘ (génistéine)
Cellule musculaire lisse vasculaire	ER $\beta$	Anti-prolifératif Trans-migration intinale ↘
<b>Non génomique</b>		
Cellule endothéliale		MCP-1 sous TNF $\alpha$ ↘ (génistéine et daïdzéine)
Monocytes/ Macrophages		Activité NADPH oxydase ↘ d'où O $_2^{\cdot-}$ ↘ (PKC-dépendant ?) (glabridine et équol) TNF $\beta$ ↘ (génistéine) ou ↗ (daïdzéine) Activité de iNOS ↘ (génistéine)
Cellule musculaire lisse vasculaire		Anti-prolifératif (par inhibition de l'activité TK) (génistéine) Trans-migration intinale (par inhibition de l'activité TK) (génistéine) Opposition à l'effet de Ang II (↗ de ARNm du pro-collagène et ↗ production de TGF $\beta$ ) (par inhibition de l'activité TK) (génistéine)
Plaquette		Agrégation ↘ (par Ca $^{2+}$ ↘) (génistéine et daïdzéine)

Figure 1 : L'élasticité des vaisseaux est améliorée (PWV diminué) par la prise d'isoflavones ou de lignanes chez les femmes les plus anciennement ménopausées (B), et non chez les femmes les plus récemment ménopausées (A)(réf. 21).



- (2001) Executive Summary of The Third Report of The National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, And Treatment of High Blood Cholesterol In Adults (Adult Treatment Panel III). *Jama*, 285, pp.2486-97.
- Adams, M.R., Golden, D.L., Anthony, M.S., Register, T.C., et al. (2002) The inhibitory effect of soy protein isolate on atherosclerosis in mice does not require the presence of LDL receptors or alteration of plasma lipoproteins. *J Nutr*, 132, pp.43-9.
- Adams, M.R., Golden, D.L., Franke, A.A., Potter, S.M., et al. (2004) Dietary soy beta-conglycinin (7S globulin) inhibits atherosclerosis in mice. *J Nutr*, 134, pp.511-6.
- Akiyama, T., Ogawara, H. (1991) Use and specificity of genistein as inhibitor of protein-tyrosine kinases. *Methods Enzymol*, 201, pp.362-70.
- Alberti, K.G., Zimmet, P.Z. (1998) Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus provisional report of a WHO consultation. *Diabet Med*, 15, pp.539-53.
- American Heart Association.
- Anthony, M.S., Clarkson, T.B., Bullock, B.C., Wagner, J.D. (1997) Soy protein versus soy phytoestrogens in the prevention of diet-induced coronary artery atherosclerosis of male cynomolgus monkeys. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 17, pp.2524-31.
- Arnal, J.F., Gourdy, P., Elhage, R., Garmy-Susini, B., et al. (2004) Estrogens and atherosclerosis. *Eur J Endocrinol*, 150, pp.113-7.
- Aviram, M., Fuhrman, B. (1998) Polyphenolic flavonoids inhibit macrophage-mediated oxidation of LDL and attenuate atherogenesis. *Atherosclerosis*, 137 Suppl, pp.S45-50.
- Bar, J., Lahav, J., Hod, M., Ben-Rafael, Z., et al. (2000) Regulation of platelet aggregation and adenosine triphosphate release in vitro by 17beta-estradiol and medroxyprogesterone acetate in postmenopausal women. *Thromb Haemost*, 84, pp.695-700.
- Bar, J., Tepper, R., Fuchs, J., Pardo, Y., et al. (1993) The effect of estrogen replacement therapy on platelet aggregation and adenosine triphosphate release in postmenopausal women. *Obstet Gynecol*, 81, pp.261-4.
- Barbier, O., Torra, I.P., Duguay, Y., Blanquart, C., et al. (2002) Pleiotropic actions of peroxisome proliferator-activated receptors in lipid metabolism and atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 22, pp.717-26.
- Bhavnani, B.R., Cecutti, A., Gerulath, A., Woolever, A.C., et al. (2001) Comparison of the antioxidant effects of equine estrogens, red wine components, vitamin E, and probucol on low-density lipoprotein oxidation in postmenopausal women. *Menopause*, 8, pp.408-19.
- Blakesmith, S.J., Lyons-Wall, P.M., George, C., Joannou, G.E., et al. (2003) Effects of supplementation with purified red clover (*Trifolium pratense*) isoflavones on plasma lipids and insulin resistance in healthy premenopausal women. *Br J Nutr*, 89, pp.467-74.
- Bonora, E., Targher, G., Formentini, G., Calcaterra, F., et al. (2004) The Metabolic Syndrome is an independent predictor of cardiovascular disease in Type 2 diabetic subjects. Prospective data from the Verona Diabetes Complications Study. *Diabet Med*, 21, pp.52-8.
- Bourassa, P.A., Milos, P.M., Gaynor, B.J., Breslow, J.L., et al. (1996) Estrogen reduces atherosclerotic lesion development in apolipoprotein E-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93, pp.10022-7.
- Bourdarias, J., Cacoub, P., Bierling, P. (1998) Pathologies cardiaques et vasculaires, hémostasie et thrombose. Paris, Flammarion-Médecine Sciences.
- Bourdillon, M.C. (2003) Modèles animaux d'athérosclérose : modèles traditionnels et modèles génétiques. IN: Toussaint, J. F., Jacob, M. P. ed. *L'athérosclérose : physiopathologie, diagnostics, thérapeutiques*. Paris, Masson, pp. 347-67.
- Brouchet, L., Krust, A., Dupont, S., Chambon, P., et al. (2001) Estradiol accelerates reendothelialization in mouse carotid artery through estrogen receptor-alpha but not estrogen receptor-beta. *Circulation*, 103, pp.423-8.
- Brussaard, H.E., Leuven, J.A., Krans, H.M., Kluit, C. (2002) The effect of 17 beta-oestradiol on variables of coagulation and fibrinolysis in postmenopausal women with type 2 diabetes mellitus. *Vascul Pharmacol*, 39, pp.141-7.
- Cachia, O., Benna, J.E., Pedruzzi, E., Descomps, B., et al. (1998) alpha-tocopherol inhibits the respiratory burst in human monocytes. Attenuation of p47(phox) membrane translocation and phosphorylation. *J Biol Chem*, 273, pp.32801-5.
- Castelli, W.P., Garrison, R.J., Wilson, P.W., Abbott, R.D., et al. (1986) Incidence of coronary heart disease and lipoprotein cholesterol levels. The Framingham Study. *Jama*, 256, pp.2835-8.
- Celermajer, D.S., Sorensen, K.E., Gooch, V.M., Spiegelhalter, D.J., et al. (1992) Non-invasive detection of endothelial dysfunction in children and adults at risk of atherosclerosis. *Lancet*, 340, pp.1111-5.
- Chambliss, K.L., Shaul, P.W. (2002) Rapid activation of endothelial NO synthase by estrogen: evidence for a steroid receptor fast-action complex (SRFC) in caveolae. *Steroids*, 67, pp.413-9.
- Clarkson, P., Adams, M.R., Powe, A.J., Donald, A.E., et al. (1996) Oral L-arginine improves endothelium-dependent dilation in hypercholesterolemic young adults. *J Clin Invest*, 97, pp.1989-94.
- Clarkson, T.B., Anthony, M.S., Morgan, T.M. (2001) Inhibition of postmenopausal atherosclerosis progression: a comparison of the effects of conjugated equine estrogens and soy phytoestrogens. *J Clin Endocrinol Metab*, 86, pp.41-7.
- Clifton-Bligh, P.B., Baber, R.J., Fulcher, G.R., Nery, M.L., et al. (2001) The effect of isoflavones extracted from red clover (Rimostil) on lipid and bone metabolism. *Menopause*, 8, pp.259-65.
- Crouse, J.R., 3rd, Morgan, T., Terry, J.G., Ellis, J., et al. (1999) A randomized trial comparing the effect of casein with that of soy protein containing varying amounts of isoflavones on plasma concentrations of lipids and lipoproteins. *Arch Intern Med*, 159, pp.2070-6.
- Dalais, F.S., Ebeling, P.R., Kotsopoulos, D., McGrath, B.P., et al. (2003) The effects of soy protein containing isoflavones on lipids and indices of bone resorption in postmenopausal women. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 58, pp.704-9.
- Dang, Z.C., Audinot, V., Papapoulos, S.E., Boutin, J.A., et al. (2003) Peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) as a molecular target for the soy phytoestrogen genistein. *J Biol Chem*, 278, pp.962-7.

- Darblade, B., Pendaries, C., Krust, A., Dupont, S., et al. (2002) Estradiol alters nitric oxide production in the mouse aorta through the alpha-, but not beta-, estrogen receptor. *Circ Res*, 90, pp.413-9.
- De Kleijn, M.J.J., van der Schouw, Y.T., Wilson, P.W.F., Groobee, D.E., et al. (2001) Dietary intakes of phytoestrogens is associated with a favorable metabolic cardiovascular risk profile in postmenopausal US women: the Framingham Study. *J Nutr*, 132, pp.276-82.
- De Nigris, F., Lerman, L.O., Condorelli, M., Lerman, A., et al. (2001) Oxidation-sensitive transcription factors and molecular mechanisms in the arterial wall. *Antioxid Redox Signal*, 3, pp.1119-30.
- Dent, S.B., Peterson, C.T., Brace, L.D., Swain, J.H., et al. (2001) Soy protein intake by perimenopausal women does not affect circulating lipids and lipoproteins or coagulation and fibrinolytic factors. *J Nutr*, 131, pp.2280-7.
- Dewell, A., Hollenbeck, C.B., Bruce, B. (2002) The effects of soy-derived phytoestrogens on serum lipids and lipoproteins in moderately hypercholesterolemic postmenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab*, 87, pp.118-21.
- Dobrydneva, Y., Williams, R.L., Morris, G.Z., Blackmore, P.F. (2002) Dietary phytoestrogens and their synthetic structural analogues as calcium channel blockers in human platelets. *J Cardiovasc Pharmacol*, 40, pp.399-410.
- Downs, J.R., Clearfield, M., Weis, S., Whitney, E., et al. (1998) Primary prevention of acute coronary events with lovastatin in men and women with average cholesterol levels: results of AFCAPS/TexCAPS. Air Force/Texas Coronary Atherosclerosis Prevention Study. *Jama*, 279, pp.1615-22.
- Duncan, A.M., Merz, B.E., Xu, X., Nagel, T.C., et al. (1999a) Soy isoflavones exert modest hormonal effects in premenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab*, 84, pp.192-7.
- Duncan, A.M., Underhill, K.E., Xu, X., Lavalleur, J., et al. (1999b) Modest hormonal effects of soy isoflavones in postmenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab*, 84, pp.3479-84.
- Durand, P., Blache, D. (1996) Enhanced platelet thromboxane synthesis and reduced macrophage-dependent fibrinolytic activity related to oxidative stress in oral contraceptive-treated female rats. *Atherosclerosis*, 121, pp.205-16.
- Elhage, R., Bayard, F., Richard, V., Holvoet, P., et al. (1997) Prevention of fatty streak formation of 17beta-estradiol is not mediated by the production of nitric oxide in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation*, 96, pp.3048-52.
- Eurostat (2002).
- Exner, M., Hermann, M., Hofbauer, R., Kapiotis, S., et al. (2001) Genistein prevents the glucose autooxidation mediated atherogenic modification of low density lipoprotein. *Free Radic Res*, 34, pp.101-12.
- Farnier, M. (2003) Dyslipidémies athérogènes. IN: Toussaint, J. ed. *L'athérosclérose : physiopathologie, diagnostics, thérapeutiques*. Paris, Masson, pp. 571-97.
- Finking, G., Krauss, N., Romer, S., Eckert, S., et al. (2001) 17beta-estradiol, gender independently, reduces atheroma development but not neointimal proliferation after balloon injury in the rabbit aorta. *Atherosclerosis*, 154, pp.39-49.
- Ford, C.M., Li, S., Pickering, J.G. (1999) Angiotensin II stimulates collagen synthesis in human vascular smooth muscle cells. Involvement of the AT(1) receptor, transforming growth factor-beta, and tyrosine phosphorylation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 19, pp.1843-51.
- Francis, G.A., Annicotte, J.S., Auwerx, J. (2003) PPAR agonists in the treatment of atherosclerosis. *Curr Opin Pharmacol*, 3, pp.186-91.
- Freedman, J.E., Loscalzo, J., Benoit, S.E., Valeri, C.R., et al. (1996) Decreased platelet inhibition by nitric oxide in two brothers with a history of arterial thrombosis. *J Clin Invest*, 97, pp.979-87.
- Gardner, C.D., Newell, K.A., Cherin, R., Haskell, W.L. (2001) The effect of soy protein with or without isoflavones relative to milk protein on plasma lipids in hypercholesterolemic postmenopausal women. *Am J Clin Nutr*, 73, pp.728-35.
- Gardner-Thorpe, D., O'Hagen, C., Young, I., Lewis, S.J. (2003) Dietary supplements of soya flour lower serum testosterone concentrations and improve markers of oxidative stress in men. *Eur J Clin Nutr*, 57, pp.100-6.
- Gooderham, M.H., Adlercreutz, H., Ojala, S.T., Wahala, K., et al. (1996) A soy protein isolate rich in genistein and daidzein and its effects on plasma isoflavone concentrations, platelet aggregation, blood lipids and fatty acid composition of plasma phospholipid in normal men. *J Nutr*, 126, pp.2000-6.
- Goodman-Gruen, D., Kritzer-Silverstein, D. (2001) Usual dietary isoflavone intake is associated with cardiovascular disease risk factors in postmenopausal women. *J Nutr*, 131, pp.1202-6.
- Gottstein, N., Ewins, B.A., Eccleston, C., Hubbard, G.P., et al. (2003) Effect of genistein and daidzein on platelet aggregation and monocyte and endothelial function. *Br J Nutr*, 89, pp.607-16.
- Gourdy, P., Mallat, Z., Castano, C., Garmy-Susini, B., et al. (2003) The atheroprotective effect of 17 beta-estradiol is not altered in P-selectin- or ICAM-1-deficient hypercholesterolemic mice. *Atherosclerosis*, 166, pp.41-8.
- Grundy, S.M. (1999) Hypertriglyceridemia, insulin resistance, and the metabolic syndrome. *Am J Cardiol*, 83, pp.25F-29F.
- Haffner, S.M., Lehto, S., Ronnema, T., Pyorala, K., et al. (1998) Mortality from coronary heart disease in subjects with type 2 diabetes and in nondiabetic subjects with and without prior myocardial infarction. *N Engl J Med*, 339, pp.229-34.
- Han, K.K., Soares, J.M., Jr., Haidar, M.A., de Lima, G.R., et al. (2002) Benefits of soy isoflavone therapeutic regimen on menopausal symptoms. *Obstet Gynecol*, 99, pp.389-94.
- Hennig, B., Toborek, M., McClain, C.J. (2001) High-energy diets, fatty acids and endothelial cell function: implications for atherosclerosis. *J Am Coll Nutr*, 20, pp.97-105.
- Hirai, H., Abe, H., Tanaka, K., Takatsu, K., et al. (2003) Gene structure and functional properties of mouse CRTH2, a prostaglandin D2 receptor. *Biochem Biophys Res Commun*, 307, pp.797-802.
- Hodgson, J.M., Puddey, I.B., Beilin, L.J., Mori, T.A., et al. (1998) Supplementation with isoflavonoid phytoestrogens does not alter serum lipid concentrations: a randomized controlled trial in humans. *J Nutr*, 128, pp.728-32.

- Howes, J.B., Sullivan, D., Lai, N., Nestel, P., et al. (2000) The effects of dietary supplementation with isoflavones from red clover on the lipoprotein profiles of post menopausal women with mild to moderate hypercholesterolaemia. *Atherosclerosis*, 152, pp.143-7.
- Hwang, J., Wang, J., Morazzoni, P., Hodis, H.N., et al. (2003) The phytoestrogen equol increases nitric oxide availability by inhibiting superoxide production: an antioxidant mechanism for cell-mediated LDL modification. *Free Radic Biol Med*, 34, pp.1271-82.
- Iafrafi, M.D., Karas, R.H., Aronovitz, M., Kim, S., et al. (1997) Estrogen inhibits the vascular injury response in estrogen receptor alpha-deficient mice. *Nat Med*, 3, pp.545-8.
- Jabs, W.J., Theissing, E., Nitschke, M., Bechtel, J.F., et al. (2003) Local generation of C-reactive protein in diseased coronary artery venous bypass grafts and normal vascular tissue. *Circulation*, 108, pp.1428-31.
- Jacobs, M.N., Dickins, M.Lewis, D.F. (2003) Homology modelling of the nuclear receptors: human oestrogen receptorbeta (hERbeta), the human pregnane-X-receptor (PXR), the Ah receptor (AhR) and the constitutive androstane receptor (CAR) ligand binding domains from the human oestrogen receptor alpha (hERalpha) crystal structure, and the human peroxisome proliferator activated receptor alpha (PPARalpha) ligand binding domain from the human PPARgamma crystal structure. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 84, pp.117-32.
- Jayachandran, M.Miller, V.M. (2003) Human platelets contain estrogen receptor alpha, caveolin-1 and estrogen receptor associated proteins. *Platelets*, 14, pp.75-81.
- Jayagopal, V., Albertazzi, P., Kilpatrick, E.S., Howarth, E.M., et al. (2002) Beneficial effects of soy phytoestrogen intake in postmenopausal women with type 2 diabetes. *Diabetes Care*, 25, pp.1709-14.
- Jenkins, D.J., Kendall, C.W., Connelly, P.W., Jackson, C.J., et al. (2002b) Effects of high- and low-isoflavone (phytoestrogen) soy foods on inflammatory biomarkers and proinflammatory cytokines in middle-aged men and women. *Metabolism*, 51, pp.919-24.
- Jenkins, D.J., Kendall, C.W., Garsetti, M., Rosenberg-Zand, R.S., et al. (2000b) Effect of soy protein foods on low-density lipoprotein oxidation and ex vivo sex hormone receptor activity--a controlled crossover trial. *Metabolism*, 49, pp.537-43.
- Jenkins, D.J., Kendall, C.W., Jackson, C.J., Connelly, P.W., et al. (2002a) Effects of high- and low-isoflavone soyfoods on blood lipids, oxidized LDL, homocysteine, and blood pressure in hyperlipidemic men and women. *Am J Clin Nutr*, 76, pp.365-72.
- Jenkins, D.J., Kendall, C.W., Vidgen, E., Mehling, C.C., et al. (2000c) The effect on serum lipids and oxidized low-density lipoprotein of supplementing self-selected low-fat diets with soluble-fiber, soy, and vegetable protein foods. *Metabolism*, 49, pp.67-72.
- Jenkins, D.J., Kendall, C.W., Vidgen, E., Vuksan, V., et al. (2000a) Effect of soy-based breakfast cereal on blood lipids and oxidized low-density lipoprotein. *Metabolism*, 49, pp.1496-500.
- Johnson, J.L.Jackson, C.L. (2001) Atherosclerotic plaque rupture in the apolipoprotein E knockout mouse. *Atherosclerosis*, 154, pp.399-406.
- Kaamanen, M., Adlercreutz, H., Jauhiainen, M.Tikkanen, M.J. (2003) Accumulation of genistein and lipophilic genistein derivatives in lipoproteins during incubation with human plasma in vitro. *Biochim Biophys Acta*, 1631, pp.147-52.
- Karas, R.H., Schulten, H., Pare, G., Aronovitz, M.J., et al. (2001) Effects of estrogen on the vascular injury response in estrogen receptor alpha, beta (double) knockout mice. *Circ Res*, 89, pp.534-9.
- Kim-Schulze, S., Lowe, W.L., Jr.Schnaper, H.W. (1998) Estrogen stimulates delayed mitogen-activated protein kinase activity in human endothelial cells via an autocrine loop that involves basic fibroblast growth factor. *Circulation*, 98, pp.413-21.
- Kirk, E.A., Sutherland, P., Wang, S.A., Chait, A., et al. (1998) Dietary isoflavones reduce plasma cholesterol and atherosclerosis in C57BL/6 mice but not LDL receptor-deficient mice. *J Nutr*, 128, pp.954-9.
- Kitts, D.D.Weiler, K. (2003) Bioactive proteins and peptides from food sources. Applications of bioprocesses used in isolation and recovery. *Curr Pharm Des*, 9, pp.1309-23.
- Kleinert, H., Wallerath, T., Euchenhofer, C., Ihrig-Biedert, I., et al. (1998) Estrogens increase transcription of the human endothelial NO synthase gene: analysis of the transcription factors involved. *Hypertension*, 31, pp.582-8.
- Kramer, P.R.Wray, S. (2002) 17-Beta-estradiol regulates expression of genes that function in macrophage activation and cholesterol homeostasis. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 81, pp.203-16.
- Kuiper, G.G., Lemmen, J.G., Carlsson, B., Corton, J.C., et al. (1998) Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor beta. *Endocrinology*, 139, pp.4252-63.
- Lamarche, B.Lewis, G.F. (1998) Atherosclerosis prevention for the next decade: risk assessment beyond low density lipoprotein cholesterol. *Can J Cardiol*, 14, pp.841-51.
- Laurent, S., Boutouyrie, P., Asmar, R., Gautier, I., et al. (2001) Aortic stiffness is an independent predictor of all-cause and cardiovascular mortality in hypertensive patients. *Hypertension*, 37, pp.1236-41.
- Leger, C.L., Kadiri-Hassani, N.Descomps, B. (2000) Decreased superoxide anion production in cultured human promonocyte cells (THP-1) due to polyphenol mixtures from olive oil processing wastewaters. *J Agric Food Chem*, 48, pp.5061-7.
- Lemay, A., Dodin, S., Kadri, N., Jacques, H., et al. (2002) Flaxseed dietary supplement versus hormone replacement therapy in hypercholesterolemic menopausal women. *Obstet Gynecol*, 100, pp.495-504.
- Li, G., Chen, Y.F., Greene, G.L., Oparil, S., et al. (1999) Estrogen inhibits vascular smooth muscle cell-dependent adventitial fibroblast migration in vitro. *Circulation*, 100, pp.1639-45.
- Lichtenstein, A.H., Jalbert, S.M., Adlercreutz, H., Goldin, B.R., et al. (2002) Lipoprotein response to diets high in soy or animal protein with and without isoflavones in moderately hypercholesterolemic subjects. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 22, pp.1852-8.
- Mackey, R., Ekanagaki, A.Eden, J.A. (2000) The effects of soy protein in women and men with elevated plasma lipids. *Biofactors*, 12, pp.251-7.



- Makela, S., Savolainen, H., Aavik, E., Myllarniemi, M., et al. (1999) Differentiation between vasculoprotective and uterotrophic effects of ligands with different binding affinities to estrogen receptors alpha and beta. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96, pp.7077-82.
- Marsh, M.M., Walker, V.R., Curtiss, L.K., Banka, C.L. (1999) Protection against atherosclerosis by estrogen is independent of plasma cholesterol levels in LDL receptor-deficient mice. *J Lipid Res*, 40, pp.893-900.
- McCrohon, J.A., Nakhla, S., Jessup, W., Stanley, K.K., et al. (1999) Estrogen and progesterone reduce lipid accumulation in human monocyte-derived macrophages: a sex-specific effect. *Circulation*, 100, pp.2319-25.
- Merz-Demlow, B.E., Duncan, A.M., Wangen, K.E., Xu, X., et al. (2000) Soy isoflavones improve plasma lipids in normocholesterolemic, premenopausal women. *Am J Clin Nutr*, 71, pp.1462-9.
- Mezei, O., Banz, W.J., Steger, R.W., Peluso, M.R., et al. (2003) Soy isoflavones exert antidiabetic and hypolipidemic effects through the PPAR pathways in obese Zucker rats and murine RAW 264.7 cells. *J Nutr*, 133, pp.1238-43.
- Mitchell, H.C. (1974) Effect of estrogens and a progestogen on platelet adhesiveness and aggregation in rabbits. *J Lab Clin Med*, 83, pp.79-89.
- Morito, K., Hirose, T., Kinjo, J., Hirakawa, T., et al. (2001) Interaction of phytoestrogens with estrogen receptors alpha and beta. *Biol Pharm Bull*, 24, pp.351-6.
- Mostafa Mtairag, E., Chollet-Martin, S., Oudghiri, M., Laquay, N., et al. (2001) Effects of interleukin-10 on monocyte/endothelial cell adhesion and MMP-9/TIMP-1 secretion. *Cardiovasc Res*, 49, pp.882-90.
- Mostafa Mtairag, E., Chollet-Martin, S., Oudghiri, M., Laquay, N., et al. (2001) Effects of interleukin-10 on monocyte/endothelial cell adhesion and MMP-9/TIMP-1 secretion. *Cardiovasc Res*, 49, pp.882-90.
- Mukherjee, T.K., Nathan, L., Dinh, H., Reddy, S.T., et al. (2003) 17-epiestriol, an estrogen metabolite, is more potent than estradiol in inhibiting vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1) mRNA expression. *J Biol Chem*, 278, pp.11746-52.
- Nagata, C., Shimizu, H., Takami, R., Hayashi, M., et al. (2003) Soy product intake is inversely associated with serum homocysteine level in premenopausal Japanese women. *J Nutr*, 133, pp.797-800.
- Nakano, Y., Oshima, T., Matsuura, H., Kajiyama, G., et al. (1998) Effect of 17beta-estradiol on inhibition of platelet aggregation in vitro is mediated by an increase in NO synthesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 18, pp.961-7.
- Nakano, Y., Oshima, T., Ozono, R., Ueda, A., et al. (2002) Estrogen replacement suppresses function of thrombin stimulated platelets by inhibiting Ca(2+) influx and raising cyclic adenosine monophosphate. *Cardiovasc Res*, 53, pp.634-41.
- Nakashima, S., Koike, T., Nozawa, Y. (1991) Genistein, a protein tyrosine kinase inhibitor, inhibits thromboxane A2-mediated human platelet responses. *Mol Pharmacol*, 39, pp.475-80.
- Nerbrand, C., Nyberg, P., Nordstrom, L., Samsioe, G. (2002) Effects of a lipid lowering fibrate and hormone replacement therapy on serum lipids and lipoproteins in overweight postmenopausal women with elevated triglycerides. *Maturitas*, 42, pp.55-62.
- Nestel, P.J., Pomeroy, S., Kay, S., Komesaroff, P., et al. (1999) Isoflavones from red clover improve systemic arterial compliance but not plasma lipids in menopausal women. *J Clin Endocrinol Metab*, 84, pp.895-8.
- Nestel, P.J., Yamashita, T., Sasahara, T., Pomeroy, S., et al. (1997) Soy isoflavones improve systemic arterial compliance but not plasma lipids in menopausal and perimenopausal women. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 17, pp.3392-8.
- Okumura, T., Fujioka, Y., Morimoto, S., Tsuboi, S., et al. (2002) Eicosapentaenoic acid improves endothelial function in hypertriglyceridemic subjects despite increased lipid oxidizability. *Am J Med Sci*, 324, pp.247-53.
- Ossewaarde, M.E., Bots, M.L., Bak, A.A., Van Der Schouw, Y.T., et al. (2001) Effect of hormone replacement therapy on lipids in perimenopausal and early postmenopausal women. *Maturitas*, 39, pp.209-16.
- Potier, M., Karl, M., Elliot, S.J., Striker, G.E., et al. (2003) Response to sex hormones differs in atherosclerosis-susceptible and -resistant mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 285, pp.E1237-45.
- Potter, S.M., Baum, J.A., Teng, H., Stillman, R.J., et al. (1998) Soy protein and isoflavones: their effects on blood lipids and bone density in postmenopausal women. *Am J Clin Nutr*, 68, pp.1375S-1379S.
- Puska, P., Korpelainen, V., Hoie, L.H., Skovlund, E., et al. (2002) Soy in hypercholesterolaemia: a double-blind, placebo-controlled trial. *Eur J Clin Nutr*, 56, pp.352-7.
- Radomski, M.W., Palmer, R.M., Moncada, S. (1990) An L-arginine/nitric oxide pathway present in human platelets regulates aggregation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 87, pp.5193-7.
- Rajavashisth, T.B., Liao, J.K., Galis, Z.S., Tripathi, S., et al. (1999) Inflammatory cytokines and oxidized low density lipoproteins increase endothelial cell expression of membrane type 1-matrix metalloproteinase. *J Biol Chem*, 274, pp.11924-9.
- Redberg, R.F., Vogel, R.A., Criqui, M.H., Herrington, D.M., et al. (2003) 34th Bethesda Conference: Task force #3--What is the spectrum of current and emerging techniques for the noninvasive measurement of atherosclerosis? *J Am Coll Cardiol*, 41, pp.1886-98.
- Ridker, P.M., Hennekens, C.H., Buring, J.E., Rifai, N. (2000) C-reactive protein and other markers of inflammation in the prediction of cardiovascular disease in women. *N Engl J Med*, 342, pp.836-43.
- Rimbach, G., Weinberg, P.D., de Pascual-Teresa, S., Alonso, M.G., et al. (2004) Sulfation of genistein alters its antioxidant properties and its effect on platelet aggregation and monocyte and endothelial function. *Biochim Biophys Acta*, 1670, pp.229-37.
- Rosenblat, M., Belinky, P., Vaya, J., Levy, R., et al. (1999) Macrophage enrichment with the isoflavan glabridin inhibits NADPH oxidase-induced cell-mediated oxidation of low density lipoprotein. A possible role for protein kinase C. *J Biol Chem*, 274, pp.13790-9.
- Ross, R. (1993) The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature*, 362, pp.801-9.
- Rossouw, J.E., Anderson, G.L., Prentice, R.L., LaCroix, A.Z., et al. (2002) Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results From the Women's Health Initiative randomized controlled trial. *Jama*, 288, pp.321-33.

- Sacks, F.M., Pfeffer, M.A., Moya, L.A., Rouleau, J.L., et al. (1996) The effect of pravastatin on coronary events after myocardial infarction in patients with average cholesterol levels. *Cholesterol and Recurrent Events Trial investigators. N Engl J Med*, 335, pp.1001-9.
- Salonen, J.T. (2000) Markers of oxidative damage and antioxidant protection: assessment of LDL oxidation. *Free Radic Res*, 33 Suppl, pp.S41-6.
- Samman, S., Lyons Wall, P.M., Chan, G.S., Smith, S.J., et al. (1999) The effect of supplementation with isoflavones on plasma lipids and oxidisability of low density lipoprotein in premenopausal women. *Atherosclerosis*, 147, pp.277-83.
- Sampietro, T., Tuoni, M., Ferdeghini, M., Ciardi, A., et al. (1997) Plasma cholesterol regulates soluble cell adhesion molecule expression in familial hypercholesterolemia. *Circulation*, 96, pp.1381-5.
- Sanders, T.A., Dean, T.S., Grainger, D., Miller, G.J., et al. (2002) Moderate intakes of intact soy protein rich in isoflavones compared with ethanol-extracted soy protein increase HDL but do not influence transforming growth factor beta(1) concentrations and hemostatic risk factors for coronary heart disease in healthy subjects. *Am J Clin Nutr*, 76, pp.373-7.
- Scheiber, M.D., Liu, J.H., Subbiah, M.T., Rebar, R.W., et al. (2001) Dietary inclusion of whole soy foods results in significant reductions in clinical risk factors for osteoporosis and cardiovascular disease in normal postmenopausal women. *Menopause*, 8, pp.384-92.
- Scuro, L.S., Simioni, P.U., Grabriel, D.L., Saviani, E.E., et al. (2004) Suppression of nitric oxide production in mouse macrophages by soybean flavonoids accumulated in response to nitroprusside and fungal elicitation. *BMC Biochem*, 5, pp.5.
- Selles, J., Polini, N., Alvarez, C., Massheimer, V. (2001) Progesterone and 17 beta-estradiol acutely stimulate nitric oxide synthase activity in rat aorta and inhibit platelet aggregation. *Life Sci*, 69, pp.815-27.
- Sheu, F., Lai, H.H., Yen, G.C. (2001) Suppression effect of soy isoflavones on nitric oxide production in RAW 264.7 macrophages. *J Agric Food Chem*, 49, pp.1767-72.
- Shimokado, K., Umezawa, K., Ogata, J. (1995) Tyrosine kinase inhibitors inhibit multiple steps of the cell cycle of vascular smooth muscle cells. *Exp Cell Res*, 220, pp.266-73.
- Shimokado, K., Yokota, T., Umezawa, K., Sasaguri, T., et al. (1994) Protein tyrosine kinase inhibitors inhibit chemotaxis of vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb*, 14, pp.973-81.
- Simons, L.A., von Konigsmark, M., Simons, J., Celermajer, D.S. (2000) Phytoestrogens do not influence lipoprotein levels or endothelial function in healthy, postmenopausal women. *Am J Cardiol*, 85, pp.1297-301.
- Sorenson, R.L., Brelje, T.C., Roth, C. (1994) Effect of tyrosine kinase inhibitors on islets of Langerhans: evidence for tyrosine kinases in the regulation of insulin secretion. *Endocrinology*, 134, pp.1975-8.
- Spyridopoulos, I., Sullivan, A.B., Kearney, M., Isner, J.M., et al. (1997) Estrogen-receptor-mediated inhibition of human endothelial cell apoptosis. Estradiol as a survival factor. *Circulation*, 95, pp.1505-14.
- Squadrito, F., Altavilla, D., Crisafulli, A., Saitta, A., et al. (2003) Effect of genistein on endothelial function in postmenopausal women: a randomized, double-blind, controlled study. *Am J Med*, 114, pp.470-6.
- Squadrito, F., Altavilla, D., Morabito, N., Crisafulli, A., et al. (2002) The effect of the phytoestrogen genistein on plasma nitric oxide concentrations, endothelin-1 levels and endothelium dependent vasodilation in postmenopausal women. *Atherosclerosis*, 163, pp.339-47.
- Stary, H.C., Chandler, A.B., Dinsmore, R.E., Fuster, V., et al. (1995) A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 15, pp.1512-31.
- Stary, H.C., Chandler, A.B., Glagov, S., Guyton, J.R., et al. (1994) A definition of initial, fatty streak, and intermediate lesions of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Arterioscler Thromb*, 14, pp.840-56.
- Steinberg, D., Parthasarathy, S., Carew, T.E., Khoo, J.C., et al. (1989) Beyond cholesterol. Modifications of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity. *N Engl J Med*, 320, pp.915-24.
- Steinberg, D., Witztum, J.L. (2002) Is the oxidative modification hypothesis relevant to human atherosclerosis? Do the antioxidant trials conducted to date refute the hypothesis? *Circulation*, 105, pp.2107-11.
- Steinberg, F.M., Guthrie, N.L., Villablanca, A.C., Kumar, K., et al. (2003) Soy protein with isoflavones has favorable effects on endothelial function that are independent of lipid and antioxidant effects in healthy postmenopausal women. *Am J Clin Nutr*, 78, pp.123-30.
- Sulistyani, St Clair, R.W. (1997) Effect of 17 beta-estradiol on metabolism of acetylated low-density lipoprotein by THP-1 macrophages in culture. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 17, pp.1691-700.
- Sumi, D., Hayashi, T., Matsui-Hirai, H., Jacobs, A.T., et al. (2003) 17beta-estradiol inhibits NADPH oxidase activity through the regulation of p47phox mRNA and protein expression in THP-1 cells. *Biochim Biophys Acta*, 1640, pp.113-8.
- Swain, J.H., Alekel, D.L., Dent, S.B., Peterson, C.T., et al. (2002) Iron indexes and total antioxidant status in response to soy protein intake in perimenopausal women. *Am J Clin Nutr*, 76, pp.165-71.
- Tamir, S., Izrael, S., Vaya, J. (2002) The effect of oxidative stress on ERalpha and ERbeta expression. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 81, pp.327-32.
- Tanus-Santos, J.E., Desai, M., Deak, L.R., Pezzullo, J.C., et al. (2002) Effects of endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms on platelet function, nitric oxide release, and interactions with estradiol. *Pharmacogenetics*, 12, pp.407-13.
- Teede, H.J., Dalais, F.S., Kotsopoulos, D., Liang, Y.L., et al. (2001) Dietary soy has both beneficial and potentially adverse cardiovascular effects: a placebo-controlled study in men and postmenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab*, 86, pp.3053-60.
- Thijs, A., van Baal, W.M., van der Mooren, M.J., Kenemans, P., et al. (2002) Effects of hormone replacement therapy on blood platelets. *Eur J Clin Invest*, 32, pp.613-8.

- Thompson, L.P., Pinkas, G.Weiner, C.P. (2000) Chronic 17beta-estradiol replacement increases nitric oxide-mediated vasodilation of guinea pig coronary microcirculation. *Circulation*, 102, pp.445-51.
- Thompson, L.U., Robb, P., Serraino, M.Cheung, F. (1991) Mammalian lignan production from various foods. *Nutr Cancer*, 16, pp.43-52.
- Tikkanen, M.J.Adlercreutz, H. (2000) Dietary soy-derived isoflavone phytoestrogens. Could they have a role in coronary heart disease prevention? *Biochem Pharmacol*, 60, pp.1-5.
- Tonstad, S., Smerud, K.Hoie, L. (2002) A comparison of the effects of 2 doses of soy protein or casein on serum lipids, serum lipoproteins, and plasma total homocysteine in hypercholesterolemic subjects. *Am J Clin Nutr*, 76, pp.78-84.
- Uesugi, T., Fukui, Y.Yamori, Y. (2002) Beneficial effects of soybean isoflavone supplementation on bone metabolism and serum lipids in postmenopausal Japanese women: a four-week study. *J Am Coll Nutr*, 21, pp.97-102.
- Upmalis, D.H., Lobo, R., Bradley, L., Warren, M., et al. (2000) Vasomotor symptom relief by soy isoflavone extract tablets in postmenopausal women: a multicenter, double-blind, randomized, placebo-controlled study. *Menopause*, 7, pp.236-42.
- Urban, D., Irwin, W., Kirk, M., Markiewicz, M.A., et al. (2001) The effect of isolated soy protein on plasma biomarkers in elderly men with elevated serum prostate specific antigen. *J Urol*, 165, pp.294-300.
- van Baal, W.M., Kenemans, P., van der Mooren, M.J., Kessel, H., et al. (1999) Increased C-reactive protein levels during short-term hormone replacement therapy in healthy postmenopausal women. *Thromb Haemost*, 81, pp.925-8.
- van der Schouw, Y.T., Pijpe, A., Lebrun, C.E., Bots, M.L., et al. (2002) Higher usual dietary intake of phytoestrogens is associated with lower aortic stiffness in postmenopausal women. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 22, pp.1316-22.
- Vanharanta, M., Voutilainen, S., Lakka, T.A., van der Lee, M., et al. (1999) Risk of acute coronary events according to serum concentrations of enterolactone: a prospective population-based case-control study. *Lancet*, 354, pp.2112-5.
- Wagner, A.H., Schroeter, M.R.Hecker, M. (2001) 17beta-estradiol inhibition of NADPH oxidase expression in human endothelial cells. *Faseb J*, 15, pp.2121-30.
- Wagner, J.D., Cefalu, W.T., Anthony, M.S., Litwak, K.N., et al. (1997) Dietary soy protein and estrogen replacement therapy improve cardiovascular risk factors and decrease aortic cholesteryl ester content in ovariectomized cynomolgus monkeys. *Metabolism*, 46, pp.698-705.
- Wagner, J.D., Schwenke, D.C., Greaves, K.A., Zhang, L., et al. (2003) Soy protein with isoflavones, but not an isoflavone-rich supplement, improves arterial low-density lipoprotein metabolism and atherogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 23, pp.2241-6.
- Wang, J.Mazza, G. (2002) Effects of anthocyanins and other phenolic compounds on the production of tumor necrosis factor alpha in LPS/IFN-gamma-activated RAW 264.7 macrophages. *J Agric Food Chem*, 50, pp.4183-9.
- Wangen, K.E., Duncan, A.M., Xu, X.Kurzer, M.S. (2001) Soy isoflavones improve plasma lipids in normocholesterolemic and mildly hypercholesterolemic postmenopausal women. *Am J Clin Nutr*, 73, pp.225-31.
- Washburn, S., Burke, G.L., Morgan, T.Anthony, M. (1999) Effect of soy protein supplementation on serum lipoproteins, blood pressure, and menopausal symptoms in perimenopausal women. *Menopause*, 6, pp.7-13.
- Watanabe, T., Akishita, M., Nakaoka, T., Kozaki, K., et al. (2003) Estrogen receptor beta mediates the inhibitory effect of estradiol on vascular smooth muscle cell proliferation. *Cardiovasc Res*, 59, pp.734-44.
- West, S.G. (2001) Effect of diet on vascular reactivity: an emerging marker for vascular risk. *Curr Atheroscler Rep*, 3, pp.446-55.
- Wilson, P.W., Anderson, K.M.Castelli, W.P. (1991) Twelve-year incidence of coronary heart disease in middle-aged adults during the era of hypertensive therapy: the Framingham offspring study. *Am J Med*, 90, pp.11-6.
- Wiseman, H., O'Reilly, J.D., Adlercreutz, H., Mallet, A.I., et al. (2000) Isoflavone phytoestrogens consumed in soy decrease F(2)-isoprostane concentrations and increase resistance of low-density lipoprotein to oxidation in humans. *Am J Clin Nutr*, 72, pp.395-400.
- Woodman, O.L.Boujaoude, M. (2004) Chronic treatment of male rats with daidzein and 17beta-oestradiol induces the contribution of EDHF to endothelium-dependent relaxation. *Br J Pharmacol*, 141, pp.322-8.
- World Health Statistic Annual (1997-1999).
- You, H.J., Kim, J.Y.Jeong, H.G. (2003) 17 beta-estradiol increases inducible nitric oxide synthase expression in macrophages. *Biochem Biophys Res Commun*, 303, pp.1129-34.
- Zhu, X., Bonet, B., Gillenwater, H.Knopp, R.H. (1999) Opposing effects of estrogen and progestins on LDL oxidation and vascular wall cytotoxicity: implications for atherogenesis. *Proc Soc Exp Biol Med*, 222, pp.214-21.



## Conclusion générale

---

Les phyto-estrogènes sont définis par leur capacité à induire *in vivo* des effets comparables à ceux des estrogènes animaux (test utéroprolifératif et cornification vaginale). Ces effets sont liés à leur capacité à se fixer aux récepteurs des estrogènes, du fait de leur analogie structurale avec ces composés. Ces molécules sont douées d'autres propriétés (dites non génomiques) comparables à celles des molécules de la famille chimique à laquelle ils appartiennent, les composés phénoliques. Les phyto-estrogènes comportent essentiellement les isoflavones, retrouvées en quantité importante dans le soja et les produits dérivés, et les entérolignanes, dont les précurseurs (lignanes) sont présents en plus faible quantité dans nombre d'aliments : fruits, légumes, céréales et graines oléagineuses. D'autres molécules existent comme les coumestanes, qui, présentes essentiellement dans le trèfle et la luzerne, ne font pas partie de l'alimentation humaine mais se retrouvent dans des compléments alimentaires. Les autres phyto-estrogènes (chalcones, isoflavanes...) ont été relativement peu étudiées. Des plantes sont utilisées traditionnellement pour leurs effets potentiellement estrogéniques. *Une meilleure connaissance de leurs effets devrait être recherchée. Si l'on propose au consommateur des mélanges de molécules ou des extraits de plantes non traditionnellement utilisées, leur toxicité devrait être évaluée selon les réglementations en vigueur.*

Différentes techniques d'analyse utilisées dans les produits végétaux ou les produits biologiques humains (sérum, urine...) ont été développées. La technique de référence est la chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse, mais elle est difficilement utilisable pour des études de population. Pour cela ont été élaborées des techniques utilisant des anti-corps comme l'ELISA ou les tests d'immunofluorescence. *Des efforts pour la standardisation de ces méthodes sont encore à réaliser.*

La répartition des phyto-estrogènes dans le monde végétal a jusqu'à maintenant largement conditionné leur consommation humaine : les isoflavones issues du soja et des produits dérivés sont l'apanage des populations asiatiques, avec des apports moyens en isoflavones aglycones allant de 9 à 45 mg/j, alors que dans les pays occidentaux comme en Europe ou aux Etats-Unis, la consommation moyenne n'atteint pas 1 mg/j. Cependant, il existe dans les populations occidentales des groupes de personnes consommant des produits dérivés du soja (essentiellement du tonyu, du tofu et des desserts à base de soja) qui peuvent atteindre, ou même dépasser la consommation asiatique. En France, on a pu évaluer que la consommation moyenne en génistéine et daidzéine hors produits dérivés du soja varie de 9 à 15.6 µg/1000Kcal/j, dans une enquête conduite en 1999. La proportion des consommateurs de produits dérivés du soja était inférieure à 1%, avec un apport moyen de 15 mg/j de génistéine et daidzéine (45 mg/j au 95<sup>ème</sup> percentile). Mais les enquêtes de marché indiquent une forte augmentation, hors même compléments alimentaires. Concernant les lignanes, les apports en lignanes et entérolignanes sont difficiles à estimer étant donné l'ubiquité des lignanes dans les végétaux et l'absence de tables de composition satisfaisantes. Les apports moyens de lignanes sembleraient plus élevés en Europe (autour d'1 mg/j) qu'aux Etats-Unis (< 1mg/j), restent très mal connus en Asie, et apparaissent inférieurs quand ils sont évalués avec les biomarqueurs. *L'élaboration de la table de composition des aliments, complète et précise, en ce qui concerne les isoflavones et plus encore les lignanes paraît nécessaire si l'on veut réellement apprécier la consommation de ces composés dans nos populations.*

Les effets des phyto-estrogènes dans l'organisme humain sont conditionnés par leur biodisponibilité, c'est à dire le passage et la durée de présence dans la circulation sanguine d'une forme active des phyto-estrogènes. En effet, les phyto-estrogènes se retrouvent dans la lumière intestinale majoritairement sous forme de glycosides, mais ne pénètrent dans la circulation sanguine que sous forme d'aglycones. Cette transformation implique des

enzymes entérocytaires mais aussi la flore colique, qui peut en particulier favoriser le métabolisme de la forme aglycone en d'autres métabolites, parfois plus actifs : c'est le cas de la daidzine (glycoside), métabolisée en daidzéine (aglycone) puis en équol. Ce métabolisme varie d'une espèce à l'autre (rat > humain), et d'une population à l'autre (50 à 55 % de producteurs d'équol chez les Asiatiques et 30 à 40 % chez les Occidentaux). Cette capacité à métaboliser les phyto-estrogènes pourrait être modifiée par une alimentation riche en fibres, connue pour influencer la composition de la flore colique. Les aglycones sont métabolisés dans le foie sous forme glycuco-conjuguée, et en partie excrétés dans les fèces sous cette forme. *Des inconnues persistent dans la biodisponibilité des phyto-estrogènes, notamment sur la capacité de la flore colique à modifier leur métabolisme, et leur influence possible dans les différences observées entre les taux circulants chez le rat et l'homme pour un même apport alimentaire.*

Des études de toxicité par administration répétée, de génotoxicité, de carcinogénicité, mais aussi des études portant sur la fertilité, le développement des organes sexuels et leur maturation, ont été conduites le plus souvent chez les rongeurs, plus rarement chez le Chien et le Singe. Les phyto-estrogènes apparaissent généralement dépourvus de toxicité générale mais ils peuvent être génotoxiques ou carcinogènes dans certains modèles animaux et *in vitro*. Les doses utilisées sont plus élevées que celles généralement absorbées par l'Homme. *Mais comme elles conduisent à des concentrations sanguines comparables, des études de toxicité avec des doses plus élevées et selon les conditions réglementaires devraient être entreprises, même si une différence de biodisponibilité ou de métabolisme peut en partie expliquer cette différence. On peut admettre, sur la base de données de toxicité chez le rongeur et majoritairement pour la génistéine, que la limite supérieure de sécurité au delà de laquelle la toxicité potentielle des isoflavones n'est pas suffisamment documentée pour un usage chez l'Homme est de 1mg/kg pc/j.*

Par ailleurs, de façon régulière, une exposition *in utero* ou périnatale est accompagnée de troubles du développement des organes sexuels, de leur maturité et parfois aussi de la fertilité. *L'ensemble des données appellent l'attention sur le risque que pourraient encourir les femmes présentant une tumeur hormono-dépendante et les jeunes enfants exposés in utero ou dans les premiers mois de leur vie à des doses élevées de phyto-estrogènes.*

Les préparations pour nourrissons et les préparations de suite à base de protéines de soja contiennent des quantités élevées d'isoflavones. Ainsi les nourrissons de 4 mois alimentés exclusivement depuis la naissance avec de telles préparations peuvent recevoir de 4 à 9 mg/kg pc/j d'isoflavones. *Au vu de ce qui est exposé plus haut, on se doit de souligner le risque potentiel attaché à la consommation de préparations à base de protéines de soja par les nourrissons et les enfants en bas âge même s'il n'existe pas d'études humaines correspondantes. L'interférence entre la consommation de phyto-estrogènes et le traitement d'enfants hypothyroïdiens qui entraîne une relative inefficacité du traitement est avérée et doit être portée à la connaissance des médecins traitants.* De plus, on observe une tendance à donner aux enfants et quelquefois aux nourrissons des tonyus, soit pour des problèmes d'intolérance au lactose ou d'allergie aux protéines du lait de vache, soit par choix basé sur des convictions non documentées. Les tonyus contiennent des quantités variables mais qui peuvent être importantes d'isoflavones (en moyenne de 0.2 à 22.2 mg/100g). *Ainsi les enfants consommateurs de tonyus et/ou de desserts à base de soja peuvent recevoir des quantités élevées d'isoflavones dépassant 1 mg/ kg pc/j en équivalents aglycone.*

Les études portant sur l'effet des phyto-estrogènes sur l'immunité n'apparaissent pas très concluantes. Elles sont éparpillées et contradictoires, que l'on examine les résultats obtenus *in vivo* chez l'animal, *in vitro* sur cellules humaines et *in vivo* chez l'homme. Il faut noter, de façon accessoire, que le soja qui est l'un des principaux pourvoyeurs de phyto-estrogènes, est un allergène puissant par le biais de certaines de ces protéines notamment la b-conglycinine, l'inhibiteur trypsique Kunitz ou la glycinine

Puisque les phyto-estrogènes se fixent sur les récepteurs  $\alpha$  et  $\beta$  des estrogènes, même si c'est avec une affinité inférieure à celle des ligands spécifiques, notamment en ce qui concerne le récepteur  $\alpha$ , on se devait d'étudier chez l'Homme les effets hormonaux accompagnant soit l'ingestion d'une quantité connue et constante de produits dérivés du soja, soit d'un apport complémentaire en isoflavones. L'effet sur les concentrations hormonales est le plus souvent modeste et dans le sens d'une diminution. Un allongement du cycle menstruel, provenant de l'allongement de la phase folliculaire est régulièrement retrouvé (à une exception près). Enfin une augmentation du métabolisme des estrogènes vers les catéchol-estrogènes non génotoxiques (2-OH) est observée dans certaines études, en particulier après une supplémentation en lignanes. *Ceci confirmerait donc un effet hormonal des phyto-estrogènes, mais qui résulterait plutôt en un effet anti-estrogénique.*

L'intérêt porté aux phyto-estrogènes s'est accru après les interrogations soulevées par le traitement hormonal substitutif (THS). En se basant sur leur analogie structurale avec les estrogènes et en invoquant un effet agoniste suite à la fixation sur le récepteur, on a espéré pouvoir les utiliser en remplacement du THS pour corriger les troubles accompagnant la ménopause, bouffées de chaleur, sécheresse vaginale et ostéoporose sans encourir les risques associés au THS.

Plusieurs études ont donc exploré l'effet d'une supplémentation en phyto-estrogènes sur les troubles accompagnant la ménopause. Sur les bouffées de chaleur et la sécheresse vaginale, les résultats sont peu concluants et si discrets qu'il est souvent difficile de les distinguer de l'effet du placebo. *Des études plus rigoureuses, notamment en double aveugle, seraient nécessaires pour infirmer ou confirmer leur effet.* En ce qui concerne l'ostéoporose, une stabilisation de la diminution, et, dans une étude, une augmentation même, de la densité osseuse ont été observées. Cependant le critère de la densité osseuse ne suffit pas à lui seul à affirmer un effet positif sur le risque d'ostéoporose. *La démonstration d'un effet sur le risque de fracture est nécessaire pour confirmer l'effet favorable des phyto-estrogènes sur l'ostéoporose.* Enfin, s'il existe une suggestion d'amélioration des fonctions cognitives avec un apport d'isoflavones, trop peu d'études l'ont étudiée pour que l'on puisse en tirer une conviction argumentée.

Les études de l'effet des isoflavones sur les fonctions thyroïdiennes montrent qu'elles interfèrent avec la synthèse de T4 et sur sa bioconversion en T3, probablement du fait de leur analogie de structure. Cependant ces effets seraient peu probables dans une situation d'apport normal d'iodure, et le risque apparaît être d'augmenter les besoins en hormones thyroïdiennes chez les patients hypothyroïdiens, comme cela a été bien documenté chez les enfants.

Les études sur les cancers sont dominées par celles portant sur le cancer du sein, les plus nombreuses, utilisant différentes méthodologies, portant sur différentes populations exposées à différents phyto-estrogènes. Celles conduites sur des femmes asiatiques indiquent une réduction de risque associée avec les consommations les plus élevées de produits dérivés du soja. Chez les femmes occidentales, on n'observe pas d'effet, mais la consommation est environ 10 fois plus faible ; de plus leurs habitudes alimentaires s'intègrent le plus souvent dans un profil à risque, et d'autre part ne sont peut-être pas favorables à une biodisponibilité et à un métabolisme optimaux des isoflavones. Les études animales portant sur l'exposition aux isoflavones de rongeurs à l'âge prépubertaire ou adulte confortent les données obtenues chez les femmes asiatiques. Cependant, l'exposition *in utero* ou néo-natale augmente la sensibilité des animaux aux cancérigènes mammaires. Il en va de même chez les femelles ovariectomisées exposées aux isoflavones. Enfin dans les modèles d'implantation de cellules tumorales humaines hormono-dépendantes chez la souris Nude (non immuno-compétente), la prolifération des cellules implantées est augmentée par les isoflavones. Par conséquent, la vigilance s'impose dans ces catégories de population, femmes enceintes pour éviter l'exposition du fœtus, et femmes ayant présenté un cancer du sein hormono-dépendant, qui amène à éviter la consommation d'isoflavones dans ces cas.

Le cancer de la prostate a fait l'objet d'études plus nombreuses chez l'animal que chez l'homme. Elles sont en faveur d'une réduction de risque de ce cancer qui serait expliquée par un effet non génomique, l'inhibition de la 5- $\alpha$ -réductase impliquée dans le métabolisme de la testostérone. Ces observations sont à confirmer par de nouvelles études épidémiologiques.

Il en va de même pour les cancers de l'endomètre et de la thyroïde, pour lesquels une réduction de risque est suggérée, et pour les cancers du côlon, de l'ovaire et du testicule pour lesquels les études sont tout à fait insuffisantes. Il faut préciser cependant, en liaison avec les phénomènes observés sur le développement et la maturation des organes génitaux chez les animaux exposés *in utero* et en périnatalité que certaines de ces anomalies (hypospadias) constituent un facteur de risque de cancer du testicule.

On a pensé réduire le risque cardiovasculaire qui accompagne la ménopause par l'utilisation d'un apport complémentaire de phyto-estrogènes, ce traitement pouvant s'étendre à toute personne à risque pour ces pathologies. En réalité, s'il existe un effet favorable sur plusieurs marqueurs du risque cardio-vasculaire (cholestérol HDL et LDL, mais pas triglycérides), ceci est dû à la protéine de soja (à partir de la dose de 33 g/j), et non aux isoflavones. Celles-ci auraient uniquement un effet bénéfique sur la vaso-motricité aux doses égales ou supérieures à 45mg/j de génistéine. Cependant, on a montré un effet pro-inflammatoire à la dose de 73mg/j. Les données sur l'insulinémie et l'insulino-résistance ne sont pas concluantes. Les lignanes apparaissent capables de réduire les marqueurs du syndrome métabolique, notamment la triglycémie, mais ces résultats se fondent sur un nombre d'études épidémiologiques insuffisant. Il n'existe pas d'études cliniques pour conclure à un effet favorable des lignanes sur l'insulinémie et l'insulino-résistance.

Ainsi, les études portant sur les maladies cardio-vasculaires et les cancers ne semblent pas retrouver les risques associés au THS dans le cas de consommation d'isoflavones. On pourrait dire que dans l'état actuel des connaissances, les isoflavones ne paraissent associés ni aux bénéfiques (confort climatérique, ostéoporose) ni aux risques (maladies cardio-vasculaires, cancers) du THS. Notons cependant que, sauf dans le cas du cancer du sein, les études n'ont pas été aussi nombreuses et ont porté sur des effectifs plus réduits, et que les études expérimentales indiquent des risques pour certaines catégories de population (voir plus bas recommandations de santé publique).

#### **Les résultats de l'ensemble de ces études nous amènent à formuler des recommandations générales :**

- **de recherche** (caractérisation des molécules, standardisation des méthodes analytiques, tables de composition et études de consommation, études de toxicité plus larges, études épidémiologiques pour l'étude des relations avec les pathologies et/ou suivi des femmes consommant déjà des compléments alimentaires sous contrôle des prescripteurs, des études cliniques pour confirmer le risque d'effet pro-inflammatoire) ;
- **de santé publique** qui porteront sur :
  - *la prise en compte de la limite au delà de laquelle des phénomènes de toxicité pourraient apparaître chez l'Homme et qui s'élève à 1mg/kg pc/j d'aglycones pour les isoflavones Ceci est un choix résultant de l'état actuel des connaissances sur la seule génistéine et qui peut changer avec l'évolution des connaissances*
  - *les risques associés à l'exposition in utero aux phyto-estrogènes, et les risques associés à l'exposition des nourrissons et des enfants en bas âge*



*aux préparations à base de protéines de soja dont la concentration est élevée en isoflavones alors qu'elle devrait être inférieure à 1 mg/L de préparation reconstituée en équivalents aglycone<sup>46</sup>, soit environ 0.15mg/kg pc. Ces risques basés sur l'expérimentation animale portent sur la sensibilité aux carcinogènes et sur la maturation du système de reproduction avec malformations entraînant outre une altération de la fertilité, des anomalies facteurs de risque de cancer du testicule chez le jeune mâle et d'adénocarcinomes utérins chez la jeune femelle.*

- *l'effet antagoniste des phyto-estrogènes vis à vis du traitement des enfants hypothyroïdiens*
- *l'insuffisance actuelle de faits scientifiques étayant un bénéfice associé à l'apport de compléments de phyto-estrogènes, alors qu'un profil alimentaire riche en produits végétaux, pouvant inclure des produits dérivés du soja non sucrés et en quantité modérée (1 à 2 produits par jour chez l'adulte), reste la meilleure prévention nutritionnelle vis à vis des maladies chroniques dégénératives.*
- *le risque de prolifération et de croissance tumorale chez des femmes ayant présenté des antécédents personnels ou familiaux de cancer du sein.*
- **d'information du consommateur**, qui doit pouvoir connaître le contenu en isoflavones des produits qu'il achète, et notamment des compléments alimentaires et des laits pour nourrissons et de suite, par un étiquetage adéquat.

Aussi, il est recommandé que les produits alimentaires contenant des phyto-estrogènes soient étiquetés de la façon suivante :

- *Aliments à base de soja (tonyu, miso, tofu, « yaourts » et desserts au soja) :*

Contient Xmg d'isoflavones (famille des phyto-estrogènes). A consommer avec modération (limiter la consommation quotidienne à 1mg/kg poids corporel). Déconseillé aux enfants de moins de 3 ans.

- *Compléments alimentaires (phyto-estrogènes purs ou extraits de plante en contenant) et aliments enrichis :*

Contient Xmg de [molécule (s) concernée (s)]\* (famille des phyto-estrogènes). Ne pas dépasser 1mg/kg poids et par jour. Déconseillé aux femmes ayant des antécédents personnels ou familiaux de cancer du sein. Parlez-en à votre médecin.

\* isoflavones et/ou isoflavanes et/ou coumestanes et/ou flavanones et/ou chalcones et/ou entérolignanes.

---

<sup>46</sup> Ce qui peut se traduire par unité de poids corporel de la façon suivante : à 4 mois, un enfant de 5 à 6 kg consommant 800 mL de la solution à 1 mg/L ingérera 0,8 mg/poids, soit 0.14 mg/kg pc/j



# Ensemble des points clés et recommandations pour les phyto-estrogènes de l'alimentation

## Répertoire des phyto-estrogènes

### Points clés

- ❖ La notion de phyto-estrogènes qui est retenue dans ce répertoire est avant tout fonctionnelle. L'activité estrogénique doit être démontrée *in vivo* (utéroprolifération et cornification vaginale) et aussi *in vitro* pour des concentrations acceptables (de l'ordre de 1000 fois celles de l'estradiol, et jamais supérieures à 10 000).
- ❖ Les phyto-estrogènes appartiennent à la classe des polyphénols. Les molécules retenues selon nos critères sont des isoflavones, isoflavanes, coumestanes, flavanones, chalcones, stilbènes et entérolignanes (dont les précurseurs sont des lignanes).
- ❖ Le répertoire des plantes retient celles dont un ou des extraits particuliers possèdent un effet estrogénique au sens des critères de sélection définis.
- ❖ Les plantes réputées estrogéniques qui n'ont pas démontré cet effet sont également citées pour mémoire.
- ❖ Finalement, une vingtaine de molécules ont été retenues ainsi qu'une dizaine de plantes qui sont une source significative de phyto-estrogènes.

### Recommandations

#### 1 - Recommandations à visée de connaissance et de recherche

- ❖ La démonstration des propriétés estrogéniques *in vitro* doit être confirmée par des tests *in vivo* pour les molécules et les plantes non retenues dans ce rapport :
  - les molécules polyphénoliques de type flavones, flavanones, chalcones...
  - les molécules telles que stilbènes, anthraquinones, terpènes, phytostérols, ...
  - les plantes et extraits traditionnellement réputés pour une activité estrogénique
- ❖ La recherche des mécanismes d'action doit être poursuivie ainsi que l'identification des principes actifs.

#### 2- Recommandations de Santé Publique

- ❖ Les extraits non traditionnels devront faire preuve d'une absence de toxicité.

#### 3- Recommandations à visée d'information du consommateur.

- ❖ L'étiquetage doit préciser la teneur en phyto-estrogènes, exprimée en équivalents aglycone, notamment sur les aliments à base de soja et les compléments alimentaires. Ceci signifie un contrôle des doses par les industriels à chaque fabrication avec un nouveau lot de soja.
- ❖ Une standardisation des extraits permettra au consommateur de comparer les produits entre eux.

## Techniques d'analyse des phyto-estrogènes

### Points clés

- ❖ Si les principales techniques de chimie analytique sont susceptibles d'être appliquées aux phyto-estrogènes, le choix doit être fonction du but recherché. La détection dans l'ultra-violet (avec ou sans barrette de diodes) en sortie d'HPLC convient parfaitement pour l'analyse des produits à base de soja. La sensibilité de la détection électrochimique permet d'analyser aglycones, glucuronides et sulfates de phyto-estrogènes dans les fluides biologiques. La spectrométrie de masse, associée à la chromatographie liquide ou gazeuse, est particulièrement adaptée à la mise en évidence et à l'identification de nouvelles structures. Enfin, le faible coût et la sensibilité des techniques immunologiques permettent d'envisager des analyses à haut débit.

- ❖ Pour la quantification, la technique la plus utilisée à ce jour est l'HPLC-MS malgré un coût élevé et une utilisation en routine délicate. La GC-MS a également fait ses preuves et les méthodes immunologiques se développent progressivement.
- ❖ Les techniques chromatographiques permettent la quantification de plusieurs composés à la fois alors que les techniques immunologiques sont spécifiques d'un seul composé.
- ❖ La préparation des échantillons avant dosage est une étape clé. Elle peut influencer le résultat qualitatif et quantitatif concernant la composition des mélanges en molécules glycosylées (formes acétylées, malonylées, glucosylées). Les formes potentiellement actives sont les formes aglycones.

## Recommandations

### 1 - Recommandations à visée de connaissance et de recherche

Il s'avère nécessaire :

- ❖ De standardiser les méthodes d'analyses et les méthodes de préparations des échantillons. En outre, il faudrait développer des méthodes d'analyses simples, rapides, fiables, sensibles et peu onéreuses pour permettre leur utilisation systématique dans les études cliniques.
- ❖ De favoriser le développement des méthodes sensibles de dosage des entérolignanes dans les fluides biologiques.

### 2 - Recommandations de santé publique

Dans les préparations alimentaires, le dosage des isoflavones doit être exprimé en équivalents aglycones, compte tenu de l'instabilité des formes glycosylées et du fait que ce sont les aglycones qui franchissent la barrière intestinale. Ceci permettrait de mieux appréhender l'exposition de l'Homme.

Pour l'évaluation scientifique des produits, il sera nécessaire de mentionner l'origine des données portées sur les préparations (nom ou numéro d'accréditation du laboratoire d'analyse, méthode employée).

### 3 - Recommandations à visée d'information du consommateur

L'étiquetage doit préciser la teneur en phyto-estrogènes, exprimée en équivalents aglycones, notamment sur les aliments à base de soja et les compléments alimentaires. Ceci signifie un contrôle des doses par les industriels à chaque fabrication avec un nouveau lot de soja.

## Estimation des apports en phyto-estrogènes dans la population française

### Points clés

- ❖ Par manque de données, il existe une incertitude quantitative sur le contenu des **aliments** en phyto-estrogènes et une grande variation saisonnière et locale. Une table de composition en isoflavones (équivalents aglycones de la daidzéine et de la génistéine) des aliments consommés en France a toutefois pu être initiée dans ce rapport.
- ❖ Globalement, une alimentation asiatique traditionnelle riche en soja peut être plus de 100 fois plus riche en isoflavones qu'une alimentation occidentale typique. Grâce au développement récent des tables de composition alimentaires en isoflavones, des apports moyens en isoflavones aglycones ont pu être estimés dans diverses populations : 45 mg/j au Japon, 9-35 mg/j dans les autres pays asiatiques et 0-2 mg/j dans les pays occidentaux comme en Europe ou aux Etats-Unis.
- ❖ Tels que nous avons pu les estimer grâce aux données de l'étude INCA 1999, les apports en génistéine et daïdezéine dans la population française chez les non consommateurs de soja, sont de 0,026 mg/j en moyenne (écart-type : 0,024 mg/j) chez les adultes.
- ❖ Dans les pays occidentaux, chez les consommateurs ayant un comportement alimentaire particulier (végétariens, consommateurs de soja, populations définies par un comportement alimentaire dit « sain », consommateurs de compléments en isoflavones de soja), la consommation en isoflavones peut atteindre voire dépasser les apports observés dans les populations asiatiques.

- ❖ Les apports en **précurseurs des entérolignanes** proviennent d'aliments très divers (céréales, légumes, fruits) et sont beaucoup moins connus que les apports en isoflavones. Selon les premières estimations, les apports atteindraient une moyenne de 1 mg/jour dans des populations occidentales mais sont probablement sous-évalués et très contrastés selon les populations.
- ❖ Depuis 1998, le marché des **compléments alimentaires** en isoflavones de soja s'est fortement amplifié en France et représente le troisième segment des compléments alimentaires. Il a pour cible essentiellement la ménopause et tous les phénomènes qui lui sont associés. On observe une tendance à l'augmentation des dosages.

## Recommandations

### 1 - Recommandations à visée de connaissance et de recherche

- ❖ Il apparaît nécessaire de réaliser des études pour améliorer les tables de composition des aliments en phyto-estrogènes, en particulier en isoflavones et en lignanes.
- ❖ Etablir plus clairement une liste des aliments à base de soja les plus utilisés ou les extraits végétaux susceptibles de rentrer dans les compléments alimentaires (sauge, réglisse, ...).
- ❖ Inclure une gamme plus large d'aliments à base de soja dans les questionnaires des études de consommation.
- ❖ Dans les publications, préciser le dosage réalisé et la forme sous laquelle les phyto-estrogènes et en particulier les isoflavones sont exprimés.

### 2- Recommandations de Santé Publique

- ❖ Les aliments non sucrés à base de soja présentent un intérêt nutritionnel puisqu'ils sont une bonne source de protéines végétales sans graisses saturées. Dans cette perspective, il faut dissocier les aliments courants à base de soja, des préparations pour nourrissons et des préparations de suite à base de protéines de soja et des compléments alimentaires riches en extraits concentrés.

### 3- Recommandations à visée d'information du consommateur.

- ❖ Une information rigoureuse appuyée sur des données scientifiques doit avertir le consommateur que les aliments à base de soja contiennent des isoflavones, qui sont potentiellement actives (effets indésirables ou bénéfiques).
- ❖ En ce sens, les consommateurs devraient éviter de cumuler les sources de phyto-estrogènes : par exemple aliments dérivés du soja et compléments alimentaires, ou compléments alimentaires composés de plusieurs types de phyto-estrogènes (isoflavones, coumestanes, ...), en particulier si les apports totaux en phyto-estrogènes ne sont pas précisés.
- ❖ L'étiquetage doit préciser la teneur en phyto-estrogènes, exprimée en équivalents aglycones, notamment sur les aliments à base de soja et les compléments alimentaires. Ceci signifie un contrôle des doses par les industriels à chaque fabrication avec un nouveau lot de soja.

## Biodisponibilité des phyto-estrogènes

### Points clés

- ❖ L'étude de la biodisponibilité des phyto-estrogènes en est encore à ses balbutiements. Pour les isoflavones, les techniques de quantification que nous possédons aujourd'hui, et qu'il faudrait standardiser (voir chapitre « méthodes analytiques »), ont permis de définir certains des paramètres pharmacocinétiques. Pour les autres molécules, les données chez l'Homme manquent encore.
- ❖ Il existe une grande variabilité interindividuelle dans la biodisponibilité des phyto-estrogènes et ce, au sein d'une même étude.
- ❖ Certains sujets sont équal producteurs, d'autres non.
- ❖ Les isoflavones circulent essentiellement sous forme de glucuro ou de sulfo conjugués. Cette réalité n'est pas prise en compte dans l'immense majorité des études *in vitro*.

- ❖ La biodisponibilité est différente entre animaux et humains, et doit être prise en compte dans les études *in vitro* ou chez l'animal. Il faut prévoir une ingestion de 10 mg/kg pc/j d'isoflavones aglycones chez un rat pour observer des concentrations plasmatiques de 1 µM toutes formes confondues (glucuronides, sulfates, aglycones).
- ❖ Les concentrations urinaires peuvent être utilisées en tant que reflet de l'ingéré, sauf dans le cas des apports élevés.
- ❖ Sur le fondement des données actuelles, chez l'Homme, l'apport de 1 mg/kg de poids corporel (pc)/j d'isoflavones aglycones conduit à une concentration plasmatique d'isoflavones aglycones d'environ 1µM. La concentration plasmatique maximale en isoflavones aglycones est obtenue 4 à 6 heures après ingestion.
- ❖ La majorité des modèles de laboratoire : rat, souris, porc, singe, hamster sont des producteurs d'équol. L'équol étant un composé actif, il faut en tenir compte dans les essais de transposition à l'Homme qui lui n'est pas systématiquement un producteur d'équol.
- ❖ Les données plasmatiques disponibles à ce jour semblent indiquer une différence de concentrations entre Asiatiques et Occidentaux pour des ingestions identiques répétées de manière chronique.

## **Recommandations**

### **1 - Recommandations à visée de connaissance et de recherche**

- ❖ Mettre au point et standardiser des techniques d'analyses sensibles et fiables pour tous les phyto-estrogènes. Le choix de ces techniques immunologiques ou physico-chimiques doit dépendre des objectifs que l'on cherche à atteindre ;
- ❖ Vérifier la qualité des composés présents dans le compartiment sanguin et lymphatique (glucuronides, sulfates, méthyl ...)
- ❖ Tester les formes circulantes (glucuronides, sulfates, méthyl ...) *in vitro* et travailler en mélanges physiologiques ;
- ❖ Analyser de manière comparable la biodisponibilité des phyto-estrogènes chez les consommateurs asiatiques et occidentaux si l'on veut extrapoler les données obtenues en Asie aux pays européens.

### **2 - Recommandations liées de santé publique**

- ❖ Reconnaître la difficulté de prédire l'efficacité d'un apport alimentaire par les phyto-estrogènes, étant donné la variabilité des facteurs de biodisponibilité ;
- ❖ Si la prise d'isoflavones sous forme aglycone diminue les facteurs de variabilité, elle impose des précautions d'emploi (voir le chapitre sécurité) ;
- ❖ Il n'est pas possible de conseiller une prise régulière de phyto-estrogènes sans prendre en compte la variabilité inter-individuelle qui existe chez les sujets humains (production d'équol entre autre). On doit donc encourager des recherches sur les facteurs de variabilité interindividuelle dans les populations occidentales. En tout état de cause, l'utilisation systématique de ces composés ne peut s'envisager que lorsque l'on aura des données précises sur ces facteurs de variabilité ;
- ❖ Dans le cas d'interactions avec certaines pathologies ces dosages plasmatiques pourraient permettre d'identifier les patients prenant des phyto-estrogènes en connaissance de cause ou à leur insu ;
- ❖ D'éventuels essais thérapeutiques avec des phyto-estrogènes devront prendre en compte la variabilité métabolique des patients (et par exemple le fait qu'ils soient ou non producteurs d'équol).

### **3 - Recommandations à visée d'information du consommateur**

- ❖ L'étiquetage doit préciser la teneur en phyto-estrogènes, exprimée en équivalents aglycone, notamment dans les aliments à base de soja et les compléments alimentaires. Ceci signifie un contrôle des doses par les industriels à chaque fabrication avec un nouveau lot de soja.
- ❖ Imposer une mention claire en équivalents aglycones (fraction active des phyto-estrogènes) sur les compléments alimentaires.

## Sécurité des phyto-estrogènes

### Points clés

- ❖ Il convient de souligner que la grande majorité des études qui ont fait l'objet d'un commentaire dans ce chapitre « Toxicité » concerne la génistéine et, à un degré sensiblement moindre, la daidzéine et le coumestrol.
- ❖ Les différences inter-espèces relatives au **métabolisme** des phyto-estrogènes et à la production d'équol en particulier, constituent un sujet d'interrogation quant au degré d'extrapolation des résultats observés chez le rongeur par rapport à l'Homme.
- ❖ Les études de **toxicité par administration unique ou répétée**, qui recouvrent essentiellement la génistéine, n'ont pas mis en évidence de toxicité particulière. L'utilisation traditionnelle du soja dans les populations asiatiques, qui ne concerne pas les nourrissons, ne peut toutefois, à elle seule, servir de garantie à la sécurité des phyto-estrogènes tant est grande la diversité de ces composés.
- ❖ Le **profil génotoxique** de la génistéine n'est pas sensiblement différent de celui qui a été observé avec l'estradiol. Celui de la daidzéine est moins superposable, des effets anti-mutagènes ayant même été rapportés. Le coumestrol, la glycitéine, et la biochanine A ont également été étudiés ainsi que quatre métabolites de la daidzéine dont l'équol. Des effets génotoxiques dose-dépendants ont été observés dans ce cas, à partir d'un test *in vitro* (lymphome souris). De tels effets ne sont pas confirmés chez des sujets malades (cancer de la prostate) recevant 300 à 600 mg/j de génistéine, daidzéine ou glycitéine pendant au moins 28 jours.
- ❖ L'existence, notamment, d'effet ambivalent de type estrogénique ou anti-estrogénique conduit à s'interroger sur les risques de consommation des phyto-estrogènes dans des situations physiopathologiques particulières comme l'existence de **tumeurs hormono-sensibles** ou d'antécédents familiaux de cette nature. Des traitements concomitants à visée hormonale peuvent également interagir avec la prise de phyto-estrogènes, comme cela a été montré tant *in vitro* qu'*in vivo* avec le tamoxifène.
- ❖ Les périodes **néo-natale et pré-pubertaire** pour lesquelles les effets délétères des phyto-estrogènes sur le développement et la maturation des organes sexuels sont les plus fréquemment rapportés constituent, les périodes sensibles de risque lié à une consommation excessive de phyto-estrogènes. Cette remarque s'applique tout particulièrement aux préparations pour nourrissons à base de protéines de soja contenant des isoflavones.
- ❖ Les **interactions** potentielles entre phyto-estrogènes et hormones thyroïdiennes sont un autre motif d'interrogation qui doit justifier d'une attention toute particulière chez des sujets qui présenteraient des troubles de la fonction thyroïdienne.  
D'une façon générale, la notion d'interaction entre phyto-estrogènes et traitements hormonaux n'est pas suffisamment documentée et le risque d'exacerbation ou de neutralisation de traitements concomitants doit faire l'objet d'études plus approfondies.
- ❖ Il ne peut être exclu qu'une consommation élevée de phyto-estrogènes, notamment de composés « actifs » isolés ou associés à des doses ou dans des proportions différentes de celles de la matrice végétale naturelle, puisse être à l'origine d'effets indésirables. Cette remarque s'applique en particulier à des populations dites « à risque » (nourrissons, femmes enceintes, sujets avec troubles thyroïdiens ou tumeurs hormono-sensibles).

### Recommandations

#### 1- Recommandations à visée de connaissance et de recherche

##### **Toxicité générale :**

- ❖ il est nécessaire de développer des études conformes aux « recommandations médicament », comprenant 3 doses dont la plus élevée entraîne une symptomatologie du même type que celle que l'on peut observer chez le rat avec l'estradiol après 90 jours d'exposition à 0.05, 2.5, 10 et 50 ppm de régime. Cela permettrait de mieux situer la toxicité d'un phyto-estrogène (génistéine par exemple) par rapport à un estrogène largement utilisé par ailleurs et éventuellement d'établir un profil toxique parallèle.

- ❖ il serait bon d'envisager des études des ces molécules à faibles doses, à l'image de ce qui est entrepris pour les xéno-estrogènes puisque plusieurs expériences mentionnent des effets marqués aux faibles doses qui ne sont pas ou moins retrouvés aux fortes doses
- ❖ il convient de disposer d'études d'une durée de 6 mois, au moins sur une espèce dont le métabolisme est le plus proche de celui de l'Homme, puisque la durée des études devrait prendre en compte le fait que ces phyto-estrogènes sont destinés à être « consommés » pendant de longues périodes de la vie. Dans ces conditions, on estime que le rat n'est pas le modèle le plus pertinent pour des raisons **métaboliques**. Des études de toxicocinétique (TK) devront impérativement être menées pour relier symptomatologie clinique et les modifications des paramètres hémato-biochimiques ou histologiques au degré de l'exposition sanguine.
- ❖ Compte tenu des particularités métaboliques du Rat chez lequel le plus grand nombre d'études ont été réalisées et de l'existence de sujets « équol-producteurs » chez l'Homme, il conviendrait de mieux documenter la toxicité potentielle de ce métabolite. D'autres métabolites pourraient être considérés au cas par cas par ces approches.

### **Effets hormonaux**

- ❖ Prendre en considération les effets hormonaux multiples (anti-estrogénique, thyroïdiens...) et les risques d'interaction entre phyto-estrogènes et médicaments (antithyroïdiens, tamoxifène ou équivalent...)

## **2- Recommandations de santé publique :**

### ***Données historiques de consommation.***

On ne saurait les remettre en cause en l'absence d'effets délétères spécifiques rapportés. Toutefois, il convient de rester vigilant quant aux extrapolations qui en seraient faites sur la consommation de compléments alimentaires : totum végétal contre produits purifiés et concentrés, « actifs » produits par synthèse, proportion de molécules actives différentes de celle des produits naturels, associations « potentialisatrices »

### ***Toxicité générale***

En l'état actuel des connaissances, l'apport quotidien d'1mg/kg/pc d'aglycone d'isoflavones peut être considéré comme la dose limite administrable à l'Homme ayant fait l'objet d'études de sécurité chez l'animal conduisant à une dose sans effet indésirable. Ces données concernent plus spécifiquement la génistéine.

Il appartient donc aux industriels qui souhaiteraient aller au delà de cette dose quotidienne d'isoflavones ou mettre sur le marché des associations « originales », d'apporter la preuve de l'innocuité de leur produit dans les conditions d'utilisation préconisées.

### ***Génotoxicité***

Il convient de reconsidérer toute donnée de ce type pour des composés issus d'un procédé de synthèse pouvant générer des impuretés de synthèse ou de dégradation ainsi que pour les produits d'extraction mettant en oeuvre des solvants susceptibles de se retrouver à l'état de trace en tant que résidus.

### ***Carcinogénicité***

Les études animales montrent que les isoflavones peuvent favoriser la prolifération et la croissance de tumeurs mammaires hormonodépendantes, suggérant un risque potentiel pour les personnes ayant des antécédents personnels ou familiaux de cancers du sein hormonodépendants.

### ***Maturation des organes sexuels***

Les études animales montrent que les phases précoces du développement des organes sexuels (pendant la gestation et la lactation) sont particulièrement sensibles à l'exposition aux phyto-estrogènes. Des anomalies morphologiques pouvant entraîner une diminution de la fertilité mais aussi une plus grande sensibilité aux carcinogènes sont observées. Une précaution importante apparaît donc d'éviter chez la femme enceinte et allaitante une consommation élevée d'isoflavones, notamment sous la forme de compléments alimentaires. De même, la consommation de produits à base de soja chez le nourrisson (préparations à base de protéines de soja, puis préparations de suite) et l'enfant en bas âge (tonyus, yaourts au soja) est à éviter.

### ***Interactions hormonales***

L'interaction des phyto-estrogènes avec la synthèse des hormones thyroïdiennes impose l'exclusion de leur consommation sous quelle que forme que ce soit par les sujets hypothyroïdiens traités ou non traités

Il existe aussi des risques d'interaction avec d'autres traitements hormonaux (par ex : tamoxifène) pouvant exacerber ou neutraliser ces traitements. La consommation de phyto-estrogènes devrait être également évitée dans ces situations.



## Mécanismes moléculaires et cellulaires des estrogènes et des phyto-estrogènes

### Points clés

- ❖ Les estrogènes agissent sur leurs tissus-cibles principalement par l'intermédiaire de 2 protéines nucléaires appelées récepteurs  $\alpha$  et  $\beta$  des estrogènes. Ces derniers présentent :
  - un domaine de liaison à l'ADN très voisin (94% d'homologie) ;
  - un domaine de liaison à l'hormone d'homologie plus faible (50%) ;
  - des domaines de régulation transcriptionnelle très différents (~17% d'homologie), ce qui laisse supposer des fonctions biologiques différentes pour les deux types de récepteur aux estrogènes.
- ❖ Pour qu'il existe un effet estrogénique :
  - le dimère estradiol-récepteur des estrogènes fixé sur l'ADN doit aussi lier d'autres protéines nucléaires, appelées co-activateurs, nécessaires à la régulation de la transcription des gènes ;
  - en cas de liaison du récepteur des estrogènes par une molécule antagoniste telle que le tamoxifène, ce sont des co-inhibiteurs qui seront liés par le récepteur des estrogènes, empêchant ainsi l'activité estrogénique.
- ❖ Les estrogènes peuvent avoir d'autres effets dits non génomiques situés pour partie au niveau de la membrane cytoplasmique. Par cette voie, les estrogènes pourraient avoir des effets sur la voie métabolique de plusieurs familles de facteur de croissance en interférant en particulier avec le complexe AP1.
- ❖ Les modulateurs des récepteurs des estrogènes (SERM) sont capables d'avoir des effets estrogéniques ou antiestrogéniques selon le tissu, et dans le même tissu en fonction du gène considéré. Leur structure biochimique influe aussi beaucoup sur leurs effets biologiques.
- ❖ Les isoflavones peuvent être considérés comme des SERM naturels qui lient les récepteurs des estrogènes avec une faible affinité. Ils sont en général plus affins pour le récepteur  $\alpha$ . Leur fonctionnalité est plus dans le sens d'un effet estrogénique dans beaucoup de tissus. Cependant ils semblent diminuer la biosynthèse des estrogènes. L'effet global pourrait donc être un effet estrogénique faible.
- ❖ Les isoflavones peuvent avoir d'autres fonctions biologiques telles que, par exemple, celles d'être inhibiteur de la fonction tyrosine kinase de certains récepteurs membranaires de facteurs de croissance ou d'avoir des propriétés anti-oxydantes. Ces effets biologiques semblent chacun optimal pour des concentrations différentes du produit utilisé, ce qui rend particulièrement délicat leur évaluation en clinique.

### Les points obscurs

- ❖ Les isoflavones ont *in vitro* des effets biologiques indéniables mais extrêmement polymorphes qui sont parfois très éloignés d'un effet agoniste ou antagoniste des estrogènes, et ces effets diffèrent selon l'isoflavone considéré. *In vivo*, les études concernent des mélanges de phytoestrogènes sous forme active et/ou inactive qui rendent quasi impossible leur interprétation. L'ingestion quotidienne d'une quantité de flavonoïdes plus ou moins importante rend difficile l'appréciation de l'utilité d'un rajout, si important soit-il.

## Recommandations

### 1- Recommandations à visée de connaissance et de recherche

Développer des études cliniques utilisant des produits purs, sans association, avec des marqueurs de réponses biologiques fiables afin de juger, dans un premier temps, sur des critères objectifs de l'impact que peuvent avoir ces produits sur l'organisme. Ces études d'efficacité devraient être suivies d'études cliniques recherchant les effets bénéfiques escomptés aux doses efficaces démontrées et les potentiels effets délétères des doses élevées.

## Phyto-estrogènes et préparations pour nourrissons et préparations de suite à base de protéines de soja

### Points clés

- ❖ Les préparations pour nourrissons et les préparations de suite à base de protéines de soja (PPS) actuellement commercialisées contiennent des quantités élevées d'isoflavones (18 à 47 mg/L de préparation reconstituée), principalement sous forme de génistéine et de daidzéine. De ce fait, les nourrissons alimentés de façon exclusive avec ces préparations constituent le sous-groupe de la population actuellement exposé aux doses les plus élevées de phyto-estrogènes.
- ❖ De nombreux travaux expérimentaux montrent que les phyto-estrogènes ont des effets sur le développement et le fonctionnement neuro-endocrinien et immunitaire dans différentes espèces animales. Cependant, malgré la forte exposition et les concentrations plasmatiques rapportées chez les nourrissons et enfants alimentés de façon prolongée avec des préparations à base de soja, il n'a pas été observé jusqu'à présent de troubles particuliers de la croissance et du développement endocrinien. Toutefois, on ne dispose pas d'étude à long terme portant notamment sur la fertilité.

### Recommandations

#### 1 - Recommandations à visée de connaissance et de recherche

- ❖ Des études sont nécessaires non seulement pour contrôler l'état hormonal des nourrissons alimentés avec des PPS, mais aussi pour apprécier leur développement à long terme : croissance, puberté. Des études approfondies, cliniques et biologiques devraient être entreprises pour apprécier l'état neuro-endocrinien, la fertilité, la qualité du sperme des adultes qui ont reçu des PPS au cours des premiers mois de leur vie.
- ❖ Des études analytiques devraient être entreprises sur le contenu en phyto-estrogènes des préparations pour nourrissons et des préparations de suite à base de protéines de lait de vache, compte-tenu de l'évolution des pratiques en alimentation animale notamment par l'utilisation de tourteau de soja riche en phyto-estrogènes.

#### 2 – Recommandations de Santé Publique

- ❖ Compte tenu de l'état actuel des connaissances et des incertitudes concernant les effets à long terme des fortes doses d'isoflavones ingérées de façon prolongée par les nourrissons (dans le cas où les PPS sont utilisées pour leur alimentation à défaut d'allaitement maternel ou de préparations au lait de vache), il paraît prudent de déconseiller pour la tranche d'âge de la naissance à 3 ans, l'utilisation de préparations à base de protéines de soja si celles-ci ne sont pas à teneur réduite en isoflavones. A notre connaissance ces préparations ne sont pas actuellement disponibles sur le marché. L'article 6 chapitre 1<sup>er</sup> de l'arrêté du 1<sup>er</sup> juillet 1976 modifié relatif aux aliments destinés aux nourrissons et aux enfants en bas âge, indique que «... la teneur en substances hormonales en particulier en estrogènes ou anabolisants doit être inférieure à 1 µg/kg d'aliment ...». La nouvelle directive européenne concernant les préparations pour nourrissons et les préparations de suite qui est en cours d'élaboration devrait préciser que leur concentration en isoflavones doit être inférieure à 1 mg/l de préparation reconstituée en équivalent-aglycone.
- ❖ En outre, les médecins prenant en charge les nourrissons atteints d'hypothyroïdie congénitale doivent être informés que les phyto-estrogènes présents dans les préparations à base de protéines de soja peuvent entraîner des besoins plus élevés en thyroxine chez ces patients.

#### 3- Recommandations à visée d'information du consommateur

- ❖ Compte tenu de leur composition, les tonyus (jus de soja) sont contre-indiqués pour l'alimentation des nourrissons et des enfants en bas-âge (de la naissance à 3 ans).
- ❖ L'étiquetage de toute préparation diététique à base de protéines de soja destinée aux nourrissons et aux enfants en bas âge doit préciser la teneur en phyto-estrogènes, exprimée en équivalents aglycones,

notamment sur les aliments à base de soja et les compléments alimentaires. Ceci signifie un contrôle des doses par les industriels à chaque fabrication avec un nouveau lot de soja.

- ❖ la concentration en phyto-estrogènes des préparations pour nourrissons et des préparations de suite à base de protéines de lait de vache actuellement utilisées, devrait être régulièrement précisée, compte tenu de l'évolution des pratiques en alimentation animale.

## Effets des phyto-estrogènes sur la fonction thyroïdienne

### Points clés

- ❖ La consommation d'isoflavones pourrait modifier les taux circulants d'hormones thyroïdiennes par un effet sur la synthèse, en agissant sur la peroxydase thyroïdienne, ou sur la conversion périphérique de T4 en T3, en agissant sur les 5'-déiodases ; ces effets sont probablement associés à l'analogie de structure de certaines isoflavones avec les hormones thyroïdiennes.
- ❖ Ces effets sont atténués *in vitro* par la présence d'iodures
- ❖ Les effets des isoflavones sur le développement d'un goitre ont été suggérés mais non démontrés chez l'adulte. Ils se limitent à la consommation de farine de soja mais ne sont pas observés en cas d'utilisation de protéines extraites de soja enrichi en iode
- ❖ Des études complémentaires doivent être encouragées pour préciser la relation les mécanismes de l'effet goitrigène du soja
- ❖ Les études épidémiologiques sont limitées ; elles ne montrent pas de relation entre la consommation de soja et d'isoflavones avec le risque de développer un cancer de la thyroïde.
- ❖ Le principal risque de la consommation d'isoflavones pourrait être d'augmenter les besoins en hormones thyroïdiennes chez les patients hypothyroïdiens substitués ou freinés par thyroxine, comme cela a été documenté chez l'enfant (voir chapitre phyto-estrogènes et nourrisson)

### Recommandations

- ❖ Il est recommandé de prévenir les médecins que la consommation de protéines de soja ou de phyto-estrogènes peut augmenter les besoins de substitution en hormones thyroïdiennes chez les patients hypothyroïdiens
- ❖ Bien que les concentrations d'isoflavones libres chez l'enfant ou l'adulte n'atteignent probablement pas des valeurs délétères pour la fonction thyroïdienne, un supplément d'iode devrait être recommandé chez les femmes enceintes consommant des phyto-estrogènes

## Effet des phyto-estrogènes sur l'immunité

### Points clés

- ❖ Les études concernant l'effet des phyto-estrogènes et surtout des isoflavones sont éparées et contradictoires, que l'on examine les résultats obtenus *in vivo* chez l'animal, *in vitro* sur cellules humaines et *in vivo* chez l'homme.
- ❖ Le soja qui est l'un des principaux pourvoyeurs de phyto-estrogènes est un allergène puissant par le biais de certaines de ces protéines notamment la  $\beta$ -conglycinine, l'inhibiteur trypsique de Kunitz ou la glycinine.

### Recommandations

#### 1- Recommandations à visée de connaissance et de recherche

- ❖ Des études d'intervention restent à faire chez l'enfant et l'adulte pour vérifier l'action des phyto-estrogènes au sens large et des isoflavones du soja en particulier sur la fonction immunitaire.
- ❖ Les estrogènes activent la fonction immunitaire. Le GnRH neurohormone clé du système hypothalamo-hypophysaire participe également au contrôle de la fonction immunitaire. Il agit soit directement *via* des

récepteurs présents sur le thymus soit indirectement *via* son action sur les taux circulants d'estrogènes. Les effets anti-LH des isoflavones et du coumestrol ayant été attribués par certains auteurs à une perturbation de la sécrétion de GnRH, et l'influence des estrogènes et de ce décapeptide sur la fonction immunitaire étant connues, il serait bon de vérifier si une interaction des isoflavones et du coumestrol avec la fonction immunitaire pourrait faire intervenir une perturbation de la fonction gonadotrope.

### **3- Recommandations à visée d'information du consommateur**

- ❖ Bien qu'aucun phénomène d'allergie n'ait à ce jour été rapporté avec les compléments alimentaires à base d'isoflavones de soja, la variété des modes d'obtention de ces extraits doit inciter les personnes notoirement sensibles aux protéines de soja à la prudence vis à vis de ces préparations.

## **Effets hormonaux des phyto-estrogènes chez la femme et chez l'homme.**

### **Points clés**

- ❖ Les études épidémiologiques et la plupart des études d'intervention ont rapporté un effet de la consommation de soja, et dans certains cas d'isoflavones sur l'allongement du cycle menstruel avec une tendance à la diminution des concentrations de l'estradiol et à l'augmentation de son catabolisme en composés peu actifs biologiquement.
- ❖ Cet effet ne paraît pas associé à un effet de type estrogène sur l'endomètre ou la cytologie vaginale.
- ❖ Les études épidémiologiques menées au Japon ont dans l'ensemble montré que la consommation de produits dérivés du soja est associée à un nombre et une sévérité moindre des bouffées de chaleur qu'en Europe. Mais, ces études n'ont pas cherché à identifier les facteurs de confusion possibles associés à la consommation traditionnelle de soja entre les populations asiatiques, nord américaines ou européennes.
- ❖ L'engouement actuel pour la consommation de phyto-estrogènes sous la forme de complément d'extraits de protéines de soja enrichis en isoflavones ne repose pas sur la démonstration d'un effet bénéfique sur les bouffées de chaleur ou sur la démonstration d'un effet comparable à celui des estrogènes. Les essais randomisés d'un apport contrôlé de protéines de soja (aliment) n'ont généralement pas montré de bénéfice significativement supérieur à celui d'un placebo sur les bouffées de chaleur.
- ❖ Concernant le fort effet placebo des compléments de phyto-estrogène observé dans la plupart des études et la différence significative d'avec le placebo observée dans certaines études, on peut formuler l'hypothèse que certaines femmes ont un métabolisme particulier des isoflavones (production d'équol) qui pourrait augmenter leur biodisponibilité et leur activité estrogénique expliquant leur effet favorable sur les bouffées de chaleur.
- ❖ Bien que les trois études réalisées dans des populations de femmes traitées pour cancer du sein n'aient pas montré d'effet particulier sur le sein on ne peut pas écarter le risque d'un effet de type estrogène potentiellement dangereux.

### **Recommandations**

#### **1 - Recommandations à visée de connaissance et de recherche.**

- ❖ Mise en place d'études contrôlées présentant des effectifs suffisants et calculés afin de répondre à la question ouverte des risques ou bénéfiques de l'apport de soja et/ou d'isoflavones chez la femme ménopausée. Ces études d'intervention devront respecter les règles usuelles des essais thérapeutiques.

#### **2- Recommandations de Santé Publique**

- ❖ Il doit être clairement mentionné que les produits dérivés du soja ne doivent pas faire allégation de traitement alternatif au traitement hormonal substitutif de la ménopause.

- ❖ Il paraît prudent de ne pas recommander un apport d'un complément de phyto-estrogènes ou d'isoflavones chez des femmes ménopausées aux antécédents de cancer du sein, bien qu'il y ait pas d'étude à long terme

### **3- Recommandations à visée d'information du consommateur.**

- ❖ Les consommateurs de produits dérivés du soja doivent être informés que ces produits contiennent des isoflavones dont il a été montré qu'elles pouvaient exercer des effets hormonaux. La composition en isoflavones de ces compléments doit être clairement mentionnée. La mention « Parlez en avec votre médecin » doit alerter les consommateurs d'éventuelles contre indications.
- ❖ La publicité sur les phyto-estrogènes doit être rigoureusement contrôlée.

## **Effets des phyto-estrogènes sur l'ostéoporose**

### **Points clés**

#### ***Risque de fracture***

- ❖ Aucune étude clinique ciblant l'impact des phyto-estrogènes sur le risque fracturaire n'est actuellement disponible.

#### ***Densité minérale osseuse***

- ❖ Dans les populations asiatiques, les études épidémiologiques d'observation montrent qu'une consommation importante d'isoflavones de soja est associée à une densité minérale osseuse élevée. Cette donnée doit toutefois être considérée avec précaution du fait de l'existence probable de facteurs de confusion (profil alimentaire, activité physique, stature, etc.).
- ❖ L'apport en isoflavones de soja permet d'éviter les processus de déminéralisation démontrés dans des situations de carence estrogénique (cas des études d'intervention chez la femme ménopausée, données issues de l'expérimentation animale conduite sur rates ovariectomisées). Les doses quotidiennes testées sont de l'ordre de 50-100 mg. Toutefois, aucune information sur l'impact à long terme n'est disponible.
- ❖ Il existe un certain nombre d'arguments en faveur d'une efficacité supérieure des isoflavones chez les personnes capables de bioconvertir l'équol à partir de son précurseur la daidzéine (notion de répondeur)

#### ***Remodelage osseux***

- ❖ Les études *in vitro* indiquent que les mécanismes mis en jeu impliquent simultanément les ostéoblastes et les ostéoclastes, ce qui traduit une inhibition de la résorption osseuse associée à une stimulation de l'accrétion.
- ❖ Cependant, les études cliniques de courte durée ne fournissent aucune preuve convaincante de l'effet des phyto-estrogènes sur les marqueurs du remodelage osseux, qu'il s'agisse de l'activité ostéoblastique impliquée dans l'élaboration de la trame organique et sa minéralisation, ou des paramètres de résorption.

### **Recommandations**

#### **1 - Recommandations à visée de connaissances et de recherche**

- ❖ Il est indispensable de pouvoir disposer de données relatives à l'impact des phyto-estrogènes sur le risque fracturaire.
- ❖ Il est important de pouvoir explorer l'impact de la biodisponibilité de ces molécules sur leurs effets biologiques, de façon à mieux comprendre la relation dose-effet.

#### **2- Recommandations de santé publique**

- ❖ Bien que les études cliniques suggèrent un effet favorable des phyto-estrogènes sur les paramètres de masse osseuse, il est prématuré de recommander ces molécules pour une prise en charge préventive de l'ostéoporose car aucune information relative à la réduction du risque de fracture n'est actuellement disponible.

## Effet des phyto-estrogènes sur le système nerveux central, fonctions cérébrales et cognitives

### Points clés

- ❖ Le transfert des phyto-estrogènes à travers la barrière cérébro-méningée semble minime chez l'Homme sauf peut être pendant la période fœtale, avant la mise en place de cette barrière méningée.
- ❖ Les effets rapportés sur l'inflammation et sur les protéines impliquées dans les mécanismes de neuro-dégénérescence rapportés chez les rongeurs restent à démontrer chez l'homme
- ❖ Les effets anatomiques des phyto-estrogènes sur le noyau sexuellement dimorphique de l'aire pré-optique de l'hypothalamus des rongeurs qui traduisent un effet des isoflavones sur l'axe hypothalamo-hypophysaire ne semblent significatifs que pour une exposition pharmacologique *in utero* alors qu'en période néonatale des doses alimentaires peuvent être actives. Si les données obtenues chez les rongeurs sont difficilement extrapolables directement à l'espèce humaine, celles sur les marmosets nouveau-nés posent question.
- ❖ Les études cliniques disponibles suggèrent un effet favorable des isoflavones sur les fonctions cognitives, mais elles sont insuffisantes en nombre et en effectif pour constituer une preuve solide.

### Recommandations

#### 1- Recommandations à visée de connaissance et de recherche

- L'étude du transfert des phyto-estrogènes à travers la barrière cérébro-méningée et les concentrations résultantes libres ou conjuguées des phyto-estrogènes dans le cerveau en comparaison des concentrations d'estrogènes endogènes devrait faire l'objet d'études plus documentées
- Si les études d'épidémiologie analytique apparaissent difficiles à mettre en oeuvre, on peut cependant faire des études de suivi sur les populations consommant des phyto-estrogènes dans des conditions fiables de doses et de durée, en partenariat avec le réseau des prescripteurs.
- Concernant les effets des phyto-estrogènes sur l'hypothalamus et l'hypophyse en exposition néonatale, les recherches doivent être encouragées.

#### 2- Recommandations à visée d'information du consommateur.

- Dans l'état actuel de nos connaissances, dans l'attente d'étude d'intervention contrôlée qu'il faut encourager, aucune étude humaine pertinente ne permet d'autoriser d'allégation de prévention de la dégradation des fonctions cognitives chez la femme aux dérivés du soja ou aux suppléments d'isoflavones.
- Comme déjà mentionné il faut être prudent quant à l'utilisation des formules infantiles à bases de protéines de soja chez le nourrisson.

## Effets des phyto-estrogènes sur les cancers

### Points clés

- ❖ La consommation de produits dérivés du soja ainsi que celle d'isoflavones réduit **le risque de cancer du sein** de façon significative chez les femmes asiatiques. Cette réduction de risque correspond à un niveau d'apport entre 30 et 40 mg/jour dès l'adolescence et dans un contexte alimentaire favorable (apport important de produits végétaux, d'acides gras de la série n-3, et apport faible de lipides saturés). Cet effet paraît plus net chez les femmes avant la ménopause, suggérant un mécanisme hormonal. Cependant, un certain nombre d'autres facteurs associés au style de vie sont difficilement dissociables de l'effet des phyto-estrogènes et empêche de conclure à la spécificité de leur effet.
- ❖ Ces observations sont corroborées par les expérimentations animales réalisées en période prépubertaire et à l'âge adulte. Cependant, lors d'une exposition *in utero* et/ou néonatale, les isoflavones augmentent la sensibilité de la progéniture (mâle ou femelle) aux cancérogènes mammaires.

Chez des animaux ovariectomisés (mimant le statut ménopausal), les isoflavones peuvent favoriser le développement de tumeurs chimio-induites, à l'image de ce qui est également observé dans des modèles d'implantation de cellules tumorales humaines hormono-dépendantes dont la prolifération est augmentée par les isoflavones.

- ❖ Les études sont moins nombreuses mais concordantes à montrer une réduction de risque pour le **cancer de l'endomètre**. Cependant, les isoflavones apparaissent sans effet chez les femmes occidentales, soit que la dose habituellement consommée soit trop faible, et/ou que ces femmes aient des habitudes alimentaires et un style de vie favorables au développement du cancer. Quand au **cancer de la prostate**, il existe peu d'études épidémiologiques analytiques concluantes, mais les études animales convergent globalement vers une réduction du risque. Pour ces deux cancers, la réduction de risque peut être qualifiée de possible dans les conditions d'exposition des populations asiatiques.
- ❖ Aucune étude épidémiologique ne permet de prouver l'effet des phyto-estrogènes sur le **cancer du testicule**, mais les données expérimentales montrent que les isoflavones peuvent exercer leur effet estrogénique *in utero*, résultant en des anomalies génitales, facteurs de risque de ce cancer.
- ❖ En ce qui concerne **les autres cancers**, les données, tant épidémiologiques qu'expérimentales, sont insuffisantes pour conclure.
- ❖ Quant aux lignanes, elles pourraient jouer un rôle chez les femmes occidentales puisqu'elles représentent la majorité des phyto-estrogènes ingérés chez les femmes occidentales. Cependant, l'ubiquité des lignanes dans le règne végétal et la quasi-absence de table de composition complète et validée rendent difficiles l'interprétation des résultats. Les études par biomarqueurs qui devraient apporter des résultats plus fiables sont, en l'état actuel des connaissances sur la biodisponibilité des lignanes, également difficilement interprétables.

Ainsi l'apport d'isoflavones se démarque de l'apport d'estrogènes en ce qui concerne le risque de cancers, mais les études animales amènent à prendre en considération certaines situations :

- *La grossesse*: les études animales indiquent qu'une exposition aux isoflavones lors de la période de gestation entraîne une modification du développement de la glande mammaire de la progéniture femelle, et du testicule de la progéniture mâle entraînant une augmentation de risque respectivement de cancer du sein et de cancer du testicule.
- *La présence de tumeur hormono-dépendante* : chez la femme ménopausée, l'exposition aux phyto-estrogènes pourrait favoriser la prolifération et la croissance tumorale à l'instar de ce qui est observé chez la ratte ovariectomisée présentant une tumeur chimio-induite.

## Recommandations

### 1- Recommandations à visée de connaissance et de recherche

#### Epidémiologie

- ❖ La réalisation d'une table de composition complète et fiable des aliments consommés en Europe est l'étape nécessaire préalable à toute recherche épidémiologique. A la suite, les données de consommation des cohortes nationales (E3N, SU.VI.MAX) et européenne (EPIC) seront mises en relation avec l'incidence des cancers dans ces cohortes pour évaluer une possible relation. Le cas des lignanes demandera une attention particulière pour éventuellement séparer leur effet spécifique de celui des différents aliments vecteurs.
- ❖ Etant donné l'absence de marqueurs intermédiaires pertinents, des études d'intervention ne paraissent pas réalisables. On pourrait cependant envisager un suivi des femmes consommant des compléments alimentaires à base de soja dans des conditions fiables de doses et de durée, en partenariat avec le réseau des phytothérapeutes. Un suivi pourrait s'appliquer également aux femmes présentant un cancer du sein et consommant par une démarche volontaire des compléments alimentaires contenant des isoflavones après ovariectomie et/ou traitement par le tamoxifène.

#### Etudes expérimentales *in vivo*

- ❖ Elles demandent des modèles éventuellement extrapolables à l'Homme en terme de doses et des différents composés actifs.
- ❖ Alors que les études expérimentales sont bien documentées quant au risque lié à une exposition en début de vie, celles concernant le stade de la ménopause sont encore trop peu nombreuses et un effort

en ce sens est nécessaire afin de discriminer le risque chez des sujets sains et chez des sujets déjà atteints de cancer. D'autre part, quelques études expérimentales font état des risques d'interaction entre phyto-estrogènes et xéno-estrogènes. Des études mécanistiques en ce sens mériteraient d'être développées, en particulier des risques d'interaction avec des pesticides ou des migrants d'emballages présents dans notre alimentation, mais également avec des produits pharmaceutiques (pilule contraceptive, hormonothérapie).

## **2- Recommandations de Santé Publique**

- ❖ Les aliments à base de soja, tels le tonyu, le tofu, peuvent être consommés sans excès par les adultes, puisqu'ils diminuent l'apport en graisses saturées animales, **et dans le cadre d'une alimentation équilibrée et diversifiée**, en accord avec les recommandations de santé publique (Programme National Nutrition Santé). Cette dernière recommandation concernant une alimentation équilibrée s'applique notamment aux personnes qui penseraient prévenir le risque de cancer en consommant des compléments alimentaires à base d'isoflavones « plaqués » sur des habitudes alimentaires et un style de vie occidentales.
- ❖ Certaines fenêtres d'exposition apparaissent comme des fenêtres à risque. Ainsi, un apport élevé (> 1mg/kg/j) en phyto-estrogènes pendant la grossesse ou après un cancer du sein ne peut être recommandé. Dans le premier cas, car cette consommation pourrait ne pas être sans risque sur le développement du tractus génital et éventuellement augmenter le risque de cancer du testicule et du sein dans la progéniture. Dans le deuxième cas, un risque d'augmentation de la prolifération des cellules tumorales ne peut être écarté. Une même dose est à respecter chez les femmes ménopausées

## **3/-Recommandations à visée d'information du consommateur**

- ❖ L'étiquetage doit préciser la teneur en phyto-estrogènes, exprimée en équivalents aglycones, notamment pour les aliments à base de soja et les compléments alimentaires. Ceci signifie un contrôle des doses par les industriels à chaque fabrication avec un nouveau lot de soja.
- ❖ Une contre-indication devrait être mentionnée concernant l'utilisation de ces compléments pour une exposition *in utero*, et la présence de cancers hormonodépendants

## **Effets des phyto-estrogènes sur les maladies cardio-vasculaires**

### **Points clés**

- ❖ Les isoflavones purifiées de soja n'ont pas d'effet sur le cholestérol plasmatique circulant, quelle que soit sa forme de transport.
- ❖ En revanche, un effet dépresseur sur le cholestérol total et le cholestérol des LDL, bénéfique en terme de risque cardiovasculaire, est associé aux protéines de soja à un niveau d'apport au moins égal à 33 g/j.
- ❖ Les isoflavones de soja purifiées présentent un effet bénéfique sur la vaso-tonicité à partir d'un apport de 45 mg/j de génistéine (ou génistéine + biochanine A). Une étude montre qu'un apport de 118 mg/j d'isoflavones (dont 75 mg/j de génistéine) présente un effet inverse.
- ❖ Un effet pro-inflammatoire a été observé pour un apport de 73 mg/j d'isoflavones de soja.
- ❖ Les études d'intervention ne mettent en évidence aucun effet des isoflavones ou des préparations protéiques sur les triglycérides circulants.
- ❖ Des études épidémiologiques suggèrent en revanche un effet hypotriglycéridémiant dans le seul cas des lignanes et une amélioration du syndrome métabolique et de l'élasticité des vaisseaux dans le cas aussi bien des lignanes et que des isoflavones.
- ❖ De nombreux mécanismes, principalement non estrogéno-dépendants, suggèrent un rapport de causalité entre la prise d'isoflavones (le plus souvent la génistéine) et les effets observés chez l'Homme.
- ❖ L'effet bénéfique des isoflavones sur la vaso-tonicité est la seule propriété qui ait été observée dans les quatre types d'approche : épidémiologique, interventionnelle (mais seulement dans le cas des isoflavones purifiées), mécanistique, fonctionnelle.



- ❖ L'inversion de cet effet pour des apports supérieurs à 110 mg/j, ainsi que l'effet pro-inflammatoire pour des apports de 73 mg/j méritent une attention particulière.
- ❖ Le fait que le statut du cholestérol circulant soit amélioré par les protéines de soja et ne soit pas modifié par les isoflavones mérite d'être pris en compte dans la formulation des produits. Ceci implique également une meilleure compréhension du mécanisme d'action.
- ❖ Les résultats en faveur d'un effet bénéfique sur l'insulinémie et l'insulino-résistance dans le diabète de type 2, un facteur de risque cardio-vasculaire, sont insuffisants pour conclure à un effet favorable.
- ❖ Les preuves directes d'un effet protecteur des isoflavones et des préparations enrichies en isoflavones sur la morbi-mortalité cardio-vasculaire sont insuffisantes. Les données sur les lignanes sont trop rares pour qu'il soit possible d'émettre une appréciation sur leur action.

## **Recommandations**

### **1-Recommandations à visée de connaissance et de recherche**

- ❖ Des études permettant de mieux apprécier l'impact sur la morbi-mortalité cardiovasculaire des isoflavones (de protéines de soja ou purifiées) et des lignanes sont indispensables dans le contexte de consommation alimentaire de la population française.
- ❖ Ces études devront être accompagnées de l'évaluation des niveaux circulants des marqueurs biochimiques de consommation des phytoestrogènes afin d'établir la teneur circulante minimale protectrice
- ❖ Des études doivent être entreprises sur le syndrome métabolique (en tant que facteur de risque cardiovasculaire) et ses différentes composantes. Il faudrait en particulier rechercher s'il existe un effet sur l'insulino-résistance lié à la prise d'isoflavones ou de lignanes
- ❖ La prise en compte de polymorphismes génétique sera nécessaire. Une attention particulière devrait être accordée au génotype Glu298Asp de la NO synthétase endothéliale.
- ❖ L'effet défavorable de doses élevées d'isoflavones (ou spécifiquement de génistéine) sur la vaso-tonicité et sur des marqueurs intermédiaires de l'inflammation devra être examiné avec attention
- ❖ L'effet respectif de la fraction protéique et des isoflavones de soja doit faire l'objet de recherches qui pourraient permettre, à terme, une utilisation séparée et différente de ces produits.

### **2- Recommandations de santé publique**

Dans l'état actuel des connaissances, des apports au moins égaux à 30 g/j de protéines de soja et à 45 mg/j de génistéine (ou génistéine + biochanine A) peuvent contribuer à stabiliser, voire améliorer, des marqueurs intermédiaires de risque cardio-vasculaire (cholestérol, vaso-réactivité). Ces apports ne pourront pas dépasser 50 g/j de protéines de soja pour des raisons de confort et ne devront pas dépasser 70 mg/j de génistéine (son précurseur biochanine A inclus) ou d'isoflavones totales de protéines de soja en raison d'une éventuelle inversion des effets sur la vaso-réactivité et d'une réaction inflammatoire possible au delà de ce niveau d'apport. Dans l'état actuel des connaissances, une surveillance de paramètres biochimiques de l'inflammation (par exemple CRP et IL-6) s'impose dans le cas d'apports continus à des niveaux élevés d'isoflavones.

### **3- Recommandations à visée d'information du consommateur**

- ❖ Le niveau de cholestérol circulant, dont l'augmentation est liée à un risque accru de maladies cardio-vasculaires, peut être abaissé par les préparations de protéines de soja à des doses de 30 g/j.
- ❖ La tonicité vasculaire, dont la diminution accompagne souvent une augmentation du risque cardio-vasculaire, est améliorée par les isoflavones purifiées de soja à des doses de 45 à 55 mg/j de génistéine. Les doses supérieures n'ont pas fait preuve de leur innocuité.
- ❖ L'étiquetage doit préciser la teneur en phyto-estrogènes, exprimée en équivalents aglycones, notamment sur les aliments à base de soja et les compléments alimentaires. Ceci signifie un contrôle des doses par les industriels à chaque fabrication avec un nouveau lot de soja.

## Conclusion générale

Les résultats de l'ensemble de ces études nous amènent à formuler des recommandations générales:

- ❖ **de recherche** :caractérisation des molécules, standardisation des méthodes analytiques, tables de composition et études de consommation, études de toxicité plus larges, études épidémiologiques pour l'étude des relations avec les pathologies et/ou suivi des femmes consommant déjà des compléments alimentaires sous contrôle des prescripteurs, études cliniques pour confirmer ou infirmer le risque d'effet pro-inflammatoire ;
- ❖ **de santé publique qui porteront sur :**
  - la prise en compte de la limite au delà de laquelle des phénomènes de toxicité pourraient apparaître chez l'Homme, qui s'élève à 1mg/kg de poids corporel/j d'aglycones pour les isoflavones Ceci est un choix résultant de l'état actuel des connaissances sur la seule génistéine et qui peut changer avec l'évolution des connaissances.
  - les risques associés à l'exposition in utero aux phyto-estrogènes, et les risques associés à l'exposition des nourrissons et des enfants en bas âge aux préparations à base de protéines de soja dont la concentration est élevée en isoflavones alors qu'elle devrait être inférieure à 1 mg/L de préparation reconstituée en équivalents aglycones, soit environ 0.15mg/kg de poids corporel. Ces risques basés sur l'expérimentation animale portent sur la sensibilité aux carcinogènes et sur la maturation du système de reproduction avec malformations entraînant outre une altération de la fertilité, des anomalies facteurs de risque de cancer du testicule chez le jeune mâle et d'adénocarcinome utérin chez la jeune femelle.
  - l'effet antagoniste des phyto-estrogènes vis à vis du traitement par thyroxine des enfants hypothyroïdiens
  - l'insuffisance actuelle de faits scientifiques étayant un bénéfice associé à l'apport de compléments de phyto-estrogènes, alors qu'un profil alimentaire riche en produits végétaux, pouvant inclure des produits dérivés du soja non sucrés et en quantité modérée (1 à 2 produits par jour chez l'adulte), reste la meilleure prévention nutritionnelle vis à vis des maladies chroniques dégénératives.
  - le risque de prolifération et de croissance tumorale chez des femmes ayant présenté des antécédents personnels ou familiaux de cancer du sein.
- ❖ **d'information du consommateur**, qui doit pouvoir connaître le contenu en isoflavones des produits qu'il achète, et notamment des compléments alimentaires et des préparations pour nourrissons et de suite, par un étiquetage adéquat.

Aussi, il est recommandé que les produits alimentaires contenant des phyto-estrogènes soient étiquetés de la façon suivante :

- **Aliments à base de soja (tonyu, miso, tofu, yaourts et desserts au soja) :**  
Contient Xmg d'isoflavones (famille des phyto-estrogènes). A consommer avec modération (limiter la consommation quotidienne à 1mg/kg poids corporel). Déconseillé aux enfants de moins de 3 ans.
- **Compléments alimentaires (phyto-estrogènes purs ou extraits de plante en contenant) et aliments enrichis :**  
Contient Xmg de [molécule (s) concernée (s)]\* (famille des phyto-estrogènes). Ne pas dépasser 1mg/kg poids et par jour. Déconseillé aux femmes ayant des antécédents personnels ou familiaux de cancer du sein. Parlez-en à votre médecin.  
\* isoflavones et/ou isoflavanes et/ou coumestanes et/ou flavanones et/ou chalcones et/ou entérolignanes

## Sommaire

<b>Annexe 1</b> : Les tests de détection des effets estrogéniques .....	373
<b>Annexe 2</b> : Données de composition des aliments en isoflavones (daïdzéine et génistéine) et estimation des apports de ces substances, en France .....	379
Annexe 2 a : Données de composition .....	380
Annexe 2 b : Estimation des apports .....	406
Annexe 2 c : Évolution des ventes des produits à base de soja entre 1996 et 2001 ..	423
<b>Annexe 3</b> : Le traitement hormonal substitutif de la ménopause.....	425
<b>Annexe 4</b> : Données réglementaires relatif à l'utilisation d'ingrédients sources de phyto-estrogènes et aux allégations s'y rapportant.....	431
<b>Annexe 5</b> : L'épissage différentiel (ou alternatif) des récepteurs $\alpha$ et $\beta$ aux estrogènes : les variants possibles chez l'Homme.....	435
<b>Annexe 6</b> : Masses moléculaires relatives des différentes formes de certains phyto-estrogènes.....	439



# Annexe 1

---

## LES TESTS DE DÉTECTION DES EFFETS ESTROGÉNIQUES

**Marie-Chantal Canivenc-Lavier**

Le choix des tests de détection des effets estrogéniques doit se référer aux nombreux travaux en cours au sein des instances nationales et internationales (OCDE et EPA notamment) dans le cadre de la problématique plus générale des perturbateurs endocriniens. Pour identifier les molécules et les extraits de plantes pour lesquels un effet estrogénique a été démontré, nous nous sommes référés aux orientations des lignes directrices de l'OCDE (Organisation for Economic Cooperation and Development 2002). En 1996, sur la base des lignes directrices éditées pour tester la toxicité des produits chimiques (Organisation for Economic Cooperation and Development 1995) cette organisation a mis en place une « Activité spéciale sur les essais et l'évaluation des perturbateurs endocriniens » dont l'objectif est notamment de redéfinir, d'harmoniser et d'améliorer ces tests de détections afin d'élaborer des lignes directrices qui seront reconnues à l'échelle internationale. Ces travaux ont donné lieu à plusieurs conférences et rapports (Organisation for Economic Cooperation and Development 1999), et en juin 2002 une stratégie de détection de substances à effet perturbateur endocrinien a été adoptée (2<sup>nd</sup> Copenhagen Workshop on Endocrine Disrupters, Danemark, 7-9 décembre 2002). Considérant l'ampleur du travail, les procédures officielles de tests standardisés (notamment spécifiques aux effets œstrogéniques) n'ont pas encore été finalisés. En revanche, une stratégie générale de détection des substances, et des orientations en terme de sélection et d'amélioration de certains tests ont été élaborées.

Succinctement, les tests de détections de composés perturbateurs endocriniens dont les composés estrogéniques, regroupent des tests *in vitro* et *in vivo*, établis sur la base des connaissances physiologiques (tests *in vivo*) et mécanistiques (tests *in vitro*) recueillies sur les effets spécifiques à une hormone définie (Organisation for Economic Cooperation and Development 2002). Les tests *in vitro* permettent de faire des criblages rapides sur des modèles simplifiés sur la base de propriétés des estrogènes à l'échelle cellulaires. Toutefois, l'observation d'un résultat au niveau cellulaire n'implique pas nécessairement que cet effet puisse exister dans un organisme multicellulaire, éminemment plus complexe. Aussi, l'OCDE considère qu'il n'est actuellement pas possible de recommander l'adoption formelle des tests *in vitro* de l'effet estrogénique en raison de leurs limitations et des difficultés inhérentes au modèle. Toutefois, le développement et l'optimisation de certains essais est recommandé ; ils pourront être utilisés dans les phases initiales de tri des molécules. Une étape de sélection à un niveau plus physiologique est donc nécessaire, et c'est la raison pour laquelle des tests *in vivo* sont menés chez l'animal. A ce stade, la démonstration de l'activité de la molécule dans un organisme complexe est faite. De fait, en 2000, le comité scientifique européen en charge des perturbateurs endocriniens (CSTEE) a indiqué qu'il privilégie les méthodes *in vivo* par rapport aux méthodes *in vitro*, ces dernières pouvant aboutir à des faux positifs et négatifs. Les avis de ces deux instances renforcent le fait que le principe essentiel retenu dans ce rapport, soit celui de la démonstration des effets *in vivo*.

En accord avec les directives de l'OCDE, les molécules prioritairement retenues dans ce document sont celles qui ont des effets reconnus et validés par les tests *in vivo* réglementaires (essai utéroprolifératif et cornification vaginale chez la femelle, mensuration des organes génitaux chez le mâle). Les tests *in vitro* n'ont pas été retenus pour établir un premier criblage et sélectionner des molécules potentiellement estrogéniques, mais ils viennent ici appuyer les effets observés *in vivo* et permettent une ébauche des mécanismes d'action. Par ailleurs, de nouvelles méthodes d'essai voient le jour dans la littérature, ce développement étant encouragé par les orientations de l'OCDE, en vue d'améliorer la batterie de tests disponibles. Plus sensibles et plus spécifiques, elles ont aussi pu être considérées dans cette étude pour compléter certaines analyses (paramètres histologiques, expression de protéines spécifiques...). Cette analyse a également été complétée en rapportant d'autres effets hormonaux (anti-androgéniques, anti-thyroïdiens, etc) associés à certains aux phyto-estrogènes. Ces effets ont été rapportés en tenant prioritairement compte des effets décrits *in vivo* (test de Hershberger par exemple). Toutefois, certaines molécules, peu actives *in vivo* mais fortement actives *in vitro* pourront être considérées comme des molécules à confier à la surveillance scientifique. Cette annexe a pour objectif de définir les limites et les intérêts de ces différents tests de détection pour une meilleure compréhension des arguments qui ont été à la base de notre discrimination.

## I- LES TESTS DE CRIBLAGES *IN VITRO*

Les tests *in vitro* sont basés sur des mécanismes moléculaires et cellulaires connus de l'action des œstrogènes : les essais de liaison de ligands sur les récepteurs aux œstrogènes, les tests de prolifération cellulaire, et les tests d'expression des gènes dans les cellules mammaires et les levures (Zacharewski 1998) (voir chapitre Mécanismes). Les modèles biologiques sont de trois types : subcellulaires, cellulaires, et construits.

### I-1 Les tests de liaisons aux récepteurs aux œstrogènes

Ils sont réalisés soit sur fractions subcellulaires (tests d'affinité et tests de compétition), soit sur cultures de cellules (Scatchard). Les modèles subcellulaires (fractions cytosoliques et nucléaires) sont issus de divers tissus animaux (utérus, glandes mammaires, foie) ou de cultures de cellules (hépatocytes, lignées tumorales, etc...) et présentent l'avantage de permettre la comparaison de l'affinité des molécules pour des récepteurs de tissus différents, et surtout d'espèces différentes : notamment entre l'Homme et les Rongeurs. Ils permettent également de positionner l'effet œstrogénique par rapport à celui de l'œstradiol (tests de compétitions). Ils sont de plus en plus complétés par des études de modélisation pour tenter d'établir des relations structure/activité (Etudes QSAR).

### I-2 Les tests dits de « E-Screen »

Ils reposent sur l'action positive des œstrogènes sur la division et la prolifération cellulaire ; leur sensibilité découle d'une bonne expression des récepteurs aux œstrogènes. Toutefois, d'autres récepteurs nucléaires que les récepteurs aux œstrogènes sont également impliqués dans la prolifération cellulaire (récepteur aux androgènes par exemple), et ces tests de E-screen doivent, pour être crédibles, être comparés à des tests de prolifération cellulaire obtenus sur une lignée ne possédant pas le récepteur (témoin négatif). Les modèles cellulaires les plus rencontrés utilisent des lignées tumorales de cellules mammaires humaines, possédant (MCF-7) ou non (MDA-MB231) le récepteur aux œstrogènes (Soto 1992, Nagel 1997, Desaulniers 1998). Le paramètre retenu pour mesurer la prolifération cellulaire est d'une extrême importance : la numération cellulaire reste le paramètre scientifiquement le plus représentatif, mais on lui préfère parfois la mesure de la quantité d'ADN synthétisé et au pire un dosage de protéines, plus simple à réaliser. Ces essais doivent présenter au moins deux répétitions et plusieurs duplicatas pour être crédibles. Il est à noter que ces tests doivent être réalisés en absence de rouge de phénol, un indicateur coloré incorporé dans les milieux de cultures pour cellules, qui possède des effets œstrogéniques et interfère donc sur le test de prolifération (Berthois 1986). Dans des études pionnières, l'étude de l'effet des molécules sur la prolifération cellulaire est également associée à l'identification d'effets sur l'expression de protéines spécifiquement régulées par les œstrogènes qui servent de protéines marqueurs : c'est le cas du récepteur de la progestérone, de la lactoferrine (Liu 1994), ou de certaines protéines tumorales telles que la pS2 et la cathepsine D (Miksicek 1995, Miodini 1999). Enfin, l'analyse bibliographique montre que, pour une même lignée, des divergences sont obtenues entre laboratoires, avec souvent une perte de la sensibilité en raison de l'instabilité de l'expression des récepteurs et de l'évolution des cultures au cours des repiquages. Ils présentent cependant l'avantage d'être simples et faciles à mettre en place dans la plupart des laboratoires équipés pour la culture cellulaire.

### I - 3 Les tests sur des modèles construits

Ils bénéficient des progrès de la biologie moléculaire et de la biophysique : des récepteurs chimériques, la plupart du temps couplés à une enzyme marqueur (ex : catécholamine Aminotransférase ou CAT, luciférase) sont transfectés dans des cellules eucaryotes (Desaulniers 1998, Le Bail 1998, Miksicek 1995) ou procaryotes (Petit 1997, O'Connor 1998b, O'Connor 1998a). Certains tentent par là d'augmenter la sensibilité des MCF-7 utilisées dans les tests de E-screen ou d'autres lignées tumorales mammaires (Le Bail 1998), tandis que d'autres transfectent des cellules issues de tissus divers (Hela, intestin ; Miksicek 1995), voire même des cellules procaryotes comme la levure (Petit et al., 1997). La vitesse de croissance des levures leur permet d'être à la fois rapide et tout aussi sensibles. Ces modèles construits permettent donc de gagner en sensibilité et en précision, permettant d'accorder à ce type de test plus de crédibilité. Ces mêmes tests, réalisés en présence d'œstradiol, peuvent également être utilisés pour discriminer une activité anti-œstrogénique (So 1997, Le Bail 1998). Néanmoins, même si les tests *in vitro* se sont avérés très souvent prédictifs d'un effet œstrogénique *in vivo*, ils ne peuvent se suffire à eux-mêmes car ils écartent tout phénomène lié à l'absorption, au transport et à la bioactivation métabolique dans l'organisme. Ils ne reflètent donc pas forcément pas la réalité mais nous informe

de la présence d'un potentiel estrogénique. A noter également qu'il existe d'autres tests visant à mettre en évidence des effets plus indirects comme la mesure de l'activité d'enzymes intégrées dans la synthèse stéroïdienne (ex : aromatasase), qui peuvent être à l'origine d'une modification des taux d'hormones endogènes (Brueggemeier 2001).

## **II- Les tests *in vivo***

### **II-1 Chez les rongeurs :**

Il est important de préciser que les études *in vivo* présentées ci-dessous portent essentiellement sur deux espèces de rongeurs : des rats et des souris. Cependant, les souris seraient plus sensibles que les rats (Evans 1941, Zacharewski 1998)). Il existe plusieurs tests *in vivo* portant sur l'étude de l'action des molécules estrogéno-mimétiques sur différents organes : glandes mammaires (Colerangle 1997), prostate, gonades, foie, reins, épидидymes et vésicules séminales (Ashby 1997), densité osseuse, et taux sérique de cholestérol (Dodge 1996). Mais aucun de ces tests n'est strictement spécifique. Il existe néanmoins deux tests largement utilisés et validés pour la détermination d'un pouvoir estrogéno-mimétique : le test utéro-trophique (augmentation du poids de l'utérus) et celui de cornification vaginale. Ils sont réalisés sur des femelles immatures au moment du sevrage (mimant un statut prépubertaire), ou sur des femelles adultes ovariectomisées (mimant un statut ménopausal), les animaux immatures étant plus sensibles (Zacharewski 1998, Stroheker 2003). Dans les conditions réglementaires, ces tests d'estrogénicité sont réalisés sur des périodes d'exposition très courtes : 3 ou 4 jours seulement.

#### **II-1-2- Le test utéro-trophique**

Il repose sur l'augmentation du poids de l'utérus induite par les estrogènes. Ce phénomène résulte d'une rétention d'eau (effet strictement estrogénique) et/ou d'un épaississement de l'épithélium de l'endomètre. Or des molécules progestagènes ainsi que la testostérone peuvent aussi induire une augmentation du poids de l'utérus (Zacharewski 1998). Une analyse complète présentera donc les résultats sur la base du poids frais et du poids sec de l'utérus afin de discriminer l'effet strictement estrogénique. Mais les effets sont parfois trop faibles pour espérer obtenir des différences statistiquement significatives. De fait, ce test présente une spécificité relative (Odum 1997), il n'est pas strictement spécifique des estrogènes. Malgré cela, il est encore largement utilisé car il est à l'origine de la mise en évidence de l'activité estrogénomimétique de la plupart des molécules testées (quantification de l'activité et d'un effet dose) et il est ainsi devenu un test de référence reconnu par les instances internationales.

#### **II-1-2 La cornification vaginale**

Elle est observée sur frottis vaginaux. C'est un phénomène naturel qui se produit lors de l'œstrus : durant la phase anabolique (œstrus), l'épithélium vaginal s'épaissit et une couche cornifiée parallèle à celle de l'épiderme se développe (Jones 1973). Durant la phase catabolique (post-œstrus), les couches externes de cet épithélium dégénèrent et sont éliminées par l'action des leucocytes (Allen 1923). Cette propriété est utilisée pour observer l'apparition d'une couche de cellules kératinisées au niveau de l'épithélium vaginal. Ce test est généralement mené en parallèle du test utéro-trophique, juste avant de prélever l'utérus de l'animal.

Il existe deux méthodes pour le test de cornification vaginale: soit on effectue des frottis vaginaux que l'on observe au microscope (Allen 1923), soit on prélève le vagin pour pratiquer des coupes transversales que l'on colore à l'hématoxyline et à l'éosine (Jones 1973). Dans le premier cas, l'apparition de cellules kératinisées et la disparition de leucocytes témoignent d'une activité estrogénique. Sur les coupes, cela se traduit par l'épaississement de l'épithélium vaginal et la présence de cellules cornifiées dans la lumière vaginale. A l'inverse du test utéro-trophique, le test de cornification vaginale est très hautement spécifique d'un effet estrogénique (O'Connor 1996). La durée de la cornification est directement liée à la dose et à la pharmacocinétique des œstrogènes administrés. Parmi les autres classes d'hormones stéroïdes, les androgènes et la progestine stimulent la murification vaginale mais n'induisent pas la kératinisation épithéliale (ou cornification) (Jones 1973) et un fort pourcentage de leucocytes éosinophiles est associée à un effet progestatif (Ramos 2000).

Lors d'un effet estrogénique, la cornification vaginale est étroitement corrélée à l'utéroprolifération. Chez les animaux immatures, ces deux tests sont parfois complétés par un autre paramètre : l'ouverture vaginale, qui traduit une maturité sexuelle précoce. Chez les mâles, les effets estrogéniques *in vivo* sont observés suite à une exposition *in utero* et se traduisent par une augmentation de la distance anogénitale, une altération de la descente testiculaire, un retard de la date de séparation prépuçiale et une altération pondérale des organes génitaux, etc. (Gray 1998, Biegel 1998). Ces derniers paramètres sont toutefois peu utilisés pour les tests de screening *in vivo*.

### **II-1-3 Validité des tests**

#### **Doses utilisées**

Les tests *in vivo* sont à considérer comme des tests toxicologiques ou des tests de criblages : il faut garder présent à l'esprit que ces études effets/doses permettent d'obtenir des doses sans effet et des doses actives dans des conditions d'exposition très courtes (3 à 4 jours) et que l'effet des molécules est comparé à celui d'une dose d'œstradiol supra-physiologique donnant un effet maximum. Pour une même molécule, on peut obtenir un effet minimum à des doses très différentes selon l'espèce utilisée, mais aussi selon la composition du régime (présence de phyto-estrogènes par exemple, voir ci-dessous). De ce fait, il faut dans la plupart des cas, atteindre des doses supra-physiologiques pour obtenir un effet significatif, y compris avec la molécule de référence, l'œstradiol. Par ailleurs, l'éthinyl œstradiol, qui est une molécule de synthèse 10 à 100 fois plus active que le 17- $\beta$  œstradiol, est également utilisée comme témoin positif. Cela complique l'analyse bibliographique car le 17- $\beta$  œstradiol n'est plus la molécule de référence. Cela diminue également la sensibilité du test à l'égard des faibles doses ou de composés faiblement estrogéniques. C'est pourquoi, certaines études expérimentales présentent des travaux plus complets, visant à détecter des effets à de faibles doses.

#### **Composés faiblement estrogéniques**

Pour les composés faiblement estrogéniques, la détection *in vivo* se fait sur la base du test utéroprolifératif, avec des faibles doses, parfois pendant de plus longues périodes (test 28 jours par exemple). Les effets utéroprolifératifs sont déterminés par la mesure de paramètres plus fins dont l'épaisseur de l'épithélium de l'endomètre et le nombre de glandes épithéliales observées sur coupes histologiques (Mylonas 2003, Cline 2004). L'utéroprolifération peut être également estimée indirectement par l'incorporation de BRDU, un marqueur de prolifération cellulaire, ou encore par le test PNCA. Certaines études expérimentales incluent également des dosages immuno-histochimiques marqueurs d'estrogénicité sont celui du récepteur à la progestérone, de la clustérine de la lactoferrine ou du complément C3 (Diel 2004, Diel 2000, Newbold 2001) ainsi que des dosages sériques d'estrogènes et d'hormones gonadotropiques (LH et FSH), lesquelles régulent la production endogène d'œstrogènes (McGarvey 2001).

#### **Fenêtre d'exposition**

Si l'on s'en réfère aux hypothèses selon lesquelles, la toxicité des composés estrogéniques en liaison avec le développement croissant de certains cancers hormonaux (sein, cancer, prostate) résulte d'une exposition chronique à des doses physiologiques à une période critique (Davis 1993, Sharpe 1995) ; la fenêtre d'exposition revêt alors une importance prépondérante. Or, en l'état, les tests présentés ci-dessus ne sont pas adaptés pour établir ce type d'effet. Aussi, des études expérimentales sont également développées *in vivo* à des fins plus mécanistiques. Il s'agit d'études d'effets d'une exposition à faibles doses *in utero* ou en période néonatale sur le développement de malformations génitales et/ou sur les paramètres de fertilité ainsi que sur le développement de la glande mammaire (Colerangle 1997, Soto 1992).

#### **Effet de la composition du régime alimentaire**

Plusieurs études dénoncent certains régimes comme étant responsables de résultats inattendus parce qu'ils contiennent certains éléments perturbateurs qui influencent positivement ou négativement les effets escomptés. Les protéines de soja, largement utilisées dans les régimes du commerce, contiennent des niveaux variables en phyto-estrogènes ayant une activité estrogénique, les principaux étant la génistéine et la daïdzéine. Un tel régime peut influencer le développement et la différenciation sexuelle chez le Rat. Il peut affecter en particulier le contrôle du poids de l'utérus lors d'un test utéroprolifératif chez la rate immature et par conséquent biaiser le test (Casanova 1999). Dans le cadre d'études de toxicité en endocrinologie, il n'existe pas à l'heure actuelle de régime standard pour lequel on soit sûr de ne pas rencontrer certains problèmes d'interférence (Odum 2001, Allred 2001). Odum. ( 2001) ont comparé les effets de plusieurs régimes à taux variables en phyto-estrogènes et ont montré leur influence sur le développement des tissus reproducteurs. Les régimes RM1/RM3 (Rat and Mouse N° 1 ou 3, Special Diet Service) sont des régimes de référence donnés en période néonatale (RM3) et en



période post-sevrage (RM1). Ils contiennent un taux moyen de phyto-estrogènes (de 80 à 180 µg/g de régime). Le régime *Purina 5001* (Purina Mills), utilisé couramment dans les élevages, est à fort taux en phyto-estrogènes (plus de 290 µg/g de régime). Deux autres régimes (*AIN-76A* et *Teklad global 2016*, Harlan Teklad) sont totalement dépourvus d'isoflavones (moins de 5 µg/g de régime). Il en ressort que les différences observées sur le développement des organes reproducteurs sont faibles, et que les animaux nourris avec le régime *Purina 5001* sont généralement plus développés (poids corporel, organes génitaux). Ce curieux résultat peut s'expliquer par le fait que les régimes *AIN 76* et *Purina 5001* sont de compositions extrêmes, ce qui implique l'intervention éventuelle de facteurs autres que les phyto-estrogènes (palatabilité du régime, digestibilité, etc....), mais ce phénomène reste encore inexpliqué (Ashby 2000). Toutefois, ces mêmes auteurs ont testé du lait en poudre pour enfant à base de soja et ont observé chez des rats et des souris femelles immatures, une utérothrophie, et une ouverture vaginale et un premier œstrus plus précoce (Odum 2001). La sensibilité des rongeurs pour le test d'utérothrophie est donc réduite lors de l'utilisation d'un régime contenant des phyto-estrogènes, principalement à cause de l'augmentation du poids de l'utérus (Ashby 2000). La consommation de 16 mg de génistéine, pour 100 g de régime, ne donne pas une réponse utérothrophique détectable. Toutefois, une augmentation de 0,1% de ce composé dans le régime suffit à induire une forte réponse utérothrophique (Casanova 1999). Or la génistéine, au même titre que la daïdzéine, se trouve à une concentration qui varie en fonction du pourcentage de soja dans la ration alimentaire (Thigpen 1999). Il devient donc essentiel, dans de prochaines études de toxicité, de tenir compte de la composition des régimes administrés aux rongeurs car certains composés comme le soja, la luzerne mais aussi le maïs, renferment des phyto-estrogènes susceptibles d'influencer les résultats en perturbant les tests. Par ailleurs, on découvre de plus en plus de nouveaux perturbateurs endocriniens chez les végétaux (flavonoïdes hydroxylés, terpènes...) qui sont également susceptibles d'interférer (Canivenc-Lavier, communication personnelle).

## II-2 Chez d'autres espèces:

D'autres tests d'estrogénicité validés dans le contexte éco-toxicologique peuvent également être utilisés. Ces tests ont été développés suite à des modifications de paramètres écotoxicologiques observés sur les oiseaux ou sur les poissons et batraciens sous l'action de polluants (marées noires, pollutions des eaux par des pesticides, etc) dont les effets estrogéniques sont aujourd'hui établis. On peut citer entre autres, les dosages de vitellogénine (poissons, oiseaux), l'altération du sex ratio, l'altération morphologique des nageoires (test zébrafish) ou l'inhibition de la métamorphose des têtards chez les batraciens, l'altération des gonades et de la fertilité chez les reptiles, l'altération de la dureté de la coquille des œufs (oiseaux, poissons), et l'imposex chez les mollusques et crustacés. Dans le contexte de notre étude, ces tests ne constituent pas des modèles déterminants pour détecter des phyto-estrogènes mais peuvent amener des données supplémentaires, d'autant qu'ils sont plus sensibles que les tests *in vitro* développés sur levure ou sur MCF-7 (Folmar 2002).

## Références bibliographiques

---

- Allen, E., Doisy, E.A. (1923) An ovarianhormone: preliminary report on in localization, extraction and partial purification, and action in test animals. *JAMA*, 81, pp.819-21.
- Allred, C.D., Allred, K.F., Ju, Y.H., Virant, S.M., et al. (2001) Soy diets containing varying amounts of genistein stimulate growth of estrogen-dependent (MCF-7) tumors in a dose-dependent manner. *Cancer Res*, 61, pp.5045-50.
- Ashby, J., Tinwell, H., Lefevre, P.A., Odum, J., et al. (1997) Normal Sexual Development of Rats Exposed to Butyl Benzyl Phthalate from Conception to Weaning. *Regul Toxicol Pharmacol*, 26, pp.102-18.
- Ashby, J., Tinwell, H., Odum, J. (2000) Uterotrophic activity of a "phytoestrogen-free" rat diet. *Environ Health Perspect*, 108, pp.A12-3.
- Berthois, Y., Katzenellenbogen, J.A., Katzenellenbogen, B.S. (1986) Phenol red in tissue culture media is a weak estrogen: implications concerning the study of estrogen-responsive cells in culture. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 83, pp.2496-500.
- Biegel, L.B., Flaws, J.A., Hirshfield, A.N., O'Connor, J.C., et al. (1998) 90-day feeding and one-generation reproduction study in Crl:CD BR rats with 17 beta-estradiol. *Toxicol Sci*, 44, pp.116-42.
- Brueggemeier, R.W., Gu, X., Mobley, J.A., Joomprabutra, S., et al. (2001) Effects of phytoestrogens and synthetic combinatorial libraries on aromatase, estrogen biosynthesis, and metabolism. *Ann N Y Acad Sci*, 948, pp.51-66.
- Casanova, M., You, L., Gaido, K.W., Archibeque-Engle, S., et al. (1999) Developmental effects of dietary phytoestrogens in Sprague-Dawley rats and interactions of genistein and daidzein with rat estrogen receptors alpha and beta in vitro. *Toxicol Sci*, 51, pp.236-44.
- Cline, J.M., Franke, A.A., Register, T.C., Golden, D.L., et al. (2004) Effects of dietary isoflavone aglycones on the reproductive tract of male and female mice. *Toxicol Pathol*, 32, pp.91-9.
- Colerangle, J.B., Roy, D. (1997) Profound effects of the weak environmental estrogen-like chemical bisphenol A on the growth of the mammary gland of Noble rats. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 60, pp.153-60.

Davis, D.L., Bradlow, H.L., Wolff, M., Woodruff, T., et al. (1993) Medical hypothesis: xenoestrogens as preventable causes of breast cancer. *Environ Health Perspect*, 101, pp.372-7.

Desaulniers, D., Leingartner, K., Zacharewski, T., Foster, W.G. (1998) Optimization of an MCF7-E3 cell proliferation assay and effects of environmental pollutants and industrial chemicals. *Toxicol in Vitro*, 12, pp.409-22.

Diel, P., Schmidt, S., Vollmer, G., Janning, P., et al. (2004) Comparative responses of three rat strains (DA/Han, Sprague-Dawley and Wistar) to treatment with environmental estrogens. *Arch Toxicol*, 78, pp.183-93.

Diel, P., Schulz, T., Smolnikar, K., Strunck, E., et al. (2000) Ability of xeno- and phytoestrogens to modulate expression of estrogen-sensitive genes in rat uterus: estrogenicity profiles and uterotrophic activity. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 73, pp.1-10.

Dodge, J.A., Glasebrook, A.L., Magee, D.E., Phillips, D.L., et al. (1996) Environmental estrogens: effects on cholesterol lowering and bone in the ovariectomized rat. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 59, pp.155-61.

Folmar, L.C., Hemmer, M.J., Denslow, N.D., Kroll, K., et al. (2002) A comparison of the estrogenic potencies of estradiol, ethynylestradiol, diethylstilbestrol, nonylphenol and methoxychlor in vivo and in vitro. *Aquat Toxicol*, 60, pp.101-10.

Gray, L.E., Jr. (1998) Tiered screening and testing strategy for xenoestrogens and antiandrogens. *Toxicol Lett*, 102-103, pp.677-80.

Jones, R.C., Edgren, R.A. (1973) The effects of various steroids on the vaginal histology in the rat. *Fertil Steril*, 24, pp.284-91.

Le Bail, J.C., Varnat, F., Nicolas, J.C., Habrioux, G. (1998) Estrogenic and antiproliferative activities on MCF-7 human breast cancer cells by flavonoids. *Cancer Lett*, 130, pp.209-16.

Liu, Y., Teng, C.T. (1994) Identification of the estrogen sensitive marker in human endometrial carcinoma RL95-2 cells. *Mol Cell Endocrinol*, 101, pp.167-71.

McGarvey, C., Cates, P.A., Brooks, A., Swanson, I.A., et al. (2001) Phytoestrogens and gonadotropin-releasing hormone pulse generator activity and pituitary luteinizing hormone release in the rat. *Endocrinology*, 142, pp.1202-8.

Miksicek, R.J. (1995) Estrogenic flavonoids: structural requirements for biological activity. *Proc Soc Exp Biol Med*, 208, pp.44-50.

Miodini, P., Fioravanti, L., Di Fronzo, G., Cappelletti, V. (1999) The two phyto-oestrogens genistein and quercetin exert different effects on oestrogen receptor function. *Br J Cancer*, 80, pp.1150-5.

Mylonas, I., Jeschke, U., Makovitzky, J., Winkler, L., et al. (2003) Immunohistochemical expression of steroid receptors and glycodefin A in isolated proliferative human endometrial glandular cells after stimulation with tamoxifen and phytoestrogens (genistein and daidzein). *Anticancer Res*, 23, pp.1119-25.

Nagel, S.C., vom Saal, F.S., Thayer, K.A., Dhar, M.G., et al. (1997) Relative binding affinity-serum modified access (RBA-SMA) assay predicts the relative in vivo bioactivity of the xenoestrogens bisphenol A and octylphenol. *Environ Health Perspect*, 105, pp.70-6.

Newbold, R.R., Jefferson, W.N., Padilla-Banks, E., Walker, V.R., et al. (2001) Cell response endpoints enhance sensitivity of the immature mouse uterotrophic assay. *Reprod Toxicol*, 15, pp.245-52.

O'Connor, J.C., Cook, J.C., Craven, S.C., Van Pelt, C.S., et al. (1996) An in vivo battery for identifying endocrine modulators that are estrogenic or dopamine regulators. *Fundam Appl Toxicol*, 33, pp.182-95.

O'Connor, J.C., Cook, J.C., Slone, T.W., Makovec, G.T., et al. (1998b) An ongoing validation of a Tier I screening battery for detecting endocrine-active compounds (EACs). *Toxicol Sci*, 46, pp.45-60.

O'Connor, J.C., Frame, S.R., Biegel, L.B., Cook, J.C., et al. (1998a) Sensitivity of a Tier I screening battery compared to an in utero exposure for detecting the estrogen receptor agonist 17 beta-estradiol. *Toxicol Sci*, 44, pp.169-84.

Odum, J., Lefevre, P.A., Tittensor, S., Paton, D., et al. (1997) The rodent uterotrophic assay: critical protocol features, studies with nonyl phenols, and comparison with a yeast estrogenicity assay. *Regul Toxicol Pharmacol*, 25, pp.176-88.

Odum, J., Tinwell, H., Jones, K., Van Miller, J.P., et al. (2001) Effect of rodent diets on the sexual development of the rat. *Toxicol Sci*, 61, pp.115-27.

Organisation for Economic Cooperation and Development (1995) OECD Guideline n°407 . Test guidelines for testing of chemicals, section4, health effects 2 july 1995. Paris, OECD.

Organisation for Economic Cooperation and Development (1999) OECD for guidance and protocol for the prevalidation of the uterotrophic screening assay 19-20 april 1999. Paris, OECD.

Organisation for Economic Cooperation and Development (2002) Report of the first meeting of the OECD endocrine disrupter testing and assessment (EDTA) working group 10-11 mars 2002. Paris, OECD.

Petit, F., Le Goff, P., Cravedi, J.P., Valotaire, Y., et al. (1997) Two complementary bioassays for screening the estrogenic potency of xenobiotics: recombinant yeast for trout estrogen receptor and trout hepatocyte cultures. *J Mol Endocrinol*, 19, pp.321-35.

Ramos, J.G., Varayoud, J., Kass, L., Rodriguez, H., et al. (2000) Estrogen and progesterone modulation of eosinophilic infiltration of the rat uterine cervix. *Steroids*, 65, pp.409-14.

Sharpe, R.M., Fisher, J.S., Millar, M.M., Jobling, S., et al. (1995) Gestational and lactational exposure of rats to xenoestrogens results in reduced testicular size and sperm production. *Environ Health Perspect*, 103, pp.1136-43.

So, F.V., Guthrie, N., Chambers, A.F., Carroll, K.K. (1997) Inhibition of proliferation of estrogen receptor-positive MCF-7 human breast cancer cells by flavonoids in the presence and absence of excess estrogen. *Cancer Lett*, 112, pp.127-33.

Soto, A.M., Lin, H., Justicia, R.M. (1992) An "in culture" bioassay to assess the estrogenicity of xenobiotics (E-Screen). IN: Colborn, T.Clement, C. ed. *Chemical-induced alterations in sexual and functional development : the wildlif connection*. Princeton (NJ), PrincetonScientific Pub.

Stroheker, T., Chagnon, M.C., Pinnert, M.F., Berges, R., et al. (2003) Estrogenic effects of food wrap packaging xenoestrogens and flavonoids in female Wistar rats: a comparative study. *Reprod Toxicol*, 17, pp.421-32.

Thigpen, J.E., Setchell, K.D., Ahlmark, K.B., Locklear, J., et al. (1999) Phytoestrogen content of purified, open- and closed-formula laboratory animal diets. *Lab Anim Sci*, 49, pp.530-6.

Zacharewski, T. (1998) Identification and assessment of endocrine disruptors: limitations of in vivo and in vitro assays. *Environ Health Perspect*, 106 Suppl 2, pp.577-82.

## **ANNEXE 2**

---

### **DONNÉES DE COMPOSITION DES ALIMENTS EN ISOFLAVONES (DAÏDZÉINE ET GÉNISTÉINE) ET ESTIMATION DES APPORTS DE CES SUBSTANCES, EN FRANCE**

#### **Sommaire**

#### **Annexe 2 a : Données de composition**

I- Table de composition des aliments

II- Précisions concernant la table de composition en génistéine et daïdzéine des aliments consommés en France

II-1 Précisions sur la méthodologie

II-2 Précisions sur les teneurs en isoflavones de certaines catégories alimentaires

II-3 Limites de la table de composition

II-4 Récapitulatif relatif à la disponibilité des données de composition

#### **Annexe 2 b : Estimation des apports**

I- Apports en isoflavones, hors aliments à base de soja

I-1 Chez les adultes de 15 ans et plus

I-2 Chez les enfants (3 à 14 ans)

II- Apport, hors aliments à base de soja, en daïdzéine et génistéine, par classe d'âge et de sexe

III- Données de consommation d'aliments à base de soja – desserts à base de soja, tofu, tonyu- par sexe et par classe d'âge

IV- Estimation des apports en isoflavones par les aliments à base de soja

IV-1 Chez les adultes (15 ans et plus)

IV-2 Chez les enfants (3 à 14 ans)

V- Estimation des apports en isoflavones par les aliments à base de soja détaillé par classe d'âge et de sexe

#### **Annexe 2 c : Évolution des ventes des produits à base de soja entre 1996 et 2001**

I- Précisions concernant la méthodologie

II- Précisions concernant la consommation journalière des aliments à base de soja (tofu, tonyu, aliments à base de soja)

III- Précisions concernant les autres marchés susceptibles de contenir des isoflavones

## Annexe 2 a : Données de composition (Oseredczuk 2004)

### I- TABLE DE COMPOSITION DES ALIMENTS

Catégorie	Aliment	génistéine (µg/100g)	daïdzéine (µg/100g)
Aliments à base de soja	Boisson au soja	3730	3402
Aliments à base de soja	Tofu	14770	10316
Aliments à base de soja	Dessert au soja aux ferments vivants	17475	17300
Abats	Cervelle de porc cuite	0	0
Abats	Cervelle de veau cuite	0	0
Abats	Coeur de boeuf cuit	0	0
Abats	Coeur sans autre précision	0	0
Abats	Foie d'agneau cuit	0	0
Abats	Foie de génisse cuit	0	0
Abats	Foie de veau cuit	0	0
Abats	Foie de volaille cuit	0	0
Abats	Langue de boeuf cuite	0	0
Abats	Langue de veau	0	0
Abats	Ris de veau braisé	0	0
Abats	Rognon de porc	0	0
Abats	Rognon de porc cuit	0	0
Abats	Rognon de veau	0	0
Abats	Rognon sans autre précision cuit	0	0
Aliments destinés à une alimentation particulière	Boisson de l'effort		
Aliments destinés à une alimentation particulière	Édulcorant de synthèse	0	0
Aliments destinés à une alimentation particulière	Substitut de repas		
Autres céréales	Blé soufflé pour petit déjeuner	15,2	18,8
Autres céréales	Flocons d'avoine cuit à l'eau, porridge		
Autres céréales	Germe de blé		
Autres céréales	Maïs éclaté à l'huile salé, pop corn		
Autres graisses	Graisse d'oie	0	0
Autres graisses	Lard	0	0
Autres graisses	Saindoux	0	0
Beurre	Beurre	tr	tr
Beurre	Beurre ajouté	tr	tr
Beurre	Beurre allégé	tr	tr
Beurre	Beurre de cuisson ajouté	tr	tr
Beurre	Beurre demi-sel	tr	tr
Biscuits	Amuse-gueule à base de maïs		
Biscuits	Barre confiturée AUTRE type Chamonix		
Biscuits	Barre confiturée fourrée type Fruitolu		
Biscuits	Biscuit à la cuillère, champagne (biscuit)		9,9
Biscuits	Biscuit apéritif au fromage		
Biscuits	Biscuit apéritif salé		
Biscuits	Biscuit chocolaté		
Biscuits	Biscuit nappé de chocolat type Pépito		
Biscuits	Biscuit nappé de chocolat type Petit Écolier		

Catégorie	Aliment	génistéine (µg/100g)	daïdzéine (µg/100g)
Biscuits	Biscuit petit beurre		
Biscuits	Biscuit sec		1,1
Biscuits	Biscuit sec AUTRE Sirtaki (raisins secs), Tuiles aux amandes	2,5	1,2
Biscuits	Biscuit sec chocolaté AUTRE type Mikado		
Biscuits	Biscuit sec chocolaté type LU P'tit déjeuner		
Biscuits	Biscuit sec feuilleté type Petits Cœurs nature, Palmito, Feuilleté doré		
Biscuits	Brownie au chocolat et aux noix		5,1
Biscuits	Cake	3,7	6,2
Biscuits	Cookie		
Biscuits	Galette ou sablé (Sablé des Flandres, Galette St Sauveur, Beurré Nantais)		1,1
Biscuits	Gaufrette confiturée type Paille d'or		
Biscuits	Gaufrette fourrée crème grasse type Résille d'or ou Schock		
Biscuits	Génoise confiturée nappée type Barquette fruits Mini roulés (Captain choc)		
Biscuits	Génoise enrobée de chocolat Type Pim's, gâteau fourré (Captain Choc)		4,1
Biscuits	Goûter chocolaté fourré type Prince, Crock Image		
Biscuits	Langue de chat		
Biscuits	Madeleine		
Biscuits	Madeleine confiturée type Coqueline		
Biscuits	Pain d'épices		
Biscuits	Pâtisserie chocolatée type Napolitain Mini-roulé		
Biscuits	Quatre-quarts		
Biscuits	Tuile aux amandes (biscuit)		
Boissons alcoolisées	Apéritif à base de vin ou vermouth		
Boissons alcoolisées	Apéritif à la gentiane		
Boissons alcoolisées	Bière brune		
Boissons alcoolisées	Bière export		
Boissons alcoolisées	Bière ordinaire		
Boissons alcoolisées	Bière pression		
Boissons alcoolisées	Champagne (boisson alcoolisée)		
Boissons alcoolisées	Cidre brut		
Boissons alcoolisées	Cidre doux		
Boissons alcoolisées	Cognac, Armagnac		
Boissons alcoolisées	Eau de vie		
Boissons alcoolisées	Gin		
Boissons alcoolisées	Kir, Kir royal		
Boissons alcoolisées	Liqueur		
Boissons alcoolisées	Panaché		
Boissons alcoolisées	Pastis		
Boissons alcoolisées	Pastis prêt à boire (1+5)		
Boissons alcoolisées	Pétillant de fruits		
Boissons alcoolisées	Porto		
Boissons alcoolisées	Rhum		
Boissons alcoolisées	Sangria		
Boissons alcoolisées	Vin blanc		
Boissons alcoolisées	Vin blanc mousseux		
Boissons alcoolisées	Vin doux		
Boissons alcoolisées	Vin rouge 09°		

Catégorie	Aliment	génistéine (µg/100g)	daïdzéine (µg/100g)
Boissons alcoolisées	Vin rouge 10°		
Boissons alcoolisées	Vin rouge 11°		
Boissons alcoolisées	Vin rouge 12°		
Boissons alcoolisées	Vin sans autre précision		
Boissons alcoolisées	Vodka		
Boissons alcoolisées	Whisky		
Boissons chaudes	Boisson maltée sucrée en poudre		
Boissons chaudes	Cacao amer en poudre		
Boissons chaudes	Café noir	tr	0,8
Boissons chaudes	Poudre cacaoïée et sucrée pour boisson au chocolat		
Boissons chaudes	Thé infusé		
BRSA	Ananas jus à base de concentré	0	0
BRSA	Apéritif anisé sans alcool		
BRSA	Bière sans alcool		
BRSA	Boisson anisée sans alcool		
BRSA	Boisson au cacao sucrée (type Cacolac)		
BRSA	Boisson au jus d'orange gazéifié		
BRSA	Boisson aux extraits de thé		
BRSA	Boisson aux fruits exotiques		
BRSA	Boisson sans autre précision		
BRSA	Carotte jus pasteurisé	0	0
BRSA	Citron préparation à diluer	0	0
BRSA	Gini		
BRSA	Jus d'abricot		
BRSA	Jus de citron frais	0	0
BRSA	Jus de lime (citron vert) en conserve		
BRSA	Jus de pamplemousse à base de concentré		
BRSA	Jus de pamplemousse frais		
BRSA	Jus de pomme à base de concentré		
BRSA	Jus de raisin pur pasteurisé	0	0
BRSA	Jus de tomate pur pasteurisé		
BRSA	Jus d'orange à base de concentré, Minute Maid	0	0
BRSA	Jus d'orange frais non sucré	0	0
BRSA	Limonade, Seven'Up, Sprite		
BRSA	Mangue nectar pasteurisé		
BRSA	Nectar d'abricot	0	0
BRSA	Nectar de fruit exotique		
BRSA	Nectar de mangue pasteurisé		
BRSA	Nectar de poire	0	0
BRSA	Nectar d'orange		
BRSA	Noix de coco lait		
BRSA	Orangina, Soda orange	0	0
BRSA	Perrier	0	0
BRSA	Schweppes	0	0
BRSA	Sirop aux extraits de fruits		
BRSA	Soda au cola light, Coca-cola light, Pepsi-Cola light		
BRSA	Soda au cola, Coca-Cola, Pepsi-Cola		

Catégorie	Aliment	génistéine (µg/100g)	daïdzéine (µg/100g)
BRSA	Soda au cola, Coca-Cola, Pepsi-Cola		
BRSA	Soda aux fruits		
BRSA	Soda light		
Café	Café en poudre soluble	tr	50,3
Café	Café noir (boisson prête à la consommation)	tr	0,8
Céréales pour petit déjeuner	Blé soufflé pour petit déjeuner	15,2	18,8
Céréales pour petit déjeuner	Céréales chocolatées pour petit déjeuner	4,9	16,4
Céréales pour petit déjeuner	Céréales sans autre précision pour petit déjeuner	5,8	16,3
Céréales pour petit déjeuner	Céréales sucrées pour petit déjeuner	4,9	16,4
Céréales pour petit déjeuner	Farine bouillie petit déjeuner enfant		
Céréales pour petit déjeuner	Germe de blé		
Céréales pour petit déjeuner	Muesli	7,2	17,4
Céréales pour petit déjeuner	Pétales de maïs enrichi	0	17,9
Céréales pour petit déjeuner	Riz soufflé enrichi	2,7	10,7
Charcuterie	Andouille	0	0
Charcuterie	Andouillette	0	0
Charcuterie	Bacon fumé cuit	0	0
Charcuterie	Boudin blanc	0	0
Charcuterie	Boudin noir cuit	0	0
Charcuterie	Cervelas	0	0
Charcuterie	Chair à saucisse	0	0
Charcuterie	Chipolata	0	0
Charcuterie	Chorizo sec	0	0
Charcuterie	Coppa	0	0
Charcuterie	Foie gras	0	0
Charcuterie	Fromage de tête	0	0
Charcuterie	Galantine	0	0,6
Charcuterie	Jambon cru	0	0
Charcuterie	Jambon cuit	0	0
Charcuterie	Jambon cuit DD (découenné dégraissé)	0	0
Charcuterie	Jambon cuit supérieur DD (découenné dégraissé)		
Charcuterie	Jambon fumé	0	0
Charcuterie	Jambon sec DD (découenné dégraissé)	0	0
Charcuterie	Lard maigre frais	0	0
Charcuterie	Lardons	0	0
Charcuterie	Merguez	0	0
Charcuterie	Mortadelle	0	0
Charcuterie	Mousse de poisson		4
Charcuterie	Pâté à base de poisson ou de crustacés		
Charcuterie	Pâté de campagne		
Charcuterie	Pâté de foie de porc		
Charcuterie	Pâté de foie de volaille		
Charcuterie	Pâté de lapin		
Charcuterie	Pâté de tête		
Charcuterie	Pâté en croûte		
Charcuterie	Poitrine de porc fumée	0	0

Catégorie	Aliment	génistéine (µg/100g)	daïdzéine (µg/100g)
Charcuterie	Rillettes	0	0
Charcuterie	Rosette ou Fuseau	0	0
Charcuterie	Salami	0	0
Charcuterie	Saucisse alsacienne fumée (Gendarme)	0	0
Charcuterie	Saucisse cocktail	0	0
Charcuterie	Saucisse de Francfort	0	0
Charcuterie	Saucisse de Montbéliard	0	0
Charcuterie	Saucisse de Morteau	0	0
Charcuterie	Saucisse de Strasbourg	0	0
Charcuterie	Saucisse de Toulouse	0	0
Charcuterie	Saucisse sèche	0	0
Charcuterie	Saucisson à l'ail	0	0
Charcuterie	Saucisson sec	0	0
Charcuterie	Snack, saucisse	0	0
Charcuterie	Tarama		
Charcuterie	Terrine de canard		
Charcuterie	Terrine ou mousse de légumes		6,1
Charcuterie	Tripes	0	0
Chocolat	Barre chocolatée biscuitée		0,6
Chocolat	Barre chocolatée enrobée type Mars		
Chocolat	Barre glacée type Mars, Nuts		
Chocolat	Barre sucrée pour enfant type Pingui, Coeur de lait		
Chocolat	Chocolat à croquer		
Chocolat	Chocolat au lait		
Chocolat	Chocolat au lait aux fruits secs (amande, noisette)		
Chocolat	Chocolat blanc		
Chocolat	Poudre cacaoïée et sucrée pour boisson au chocolat		
Compotes et fruits cuits	Abricot au sirop léger en conserve	0	0
Compotes et fruits cuits	Ananas au sirop en conserve	0	0
Compotes et fruits cuits	Compote allégée	0	1,5
Compotes et fruits cuits	Compote de pomme en conserve		2,2
Compotes et fruits cuits	Macédoïne de fruits au sirop conserve	0,3	0
Compotes et fruits cuits	Pamplemousse au sirop	19,0	24,9
Compotes et fruits cuits	Pêche au sirop en conserve	1	0,5
Compotes et fruits cuits	Poire au sirop en conserve	1	0,2
Condiments et sauces	Assaisonnement ajouté		
Condiments et sauces	Ciboule ou Ciboulette fraîche		
Condiments et sauces	Cube pour bouillon		
Condiments et sauces	Curry		
Condiments et sauces	Ketchup	2,9	
Condiments et sauces	Mayonnaïse allégée		
Condiments et sauces	Mayonnaïse sans autre précision		
Condiments et sauces	Moutarde		
Condiments et sauces	Olive noire en saumure	0	0
Condiments et sauces	Olive verte en saumure	0	0
Condiments et sauces	Poivre moulu		



Catégorie	Aliment	génistéine (µg/100g)	daïdzéine (µg/100g)
Condiments et sauces	Sauce Barbecue	1,32	0
Condiments et sauces	Sauce béarnaise		
Condiments et sauces	Sauce de soja	1368	937
Condiments et sauces	Sauce hollandaise		
Condiments et sauces	Sauce Mornay		
Condiments et sauces	Sauce tomate à la viande	1,8	0
Condiments et sauces	Sauce tomate sans viande	3,0	0
Condiments et sauces	Sauce vinaigrette à l'huile d'olive		
Condiments et sauces	Sauce vinaigrette allégée		
Condiments et sauces	Sauve béchamel		
Condiments et sauces	Sel de mer	0	0
Condiments et sauces	Sel fin	0	0
Condiments et sauces	Vinaigre		
Crustacés et mollusques	Bigorneau cuit	0	0
Crustacés et mollusques	Bulot ou Buccin cuit	0	0
Crustacés et mollusques	Calmar frit	0	0
Crustacés et mollusques	Coquille St Jacques	0	0
Crustacés et mollusques	Coquille St Jacques crue	0	0
Crustacés et mollusques	Crabe en conserve	0	0
Crustacés et mollusques	Crabe ou Tourteau poché	0	0
Crustacés et mollusques	Crevette cuite	0	0
Crustacés et mollusques	Escargot	0	0
Crustacés et mollusques	Fruits de mer	0	0
Crustacés et mollusques	Huître	0	0
Crustacés et mollusques	Langouste	0	0
Crustacés et mollusques	Langoustine frite	0	0
Crustacés et mollusques	Moule cuite à l'eau	0	0
Crustacés et mollusques	Seiche	0	0
Eaux	Eau de source	0	0
Eaux	Eau du robinet	0	0
Eaux	Eau minérale gazeuse	0	0
Eaux	Eau minérale plate	0	0
Eaux	Eau minérale sans autre précision	0	0
Entrées	Céleri rémoulade	2,7	0
Entrées	Champignon à la grecque	1,6	0
Entrées	Crudités sans autre indication	0,5	2,2
Entrées	Nem, pâté impérial	56,5	3,1
Entrées	Rouleau de printemps	56,5	3,1
Entrées	Salade de thon et légumes en conserve	3,1	1,6
Entrées	Salade verte sans assaisonnement	0	0
Entrées	Taboulé		
Entremets	Bavarois		3,3
Entremets	Chantilly		
Entremets	Clafoutis		6,6
Entremets	Crème anglaise		

Catégorie	Aliment	génistéine (µg/100g)	daïdzéine (µg/100g)
Entremets	Crème brûlée		3,2
Entremets	Crème caramel		5,8
Entremets	Crème dessert appertisée type Mont Blanc		
Entremets	Crème dessert industrielle chocolat type Danette		
Entremets	Crème pâtissière		
Entremets	Dessert pour enfant type Surpriz, Grain de Malice		1,1
Entremets	Dessert sans autre précision		
Entremets	Flan nappé caramel Type Flanby, Flandise		
Entremets	Gâteau de riz ou de semoule	2,5	1,2
Entremets	Ile flottante		
Entremets	Lait gélifié type Dany, Créola, Yopi (chocolat, vanille caramel)		
Entremets	Liégeois, Viennois (chocolat, café et assimilé)		
Entremets	Mousse au chocolat		
Entremets	Mousse aux fruits		
Entremets	Omelette norvégienne		
Entremets	Pain perdu		
Entremets	Pêche Melba, poire Belle Hélène		
Entremets	Profiteroles		2,2
Entremets	Riz au lait		1,7
Entremets	Semoule au lait		1,7
Entremets	Tiramisu		2,2
Fromages	Apéricube	tr	tr
Fromages	Beaufort	tr	tr
Fromages	Bleu d'Auvergne	tr	tr
Fromages	Bleu de Bresse, Mini Bleu de Bresse	tr	tr
Fromages	Bleu des Causses	tr	tr
Fromages	Bleu sans autre précision (fromage)	tr	tr
Fromages	Brie	tr	tr
Fromages	Camembert 40% M.G.	tr	tr
Fromages	Camembert 45% M.G.	tr	tr
Fromages	Camembert et apparenté 50% M.G.	tr	tr
Fromages	Camembert sans autre précision	tr	tr
Fromages	Cantal	tr	tr
Fromages	Caprice des dieux	tr	tr
Fromages	Carré de l'Est	tr	tr
Fromages	Chamois d'Or	tr	tr
Fromages	Chaource	tr	tr
Fromages	Chaumes	tr	tr
Fromages	Chavroux (chèvre individuel)	tr	tr
Fromages	Cheddar	tr	tr
Fromages	Comté	tr	tr
Fromages	Coulommiers	tr	tr
Fromages	Crottin	tr	tr
Fromages	Édam	tr	tr
Fromages	Emmental	tr	tr
Fromages	Epoisses	tr	tr

Catégorie	Aliment	génistéine (µg/100g)	daïdzéine (µg/100g)
Fromages	Féta, cottage	tr	tr
Fromages	Fol épi (fromage)	tr	tr
Fromages	Fromage à cuire type Menu Fromage, Crousticho, Saint Chevrin	tr	tr
Fromages	Fromage allégé (20-25% M.G.) à l'exclusion du fromage blanc	tr	tr
Fromages	Fromage de chèvre demi sec	tr	tr
Fromages	Fromage de chèvre frais	tr	tr
Fromages	Fromage de chèvre pâte molle	tr	tr
Fromages	Fromage de chèvre sec	tr	tr
Fromages	Fromage fondu 45% M.G.	tr	tr
Fromages	Fromage fondu 65% M.G.	tr	tr
Fromages	Fromage fondu 70% M.G.	tr	tr
Fromages	Fromage genre Bonbel, Babybel	tr	tr
Fromages	Fromage pâte ferme 20-30% M.G.	tr	tr
Fromages	Fromage sans autre précision	tr	tr
Fromages	Gorgonzola	tr	tr
Fromages	Gouda	tr	tr
Fromages	Gruyère	tr	tr
Fromages	Hollande (fromage)	tr	tr
Fromages	Kiri	tr	tr
Fromages	Leerdammer	tr	tr
Fromages	Livarot	tr	tr
Fromages	Maasdam	tr	tr
Fromages	Maroilles	tr	tr
Fromages	Mimolette	tr	tr
Fromages	Morbier	tr	tr
Fromages	Munster	tr	tr
Fromages	Neufchâtel	tr	tr
Fromages	Parmesan	tr	tr
Fromages	Pavé d'Affinois	tr	tr
Fromages	Pont l'Évêque	tr	tr
Fromages	Port Salut	tr	tr
Fromages	P'tit Louis	tr	tr
Fromages	Pyrénées (fromage)	tr	tr
Fromages	Raclette	tr	tr
Fromages	Rambol aux noix	tr	tr
Fromages	Reblochon	tr	tr
Fromages	Roquefort	tr	tr
Fromages	Rouy	tr	tr
Fromages	Saint-Albray	tr	tr
Fromages	Saint-Marcellin	tr	tr
Fromages	Saint-Nectaire	tr	tr
Fromages	Saint-Paulin	tr	tr
Fromages	Samos 99	tr	tr
Fromages	Selles-sur-Cher	tr	tr
Fromages	Suprême	tr	tr
Fromages	Tomme	tr	tr

Catégorie	Aliment	génistéine (µg/100g)	daïdzéine (µg/100g)
Fromages	Vache qui rit	tr	tr
Fromages	Vacherin	tr	tr
Fromages	Vieux Pané	tr	tr
Fruits	Abricot frais	0	0
Fruits	Ananas frais	0	0
Fruits	Banane fraîche	0	0
Fruits	Cassis frais		
Fruits	Cerise fraîche	0	0
Fruits	Citron frais		
Fruits	Clémentine ou Mandarine	2,9	0,3
Fruits	Figue fraîche	1,4	0,5
Fruits	Fraise fraîche	4,6	0,5
Fruits	Framboise fraîche	0	0
Fruits	Fruit de la Passion	10,8	6,6
Fruits	Gélatine	0	0
Fruits	Grenade fraîche	0	0
Fruits	Groseille fraîche	178	46,1
Fruits	Kaki frais		
Fruits	Kiwi frais	0	0
Fruits	Litchi au sirop en conserve	0	0
Fruits	Litchi frais	0	0
Fruits	Mangue fraîche	3,2	3,8
Fruits	Melon frais	0,4	0,6
Fruits	Mirabelle fraîche	2,5	0,0
Fruits	Mûre (Ronce) fraîche		
Fruits	Mûre noire (Mûrier) fraîche		
Fruits	Myrtille fraîche		
Fruits	Nectarine non pelée fraîche	0	0
Fruits	Orange fraîche	0	0
Fruits	Pamplemousse	27,1	35,6
Fruits	Pastèque fraîche	0	0
Fruits	Pêche non pelée fraîche	0	0
Fruits	Poire non pelée fraîche	0,2	0
Fruits	Pomélo dit Pamplemousse	27,1	35,6
Fruits	Pomme non pelée fraîche		2,5
Fruits	Raisin blanc frais	0	0
Fruits	Raisin noir frais	0	0
Fruits secs et graines oléagineuses	Abricot sec	tr	4,3
Fruits secs et graines oléagineuses	Amande	0	0
Fruits secs et graines oléagineuses	Cacahuète	34,5	17,2
Fruits secs et graines oléagineuses	Cacahuète grillée salée	17,2	3,7
Fruits secs et graines oléagineuses	Châtaigne	0,4	0
Fruits secs et graines oléagineuses	Crème de marrons vanillée en conserve	0,4	
Fruits secs et graines oléagineuses	Datte sèche	5,2	1,7
Fruits secs et graines oléagineuses	Figue sèche	4,2	1,8
Fruits secs et graines oléagineuses	Fruits séchés pour apéritif (Apéritifs)	13,1	6,2

Catégorie	Aliment	génistéine (µg/100g)	daïdzéine (µg/100g)
Fruits secs et graines oléagineuses	Noisette	18,5	5,5
Fruits secs et graines oléagineuses	Noix	tr	2,5
Fruits secs et graines oléagineuses	Noix de cajou salée		
Fruits secs et graines oléagineuses	Noix de coco amande sèche	0	0
Fruits secs et graines oléagineuses	Noix du Brésil		1,2
Fruits secs et graines oléagineuses	Pâte d'amande	0	0
Fruits secs et graines oléagineuses	Pâte d'arachide		
Fruits secs et graines oléagineuses	Pistache rôtie salée		
Fruits secs et graines oléagineuses	Pruneau sec	10,9	3,7
Fruits secs et graines oléagineuses	Purée de marron en conserve	0,4	
Fruits secs et graines oléagineuses	Raisin sec	62,3	29,5
Fruits secs et graines oléagineuses	Sésame graine	1,7	3,7
Fruits secs et graines oléagineuses	Tournesol graine	tr	tr
Glaces	Glace au lait ou crème glacée en bac ou sans autre précision		
Glaces	Glace au lait ou crème glacée en cornet		
Glaces	Glace au lait ou crème glacée type Esquimau		
Huiles	Huile d'arachide	0	0
Huiles	Huile de colza	0	0
Huiles	Huile de cuisson ajoutée	0	0
Huiles	Huile de noix	0	0
Huiles	Huile de poisson	0	0
Huiles	Huile de tournesol	0	0
Huiles	Huile d'olive vierge	0	0
Huiles	Huile mélangée équilibrée type Isio 4	0	0
Lait	Bifidus, Lait fermenté nature	tr	tr
Lait	Lait aromatisé UHT	tr	tr
Lait	Lait de chèvre		
Lait	Lait de croissance infantile		
Lait	Lait demi écrémé en poudre	tr	tr
Lait	Lait demi écrémé pasteurisé	tr	tr
Lait	Lait demi écrémé UHT	tr	tr
Lait	Lait écrémé en poudre	tr	tr
Lait	Lait écrémé UHT	tr	tr
Lait	Lait entier concentré	tr	tr
Lait	Lait entier concentré sucré	tr	tr
Lait	Lait entier cru	tr	tr
Lait	Lait entier pasteurisé	tr	tr
Lait	Lait entier UHT	tr	tr
Lait	Lait fermenté (Fjord), lait ribot type Yorik	tr	tr
Lait	Lait fermenté type Actimel LC1 Yakult	tr	tr
Légumes (hors pommes de terre)	Ail	tr	0
Légumes (hors pommes de terre)	Artichaut		
Légumes (hors pommes de terre)	Asperge cuite	tr	28,9
Légumes (hors pommes de terre)	Aubergine crue	0,7	0,1
Légumes (hors pommes de terre)	Aubergine cuite	0,6	0,3
Légumes (hors pommes de terre)	Avocat	0	0

Catégorie	Aliment	génistéine (µg/100g)	daïdzéine (µg/100g)
Légumes (hors pommes de terre)	Bette cuite		
Légumes (hors pommes de terre)	Betterave rouge	0	0
Légumes (hors pommes de terre)	Brocoli cuit	0,3	14,8
Légumes (hors pommes de terre)	Cardon		
Légumes (hors pommes de terre)	Carotte crue	0	0
Légumes (hors pommes de terre)	Carotte cuite	0	0
Légumes (hors pommes de terre)	Carotte en conserve	0	0
Légumes (hors pommes de terre)	Céleri branche appertisé	0	0
Légumes (hors pommes de terre)	Céleri branche cru	0	0
Légumes (hors pommes de terre)	Céleri branche cuit	0	0
Légumes (hors pommes de terre)	Céleri-rave cru	4,5	0
Légumes (hors pommes de terre)	Céleri-rave cuit	3,4	0
Légumes (hors pommes de terre)	Champignon appertisé	1,5	0,1
Légumes (hors pommes de terre)	Champignon cru	1,6	0,1
Légumes (hors pommes de terre)	Champignon de Paris appertisé	1,6	0,1
Légumes (hors pommes de terre)	Chicorée frisée crue		
Légumes (hors pommes de terre)	Chou blanc	0,3	0
Légumes (hors pommes de terre)	Chou de Bruxelles appertisé	0	tr
Légumes (hors pommes de terre)	Chou de Bruxelles cuit	0	tr
Légumes (hors pommes de terre)	Chou rouge cru	0	0
Légumes (hors pommes de terre)	Chou rouge cuit à l'eau	2,4	0
Légumes (hors pommes de terre)	Chou vert	0	0
Légumes (hors pommes de terre)	Chou-fleur cuit	0	tr
Légumes (hors pommes de terre)	Coeur de palmier appertisé		
Légumes (hors pommes de terre)	Concombre cru	0,3	0
Légumes (hors pommes de terre)	Cornichon au vinaigre		
Légumes (hors pommes de terre)	Courge musquée pulpe		
Légumes (hors pommes de terre)	Courgette crue	0	0
Légumes (hors pommes de terre)	Courgette cuite	0	0
Légumes (hors pommes de terre)	Cresson	0	0
Légumes (hors pommes de terre)	Endive crue	0	0
Légumes (hors pommes de terre)	Endive cuite	0	0
Légumes (hors pommes de terre)	Épinard cuit	0	0
Légumes (hors pommes de terre)	Épinard surgelé haché	0	0
Légumes (hors pommes de terre)	Fenouil	0	0
Légumes (hors pommes de terre)	Germe de soja appertisé (haricot Mungo)	117	65
Légumes (hors pommes de terre)	Germe de soja cru (haricot Mungo)	314	173
Légumes (hors pommes de terre)	Haricot beurre appertisé	15,1	5,4
Légumes (hors pommes de terre)	Haricot vert appertisé	16,3	5,8
Légumes (hors pommes de terre)	Haricot vert cuit	25,5	9,5
Légumes (hors pommes de terre)	Haricot vert surgelé	21,3	7,6
Légumes (hors pommes de terre)	Haricot vert surgelé cuit	18,8	6,7
Légumes (hors pommes de terre)	Laitue crue	0	0
Légumes (hors pommes de terre)	Laitue cuite	0	0
Légumes (hors pommes de terre)	Légumes sans autre précision	7	3,5
Légumes (hors pommes de terre)	Macédoine de légumes	7	3,5

Catégorie	Aliment	génistéine (µg/100g)	daïdzéine (µg/100g)
Légumes (hors pommes de terre)	Mâche		
Légumes (hors pommes de terre)	Maïs doux appertisé	1,7	1
Légumes (hors pommes de terre)	Maïs doux en épis cuit	1,1	0,7
Légumes (hors pommes de terre)	Navet cuit	0,6	0,7
Légumes (hors pommes de terre)	Oignon cru	0,9	0
Légumes (hors pommes de terre)	Oignon cuit	0	0
Légumes (hors pommes de terre)	Oseille cuite à l'eau		
Légumes (hors pommes de terre)	Persil frais		
Légumes (hors pommes de terre)	Petit pois appertisé	1,9	0
Légumes (hors pommes de terre)	Petit pois cuit	4,2	0
Légumes (hors pommes de terre)	Petit pois surgelé	5,6	0
Légumes (hors pommes de terre)	Pissenlit cru		
Légumes (hors pommes de terre)	Poireau cuit	0	0
Légumes (hors pommes de terre)	Poivron rouge cru		
Légumes (hors pommes de terre)	Poivron rouge cuit		
Légumes (hors pommes de terre)	Poivron vert cru		
Légumes (hors pommes de terre)	Poivron vert cuit		0
Légumes (hors pommes de terre)	Poivron vert jaune ou rouge cru		0
Légumes (hors pommes de terre)	Poivron vert jaune ou rouge cuit		0
Légumes (hors pommes de terre)	Pop corn		
Légumes (hors pommes de terre)	Potiron	0	0
Légumes (hors pommes de terre)	Potiron appertisé	0	0
Légumes (hors pommes de terre)	Radis	0,2	0
Légumes (hors pommes de terre)	Radis noir		
Légumes (hors pommes de terre)	Salade sans autre précision	0	0
Légumes (hors pommes de terre)	Salsifis appertisé		
Légumes (hors pommes de terre)	Salsifis cuit		
Légumes (hors pommes de terre)	Tomate crue	3,3	0
Légumes (hors pommes de terre)	Tomate pelée en conserve	3,3	0
Légumes (hors pommes de terre)	Topinambour		
Légumes secs	Fève	0,3	0,4
Légumes secs	Haricot blanc appertisé	5,8	0,5
Légumes secs	Haricot blanc cuit	4,9	7,4
Légumes secs	Haricot blanc sec	47,6	21,8
Légumes secs	Haricot flageolet appertisé	5,8	0,5
Légumes secs	Haricot rouge cuit	9,2	13
Légumes secs	Lentille cuisinée appertisée	3,3	1,8
Légumes secs	Lentille cuite	3,3	1,8
Légumes secs	Pois cassé	5,2	
Légumes secs	Pois chiche	24,1	0
Margarine	Margarine ajoutée	0	0
Margarine	Margarine allégée	0	0
Margarine	Margarine au tournesol allégée	0	0
Margarine	Margarine au tournesol en barquette	0	0
Margarine	Margarine de cuisson ajoutée	0	0
Margarine	Margarine sans autre précision	0	0

Catégorie	Aliment	génistéine (µg/100g)	daïdzéine (µg/100g)
OEufs et dérivés	Blanc d'oeuf		
OEufs et dérivés	Oeuf au plat salé	tr	tr
OEufs et dérivés	Oeuf brouillé beurre	tr	tr
OEufs et dérivés	Oeuf dur	tr	tr
OEufs et dérivés	Oeuf entier cru	tr	tr
OEufs et dérivés	Oeuf poché	tr	tr
OEufs et dérivés	Oeuf, blanc seul		
OEufs et dérivés	Omelette nature	tr	tr
Pain, biscottes	Baguette de pain		
Pain, biscottes	Biscotte sans spécification		
Pain, biscottes	Blini		0,8
Pain, biscottes	Farine blanche	0	0
Pain, biscottes	Fecule de maïs		
Pain, biscottes	Galette de sarrasin		1,7
Pain, biscottes	Pain complet		
Pain, biscottes	Pain de campagne		
Pain, biscottes	Pain de mie		
Pain, biscottes	Pain de seigle		
Pain, biscottes	Pain de seigle et froment		
Pain, biscottes	Pain grillé domestique		
Pain, biscottes	Pain sans sel		
Pain, biscottes	Pain type Poilane		
Pâtes	Pâte feuilletée cuite		
Pâtes	Pâtes alimentaires aux oeufs cuites	2,1	3,6
Pâtes	Pâtes alimentaires cuites	3,03	0
Pâtisserie	Beignet à la confiture, donut à la confiture		
Pâtisserie	Beignet sucré, donut		
Pâtisserie	Charlotte		
Pâtisserie	Chou à la crème, éclair, religieuse		
Pâtisserie	Chouquette		
Pâtisserie	Crêpe sucrée fourrée ou non fourrée		
Pâtisserie	Crumble		
Pâtisserie	Gâteau à la crème		
Pâtisserie	Gâteau au fromage blanc		
Pâtisserie	Gâteau de Savoie		11,9
Pâtisserie	Gâteau Mousse aux fruits		
Pâtisserie	Gâteau sans autre précision		
Pâtisserie	Gaufre		5,8
Pâtisserie	Macaron		
Pâtisserie	Meringue		
Pâtisserie	Mille-feuille		
Pâtisserie	Muffin		
Pâtisserie	Pâtisserie orientale (corne de gazelle, makroud, ...)		
Pâtisserie	Tarte à la crème		1,5
Pâtisserie	Tarte aux fruits, tartelette aux fruits	0,5	
Pâtisserie	Tarte aux pommes, tartelette aux pommes		3,3



Catégorie	Aliment	génistéine (µg/100g)	daïdzéine (µg/100g)
Pâtisserie	Tourte aux amandes		2,5
Pizzas, quiches et pâtisseries salées	Croissant au jambon		
Pizzas, quiches et pâtisseries salées	Feuilleté au fromage		
Pizzas, quiches et pâtisseries salées	Feuilleté au poisson		1,1
Pizzas, quiches et pâtisseries salées	Flamenkueche (tarte salée)		1,4
Pizzas, quiches et pâtisseries salées	Flamiche picarde		2,2
Pizzas, quiches et pâtisseries salées	Friand à la viande		
Pizzas, quiches et pâtisseries salées	Friand au fromage		
Pizzas, quiches et pâtisseries salées	Pizza sans autre précision		
Pizzas, quiches et pâtisseries salées	Pizza spéciale (4 saisons, fruits de mer, ...)		
Pizzas, quiches et pâtisseries salées	Pizza tomate et fromage		
Pizzas, quiches et pâtisseries salées	Pizza tomate jambon fromage		
Pizzas, quiches et pâtisseries salées	Quiche lorraine		3,3
Pizzas, quiches et pâtisseries salées	Tarte aux légumes		1,7
Plats composés	Accras de morue		3,9
Plats composés	Beignet de crevette		
Plats composés	Beignet salé (fourré viande volaille ou poisson)		
Plats composés	Blanquette de veau	0	0
Plats composés	Boeuf bourguignon	0,3	0,1
Plats composés	Boeuf carottes	0,2	0
Plats composés	Bouchée à la reine au poulet		
Plats composés	Bouchée à la reine, vol-au-vent sans autre précision		
Plats composés	Brochette d'agneau	0	0
Plats composés	Brochette de boeuf		
Plats composés	Brochette de crevettes		
Plats composés	Brochette de poisson		
Plats composés	Brochette de volailles		
Plats composés	Brochette mixte de viande		
Plats composés	Cannelloni à la viande		
Plats composés	Carpaccio de boeuf	0	0
Plats composés	Carpaccio de saumon	0	0
Plats composés	Carpaccio de viande	0	0
Plats composés	Cassoulet en conserve	2,9	0,1
Plats composés	Chili con carne	3,5	4,2
Plats composés	Choucroute garnie en conserve		
Plats composés	Choucroute sans garniture		
Plats composés	Confit de canard	0	0
Plats composés	Coq au vin		
Plats composés	Couscous garni	0,5	0
Plats composés	Crêpe au jambon surgelée cuite		
Plats composés	Crêpe fourrée salée		
Plats composés	Croque-madame (à l'oeuf)		1,9
Plats composés	Croque-monsieur		
Plats composés	Fondue bourguignonne		
Plats composés	Fondue savoyarde (fondue au fromage)		
Plats composés	Gnocchis		

Catégorie	Aliment	génistéine (µg/100g)	daïdzéine (µg/100g)
Plats composés	Gougère au beurre		
Plats composés	Gratin dauphinois		2,2
Plats composés	Gratin de pâtes	3,0	0
Plats composés	Gratin endives jambon	0	0
Plats composés	Guacamole	0,6	0
Plats composés	Hachis Parmentier		
Plats composés	Lasagne		
Plats composés	Légume farci (sauf tomate)	0,4	1,5
Plats composés	Moussaka		0,6
Plats composés	Navarin d'agneau	2,4	0,6
Plats composés	Nugget de volaille		5,5
Plats composés	Osso bucco	0,4	0
Plats composés	Paella	0,3	
Plats composés	Paupiette de veau	3,7	2,9
Plats composés	Paupiette de volaille	3,7	2,9
Plats composés	Pot-au-feu	0,2	0,1
Plats composés	Potée auvergnate	0,7	7,3
Plats composés	Poulet au curry	0	0
Plats composés	Quenelle au naturel appertisée		6,9
Plats composés	Quenelle de volaille		8,3
Plats composés	Quenelle en sauce appertisée		6,9
Plats composés	Ratatouille niçoise	0,9	0,1
Plats composés	Ravioli viande sauce tomate		
Plats composés	Soufflé au fromage		
Plats composés	Spaghetti sauce tomate		
Plats composés	Tomate à la provençale	3,1	0
Plats composés	Tomate farcie	1,9	
Poissons	Anchois filets à l'huile semi-conserve	0	0
Poissons	Anguille cuite au four	0	0
Poissons	Bar commun (loup)	0	0
Poissons	Baudroie grillée	0	0
Poissons	Brochet cuit au four	0	0
Poissons	Cabillaud à la vapeur	0	0
Poissons	Cabillaud au four	0	0
Poissons	Carpe au four	0	0
Poissons	Carrelet à la vapeur	0	0
Poissons	Carrelet frit	0	0
Poissons	Colin d'Alaska	0	0
Poissons	Croquette de poisson frit		
Poissons	Espadon frais	0	0
Poissons	Filet de julienne	0	0
Poissons	Flétan	0	0
Poissons	Grenouille cuisse	0	0
Poissons	Hareng fumé	0	0
Poissons	Hareng grillé	0	0
Poissons	Hareng saur, Rollmops	0	0

Catégorie	Aliment	génistéine (µg/100g)	daïdzéine (µg/100g)
Poissons	Lieu noir	0	0
Poissons	Limande	0	0
Poissons	Limande-sole à la vapeur	0	0
Poissons	Limande-sole panée frite		
Poissons	Lotte	0	0
Poissons	Maquereau cuit au four	0	0
Poissons	Maquereau filet au vin blanc conserve	0	0
Poissons	Maquereau filet sauce tomate conserve	0	0
Poissons	Maquereau frit	0	0
Poissons	Merlan à la vapeur	0	0
Poissons	Merlan frit	0	0
Poissons	Merlu	0	0
Poissons	Morue salée pochée	0	0
Poissons	Nugget de poisson		
Poissons	Oeufs de lompe semi-conserve	0	0
Poissons	Perche au four	0	0
Poissons	Pilchard sauce tomate en conserve	0	0
Poissons	Poisson en sauce surgelé	0	0
Poissons	Poisson pané frit		
Poissons	Poisson sans autre précision	0	0
Poissons	Raie au court-bouillon	0	0
Poissons	Raie au four	0	0
Poissons	Raie frite	0	0
Poissons	Rascasse	0	0
Poissons	Rollmops, hareng saur	0	0
Poissons	Rouget frais	0	0
Poissons	Roussette braisée	0	0
Poissons	Roussette ou petite roussette crue	0	0
Poissons	Sardine à l'huile conserve	0	0
Poissons	Sardine crue	0	0
Poissons	Sardine sauce tomate conserve	0	0
Poissons	Saumon à la vapeur	0	0
Poissons	Saumon cru	0	0
Poissons	Saumon fumé	0	0
Poissons	Sole au four	0	0
Poissons	Surimi bâtonnets		
Poissons	Thon à l'huile en conserve	0	0
Poissons	Thon au naturel en conserve	0	0
Poissons	Thon cru	0	0
Poissons	Thon cuit au four	0	0
Poissons	Truite arc en ciel à la vapeur	0	0
Poissons	Truite arc en ciel au four	0	0
Poissons	Truite de rivière à la vapeur	0	0
Poissons	Truite de rivière au four	0	0
Poissons	Turbot sauvage	0	0
Pommes de terre et apparenté	Chips salées (pomme de terre)		

Catégorie	Aliment	génistéine (µg/100g)	daïdzéine (µg/100g)
Pommes de terre et apparenté	Patate douce	tr	0
Pommes de terre et apparenté	Pomme de terre au four	1,7	0,8
Pommes de terre et apparenté	Pomme de terre cuite à l'eau	1,1	0,6
Pommes de terre et apparenté	Pomme de terre dauphine cuite	1,3	0,6
Pommes de terre et apparenté	Pomme de terre frite non salée	2,6	1,3
Pommes de terre et apparenté	Pomme de terre purée	1,1	0,6
Pommes de terre et apparenté	Pomme de terre sautée	1,7	0,8
Pommes de terre et apparenté	Pomme noisette précuite surgelée	1,7	0,8
Pommes de terre et apparenté	Tapioca		
Riz et semoule	Couscous (graine seule), semoule cuite		
Riz et semoule	Riz blanc cuit	3,9	2,6
Riz et semoule	Riz blanc étuvé	3,9	2,6
Riz et semoule	Riz complet cuit	4,8	4,2
Sandwiches, casse-croûte	Cheeseburger		
Sandwiches, casse-croûte	Cheeseburger double		
Sandwiches, casse-croûte	Hamburger		
Sandwiches, casse-croûte	Hot Dog à la moutarde		
Sandwiches, casse-croûte	Pan bagna		
Sandwiches, casse-croûte	Sandwich baguette sans autre précision		
Sandwiches, casse-croûte	Sandwich crudités		4,1
Sandwiches, casse-croûte	Sandwich crudités dinde		
Sandwiches, casse-croûte	Sandwich crudités grec		
Sandwiches, casse-croûte	Sandwich crudités jambon		1,8
Sandwiches, casse-croûte	Sandwich crudités oeuf		7,5
Sandwiches, casse-croûte	Sandwich crudités porc		
Sandwiches, casse-croûte	Sandwich crudités poulet		
Sandwiches, casse-croûte	Sandwich crudités thon		
Sandwiches, casse-croûte	Sandwich fromage		
Sandwiches, casse-croûte	Sandwich jambon		
Sandwiches, casse-croûte	Sandwich jambon beurre		
Sandwiches, casse-croûte	Sandwich jambon fromage		
Sandwiches, casse-croûte	Sandwich kebab		
Sandwiches, casse-croûte	Sandwich merguez		
Sandwiches, casse-croûte	Sandwich pain complet		
Sandwiches, casse-croûte	Sandwich pain de mie sans autre précision		
Sandwiches, casse-croûte	Sandwich pâté		
Sandwiches, casse-croûte	Sandwich salami		
Sandwiches, casse-croûte	Sandwich sans autre précision		
Sandwiches, casse-croûte	Sandwich saucisson		
Sandwiches, casse-croûte	Sandwich saumon		
Sandwiches, casse-croûte	Toasts salés		
Soupes	Julienne de légumes, soupe de légumes	0,5	0,7
Soupes	Minestrone	3,3	2
Soupes	Soupe à l'oignon	0	0
Soupes	Soupe de lentilles	1,3	0,7
Soupes	Soupe de poisson en conserve		

Catégorie	Aliment	génistéine (µg/100g)	daïdzéine (µg/100g)
Soupes	Soupe poireau pomme de terre conserve	0,3	0,7
Soupes	Soupe poulet vermicelle		
Soupes	Velouté de champignons	0,2	0
Soupes	Velouté de tomate	1,3	0
Sucres et dérivés	Barre céréalière		
Sucres et dérivés	Barre chocolatée céréalière		
Sucres et dérivés	Barre noix de coco enrobée		
Sucres et dérivés	Bonbons gélifiés	0	0
Sucres et dérivés	Bonbons tout type		0
Sucres et dérivés	Chewing-gum	0	0
Sucres et dérivés	Chewing-gum light	0	0
Sucres et dérivés	Confiture allégée	1,2	0,3
Sucres et dérivés	Confiture tout type	1,2	0,3
Sucres et dérivés	Miel	0	0
Sucres et dérivés	Pâte à tartiner chocolatée Type Nutella		
Sucres et dérivés	Pâte de fruits	0,7	2,7
Sucres et dérivés	Sorbet	1,2	0
Sucres et dérivés	Sucre ajouté dans les cafés	0	0
Sucres et dérivés	Sucre ajouté dans pdrt lait. enfant	0	0
Sucres et dérivés	Sucre blanc	0	0
Sucres et dérivés	Sucre roux	0	0
Ultra frais laitier	Bifidus aux fruits	tr	tr
Ultra frais laitier	Bifidus type BA, Bio, Yaourt aromatisé ou aux fruits, sur coulis	tr	tr
Ultra frais laitier	Bifidus type Bio, Fromage blanc aromatisé	tr	tr
Ultra frais laitier	Bifidus, yaourt	tr	tr
Ultra frais laitier	Boursin	tr	tr
Ultra frais laitier	Carré frais type Carré Gervais	tr	tr
Ultra frais laitier	Crème de lait épaisse UHT, crème fraîche épaisse UHT	tr	tr
Ultra frais laitier	Crème de lait épaisse, crème fraîche épaisse	tr	tr
Ultra frais laitier	Crème de lait légère, crème fraîche légère	tr	tr
Ultra frais laitier	Crème de lait stérilisée liquide, crème fraîche stérilisée liquide	tr	tr
Ultra frais laitier	Crème fraîche crue, crème de lait crue	tr	tr
Ultra frais laitier	Crème fraîche sans autre précision, crème de lait sans autre précision	tr	tr
Ultra frais laitier	Fromage blanc 40% M.G. nature	tr	tr
Ultra frais laitier	Fromage blanc aromatisé salé 70% M.G.	tr	tr
Ultra frais laitier	Fromage blanc aux fruits 0% M.G.	tr	tr
Ultra frais laitier	Fromage blanc aux fruits 20% M.G.	tr	tr
Ultra frais laitier	Fromage blanc de campagne (avec ou sans faisselle) de 0 à 40% M.G.	tr	tr
Ultra frais laitier	Fromage blanc demi-sel 40% M.G.	tr	tr
Ultra frais laitier	Fromage blanc nature 0% M.G.	tr	tr
Ultra frais laitier	Fromage blanc nature 20% M.G.	tr	tr
Ultra frais laitier	Fromage blanc nature genre Gervita	tr	tr
Ultra frais laitier	Fromage blanc sans autre précision	tr	tr
Ultra frais laitier	Milk-shake aux fruits	tr	tr
Ultra frais laitier	Mozzarella	tr	tr
Ultra frais laitier	Petit-Suisse aromatisé 40% M.G.	tr	tr

Catégorie	Aliment	génistéine (µg/100g)	daïdzéine (µg/100g)
Ultra frais laitier	Petit-Suisse aux fruits	tr	tr
Ultra frais laitier	Petit-Suisse nature 40% M.G.	tr	tr
Ultra frais laitier	Ricotta	tr	tr
Ultra frais laitier	Saint-Moret	tr	tr
Ultra frais laitier	Saint-Moret allégé	tr	tr
Ultra frais laitier	Tartare (fromage)	tr	tr
Ultra frais laitier	Yaourt à boire aromatisé	tr	tr
Ultra frais laitier	Yaourt à boire nature sucré	tr	tr
Ultra frais laitier	Yaourt aromatisé	tr	tr
Ultra frais laitier	Yaourt aromatisé au lait écrémé	tr	tr
Ultra frais laitier	Yaourt aromatisé au lait entier	tr	tr
Ultra frais laitier	Yaourt aux céréales type Breakfast	tr	tr
Ultra frais laitier	Yaourt aux fruits au lait entier	tr	tr
Ultra frais laitier	Yaourt aux fruits et édulcorant maigre	tr	tr
Ultra frais laitier	Yaourt avec des morceaux de fruits ou à la pulpe de fruits 0% M.G.	tr	tr
Ultra frais laitier	Yaourt avec des morceaux de fruits ou sur coulis de fruits	tr	tr
Ultra frais laitier	Yaourt bulgare ou velouté à la pulpe de fruits	tr	tr
Ultra frais laitier	Yaourt bulgare ou velouté nature	tr	tr
Ultra frais laitier	Yaourt nature	tr	tr
Ultra frais laitier	Yaourt nature au lait entier	tr	tr
Ultra frais laitier	Yaourt nature maigre	tr	tr
Ultra frais laitier	Yaourt nature sucré	tr	tr
Ultra frais laitier	Yaourt sans autre précision	tr	tr
Ultra frais laitier	Yaourt sucré maigre	tr	tr
Viandes	Agneau côtelette grillé	0	0
Viandes	Agneau épaule cuit rôti	0	0
Viandes	Agneau épaule maigre rôti	0	0
Viandes	Agneau gigot rôti	0	0
Viandes	Boeuf à bourguignon cuit	0	0
Viandes	Boeuf à pot-au-feu cuit	0	0
Viandes	Boeuf bifteck grillé	0	0
Viandes	Boeuf braisé	0	0
Viandes	Boeuf entrecôte grillé	0	0
Viandes	Boeuf faux filet grillé	0	0
Viandes	Boeuf rosbif rôti	0	0
Viandes	Cheval viande	0	0
Viandes	Porc côtelette grillé	0	0
Viandes	Porc échine rôti	0	0
Viandes	Porc filet rôti maigre cuit	0	0
Viandes	Porc rôti cuit	0	0
Viandes	Porc travers braisé	0	0
Viandes	Steak haché 05% M.G. cru	0	0
Viandes	Steak haché 05% M.G. cuit	0	0
Viandes	Steak haché 10% M.G. cuit	0	0
Viandes	Steak haché 15% M.G. cru	0	0
Viandes	Steak haché 15% M.G. cuit	0	0

Catégorie	Aliment	génistéine (µg/100g)	daïdzéine (µg/100g)
Viandes	Steak haché 20% M.G. cuit	0	0
Viandes	Veau côte	0	0
Viandes	Veau épaule	0	0
Viandes	Veau escalope cuit	0	0
Viandes	Veau filet rôti	0	0
Viandes	Veau poitrine	0	0
Viandes	Veau rôti	0	0
Viandes	Viande sans autre précision	0	0
Viennoiseries	Brioche		3
Viennoiseries	Croissant		
Viennoiseries	Croissant au beurre		
Viennoiseries	Croissant aux amandes		
Viennoiseries	Pain au chocolat		0,8
Viennoiseries	Pain au lait		0,8
Viennoiseries	Pain aux raisins	2,5	2,3
Volailles et gibiers	Caille	0	0
Volailles et gibiers	Canard rôti	0	0
Volailles et gibiers	Chevreuil rôti	0	0
Volailles et gibiers	Dinde escalope sautée	0	0
Volailles et gibiers	Dinde rôtie	0	0
Volailles et gibiers	Faisan rôti	0	0
Volailles et gibiers	Lapin en ragoût	0	0
Volailles et gibiers	Lapin sans autre précision	0	0
Volailles et gibiers	Lièvre en ragoût	0	0
Volailles et gibiers	Magret de canard	0	0
Volailles et gibiers	Pigeon rôti	0	0
Volailles et gibiers	Poule viande bouillie	0	0
Volailles et gibiers	Poule viande et peau bouillie	0	0
Volailles et gibiers	Poulet cuisse rôti	0	0
Volailles et gibiers	Poulet rôti	0	0
Volailles et gibiers	Sanglier	0	0

## II- Précisions concernant la table de composition en génistéine et daïdzéine des aliments consommés en France

Sont rapportés ci-dessous des précisions relatives à la méthodologie d'élaboration de la table de composition, aux teneurs en isoflavones pour certaines catégories d'aliments, et aux limites de la table de composition.

### II- 1 Précisions sur la méthodologie

#### II-1-1 Sélection de la forme chimique

Nous avons choisi d'exprimer, dans la table, les teneurs en génistéine et daïdzéine en équivalents aglycones. C'est également de cette façon que d'autres auteurs ont exprimé leurs données. Notamment lors du travail réalisé pour la base de donnée VENUS, les données publiées donnant des teneurs en glucosides n'ont pas été écartées : les auteurs ont pu les convertir en équivalents aglycones pour inclure les résultats de leurs calculs dans leur base de données. Enfin, une démarche identique avait été adoptée par le USDA lors de la création de sa base de données sur les isoflavones.

## **II-1-2 Bio-disponibilité**

Comme cela est mentionné dans le chapitre § « Biodisponibilité », les isoflavones aglycones pourraient être davantage biodisponibles que les formes glycosylées. Enfin, il convient de noter que la seule mention de la teneur en équivalents aglycones dans la table de composition pourrait donc masquer des biodisponibilités différentes des isoflavones dans les aliments.

## **II- 2 Précisions sur les teneurs en isoflavones de certaines catégories alimentaires**

### **II-2-1 Produits céréaliers : pain et biscottes**

Peut-on comparer les teneurs en farine de soja des pains en France et celles des autres pays ? Le décret n° 93-1074 du 13 septembre 1993 pris pour l'application de la loi du 1er août 1905 en ce qui concerne certaines catégories de pain définit le « pain de tradition française » (ou « pain traditionnel français », ou « pain traditionnel de France »). Il indique que ce pain doit être composé d'un mélange de farines panifiables de blé, d'eau potable et de sel de cuisine. La fermentation doit être effectuée à l'aide de levure de panification et de levain. Ces ingrédients ne contiendraient au plus que des traces d'isoflavones. En outre, le décret prévoit la possibilité (et non l'obligation) d'utiliser jusqu'à 2% de farines de fèves (qui est une légumineuse, comme le soja) et 0.5% de farine de soja (par rapport au poids total de farine mise en œuvre). Il est donc possible que les pains de tradition française contiennent des isoflavones apportées par la farine de soja et de fèves. En connaissant la recette d'une baguette et la teneur en isoflavones de la farine de soja, on pourrait calculer la teneur maximale en daïdzéine et génistéine issues de farine de soja. Dans la base de données VENUS, on trouve plus de 30 résultats sur les farines de soja : elles contiennent entre 0 et 149600µg de daïdzéine /100g et entre 100 et 115000µg de génistéine /100g. Mais toutes ces farines sont-elles utilisables pour la panification ? Sans cette information, le calcul des teneurs en isoflavones provenant de la farine de soja dans le pain de tradition française est impossible. C'est pourquoi il serait utile de faire des analyses sur les pains consommés en France, ou au moins de connaître les types de farines vendus pour la panification en France.

Pour les pains de mie industriels, un relevé effectué entre 1996 et 1998 par l'OCA met en évidence l'utilisation de farine de soja dans des pains de mie de marques connues, comme dans des produits de marques distributeurs. Toutefois, d'après la base de recette établie plus récemment par l'OCA, la farine de soja ne serait plus actuellement un ingrédient de ces produits (la farine de fèves est par contre fréquemment utilisée, mais on ne dispose pas dans les données compilées de sa teneur en isoflavones). Là aussi des analyses actualisées seraient utiles.

### **II-2-2 Produits d'origine animale (viandes, poissons, crustacés et mollusques, volailles, gibiers, œufs, laits et dérivés)**

Horn Ross (Horn-Ross 2000a) n'ont pas trouvé d'isoflavones ou seulement des traces dans du bœuf haché, du poulet, du poisson, du foie, du lait, du fromage et des yaourts (rappelons que la limite de détection dans cette étude est 25µg d'isoflavones/100g d'aliment). Les isoflavones sont certes des phyto-estrogènes, mais l'emploi du terme « phyto » pour qualifier cet ensemble de composés n'exclut pas pour autant de façon absolue leur présence dans des produits d'origine animale : (i) d'une part il est possible que les produits issus d'animaux ayant consommé des phyto-estrogènes contiennent ces molécules, (ii) d'autre part, la présence d'isoflavones dans des produits d'origine apparemment animale peut s'expliquer par l'utilisation méconnue d'un ingrédient. Dans la table, en l'absence de données analytiques, on a considéré que les teneurs en isoflavones des produits d'origine animale étaient au plus égale à des traces, toutefois les points ci-dessous méritent d'être soulevés.

#### **- Viandes hachées et préparations à base de viandes hachées**

Bien que l'enquête INCA ne permette pas de les distinguer<sup>1</sup>, il faut souligner que certains des produits qui mettent en avant leur tendreté, leur fondant, ou une aromatisation particulière peuvent inclure dans leur liste d'ingrédients des protéines végétales : ces préparations à base de viandes hachées peuvent contenir jusqu'à 30% de protéines végétales et notamment 14% de protéines de soja. D'après les données de la base VENUS sur la teneur en isoflavones des protéines de soja, la teneur d'une telle préparation de viande pourrait atteindre

<sup>1</sup> Cela peut être dû à une réelle absence de consommation de ce type de produits (ils sont en effet peu représentés dans l'offre générale de préparations de viandes hachées) ou à l'ignorance des enquêtés sur la nature exacte des préparations à base de viandes qu'ils consomment.



quelques milligrammes de daïdzéine ou de génistéine / 100g. A titre de comparaison, ces teneurs sont plus de deux fois supérieures à celles estimées dans le tonyu.

- Pâtés et charcuteries à base de viandes, de volailles ou de poissons, poissons panés

Ces produits ne contiennent pas exclusivement des ingrédients d'origine animale : on y trouve parfois selon les marques de la farine de blé, de la féculé de pomme de terre et plus rarement des protéines de soja ou des isolats de ces protéines (dans quelques pâtés en conserve à base de viandes, le tarama, les morceaux de volailles transformés, les poissons panés et les croquettes de poisson)... Ces ingrédients d'origine végétale ne sont cependant pas utilisés systématiquement dans ces produits. Ceci a conduit l'OCA à ne pas mentionner d'ingrédients à base de soja dans les recettes moyennes de ces différents produits, la table ne mentionne donc pas de teneurs en isoflavones pour ces produits.

- Laits et produits laitiers

Antignac (Antignac 2004) et King (King 1998) ont analysé des laits commerciaux (de France et d'Australie) et ils ont pu observer que les teneurs en phyto-estrogènes étaient faibles mais non nulles : elles étaient inférieures à 0.5µg/100ml pour la daïdzéine dans les 2 études, et comprises entre la limite de détection et 3µg/100ml pour la génistéine. L'étude australienne suppose que la présence de trèfle dans les pâturages au printemps explique la présence plus importante de génistéine dans les laits de printemps. Bien que l'équol, un autre phyto-estrogène ne soit pas étudié dans ce chapitre, remarquons que les 2 études montrent que l'équol atteint des concentrations bien supérieures à celles de la génistéine et de la daïdzéine dans le lait : jusqu'à 29.3µg d'équol /100ml au printemps dans l'étude de King (King, Mano, Head 1998). Les laits fermentés, les laits coagulés éventuellement fermentés (fromages) et les desserts lactés sont donc susceptibles de contenir de faibles quantités d'isoflavones apportées par le lait. Les ingrédients ajoutés aux substances issues du lait qui pourraient être sources d'isoflavones sont les fruits (ils sont ajoutés à hauteur de 5 à 12% environ). A quelques exceptions près, les fruits étant des sources mineures d'isoflavones, les teneurs en isoflavones issues des fruits et calculées dans ce type de laitages sont inférieures à 1µg/100g.

- Oeufs

L'étude de Horn-Ross indique que les œufs contiendraient des traces de génistéine et 27.6µg/100 de daïdzéine pour 100g. Saitoh (Saitoh 2001) ont quant à eux démontré qu'une poule nourrie avec une alimentation fortement concentrée en isoflavones de soja produit des œufs dont le jaune contient des isoflavones (jusqu'à 65.29µg d'isoflavones pour 100g de jaune d'œuf dans les conditions expérimentales). L'étude de Horn-Ross est la seule parmi toutes les données compilées qui donne une teneur moyenne en isoflavones dans les œufs commerciaux. Si on choisit de ne pas utiliser cette donnée, et de considérer dans la table qui servira à l'estimation des apports qu'il s'agit d'une valeur manquante, on risque de sous-estimer les apports en daïdzéine provenant des œufs. Si par contre, on utilise cette donnée, on considère sans certitude que l'échantillon analysé par les auteurs est assimilable à un échantillon représentatif des œufs consommés en France. La teneur élevée en daïdzéine des œufs d'après Horn-Ross multipliée par la consommation importante de ce type de produits (les enfants consomment en moyenne 10.2g d'œuf /j/personne et les adultes 18.3g/jour/personne) conduira vraisemblablement à faire d'eux un vecteur de daïdzéine dans les calculs d'apports. C'est finalement la première approche qui a été choisie. Cependant, il serait souhaitable de valider la valeur de composition choisie en la comparant à d'autres analyses, effectuées sur des échantillons bien définis et représentatifs de la consommation française.

### **II-3 Limites de la table de composition**

Les limites de la table de composition sont de 2 ordres : (i) faible disponibilité des données sur la composition des aliments en phyto-estrogènes, (ii) difficultés liées à l'utilisation de compilations de données.

#### **II-3-1 Faible disponibilité des données sur la composition des aliments en phyto-estrogènes**

Les données de composition des aliments en daïdzéine et génistéine sont détaillées p7 et 8.

Le nombre de données utilisées sur la composition des aliments en daïdzéine et génistéine est restreint : pour la génistéine, on a 36.4% de données manquantes et 31.8% pour la daïdzéine. Van Erp-Baart (2003) cite les pourcentages de valeurs manquantes dans les quatre tables nationales créées à partir de la base de données VENUS : ces pourcentages varient entre 3 et 13%. Ces pourcentages de valeurs manquantes faibles indiquent que le travail effectué pour constituer les quatre bases irlandaise, italienne, hollandaise et anglaise est plus complet que celui présenté ici. Il se peut aussi que davantage d'aliments aient été considérés comme « non pertinents » par les auteurs des quatre bases de données nationales. Les aliments « non pertinents » sont des

aliments qui appartiennent à une table de composition car ils sont effectivement consommés mais pour lesquels les auteurs estiment que leurs teneurs en isoflavones sont nulles, sans disposer de résultats analytiques pour le prouver. Pour ces aliments, les auteurs peuvent attribuer un « zéro logique » au lieu de considérer que la donnée de composition est manquante.

On a bien souvent trouvé une seule donnée que l'on a utilisée faute de mieux en tant que teneur moyenne. Dans un certain nombre de cas, ce manque de données ou l'utilisation de données inadéquates pour notre objectif concerne des aliments fortement consommés comme le pain, les biscuits sucrés, ou les céréales pour petit-déjeuner. Le manque de données conduira donc à la sous-estimation des apports en isoflavones lors du croisement de cette table avec les données de consommation de l'enquête Inca.

Certains aliments composés sont spécifiquement français. Pour connaître leur composition en isoflavones, il faut soit faire des analyses, soit estimer leur composition en utilisant des recettes. Pour cela, il faudrait que les recettes soient représentatives pas seulement des aliments tels que préparés à la maison mais aussi des aliments tels que préparés par les industriels. La composition des aliments industriels est très difficile à connaître de façon quantitative, or les industriels sont plus susceptibles que les ménages d'ajouter des ingrédients issus du soja dans les aliments composés. Par ailleurs, même en admettant que les recettes que nous avons utilisées sont représentatives de la consommation globale d'un type d'aliments, il faudrait connaître la teneur en isoflavones de tous les ingrédients mis en œuvre pour calculer la teneur en isoflavones d'un aliment composé. Les teneurs en isoflavones d'ingrédients aussi fréquents que la farine et les œufs sont encore mal connues, ce qui conduit certainement à des imprécisions sur la composition des aliments composés.

Rappelons également que cette table de composition présente des données de composition en daïdzéine et génistéine, mais les phyto-estrogènes ne se limitent pas à ces deux composés. Keinan Boker (2002) ont évalué l'apport en phyto-estrogènes chez des femmes hollandaises de 50 à 69 ans à l'aide d'un questionnaire de fréquence standardisé semi-quantitatif et ont conclu que plus de la moitié de l'apport en phyto-estrogènes totaux provenait des lignanes, composés qui ne figurent pas dans cette table. Toutefois, le fait de bâtir une table de composition en daïdzéine et génistéine nous a été imposé par le manque de données disponibles sur les autres phyto-estrogènes.

### **II-3-2 L'utilisation de compilations de données pose plusieurs problèmes**

Le premier problème est lié à l'obtention de données par des protocoles de préparation, d'extraction et d'analyse des isoflavones variables selon les auteurs des sources de données compilées. Selon les études, la signification du terme « traces » peut donc être variable. Dans l'étude de Horn-Ross (Horn-Ross 2000a), on considère qu'on a des traces d'isoflavones dans un aliment en-dessous de 25µg d'isoflavones pour 100g, alors que dans l'étude d'Antignac ce terme est employé en-dessous de 5µg d'isoflavones par litre de lait.

Le deuxième point concerne la description des aliments analysés : celle-ci n'est pas toujours suffisamment complète et peut donner lieu à des confusions. Il faudrait au moins pouvoir connaître les noms scientifiques des végétaux analysés et les teneurs en eau, voire en macro nutriments, des aliments cités dans les compilations pour déterminer si elles correspondent à celles qui ont été citées dans l'enquête de consommation.

Le troisième problème liée à l'utilisation de compilation de données concerne les aliments composés. Ce n'est pas parce qu'un aliment porte le même nom dans deux pays différents qu'il est formulé de la même manière dans ces deux pays. La réticence des consommateurs français à la consommation d'OGM, et par répercussion, à la consommation de soja, a pu conduire les industriels à formuler pour le marché français des produits contenant moins d'ingrédients à base de soja que ceux proposés aux Etats-Unis. Il est donc délicat d'emprunter des données étrangères pour établir une table de composition adaptée aux aliments français.

D'une manière générale, l'utilisation de compilations de données ne permet pas l'accès direct au contexte d'obtention complet des données. Or, les travaux menés par le Nutrient Data Laboratory du USDA (Holden 2002), précurseur en matière d'évaluation qualitative des données de composition des aliments, insistent sur l'importance de la documentation d'une donnée pour en évaluer la qualité. Les informations à connaître pour attribuer un code de confiance à chaque donnée d'une table de composition des aliments concernent l'identification précise de l'aliment, le plan d'échantillonnage, le nombre d'échantillons, leur manipulation, la méthode d'analyse, et l'assurance qualité. Idéalement, un système expert d'évaluation des données déclinant ces cinq catégories d'informations de manière spécifique au constituant analysé devrait être utilisé. Valsta (van Erp-Baart 2003) ont présenté succinctement un système d'évaluation de la qualité des données de composition, amis tel que publié, ce système n'est pas spécifique aux différentes catégories de phyto-estrogènes. Il n'a pas

été possible dans notre étude de développer un tel système et de l'utiliser, puisque nous avons utilisé des données compilées, donc peu documentées. Par défaut, il faudra donc considérer la totalité des données de la table présentée ici comme des estimations dont la fiabilité n'est pas assurée.

#### II- 4 Récapitulatif relatif à la disponibilité des données de composition

Tableau A1. Données de composition disponibles pour la génistéine

Groupe	Nombre de données disponibles	de Nombre de données manquantes	de Nombre d'aliments par groupe	Pourcentage de données manquantes
Abats	16	0	16	0.0%
Autres graisses	3	0	3	0.0%
Beurre	5	0	5	0.0%
Café	2	0	2	0.0%
Crustacés et mollusques	15	0	15	0.0%
Eaux	5	0	5	0.0%
Fromages	74	0	74	0.0%
Huiles	8	0	8	0.0%
Légumes secs	11	0	11	0.0%
Margarine	6	0	6	0.0%
Ultra frais laitier	49	0	49	0.0%
Viandes	30	0	30	0.0%
Volailles et gibiers	16	0	16	0.0%
Poissons	59	5	64	7.8%
Compotes et fruits cuits	7	1	8	12.5%
Entrées	7	1	8	12.5%
Lait	14	2	16	12.5%
Fruits secs et graines oléagineuses	18	4	22	18.2%
Pommes de terre et apparenté	8	2	10	20.0%
Fruits	27	7	34	20.6%
Céréales pour petit déjeuner	7	2	9	22.2%
Soupes	7	2	9	22.2%
Charcuterie	38	12	50	24.0%
Oeufs et dérivés	6	2	8	25.0%
Riz et semoule	3	1	4	25.0%
Légumes (hors pommes de terre)	60	22	82	26.8%
Sucres et dérivés	12	5	17	29.4%
Pâtes	2	1	3	33.3%
Plats composés	26	33	59	55.9%
Condiments et sauces	9	15	24	62.5%
Aliments destinés à une alimentation particulière	1	2	3	66.7%
<u>Sodas et jus de fruits</u>	<u>13</u>	<u>26</u>	<u>39</u>	<u>66.7%</u>
Autres céréales	1	3	4	75.0%
Boissons chaudes	1	4	5	80.0%
Viennoiseries	1	6	7	85.7%
Biscuits	4	29	33	87.9%
<u>Entremets</u>	<u>2</u>	<u>24</u>	<u>26</u>	<u>92.3%</u>
Pain, biscottes	1	13	14	92.9%
Pâtisserie	1	21	22	95.5%
Boissons alcoolisées	0	31	31	100.0%
Chocolat	0	9	9	100.0%
Glaces	0	3	3	100.0%
Pizzas, quiches et pâtisseries salées	0	13	13	100.0%
Sandwiches, casse-croûte	0	28	28	100.0%
<b>Total</b>	<b>575</b>	<b>329</b>	<b>904</b>	<b>36.4%</b>

**Tableau A2. Données de composition disponibles pour la daïdzéine**

Groupe	Nombre de données disponibles	Nombre de données manquantes	Nombre d'aliments par groupe	Pourcentage de données manquantes
Abats	16	0	16	0.0%
Autres graisses	3	0	3	0.0%
Beurre	5	0	5	0.0%
Café	2	0	2	0.0%
Compotes et fruits cuits	8	0	8	0.0%
Crustacés et mollusques	15	0	15	0.0%
Eaux	5	0	5	0.0%
Fromages	74	0	74	0.0%
Huiles	8	0	8	0.0%
Margarine	6	0	6	0.0%
Ultra frais laitier	49	0	49	0.0%
Viandes	30	0	30	0.0%
Volailles et gibiers	16	0	16	0.0%
Poissons	59	5	64	7.8%
Légumes secs	10	1	11	9.1%
Entrées	7	1	8	12.5%
Lait	14	2	16	12.5%
Fruits	28	6	34	17.6%
Charcuterie	40	10	50	20.0%
Pommes de terre et apparenté	8	2	10	20.0%
Céréales pour petit déjeuner	7	2	9	22.2%
Soupes	7	2	9	22.2%
Fruits secs et graines oléagineuses	17	5	22	22.7%
Légumes (hors pommes de terre)	63	19	82	23.2%
Sucres et dérivés	13	4	17	23.5%
Oeufs et dérivés	6	2	8	25.0%
Riz et semoule	3	1	4	25.0%
Pâtes	2	1	3	33.3%
Viennoiseries	4	3	7	42.9%
Plats composés	32	27	59	45.8%
<u>Entremets</u>	<u>11</u>	<u>15</u>	<u>26</u>	<u>57.7%</u>
Pizzas, quiches et pâtisseries salées	5	8	13	61.5%
Aliments destinés à une alimentation particulière	1	2	3	66.7%
<u>Sodas et jus de fruits</u>	<u>13</u>	<u>26</u>	<u>39</u>	<u>66.7%</u>
Condiments et sauces	8	16	24	66.7%
Biscuits	9	24	33	72.7%
Autres céréales	1	3	4	75.0%
Pâtisserie	5	17	22	77.3%
Pain, biscottes	3	11	14	78.6%
Boissons chaudes	1	4	5	80.0%
Chocolat	1	8	9	88.9%
Sandwiches, casse-croûte	3	25	28	89.3%
Boissons alcoolisées	0	31	31	100.0%
Glaces	0	3	3	100.0%
<b>Total</b>	<b>618</b>	<b>286</b>	<b>904</b>	<b>31.6%</b>

## Références bibliographiques :

---

- Antignac, J.P., Cariou, R., Le Bizec, B., André, F. (2004) New data regarding phytoestrogens content in bovine milk. *Food Chem*, 87, pp.275-81.
- Holden, J.M., Bhagwat, S.A., patterson, K.Y. (2002) Development of a multi-nutrient data quality evaluation system. *J Food Comp Anal*, 15, pp.339-48.
- Horn-Ross, P.L., Barnes, S., Lee, M., Coward, L., et al. (2000a) Assessing phytoestrogen exposure in epidemiologic studies: development of a database (United States). *Cancer Causes Control*, 11, pp.289-98.
- Keinan-Boker, L., Peeters, P.H., Mulligan, A.A., Navarro, C., et al. (2002) Soy product consumption in 10 European countries: the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC) study. *Public Health Nutr*, 5, pp.1217-26.
- King, R.A., Mano, M.M., Head, R.J. (1998) Assessment of isoflavonoid concentrations in Australian bovine milk samples. *J Dairy Res*, 65, pp.479-89.
- Oseredczuk, M., Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments (2004) Table de composition en génistéine et daïdzéine des aliments consommés en France.CIQAL/MO/2004-190. Maisons Alfort, AFSSA-CIQAL.
- Saitoh, S., Sato, T., Harada, H., Takita, T. (2001) Transfer of soy isoflavone into the egg yolk of chickens. *Biosci Biotechnol Biochem*, 65, pp.2220-5.
- van Erp-Baart, M.A., Brants, H.A., Kiely, M., Mulligan, A., et al. (2003) Isoflavone intake in four different European countries: the VENUS approach. *Br J Nutr*, 89 Suppl 1, pp.S25-30.

## Annexe 2 b : Estimation des apports (Bemrah-Aouachria N 2004)

### I- Apports en isoflavones, hors aliments à base de soja I-1 Chez les adultes de 15 ans et plus

Tableau A3 Apport en Genistéine chez les adultes de 15 ans et plus, hors aliments à base de soja

Adultes (n=1474)	GENISTÉINE			
	Ensemble de la population			
	Moyenne (µg/j)	Écart-type (µg/j)	95è perc. (µg/j)	Contribution
<b>Légumes (hors pommes de terre)</b>	<b>5.8</b>	<b>9.2</b>	<b>16.4</b>	<b>43.0%</b>
Fruits	1.5	4.1	8.4	11.1%
Condiments et sauces	1.2	8.5	0.3	8.9%
Pâtes	1.1	1.1	3	8.1%
Entrées	1.1	4.9	7.2	8.1%
Riz et semoule	0.7	1	2.5	5.2%
Légumes secs	0.4	1.8	1.9	3.0%
Pommes de terre et apparenté	0.4	0.4	1.3	3.0%
Plats composés	0.4	0.7	1.8	3.0%
Céréales pour petit déjeuner	0.3	1	1.6	2.2%
Fruits secs et graines oléagineuses	0.3	1.2	1.3	2.2%
Biscuits	0.1	0.3	0.3	0.7%
Sucres et dérivés	0.1	0.2	0.5	0.7%
Autres catégories	0.1	0.3	0.7	0.7%
<b>Apport total hors aliments à base de soja</b>	<b>13.5</b>	<b>14.7</b>	<b>34.8</b>	<b>100.0%</b>

Tableau A4. Apport en Daïdzéine chez les adultes de 15 ans et plus, hors aliments à base de soja

Adultes (n=1474)	DAIDZEINE			
	Ensemble de la population			
	Moyenne (µg/j)	Écart-type (µg/j)	95è perc. (µg/j)	Contribution
<b>Légumes (hors pommes de terre)</b>	<b>3</b>	<b>5.4</b>	<b>9.8</b>	<b>24.6%</b>
<b>Café en poudre</b>	<b>2.4</b>	<b>3.7</b>	<b>9</b>	<b>19.7%</b>
<b>Fruits</b>	<b>2.2</b>	<b>4.9</b>	<b>11.1</b>	<b>18.0%</b>
Céréales pour petit déjeuner	0.8	2.6	5.9	6.6%
Condiments et sauces	0.8	5.8	0	6.6%
Riz et semoule	0.5	0.6	1.7	4.1%
Pâtisserie	0.4	0.8	1.9	3.3%
Légumes secs	0.3	1.1	2.1	2.5%
Viennoiseries	0.3	0.7	1.4	2.5%
Biscuits	0.3	0.7	1.5	2.5%
Plats composés	0.3	0.7	1.5	2.5%
Pommes de terre et apparenté	0.2	0.2	0.6	1.6%
Pizzas, quiches et pâtisseries salées	0.2	0.5	1.1	1.6%
Entremets	0.1	0.5	1	0.8%
Fruits secs et graines oléagineuses	0.1	0.6	0.7	0.8%
Entrées	0.1	0.3	0.6	0.8%
Compotes et fruits cuits	0.1	0.4	0.9	0.8%
Autres catégories	0.1	0.3	0.6	0.8%
<b>Apport total hors aliments à base de soja</b>	<b>12.2</b>	<b>10.7</b>	<b>30.8</b>	<b>100.0%</b>

**Tableau A5 Apport en Genistéine+Daïdzéine chez les adultes de 15 ans et plus, hors aliments à base de soja**

Adultes (n=1474)	GENISTÉINE+DAÏDZÉINE			
	Ensemble de la population			
	Moyenne (µg/j)	Écart-type (µg/j)	95è perc. (µg/j)	Contribution
<b>Légumes (hors pommes de terre)</b>	<b>8.8</b>	<b>14.1</b>	<b>25.1</b>	<b>34.1%</b>
Fruits	3.6	8.7	18.9	13.9%
Café en poudre	2.4	3.7	9	9.3%
Condiments et sauces	2	14.4	0.3	7.7%
Riz et semoule	1.2	1.6	4.2	4.6%
Entrées	1.2	5.2	8.2	4.6%
Céréales pour petit déjeuner	1.1	3.6	7.3	4.3%
Pâtes	1.1	1.1	3	4.2%
Légumes secs	0.7	2.8	3.5	2.7%
Plats composés	0.7	1.1	2.5	2.7%
Pommes de terre et apparenté	0.6	0.6	1.9	2.3%
Pâtisserie	0.4	0.8	2	1.5%
Fruits secs et graines oléagineuses	0.4	1.7	2.1	1.5%
Viennoiseries	0.3	0.7	1.4	1.2%
Biscuits	0.3	0.9	1.8	1.2%
Entremets	0.2	0.5	1	0.8%
Pizzas, quiches et pâtisseries salées	0.2	0.5	1.1	0.78%
Compotes et fruits cuits	0.2	0.5	0.9	0.8%
Sucres et dérivés	0.1	0.3	0.6	0.4%
Soupes	0.1	0.3	0.6	0.4%
Autres catégories	0	0.2	0.1	0.0%
<b>Apport total hors aliments à base de soja</b>	<b>25.8</b>	<b>24.1</b>	<b>61.8</b>	<b>100.0%</b>

**I-2 Chez les enfants (3 à 14 ans)**

**Tableau A6 Apport en Genistéine chez les enfants de 3 à 14 ans, hors aliments à base de soja**

Enfants (n=1018)	GENISTÉINE			
	Ensemble de la population			
	Moyenne (µg/j)	Écart-type (µg/j)	95è perc. (µg/j)	Contribution
<b>Légumes (hors pommes de terre)</b>	<b>3.5</b>	<b>3.7</b>	<b>10.1</b>	<b>37.2%</b>
Pâtes	1.1	1	3	11.7%
Céréales pour petit déjeuner	0.8	1.8	3.9	8.5%
Riz et semoule	0.8	0.9	2.2	8.5%
Fruits	0.8	2.3	4.1	8.5%
Entrées	0.6	3.3	1.1	6.4%
Condiments et sauces	0.5	4.8	0.2	5.3%
Pommes de terre et apparenté	0.4	0.4	1.1	4.3%
Plats composés	0.3	0.6	1.5	3.2%
Légumes secs	0.2	0.6	1.1	2.1%
Biscuits	0.1	0.2	0.4	1.1%
Fruits secs et graines oléagineuses	0.1	0.6	1	1.1%
Sucres et dérivés	0.1	0.1	0.3	1.1%
Autres catégories	0.1	0.4	0.5	1.1%
<b>Apport total hors aliments à base de soja</b>	<b>9.4</b>	<b>8.4</b>	<b>22</b>	<b>100.0%</b>

Tableau A7 Apport en Daïdzéine chez les enfants de 3 à 14 ans, hors aliments à base de soja

Enfants (n=1018)	DAÏDZÉINE			
	Ensemble de la population			
	Moyenne (µg/j)	Écart-type (µg/j)	95 <sup>e</sup> perc. (µg/j)	Contribution
<b>Céréales pour petit déjeuner</b>	<b>3</b>	<b>4.4</b>	<b>11.3</b>	<b>33.7%</b>
Légumes (hors pommes de terre)	1.5	2	5.1	16.8%
Fruits	1	2.6	4.8	11.2%
Riz et semoule	0.5	0.6	1.5	5.6%
Biscuits	0.5	1	2.4	5.6%
Viennoiseries	0.4	0.9	1.6	4.5%
Pâtisserie	0.3	0.6	1.7	3.4%
Plats composés	0.3	0.6	1.5	3.4%
Condiments et sauces	0.3	3.3	0	3.4%
Pommes de terre et apparenté	0.2	0.2	0.6	2.2%
Café	0.2	1	0.7	2.2%
Compotes et fruits cuits	0.2	0.5	0.9	2.2%
Légumes secs	0.1	0.4	1	1.1%
Entremets	0.1	0.3	0.4	1.1%
Fruits secs et graines oléagineuses	0.1	0.3	0.5	1.1%
Pizzas, quiches et pâtisseries salées	0.1	0.3	0.9	1.1%
Entrées	0.1	0.2	0.3	1.1%
Autres catégories	0.1	0.3	0.4	1.1%
<b>Apport total hors aliments à base de soja</b>	<b>8.9</b>	<b>6.9</b>	<b>20.8</b>	<b>100.0%</b>

Tableau A8. Apport en Genistéine+Daïdzéine chez les enfants de 3 à 14 ans, hors aliments à base de soja

Enfants (n=1018)	GENISTÉINE+DAÏDZÉINE			
	Ensemble de la population			
	Moyenne (µg/j)	Écart-type (µg/j)	95 <sup>e</sup> perc. (µg/j)	Contribution
<b>Légumes (hors pommes de terre)</b>	<b>5</b>	<b>5.4</b>	<b>14.8</b>	<b>27.5%</b>
Céréales pour petit déjeuner	3.8	5.8	14.6	20.9%
Fruits	1.7	4.6	8.5	9.3%
Riz et semoule	1.3	1.5	3.7	7.1%
Pâtes	1.1	1	3.1	6.0%
Condiments et sauces	0.8	8	0.2	4.4%
Entrées	0.7	3.5	1.7	3.8%
Biscuits	0.6	1.1	2.8	3.3%
Pommes de terre et apparenté	0.6	0.6	1.7	3.3%
Plats composés	0.6	0.9	2.4	3.3%
Légumes secs	0.4	1	1.8	2.2%
Viennoiseries	0.4	0.9	1.6	2.2%
Pâtisserie	0.3	0.7	1.7	1.6%
Fruits secs et graines oléagineuses	0.2	0.9	1.5	1.1%
Café	0.2	1	0.7	1.1%
Compotes et fruits cuits	0.2	0.8	0.9	1.1%
Entremets	0.1	0.3	0.7	0.5%
Sucres et dérivés	0.1	0.2	0.4	0.5%
Pizzas, quiches et pâtisseries salées	0.1	0.3	0.9	0.5%
Autres catégories	0.1	0.4	0.5	0.5%
<b>Apport total hors aliments à base de soja</b>	<b>18.2</b>	<b>14</b>	<b>39.1</b>	<b>100.0%</b>



## II- Apport, hors aliments à base de soja, en daïdzéine et génistéine, par classe d'âge et de sexe

Tableau A9 Apport en Génistéine par sexe et par classe d'âge, hors aliments à base de soja

			GENISTÉINE			
			Ensemble de la population			
Catégorie	Sexe	Classe d'âge	Effectif	Moyenne (µg/1000 Kcal/j)	Écart-type (µg/1000 Kcal/j)	95è perc. (µg/1000 Kcal/j)
Céréales pour petit déjeuner	Garçon	3 à 9 ans	314	0.5	1.0	2.2
		10 à 14 ans	216	0.5	1.0	2.6
	Homme	15 à 18 ans	61	0.4	0.9	2.9
		19 à 49 ans	362	0.1	0.4	0.4
		50 ans et plus	249	0.0	0.2	0.0
	Fille	3 à 9 ans	279	0.4	0.7	1.7
		10 à 14 ans	209	0.4	0.8	2.0
	Femme	15 à 18 ans	74	0.4	0.9	2.4
		19 à 49 ans	454	0.2	0.6	1.3
		50 ans et plus	274	0.1	0.3	0.2
Pâtes	Garçon	3 à 9 ans	314	0.6	0.5	1.6
		10 à 14 ans	216	0.7	0.6	1.7
	Homme	15 à 18 ans	61	0.8	0.9	2.1
		19 à 49 ans	362	0.5	0.5	1.4
		50 ans et plus	249	0.4	0.4	1.2
	Fille	3 à 9 ans	279	0.6	0.5	1.6
		10 à 14 ans	209	0.7	0.5	1.8
	Femme	15 à 18 ans	74	0.7	0.6	1.8
		19 à 49 ans	454	0.5	0.5	1.4
		50 ans et plus	274	0.4	0.4	1.1
Riz et semoule	Garçon	3 à 9 ans	314	0.4	0.5	1.1
		10 à 14 ans	216	0.4	0.5	1.5
	Homme	15 à 18 ans	61	0.4	0.6	1.9
		19 à 49 ans	362	0.4	0.4	1.1
		50 ans et plus	249	0.3	0.4	1.0
	Fille	3 à 9 ans	279	0.4	0.4	1.2
		10 à 14 ans	209	0.5	0.6	1.5
	Femme	15 à 18 ans	74	0.5	0.6	1.6
		19 à 49 ans	454	0.4	0.5	1.4
		50 ans et plus	274	0.2	0.4	1.0
Légumes (hors pommes de terre)	Garçon	3 à 9 ans	314	1.9	2.1	5.4
		10 à 14 ans	216	1.9	2.0	6.2
	Homme	15 à 18 ans	61	2.4	2.6	8.0
		19 à 49 ans	362	2.3	3.1	6.7
		50 ans et plus	249	2.9	2.8	8.0
	Fille	3 à 9 ans	279	1.9	1.8	5.3
		10 à 14 ans	209	1.9	2.1	5.6
	Femme	15 à 18 ans	74	2.3	2.4	7.2
		19 à 49 ans	454	2.7	2.9	7.6
		50 ans et plus	274	3.5	7.6	9.4
Pommes de terre et apparenté	Garçon	3 à 9 ans	314	0.2	0.2	0.5
		10 à 14 ans	216	0.2	0.2	0.6
	Homme	15 à 18 ans	61	0.2	0.2	0.5
		19 à 49 ans	362	0.2	0.2	0.5
		50 ans et plus	249	0.2	0.2	0.6
	Fille	3 à 9 ans	279	0.2	0.2	0.6
		10 à 14 ans	209	0.3	0.3	0.7
	Femme	15 à 18 ans	74	0.2	0.2	0.6
		19 à 49 ans	454	0.2	0.2	0.6
		50 ans et plus	274	0.2	0.2	0.7
Légumes secs	Homme	3 à 9 ans	314	0.1	0.3	0.6
		10 à 14 ans	216	0.1	0.3	0.6
	Homme	15 à 18 ans	61	0.2	1.2	0.8
		19 à 49 ans	362	0.2	0.6	0.7
		50 ans et plus	249	0.3	1.3	1.2
	Femme	3 à 9 ans	279	0.1	0.4	0.5
		10 à 14 ans	209	0.2	0.5	0.6
	Femme	15 à 18 ans	74	0.2	0.6	1.6
		19 à 49 ans	454	0.2	0.6	0.7
		50 ans et plus	274	0.2	0.8	0.9
Fruits	Garçon	3 à 9 ans	314	0.4	1.0	1.9
		10 à 14 ans	216	0.3	0.9	1.7
	Homme	15 à 18 ans	61	0.4	0.9	1.8
		19 à 49 ans	362	0.3	1.0	1.8
		50 ans et plus	249	0.9	2.5	5.2
Fille	3 à 9 ans	279	0.4	0.8	1.9	

GENISTÉINE							
Ensemble de la population							
Catégorie	Sexe	Classe d'âge	Effectif	Moyenne (µg/1000 Kcal/l)	Écart-type (µg/1000 Kcal/l)	95è perc. (µg/1000 Kcal/l)	
	Femme	10 à 14 ans	209	0.6	2.5	2.5	
		15 à 18 ans	74	0.8	2.5	3.2	
		19 à 49 ans	454	0.6	1.4	2.7	
		50 ans et plus	274	1.4	3.2	6.9	
Fruits secs et graines oléagineuses	Garçon	3 à 9 ans	314	0.1	0.3	0.4	
		10 à 14 ans	216	0.1	0.4	0.4	
		15 à 18 ans	61	0.0	0.1	0.0	
		19 à 49 ans	362	0.1	0.6	0.7	
	Fille	3 à 9 ans	279	0.1	0.2	0.5	
		10 à 14 ans	209	0.0	0.2	0.3	
		15 à 18 ans	74	0.1	0.5	0.6	
		19 à 49 ans	454	0.1	0.4	0.6	
	Femme	19 à 49 ans	454	0.1	0.4	0.6	
		50 ans et plus	274	0.1	0.8	0.7	
		Garçon	3 à 9 ans	314	0.0	0.1	0.2
			10 à 14 ans	216	0.0	0.1	0.1
15 à 18 ans	61		0.0	0.1	0.1		
19 à 49 ans	362		0.0	0.1	0.2		
Fille	3 à 9 ans	279	0.0	0.1	0.2		
	10 à 14 ans	209	0.0	0.1	0.2		
	15 à 18 ans	74	0.0	0.1	0.2		
	19 à 49 ans	454	0.1	0.1	0.2		
Femme	19 à 49 ans	454	0.1	0.1	0.2		
	50 ans et plus	274	0.1	0.1	0.3		
	Garçon	3 à 9 ans	314	0.1	0.2	0.7	
		10 à 14 ans	216	0.2	0.4	1.0	
15 à 18 ans		61	0.2	0.4	1.0		
19 à 49 ans		362	0.2	0.4	0.8		
Fille	3 à 9 ans	279	0.1	0.3	0.6		
	10 à 14 ans	209	0.2	0.4	1.0		
	15 à 18 ans	74	0.3	0.4	1.1		
	19 à 49 ans	454	0.2	0.3	0.9		
Femme	19 à 49 ans	454	0.2	0.3	0.9		
	50 ans et plus	274	0.1	0.2	0.7		
	Garçon	3 à 9 ans	314	0.3	1.5	2.5	
		10 à 14 ans	216	0.2	1.9	0.3	
15 à 18 ans		61	0.3	1.3	0.1		
19 à 49 ans		362	0.5	1.9	3.3		
Fille	3 à 9 ans	279	0.2	1.1	0.6		
	10 à 14 ans	209	0.6	2.9	3.4		
	15 à 18 ans	74	1.0	4.2	5.0		
	19 à 49 ans	454	0.7	2.8	5.1		
Femme	19 à 49 ans	454	0.7	2.8	5.1		
	50 ans et plus	274	0.4	1.6	2.5		
	Garçon	3 à 9 ans	314	0.2	1.9	0.1	
		10 à 14 ans	216	0.4	2.9	0.2	
15 à 18 ans		61	1.8	8.6	0.1		
19 à 49 ans		362	0.5	3.3	0.1		
Fille	3 à 9 ans	279	0.1	1.1	0.1		
	10 à 14 ans	209	0.3	2.4	0.1		
	15 à 18 ans	74	2.2	10.6	9.0		
	19 à 49 ans	454	0.8	5.5	0.2		
Femme	19 à 49 ans	454	0.8	5.5	0.2		
	50 ans et plus	274	0.1	1.6	0.1		

GENISTÉINE						
Ensemble de la population						
Catégorie	Sexe	Classe d'âge	Effectif	Moyenne (µg/1000 Kcal/l)	Écart-type (µg/1000 Kcal/l)	95è perc. (µg/1000 Kcal/l)
Autres catégories	Garçon	3 à 9 ans	314	0.1	0.2	0.4
		10 à 14 ans	216	0.1	0.3	0.3
		15 à 18 ans	61	0.1	0.2	0.5
	Homme	19 à 49 ans	362	0.1	0.2	0.4
		50 ans et plus	249	0.1	0.2	0.4
		Fille	3 à 9 ans	279	0.1	0.3
	Femme	10 à 14 ans	209	0.1	0.2	0.3
		15 à 18 ans	74	0.1	0.2	0.5
		19 à 49 ans	454	0.1	0.2	0.4
		50 ans et plus	274	0.1	0.2	0.5
Apport total hors aliments à base de soja	Homme	3 à 9 ans	314	4.8	3.6	11.0
		10 à 14 ans	216	5.1	4.8	11.0
		15 à 18 ans	61	7.3	9.1	20.5
	Homme	19 à 49 ans	362	5.4	5.1	13.7
		50 ans et plus	249	6.3	6.2	15.9
	Femme	3 à 9 ans	279	4.6	2.7	9.7
		10 à 14 ans	209	5.8	5.6	15.0
		15 à 18 ans	74	8.8	12.7	38.3
	Femme	19 à 49 ans	454	6.6	7.4	18.9
		50 ans et plus	274	7.0	9.0	18.0

Tableau A10 Apport en Daidzéine par sexe et par classe d'âge, hors aliments à base de soja

			DAIDZEINE			
			Ensemble de la population			
Catégorie	Sexe	Classe d'âge	Effectif	Moyenne (µg/1000 Kcal/lj)	Écart-type (µg/1000 Kcal/lj)	95è perc. (µg/1000 Kcal/lj)
Céréales pour petit déjeuner	Garçon	3 à 9 ans	314	1.6	2.3	7.1
		10 à 14 ans	216	1.7	2.5	6.0
		15 à 18 ans	61	1.2	2.3	6.0
	Homme	19 à 49 ans	362	0.2	0.9	1.5
		50 ans et plus	249	0.2	0.7	1.4
	Fille	3 à 9 ans	279	1.5	1.9	5.2
		10 à 14 ans	209	1.4	1.8	5.7
		15 à 18 ans	74	1.1	1.8	5.7
	Femme	19 à 49 ans	454	0.6	1.5	4.2
		50 ans et plus	274	0.2	1.0	1.5
Riz et semoule	Garçon	3 à 9 ans	314	0.3	0.3	0.8
		10 à 14 ans	216	0.3	0.4	1.0
		15 à 18 ans	61	0.3	0.4	1.2
	Homme	19 à 49 ans	362	0.2	0.3	0.7
		50 ans et plus	249	0.2	0.3	0.7
	Fille	3 à 9 ans	279	0.3	0.3	0.8
		10 à 14 ans	209	0.3	0.4	1.0
		15 à 18 ans	74	0.3	0.4	1.1
	Femme	19 à 49 ans	454	0.3	0.3	1.0
		50 ans et plus	274	0.2	0.3	0.6
Viennoiseries	Garçon	3 à 9 ans	314	0.2	0.4	1.0
		10 à 14 ans	216	0.2	0.4	1.0
		15 à 18 ans	61	0.2	0.4	0.9
	Homme	19 à 49 ans	362	0.1	0.3	0.6
		50 ans et plus	249	0.1	0.2	0.4
	Fille	3 à 9 ans	279	0.2	0.2	0.7
		10 à 14 ans	209	0.2	0.2	0.6
		15 à 18 ans	74	0.1	0.2	0.5
	Femme	19 à 49 ans	454	0.2	0.4	0.8
		50 ans et plus	274	0.1	0.3	0.5
Biscuits	Garçon	3 à 9 ans	314	0.3	0.4	1.1
		10 à 14 ans	216	0.2	0.4	0.9
		15 à 18 ans	61	0.2	0.5	1.4
	Homme	19 à 49 ans	362	0.1	0.3	0.6
		50 ans et plus	249	0.1	0.2	0.4
	Fille	3 à 9 ans	279	0.3	0.5	1.2
		10 à 14 ans	209	0.3	0.5	1.2
		15 à 18 ans	74	0.2	0.3	0.7
	Femme	19 à 49 ans	454	0.1	0.3	0.7
		50 ans et plus	274	0.1	0.3	0.7
pâtisserie	Garçon	3 à 9 ans	314	0.1	0.3	0.7
		10 à 14 ans	216	0.2	0.3	0.8
		15 à 18 ans	61	0.1	0.2	0.4
	Homme	19 à 49 ans	362	0.2	0.3	0.8
		50 ans et plus	249	0.2	0.4	0.9
	Fille	3 à 9 ans	279	0.1	0.4	0.7
		10 à 14 ans	209	0.2	0.3	0.9
		15 à 18 ans	74	0.2	0.3	0.7
	Femme	19 à 49 ans	454	0.2	0.3	0.8
		50 ans et plus	274	0.2	0.4	0.9
Légumes (hors pommes de terre)	Garçon	3 à 9 ans	314	0.8	1.1	2.5
		10 à 14 ans	216	0.8	1.1	2.8
		15 à 18 ans	61	1.2	1.6	4.5
	Homme	19 à 49 ans	362	1.1	2.0	3.7
		50 ans et plus	249	1.3	1.5	4.4
	Fille	3 à 9 ans	279	0.8	1.0	2.6
		10 à 14 ans	209	0.9	1.0	2.9
		15 à 18 ans	74	1.2	1.9	4.1
	Femme	19 à 49 ans	454	1.4	1.8	5.0
		50 ans et plus	274	2.0	4.4	5.7
Pommes de terre et apparenté	Garçon	3 à 9 ans	314	0.1	0.1	0.3
		10 à 14 ans	216	0.1	0.1	0.3
		15 à 18 ans	61	0.1	0.1	0.3
	Homme	19 à 49 ans	362	0.1	0.1	0.2
		50 ans et plus	249	0.1	0.1	0.3
Fille	3 à 9 ans	279	0.1	0.1	0.3	

			DAIDZEINE			
			Ensemble de la population			
Catégorie	Sexe	Classe d'âge	Effectif	Moyenne (µg/1000 Kcal/j)	Écart-type (µg/1000 Kcal/j)	95è perc. (µg/1000 Kcal/j)
	Femme	10 à 14 ans	209	0.1	0.1	0.3
		15 à 18 ans	74	0.1	0.1	0.3
		19 à 49 ans	454	0.1	0.1	0.3
		50 ans et plus	274	0.1	0.1	0.4
Légumes secs	Homme	3 à 9 ans	314	0.1	0.2	0.5
		10 à 14 ans	216	0.1	0.2	0.4
		15 à 18 ans	61	0.1	0.6	0.4
		19 à 49 ans	362	0.1	0.3	0.5
	Femme	50 ans et plus	249	0.2	0.8	1.3
		3 à 9 ans	279	0.1	0.3	0.6
		10 à 14 ans	209	0.1	0.3	0.4
		15 à 18 ans	74	0.2	0.6	1.1
Fruits	Homme	19 à 49 ans	454	0.1	0.4	0.6
		50 ans et plus	274	0.1	0.5	1.1
		3 à 9 ans	314	0.5	1.2	1.4
		10 à 14 ans	216	0.5	1.1	2.2
	Femme	15 à 18 ans	61	0.5	1.1	3.2
		19 à 49 ans	362	0.5	1.3	2.5
		50 ans et plus	249	1.4	2.8	6.1
		3 à 9 ans	279	0.5	1.1	1.9
Fruits secs et graines oléagineuses	Homme	10 à 14 ans	209	0.7	2.3	3.0
		15 à 18 ans	74	1.1	3.3	4.1
		19 à 49 ans	454	0.8	1.7	3.6
		50 ans et plus	274	1.9	3.7	9.0
	Femme	3 à 9 ans	314	0.0	0.2	0.2
		10 à 14 ans	216	0.0	0.2	0.3
		15 à 18 ans	61	0.0	0.1	0.0
		19 à 49 ans	362	0.1	0.3	0.4
Café	Homme	50 ans et plus	249	0.0	0.1	0.3
		3 à 9 ans	279	0.0	0.1	0.2
		10 à 14 ans	209	0.0	0.1	0.2
		15 à 18 ans	74	0.0	0.2	0.3
	Femme	19 à 49 ans	454	0.1	0.2	0.3
		50 ans et plus	274	0.1	0.4	0.4
		3 à 9 ans	314	0.1	0.6	0.2
		10 à 14 ans	216	0.1	0.7	0.5
Pizzas, quiches et pâtisseries salées	Homme	15 à 18 ans	61	0.2	0.3	0.9
		19 à 49 ans	362	0.9	1.1	2.7
		50 ans et plus	249	1.2	1.7	4.2
		3 à 9 ans	279	0.1	0.6	0.2
	Femme	10 à 14 ans	209	0.1	0.3	0.5
		15 à 18 ans	74	0.3	0.8	1.4
		19 à 49 ans	454	1.1	1.5	3.8
		50 ans et plus	274	1.8	2.8	8.2
Plats composés	Homme	3 à 9 ans	314	0.1	0.2	0.4
		10 à 14 ans	216	0.1	0.2	0.5
		15 à 18 ans	61	0.1	0.2	0.5
		19 à 49 ans	362	0.1	0.2	0.6
	Femme	50 ans et plus	249	0.1	0.1	0.4
		3 à 9 ans	279	0.1	0.2	0.5
		10 à 14 ans	209	0.1	0.2	0.4
		15 à 18 ans	74	0.1	0.2	0.5
Entrées	Homme	19 à 49 ans	454	0.1	0.2	0.6
		50 ans et plus	274	0.1	0.3	0.5
		3 à 9 ans	314	0.2	0.4	0.8
		10 à 14 ans	216	0.1	0.3	0.6
	Femme	15 à 18 ans	61	0.1	0.3	0.7
		19 à 49 ans	362	0.1	0.3	0.8
		50 ans et plus	249	0.1	0.4	0.5
		3 à 9 ans	279	0.1	0.3	0.8

			DAIDZEINE			
			Ensemble de la population			
Catégorie	Sexe	Classe d'âge	Effectif	Moyenne (µg/1000 Kcal/lj)	Écart-type (µg/1000 Kcal/lj)	95è perc. (µg/1000 Kcal/lj)
	Femme	10 à 14 ans	209	0.0	0.2	0.3
		15 à 18 ans	74	0.1	0.2	0.3
		19 à 49 ans	454	0.1	0.2	0.3
		50 ans et plus	274	0.0	0.1	0.3
Entremets	Homme	3 à 9 ans	314	0.0	0.1	0.3
		10 à 14 ans	216	0.0	0.1	0.1
		15 à 18 ans	61	0.0	0.1	0.3
		19 à 49 ans	362	0.0	0.2	0.3
	Femme	3 à 9 ans	249	0.1	0.2	0.6
		10 à 14 ans	279	0.0	0.2	0.2
		15 à 18 ans	209	0.0	0.2	0.3
		19 à 49 ans	74	0.0	0.2	0.2
Compotes et fruits cuits	Homme	3 à 9 ans	314	0.1	0.2	0.4
		10 à 14 ans	216	0.1	0.3	0.3
		15 à 18 ans	61	0.0	0.1	0.3
		19 à 49 ans	362	0.0	0.1	0.2
	Femme	3 à 9 ans	249	0.1	0.2	0.4
		10 à 14 ans	279	0.1	0.4	0.5
		15 à 18 ans	209	0.1	0.3	0.3
		19 à 49 ans	74	0.1	0.1	0.5
Condiments et sauces	Homme	3 à 9 ans	314	0.1	1.3	0.0
		10 à 14 ans	216	0.3	2.0	0.0
		15 à 18 ans	61	1.2	5.9	0.0
		19 à 49 ans	362	0.3	2.2	0.0
	Femme	3 à 9 ans	249	0.3	2.6	0.0
		10 à 14 ans	279	0.0	0.8	0.0
		15 à 18 ans	209	0.2	1.6	0.0
		19 à 49 ans	74	1.5	7.3	6.1
Autres catégories	Homme	3 à 9 ans	314	0.0	0.1	0.2
		10 à 14 ans	216	0.0	0.1	0.2
		15 à 18 ans	61	0.0	0.1	0.1
		19 à 49 ans	362	0.0	0.1	0.1
	Femme	3 à 9 ans	249	0.1	0.1	0.4
		10 à 14 ans	279	0.0	0.1	0.2
		15 à 18 ans	209	0.0	0.2	0.2
		19 à 49 ans	74	0.0	0.1	0.4
Apport total hors aliments à base de soja	Homme	3 à 9 ans	314	4.6	3.2	10.6
		10 à 14 ans	216	4.8	3.6	11.0
		15 à 18 ans	61	5.7	6.3	13.1
		19 à 49 ans	362	4.4	3.7	11.5
	Femme	3 à 9 ans	249	5.7	4.9	14.6
		10 à 14 ans	279	4.5	2.8	10.2
		15 à 18 ans	209	4.8	3.4	9.3
		19 à 49 ans	74	6.8	9.0	24.5
	Femme	50 ans et plus	454	5.8	5.0	14.1
		50 ans et plus	274	7.5	6.9	18.7

Tableau A11 Apport en Genistéine+Daidzéine par sexe et par classe d'âge, hors aliments à base de soja

GENISTEINE+DAIDZEINE						
Ensemble de la population						
Catégorie	Sexe	Classe d'âge	Effectif	Moyenne (µg/1000 Kcal/j)	Ecart-type (µg/1000 Kcal/j)	95è perc. (µg/1000 Kcal/j)
Céréales pour petit déjeuner	Garçon	3 à 9 ans	314	2.1	3.2	8.0
		10 à 14 ans	216	2.2	3.2	7.5
	Homme	15 à 18 ans	61	1.7	3.2	8.5
		19 à 49 ans	362	0.3	1.2	1.7
		50 ans et plus	249	0.2	0.9	2.0
	Fille	3 à 9 ans	279	1.9	2.4	6.8
		10 à 14 ans	209	1.8	2.4	6.9
	Femme	15 à 18 ans	74	1.5	2.6	8.2
		19 à 49 ans	454	0.7	2.0	5.0
		50 ans et plus	274	0.3	1.3	1.7
Pâtes	Garçon	3 à 9 ans	314	0.6	0.5	1.6
		10 à 14 ans	216	0.7	0.6	1.7
	Homme	15 à 18 ans	61	0.8	0.9	2.1
		19 à 49 ans	362	0.5	0.5	1.4
		50 ans et plus	249	0.4	0.4	1.2
	Fille	3 à 9 ans	279	0.6	0.5	1.6
		10 à 14 ans	209	0.7	0.6	1.8
	Femme	15 à 18 ans	74	0.7	0.6	1.8
		19 à 49 ans	454	0.5	0.5	1.4
		50 ans et plus	274	0.4	0.4	1.1
Riz et semoule	Garçon	3 à 9 ans	314	0.6	0.8	1.9
		10 à 14 ans	216	0.7	0.9	2.4
	Homme	15 à 18 ans	61	0.7	1.0	3.1
		19 à 49 ans	362	0.6	0.7	1.9
		50 ans et plus	249	0.4	0.7	1.7
	Fille	3 à 9 ans	279	0.7	0.7	2.0
		10 à 14 ans	209	0.8	0.9	2.5
	Femme	15 à 18 ans	74	0.8	1.0	2.7
		19 à 49 ans	454	0.7	0.8	2.5
		50 ans et plus	274	0.4	0.6	1.6
Viennoiseries	Garçon	3 à 9 ans	314	0.2	0.4	1.0
		10 à 14 ans	216	0.2	0.4	1.0
	Homme	15 à 18 ans	61	0.2	0.4	0.9
		19 à 49 ans	362	0.1	0.3	0.6
		50 ans et plus	249	0.1	0.2	0.4
	Fille	3 à 9 ans	279	0.2	0.3	0.7
		10 à 14 ans	209	0.2	0.2	0.6
	Femme	15 à 18 ans	74	0.1	0.2	0.5
		19 à 49 ans	454	0.2	0.4	0.8
		50 ans et plus	274	0.1	0.3	0.5
Biscuits	Garçon	3 à 9 ans	314	0.3	0.4	1.3
		10 à 14 ans	216	0.2	0.4	1.0
	Homme	15 à 18 ans	61	0.3	0.7	2.2
		19 à 49 ans	362	0.2	0.5	0.8
		50 ans et plus	249	0.1	0.3	0.5
	Fille	3 à 9 ans	279	0.3	0.6	1.3
		10 à 14 ans	209	0.3	0.5	1.4
	Femme	15 à 18 ans	74	0.2	0.3	1.1
		19 à 49 ans	454	0.2	0.4	0.7
		50 ans et plus	274	0.2	0.4	1.0
Pâtisserie	Garçon	3 à 9 ans	314	0.1	0.3	0.7
		10 à 14 ans	216	0.2	0.3	0.8
	Homme	15 à 18 ans	61	0.1	0.2	0.5
		19 à 49 ans	362	0.2	0.3	0.8
		50 ans et plus	249	0.2	0.4	1.0
	Fille	3 à 9 ans	279	0.2	0.4	0.7
		10 à 14 ans	209	0.2	0.3	0.9
	Femme	15 à 18 ans	74	0.2	0.3	0.8
		19 à 49 ans	454	0.2	0.3	0.8
		50 ans et plus	274	0.2	0.4	0.9
Légumes (hors pommes de terre)	Garçon	3 à 9 ans	314	2.7	3.0	7.9
		10 à 14 ans	216	2.7	2.9	8.7
	Homme	15 à 18 ans	61	3.6	4.0	12.5
		19 à 49 ans	362	3.4	5.0	10.1
		50 ans et plus	249	4.2	4.1	12.5
	Fille	3 à 9 ans	279	2.7	2.6	8.2
		10 à 14 ans	209	2.8	2.9	7.8
	Femme	15 à 18 ans	74	3.5	3.9	12.5
		19 à 49 ans	454	4.1	4.4	11.1
		50 ans et plus	274	5.5	11.8	15.8
Pommes de terre et apparenté	Garçon	3 à 9 ans	314	0.3	0.3	0.8
		10 à 14 ans	216	0.3	0.3	0.9
	Homme	15 à 18 ans	61	0.3	0.3	0.8
		19 à 49 ans	362	0.3	0.2	0.7
		50 ans et plus	249	0.3	0.3	0.9
	Fille	3 à 9 ans	279	0.3	0.3	0.9
		10 à 14 ans	209	0.4	0.4	1.0
	Femme	15 à 18 ans	74	0.3	0.3	0.9
		19 à 49 ans	454	0.3	0.3	0.8
		50 ans et plus	274	0.4	0.3	1.1
Légumes secs	Homme	3 à 9 ans	314	0.2	0.5	1.2
		10 à 14 ans	216	0.2	0.5	1.1
	Homme	15 à 18 ans	61	0.3	1.8	1.2
		19 à 49 ans	362	0.3	0.8	1.4
		50 ans et plus	249	0.5	2.0	2.4
	Femme	3 à 9 ans	279	0.2	0.6	1.1
		10 à 14 ans	209	0.2	0.7	1.1
		15 à 18 ans	74	0.3	1.1	2.6
Femme	19 à 49 ans	454	0.3	0.9	1.4	
	50 ans et plus	274	0.3	1.3	2.0	
Fruits	Garçon	3 à 9 ans	314	0.8	2.1	3.1
		10 à 14 ans	216	0.8	1.8	3.6
	Homme	15 à 18 ans	61	0.8	2.0	3.5

GENEISTEINE+DAIDZEINE							
Ensemble de la population							
Catégorie	Sexe	Classe d'âge	Effectif	Moyenne (µg/1000 Kcal/j)	Ecart-type (µg/1000 Kcal/j)	95 <sup>e</sup> perc. (µg/1000 Kcal/j)	
	Fille	19 à 49 ans	362	0.8	2.3	3.5	
		50 ans et plus	249	2.4	5.1	11.2	
		3 à 9 ans	279	0.8	1.8	2.8	
	Femme	10 à 14 ans	209	1.3	4.6	5.6	
		15 à 18 ans	74	1.9	5.7	7.0	
		19 à 49 ans	454	1.4	3.0	6.3	
		50 ans et plus	274	3.3	6.6	15.2	
Fruits secs et graines oléagineuses	Garçon	3 à 9 ans	314	0.1	0.5	0.7	
		10 à 14 ans	216	0.1	0.6	0.5	
		15 à 18 ans	61	0.0	0.2	0.0	
	Homme	19 à 49 ans	362	0.2	0.8	1.1	
		50 ans et plus	249	0.1	0.3	0.7	
		3 à 9 ans	279	0.1	0.3	0.7	
	Fille	10 à 14 ans	209	0.1	0.3	0.5	
		15 à 18 ans	74	0.2	0.7	1.0	
		19 à 49 ans	454	0.2	0.5	1.0	
			50 ans et plus	274	0.2	1.1	1.0
	Sucres et dérivés	Garçon	3 à 9 ans	314	0.0	0.1	0.2
			10 à 14 ans	216	0.0	0.1	0.2
15 à 18 ans			61	0.0	0.1	0.2	
Homme		19 à 49 ans	362	0.1	0.1	0.3	
		50 ans et plus	249	0.1	0.1	0.3	
		3 à 9 ans	279	0.0	0.1	0.2	
Fille		10 à 14 ans	209	0.0	0.1	0.2	
		15 à 18 ans	74	0.0	0.1	0.2	
		19 à 49 ans	454	0.1	0.1	0.3	
			50 ans et plus	274	0.1	0.1	0.3
Café		Garçon	3 à 9 ans	314	0.1	0.6	0.2
			10 à 14 ans	216	0.1	0.7	0.5
	15 à 18 ans		61	0.2	0.3	0.9	
	Homme	19 à 49 ans	362	0.9	1.1	2.7	
		50 ans et plus	249	1.2	1.7	4.2	
		3 à 9 ans	279	0.1	0.6	0.2	
	Fille	10 à 14 ans	209	0.1	0.3	0.5	
		15 à 18 ans	74	0.3	0.8	1.4	
		19 à 49 ans	454	1.1	1.5	3.8	
			50 ans et plus	274	1.8	2.8	8.2
	Pizzas, quiches et pâtisseries salées	Garçon	3 à 9 ans	314	0.1	0.2	0.4
			10 à 14 ans	216	0.1	0.2	0.5
15 à 18 ans			61	0.1	0.2	0.5	
Homme		19 à 49 ans	362	0.1	0.2	0.6	
		50 ans et plus	249	0.1	0.1	0.4	
		3 à 9 ans	279	0.1	0.2	0.5	
Fille		10 à 14 ans	209	0.1	0.2	0.4	
		15 à 18 ans	74	0.1	0.2	0.5	
		19 à 49 ans	454	0.1	0.2	0.6	
			50 ans et plus	274	0.1	0.3	0.5
Soupes		Garçon	3 à 9 ans	314	0.0	0.1	0.2
			10 à 14 ans	216	0.0	0.1	0.2
	15 à 18 ans		61	0.0	0.1	0.2	
	Homme	19 à 49 ans	362	0.0	0.1	0.1	
		50 ans et plus	249	0.0	0.2	0.4	
		3 à 9 ans	279	0.0	0.1	0.3	
	Fille	10 à 14 ans	209	0.0	0.1	0.2	
		15 à 18 ans	74	0.0	0.2	0.6	
		19 à 49 ans	454	0.0	0.1	0.2	
			50 ans et plus	274	0.1	0.2	0.6
	Plats composés	Garçon	3 à 9 ans	314	0.3	0.5	1.2
			10 à 14 ans	216	0.3	0.5	1.2
15 à 18 ans			61	0.4	0.5	1.2	
Homme		19 à 49 ans	362	0.4	0.6	1.4	
		50 ans et plus	249	0.3	0.5	1.1	
		3 à 9 ans	279	0.3	0.5	1.2	
Fille		10 à 14 ans	209	0.4	0.6	1.8	
		15 à 18 ans	74	0.5	0.6	1.7	
		19 à 49 ans	454	0.3	0.5	1.2	
			50 ans et plus	274	0.2	0.4	1.0
Entrées		Garçon	3 à 9 ans	314	0.3	1.5	2.7
			10 à 14 ans	216	0.3	2.0	0.5
	15 à 18 ans		61	0.3	1.4	0.1	
	Homme	19 à 49 ans	362	0.5	2.0	3.4	
		50 ans et plus	249	0.5	2.2	3.1	
		3 à 9 ans	279	0.3	1.2	0.9	
	Fille	10 à 14 ans	209	0.7	3.1	3.6	
		15 à 18 ans	74	1.0	4.5	5.3	
		19 à 49 ans	454	0.7	3.0	5.4	
			50 ans et plus	274	0.4	1.6	2.6
	Entremets	Homme	3 à 9 ans	314	0.0	0.2	0.4
			10 à 14 ans	216	0.0	0.2	0.3
15 à 18 ans			61	0.0	0.2	0.4	
Homme		19 à 49 ans	362	0.1	0.2	0.4	
		50 ans et plus	249	0.1	0.2	0.6	
		3 à 9 ans	279	0.0	0.2	0.4	
Femme		10 à 14 ans	209	0.1	0.2	0.4	
		15 à 18 ans	74	0.0	0.2	0.2	
		19 à 49 ans	454	0.1	0.3	0.6	
			50 ans et plus	274	0.1	0.2	0.6



GENISTEINE+DAIDZEINE							
Ensemble de la population							
Catégorie	Sexe	Classe d'âge	Effectif	Moyenne (µg/1000 Kcal/j)	Ecart-type (µg/1000 Kcal/j)	95è perc. (µg/1000 Kcal/j)	
Compotes et fruits cuits	Garçon	3 à 9 ans	314	0.1	0.2	0.4	
		10 à 14 ans	216	0.1	0.6	0.3	
		15 à 18 ans	61	0.0	0.1	0.3	
		19 à 49 ans	362	0.0	0.1	0.2	
	Homme	50 ans et plus	249	0.1	0.2	0.4	
		3 à 9 ans	279	0.1	0.6	0.5	
		10 à 14 ans	209	0.1	0.5	0.3	
		15 à 18 ans	74	0.1	0.1	0.5	
	Femme	19 à 49 ans	454	0.1	0.3	0.5	
		50 ans et plus	274	0.1	0.4	0.6	
Condiments et sauces		Garçon	3 à 9 ans	314	0.3	3.2	0.1
			10 à 14 ans	216	0.7	4.9	0.2
	15 à 18 ans		61	3.1	14.5	0.1	
	19 à 49 ans		362	0.8	5.5	0.1	
	Homme	50 ans et plus	249	0.7	6.4	0.1	
		3 à 9 ans	279	0.1	1.9	0.1	
		10 à 14 ans	209	0.5	4.0	0.1	
		15 à 18 ans	74	3.8	17.9	15.1	
	Femme	19 à 49 ans	454	1.3	9.3	0.2	
		50 ans et plus	274	0.2	2.7	0.1	
Autres catégories		Garçon	3 à 9 ans	314	0.0	0.2	0.1
			10 à 14 ans	216	0.0	0.1	0.0
	15 à 18 ans		61	0.0	0.0	0.0	
	19 à 49 ans		362	0.0	0.1	0.0	
	Homme	50 ans et plus	249	0.0	0.1	0.0	
		3 à 9 ans	279	0.0	0.1	0.0	
		10 à 14 ans	209	0.0	0.1	0.0	
		15 à 18 ans	74	0.0	0.1	0.3	
	Femme	19 à 49 ans	454	0.0	0.1	0.1	
		50 ans et plus	274	0.0	0.2	0.0	
Apport total hors aliments à base de soja		Garçon	3 à 9 ans	314	9.4	6.1	20.3
			10 à 14 ans	216	10.0	7.6	22.0
	15 à 18 ans		61	13.0	15.1	27.6	
	19 à 49 ans		362	9.8	8.5	24.9	
	Homme	50 ans et plus	249	11.9	10.3	26.2	
		3 à 9 ans	279	9.0	4.8	18.5	
		10 à 14 ans	209	10.6	8.1	23.6	
		15 à 18 ans	74	15.6	21.3	50.9	
	Femme	19 à 49 ans	454	12.4	11.7	30.6	
		50 ans et plus	274	14.5	15.0	37.2	

### III. Données de consommation d'aliments à base de soja – desserts à base de soja, tofy, tonyu- par sexe et par classe d'âge (Tableau A12 )

Remarque : les seuls consommateurs d'aliments à base de soja sont les personnes ayant consommé des aliments à base de soja durant la semaine d'enquête

Catégorie	Sexe	Classe d'âge	Seuls consommateurs					
			Effectif	Taux (%)	Moyenne (g/j)	Écart-type (g/j)	95è perc. (g/j)	
Dessert au soja	Garçon	3 à 9 ans	1	0.3%	64.3		64.3	
		10 à 14 ans	0	0.0%				
	Homme	15 à 18 ans	0	0.0%				
		19 à 49 ans	1	0.3%	17.9		17.9	
		50 ans et plus	1	0.4%	128.6		128.6	
	Fille	3 à 9 ans	1	0.4%	17.9		17.9	
		10 à 14 ans	0	0.0%				
	Femme	15 à 18 ans	0	0.0%				
		19 à 49 ans	5	1.1%	39.3	19.6	71.4	
		50 ans et plus	2	0.7%	44.6	37.9	71.4	
	Tonyu	Garçon	3 à 9 ans	0	0.0%			
			10 à 14 ans	0	0.0%			
Homme		15 à 18 ans	1	1.6%	94.3		94.3	
		19 à 49 ans	0	0.0%				
		50 ans et plus	0	0.0%				
Fille		3 à 9 ans	1	0.4%	62.9		62.9	
		10 à 14 ans	0	0.0%				
Femme		15 à 18 ans	0	0.0%				
		19 à 49 ans	1	0.2%	240.0		240.0	
		50 ans et plus	0	0.0%				
Tofu		Garçon	3 à 9 ans	0	0.0%			
			10 à 14 ans	0	0.0%			
	Homme	15 à 18 ans	0	0.0%				
		19 à 49 ans	0	0.0%				
		50 ans et plus	0	0.0%				
	Fille	3 à 9 ans	0	0.0%				
		10 à 14 ans	0	0.0%				
	Femme	15 à 18 ans	0	0.0%				
		19 à 49 ans	0	0.0%				
		50 ans et plus	1	0.4%	42.0		42.0	

### IV- Estimation des apports en isoflavones par les aliments à base de soja

Remarque : les seuls consommateurs d'aliments à base de soja sont les personnes ayant consommé des aliments à base de soja durant la semaine d'enquête

#### IV-1 Chez les adultes (15 ans et plus)

Tableau A13 Apport des aliments à base de soja chez les adultes de 15 ans et plus : Genistéine

	Seuls consommateurs				
	Effectif	Taux (%)	Moyenne (µg/personne/j)	Écart-type (µg/personne/j)	95è perc. (µg/personne/j)
Dessert au soja	9	0.6%	8390.8	6411.2	22467.9
Tonyu	2	0.1%	6234.4	3843.2	8952.0
Tofu	1	0.1%	6205.5		6205.5
<b>Apport total par les produits à base de soja</b>	<b>12</b>	<b>0.8%</b>	<b>7849.3</b>	<b>5674.2</b>	<b>22468.0</b>

**Tableau A14 Apport des aliments à base de soja chez les adultes de 15 ans et plus : Daïdzéine**

	Seuls consommateurs				
	Effectif	Taux (%)	Moyenne (µg/personne/j)	Écart-type (µg/personne/j)	95è perc. (µg/personne/j)
Dessert au soja	9	0.6%	8306.7	6347.0	22242.9
Tonyu	2	0.1%	5686.2	3505.3	8164.8
Tofu	1	0.1%	4334.2		4334.2
<b>Apport total par les produits à base de soja</b>	<b>12</b>	<b>0.8%</b>	<b>7538.9</b>	<b>5697.0</b>	<b>22243.0</b>

**Tableau A15 Apport des aliments à base de soja chez les adultes de 15 ans et plus : Genistéine+Daïdzéine**

	Seuls consommateurs				
	Effectif	Taux (%)	Moyenne (µg/personne/j)	Écart-type (µg/personne/j)	95è perc. (µg/personne/j)
Dessert au soja	9	0.6%	16697.5	12758.3	44710.7
Tonyu	2	0.1%	11920.6	7348.5	17116.8
Tofu	1	0.1%	10539.7		10539.7
<b>Apport total par les produits à base de soja</b>	<b>12</b>	<b>0.8%</b>	<b>15388.0</b>	<b>11359.0</b>	<b>44711.0</b>

#### IV-2 Chez les enfants (3 à 14 ans)

**Tableau A16 Apport des aliments à base de soja chez les enfants de 3 à 14 ans : Genistéine**

	Seuls consommateurs				
	Effectif	Taux (%)	Moyenne (µg/personne/j)	Écart-type (µg/personne/j)	95è perc. (µg/personne/j)
Dessert au soja	2	0.2%	7177.2	5737.0	11233.9
Tonyu	1	0.1%	2344.6		2344.6
Tofu	0	0.0%			
<b>Apport total par les produits à base de soja</b>	<b>3</b>	<b>0.3%</b>	<b>5566.3</b>	<b>4923.6</b>	<b>11234.0</b>

**Tableau A17 Apport des aliments à base de soja chez les enfants de 3 à 14 ans : Daïdzéine**

	Seuls consommateurs				
	Effectif	Taux (%)	Moyenne (µg/personne/j)	Écart-type (µg/personne/j)	95è perc. (µg/personne/j)
Dessert au soja	2	0.2%	7105.4	5679.6	11121.4
Tonyu	1	0.1%	2138.4		2138.4
Tofu	0	0.0%			
<b>Apport total par les produits à base de soja</b>	<b>3</b>	<b>0.3%</b>	<b>5449.7</b>	<b>4934.8</b>	<b>11121.0</b>

**Tableau A18 Apport des aliments à base de soja chez les enfants de 3 à 14 ans : Genistéine+Daidzéine**

	Seuls consommateurs				
	Effectif	Taux (%)	Moyenne (µg/personne/j)	Écart-type (µg/personne/j)	95è perc. (µg/personne/j)
Dessert au soja	2	0.2%	14282.6	11416.6	22355.4
Tonyu	1	0.1%	4483.0		4483.0
Tofu	0	0.0%			
<b>Apport total par les produits à base de soja</b>	<b>3</b>	<b>0.3%</b>	<b>11016.0</b>	<b>9858.0</b>	<b>22355.0</b>

**III. Estimation des apports en isoflavones par les aliments à base de soja détaillé par classe d'âge et de sexe**

**Tableau A19 Estimation des apports en isoflavones par les aliments à base de soja détaillé par classe d'âge et de sexe : Genistéine**

Catégorie	Sexe	Classe d'âge	GENISTÉINE									
			Ensemble de la population				Seuls consommateurs					
			Effectif	Moyenne (µg/1000 Kcal/j)	Écart-type (µg/1000 Kcal/j)	95è perc. (µg/1000 Kcal/j)	Effectif	Taux (%)	Moyenne (µg/1000 Kcal/j)	Écart-type (µg/1000 Kcal/j)	95è perc. (µg/1000 Kcal/j)	
Dessert au soja	Garçon	3 à 9 ans	314	17.0	300.9	0.0	1	0.3%	5332.4		5332.4	
		10 à 14 ans	216	0.0	0.0	0.0	0	0.0%				
		15 à 18 ans	61	0.0	0.0	0.0	0	0.0%				
	Homme	19 à 49 ans	362	4.0	76.4	0.0	1	0.3%	1453.4		1453.4	
		50 ans et plus	249	48.0	756.8	0.0	1	0.4%	11941.4		11941.4	
		3 à 9 ans	279	7.6	127.2	0.0	1	0.4%	2124.6		2124.6	
	Fille	10 à 14 ans	209	0.0	0.0	0.0	0	0.0%				
		15 à 18 ans	74	0.0	0.0	0.0	0	0.0%				
		19 à 49 ans	454	38.0	422.1	0.0	5	1.1%	3450.6	2335.4	7468.0	
	Femme	50 ans et plus	274	26.8	352.9	0.0	2	0.7%	3668.5	2699.3	5577.2	
Tonyu		Garçon	3 à 9 ans	314	0.0	0.0	0.0	0	0.0%			
			10 à 14 ans	216	0.0	0.0	0.0	0	0.0%			
	15 à 18 ans		61	28.6	223.6	0.0	1	1.6%	1746.1		1746.1	
	Homme	19 à 49 ans	362	0.0	0.0	0.0	0	0.0%				
		50 ans et plus	249	0.0	0.0	0.0	0	0.0%				
		3 à 9 ans	279	5.5	92.4	0.0	1	0.4%	1543.7		1543.7	
	Fille	10 à 14 ans	209	0.0	0.0	0.0	0	0.0%				
		15 à 18 ans	74	0.0	0.0	0.0	0	0.0%				
		19 à 49 ans	454	9.0	192.8	0.0	1	0.2%	4107.2		4107.2	
	Femme	50 ans et plus	274	0.0	0.0	0.0	0	0.0%				
Tofu		Garçon	3 à 9 ans	314	0.0	0.0	0.0	0	0.0%			
			10 à 14 ans	216	0.0	0.0	0.0	0	0.0%			
	15 à 18 ans		61	0.0	0.0	0.0	0	0.0%				
	Homme	19 à 49 ans	362	0.0	0.0	0.0	0	0.0%				
		50 ans et plus	249	0.0	0.0	0.0	0	0.0%				
		3 à 9 ans	279	0.0	0.0	0.0	0	0.0%				
	Fille	10 à 14 ans	209	0.0	0.0	0.0	0	0.0%				
		15 à 18 ans	74	0.0	0.0	0.0	0	0.0%				
		19 à 49 ans	454	0.0	0.0	0.0	0	0.0%				
	Femme	50 ans et plus	274	12.0	198.9	0.0	1	0.4%	3292.5		3292.5	
Apport total par les produits à base de soja		Garçon	3 à 9 ans	314	17.0	300.9	0.0	1	0.3%	5332.4		5332.4
			10 à 14 ans	216	0.0	0.0	0.0	0	0.0%			
	15 à 18 ans		61	28.6	223.6	0.0	1	1.6%	1746.1		1746.1	
	Homme	19 à 49 ans	362	4.0	76.4	0.0	1	0.3%	1453.4		1453.4	
		50 ans et plus	249	48.0	756.8	0.0	1	0.4%	11941.0		11941.0	
		3 à 9 ans	279	13.2	157.0	0.0	2	0.7%	1834.2	410.8	2124.6	
	Fille	10 à 14 ans	209	0.0	0.0	0.0	0	0.0%				
		15 à 18 ans	74	0.0	0.0	0.0	0	0.0%				
		19 à 49 ans	454	47.1	463.3	0.0	6	1.3%	3560.0	2106.0	7468.0	
	Femme	50 ans et plus	274	38.8	404.3	0.0	3	1.1%	3543.2	1921.0	5577.2	

**Tableau A20 Estimation des apports en isoflavones par les aliments à base de soja détaillé par classe d'âge et de sexe : Daïdzéine**

			DAÏDZÉINE								
			Ensemble de la population				Seuls consommateurs				
Catégorie	Sexe	Classe d'âge	Effectif	Moyenne (µg/1000 Kcal/j)	Écart-type (µg/1000 Kcal/j)	95è perc. (µg/1000 Kcal/j)	Effectif	Taux (%)	Moyenne (µg/1000 Kcal/j)	Écart-type (µg/1000 Kcal/j)	95è perc. (µg/1000 Kcal/j)
Dessert au soja	Garçon	3 à 9 ans	314	16.8	297.9	0.0	1	0.3%	5279.0		5279.0
		10 à 14 ans	216	0.0	0.0	0.0	0	0.0%			
		15 à 18 ans	61	0.0	0.0	0.0	0	0.0%			
		19 à 49 ans	362	4.0	75.6	0.0	1	0.3%	1438.8		1438.8
		50 ans et plus	249	47.5	749.2	0.0	1	0.4%	11821.8		11821.8
	Femme	3 à 9 ans	279	7.5	125.9	0.0	1	0.4%	2103.4		2103.4
		10 à 14 ans	209	0.0	0.0	0.0	0	0.0%			
		15 à 18 ans	74	0.0	0.0	0.0	0	0.0%			
		19 à 49 ans	454	37.6	417.8	0.0	5	1.1%	3416.0	2312.1	7393.2
		50 ans et plus	274	26.5	349.4	0.0	2	0.7%	3631.8	2672.3	5521.3
Tonyu	Garçon	3 à 9 ans	314	0.0	0.0	0.0	0	0.0%			
		10 à 14 ans	216	0.0	0.0	0.0	0	0.0%			
		15 à 18 ans	61	26.1	203.9	0.0	1	1.6%	1592.5		1592.5
		19 à 49 ans	362	0.0	0.0	0.0	0	0.0%			
		50 ans et plus	249	0.0	0.0	0.0	0	0.0%			
	Femme	3 à 9 ans	279	5.0	84.3	0.0	1	0.4%	1407.9		1407.9
		10 à 14 ans	209	0.0	0.0	0.0	0	0.0%			
		15 à 18 ans	74	0.0	0.0	0.0	0	0.0%			
		19 à 49 ans	454	8.3	175.8	0.0	1	0.2%	3746.0		3746.0
		50 ans et plus	274	0.0	0.0	0.0	0	0.0%			
Tofu	Garçon	3 à 9 ans	314	0.0	0.0	0.0	0	0.0%			
		10 à 14 ans	216	0.0	0.0	0.0	0	0.0%			
		15 à 18 ans	61	0.0	0.0	0.0	0	0.0%			
		19 à 49 ans	362	0.0	0.0	0.0	0	0.0%			
		50 ans et plus	249	0.0	0.0	0.0	0	0.0%			
	Femme	3 à 9 ans	279	0.0	0.0	0.0	0	0.0%			
		10 à 14 ans	209	0.0	0.0	0.0	0	0.0%			
		15 à 18 ans	74	0.0	0.0	0.0	0	0.0%			
		19 à 49 ans	454	0.0	0.0	0.0	0	0.0%			
		50 ans et plus	274	8.4	138.9	0.0	1	0.4%	2299.6		2299.6
Apport total par les produits à base de soja	Garçon	3 à 9 ans	314	314	297.9	0.0	1	0.3%	5279.0		5279.0
		10 à 14 ans	216	216	0.0	0.0	0	0.0%			
		15 à 18 ans	61	61	203.9	0.0	1	1.6%	1592.5		1592.5
		19 à 49 ans	362	362	75.6	0.0	1	0.3%	1438.8		1438.8
		50 ans et plus	249	249	749.2	0.0	1	0.4%	11822.0		11822.0
	Femme	3 à 9 ans	279	279	151.3	0.0	2	0.7%	1755.6	491.8	2103.4
		10 à 14 ans	209	209	0.0	0.0	0	0.0%			
		15 à 18 ans	74	74	0.0	0.0	0	0.0%			
		19 à 49 ans	454	454	452.6	0.0	6	1.3%	3471.0	2072.3	7393.2
		50 ans et plus	274	274	375.4	0.0	3	1.1%	3187.7	2040.1	5521.3

**Tableau A21 Estimation des apports en isoflavones par les aliments à base de soja détaillé par classe d'âge et de sexe :: Genistéine+Daïdzéine**

			GENISTÉINE + DAÏDZÉINE								
			Ensemble de la population				Seuls consommateurs				
Catégorie	Sexe	Classe d'âge	Effectif	Moyenne (µg/1000 Kcal/j)	Écart-type (µg/1000 Kcal/j)	95è perc. (µg/1000 Kcal/j)	Effectif	Taux (%)	Moyenne (µg/1000 Kcal/j)	Écart-type (µg/1000 Kcal/j)	95è perc. (µg/1000 Kcal/j)
Dessert au soja	Garçon	3 à 9 ans	314	33.8	598.8	0.0	1	0.3%	10611.5		10611.5
		10 à 14 ans	216	0.0	0.0	0.0	0	0.0%			
	Homme	15 à 18 ans	61	0.0	0.0	0.0	0	0.0%			
		19 à 49 ans	362	8.0	152.0	0.0	1	0.3%	2892.2		2892.2
		50 ans et plus	249	95.4	1505.9	0.0	1	0.4%	23763.2		23763.2
		3 à 9 ans	279	15.2	253.1	0.0	1	0.4%	4228.0		4228.0
	Femme	10 à 14 ans	209	0.0	0.0	0.0	0	0.0%			
		15 à 18 ans	74	0.0	0.0	0.0	0	0.0%			
		19 à 49 ans	454	75.6	839.9	0.0	5	1.1%	6866.6	4647.5	14861.2
		50 ans et plus	274	53.3	702.3	0.0	2	0.7%	7300.3	5371.6	11098.5
Tonyu	Garçon	3 à 9 ans	314	0.0	0.0	0.0	0	0.0%			
		10 à 14 ans	216	0.0	0.0	0.0	0	0.0%			
	Homme	15 à 18 ans	61	54.7	427.5	0.0	1	1.6%	3338.6		3338.6
		19 à 49 ans	362	0.0	0.0	0.0	0	0.0%			
		50 ans et plus	249	0.0	0.0	0.0	0	0.0%			
		3 à 9 ans	279	10.6	176.7	0.0	1	0.4%	2951.6		2951.6
	Femme	10 à 14 ans	209	0.0	0.0	0.0	0	0.0%			
		15 à 18 ans	74	0.0	0.0	0.0	0	0.0%			
		19 à 49 ans	454	17.3	368.6	0.0	1	0.2%	7853.2		7853.2
		50 ans et plus	274	0.0	0.0	0.0	0	0.0%			
Tofu	Garçon	3 à 9 ans	314	0.0	0.0	0.0	0	0.0%			
		10 à 14 ans	216	0.0	0.0	0.0	0	0.0%			
	Homme	15 à 18 ans	61	0.0	0.0	0.0	0	0.0%			
		19 à 49 ans	362	0.0	0.0	0.0	0	0.0%			
		50 ans et plus	249	0.0	0.0	0.0	0	0.0%			
		3 à 9 ans	279	0.0	0.0	0.0	0	0.0%			
	Femme	10 à 14 ans	209	0.0	0.0	0.0	0	0.0%			
		15 à 18 ans	74	0.0	0.0	0.0	0	0.0%			
		19 à 49 ans	454	0.0	0.0	0.0	0	0.0%			
		50 ans et plus	274	20.4	337.8	0.0	1	0.4%	5592.1		5592.1
Apport total par les produits à base de soja	Garçon	3 à 9 ans	314	33.8	598.8	0.0	1	0.3%	10611.0		10611.0
		10 à 14 ans	216	0.0	0.0	0.0	0	0.0%			
	Homme	15 à 18 ans	61	54.7	427.5	0.0	1	1.6%	3338.6		3338.6
		19 à 49 ans	362	8.0	152.0	0.0	1	0.3%	2892.2		2892.2
		50 ans et plus	249	95.4	1505.9	0.0	1	0.4%	23763.0		23763.0
		3 à 9 ans	279	25.7	308.2	0.0	2	0.7%	3589.8	902.6	4228.0
	Femme	10 à 14 ans	209	0.0	0.0	0.0	0	0.0%			
		15 à 18 ans	74	0.0	0.0	0.0	0	0.0%			
		19 à 49 ans	454	92.9	915.8	0.0	6	1.3%	7031.0	4176.3	14861.0
		50 ans et plus	274	73.7	778.0	0.0	3	1.1%	6730.9	3924.2	11099.0

**Référence bibliographique :**

Bemraw-Aouachria, N., Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments (2004) *Evaluation de l'apport en phyto-estrogènes dans la population française (données INCA 1999) OCA/NB/2004-141*. Maisons-Alfort, AFSSA-OCA.

## Annexe 2 c : Evolution des ventes des produits à base de soja entre 1996 et 2001 (Tard A 2004)

Sont rapportés ci-dessous des précisions relatives à la méthodologie de l'étude des données de vente des aliments à base de soja, les tableaux détaillés des estimations de ventes, d'autres précisions concernant des marchés autres que ceux concernant les aliments dits « à base de soja » mais susceptibles de contenir des isoflavones.

### I- Précisions concernant la méthodologie

Le panel Sécodip offre un relevé des achats des ménages, il ne s'agit donc pas d'une enquête alimentaire individuelle. Les achats sont relevés par ménage, par scanning informatique, tout au long de l'année, sur une période minimale de 36 semaines par an. Les relevés par ménages ne permettent donc pas d'estimer les consommations par groupe de population spécifique. En outre, le calcul par individu est lui-même imprécis puisqu'il s'agit de la quantité achetée par le ménage divisé par le nombre d'individus dans le foyer. On suppose alors que la consommation est équitable entre tous les individus du ménage (pas de distinction adultes/enfants). Les années étudiées ici vont de 1996 à 2001. Ces années sont comparables entre elles, le mode de recueil des achats étant identique. A partir de 2002, un changement dans le codage des achats doit être étudié afin d'évaluer si les données sont également comparables. Ce recul de 6 ans devrait permettre de voir les évolutions pour les marchés récents que constituent les produits à base de soja.

Les données Sécodip étant des données d'achats, elles ne tiennent pas compte de la restauration hors foyer, de l'autoconsommation ou de ce qui n'est pas consommé (restes dans l'assiette).

Les marchés étudiés sont les suivants :

- Les « laits » de soja ou **tonyu** : regroupement des laits de type longue conservation stérilisés et des laits aromatisés sélectionnés par leur composition au soja ou leur arôme soja.
- Les **desserts à base de soja** : rassemblant les desserts frais et desserts longue conservation arôme soja, ainsi que les aliments type yaourts au soja, l'ensemble des aliments inclut sous le vocable « desserts au soja » dans le panel SECODIP est donc différent de celui de l'enquête INCA (desserts aux ferments lactiques).
- Les **plats composés à base de soja** : avec les plats, ou entrées, ou légumes cuisinés frais, les quenelles fraîches, les fromages à consommer chaud, les plats cuisinés surgelés, les préparations panées, les autres entrées surgelées. Les variables permettant la sélection des plats contenant du soja sont les variables de composition (indiquant « à base de soja ») ou arôme soja, ou encore lorsque le mot soja est noté dans le libellé.

### II- Précisions concernant la consommation journalière des aliments à base de soja (tonyu, desserts à base de soja, plats composés à base de soja)

Les tableaux qui suivent rapportent la consommation de ces 3 types de denrées chez les seuls ménages acheteurs de ces produits. Leur consommation est calculée par ménages dits « consommateurs » puis estimée par individus consommateurs telle que la méthodologie l'a indiquée. Les résultats présentés sont exprimés en ml/jour ou g/jour pour la consommation alimentaire.

**Tableau A22 : Consommation journalière de « lait de soja » ou tonyu (en ml/jour) pour les ménages seuls consommateurs et estimation des apports par individus seuls consommateurs**

Année	Taux conso (en %)	Ménages seuls consommateurs			Individus seuls consommateurs	
		n	moyenne (en ml/j)	p95 (en ml/j)	Moyenne (en ml/j)	P95 (en ml/j)
1996	4,2	171	31,4	186,6	14,2	74,2
1997	4,0	214	31,7	182,1	13,2	62,1
1998	4,4	242	31,4	136,5	13,6	68,3
1999	4,5	259	34,0	187,7	14,7	85,0
2000	4,6	235	35,0	169,1	15,2	84,5
2001	4,7	263	41,3	198,3	18,3	92,3

*Guide de lecture* : en 2001, 4,7% des ménages ont acheté du tonyu, soit 263 ménages sur 5298<sup>2</sup>. La moyenne de consommation de ces 4,7% de consommateurs était estimée à 41,3 ml/j. Chez les plus forts consommateurs (p95), elle est de 198,3 ml/j. Par individus consommateurs, ces consommations sont alors estimées à 18,3 ml/j en moyenne et à 92,3 ml/j pour les plus forts consommateurs (p95).

**Tableau A23 : Consommation journalière de desserts à base de soja (en g/jour) pour les ménages seuls consommateurs et estimation des apports par individus seuls consommateurs**

Année	Taux conso (en %)	Ménages seuls consommateurs			Individus seuls consommateurs	
		n	moyenne (en ml/j)	p95 (en ml/j)	Moyenne (en g/j)	P95 (en g/j)
1996	7,9	347	7,7	35,1	3,4	13,8
1997	8,1	428	9,8	38,4	4,2	19,8
1998	8,5	479	9,9	56,6	4,2	19,5
1999	10,7	630	9,7	49,6	4,0	23,2
2000	11,5	647	10,7	48,6	4,5	21,9
2001	9,4	523	13,1	62,1	5,8	27,1

**Tableau A24 Consommation journalière de plats composés (en g/jour) pour les ménages seuls consommateurs et estimation des apports par individus seuls consommateurs**

Année	Taux conso (en %)	Ménages seuls consommateurs			Individus seuls consommateurs	
		n	moyenne (en ml/j)	p95 (en ml/j)	Moyenne (en g/j)	P95 (en g/j)
1996	1,7	57	1,739	5,248	0,910	2,624
1997	1,4	70	2,501	6,723	1,279	4,121
1998	2,1	112	1,192	3,297	0,546	1,299
1999	3,6	203	1,969	6,548	0,902	3,243
2000	3,9	188	2,568	11,429	1,167	4,425
2001	5,1	259	2,488	8,333	1,149	3,647

### III- Précisions concernant les autres marchés susceptibles de contenir des isoflavones

D'autres marchés contiennent des isoflavones. Il s'agit de marchés identifiés comme contenant du soja. Les biscuits salés, sucrés ou les viennoiseries contiennent de la farine de soja. On retrouve également de la farine de soja dans les confiseries et chocolats en plus des protéines de soja. De l'huile de soja est retrouvée dans les sauces et potages ; et enfin, des protéines ou isolats de soja sont retrouvés dans les viandes (hachées principalement) et pâtés, ceci pour leur donner une texture homogène et maintenir leur forme. Cependant, d'une part, les teneurs en soja de ces différents produits sont difficiles à connaître et d'autre part, la teneur en isoflavones des farines ou protéines de soja, est très difficile à estimer. On ne retrouve pas d'isoflavones dans les huiles de soja.

Enfin un autre type de produit peut également contenir du soja dans sa composition. Il s'agit d'un groupe de produits dénommé « produits de la forme ». Cependant, ce groupe est très hétérogène (barres céréalières, substituts de repas ou autres préparations liquides au soja). Il n'est pas possible de sélectionner l'un ou l'autre de ces produits à l'intérieur du marché et il serait hasardeux de donner à l'ensemble de ce groupe une teneur identique en isoflavones. De plus, ce groupe répertorié dans les marchés de l'année 1996, n'est plus suivi dans les années suivantes.

#### Référence bibliographique :

Tard, A., Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments (2004) Evaluation de l'apport en phytoestrogènes dans la population française (produits à base de soja, données Sécodip) OCA/AT/2004-142. Maisons-Alfort, AFSSA-OCA

<sup>2</sup> 5298 correspond au nombre total de ménages ayant participé au panel SECODIP en 2001. ce chiffre inclut les 263 ménages seuls consommateurs de tonyu



## ANNEXE 3

---

### LE TRAITEMENT HORMONAL SUBSTITUTIF DE LA MÉNOPAUSE

**Nathalie Dumarcet**

La ménopause est un processus naturel.

- Actuellement en France, plus de 10 millions de femmes sont ménopausées,
- en 2025, près de 50 % de la population féminine française sera ménopausée,
- une femme ménopausée sur 2 n'a aucun symptôme climatérique,
- la ménopause entraîne une accélération transitoire de la perte osseuse (et une femme ménopausée sur 3 aura une densité osseuse vertébrale basse 5 à 10 ans après la ménopause).

Le traitement hormonal substitutif (THS) associe, chez les femmes non hystérectomisées, un estrogène et un progestatif (ce progestatif étant administré pendant au moins 12 jours par mois).

- En France, environ 30 % des femmes ménopausées reçoivent un THS pendant au moins une année,
- le THS est initié 3 fois sur 4 par un gynécologue et 1 fois sur 4 par un généraliste,
- les gels et dispositifs transdermiques sont plus utilisés (58%) que les formes orales (42%).

Des publications sur le traitement hormonal substitutif de la ménopause (THS), dont une vaste étude américaine publiée en juillet 2002 (Rossouw 2002), ont conduit la communauté scientifique à revoir l'ensemble des données concernant les bénéfices mais aussi les risques liés à l'utilisation de ce traitement.

#### I- Nouvelles données issues de la littérature

##### I-1 Etude HERS (Heart and Estrogen/progestin Replacement Study)

**HERS I** (Hulley 1998) : Dans cette étude randomisée en double-insu, 2 763 patientes ménopausées, ayant des antécédents cardio-vasculaires (étude de prévention secondaire), ont reçu soit un THS associant 0,625 mg/j d'estrogènes conjugués équins (ECE) et 2,5 mg d'acétate de médroxyprogestérone (MPA), soit un placebo. La durée moyenne du suivi était de 4 ans.

**HERS II** (Hulley 2002) : 2 321 patientes de HERS I ont continué en ouvert leur traitement pendant une durée moyenne de 2,7 ans.

L'étude HERS a montré que l'association ECE-MPA ne diminue pas le risque de survenue d'événements cardio-vasculaires chez des femmes ménopausées ayant des antécédents cardio-vasculaires, contrairement à ce que l'on escomptait. Au terme de la première année de traitement, on note une surmortalité coronarienne significative (infarctus du myocarde non fatal, décès de type coronarien). De plus, cette association augmente le risque de survenue de maladie thrombo-embolique veineuse et de lithiase biliaire.

##### I-2 Etude WHI (Women's Health Initiative) (Rossouw 2002)

Dans cette étude randomisée en double-insu, 16 608 femmes ménopausées, sans antécédents cardio-vasculaires (étude de prévention primaire) ont reçu soit un THS associant 0,625 mg/j d'ECE et 2,5 mg de MPA, soit un placebo. La durée moyenne du suivi était de 5,2 ans. Le bras « estro-progestatif » de cette étude a été interrompu en mai 2002, le nombre de cancers du sein observé dans le groupe traité étant significativement supérieur à celui observé dans le groupe placebo et le bénéfice/risque étant jugé défavorable pour le THS.

Cette étude a fait l'objet d'analyses complémentaires, qui ont notamment apporté des précisions sur le risque de cancer du sein et de démence (Cauley 2003, Chlebowski 2003, Anderson 2003, Manson 2003, Shumaker 2003, Hays 2003). Ainsi, contrairement à ce qui avait été observé précédemment, une analyse de la WHI a montré que, par rapport au groupe placebo, les tumeurs mammaires sont diagnostiquées à un stade plus avancé et le pourcentage de mammographies anormales dès la première année de traitement est supérieur dans le groupe

traité par THS (9,4% versus 5,4% dans le groupe placebo) (Chlebowski 2003). Une autre étude a mis en évidence l'absence de bénéfice du THS sur les fonctions cognitives, et suggère une augmentation possible du risque de démence (Shumaker 2003).

En février 2004, le bras « estrogène seul » de cette étude (N = 10 739) a été arrêté, après 6,8 ans de traitement en raison d'un sur-risque d'accident vasculaire cérébral (AVC) dans le groupe traité versus placebo (Anderson 2004). Dans le groupe traité par estrogène, il a été observé une élévation de 39% du risque d'AVC (44 versus 32 AVC pour 10 000 femme-années), une baisse de 23% du risque de cancer du sein et une baisse de 30% du risque de fracture osseuse.

### I-3 Etude MWS (Beral 2003)

Une étude d'observation, la Million Women Study (MWS) a été menée au Royaume-Uni auprès de 1 084 110 femmes d'âge compris entre 50 et 64 ans. La moitié de ces femmes a reçu un THS (composition et voie d'administration variées mais comparables aux THS utilisés en Europe) à un moment donné de leur vie, l'autre moitié n'en a jamais reçu. Cette étude a confirmé le risque de cancer du sein associé au THS, et ce chez des femmes européennes quel que soit le type de THS.

## I-4 Conclusions

### I- 4- 1 Ce qui est établi en termes de risques

Essentiellement, sur la base des données établies dans les études WHI, MWS et HERS, les risques calculés pour 1000 femmes et exprimés en nombre de cas supplémentaires chez les femmes traitées par THS, par rapport au risque de base dans la population générale sont présentés dans le tableau A25.

Actuellement aucune donnée issue d'essais randomisés ne permet de savoir si les risques associés au THS sont influencés ou non par le type d'estrogène (estrogènes conjugués équins, estradiol), ou par le type de progestatif (acétate de médroxyprogestérone, noréthistérone, lévonorgestrel), ou par la voie d'administration de l'estrogène (orale, transdermique), ou enfin par les modalités d'utilisation du progestatif (administration séquentielle ou continue). Il semble cependant que ces risques augmentent avec la dose et la durée d'exposition au THS.

**Tableau A25 : Nombre de cas attendus pour différentes pathologies dans la population générale, et nombre de cas supplémentaires dans la population de femmes traitées par THS (estrogène+progestatif)**

	Nombre de cas attendus dans la population générale (pour 1000 femmes)	Nombre de cas supplémentaires (pour 1000 femmes traitées)
<b>Cancer du sein</b>	Sur 15 ans (femmes entre 50 et 65 ans)	32
		sur 5 ans + 6 sur 10 ans + 19
<b>Cancer de l'endomètre</b>	Sur 5 ans	5
		sur 5 ans variation minimale sur 10 ans variation minimale
<b>Événement cardiovasculaire<sup>1</sup></b>	Sur 1 an	3
		Sur 1 an + 0,7
<b>Accident thromboembolique veineux<sup>1</sup></b>	Sur 5 ans	3
	Tranche d'âge 50-59 ans	3
	Tranche d'âge 60-69 ans	8
		Sur 5 ans Tranche d'âge 50-59 ans + 4 Tranche d'âge 60-69 ans + 9
<b>Accident vasculaire cérébral<sup>1</sup></b>	Sur 5 ans	3
	Tranche d'âge 50-59 ans	3
	Tranche d'âge 60-69 ans	11
		Sur 5 ans Tranche d'âge 50-59 ans + 1 Tranche d'âge 60-69 ans + 4

1- Ces données sont issues d'études qui ne portaient que sur des THS utilisés par voie orale

### **Cancer du sein**

Le risque de cancer du sein est plus important chez les patientes traitées par l'association estrogène/progestatif que chez les patientes traitées par estrogène seul. Il diminue dès l'arrêt du THS pour disparaître progressivement dans les 5 ans, au plus.

Des études récentes ont montré que les tumeurs mammaires ont été diagnostiquées à un stade plus invasif et suggèrent une mortalité plus importante. L'hypothèse d'un retard de diagnostic est évoquée, lié à une hyperdensité mammaire.

### ***Cancer de l'endomètre***

Les nouvelles données ont confirmé l'absence d'augmentation du risque de cancer de l'endomètre lorsque les estrogènes, connus pour augmenter ce risque, sont associés à un progestatif.

### ***Cancer de l'ovaire***

Quelques données suggèrent que le THS pourrait être associé à une augmentation du risque de cancer de l'ovaire, mais ceci reste à être confirmé.

### ***Risque thromboembolique veineux***

Le THS augmente le risque thromboembolique veineux (phlébite, embolie pulmonaire), surtout la première année de traitement, ce qui nécessite de respecter scrupuleusement les contre-indications de prescription. Ce risque augmente avec l'âge. Les antécédents familiaux thromboemboliques veineux représentent un facteur de risque à prendre en considération.

Une étude française cas-témoin a montré qu'il n'y avait pas d'augmentation de ce risque lors de l'administration transdermique d'estrogène par rapport au THS administré par voie orale (Scarabin 2003). Ce résultat ne permet en aucun cas de conclure que la voie transdermique réduirait l'ensemble des autres risques induits par le THS.

### ***Risque cardio-vasculaire***

Les études HERS I et II (Heart and Estrogen/progestin Replacement Study) avaient montré que le THS, administré par voie orale, ne diminuait pas les risques cardio-vasculaires chez les femmes ayant une maladie coronaire connue. Les nouvelles données confirment que le THS ne protège pas du risque d'accident coronaire et entraînerait même une augmentation du risque d'infarctus du myocarde et d'accident vasculaire cérébral au cours de la première année de traitement chez les femmes sans antécédents cardio-vasculaires. Cette augmentation du risque d'accident ischémique a été observée chez des femmes de plus de 60 ans.

### ***Troubles cognitifs***

Contrairement à ce qui était attendu, il n'y a pas aujourd'hui de données mettant en évidence un effet protecteur du THS sur les troubles cognitifs. Le THS pourrait même accroître le risque de démence (chez des femmes de plus de 65 ans).

## **I-4-2 Ce qui est établi en termes d'efficacité**

### ***Troubles du climatère***

L'efficacité du THS dans le traitement des troubles du climatère, notamment sur les symptômes vasomoteurs, a été largement démontrée.

### ***Prévention de l'ostéoporose***

- Effet sur la densité osseuse

La perte osseuse, qui est associée à un risque fracturaire, est rapide la première année de ménopause. Le THS permet de prévenir cette perte osseuse et l'effet est dose-dépendant. A l'arrêt du THS, la perte osseuse reprend au rythme physiologique.

- Effet sur les fractures

**Tableau A26 : Risque relatif\* de fractures ostéoporotiques**

Fracture ostéoporotique	HERS	WHI
- col du fémur	1.61 (IC : 0.98-2.66)	0.66 (IC : 0.45-0.98)
- vertèbre	0.87 (IC : 0.52-1.48)	0.66 (IC : 0.44-0.98)

\* RR : facteur par lequel le THS multiplie le risque de base de survenue de fracture

IC : intervalle de confiance à 95 %.

Le THS est le seul traitement ayant démontré son efficacité dans la prévention primaire des fractures ostéoporotiques dans la population générale (en l'absence de mesure de la densité minérale osseuse -DMO-). Le bénéfice anti-fracturaire (en termes de risque relatif) est identique quel que soit le risque fracturaire initial. Dans l'étude WHI, le pourcentage de fractures observées au terme de 5 années de traitement est de 8,6% chez les femmes ayant reçu un THS, versus 11,1% chez les femmes non traitées.

La durée, après l'arrêt du traitement, et pendant laquelle le risque fracturaire est réduit n'est pas connue mais il semble qu'elle ne soit pas supérieure à quelques années.

Il n'est pas établi non plus qu'un THS administré en début de ménopause prévienne les fractures à distance de l'arrêt du traitement.

Enfin, il n'y a pas ou peu de données d'efficacité sur la prévention des fractures en cas de ménopause précoce, de DMO basse, ainsi que chez les femmes ayant des antécédents de fractures vertébrales.

### ***Cancer colorectal***

Actuellement, les données sont trop limitées pour se prononcer sur un éventuel effet protecteur du THS sur la survenue d'un cancer colorectal, notamment sur la durée de cette protection.

### **I-4-3 En pratique**

**Quel est le rapport bénéfice/risque du THS en fonction des indications ? Quelles sont les recommandations ?**

#### ***Chez les femmes souffrant de troubles du climatère***

Le rapport bénéfice/risque du THS reste favorable dans les troubles du climatère perçus par la patiente comme altérant sa qualité de vie.

Dans cette situation, le traitement peut être instauré si la femme le souhaite, à la dose minimale efficace, pour une durée la plus courte possible. Toutefois, à l'instauration du traitement, les patientes doivent être clairement informées des risques inhérents à ce traitement. De plus, le traitement doit être ré-évalué régulièrement, au moins une fois par an, en prenant en considération l'évolution du rapport bénéfice/risque. Cette ré-évaluation pourra s'accompagner d'une suspension temporaire du traitement afin de contrôler la persistance du syndrome climatérique et sa sévérité.

En effet, dans l'étude WHI, le groupe traité par estro-progestatif a été arrêté prématurément au terme de 5 années de traitement, le rapport bénéfice/risque ayant été jugé défavorable par rapport au groupe placebo.

#### ***Chez les femmes ménopausées ayant des facteurs de risque d'ostéoporose***

Dans la prévention du risque fracturaire, le rapport bénéfice/risque du THS, quel que soit le produit envisagé, est défavorable sur la base des données actuellement disponibles.

L'administration d'un THS pourra être envisagée chez la femme ménopausée qui a un risque élevé de fractures, uniquement lorsqu'elle présente une intolérance à un autre traitement indiqué dans la prévention de l'ostéoporose et après une évaluation individuelle précise et soigneuse du rapport bénéfice /risque. La place exacte de cette indication de deuxième intention dans la stratégie de prise en charge de l'ostéoporose chez la femme ménopausée reste à préciser.

### **Chez les femmes ménopausées en bonne santé sans trouble du climatère et sans facteur de risque d'ostéoporose**

Dans cette situation, la prescription de THS n'est pas recommandée, en raison d'un rapport bénéfice/risque défavorable.

#### **QUELLE QUE SOIT L'INDICATION, IL EST RAPPELÉ QUE :**

Avant d'initier ou de ré-instaurer un THS, un examen clinique et gynécologique complet (y compris analyse des antécédents familiaux) doit être effectué. Un examen régulier des seins doit être pratiqué selon les recommandations en vigueur (palpation, mammographie, échographie...) et adapté en fonction des cas individuels. Le THS est contre-indiqué en cas de cancer du sein connu ou suspecté, ou d'autres tumeurs estrogéno-dépendantes connues ou suspectées (par ex. cancer de l'endomètre).

L'utilisation d'un THS chez des patientes présentant des antécédents d'accident thromboembolique veineux ou un état thrombotique connu nécessite une évaluation attentive du rapport bénéfice/risque. Le THS est contre-indiqué en cas d'accident thromboembolique veineux en évolution, ou d'antécédents thromboemboliques veineux récidivants, ou de maladie thrombotique connue chez une patiente non encore traitée par anticoagulants.

Le THS est également contre-indiqué dans les situations suivantes : hémorragie génitale sans diagnostic établi, accident thrombo-embolique artériel récent ou en évolution, affection hépatique aiguë ou chronique, ou antécédents d'affection hépatique, jusqu'à normalisation des tests hépatiques, hypersensibilité aux principes actifs ou à l'un des excipients.

#### **Références bibliographiques :**

---

- Anderson, G.L., Judd, H.L., Kaunitz, A.M., Barad, D.H., et al. (2003) Effects of estrogen plus progestin on gynecologic cancers and associated diagnostic procedures: the Women's Health Initiative randomized trial. *Jama*, 290, pp.1739-48.
- Anderson, G.L., Limacher, M., Assaf, A.R., Bassford, T., et al. (2004) Effects of conjugated equine estrogen in postmenopausal women with hysterectomy: the Women's Health Initiative randomized controlled trial. *Jama*, 291, pp.1701-12.
- Beral, V. (2003) Breast cancer and hormone-replacement therapy in the Million Women Study. *Lancet*, 362, pp.419-27.
- Cauley, J.A., Robbins, J., Chen, Z., Cummings, S.R., et al. (2003) Effects of estrogen plus progestin on risk of fracture and bone mineral density: the Women's Health Initiative randomized trial. *Jama*, 290, pp.1729-38.
- Chlebowski, R.T., Hendrix, S.L., Langer, R.D., Stefanick, M.L., et al. (2003) Influence of estrogen plus progestin on breast cancer and mammography in healthy postmenopausal women: the Women's Health Initiative Randomized Trial. *Jama*, 289, pp.3243-53.
- Hays, J., Ockene, J.K., Brunner, R.L., Kotchen, J.M., et al. (2003) Effects of estrogen plus progestin on health-related quality of life. *N Engl J Med*, 348, pp.1839-54.
- Hulley, S., Furberg, C., Barrett-Connor, E., Cauley, J., et al. (2002) Noncardiovascular disease outcomes during 6.8 years of hormone therapy: Heart and Estrogen/progestin Replacement Study follow-up (HERS II). *Jama*, 288, pp.58-66.
- Hulley, S., Grady, D., Bush, T., Furberg, C., et al. (1998) Randomized trial of estrogen plus progestin for secondary prevention of coronary heart disease in postmenopausal women. Heart and Estrogen/progestin Replacement Study (HERS) Research Group. *Jama*, 280, pp.605-13.
- Manson, J.E., Hsia, J., Johnson, K.C., Rossouw, J.E., et al. (2003) Estrogen plus progestin and the risk of coronary heart disease. *N Engl J Med*, 349, pp.523-34.
- Rossouw, J.E., Anderson, G.L., Prentice, R.L., LaCroix, A.Z., et al. (2002) Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results From the Women's Health Initiative randomized controlled trial. *Jama*, 288, pp.321-33.
- Scarabin, P.Y., Oger, E., Plu-Bureau, G. (2003) Differential association of oral and transdermal oestrogen-replacement therapy with venous thromboembolism risk. *Lancet*, 362, pp.428-32.
- Shumaker, S.A., Legault, C., Rapp, S.R., Thal, L., et al. (2003) Estrogen plus progestin and the incidence of dementia and mild cognitive impairment in postmenopausal women: the Women's Health Initiative Memory Study: a randomized controlled trial. *Jama*, 289, pp.2651-62.



## Annexe 4

---

### **DONNÉES RÉGLEMENTAIRES RELATIF À L'UTILISATION D'INGRÉDIENTS SOURCES DE PHYTO-ESTROGÈNES ET AUX ALLÉGATIONS S'Y RAPPORANT**

#### ***Guillaume Cousyn***

A l'origine, l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments (AFSSA) a été saisie par la Direction générale de la concurrence, de la consommation et de la répression des fraudes (DGCCRF) afin d'évaluer le risque sanitaire lié à la consommation de compléments alimentaires contenant des isoflavones, ainsi que d'autres ingrédients végétaux présentant des effets similaires. Il était également demandé à l'AFSSA de se prononcer sur les allégations fréquemment rencontrées sur ce type de produits.

Compte tenu de l'étendue de la problématique, l'Agence a élargi la saisine à toutes les molécules d'origine végétale possédant une activité estrogénique. En outre, elle s'est également penchée sur le cas des préparations à base de protéines de soja destinées aux nourrissons. Dans ce cadre, elle souhaite connaître les dispositions réglementaires en vigueur ainsi que les textes en préparation afin d'étudier la marge de manœuvre dont disposent les autorités françaises pour mettre en œuvre ses éventuelles recommandations dans un contexte européen.

#### **I- Compléments alimentaires et phyto-estrogènes**

Lors de ses contrôles, la DGCCRF a constaté la présence sur le marché de nombreux compléments alimentaires contenant des isoflavones de soja et présentés en réponse aux troubles de la ménopause. D'autres plantes sont également utilisées comme sources de phyto-estrogènes (sauge, yam, cimicifuga, fèves...). Ces produits sont le plus souvent commercialisés librement dans d'autres pays de l'Union européenne ce qui, en l'absence d'harmonisation européenne, gêne l'action des services de contrôle.

##### **I- 1 Le règlement n° 258/97 relatif aux nouveaux aliments et aux nouveaux ingrédients**

Le règlement (CE) n°258/97 relatif aux nouveaux aliments et nouveaux ingrédients alimentaires prévoit une procédure d'autorisation préalable basée sur une expertise scientifique pour les ingrédients et aliments considérés comme nouveaux. Sont considérés comme nouveaux, les aliments et ingrédients appartenant à l'une des 6 catégories proposées par le texte et n'ayant pas fait l'objet d'une consommation significative dans l'Union européenne avant 1997, c'est-à-dire avant l'entrée en vigueur de ce texte.

Or, si les isoflavones de soja peuvent relever de la catégorie e) « aliments et ingrédients composés de végétaux ou isolés à partir de ceux-ci (...) » définie dans le règlement, certains Etats membres ont confirmé leur présence sur le marché européen avant 1997. Par conséquent, ces extraits ne rentrent pas dans le champ d'application du texte. Toutefois, aucun critères d'emploi ou spécifications techniques n'ont de ce fait été définis.

##### **I- 2 Les dispositions en matière de compléments alimentaires**

Si les isoflavones de soja ne relèvent pas du règlement n° 258/97, elles ne peuvent pas pour autant être utilisées, sans contrainte, dans tous les produits.

En effet, la majorité des produits apportant des isoflavones et autres substances estrogéniques sont des compléments alimentaires tels que définis par l'article 2 de la directive n° 2002/46/CE<sup>1</sup>. Ce texte ne fournit qu'une liste positive de vitamines et de minéraux, laissant pour le moment les plantes et leurs extraits sous l'application des dispositions nationales. La France ne possède pas encore de dispositions nationales spécifiques en matière d'emploi de plantes et d'extraits de plantes dans les compléments alimentaires ; elle applique donc les textes généraux en matière de denrées alimentaires. En revanche, certains Etats membres semblent accepter la mise sur le marché de compléments alimentaires à base de phyto-estrogènes.

La DGCCRF, en tant que gestionnaire du risque, s'interroge donc sur les risques inhérents à l'utilisation de perturbateurs endocriniens, de façon chronique et à doses parfois élevées, sous la forme de compléments alimentaires. Il est d'ailleurs possible de noter que d'autres instances s'interrogent également sur ce point, comme en témoigne le rapport rendu récemment par la Food standard agency (FSA) en Angleterre.

### **I-3 La marge de manœuvre appartenant aux autorités françaises**

En l'absence de disposition spécifique, les autorités françaises peuvent introduire, dans le droit national, des restrictions à la mise sur le marché de ces produits, sous réserve qu'elles soient motivées, le cas échéant, par l'existence de risques réels pour la santé publique. A cette fin et dans la mesure du possible, des recommandations concrètes et d'utilisation simple seraient utiles. Par ailleurs, la Commission pourra être tenue informée des éventuelles recommandations émises par l'AFSSA et en tenir compte pour faire avancer l'harmonisation.

## **II- Les allégations**

### **II-1 Situation actuelle**

Toute allégation est soumise à l'obligation générale de publicité non trompeuse. En d'autres termes, les industriels sont libres de faire état de propriétés nutritionnelles ou fonctionnelles sur leurs produits (à l'exception des propriétés de prévention, de traitement ou de guérison de maladies humaines, qui sont interdites par l'article R. 112-7 du code de la consommation), sans autorisation préalable, mais ils doivent pouvoir les justifier a posteriori auprès des services de contrôles

Les allégations nutritionnelles sont définies par l'article 4<sup>2</sup> du décret n° 93-1130 (qui transpose la directive n° 90/496). Il s'agit de toutes les mentions du type "riche en...", "source de...", "à teneur réduite en..."...

Au regard de l'article 5<sup>3</sup> de ce décret, il ne peut pas être fait état de la quantité d'isoflavones ou d'un quelconque phyto-estrogène dans une denrée alimentaire (à l'exception des compléments alimentaires qui sont exclus du champ d'application de la directive). Une telle allégation n'aurait d'ailleurs de sens que s'il existait une dose recommandée.

Les autres allégations ne sont pas encore précisément définies par la réglementation. Les industriels doivent donc uniquement être en mesure de justifier les allégations formulées et ne peuvent pas faire état de propriétés thérapeutiques.

### **II-2 Le règlement en cours d'élaboration**

La Commission a proposé de réglementer toutes les mentions faisant état de propriétés nutritionnelles ou de santé sur les denrées alimentaires, par le biais d'un règlement. A ce jour, le projet de règlement prévoit notamment que

1/ En ce qui concerne les allégations nutritionnelles, des critères (quantitatifs notamment) à respecter figureront en annexe, limitant les allégations autorisées à cette seule annexe. Une ouverture vers les substances pour lesquelles les allégations nutritionnelles n'étaient pas autorisées jusqu'à présent, est faite avec la mention : "contient du / des...". Toutefois, aucun critère quantitatif n'est pour l'instant associé à cette allégation nutritionnelle.

2/ En ce qui concerne les allégations définies comme étant de santé, un registre tiendra à jour les allégations autorisées. Toute modification de ce registre, et donc tout ajout d'allégation dans la liste positive, devra passer par une évaluation préalable. Il a été demandé aux Etats membres la liste des allégations fonctionnelles autorisées jusqu'à présent, sur leur territoire. Cette première liste, basée sur la contribution de tous les Etats membres, sera revue par l'Autorité européenne de sécurité des aliments (European food safety agency).

Il convient de noter que ce texte s'appliquera à toutes les denrées alimentaires, y compris les compléments alimentaires.

## **III- Les préparations pour nourrissons et les préparations de suite à base de protéines de soja**

Les préparations pour nourrissons et les préparations de suite sont définies à l'article 13 de l'arrêté modifié du 1<sup>er</sup> juillet 1976<sup>4</sup>. Cet arrêté, qui intègre les dispositions de la directive n° 91/321 relative aux préparations pour nourrissons et aux préparations de suite, prévoit des normes de composition et d'étiquetage pour ces produits.



### **III-1 Le soja : une source protéique autorisée au niveau communautaire**

L'article 14 de cet arrêté (qui correspond à l'article 3 de la directive précitée) dispose notamment que les préparations pour nourrissons et les préparations de suite sont fabriquées, selon le cas, à partir de sources protéiques définies dans les annexes et d'autres ingrédients alimentaires dont il a été démontré par des données scientifiques généralement admises qu'ils conviennent à l'alimentation particulière des nourrissons dès leur naissance.

L'annexe I prévoit 3 sources protéiques pour les préparations pour nourrissons :

- les protéines de lait de vache
- les isolats de protéines de soja, seuls ou mélangés à des protéines de lait de vache,
- les hydrolysats partiels de protéines

L'annexe II prévoit 2 sources protéiques pour les préparations de suite :

- les protéines de lait de vache
- les isolats de protéines de soja, seuls ou mélangés à des protéines de lait de vache.

A ces sources protéiques, sont associées des conditions quantitatives et qualitatives (indice chimique, NPU et PER) dans lesquelles les isoflavones ne sont pas prises en compte. En revanche, lors de la modification de l'arrêté en vue d'intégrer les dispositions communautaires, les restrictions sur les antibiotiques, les aflatoxines et les substances hormonales ont été conservées. La limite de 1 µg par kg est donc de portée uniquement nationale.

### **III-2 La modification de la directive n° 91/321 relative aux préparations pour nourrissons et aux préparations de suite**

Suite au rapport du Scientific committee on food (SCF) révisant les besoins nutritionnels des nourrissons, la Commission a décidé de modifier la directive n° 91-321. Dans son rapport, le SCF estime qu'au regard des incertitudes actuelles, les préparations à base de protéines de soja devraient être recommandées pour de situations exceptionnelles, le standard étant la protéine de lait de vache. Toutefois, la Commission n'a introduit aucune disposition spécifique dans son projet<sup>5</sup>.

#### **Notes de bas de page :**

1 : Définition des compléments alimentaires : Les denrées alimentaires dont le but est de compléter le régime alimentaire normal et qui constituent une source concentrée de nutriments ou d'autres substances ayant un effet nutritionnel ou physiologique seuls ou combinés, commercialisés sous forme de doses, à savoir les formes de présentation telles que les gélules, les pastilles, les comprimés, les pilules et autres formes similaires, ainsi que les sachets de poudre, les ampoules de liquide, les flacons munis d'un compte-gouttes et les autres formes analogues de préparations liquides ou en poudre destinées à être prises en unités mesurées de faible quantité.

2. « Toute représentation et tout message publicitaire qui énonce, suggère ou implique qu'une denrée alimentaire possède des propriétés nutritionnelles particulières :

- a) Soit en raison de l'énergie (valeur calorique) qu'elle fournit ou ne fournit pas, ou qu'elle fournit à un taux réduit ou accru ;
- b) Soit en raison des nutriments qu'elle contient ou ne contient pas, ou qu'elle contient en proportion réduite ou accrue. »

3 « Peuvent seules être mentionnées les allégations nutritionnelles concernant :

- a) La valeur énergétique ;
- b) Les nutriments énumérés au 2° du II de l'article 4 du présent décret et les substances qui appartiennent à l'une des catégories de ces nutriments ou en sont des composants. »

4. « Au sens du présent chapitre, on entend par :

- a) « Préparations pour nourrissons », les denrées alimentaires destinées à l'alimentation particulière des nourrissons pendant les quatre à six premiers mois de leur vie et répondant à elles seules aux besoins nutritionnels de cette catégorie de personnes ;
- b) « Préparations de suite », les denrées alimentaires destinées à l'alimentation particulière des nourrissons de plus de quatre mois et constituant le principal élément liquide d'une alimentation progressivement diversifiée de cette catégorie de personnes. »

5. L'Afssa dispose d'un exemplaire de la proposition de la Commission que lui a envoyé la DGCCRF dans le cadre de la saisine sur ces produits.



## Annexe 5

### L'ÉPISSAGE DIFFÉRENTIEL (OU ALTERNATIF) DES RÉCEPTEURS $\alpha$ ET $\beta$ AUX ESTROGÈNES : LES VARIANTS POSSIBLES

Thierry Maudelonde

Tel que cela est mentionné dans le chapitre « Mécanismes », une fois qu'un gène est transcrit en ARN messenger, ce dernier va subir une maturation qui lui permet d'exciser certaines de ses régions (les introns) qui ne participeront pas à la traduction en protéine par un mécanisme qui s'appelle épissage. Cette fonction cellulaire permet non seulement de couper mais aussi de recoller les fragments restants (les exons) afin de former l'ARN mature qui se trouve ensuite traduit en protéine. On a découvert depuis peu que l'épissage subissait aussi une régulation et qu'il était capable de sélectionner les exons pour constituer des ARN messagers matures différents. On appelle cet épissage par rapport à l'épissage classique « l'épissage différentiel ou alternatif ». Un gène peut donc donner plusieurs ARN messagers par épissage différentiel de l'ARN messenger premier transcrit qui peuvent, eux aussi, donner plusieurs protéines lors de la maturation post traductionnelle. Son mécanisme demeure encore peu connu mais il s'agit d'un domaine en pleine évolution. Il semblerait avoir une importance encore mal appréciée en pathologie car certains variants d'épissage seraient susceptibles d'avoir des fonctions biologiques indésirables tel que l'inhibition de la fonction biologique de la forme normale ou au contraire son amplification. On a montré que les gènes des récepteurs aux estrogènes donnent effectivement plusieurs transcrits matures après épissage différentiel appelés variants d'épissage (figure A27). Ces formes variantes des récepteurs des estrogènes sont présentes physiologiquement dans les divers tissus cibles. Leurs actions ne sont pas encore connues. Cependant ces modifications entraînent parfois la disparition d'un ou de plusieurs domaines du récepteur dont les fonctions sont donc altérées. Ces variants peuvent potentiellement perturber le fonctionnement du récepteur normal lorsqu'il est présent. Dans d'autres cas, le variant retrouvé correspond à une délétion d'une partie plus ou moins grande du récepteur qui peut être remplacée par une séquence différente.

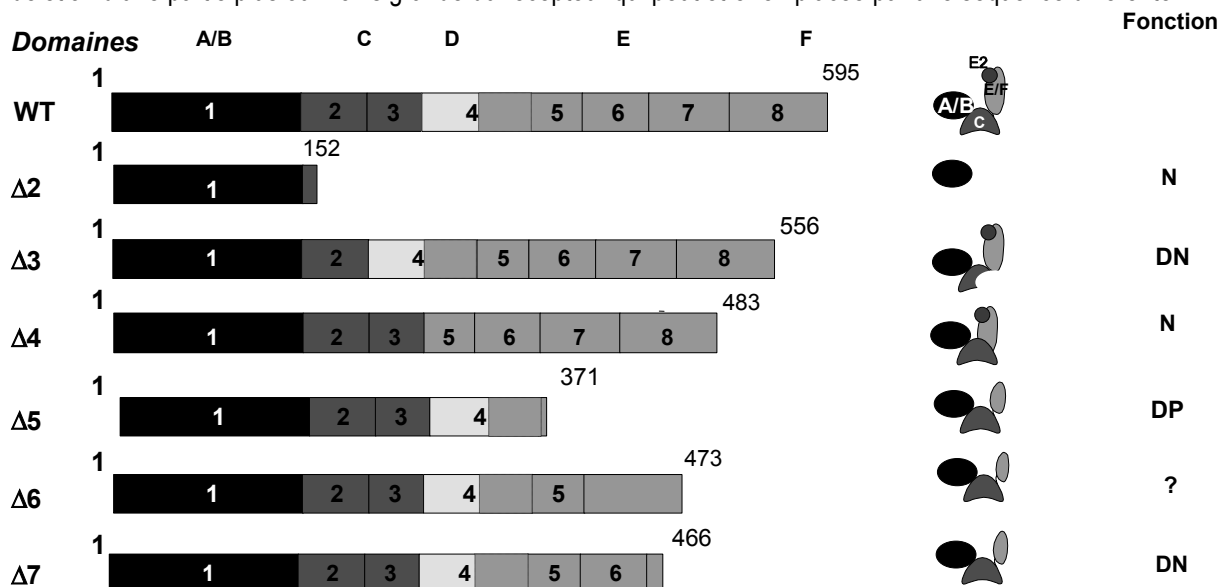


Figure A27 : les différents variants d'épissage du RE $\alpha$ . N : négatif ; DN dominant négatif ; DP : dominant positif. D'après (Murphy 1997)

#### a)-variants du RE $\alpha$

L'expression de nombreux variants d'épissage du RE $\alpha$  a donc été décrite (figure 4). Les plus fréquemment détectés et les plus abondants sont RE $\alpha$  $\Delta$ E4 (épissage de l'exon 4) et RE $\alpha$  $\Delta$ E7 (épissage de l'exon 7). Certains de ces variants sont traduits en protéines (Murphy 1998). Récemment, un test fonctionnel des différents variants d'épissage du RE $\alpha$  a été mis au point dans la levure (van Dijk 1997). Les résultats ont montré que les variants d'épissage du RE $\alpha$  sont communément présents alors que les mutations ponctuelles et les délétions sont peu

fréquentes. Excepté pour les variants d'épissage RE $\alpha$  $\Delta$ E6 (dételés uniquement dans les cellules mammaires cancéreuses T47D) et RE $\alpha$  $\Delta$ E7, les phénotypes détectés par ce test correspondaient aux fonctions attendues mais ces hypothétiques fonctions n'ont pas encore reçu de confirmation clinique.

#### **-Epissage alternatif de l'exon 2 (RE $\alpha$ $\Delta$ E2).**

La protéine est plus courte que celle du phénotype sauvage car le raccordement entre les exons 1 et 3 entraîne un décalage du cadre de lecture et l'apparition d'un codon STOP qui arrête prématurément la traduction. RE $\alpha$   $\Delta$ E2, comme RE $\alpha$   $\Delta$ E2-E3, sont constituées du domaine A/B seulement. Lorsqu'il est transfecté dans des cellules COS-1, RE $\alpha$   $\Delta$ E2 n'active pas la transcription de gènes reporters (Dotzlaw 1992) mais s'il est surexprimé il a une activité égale à environ 35% de celle de la forme sauvage du RE $\alpha$  (Korach 1996). RE $\alpha$   $\Delta$ E2 pourrait agir comme co-répresseur de la forme sauvage du RE $\alpha$  (Murphy 1997). En effet, certaines protéines du complexe de pré-initiation de la transcription notamment TAFII30 lient spécifiquement le domaine AF-1 (domaine A/B) du RE $\alpha$  sauvage (Jacq 1994). RE $\alpha$   $\Delta$ E2 qui correspond au domaine A/B pourrait donc agir par l'intermédiaire de cofacteurs sur la transcription médiée par le RE $\alpha$ . RE $\alpha$   $\Delta$ E2 pourrait également intervenir dans des réactions croisées avec d'autres voies de transduction. Par exemple, *in vitro*, un mutant réduit au domaine A/B, similaire à RE $\alpha$   $\Delta$ E2, réprime spécifiquement et très efficacement la transcription médiée par Fos (Ambrosino 1993)

#### **-Epissage alternatif de l'exon 3 (RE $\alpha$ $\Delta$ E3).**

L'épissage alternatif de l'exon 3 n'entraîne pas de décalage du cadre de lecture ni de mutation ponctuelle. RE $\alpha$  $\Delta$ E3 est une protéine de 61 kDa délétée des acides aminés 215-253 constituant le 2<sup>ème</sup> doigt de zinc. RE $\alpha$   $\Delta$ E3 n'interagit pas de façon stable avec l'ADN (Miksicek 1993a, Miksicek 1993b) et il n'active pas la transcription (Dotzlaw, Alkhalaf 1992). Mais il est capable de former des hétérodimères inactifs avec la forme sauvage du RE $\alpha$  et il a un effet dominant négatif (Pfeffer 1996). Cet effet dominant négatif est retrouvé lorsque les deux formes de récepteurs sont cotransfectées dans les cellules Hela (Wang 1991) et dans des cellules de cancer du sein (Murphy 1997). La ré-expression de RE $\alpha$   $\Delta$ E3 dans des cellules MCF-7 par transfection stable modifie l'expression des gènes régulés par les estrogènes et atténue leur phénotype malin (Erenburg 1997).

#### **-Epissage alternatif de l'exon 4 (RE $\alpha$ $\Delta$ E4).**

L'épissage alternatif de l'exon 4 n'entraîne pas de décalage du cadre de lecture ni de mutation ponctuelle. RE $\alpha$   $\Delta$ E4 est une protéine de 53 kDa délétée des acides aminés 254-365 composant le domaine D et une partie des domaines C et E. Sa répartition semble ubiquitaire. Il a été détecté dans des lignées cellulaires de cancer du sein (T 47D, MCF-7) et dans de nombreux tissus normaux et tumoraux: sein, utérus, méninges, hypophyse. Son niveau d'expression est élevé et comparable à celui de la forme sauvage (Pfeffer 1993). Une protéine dont le PM correspond à celui de RE $\alpha$   $\Delta$ E4 a été détectée dans l'ovaire normal et cancéreux. Cette protéine n'est reconnue que par des anticorps spécifiques d'épitopes différents de ceux codés par l'exon 4 (Murphy 1997) RE $\alpha$   $\Delta$ E4 ne lie pas l'estradiol, ne se lie pas aux séquences ERE et n'active pas la transcription lors de transfections transitoires dans des cellules de carcinome embryonnaire humain P19EC et dans des cellules de choriocarcinome humain JEG3 (Koehorst 1994). Il a un effet dominant négatif sur la forme sauvage du RE $\alpha$  (Murphy 1997b).

#### **-Epissage alternatif de l'exon 5 (RE $\alpha$ $\Delta$ E5).**

C'est le variant d'épissage qui a été le plus étudié. RE $\alpha$   $\Delta$ E5 est une protéine d'environ 42 kDa détectée par immunohistochimie dans les cellules BT20 (Castles 1993) et dans les cancers du sein *in vivo* en utilisant un anticorps monoclonal spécifique ne reconnaissant pas la forme sauvage du récepteur (Desai 1997). Sa présence semble liée au caractère tumoral des tissus (Castles 1993) et les premières études avaient montré qu'il pouvait être associé aux résistances du cancer du sein au tamoxifène. L'épissage alternatif de l'exon 5 entraîne un décalage du cadre de lecture et l'apparition d'un codon STOP arrêtant prématurément la traduction. RE $\alpha$   $\Delta$ E5 est délété d'une grande partie du domaine E. L'estradiol augmente la fixation des hétérodimères RE $\alpha$  sauvage/RE $\alpha$  $\Delta$ E5 aux séquences ERE (Chaidarun 1998). L'action de RE $\alpha$   $\Delta$ E5 semble dépendre de la présence de la forme sauvage du récepteur car seul il n'a pas d'effet sur l'activité transcriptionnelle mais l'augmente de façon synergique et dose dépendante lorsqu'il est co-transfecté avec le RE $\alpha$  sauvage dans les cellules U2-OS (Chaidarun 1998). La sur-expression de ce variant par transfection stable dans les cellules MCF-

7 augmente le taux de récepteur de la progestérone en absence d'estradiol (Fuqua 1995). Ce variant semble rarement ou faiblement exprimé par rapport aux autres variants (Murphy 1998).

**-Epissage alternatif de l'exon 6 (RE $\alpha$   $\Delta$ E6).**

L'épissage alternatif de l'exon 6 entraîne un décalage du cadre de lecture et l'apparition précoce d'un codon STOP. Ce variant n'a jamais été détecté dans du tissu humain par technique RT-PCR (Rey 1998, Chaidarun, Alexander 1998). Il est possible que l'ARN messager du RE $\alpha$   $\Delta$ E6 existe à de faibles taux et soit rapidement dégradé.

**-Epissage alternatif de l'exon 7 (RE $\alpha$   $\Delta$ E7).**

L'épissage alternatif de l'exon 7 amène un décalage du cadre de lecture et l'apparition précoce d'un codon STOP. Il a été décrit dans des lignées cellulaires de cancer du sein (Pfeffer 1996) et dans des tissus normaux et cancéreux: sein, utérus, méningiomes et hypophysés (Chaidarun 1998). RE $\alpha$   $\Delta$ E7 est une protéine de 51 kDa. Il a un effet dominant négatif lorsqu'il est cotransfecté avec la forme sauvage dans la levure (Fuqua 1992) mais il n'est pas fonctionnel lorsqu'il est transfecté, seul, dans des cellules HeLa (Wang 1991).

**-Epissage alternatif de l'exon 8 (RE $\alpha$   $\Delta$ E8).**

La délétion partielle de la région traduite de l'exon 8 a été retrouvée dans 1 endomètre normal et dans 1 endomètre cancéreux (Hu 1996).

**-Epissages alternatifs multi-exoniques.**

L'épissage alternatif des exons 2 et 3 induit un décalage du cadre de lecture et l'apparition précoce d'un codon STOP. Il a été détecté dans le sein normal et cancéreux où il est faiblement exprimé (Leygue 1996b, Leygue 1996a). Le RE $\alpha$  délété des exons 4 et 7, des exons 3 à 5 ou des exons 5 à 7 a été détecté dans les cellules MCF-7 et dans les cancers du sein (Pfeffer 1996). Le RE $\alpha$  délété des exons 3 et 4 semble fortement exprimé dans les cellules évoluant indépendamment de l'estradiol (Murphy 1997). Dans l'endomètre normal et cancéreux, le RE $\alpha$  délété des exons 3 et 4, des exons 4 et 5 ou de l'exon 7 et d'une partie de l'exon 8 traduit ont été détectés (Hu 1996). L'utilisation d'anticorps spécifiques de l'extrémité N-terminale du RE $\alpha$  a permis de suspecter la présence de récepteurs tronqués correspondants aux variants suivants : RE $\alpha$  $\Delta$ E2, E3+E7, RE $\alpha$  $\Delta$ E2, E3+E4, RE $\alpha$  $\Delta$ E3-E7. Ces récepteurs tronqués seraient retrouvés en plus grande quantité dans certains cancers du sein (Murphy 1998).

**b)-variants du RE  $\beta$**

Bien que ce récepteur est été trouvé récemment, la recherche d'isoformes, faite de façon systématique, a permis de retrouver plusieurs formes dont 2 paraissent importantes (figure ...). Il s'agit de l'ER $\beta$ <sub>503</sub> obtenu par un ajout de 18 acides aminés dans le domaine de liaison à l'hormone (Chu 1997) et qui a une affinité 35 fois plus faible pour l'estradiol que le RE $\beta$  de type sauvage (485 acides aminés) et trouvé dans les tissus de rat mais pas dans les tissus humains (Petersen 1998). Des variants d'épissage (RE  $\beta$ 1-5) ont été identifiés dans une librairie cADN de testicule humain et d'une lignée de cellules mammaires cancéreuses humaines (MDA-MB435) (Moore 1998). Ces iso formes ont été retrouvés en proportion variable dans les divers tissus humains analysés. Un ER  $\beta$  $\Delta$ 5 présentant une délétion de l'exon 5 (code pour le domaine de liaison à l'hormone) n'a pas d'effet sur l'activité basale de transcription mais s'hétéro dimérise avec les RE  $\alpha$  et  $\beta$  normaux (type sauvage) et empêche leur fonctionnement (Inoue 2000). C'est donc un récepteur dominant négatif. RE $\beta$ cx est un variant identique au RE  $\beta$  (exon 1 à 7) mais auquel manque une partie de la région C-terminale (exon 8) qui est remplacée par une séquence de 26 acides aminés (Ogawa 1998b, Ogawa 1998a). Ce variant manque de certains acides nucléiques importants pour la liaison de l'estradiol et pour la fonction AF2. Aussi il ne paraît pas lié l'estradiol et demeure inactif en sa présence, mais il est capable de se dimériser avec le RE  $\beta$  et surtout avec le RE  $\alpha$  dont il inhibe la liaison à l'ADN. Il se comporte donc comme un dominant négatif.

## Références bibliographiques :

---

- Ambrosino, C., Cicatiello, L., Cobellis, G., Addeo, R., et al. (1993) Functional antagonism between the estrogen receptor and Fos in the regulation of c-fos protooncogene transcription. *Mol Endocrinol*, 7, pp.1472-83.
- Castles, C.G., Fuqua, S.A., Klotz, D.M., Hill, S.M. (1993) Expression of a constitutively active estrogen receptor variant in the estrogen receptor-negative BT-20 human breast cancer cell line. *Cancer Res*, 53, pp.5934-9.
- Chaidarun, S.S., Alexander, J.M. (1998) A tumor-specific truncated estrogen receptor splice variant enhances estrogen-stimulated gene expression. *Mol Endocrinol*, 12, pp.1355-66.
- Chu, S., Fuller, P.J. (1997) Identification of a splice variant of the rat estrogen receptor beta gene. *Mol Cell Endocrinol*, 132, pp.195-9.
- Desai, A.J., Luqmani, Y.A., Walters, J.E., Coope, R.C., et al. (1997) Presence of exon 5-deleted oestrogen receptor in human breast cancer: functional analysis and clinical significance. *Br J Cancer*, 75, pp.1173-84.
- Dotzlaw, H., Alkhalaf, M., Murphy, L.C. (1992) Characterization of estrogen receptor variant mRNAs from human breast cancers. *Mol Endocrinol*, 6, pp.773-85.
- Erenburg, I., Schachter, B., Miray Lopez, R., Ossowski, L. (1997) Loss of an estrogen receptor isoform (ERalpha delta 3) in breast cancer and the consequences of its reexpression: interference with estrogen-stimulated properties of malignant transformation. *Mol Endocrinol*, 11, pp.2004-15.
- Fuqua, S.A., Fitzgerald, S.D., Allred, D.C., Elledge, R.M., et al. (1992) Inhibition of estrogen receptor action by a naturally occurring variant in human breast tumors. *Cancer Res*, 52, pp.483-6.
- Fuqua, S.A., Wolf, D.M. (1995) Molecular aspects of estrogen receptor variants in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*, 35, pp.233-41.
- Hu, C., Hyder, S.M., Needleman, D.S., Baker, V.V. (1996) Expression of estrogen receptor variants in normal and neoplastic human uterus. *Mol Cell Endocrinol*, 118, pp.173-9.
- Inoue, S., Ogawa, S., Horie, K., Hoshino, S., et al. (2000) An estrogen receptor beta isoform that lacks exon 5 has dominant negative activity on both ERalpha and ERbeta. *Biochem Biophys Res Commun*, 279, pp.814-9.
- Jacq, X., Brou, C., Lutz, Y., Davidson, I., et al. (1994) Human TAFII30 is present in a distinct TFIID complex and is required for transcriptional activation by the estrogen receptor. *Cell*, 79, pp.107-17.
- Koehorst, S.G., Cox, J.J., Donker, G.H., Lopes da Silva, S., et al. (1994) Functional analysis of an alternatively spliced estrogen receptor lacking exon 4 isolated from MCF-7 breast cancer cells and meningioma tissue. *Mol Cell Endocrinol*, 101, pp.237-45.
- Korach, K.S., Couse, J.F., Curtis, S.W., Washburn, T.F., et al. (1996) Estrogen receptor gene disruption: molecular characterization and experimental and clinical phenotypes. *Recent Prog Horm Res*, 51, pp.159-86; discussion 186-8.
- Leygue, E., Huang, A., Murphy, L.C., Watson, P.H. (1996a) Prevalence of estrogen receptor variant messenger RNAs in human breast cancer. *Cancer Res*, 56, pp.4324-7.
- Leygue, E.R., Watson, P.H., Murphy, L.C. (1996b) Estrogen receptor variants in normal human mammary tissue. *J Natl Cancer Inst*, 88, pp.284-90.
- Miksicek, R.J. (1993a) Commonly occurring plant flavonoids have estrogenic activity. *Mol Pharmacol*, 44, pp.37-43.
- Miksicek, R.J., Lei, Y., Wang, Y. (1993b) Exon skipping gives rise to alternatively spliced forms of the estrogen receptor in breast tumor cells. *Breast Cancer Res Treat*, 26, pp.163-74.
- Moore, J.T., McKee, D.D., Slentz-Kesler, K., Moore, L.B., et al. (1998) Cloning and characterization of human estrogen receptor beta isoforms. *Biochem Biophys Res Commun*, 247, pp.75-8.
- Murphy, L.C., Dotzlaw, H., Leygue, E., Coutts, A., et al. (1998) The pathophysiological role of estrogen receptor variants in human breast cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 65, pp.175-80.
- Murphy, L.C., Dotzlaw, H., Leygue, E., Douglas, D., et al. (1997) Estrogen receptor variants and mutations. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 62, pp.363-72.
- Ogawa, S., Inoue, S., Watanabe, T., Hiroi, H., et al. (1998a) The complete primary structure of human estrogen receptor beta (hER beta) and its heterodimerization with ER alpha in vivo and in vitro. *Biochem Biophys Res Commun*, 243, pp.122-6.
- Ogawa, S., Inoue, S., Watanabe, T., Orimo, A., et al. (1998b) Molecular cloning and characterization of human estrogen receptor betacx: a potential inhibitor of estrogen action in human. *Nucleic Acids Res*, 26, pp.3505-12.
- Petersen, D.N., Tkalcovic, G.T., Koza-Taylor, P.H., Turi, T.G., et al. (1998) Identification of estrogen receptor beta2, a functional variant of estrogen receptor beta expressed in normal rat tissues. *Endocrinology*, 139, pp.1082-92.
- Pfeffer, U., Fecarotta, E., Arena, G., Forlani, A., et al. (1996) Alternative splicing of the estrogen receptor primary transcript normally occurs in estrogen receptor positive tissues and cell lines. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 56, pp.99-105.
- Pfeffer, U., Fecarotta, E., Castagnetta, L., Vidali, G. (1993) Estrogen receptor variant messenger RNA lacking exon 4 in estrogen-responsive human breast cancer cell lines. *Cancer Res*, 53, pp.741-3.
- Rey, J.M., Pujol, P., Dechaud, H., Edouard, E., et al. (1998) Expression of oestrogen receptor-alpha splicing variants and oestrogen receptor-beta in endometrium of infertile patients. *Mol Hum Reprod*, 4, pp.641-7.
- van Dijk, M.A., Floore, A.N., Kloppenborg, K.I., van 't Veer, L.J. (1997) A functional assay in yeast for the human estrogen receptor displays wild-type and variant estrogen receptor messenger RNAs present in breast carcinoma. *Cancer Res*, 57, pp.3478-85.
- Wang, Y., Miksicek, R.J. (1991) Identification of a dominant negative form of the human estrogen receptor. *Mol Endocrinol*, 5, pp.1707-15.

## Annexe 6

---

### MASSES MOLÉCULAIRES RELATIVES DES DIFFÉRENTES FORMES DE CERTAINS PHYTO-ESTROGÈNES

d'après Branca (2003)

COMPOSÉ	MASSE MOLÉCULAIRE RELATIVE
<b>Isoflavonoïdes</b>	
Daidzeine	245
Daidzine	416
6-O-Acetyl daidzine	458
6-O-Malonyl daidzine	502
Genisteine	270
Genisteine	432
6-O-Acetyl genistine	474
6-O-Malonyl genistine	518
Glyciteine	284
Glycitine	446
Acetyl glycitine	488
Malonyl glycitine	532
Formononetin	268
Biochanin A	284
Equol	242
Total isoflavones	250
<b>Lignanes</b>	
Matairesinol	358
Enterodiol	302
Enterolactone	298
Secoisolariciresinol	362
<b>Coumestanes</b>	
Coumestrol	286
<b>Lignanes</b>	
Matairesinol	358
Enterodiol	302
Enterolactone	298
Secoisolariciresinol	362
<b>Coumestans</b>	
Coumestrol	286

---

#### Référence bibliographique

Branca, F. (2003) *Foreword. Br J Nutr*, 89 suppl 1, pp.3-4.

Imprimerie Bialec - Nancy  
Dépôt légal mars 2005  
**ISBN 2-11-095443-4**