

N° d'ordre : 3374

# THESE

PRESENTEE A

## L'UNIVERSITE BORDEAUX 1

ECOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE ET SCIENCES DE LA SANTE

PAR

**SEBASTIEN VERGNE**

POUR OBTENIR LE GRADE DE

**DOCTEUR**

SPECIALITE : SCIENCES DES ALIMENTS ET NUTRITION

\*\*\*\*\*

*Les isoflavones de soja : leur biodisponibilité chez l'Homme et leurs effets sur la différenciation d'une lignée ostéoblastique humaine.*

\*\*\*\*\*

Soutenue le : 12 Juin 2007

*Après avis de :*

Patrick BOREL (DR - INRA/INSERM, Marseille)  
Véronique COXAM (DR - INRA, Clermont-Ferrand)

Rapporteur  
Rapporteur

*Devant la commission d'examen formée de :*

Jean-François NARBONNE (PR - Université Bordeaux 1)  
Patrick BOREL (DR - INRA/INSERM, Marseille)  
Véronique COXAM (DR - INRA, Clermont-Ferrand)  
Jean-Michel LECERF (Responsable du service Nutrition - Institut Pasteur, Lille)  
Michèle LIEBERHERR (DR - CNRS/INRA, Jouy-en-Josas)  
Catherine BENNETAU-PELISSERO (PR - ENITA, Bordeaux)  
Philippe CHANTRE (Directeur Scientifique - ARKOPHARMA, Carros)  
Patrick SAUVANT (MC - ENITA, Bordeaux)

Président  
Rapporteur  
Rapporteur  
Examineur  
Examineur  
Co-Directeur de thèse  
Co-Directeur de thèse  
Co-Directeur de thèse



*Je voudrais d'abord exprimer de vifs remerciements à l'entreprise Demeco® de Brive-La-Gaillarde en Corrèze où j'ai pu travailler au cours d'un été ... été au cours duquel mes lombaires m'ont rapidement fait prendre conscience de tout l'intérêt d'entreprendre et de réussir ses études.*



J'exprime mes sincères remerciements aux membres du jury qui ont accepté de juger mon travail :

Mr Jean-François Narbonne de me faire l'honneur d'accepter la présidence de ce jury de thèse. Veuillez trouver le témoignage de mon profond respect,

Mr Patrick Borel d'avoir aimablement accepté de juger ce travail, de me consacrer un peu de votre temps et de m'apporter tout votre savoir sur la biodisponibilité des micronutriments et microconstituants.

Mme Véronique Coxam de me faire le plaisir d'avoir accepté d'être rapporteur de ce travail et de m'apporter toute votre connaissance et votre expertise sur les isoflavones et l'os,

Mr Jean-Michel Lecerf d'avoir très gentiment accepté de juger ce travail et de bien vouloir me consacrer un peu de votre temps si précieux. Je vous témoigne de ma profonde gratitude.

Je voudrais remercier le personnel de l'ENITA de Bordeaux où ce travail de thèse a principalement été effectué :

Mme Catherine Bennetau-Pelissero de bien avoir voulu encadrer une partie de ce travail et de m'avoir accueilli au sein de l'UMRS, unité que vous avez fondée à force de travail et de ténacité. Merci de l'aide que vous m'avez apportée pour les corrections de ce manuscrit. Merci enfin de toute la sérénité que vous avez dégagée au cours de ce travail.

Mr Patrick Sauvant de m'avoir aidé à trouver le financement de ma thèse, d'avoir co-encadré ce travail, de m'avoir fait part de ta récente expérience de doctorant et de m'avoir appris à prendre un grand recul sur mon travail. Merci de ta gentillesse, de ta bonne humeur au travail et de toutes tes qualités humaines. Merci enfin de m'avoir témoigné toute ta motivation au métier d'enseignant-chercheur.

Mme Mylène Potier-Georges de m'avoir conseillé et d'avoir jugé mon travail de thèse. Merci pour ton appréciation lors de l'écriture des articles. Merci de ton aide et de tes conseils pour la suite à donner à cette thèse, « le fameux moment où tout commence ». Merci de ta gentillesse.

Merci à Mme Valérie Lamothe de m'avoir aidé à doser ces milliards d'échantillons, de ta rigueur, de ta simplicité, de ta franchise ... et de ta patience.

Merci aux doctorants, Richard Tallon, Fabien Dumetz et Charlotte Carreau, grâce à qui les mauvais moments l'étaient un peu moins et les bons moments encore un peu plus ... Merci de leur amitié.



Merci à Mme Sandrine Papillon et à Mr Jean Marmol pour leur bonne humeur et leur aide en cette fin de thèse.

Merci à l'ensemble des stagiaires, Christophe Jussier, Delphine Diez, Myriam Guillou, Christophe Jussier, Julien Isoard et Aurélie Cendres en particulier. Merci de votre gentillesse et des bons moments passés.

Merci à l'ensemble du personnel pour avoir créé une ambiance...chaleureuse : Didier Chinzi, Michel Le Hénaff, Anne-Marie Richard, Céline Gire, Lionel Jordan-Meille, Svitlana Poix, Philippe Friant, Muriel Couderc, Myriam Delamarre, Benoît Grossiord, Muriel Denayrolles, Aurélie Baliarda, Soledad Arias, Patricia Cheype, Michèle Daydé, Pascale Cavard, Alex Antoine, Olivier Lavialle, Jean-Pierre L'Hospital, Loïc Commagnac, Philippe Chéry et Russel Wallace.

Merci enfin à Mr Jean Magne, directeur de l'ENITAB, pour son soutien durant ces travaux de thèse.

J'exprime des remerciements amicaux au service de la R&D d'Arkopharma :

Marc Pellet d'avoir initié ce projet. Philippe Chantre et Philip Chapelle d'avoir encadré ce projet. Merci Philippe d'avoir accepté de participer à ce travail et de m'avoir apporté votre soutien matériel et moral aussi parfois. C'est réellement un plaisir de travailler avec vous. Merci Philip de votre franchise et de vos conseils judicieux.

Merci à Mme Christelle Rosier-Sala pour l'aide que tu m'as apportée par tes lectures et tes commentaires sur mon travail. Merci de ta gentillesse.

Merci à Sylvie Boutin, Amélie Quinquenel, Elsa Renzacci, Laurence Aubert, Valérie Zedda et Emmanuelle Alfano grâce à qui les déplacements sur Carros étaient vraiment agréables. Merci de leur amitié.

Merci à Mr Philippe Abbe et Mme Patricia Baille pour votre aide technique sur les dosages des isoflavones par HPLC.

Merci enfin à Didier Guédon et Richard Coll pour m'avoir consacré un peu de leur temps et m'avoir fait part de leur expérience.

J'exprime également des remerciements amicaux au LNSA de l'INRA de Jouy-en-Josas :

Mme Michèle Lieberherr de m'avoir accueilli quelques mois au sein de son unité de recherche. Merci Michèle de m'avoir consacré de votre temps, de vous être rendu disponible, de m'avoir conseillé toujours judicieusement et aidé de façon constructive dans mon travail. Merci de votre gentillesse. Je garde un très bon souvenir de ce séjour en région parisienne.





Merci à Gilles Chaumaz, Christian Bordat, Christine Heberden, Anne De Wilde, Yvrick Zagar, Colette Colin et Fabien Pifferi pour leur présence amicale.

Merci à Alain Pointillart et à Béatrice Darcy-Vrillon pour leur gentillesse et leur accueil.

Merci à toutes les équipes qui ont collaboré avec nous pour la bonne réalisation de ces travaux de thèse : Joëlle Amédée de l'INSERM U577, Marlène Durand du CIC - INSERM, Paul Perez et Julien Asselineau du CHU de Bordeaux - ISPED, ainsi que Karine Titier et Nicholas Moore du département de pharmacologie de l'Université Bordeaux 2 - INSERM U657 grâce à qui tout a baigné dans la joie et la félicité.

Merci enfin à Mr Merckx, Mme Bargue, Mr Chouzenoux, Mme Bourg, Mr Dupuy, Mme Eberhardt et Mme Bessy, tous remarquables enseignants.



Je voudrais te remercier Anne pour ton soutien de chaque instant, pour ta patience, pour tout ce que tu m'apportes et bien plus encore ...

Merci aussi mon petit Antoine pour toute la motivation que tu me donnes ...

Je remercie mes parents, Chantal et Guy ainsi que ma petite sœur Aurélie de m'avoir donné à la fois l'envie et le courage de mener mes études et ce travail de thèse en particulier.

Je remercie aussi toute ma famille de m'avoir soutenu tout au long de mes études tant sur le plan matériel que par leur soutien moral.

Et puis ... les copines, les copains ... merci à vous tous !

*Merci aussi à vous tous qui êtes partis trop tôt. Vous me manquez tellement.*



Les isoflavones, contenues en quantité substantielle dans le soja, sont actuellement considérées comme une alternative naturelle aux traitements hormonaux substitutifs de la ménopause. En effet, certains effets bénéfiques leur ont été attribués par l'observation des populations asiatiques. Les résultats des études, ayant trait aux isoflavones, sont parfois contradictoires, en particulier lorsque leurs effets cliniques sont recherchés. Il apparaît donc important d'étudier la biodisponibilité des isoflavones, nécessaire préalable à leur efficacité biologique. L'objet de cette thèse est donc de caractériser les facteurs influant sur la biodisponibilité des isoflavones de soja : la formulation des compléments alimentaires, la matrice alimentaire, le contexte alimentaire, la chronicité d'ingestion et l'appartenance à une ethnie seront étudiés. Enfin, l'effet des isoflavones de soja sur l'ostéoporose sera étudié au travers d'une étude *in vitro* sur une lignée ostéoblastique humaine. Elle suggère l'intérêt d'une prévention nutritionnelle de l'ostéoporose par les isoflavones de soja.

**Mots clés :** Isoflavones, Biodisponibilité, Nutrition, Pharmacologie, Ostéoblastes, Récepteurs aux œstrogènes, Marqueurs de différenciation.

Soy isoflavones are currently considered as an alternative to menopausal hormone replacement therapy. Indeed, some of their beneficial effects are known with data resulting from Asian epidemiological studies. However results obtained from clinical studies are discrepant. As a consequence, it appears important to study the bioavailability of isoflavones, a prerequisite of their biological activity. The aim of this thesis has been to study the effect of factors influencing their bioavailability, such as industrial processes used in the making of soy-based supplements, dietary matrix, dietary context, chronic ingestion of soy-based products, ethnic appurtenance. The effect of isoflavones on osteoporosis was suggested with an *in vitro* study, with a human osteoblast line being used. Soy isoflavones may be taken into consideration for the nutritional prevention of osteoporosis.

**Key words :** Isoflavone, Bioavailability, Nutrition, Pharmacology, Osteoblast, Estrogen receptor, Differentiation markers.



## ***Bibliographie***

1- VERGNE S., TITIER K., BERNARD V., ASSELINEAU J., DURAND M., LAMOTHE V., POTIER M., PEREZ P., DESMOTES-MAINARD J., CHANTRE P., BENNETAU-PELISSERO C., MOORE N. AND SAUVANT P. “Plasmatic and urinary pharmacokinetics of isoflavones after oral administration of two formulations of a soy based capsule, in healthy human volunteers” *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2007, 43(4):1488-94.

2- VERGNE S., BENNETAU-PELISSERO C., CHANTRE P., ASSELINEAU J., DURAND M., LAMOTHE V., POTIER M., MOORE N. AND SAUVANT P. “Higher bioavailability of isoflavones after a single ingestion of a soy-based supplement than a soy-based food in young healthy males”, *sous presse au British Journal of Nutrition*.

3- VERGNE S., SAUVANT P., CHANTRE P., ASSELINEAU J., DURAND M., LAMOTHE V., POTIER M., MOORE N., AND BENNETAU-PELISSERO C. “Influence of ethnic origin: Asian vs Caucasian and of background dietary habits on the bioavailability of isoflavones”, *en préparation*.

4- VERGNE S., CHAUMAZ G., ROSIER-SALA C., POTIER M., BENNETAU-PELISSERO C., LIEBERHERR M. AND SAUVANT P. “Equol-increased alkaline phosphatase activity in MG-63, a human osteosarcoma cell line, is mediated through estrogen receptors”, *en préparation*.

5- VERGNE S., ET SAUVANT P. “Les isoflavones de soja dans le traitement de la ménopause” *Phytothérapie*; 4; 172-180; 2006.

## ***Abstracts***

1- BENNETAU-PELISSERO C.\*, LAMOTHE V., VERGNE S. AND SAUVANT P. “Isoflavones in food and preparations in France” 2<sup>nd</sup> PhytoHealth Congress, Barcelona, Spain, 2004 (communication orale) \*orateur.

2- VERGNE S.\*, TITIER K., BERNARD V., ASSELINEAU J., DURAND M., LAMOTHE V., POTIER M., PEREZ P., DESMOTES-MAINARD J., CHANTRE P., BENNETAU-PELISSERO C., MOORE N. AND SAUVANT P. “Soy proteins of food supplements do not affect the bioavailability of isoflavones:





a human study” 4<sup>th</sup> PhytoHealth Congress, Lausanne, Switzerland, 2005 (communication orale) \*orateur.

3- VERGNE S., CHANTRE P., BENNETAU-PELISSERO C. AND SAUVANT P. “Phytoestrogen bioavailability of two formulations of a soy based food supplement” 2<sup>ème</sup> congrès de la Société Française de Nutrition, Marseille, France, 2005 (poster).

4- VERGNE S.\*, CHAUMAZ G., ROSIER-SALA C., POTIER M., BENNETAU-PELISSERO C., LIEBERHERR M. AND SAUVANT P. “Equol modulates alkaline phosphatase expression” 2<sup>ème</sup> congrès de la Société Française de Nutrition, Marseille, France, 2005 (communication orale) \*orateur.

5- VERGNE S., CHAUMAZ G., GUILLOU M., POTIER M., ROSIER-SALA C., BENNETAU-PELISSERO C., LIEBERHERR M. AND SAUVANT P. “Soy isoflavone modulate alkaline phosphatase activity in the human bone cells, MG-63” 5<sup>th</sup> PhytoHealth Congress, Norwich, UK, 2005 (poster).

6- VERGNE S.\*, CHANTRE P., BENNETAU-PELISSERO C., LIEBERHERR M. AND SAUVANT P. “Soy isoflavones: factors influencing their bioavailability and their action on bone” Journée de l’école doctorale de l’Université de Bordeaux 1, Bordeaux, France, 2006 (communication orale) \*orateur.

7- VERGNE S., CARREAU C., CHAUMAZ G., POTIER M., ROSIER-SALA C., BENNETAU-PELISSERO C., LIEBERHERR M. AND SAUVANT P. “The crucial role of estrogen receptor, involved in the alkaline phosphatase modulation by equol, in the human bone cells MG-63” 1<sup>st</sup> International Congress on Food Safety, Budapest, Hungary, 2006 (poster).

8- VERGNE S., CHANTRE P., LAMOTHE V., ASSELINEAU J., DURAND M., POTIER M., BENNETAU-PELISSERO C., MOORE N. AND SAUVANT P. “Isoflavones contained in soy based capsules are more bioavailable compared with soy based cheese after single ingestion in Humans” 4<sup>th</sup> International Soy and Health Conference, Düsseldorf, Germany, 2006 (poster).

9- VERGNE S., CHAUMAZ G., POTIER M., ROSIER-SALA C., BENNETAU-PELISSERO C., LIEBERHERR M. AND SAUVANT P. “The effects of physiological concentrations of soy isoflavones on bone



cell differentiation, an *in vitro* study” 4<sup>th</sup> International Soy and Health Conference, Düsseldorf, Germany, 2006 (poster).

10- VERGNE S., CHANTRE P., LAMOTHE V., ASSELINEAU J., DURAND M., POTIER M., BENNETAU-PELISSERO C., MOORE N. AND SAUVANT P. "Influence of food matrix on bioavailability of isoflavones after a single ingestion in Humans” 10<sup>th</sup> European Nutrition conference, Paris, France, 2007 (poster).

11- VERGNE S., CHANTRE P., LAMOTHE V., ASSELINEAU J., DURAND M., POTIER M., BENNETAU-PELISSERO C., MOORE N. AND SAUVANT P. “Influence of ethnicity on bioavailability of isoflavones in Human: Caucasian vs Asian” 10<sup>th</sup> European Nutrition conference, Paris, France, 2007 (poster).

12- VERGNE S., CHANTRE P., POTIER M., BENNETAU-PELISSERO C. AND SAUVANT P. “The bioavailability of isoflavones” Journée de l'école doctorale de l'Université de Bordeaux 2, Arcachon, France, 2007 (poster).



<i>ABC</i> : ATP-binding cassette	<i>LDL</i> : Low Density Lipoprotein
<i>ADN</i> : Acide Désoxyribo Nucléique	<i>LH</i> : Luteinising Hormone
<i>AF-1</i> : Domaine de transactivation 1	<i>MAPK</i> : Mitogen-Activated Protein Kinase
<i>AF-2</i> : Domaine de transactivation 2	<i>M-CSF</i> : Macrophage-Colony Stimulating Factor
<i>ALP</i> : Phosphatase Alcaline	<i>MCV</i> : Maladies CardioVasculaires
<i>AUC<sub>0→t</sub></i> : Aire Sous la Courbe	<i>MRP</i> : Multidrug Resistant Protein
<i>BERKO</i> : Estrogen Receptor $\beta$ Knocked Out	<i>MWS</i> : Million Women Study
<i>BSA</i> : Bovine Serum Albumin	<i>NO</i> : monoxyde d'azote
<i>Cl</i> : Clairance	<i>o-DMA</i> : o-Desméthylangolensine
<i>C<sub>max</sub></i> : Concentration maximale atteinte dans le plasma	<i>OPG</i> : Ostéoprotégérine
<i>CMO</i> : Contenu Minéral Osseuse	<i>PBS</i> : Phosphate Buffer Saline
<i>Da</i> : Dalton	<i>Pgp-MDR</i> : protéine multidrug resistance
<i>DBD</i> : DNA Binding Domain	<i>PKC</i> : Protein Kinase C
<i>DERKO</i> : Estrogen Receptor Knocked Out	<i>RANK</i> : Receptor Activator of Nuclear factor $\kappa$ B
<i>DMO</i> : Densité Minérale Osseuse	<i>RANK-L</i> : Receptor Activator of Nuclear factor $\kappa$ B-Ligand
<i>DMSO</i> : Diméthylsulfoxyde	<i>RAR</i> : Retinoic Acid Receptor
<i>E<sub>1</sub></i> : Œstrone	<i>RXR</i> : Retinoid X Receptor
<i>E<sub>2</sub></i> : 17 $\beta$ -Œstradiol	<i>SERM</i> : Selective Estrogen Receptor Modulator
<i>E<sub>3</sub></i> : Œstriol	<i>SLGT 1</i> : Sodium Dependent Glucose Transporter 1
<i>E3N-EPIC</i> : Etude Epidémiologique de femmes de la Mutuelle Générale de l'Education Nationale - European Prospective Into Cancer	<i>SHBG</i> : Steroid Hormone Binding Globulin
<i>EDTA</i> : Ethylene Diamine Tetraacetic Acid	<i>SULT</i> : Sulfotransferase
<i>EGTA</i> : Ethylene Glycol Tetraacetic Acid	<i>SVF</i> : Sérum de Veau Fœtale
<i>ELISA</i> : Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay	<i>T<sub>1/2 élim</sub></i> : Demi-vie d'élimination
<i>ER<math>\alpha</math></i> : Estrogen Receptor $\alpha$	<i>TG</i> : Triglycérides
<i>ER<math>\beta</math></i> : Estrogen Receptor $\beta$	<i>TGF</i> : Transforming Growth Factor
<i>ERE</i> : Estrogen Responsive Element	<i>THS</i> : Traitement Hormonal Substitutif
<i>ERKO</i> : Estrogen Receptor $\alpha$ Knocked Out	<i>T<sub>max</sub></i> : Temps auquel la concentration maximale est atteinte
<i>FDA</i> : Food and Drug Agency	<i>TNF</i> : Tumor Necrosis Factor
<i>FSH</i> : Follicular Stimulating Hormone	<i>PVT</i> : Protéines Végétales Texturées
<i>GnRH</i> : Gonadotropin Releasing Hormone	<i>UDPGT</i> : Uracyl diphosphate - Glucuronosyltransferase
<i>GM-CSF</i> : Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor	<i>V<sub>d</sub></i> : Volume de distribution
<i>HEC-1</i> : Human Endometrial Carcinoma-1	<i>VENUS</i> : Vegetable Estrogens in Nutrition and the Skeleton
<i>HERS</i> : Heart and Estrogen/progestin Replacement Study	<i>VLDL</i> : Very Low Density Lipoprotein
<i>HDL</i> : High Density Lipoprotein	<i>WHI</i> : Women's Health Initiative
<i>HPLC</i> : High Performance Liquid Chromatography	
<i>HSP</i> : Heat Shock Protein	
<i>IC</i> : Intervalle de Confiance	
<i>ICI</i> : Imperial Chemical Industries	
<i>IL</i> : Interleukine	
<i>JHCI</i> : Joint Health Claims Initiative	
<i>KO</i> : Knocked Out	
<i>LBD</i> : Ligand Binding Domain	



*Introduction bibliographique*

*Figure 1. Structures chimiques des œstrogènes endogènes*

*Figure 2. Métabolisme des stéroïdes au niveau des gonades*

*Figure 3. Métabolisme des stéroïdes au niveau des cortico-surrénales*

*Figure 4. Métabolites glucuro- et sulfo-conjugués de l'œstradiol*

*Figure 5. Production des œstrogènes conjugués et leur devenir dans l'organisme*

*Figure 6. Les œstrogènes et les cycles menstruels*

*Figure 7. Structure des récepteurs aux œstrogènes*

*Figure 8. Répartition des ERs  $\alpha$  et  $\beta$  chez l'Homme et la souris*

*Figure 9. Les différentes actions de l'œstradiol via les ERs*

*Figure 10. Analyse du tractus reproductif chez des rates femelles ERKO et BERKO*

*Figure 11. Complexité d'action génomique et non génomique des œstrogènes*

*Figure 12. Taux d'utilisatrices du THS chez les femmes ménopausées incluses dans la cohorte E3N*

*Figure 13. Risque relatif de l'incidence de cancer invasif du sein en relation avec le type de THS utilisé*

*Figure 14. Etude MWS - Incidence cumulée de l'incidence de cancer du sein et de l'endomètre selon la prise de THS (depuis 10 ans ou non) et selon le THS utilisé*

*Figure 15. Structure chimique d'un coumestane*

*Figure 16. Structure chimique des stilbènes et d'un stilbène particulier : le resvératrol*

*Figure 17. Structure chimique des lignanes et entérolignanes*

*Figure 18. Structure chimique du benzo- $\gamma$ -pyrone*

*Figure 19. Structure générale des principaux flavanones*

*Figure 20. Structure chimique des isoflavones aglycones*

*Figure 21. Structure chimique de la biochanine A et de la formononétine*

*Figure 22. Structure chimique des isoflavones glycosilées*

*Figure 23. Les procédés industriels de transformation du soja*

*Figure 24. Seules les isoflavones aglycones sont absorbées au niveau intestinal*

*Figure 25. La déglycosilation partielle stomacale des isoflavones conjuguées*

*Figure 26. Les sites d'absorption intestinale privilégiées des isoflavones chez le rat*

*Figure 27. Absorption et conjugaison intestinale des isoflavones*

*Figure 28. Mécanisme d'absorption intestinale des isoflavones via une enzyme de type  $\beta$ -glucosidase*

*Figure 29. La mise en évidence par des inhibiteurs spécifiques de l'action des CYP450*





- Figure 30. Le métabolisme hépatique des isoflavones via l'action des CYP450
- Figure 31. Le métabolisme de la génistéine
- Figure 32. Le métabolisme de la daïdzéine
- Figure 33. Les preuves de l'origine bactérienne de l'équol
- Figure 34. Les énantiomères de l'équol
- Figure 35. Définition d'un producteur d'équol
- Figure 36. Les métabolites circulants des isoflavones
- Figure 37. Le recyclage entéro-hépatique des isoflavones
- Figure 38. Les métabolites des isoflavones excrétés par voie urinaire
- Figure 39. Profil pharmacocinétique des isoflavones et définition des paramètres associés
- Figure 40. Plateau pharmacocinétique atteint après ingestion chronique d'isoflavones
- Figure 41. Profils pharmacocinétiques à J1 et après ingestion chronique d'isoflavones (J30)
- Figure 42. Effet de la forme chimique ingérée (aglycone vs glycoside) sur la biodisponibilité des isoflavones
- Figure 43. Effet de la forme chimique ingérée (aglycone vs glycoside) sur la biodisponibilité des isoflavones
- Figure 44. Effet de la matrice sur la biodisponibilité des isoflavones
- Figure 45. Techniques moléculaires de caractérisation de l'action classique des molécules œstrogéniques
- Figure 46. Affinité des isoflavones pour les récepteurs aux œstrogènes
- Figure 47. Activité transcriptionnelle des isoflavones mise en évidence dans un système de lignées HEC-1 cotransfectées
- Figure 48. Action non classique de la génistéine sur la eNOS
- Figure 49. Effet de la génistéine sur le contenu en AMPc à 5 min
- Figure 50. Effet de la daïdzéine sur le contenu en  $Ca^{2+}$  intracellulaire
- Figure 51. Séquence d'acides aminés caractéristiques, structure secondaire, structure tertiaire et fibrilles de collagène de type I observées au microscope électronique
- Figure 52. Structure 3D de la phosphatase alcaline, réalisée à partir de la séquence d'acides aminés
- Figure 53. Cristaux d'hydroxyapatite observés au microscope électronique
- Figure 54. Action combinée de RANK-L/RANK/OPG dans la différenciation des ostéoclastes
- Figure 55. La différenciation théorique des ostéoblastes in vitro
- Figure 56. Déterminisme du stade de différenciation des ostéoblastes via l'expression de marqueurs protéiques



*Figure 57. Le remodelage osseux*

*Figure 58. Evolution de la masse osseuse au cours de la vie*

*Figure 59. Action du  $17\beta$ -œstradiol sur les cellules osseuses*

#### *Matériel et Méthodes*

*Figure 60. Digestion et extraction des isoflavones contenues dans un complément alimentaire à base de soja*

*Figure 61. Les principales étapes du dosage des isoflavones en ELISA*

*Figure 62. Calcul des concentrations en isoflavones à partir d'une gamme*

*Figure 63. La lignée d'ostéosarcomes MG-63*

*Figure 64. Relation entre densité optique et nombre de cellules*

#### *Résultats*

*Figure 65. Profils HPLC des isoflavones contenues dans deux formulations de Phytosoya<sup>®</sup>*

*Figure 66. Effets des isoflavonoïdes sur la minéralisation des MG-63*

*Figure 67. Effets de différents mélanges d'isoflavonoïdes sur l'activité de la phosphatase alcaline*



### *Introduction bibliographique*

*Tableau 1. Etude E3N-EPIC : Incidence de cancer du sein selon le THS utilisé*

*Tableau 2. Composition de fruits et graines de consommation courante en isoflavones*

*Tableau 3. Concentrations en isoflavones d'aliments dérivés du soja*

*Tableau 4. Concentrations en isoflavones de compléments alimentaires à base de soja*

*Tableau 5. Action des enzymes hépatiques de phase 2 : constantes cinétiques de formation du génistéine-7-glucuronide à partir de la génistéine*

*Tableau 6. Action des enzymes hépatiques de phase 2 : constantes cinétiques de formation de la daïdzéine-7-glucuronide à partir de la daïdzéine*

*Tableau 7. Les paramètres pharmacocinétiques plasmatiques des isoflavones*

*Tableau 8. Composition des régimes alimentaires*

*Tableau 9. Concentrations plasmatiques d'isoflavones suite à une exposition chronique, selon l'appartenance à une ethnie*

*Tableau 10. Affinité relative des isoflavones pour les récepteurs aux œstrogènes*

*Tableau 11. Effets des isoflavones de soja sur les bouffées de chaleur*

*Tableau 12. Principaux essais cliniques visant à montrer les effets des isoflavones sur les paramètres osseux*

*Tableau 13. Effets des isoflavones sur les cellules osseuses*

### *Matériel et Méthodes*

*Tableau 14. Tests de spécificité des anticorps anti-équol, -génistéine et -daïdzéine*

### *Résultats*

*Tableau 15. Valeurs de volume de distribution et de clairance au cours de l'étude de bioéquivalence*

*Tableau 16. Concentrations plasmatiques en isoflavonoïdes de femmes ménopausées consommant 2 gélules de Phytosoya<sup>®</sup> (2 x 35 mg d'isoflavones totales par jour) depuis 4 mois*



<i>Avant Propos</i> .....	1
<i>Introduction bibliographique</i> .....	5
<b>1. LES ŒSTROGENES ENDOGENES</b> .....	<b>5</b>
1.1. DEFINITIONS ET HISTORIQUE .....	5
1.2. LES VOIES DE SYNTHÈSE DES ŒSTROGENES ET LES MOLECULES ŒSTROGENIQUES .....	5
1.3. LE TRANSPORT ET LE CATABOLISME DES ŒSTROGENES .....	6
1.4. LES ROLES PHYSIOLOGIQUES DES ŒSTROGENES .....	7
1.4.1. <i>Les œstrogènes et la fonction de reproduction</i> .....	7
1.4.2. <i>Les œstrogènes sont doués de nombreux autres effets physiologiques</i> .....	8
1.5. LES MODES D'ACTION DES ŒSTROGENES .....	9
1.5.1. <i>Les récepteurs aux œstrogènes</i> .....	9
1.5.2. <i>Mécanisme d'action génomique des œstrogènes</i> .....	10
1.5.3. <i>La fonctionnalité des récepteurs aux œstrogènes</i> .....	11
1.5.4. <i>Les actions non génomiques des œstrogènes</i> .....	12
1.6. EFFETS PHARMACOLOGIQUES DES ŒSTROGENES .....	12
1.6.1. <i>La ménopause et l'utilisation d'œstrogènes à titre thérapeutique</i> .....	12
1.6.2. <i>Des études remettent en cause le traitement hormonal substitutif</i> .....	14
1.6.2.1. L'Heart and Estrogen/progestin Replacement Study I/II (HERS I/II) .....	14
1.6.2.2. La Women's Health Initiative (WHI).....	14
1.6.2.3. La Million Women Study (MWS).....	14
1.6.2.4. L'Etude épidémiologique de femmes de la Mutuelle Générale de l'Education Nationale - European Prospective Into Cancer (E3N-EPIC).....	15
1.6.3. Les conclusions de l'Agence Française de Sécurité Sanitaire des Produits de Santé (AFSSAPS) .....	15
<b>2. DIVERSITE ET SOURCES DES PHYTO-ŒSTROGENES DANS L'ALIMENTATION</b> .....	<b>18</b>
2.1. LA DECOUVERTE DES PHYTO-ŒSTROGENES .....	18
2.2. LES MOLECULES PHYTO-ŒSTROGENIQUES .....	19
2.2.1. <i>Les coumestanes</i> .....	19
2.2.2. <i>Les stilbènes</i> .....	19
2.2.3. <i>Les lignanes et les entérolignanes</i> .....	20
2.2.4. <i>Les flavonoïdes</i> .....	21
2.3. LES ISOFLAVONES DANS L'ALIMENTATION HUMAINE.....	21
2.3.1. <i>La structure chimique des isoflavones</i> .....	21
2.3.2. <i>Les sources alimentaires en isoflavones</i> .....	22
2.3.2.1. Les matières premières .....	22
2.3.2.2. Les aliments traditionnels asiatiques dérivés du soja.....	23
2.3.2.2. Les aliments « occidentaux » dérivés du soja .....	24
2.3.2.3. Les compléments alimentaires .....	25
2.4. L'EXPOSITION ALIMENTAIRE AUX ISOFLAVONES .....	25
2.4.1. <i>L'exposition des asiatiques</i> .....	25
2.4.2. <i>L'exposition des occidentaux</i> .....	26
<b>3. LA BIODISPONIBILITE DES ISOFLAVONES</b> .....	<b>29</b>
3.1. DEFINITIONS.....	29
3.2. L'ABSORPTION DES ISOFLAVONES .....	29
3.2.1. <i>Les hydrolyses pré-intestinales</i> .....	29
3.2.2. <i>L'absorption intestinale : définition</i> .....	30
3.2.3. <i>Les processus d'hydrolyse des formes glycosilées au niveau intestinal</i> .....	30
3.2.4. <i>L'intestin est également un site de conjugaison pour les isoflavones</i> .....	31
3.2.5. <i>Les paramètres pharmacocinétiques associés à l'absorption des isoflavones</i> .....	32
3.3. LE METABOLISME HEPATIQUE DES ISOFLAVONES .....	32
3.3.1. <i>Les biotransformations hépatiques des isoflavones lors des réactions de phase I</i> .....	32
3.3.2. <i>Les biotransformations hépatiques des isoflavones lors des réactions de phase II</i> .....	33
3.3.3. <i>Le foie est également un site de déconjugaison</i> .....	34
3.4. LES BIOTRANSFORMATIONS DES ISOFLAVONES PAR LA MICROFLORE INTESTINALE.....	34
3.4.1. <i>Le rôle de la microflore intestinale</i> .....	34
3.4.2. <i>L'action de la microflore intestinale : hydrolyse des formes conjuguées</i> .....	34
3.4.3. <i>Le cas particulier de la biotransformation de la daïdzéine en équol</i> .....	35
3.5. LE TRANSPORT DES ISOFLAVONES DANS LA CIRCULATION SYSTEMIQUE .....	36





3.5.1. Les métabolites circulants et le transport des isoflavones dans le sang.....	36
3.5.2. La distribution des isoflavones.....	37
3.6. L'ELIMINATION DES ISOFLAVONES.....	37
3.6.1. L'élimination biliaire des isoflavones.....	37
3.6.2. L'élimination urinaire des isoflavones.....	38
3.6.3. Les paramètres pharmacocinétiques associés à l'élimination des isoflavones.....	39
3.7. LES PROFILS PHARMACOCINETIQUES DES ISOFLAVONES.....	40
3.8. LES FACTEURS INFLUANT SUR LA BIODISPONIBILITE DES ISOFLAVONES.....	40
3.8.1. L'effet de la microflore intestinale.....	41
3.8.2. L'effet du genre.....	41
3.8.3. L'effet de l'âge.....	41
3.8.4. L'effet de l'exposition précoce au soja.....	42
3.8.5. L'effet de l'exposition chronique au soja.....	42
3.8.6. L'effet de la forme chimique ingérée.....	43
3.8.6.1. Daidzéine vs génistéine.....	43
3.8.6.2. Formes aglycones vs formes glycosilées.....	44
3.8.7. L'effet des matrices alimentaires.....	45
3.8.8. L'effet des régimes alimentaires.....	46
3.8.9. L'effet de l'appartenance à une ethnie.....	46
<b>4. LES EFFETS BIOLOGIQUES DES ISOFLAVONES.....</b>	<b>49</b>
4.1. LES EFFETS CELLULAIRES DES ISOFLAVONES.....	49
4.1.1. Les effets génomiques classiques.....	49
4.1.1.1. La liaison aux récepteurs aux œstrogènes.....	49
4.1.1.2. Interaction du complexe isoflavone-récepteurs aux œstrogènes avec les Estrogen Responsive Elements.....	49
4.1.1.3. Interaction avec les cofacteurs de transcription.....	50
4.1.1.4. Activité de transactivation des récepteurs aux œstrogènes induite par les isoflavones.....	50
4.1.2. Les effets non classiques, non génomiques des isoflavones.....	51
4.1.2.1. Les actions membranaires des isoflavones.....	51
4.1.2.2. Les actions cellulaires des isoflavones.....	51
4.2. LES EFFETS PHYSIOLOGIQUES DES ISOFLAVONES.....	52
4.2.1. Les isoflavones et les symptômes de la ménopause.....	52
4.2.2. Les isoflavones, la lipémie et les maladies cardiovasculaires.....	53
4.2.3. Les isoflavones et les cancers du sein et de l'endomètre.....	54
4.2.4. Les isoflavones et la cognition.....	56
<b>5. UN CAS PARTICULIER : LES EFFETS DES ISOFLAVONES SUR L'OS.....</b>	<b>58</b>
5.1. LE TISSU OSSEUX.....	58
5.1.1. Les fonctions physiologiques du tissu osseux.....	58
5.1.2. La composition du tissu osseux.....	58
5.1.2.1. L'ostéoïde.....	58
5.1.2.2. La phase minérale.....	59
5.1.3. Les cellules osseuses.....	59
5.1.3.1. Les ostéoclastes et la résorption osseuse.....	59
5.1.3.2. Les ostéoblastes et la formation osseuse.....	60
5.1.4. Le remodelage osseux.....	61
5.2. LES ŒSTROGENES ET LE TISSU OSSEUX.....	62
5.3. LES ISOFLAVONES ET L'OSTEOPOROSE.....	64
5.3.1. Les études épidémiologiques.....	64
5.3.2. Les études cliniques.....	65
5.3.3. Les études chez l'animal.....	67
5.3.3.1. Les études sur modèles simiens.....	67
5.3.3.2. Les études sur modèles murins.....	67
5.3.4. Les études in vitro.....	68
5.3.4.1. Les études sur ostéoclastes.....	68
5.3.4.2. Les études sur ostéoblastes.....	69
<i>Matériel et Méthodes.....</i>	<i>72</i>
<b>1. LE DOSAGE DES ISOFLAVONOÏDES DANS LES ALIMENTS, COMPLEMENTS ALIMENTAIRES ET FLUIDES BIOLOGIQUES.....</b>	<b>72</b>



1.1. LA DIGESTION ET L'EXTRACTION DES ISOFLAVONES .....	72
1.1.1. Préparation des échantillons alimentaires et biologiques.....	72
1.1.2. Digestion enzymatique.....	72
1.1.3. L'extraction des isoflavones .....	73
1.2. L'ENZYME LINKED IMMUNO SORBENT ASSAY (ELISA).....	73
1.2.1. Le coating.....	74
1.2.2. La saturation .....	74
1.2.3. La compétition .....	74
1.2.4. L'anticorps secondaire.....	75
1.2.5. La révélation.....	75
1.3. LES CARACTERISTIQUES TECHNIQUES DE CE DOSAGE.....	76
1.4. LES TAMPONS UTILISES AU COURS DU DOSAGE ELISA DES ISOFLAVONES .....	76
<b>2. LES EXPERIENCES IN VITRO .....</b>	<b>77</b>
2.1. LE MATERIEL D'ETUDE .....	77
2.1.1. Le matériel biologique, les cellules MG-63.....	77
2.1.2. Les produits chimiques .....	77
2.2. LA CULTURE CELLULAIRE .....	77
2.2.1. Les milieux de culture et expérimentaux.....	77
2.2.2. L'entretien et la congélation des cellules .....	78
2.3. LA MESURE DE LA PROLIFERATION .....	78
2.4. LA MESURE DE L'ACTIVITE PHOSPHATASE ALCALINE OSSEUSE .....	78
2.5. LA MESURE DE LA MINERALISATION .....	79
2.6. LES WESTERN BLOTS DES RECEPTEURS AUX OESTROGENES.....	79
2.6.1. L'obtention des fractions cellulaires .....	79
2.6.2. La séparation des protéines et immunoblotting.....	79
2.7. L'ANALYSE STATISTIQUE .....	80
 <i>Résultats.....</i>	 <i>81</i>
<b>1. UNE ETUDE DE BIOEQUIVALENCE DES ISOFLAVONES DE DEUX FORMULATIONS DE COMPLEMENTES ALIMENTAIRES A BASE DE SOJA, PHYTOSOYA® .....</b>	<b>81</b>
1.1. CONTEXTE DE L'ETUDE .....	82
1.2. RESUME ET INTERET DE L'ETUDE .....	82
1.3. BIOAVAILABILITY AND URINARY EXCRETION OF ISOFLAVONES IN HUMANS: EFFECTS OF SOY-BASED SUPPLEMENTS FORMULATION AND EQUOL PRODUCTION .....	83
1.4. RESULTATS COMPLEMENTAIRES .....	104
<b>2. L'EFFET DE LA MATRICE ALIMENTAIRE SUR LA BIODISPONIBILITE DES ISOFLAVONES DE SOJA : UN COMPLEMENT ALIMENTAIRE VS UN FROMAGE A BASE DE SOJA .....</b>	<b>105</b>
2.1. CONTEXTE DE L'ETUDE .....	106
2.2. RESUME ET INTERET DE L'ETUDE .....	106
2.3. HIGHER BIOAVAILABILITY OF ISOFLAVONES AFTER A SINGLE INGESTION OF A SOY-BASED SUPPLEMENT THAN A SOY-BASED FOOD IN YOUNG HEALTHY MALES.....	107
<b>3. LES EFFETS DE L'APPARTENANCE A UNE ETHNIE ET DU CONTEXTE ALIMENTAIRE SUR LA BIODISPONIBILITE DES ISOFLAVONES DE SOJA, APRES UNE EXPOSITION UNIQUE OU PROLONGEE AU SOJA .....</b>	<b>135</b>
3.1. CONTEXTE DE L'ETUDE .....	136
3.2. RESUME ET INTERET DES ESSAIS CLINIQUES .....	137
3.3. INFLUENCE OF ETHNIC ORIGIN: ASIAN VS CAUCASIAN, AND BACKGROUND DIETARY HABITS ON THE BIOAVAILABILITY OF ISOFLAVONES .....	138
<b>4. L'EFFET DES ISOFLAVONES DE SOJA ET DE L'EQUOL SUR LA DIFFERENCIATION OSTEOBLASTIQUE : UNE ETUDE IN VITRO.....</b>	<b>164</b>
4.1. CONTEXTE DE L'ETUDE .....	165
4.2. RESUME ET INTERET DE L'ETUDE .....	165
4.3. EQUOL-INCREASED ALKALINE PHOSPHATASE ACTIVITY IS MEDIATED THROUGH ESTROGEN RECEPTORS IN MG-63, A HUMAN OSTEOSARCOMA CELL LINE.....	166
4.4. RESULTATS COMPLEMENTAIRES .....	187



<i>Discussion générale</i> .....	188
<b>1. LA BIODISPONIBILITE DES ISOFLAVONES</b> .....	<b>188</b>
<b>2. LES EFFETS DES ISOFLAVONES SUR DES SYSTEMES BIOLOGIQUES OSSEUX</b> .....	<b>194</b>
<i>Conclusion et Perspectives</i> .....	197
<i>Références</i> .....	199



# Avant Propos

« Scribitur ad narrandum, non ad probandum. »





« Au cours de la décennie écoulée, les progrès rapides accomplis dans plusieurs domaines scientifiques pertinents, en particulier dans la quantité de données épidémiologiques tirées de la population, ont aidé à clarifier le rôle du régime alimentaire dans la lutte contre la mortalité prématurée due à des maladies non transmissibles. On a aussi repéré certains des éléments tenant spécifiquement au régime alimentaire qui augmentent la probabilité de voir apparaître ces maladies chez des individus. »

*Rapport d'experts sur le régime alimentaire*

Organisation Mondiale de la Santé

Genève, Suisse, 2002.



L'histoire de la domestication et de la dissémination du soja n'est que partiellement décrite. D'après les écrits laissés par des autorités religieuses ou politiques, suffisamment d'informations convergent pour permettre aux historiens d'établir les grandes étapes de la dissémination du soja à travers le monde. Le berceau de la domestication du soja serait une région au Nord-Est de la Chine au 11<sup>ème</sup> siècle Av. JC, même si des écrits plus anciens comme le « *Materia Medica* » de l'empereur Shen Nung datent les premières utilisations thérapeutiques du soja vers -2 859 av. JC. Utilisé dès le début dans les rotations culturales pour fixer l'azote dans le sol, le soja ne peut être consommé (par l'Homme ou l'animal) qu'après avoir subi divers procédés technologiques (trempage, fermentation ...) permettant de le débarrasser des facteurs anti-nutritionnels qu'il contient. Au premier siècle de notre ère, le soja est disséminé hors de Chine, *via* les routes commerciales et les grandes voies migratoires humaines de l'époque. Le soja se cultive alors au Japon, en Indonésie, aux Philippines, au Vietnam, en Thaïlande, en Malaisie, au Népal et dans le nord de l'Inde. Le soja entre dans la cuisine traditionnelle asiatique où il est présenté, à table, dans une large gamme de produits dérivés.

Le soja est introduit au milieu du XVIII<sup>ème</sup> siècle en Europe puis en Amérique, où il n'est d'abord qu'une curiosité botanique. Au fil du temps, les recherches et découvertes agronomiques ont alors permis de généraliser la culture de nouvelles variétés de soja au sein de chaque pays. De plus, de nouveaux procédés technologiques de transformation, dans les industries agro-alimentaires ou les laboratoires pharmaceutiques, permettent aujourd'hui une utilisation importante du soja en alimentation animale et en nutrition humaine. Tous les procédés actuels visent à débarrasser le soja de ses principaux facteurs anti-nutritionnels, mais pas forcément de ses isoflavones.

Les études épidémiologiques réalisées dans les années 1990 montrent une moindre incidence des maladies dégénératives associées au vieillissement dans les contrées asiatiques. On associe alors rapidement cet état de fait avec l'alimentation traditionnelle asiatique et notamment la consommation de soja. De nouvelles études épidémiologiques viennent ensuite étayer l'argument d'une protection par l'alimentation. Ces études étaient menées chez des femmes, d'origine asiatique, qui migrent aux USA et qui, par là-même, occidentalisent leur mode de vie, en particulier leur alimentation. Les femmes de deuxième génération perdent leur relative protection vis-à-vis des maladies dégénératives, alors que leurs compatriotes restées en Asie la conservent.



Bien qu'aujourd'hui ces études soient encore très citées pour démontrer le rôle prépondérant des facteurs environnementaux dans la survenue de pathologies comme les cancers et l'ostéoporose, les études épidémiologiques soulèvent d'importants débats. En effet, aucune étude nutritionnelle n'a clairement démontré, à ce jour, le rôle joué par les différents composés de l'alimentation (les fibres, les polyphénols, les acides gras de la famille des oméga 3 ...) et notamment celui du soja, dans la prévention de ces pathologies.

Malgré l'absence de preuves irréfutables des bienfaits du soja pris isolément et l'assimilation des phyto-œstrogènes à des perturbateurs endocriniens responsables d'effets néfastes observés chez les animaux, les phyto-œstrogènes, en particulier les isoflavones de soja, jouissent aujourd'hui d'une incroyable popularité. Quatre raisons peuvent expliquer ce succès : (1) les études démontrant les risques du traitement hormonal substitutif américain sur les maladies cardiovasculaires et les cancers du sein, (2) la médiatisation des bienfaits du régime alimentaire asiatique, (3) l'origine naturelle du soja et (4) l'accès de ces produits, en vente libre, sur le marché. En effet, les produits alimentaires à base de soja réservés à l'alimentation sont disponibles dans le commerce sous la forme de préparations alimentaires dérivés du soja ou sous la forme de compléments alimentaires à base de soja, commercialisés par des laboratoires pharmaceutiques le plus souvent.

Face à l'augmentation significative de la consommation de soja et de ses produits dérivés, face également aux questionnements des médecins sur l'efficacité et les effets des compléments alimentaires à base de phyto-œstrogènes sur la santé humaine, les autorités publiques françaises ont réuni un groupe de travail AFSSA - AFSSAPS (Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments - Agence Française de Sécurité Sanitaire des Produits de Santé) pour évaluer les conséquences de la consommation de phyto-œstrogènes en France.



La première partie de ce manuscrit synthétise les données actuelles concernant les isoflavones de soja, leur biodisponibilité et leurs effets sur la physiologie humaine, en particulier leurs effets sur le tissu osseux. Le premier chapitre rappelle des données sur les œstrogènes endogènes. Il permettra d'abord de situer le contexte d'étude de ces travaux de thèse, puis de corrélérer les effets physiologiques des œstrogènes avec ceux des isoflavones.

La seconde partie présente le matériel et les méthodes utilisés pour la réalisation de ce travail. Une troisième partie présente l'ensemble des résultats cliniques obtenus sur la biodisponibilité des isoflavones, ainsi que les résultats issus d'études *in vitro* présentant les effets des isoflavones sur la différenciation de cellules osseuses. Enfin, la dernière partie de ce manuscrit est une discussion de ce travail focalisée sur la relation entre les doses ingérées, les doses circulantes et les effets physiologiques des isoflavones.

Cette thèse a été financée par les laboratoires pharmaceutiques Arkopharma, dans le cadre d'une Convention Industrielle de Formation par la Recherche (CIFRE) N°856/2003, et réalisée à l'Unité Micronutriments Reproduction Santé (UMRS) de l'Ecole Nationale des Ingénieurs des Travaux Agricoles de Bordeaux (ENITAB) et au Laboratoire Nutrition et Sécurité Alimentaire (LNSA) de l'Institut National de la Recherche Agronomique (INRA) de Jouy-en-Josas.

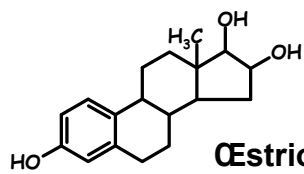




# Introduction bibliographique

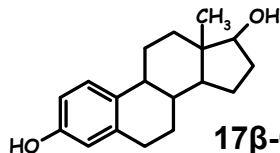
« En ces temps, époque lointaine, merveilleuse... »

Charles Callet



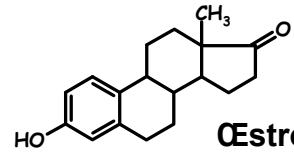
**Œstriol**

MM = 288,4 g.mol<sup>-1</sup>



**17β-Œstradiol**

MM = 272,4 g.mol<sup>-1</sup>



**Œstrone**

MM = 270,4 g.mol<sup>-1</sup>

*Figure 1. Structures chimiques des œstrogènes endogènes*

# 1. Les œstrogènes endogènes

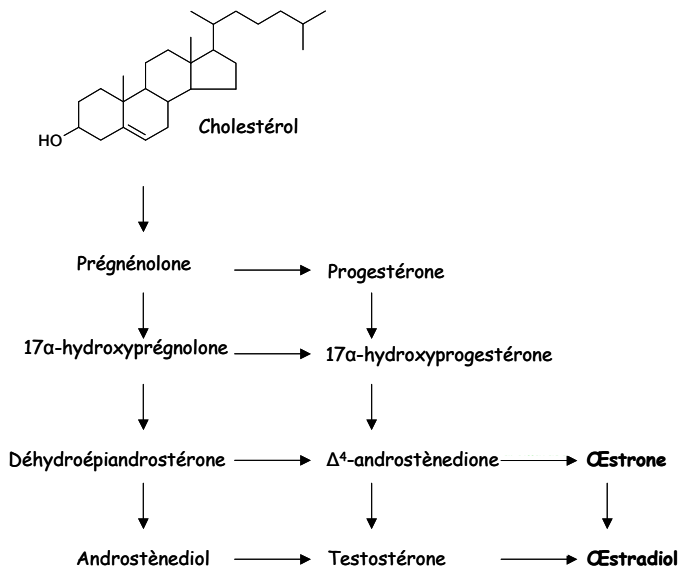
## 1.1. Définitions et historique

Les hormones sont des substances chimiques messagères de l'organisme, qui assurent la transmission d'informations et participent à la régulation des fonctions organiques et des processus métaboliques. Les hormones sont synthétisées par les glandes endocrines au sein de cellules spécialisées, elles sont sécrétées par diffusion, puis sont distribuées dans l'organisme par voie circulatoire. Selon des critères biochimiques, on distingue trois groupes différents : (1) les hormones peptidiques et glycoprotéiques, parmi lesquelles on trouve les hormones hypothalamiques, la parathormone, la calcitonine et les hormones pancréatiques comme l'insuline et le glucagon, (2) les hormones dérivées d'acides aminés comme les hormones thyroïdiennes, les cathécholamines (noradrénaline et adrénaline) ainsi que l'histamine et la sérotonine, et (3) les hormones stéroïdiennes subdivisées elles-mêmes en trois catégories : les glucocorticoïdes, les minéralocorticoïdes et les hormones sexuelles (Valloton, 1983).

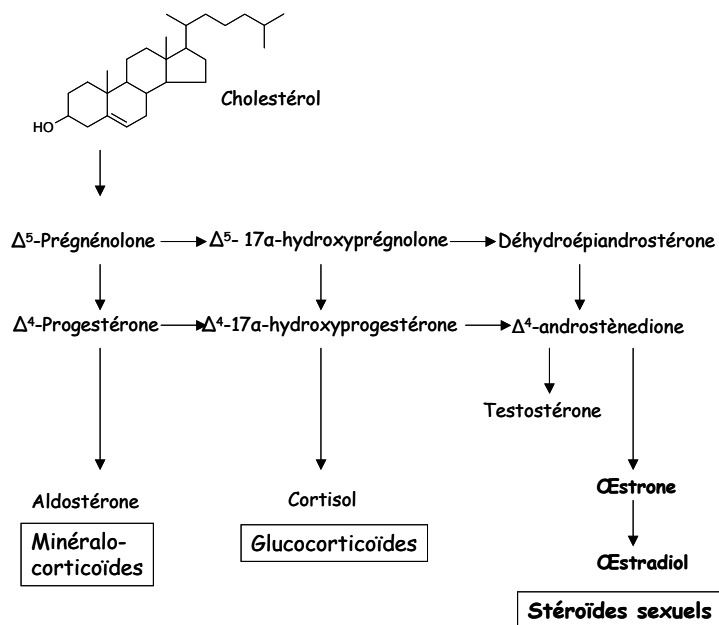
Les œstrogènes appartiennent à la famille des hormones stéroïdiennes sexuelles et sont définis d'après Duax & Weeks comme des composés capables d'induire directement chez l'animal une réaction d'utérutrophie (Duax et Weeks, 1980). Cette définition a ensuite été revue par Mc Lachlan, en 1984 (McLachlan *et al.*, 1984), qui introduit la notion de pro-œstrogène, soit une molécule susceptible d'induire une utérutrophie après transformation métabolique notamment au niveau de l'intestin et/ou du foie. Aujourd'hui, la définition a encore évolué avec l'avènement de la biologie moléculaire : on appelle œstrogène, toute substance capable d'induire la transcription d'un gène cible dépendant d'une séquence promotrice contenant un Estrogen Responsive Element (ERE). Par exemple, des modèles de levures transfectées avec des constructions codant pour la luciférase permettent de déterminer l'œstrogénicité de différentes molécules. Cependant la notion de pro-œstrogène continue à être prise en compte grâce aux tests *in vitro* sur hépatocytes de poisson (Petit *et al.*, 1997).

## 1.2. Les voies de synthèse des œstrogènes et les molécules œstrogéniques

Les œstrogènes sont des stéroïdes comportant 18 atomes de carbone, dont le noyau A du cycle pentanophénanthrénique est phénolique. Trois types d'œstrogènes sont sécrétés : l'œstrone ( $E_1$ ), l'œstradiol ( $E_2$ ) comportant un hydroxyle en position  $17\beta$  supplémentaire par rapport à l'œstrone, et enfin l'œstriol ( $E_3$ ) avec deux groupements supplémentaires en positions  $17\beta$  et 16 (*Figure 1*).



***Figure 2. Métabolisme des stéroïdes au niveau des gonades***



***Figure 3. Métabolisme des stéroïdes au niveau des cortico-surrénales***

Les œstrogènes et les hormones stéroïdiennes de façon plus générale, dérivent du cholestérol, qui est une molécule synthétisée principalement dans le foie à partir de l'acétyl-CoA. Le cholestérol est transporté par les lipoprotéines vers les glandes endocrines, où il est mis en réserve, puis utilisé pour la synthèse des hormones stéroïdiennes (Borel *et al.*, 1997). Les différentes étapes de la synthèse des œstrogènes au niveau ovarien sont représentées en *figure 2*. Ces étapes nécessitent l'intervention d'enzymes spécifiques, tels que des desmolases, des hydrogénases et des aromatasés.

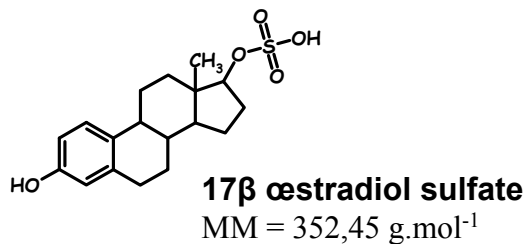
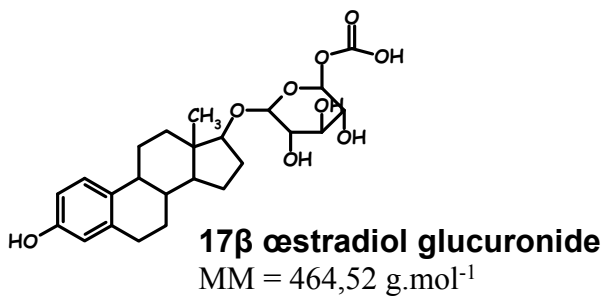
Chez les femmes pré-ménopausées, la synthèse des œstrogènes a lieu principalement dans les ovaires. L'E<sub>2</sub> est produit essentiellement par conversion enzymatique des androgènes (androstènedione et testostérone). Les androgènes sont produits par les cellules de la thèque entourant le follicule et leur conversion en E<sub>2</sub> a lieu dans les cellules de la granulosa du follicule grâce à une activité aromatasé. Ainsi, les concentrations circulantes en E<sub>2</sub> varient selon le moment du cycle ovarien : de 10 pg.mL<sup>-1</sup> en phase folliculaire précoce jusqu'à 500 pg.mL<sup>-1</sup> au moment de l'ovulation. Les glandes cortico-surrénales sont également responsables de la synthèse d'une partie des œstrogènes (*Figure 3*).

Chez les femmes post-ménopausées et les hommes, des œstrogènes sont également synthétisés, par aromatisation locale, au niveau d'autres sites de synthèse. Ce sont notamment les cellules mésenchymateuses du tissu adipeux, y compris celui du sein, les cellules de type chondroblastique, l'endothélium des vaisseaux, les cellules du muscle lisse aortique et divers noyaux cérébraux (Simpson, 2003). Les œstrogènes synthétisés dans ces différents sites sont destinés à agir à un niveau très local. S'ils échappent au catabolisme, ils passent alors dans la circulation, mais les doses circulantes atteintes sont de l'ordre de 10 pg.mL<sup>-1</sup>.

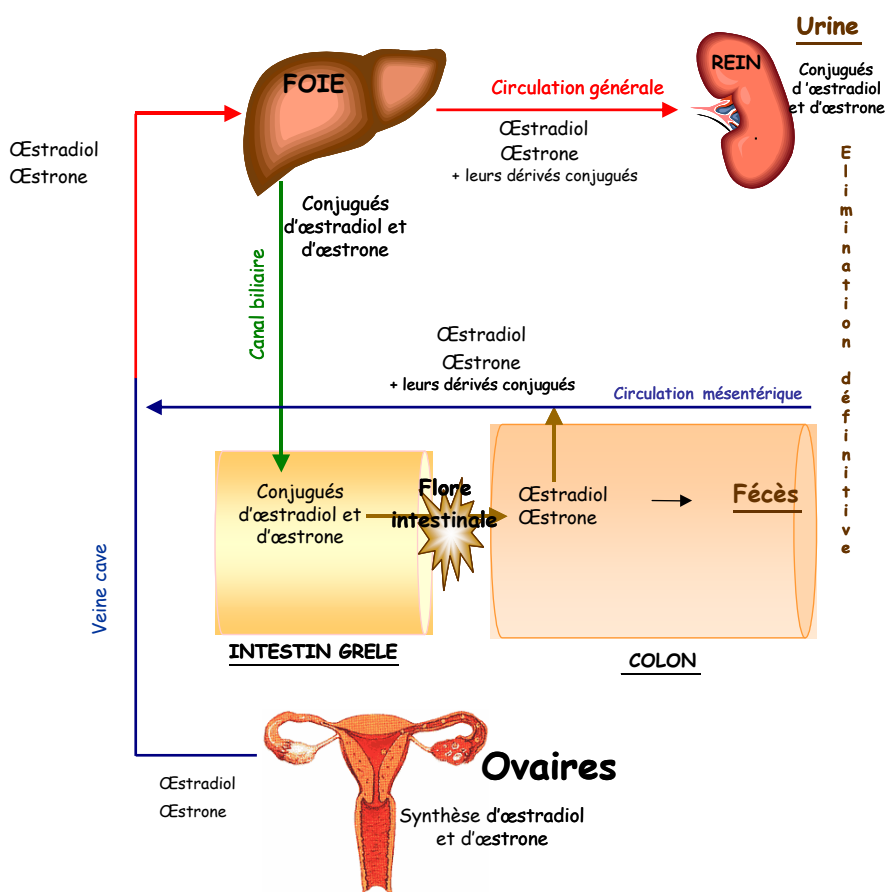
### **1.3. Le transport et le catabolisme des œstrogènes**

Les œstrogènes sont véhiculés au niveau sanguin sous forme sulfatée ou glucuronidée (60 %), liés spécifiquement à la Steroid Hormone Binding Globulin (SHBG) (20 %), de manière non spécifique à des protéines plasmatiques comme l'albumine (≈ 15 %) ou enfin sous forme libre (< 3 %) (Borel *et al.*, 1997 ; Nagel *et al.*, 1998).

Les œstrogènes, molécules lipophiles, doivent être métabolisés en composés hydrophiles pour être facilement éliminés dans la bile et les urines. Les métabolites sont moins actifs, voire inactifs, par rapport aux molécules originelles. Le catabolisme des œstrogènes s'effectue principalement au niveau du foie, en trois étapes successives ; ce sont les réactions de phase I, II et III. La phase I regroupe le plus souvent des réactions d'oxydation conduisant à la formation de dérivés hydroxylés. L'E<sub>2</sub> peut être métabolisé en E<sub>1</sub>



**Figure 4. Métabolites glucuro- et sulfo-conjugués de l'œstradiol**



**Figure 5. Production des œstrogènes conjugués et leur devenir dans l'organisme**

de manière réversible. L'E<sub>1</sub> est un carrefour métabolique pouvant orienter le métabolisme de l'E<sub>2</sub> vers deux voies principales irréversibles : une voie qui conduit au 16-hydroxyœstrone puis à l'E<sub>3</sub> et une voie qui conduit au 2-hydroxyœstrone puis au 2-méthoxyœstrone après réaction de phase II. Les réactions de phase II permettent des conjugaisons, principalement à des groupements glucuronides et sulfates *via* des uridine diphosphate glucuronosyl-transférases (UDPG-T) et des sulfotransférases (SULT), respectivement (*Figure 4*) (Mauvais-Charvis *et al.*, 1983). Enfin, les réactions de phase III correspondent à l'excrétion cellulaire des métabolites formés lors des phases I et II. Ces métabolites étant trop hydrophiles pour diffuser passivement à travers la membrane cellulaire, un mécanisme de transport actif est utilisé empruntant des transporteurs spécifiques. L'excrétion cellulaire d'E<sub>2</sub> se fait grâce à des protéines appartenant à la famille des ATP-binding cassette transporters (transporteurs ABC), en particulier les protéines Multidrug Resistance (Pgp-MDR) et MRP.

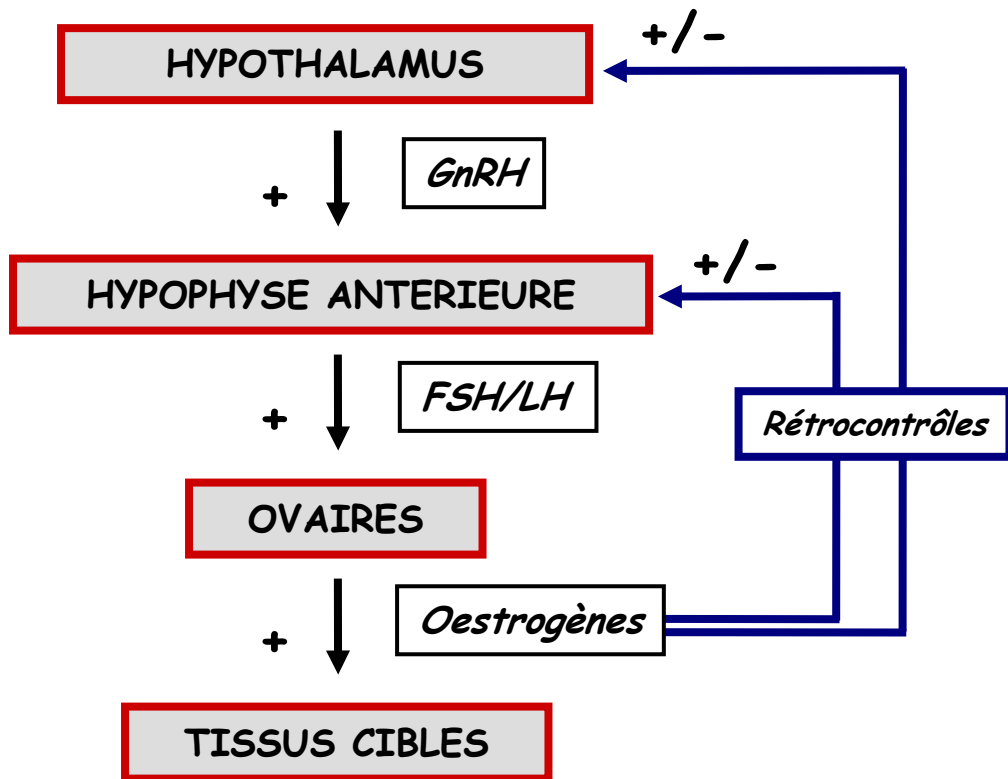
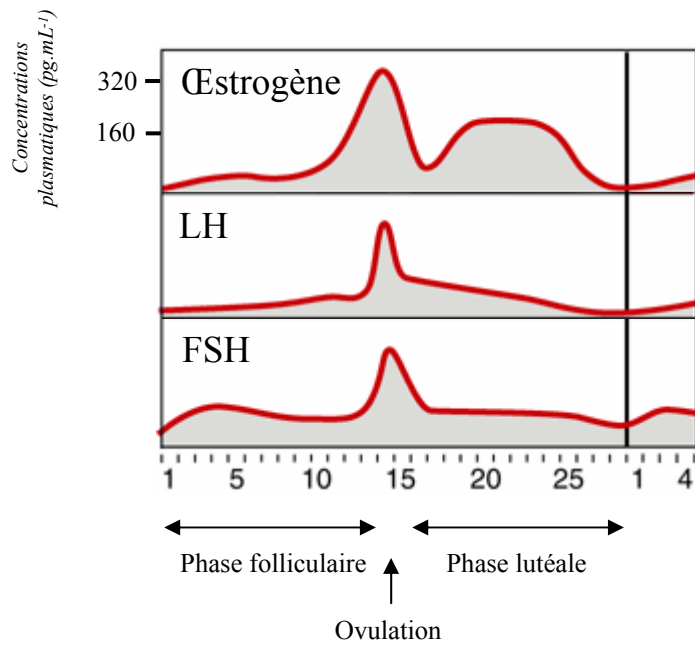
Seul 1/5<sup>ème</sup> des molécules d'œstrogènes conjuguées est éliminé par voie biliaire. Une fraction des œstrogènes conjugués déversés par la bile dans l'intestin grêle, peut être de nouveau réabsorbée, après hydrolyse des molécules conjuguées par les glycosidases de la bordure en brosse entérocytaire ou de la microflore intestinale et retourner au foie : il s'agit là d'une recirculation entérohépatique (*Figure 5*). Historiquement, on pensait que seule la conjugaison des œstrogènes correspondait à la voie d'inhibition et d'élimination de ces molécules. Or, il est maintenant établi que les œstrogènes sulfates ont une demi-vie plus longue que celle des molécules natives. Ainsi, les phénomènes de conjugaison et de déconjugaison des œstrogènes pourraient représenter un mécanisme de régulation de l'activité œstrogénique *via* une modification de leur biodisponibilité.

Enfin, une partie du catabolisme des œstrogènes s'effectue au niveau du foie et de l'utérus, où les molécules d'E<sub>1</sub> et d'E<sub>2</sub> sont oxydées en E<sub>3</sub>.

## **1.4. Les rôles physiologiques des œstrogènes**

### **1.4.1. Les œstrogènes et la fonction de reproduction**

Les œstrogènes sont impliqués dans la régulation des cycles menstruels et peuvent, dans ce cadre, moduler la sécrétion des hormones du système hypothalamo-hypophysaire. Ils appartiennent ainsi à une boucle de régulation hormonale dont la finalité est de contrôler la propre sécrétion des œstrogènes. En effet, selon leurs concentrations plasmatiques, les œstrogènes peuvent effectuer un rétro-contrôle négatif de la sécrétion des hormones hypophysaires, Follicular Stimulating Hormone (FSH) et Luteinising Hormone (LH), ainsi



*Figure 6. Les œstrogènes et les cycles menstruels*



qu'un rétrocontrôle positif des hormones hypothalamiques, les Gonadotropin Releasing Hormones (GnRH) (*Figure 6*).

Le rôle majeur des œstrogènes s'exerce sur la fonction de reproduction : ils participent activement à toutes les étapes de la reproduction. Les œstrogènes jouent d'abord un rôle important dans le développement des caractères sexuels primaires et secondaires de la femme. Les œstrogènes sont impliqués dans la maturation du follicule ovarien et la prolifération des muqueuses utérine et vaginale. Ils favorisent le développement des grandes et des petites lèvres, l'élargissement gynoïde du bassin, la répartition du tissu adipeux et le développement des glandes mammaires (Sizomenko, 1983).

D'autre part, les œstrogènes modifient la consistance de la glaire cervicale et favorisent ainsi la migration, la progression et la survie des spermatozoïdes dans le tractus génital féminin. Ils participent à la préparation de l'endomètre à l'implantation de l'œuf et à la poursuite de la gestation (Psychoyos, 1983).

Enfin, les œstrogènes sont impliqués dans la parturition, en augmentant la capacité de contraction du myomètre et la sensibilité à l'ocytocine. Ils jouent également un rôle dans la lactation en stimulant la sécrétion de prolactine et la croissance des canaux galactophores (Psychoyos, 1983).

#### **1.4.2. Les œstrogènes sont doués de nombreux autres effets physiologiques**

Dans le cadre des actions métaboliques, les œstrogènes sont impliqués dans la régulation du tissu osseux. Pour des raisons de clarté, cette partie sera traitée de façon plus détaillée dans le chapitre 6 de cette introduction bibliographique. D'autre part, les œstrogènes régulent et sont impliqués dans de nombreux effets physiologiques.

Les œstrogènes peuvent influencer sur la prise alimentaire et le bilan énergétique. Ils induisent une augmentation du tissu adipeux en augmentant les concentrations de triglycérides, de Very Low Density Lipoproteins (VLDL) et de High Density Lipoproteins (HDL). Ils augmentent également le catabolisme des Low Density Lipoproteins LDL (Sacks et Walsh, 1994). Ainsi, il leur serait attribué un rôle protecteur contre les maladies cardiovasculaires par une action indirecte sur la régulation de la lipémie.

Toutefois, les œstrogènes exercent aussi un rôle direct sur le système cardiovasculaire. En effet, ils sont actifs à la fois sur les cellules musculaires lisses qui entourent les vaisseaux et sur les cellules endothéliales. L'administration d'œstrogènes induit une vasodilatation due en partie à l'augmentation de la biodisponibilité en monoxyde d'azote (NO). Les œstrogènes

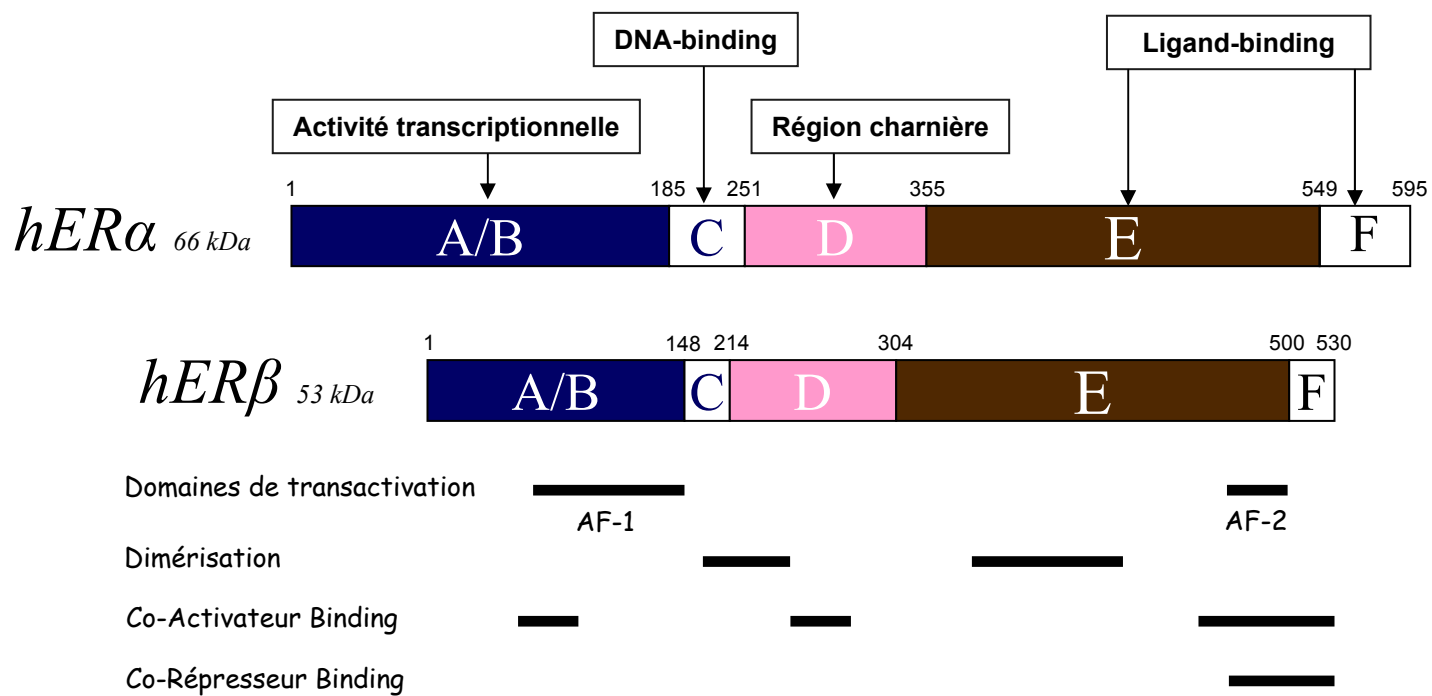


Figure 7. Structure des récepteurs aux œstrogènes

sont, en effet, impliqués dans la régulation de la synthèse en NO au niveau de l'endothélium vasculaire, en modulant la transcription et la traduction de la NO synthase, mais aussi les mécanismes de la dégradation du NO (Tostes *et al.*, 2003). D'autre part, il a été montré, *in vitro*, que les œstrogènes inhibent directement la contraction des cellules du muscle lisse en modulant les échanges ioniques intracellulaires (activation de l'efflux de potassium cellulaire et inhibition de l'influx de calcium) (Tostes *et al.*, 2003).

Les œstrogènes, aux concentrations circulantes lors d'un cycle (de 10 à 500 pg.mL<sup>-1</sup>) activent également la réponse immunitaire, humorale en particulier, et diminuent la susceptibilité aux infections (Cutolo *et al.*, 2006). En revanche, l'E<sub>2</sub> aux concentrations circulantes durant la gestation (10 000 à 30 000 pg.mL<sup>-1</sup>) préviennent le rejet de l'embryon et du fœtus. Les œstrogènes modulent donc de façon fine les réactions immunitaires selon des conditions physiologiques particulières comme la période du cycle, la prise de contraceptifs, la gestation ...

Les œstrogènes remplissent de nombreuses fonctions sur le système nerveux central. Ils sont, par exemple, impliqués dans le comportement sexuel et social. Plusieurs études ont également montré un effet bénéfique des œstrogènes sur l'anxiété et les symptômes associés à la dépression (Osterlund *et al.*, 2005). Les effets des œstrogènes sont également suggérés par la présence dans le cerveau de récepteurs spécifiques aux œstrogènes (McEwen et Alves, 1999).

## **1.5. Les modes d'actions des œstrogènes**

### **1.5.1. Les récepteurs aux œstrogènes**

En 1962, Jensen et Jacobson concluait à une liaison spécifique de l'E<sub>2</sub> au niveau de l'utérus et émettaient alors l'hypothèse de l'existence des récepteurs aux œstrogènes (ERs) (Jensen et Jacobson, 1962). En 1986, l'équipe de Pierre Chambon découvrait le premier ER (Green *et al.*, 1986). Il s'agit en fait de ER $\alpha$ , puisqu'en 1996, Kuiper et collaborateurs isolaient un second type de récepteur ER $\beta$  dans des cellules prostatiques murines (Kuiper *et al.*, 1996).

Les ERs appartiennent à la super famille des récepteurs nucléaires tout comme les récepteurs aux hormones thyroïdiennes, les récepteurs aux acides rétinoïques (RAR, RXR) ... Les ERs présentent une structuration modulaire avec différentes régions correspondant à des domaines fonctionnellement autonomes. Les ERs sont composés de 6 domaines notés de A à F (*Figure 7*). Les domaines A/B comportent un domaine avec une fonction de transactivation AF-1. Lorsque ce domaine est tronqué par mutation dirigée ou par épissage



alternatif, le récepteur peut faiblement induire les gènes œstrogéno-dépendants, même en l'absence de ligand, ce qui met en évidence son rôle clé dans le bon fonctionnement des ERs (Flouriot *et al.*, 2000). Le domaine C, ou DNA Binding Domain (DBD), est constitué d'une région très conservée d'une espèce à l'autre formée de deux doigts de zinc, qui permettent la liaison à l'ADN. Le domaine D est une région charnière impliquée dans la flexibilité de conformation, la localisation nucléaire et la dimérisation des ERs. Le Ligand Binding Domain (LBD) correspond aux domaines E et F. Il est constitué d'une poche hydrophobe dans laquelle viennent s'insérer les molécules d'œstrogènes (Duax et Weeks, 1980). Ce domaine est également impliqué dans la dimérisation, la translocation nucléaire, les interactions avec les Heat Shock Proteins (HSP). Il porte également le domaine de transactivation AF-2, responsable de l'activation transcriptionnelle induite par le ligand et du recrutement des facteurs de transcription.

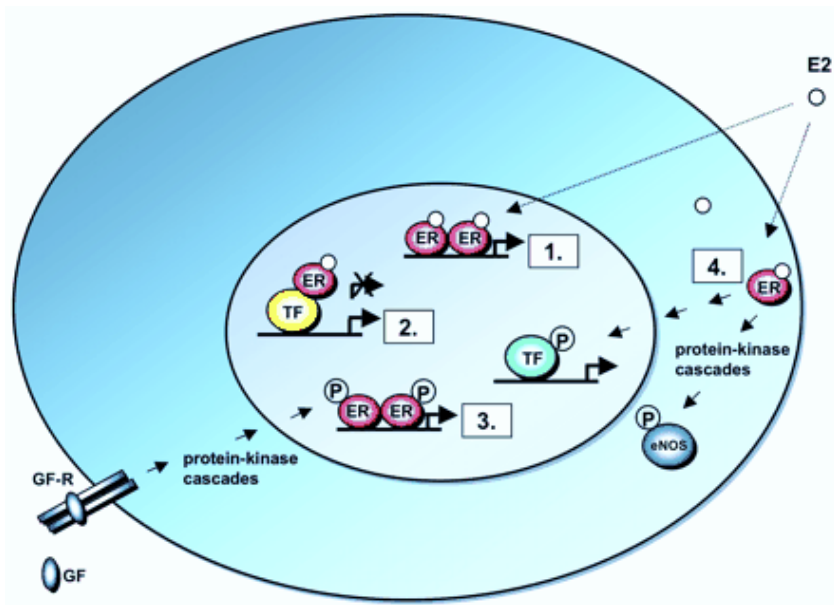
Le gène ESR1 code pour la protéine ER $\alpha$  et se trouve sur le chromosome 6. Le gène ESR2, qui code pour ER $\beta$ , se trouve sur le chromosome 14. Les deux protéines ne sont pas exprimées de la même façon dans tous les tissus (*Figure 8*). Bien que les ERs ne soient pas exprimés par les mêmes gènes, des convergences structurales et fonctionnelles existent entre eux. Le domaine C est ainsi le domaine le plus conservé et la séquence codante pour les deux doigts de zinc possède 97 % d'homologie entre ER $\alpha$  et ER $\beta$ . Le domaine A/B ne présente en revanche que 17 % d'homologie entre les ERs (Couse et Korach, 1999).

Il existe, d'autre part, plusieurs variants issus de la transcription du gène ER $\alpha$  et de l'épissage alternatif des ARNm qui en résulte. La plupart des variants sont traduits en la forme longue d'ER $\alpha$ , dite ER $\alpha$  66 en raison de son poids moléculaire (66 kDa). Toutefois, une autre isoforme a été isolée en 2000 ; il s'agit de la forme ER $\alpha$  46 dont la fonction de transactivation AF-1 est tronquée par rapport à ER $\alpha$  66 (Flouriot *et al.*, 2000). De la même façon, cinq isoformes d'ER $\beta$  ont été isolées, mais elles ne sont pas toutes fonctionnelles (Moore *et al.*, 1998).

L'action des œstrogènes endogènes est basée majoritairement sur le mécanisme de leur liaison aux ERs, entraînant une modification de l'expression des gènes : c'est la voie d'action génomique classique.

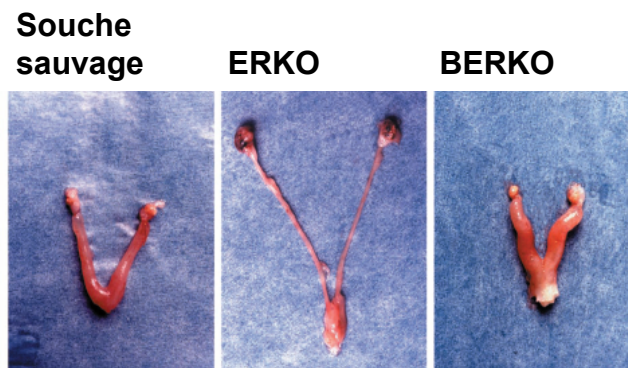
### **1.5.2. Mécanisme d'action génomique des œstrogènes**

En absence d'œstrogènes, les ERs sont liés à des protéines chaperonnes, les HSP. Les propriétés lipophiles des œstrogènes leur permettent de traverser la membrane plasmique des cellules. Une fois dans le cytoplasme, les œstrogènes se lient aux ERs, modifient leur



1. Voie génomique classique : l'E2 se fixe directement sur le promoteur ERE du gène cible
2. Voie ERE-indépendante : le complexe E2-ER joue le rôle d'un cofacteur
3. Voie E2-indépendante : ERs phosphorylés permettent la transcription du gène cible
4. Voie non génomique

***Figure 9. Les différentes actions de l'œstradiol via les ERs***  
 D'après Björnström *et al.*, 2005



***Figure 10. Analyse du tractus reproductif chez des rates femelles ERKO et BERKO***

D'après Curtis-Hewitt *et al.*, 2000

conformation par phosphorylation et libèrent ainsi les HSP (Wiegel, 1996). Cette liaison du ligand révèle un domaine d'adressage nucléaire sur le récepteur et le complexe ligand-récepteur est alors transloqué dans le noyau. Après dimérisation avec un autre complexe ligand-récepteur, il va pouvoir se fixer sur une séquence consensus palindromique (AGGTCAnnnTGACCT) d'ADN située au niveau du promoteur de certains gènes œstrogéno-dépendants : les ERE (*Figure 9*). De nombreux facteurs de transcription ajoutent un niveau de complexité et de régulation à ce processus : ce sont les co-activateurs ou co-répresseurs de transcription. Ces facteurs de transcription sont tissus-spécifiques et définissent le contexte cellulaire de l'action des œstrogènes.

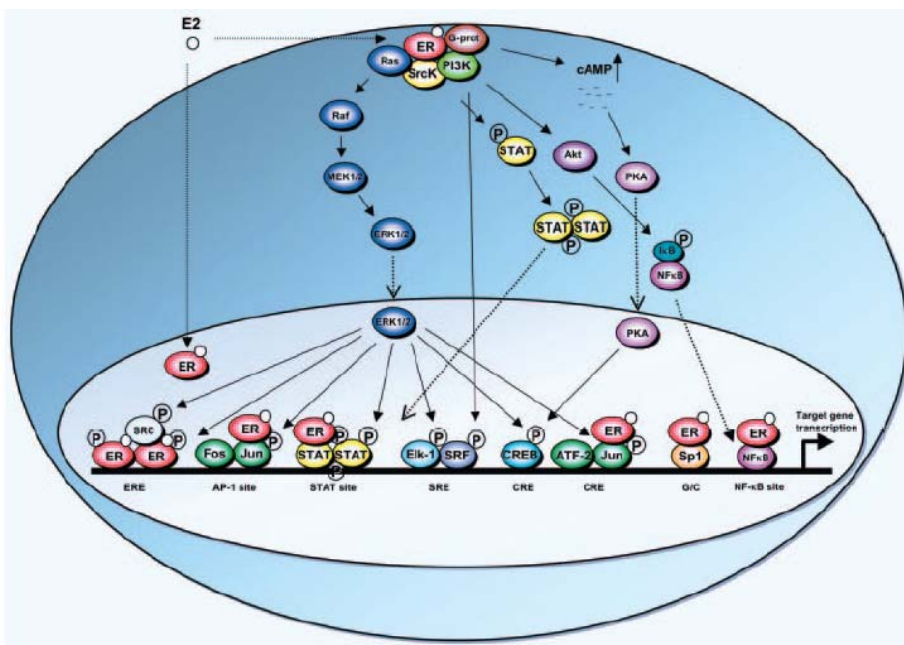
L'action génomique des œstrogènes est caractérisée par un délai spécifique de réponse, compris entre 2 et 8 h, ainsi qu'une sensibilité face à des inhibiteurs de la transcription (actinomycine D), de la traduction (cycloheximide). Enfin, l'ICI 182,780 est un anti-œstrogène de synthèse se liant de façon irréversible au récepteur et qui, en empêchant la liaison des œstrogènes aux ERs par inhibition compétitive, peut également inhiber la voie d'action génomique des œstrogènes.

### 1.5.3 La fonctionnalité des récepteurs aux œstrogènes

Les ER $\alpha$  et ER $\beta$  peuvent, en présence d'œstrogènes, activer la transcription de gènes rapporteurs sous le contrôle d'une région promotrice portant des ERE. Le rôle physiologique de ces ERs a pu être mis en évidence par la réalisation de modèles murins expérimentaux n'exprimant pas les ERs. Les phénotypes de souris, dont les gènes d'ER $\alpha$  (ERKO), d'ER $\beta$  (BERKO) ou pour les deux ERs (DERKO) sont délétés, ou « knocked out » (KO), suggèrent un rôle distinct pour chaque ER.

Chez la femelle, la stérilité des souris ERKO est due à une insensibilité de l'utérus aux effets de prolifération et de différenciation de l'E<sub>2</sub> (Couse et Korach, 1999 ; Lubahn *et al.*, 1993). Les structures du tractus reproductif sont normalement présentes chez les souris ERKO mais complètement immatures (*Figure 10*). Chez les BERKO, l'appareil reproducteur est fonctionnel et aucune différence dans l'anatomie du tractus reproductif, avec les souris normales ou « wild-type », n'est observable. La prolificité des animaux est toutefois moins importante chez les BERKO. Les souris femelles ERKO n'ont pas de développement pubertaire au niveau des glandes mammaires, alors que les souris BERKO présentent des glandes mammaires normales et fonctionnelles (Couse et Korach, 1999).

Enfin, il existe des différences notables dans l'anatomie du tissu osseux (les os sont plus courts, et plus fins chez les ERKO), au niveau du système cardiovasculaire (taux basal de



***Figure 11. Complexité d'action génomique et non génomique des œstrogènes***  
 D'après Björnström *et al.*, 2005



NO plus faible chez les ERKO) et au niveau des fonctions cérébrales (manque de perception chez les ERKO) (Curtis Hewitt *et al.*, 2000).

Dans certains cas, il a également été rapporté que des systèmes de compensation existaient lorsqu'un des ERs était délété. Bien que les ERs semblent être la voie privilégiée d'action des œstrogènes endogènes, d'autres effets des œstrogènes sont décrits, laissant présager l'existence d'un autre mécanisme : il peut s'agir d'une voie d'action non génomique.

#### **1.5.4. Les actions non génomiques des œstrogènes**

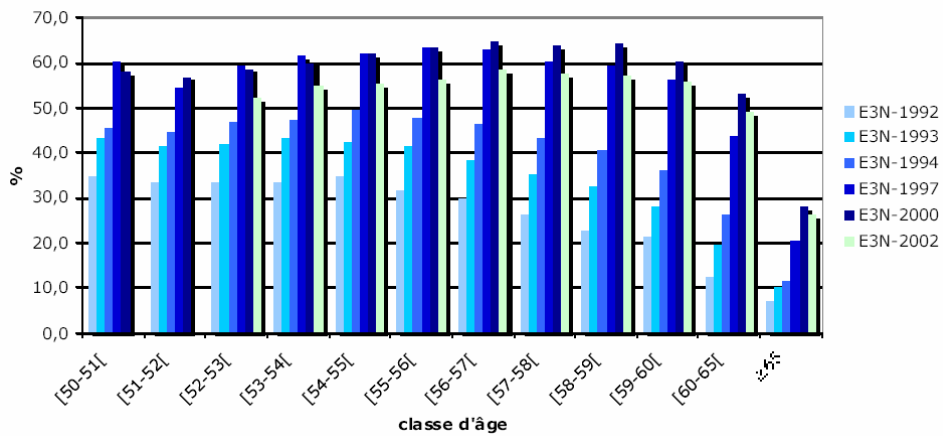
Ces effets sont caractérisés par une réponse très rapide, de l'ordre de la minute, voire de la seconde, et par une insensibilité aux divers inhibiteurs de la transcription, de la traduction ou même de la liaison aux ERs (Walsh *et al.*, 2005). Des actions non génomiques de l'E<sub>2</sub> ont été rapportées dans différentes lignées cellulaires et font intervenir notamment un changement de concentration intracellulaire en Ca<sup>2+</sup> (Doolan et Harvey, 2003 ; Lieberherr *et al.*, 1993) puis une cascade de phosphorylation au niveau du cytoplasme. La voie des enzymes de type Mitogen-Activated Protein Kinases (MAPK) est également impliquée : ERK1 (MAPK p44), ERK2 (MAPK p42) ... (Falkenstein *et al.*, 2000) (*Figure 11*). L'action non génomique des œstrogènes peut être démontrée par l'induction d'un effet œstrogénique d'un complexe formé par une molécule d'E<sub>2</sub> couplé à la BSA (Bovine Serum Albumin) (Beyer et Raab, 1998). La BSA est une protéine de 66,5 kDa dont le poids moléculaire empêche tout passage au travers de la membrane plasmique des cellules. Les actions non génomiques seraient médiées par un récepteur membranaire. Des expériences immunologiques montrent une structure très proche des ERs nucléaires (Watson *et al.*, 1999), toutefois la structure exacte du ER membranaire n'est pas encore élucidée.

Bien que ces actions soient encore moins décrites que les actions génomiques, elles semblent être impliquées dans une partie des effets physiologiques imputés aux œstrogènes.

### **1.6. Effets pharmacologiques des œstrogènes**

#### **1.6.1. La ménopause et l'utilisation d'œstrogènes à titre thérapeutique**

La ménopause est un stade physiologique normal caractérisé par une diminution de la sécrétion en œstrogènes et en progestérone consécutive à l'arrêt progressif du fonctionnement des ovaires. La ménopause résulte de l'épuisement progressif du capital des ovocytes formés pendant la vie fœtale : de 6-7 millions au 6<sup>ème</sup> mois de grossesse, ils ne sont plus qu'un million à la naissance, 300 000 à la puberté, et quelques centaines lorsque les règles



**Figure 12. Taux d'utilisatrices du THS chez les femmes ménopausées incluses dans la cohorte française E3N**

D'après le rapport de l'AFSSAPS sur les traitements hormonaux de la ménopause, 2005

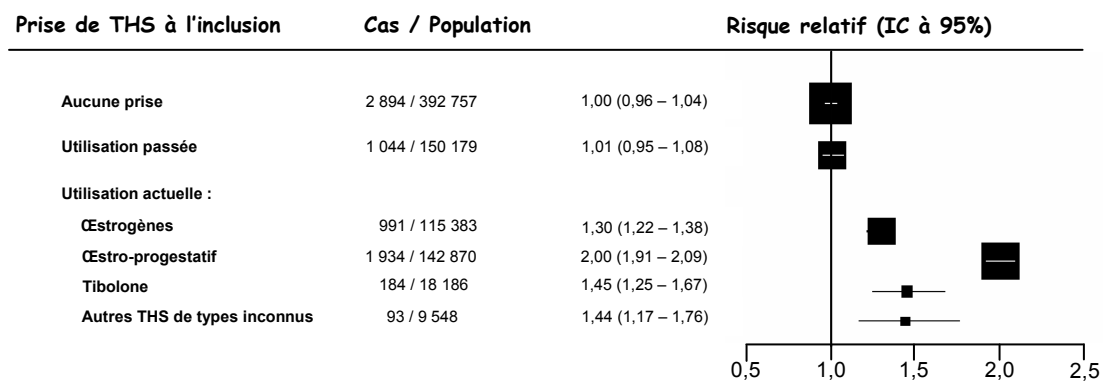
disparaissent (Netter, 1991). Actuellement plus de 10 millions de françaises sont ménopausées et entre 300 000 et 500 000 femmes entrent en ménopause chaque année.

Les conséquences physiologiques de la ménopause sont multiples. La carence hormonale engendrée est, en effet, responsable de symptômes divers comme les bouffées de chaleur, la sécheresse vaginale, la fatigue, une hyper nervosité, des insomnies ... La ménopause peut aussi être responsable de pathologies, à moyen et long termes comme l'ostéoporose, les maladies cardiovasculaires, et certains cas de cancers.

Le Traitement Hormonal Substitutif (THS) de la ménopause vise à compenser la carence en œstrogènes. En France, on utilise majoritairement l'E<sub>2</sub> de synthèse par voie orale ou par voie extra-digestive (transdermique ou nasale), et fréquemment, l'E<sub>2</sub> est associé à un progestatif (micronisé et de synthèse). Dans d'autres pays, aux USA en particulier, les œstrogènes utilisés sont plutôt des œstrogènes conjugués d'origine équine administrés par voie orale. Les schémas d'administration peuvent être continus ou cycliques pour l'E<sub>2</sub> et continus ou séquentiels pour la progestérone.

La prévalence d'utilisation du THS en France est représentée par la *figure 12*. Jusqu'à une période récente, le rapport entre les bénéfices et les risques des THS était considéré comme largement favorable, excepté dans les cas de contre-indications telles que les cas de cancers du sein connus ou suspectés, les cas d'autres cancers œstrogéno-dépendants, les antécédents d'accidents thrombo-emboliques veineux, les antécédents d'affection hépatique ... Les bénéfices potentiels comprenaient son efficacité dans le traitement des troubles du climatère, la prévention de l'ostéoporose et une prévention des accidents cardio-vasculaires (Alperovitch *et al.*, 2004). Les résultats d'études récentes de grande envergure ont remis en cause la balance bénéfices/risques des THS de la ménopause.

L'ensemble de ces analyses a permis de préciser les données d'utilisation : entre 20 et 25 % des femmes âgées de 40 à 65 ans prenaient un THS entre 2000 et 2002. Les estimations du nombre d'événements néfastes attribuables au THS sur une année, survenant chez les femmes âgées de 40 à 65 ans, représentent pour le cancer du sein entre 650 et 1 200 cas, soit 3 % à 6 % du total des cas de cancer du sein constatés, pour l'infarctus du myocarde, entre 60 et 200 cas, soit 2 % à 6 % du total des cas constatés et pour les accidents vasculaires cérébraux ischémiques, entre 300 et 650 cas soit 6,5 % à 13,5 % du total des cas constatés.



***Figure 13. Risque relatif de l'incidence de cancer invasif du sein en relation avec le type de THS utilisé***

D'après Beral *et al.*, 2003

## **1.6.2. Des études remettent en cause le traitement hormonal substitutif**

### **1.6.2.1. L'Heart and Estrogen/progestin Replacement Study I/II (HERS I/II)**

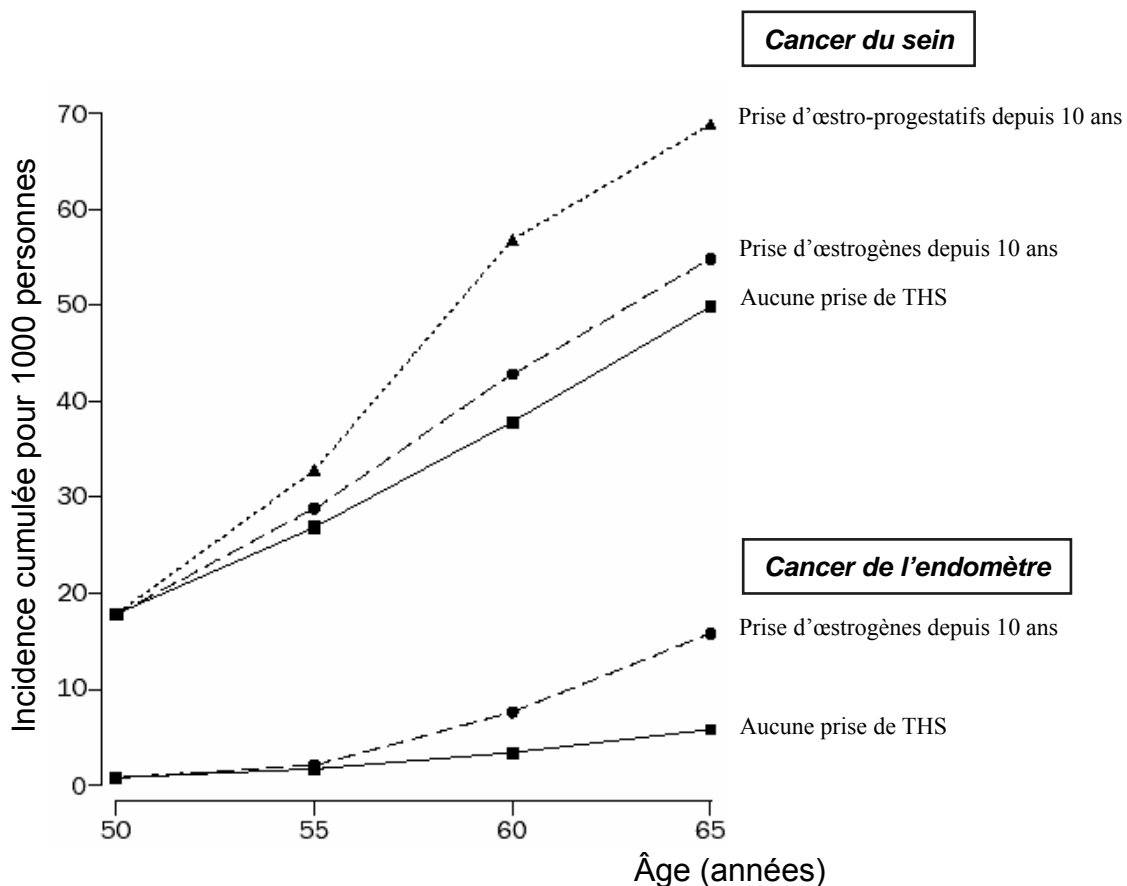
Le but de l'HERS I était de déterminer si le THS diminuait les risques de maladies cardiovasculaires (MCV) chez les femmes ménopausées avec des antécédents de maladies coronariennes (Hulley *et al.*, 1998). L'HERS II était une étude randomisée, en double aveugle, contre placebo dont la durée a été de 4,1 années. Les 2 763 femmes, incluses dans cette étude, recevaient un mélange œstro-progestatif (0,625 mg d'œstrogènes d'origine équine + 2,5 mg de medroxyprogestérone) ou le placebo. En dépit d'une nette diminution des taux de LDL (-11 % *vs* placebo) dès la première année de traitement et une augmentation des taux de HDL (+10 % *vs* placebo), le THS ne diminuait pas le risque d'incidents cardiovasculaires chez des femmes ayant déjà une maladie coronarienne. D'autre part, suite à une prise plus longue de ce même THS (au total 6,8 années), une augmentation des risques thrombo-emboliques veineux a été démontrée ; le risque relatif est de 2,08 (1,28 - 3,40 d'intervalle de confiance (IC) à 95 %) (Hulley *et al.*, 2002).

### **1.6.2.2. La Women's Health Initiative (WHI)**

Rossouw et collaborateurs ont mené la WHI dans le but de mesurer les bénéfices et les risques encourus lors d'une prise d'un mélange œstro-progestatif, couramment utilisé aux Etats-Unis (Rossouw *et al.*, 2002). Cette étude de prévention primaire incluait 16 608 femmes post-ménopausées dont l'âge variait entre 50 et 79 ans. Un premier groupe recevait 0,625 mg d'œstrogènes conjugués d'origine équine et 2,5 mg de médroxyprogestérone quotidiennement par voie orale. Le second groupe recevait un placebo. Les résultats étaient inattendus, dans la mesure où le conseil de suivi et d'éthique de la WHI a décidé d'arrêter l'étude après 5,2 années au lieu des 8,5 années initialement prévues. En effet, les risques de développer un cancer du sein et/ou les risques encourus de maladies cardiovasculaires devenaient plus importants dans le groupe de femmes sous THS avec des risques relatifs de 1,26 (1,00 - 1,59 d'IC à 95 %) et 1,29 (1,02 - 1,63 d'IC à 95 %), respectivement. L'index global de risques encourus était alors supérieur aux bénéfices.

### **1.6.2.3. La Million Women Study (MWS)**

L'étude prospective MWS visait à montrer les effets de certains THS spécifiques sur l'incidence des cancers du sein (Beral, 2003). Plus d'un million de femmes, âgées de 50 à 64 ans, ont participé à cette étude au Royaume-Uni. Plus de la moitié des volontaires utilisaient un THS au moment de leur recrutement. Durant les 2,6 premières années de suivi, 9 364 cas



**Figure 14. Etude MWS - Incidence cumulée de cas de cancers du sein et de l'endomètre selon la prise de THS (depuis 10 ans ou non) et selon le THS utilisé**  
D'après Beral *et al.*, 2003

**Tableau 1. Etude E3N-EPIC : Incidence de cancer du sein selon le THS utilisé**  
D'après Fournier *et al.*, 2003

Type d'exposition	Durée d'exposition					
	< 2 ans		2 - 4 ans		≥ 4 ans	
	cas	RR (IC à 95%)	cas	RR (IC à 95%)	cas	RR (IC à 95%)
Aucune utilisation du THS	185	1,2 (1,0 – 1,5)	115	1,2 (1,0 – 1,5)	72	1,2 (0,9 – 1,6)
Utilisation transdermale d'œstrogène						
Utilisé seul	18	1,4 (0,8 – 2,2)	10	1,4 (0,7- 2,6)	1	0,3 (0,1 – 1,8)
Combiné avec progestérone micronisée	26	0,9 (0,6 – 1,4)	13	0,7 (0,4 – 1,2)	16	1,2 (0,7 – 2,0)
Combiné avec progestérone synthétique	95	1,6 (1,3 – 2,0)	57	1,4 (1,0 – 1,8)	35	1,2 (0,8 – 1,7)
Administration orale d'œstrogène						
Combiné avec progestérone synthétique	36	1,2 (0,9 – 1,8)	27	1,6 (1,1-2,3)	17	1,9 (1,2 – 3,2)

RR : Risque Relatif ; IC : Intervalle de Confiance

de cancer du sein se sont déclarés, causant la mort de 637 personnes pendant les 4,1 premières années d'étude. Les utilisatrices du THS ont développé des cancers du sein avec un risque relatif de 1,66 (1,58 - 1,75 d'IC à 95 %) par rapport aux volontaires qui n'ont jamais pris de THS (*Figure 13*). Plus précisément, le risque relatif de développer un cancer du sein a été évalué à 1,30 (1,21 - 1,40 d'IC à 95 %) pour les personnes dont le THS était à base d'œstrogènes seulement et de 2,00 (1,88 - 2,12 d'IC à 95 %) pour les personnes dont le THS était un œstro-progestatif. Enfin, il a été montré que pour chaque type de THS, le risque relatif de développer un cancer du sein était corrélé positivement avec la durée totale d'utilisation du THS, si bien que les auteurs ont estimé à 5 pour 1 000 le nombre de cancers développés des suites d'une prise d'œstrogènes substitutifs et à 19 pour 1 000 le nombre de cancers dans le cas d'une prise d'un mélange œstro-progestatif. D'autre part, 5 cas de cancers de l'endomètre ont été diagnostiqués sur un panel de 1000 femmes non utilisatrices de THS entre 50 et 64 ans. Quatre cas supplémentaires de cancers de l'endomètre ont été diagnostiqués chez des femmes sous THS à base d'œstrogènes depuis 5 ans et 10 cas supplémentaires pour des femmes sous THS à base d'œstrogènes depuis 10 ans (*Figure 14*).

#### **1.6.2.4. L'Etude épidémiologique de femmes de la Mutuelle Générale de l'Education Nationale - European Prospective Into Cancer (E3N-EPIC)**

L'E3N-EPIC est une étude observationnelle dont le but est d'évaluer le risque de développer un cancer du sein associé à la prise du THS chez 54 548 femmes post-ménopausées (Fournier *et al.*, 2004). Les volontaires incluses n'utilisaient plus de THS depuis au moins un an avant le début de l'étude. Les résultats obtenus montrent une augmentation du risque de développer un cancer du sein corrélée avec certaines formes de THS. Lorsque le THS est un œstrogène seul ou un œstrogène pris avec de la progestérone micronisée, ce risque est nul ou faible [1,1 (0,8 - 1,6 d'IC à 95 %) et 0,9 (0,7 - 1,2 d'IC à 95 %), respectivement]. En revanche, lorsque les œstrogènes sont combinés à de la progestérone synthétique, le risque relatif de développer un cancer du sein devient significatif, même sur une courte période de traitement (< 2 ans) : 1,6 (1,3 - 2,0 d'IC à 95 %) (*Tableau 1*).

#### **1.6.3. Les conclusions de l'Agence Française de Sécurité Sanitaire des Produits de Santé (AFSSAPS)**

Fort de la connaissance de ces dernières études d'envergure sur les THS de la ménopause, l'AFSSAPS recommande dans un dernier bulletin datant de 2006 (Caulin *et al.*, 2006) :





- Il existe un sur-risque de cancer du sein chez les femmes utilisant un THS de la ménopause œstro-progestatif. Ce sur-risque de cancer augmente avec la durée de traitement. Aucune différence n'est démontrée en fonction de la voie d'administration (orale ou extra-digestive). Des données suggèrent que le sur-risque de cancer du sein est lié au traitement œstro-progestatif et pourrait varier en fonction du type de progestatif mais ces données nécessitent d'être confirmées.

- Le THS de la ménopause, œstro-progestatif ou œstrogènes seuls, n'exerce pas d'effet protecteur sur la maladie coronarienne et vis-à-vis du risque cérébro-vasculaire, que les femmes aient ou non des antécédents cardio- ou cérébro-vasculaires. Il existe une augmentation du risque coronarien et cérébrovasculaire sous traitement œstro-progestatif, sans que l'on observe de variation notable en fonction de la durée de traitement. Néanmoins, l'augmentation du risque coronarien a été observée chez des femmes de plus de 60 ans traitées par l'association œstrogènes conjugués équinés et acétate de médroxyprogestérone.

- Il existe une élévation du risque de maladie veineuse thrombo-embolique sous THS de la ménopause œstro-progestatif. Ce risque ne semble pas exister avec les œstrogènes administrés par voie transdermique mais ces données nécessitent d'être confirmées.



Les récentes études risques/bénéfices publiées sur les THS de la ménopause et fortement médiatisées ont suscité une relative appréhension chez les femmes ménopausées, les conduisant à rechercher des traitements alternatifs pour traiter les symptômes liés à l'apparition de leur ménopause. Plusieurs études épidémiologiques louaient dans le même temps les bienfaits de l'alimentation asiatique et imputaient en partie ces effets bénéfiques à la consommation des phyto-œstrogènes du soja (Adlercreutz, 1990). Qu'est-ce qu'un phyto-œstrogène ? Quelle est la nature chimique d'un phyto-œstrogène ? Quelles sont les sources de ces composés ?



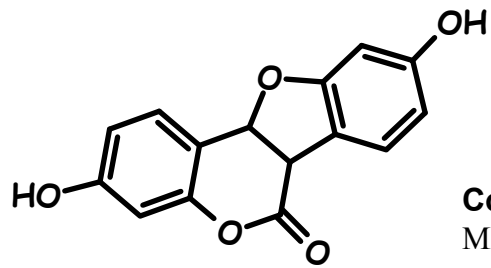
## 2. Diversité et sources des phyto-œstrogènes dans l'alimentation

Le terme de phyto-œstrogènes regroupe plusieurs molécules issues du monde végétal, de structures chimiques différentes mais présentant une similarité avec la structure de l'E<sub>2</sub>. Les phyto-œstrogènes sont ainsi capables de se lier aux ERs et sont doués d'activité œstrogénique. Ils appartiennent aux classes des coumestanes, des flavonoïdes, des stilbènes, des lignanes ou entérolignanes (Setchell, 1998). Toutes ces molécules sont de faible poids moléculaire, possédant un ou plusieurs cycles aromatiques, porteurs d'au moins un groupe hydroxyle libre ou engagé dans une autre fonction éther, ester ou hétéroside.

### 2.1. La découverte des phyto-œstrogènes

Les premières études, qui ont permis de mettre en évidence les phyto-œstrogènes, relatent des perturbations de la fonction de reproduction. En 1946, Bennetts et collaborateurs remarquent des problèmes d'infertilité, de chaleurs persistantes, de dystocies et de prolapsus de l'utérus chez des brebis et corrèlent rapidement ces problèmes avec une pâture riche en trèfle, source de fortes concentrations d'isoflavones aujourd'hui connues comme phyto-œstrogènes (Bennetts *et al.*, 1946). Bien que les béliers ne présentaient aucun symptôme particulier, les béliers castrés sécrétaient un fluide mammaire et présentaient des anomalies de la prostate et de la glande bulbo-urétrale. Enfin, les femelles prépubères ou non gravides sécrétaient également un fluide mammaire. En 1970, Obst et Seamark décrivaient également une dérégulation hormonale de la progestérone chez des brebis broutant une pâture riche en composés œstrogéniques issus du trèfle (Obst et Seamark, 1970). Shemesh et collaborateurs montraient, par des expériences de binding sur des utérus de lapines, que la génistéine, une des isoflavones présentes dans le trèfle et le soja, pouvait se lier à des récepteurs de l'E<sub>2</sub> (Shemesh *et al.*, 1972), les ERs n'ayant été isolés que dans les années 1980. Au même moment, Shutt et Cox présentaient des travaux similaires sur des ERs d'utérus de brebis (Shutt et Cox, 1972). En 1973, Findlay et collaborateurs mettaient en évidence, chez des brebis ayant pâturé du trèfle pendant plus de trois ans, des perturbations du pic de LH indispensable à l'ovulation (Findlay *et al.*, 1973). Ces effets sont qualifiés d'anti-œstrogéniques et permettent de considérer les phyto-œstrogènes comme des perturbateurs endocriniens.

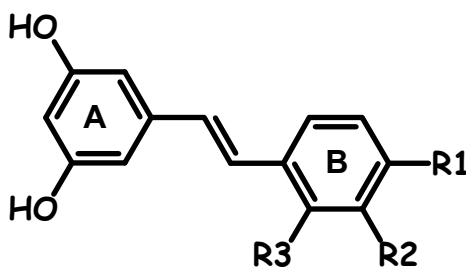
Pour résumer, l'exposition de brebis, souris, ou rates de laboratoire à des fortes concentrations d'isoflavones conduit à un œstrus permanent, à une sécrétion vaginale



**Coumestrol**

MM = 270,24 g.mol<sup>-1</sup>

Figure 15. Structure chimique d'un coumestane



**Resvératrol**

MM = 228,3 g.mol<sup>-1</sup>

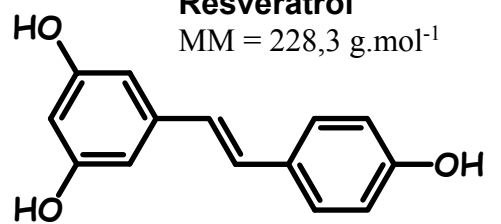


Figure 16. Structure chimique des stilbènes et d'un stilbène particulier : le resvératrol

abondante et à une utérotrophie (effet œstrogénique). Parallèlement, l'effet anti-gonadotrope se traduit quant à lui par une perturbation de la sécrétion de LH pouvant aller jusqu'à une abolition du pic pré-ovulatoire de LH. Ceci peut, dans les cas extrêmes, conduire à un syndrome d'anovulation strict. Ceci peut également conduire à une perturbation de la sécrétion de progestérone, cause de problèmes d'implantation embryonnaire et d'une réduction de la fréquence des naissances gémellaires liée à des avortements plus ou moins précoces (Adams, 1995).

## **2.2. Les molécules phyto-œstrogéniques**

Un répertoire des phyto-œstrogènes, *sensus stricto*, va être présenté, ainsi que les caractéristiques chimiques associées à chaque classe de phyto-œstrogènes. Des données sur les concentrations de phyto-œstrogènes sont également présentées à titre informatif, mais il est important de prendre en considération les différents facteurs qui peuvent influencer sur ces valeurs : les conditions de culture des végétaux, les cultivars, les techniques d'analyse ...

### **2.2.1. Les coumestanes**

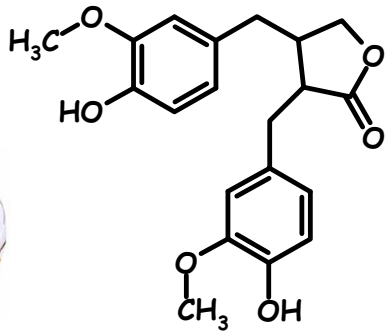
Bien que de nombreuses molécules soient référencées dans le groupe des coumestanes, seules quelques unes d'entre elles présentent une activité œstrogénique, en particulier le coumestrol (*Figure 15*) et le 4'méthoxycoumestrol.

Les sources alimentaires principales des coumestanes sont les légumes. Les haricots Lima et les haricots Pinto contiennent de faibles concentrations en coumestanes, de l'ordre de 10 mg par kg (Murphy *et al.*, 1999). Les germes de trèfle rouge contiennent 281 mg de coumestrol par kg de poids sec. La luzerne contient entre 25 et 65 mg de coumestrol par kg de pois sec et les germes de soja contiennent entre 4,5 et 12,1 mg de coumestrol par kg de poids sec. (Cornwell *et al.*, 2004 ; Lapcik *et al.*, 2003 ; Reinli et Block, 1996 ).

### **2.2.2. Les stilbènes**

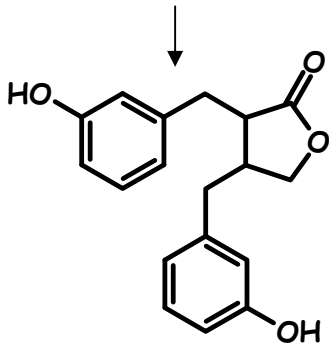
Les stilbènes sont constitués de deux noyaux aromatiques liés par un groupe éthylénique. Le noyau aromatique A possède deux groupements hydroxyles en position *méta*, le cycle B peut être substitué par des groupements hydroxyles ou méthoxylés en position *ortho*, *méta* ou *para* (*Figure 16*).

Ce sont des molécules peu répandues dans les aliments et par conséquent peu abondantes dans notre alimentation. Ils ont été identifiés dans les baies de raisin, le jus de raisin, le vin, les cacahuètes et ses produits dérivés. Le principal stilbène connu dans les



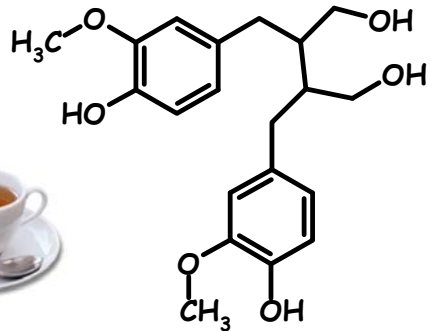
**Matairésinol**

MM = 358,4 g.mol<sup>-1</sup>



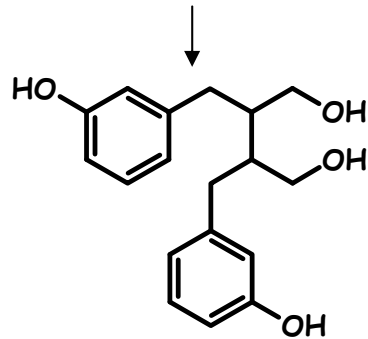
**Entérolactone**

MM = 298,3 g.mol<sup>-1</sup>



**Sécoisolaricirésinol**

MM = 362,4 g.mol<sup>-1</sup>



**Entérodiol**

MM = 302,4 g.mol<sup>-1</sup>

Figure 17. Structure chimique des lignanes et entérolignanes



aliments est le monomère trans-resvératrol (*Figure 16*). Il existe deux isomères du resvératrol et seule la forme *trans* est douée d'action œstrogénique (Cornwell *et al.*, 2004).

Le vin rouge contient entre 0,2 et 8 mg.L<sup>-1</sup> de resvératrol selon le cépage (Lamuela-Raventos *et al.*, 1995). Dans le jus de raisin rouge, la teneur moyenne de resvératrol est d'environ 5 mg.L<sup>-1</sup>. C'est le resvératrol qui a suscité le plus d'attention depuis sa découverte dans les racines de plantes utilisées en médecine traditionnelle chinoise (Chung *et al.*, 1992) et à qui l'on attribue aujourd'hui, des propriétés biologiques diverses comme l'inhibition de l'agrégation plaquettaire, des effets anti-carcinogéniques ou des effets pro-apoptiques (Bhat *et al.*, 2001 ; Kimura, 2005).

### 2.2.3. Les lignanes et les entérolignanes

Les lignanes sont caractérisées par une structure C6-C3-C3-C6 comportant deux unités phénylpropanes. Ces composés sont présents sous forme de traces dans quelques céréales, fruits ou légumes et sont plus concentrés dans les graines de lin. Ces graines sont consommées dans les pays de l'Europe du Nord alors que sa consommation en Europe du Sud est mineure. Les lignanes restent peu consommées dans une alimentation de type occidental.

Le sécoisolaricirésinol et le matairesinol constituent les principales lignanes d'origine végétale (Axelson *et al.*, 1982) (*Figure 17*). Des concentrations de 3,7 g par kg de poids sec de sécoisolaricirésinol dans les graines de lin et 10,8 mg par kg de poids sec de matairesinol ont été rapportées (Mazur *et al.*, 1996). L'analyse de plusieurs thés verts, noirs ou rouges a révélé des quantités allant de 6,1 à 28,9 mg.L<sup>-1</sup> et de 0,6 à 3,05 mg.L<sup>-1</sup> respectivement pour ces deux derniers composés (Mazur, 1998).

Bien que le sécoisolaricirésinol et le matairesinol ne soient pas intrinsèquement doués d'activité œstrogénique, ils sont convertis respectivement en entérodiol et en entérolactone au niveau colique (*Figure 17*). Ces derniers sont doués d'activités œstrogéniques (Setchell *et al.*, 1981). Ces composés ont été isolés dans les fluides biologiques (plasma et urine) chez l'Homme et sont ainsi nommés entérolignanes (Adlercreutz et Mazur, 1997). Bien que leur origine alimentaire soit établie, on ne connaît pas encore l'ensemble de leurs précurseurs dans l'alimentation. Dans les céréales, les précurseurs des lignanes sont principalement localisés dans les couches à aleurone, couches externes riches en fibres. Ceci pourrait être un paramètre important impliqué dans le métabolisme des lignanes car les fibres alimentaires augmentent les fermentations intestinales.

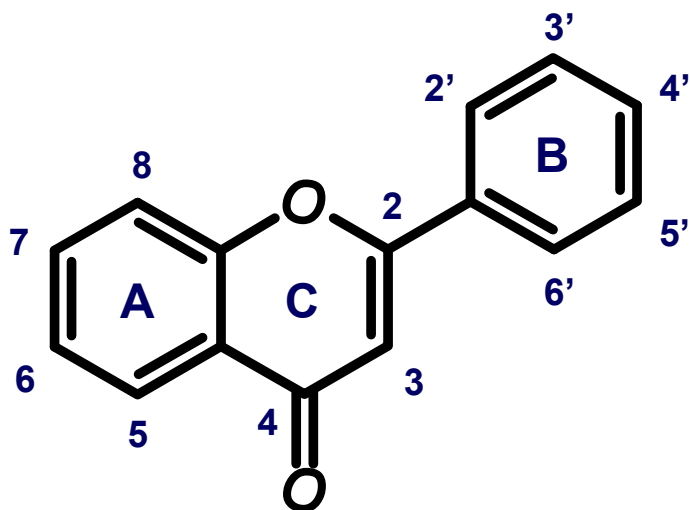
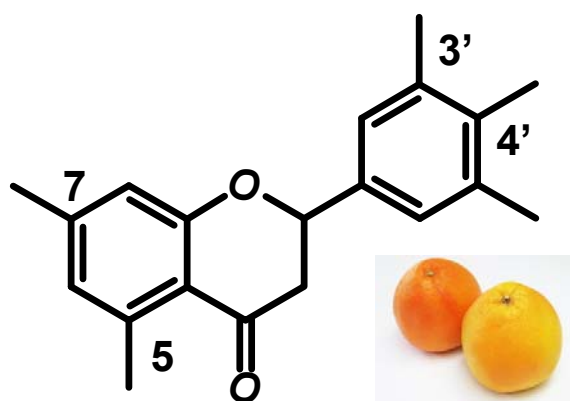


Figure 18. Structure chimique du benzo- $\gamma$ -pyrone



Composés	Positions			
	5	7	3'	4'
Naringénine	OH	OH	H	OH
Hespéritine	OH	OH	OH	OCH <sub>3</sub>
Eriodictyol	OH	OH	OH	OH
Isosakuranétine	OH	OH	H	OCH <sub>3</sub>

Figure 19. Structure générale des principaux flavanones

#### **2.2.4. Les flavonoïdes**

Les flavonoïdes sont les polyphénols présentant la plus grande variabilité structurale. Plus de 4 000 molécules de flavonoïdes ont été identifiées (Nijveldt *et al.*, 2001). Quelques similarités chimiques existent toutefois entre ces molécules. Les flavonoïdes sont caractérisés par un squelette de 15 atomes de carbone et qui forment 2 noyaux aromatiques (cycles A et B) et un hétérocycle oxygéné (cycle C). Les atomes de carbone des cycles A et C sont numérotés de 2 à 8 et ceux du cycle B de 2' à 6'. D'une manière générale, tous les flavonoïdes peuvent être classés selon la nature des différents substituants présents sur les cycles de la molécule et selon le degré de saturation du squelette benzo- $\gamma$ -pyrone (*Figure 18*). Les flavonoïdes au sens strict sont des composés dont la substitution par un noyau benzénique se fait en position 2.

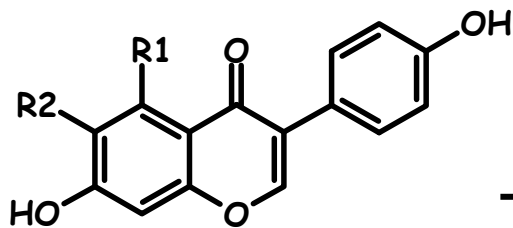
Il existe différentes classes de flavonoïdes, parmi lesquelles on trouve les flavones, les flavonols, les flavanols et les flavanones. Seules quelques molécules de la classe des flavanones sont douées d'effets œstrogéniques. Ces molécules sont caractéristiques des agrumes et sont concentrées dans la peau des fruits et dans l'albédo, partie blanche et spongieuse entre la peau et la chair du fruit. Les quatre flavanones les plus abondantes sont la naringénine, l'hespéritine, l'ériodictyol et l'isosakuranétine (*Figure 19*). La naringine, dérivé sucré de la naringénine, est responsable du goût amer caractéristique du pamplemousse et de l'orange amère. Le pamplemousse contient de 1,7 à 2,8 g par kg de poids frais de naringine et l'orange contient de 2,7 à 6,0 mg par kg de poids frais d'hespéridine (hespéritine couplée à un sucre, le rutinose). De façon plus générale, les teneurs en flavanones des agrumes sont référencées pour les jus de fruits, où elles peuvent atteindre le gramme par litre de jus de fruits.

Tous les phyto-œstrogènes ne sont pas équivalents en terme d'œstrogénicité ou de concentrations dans les aliments. En effet, certaines familles ont une activité œstrogénique forte mais sont peu présentes dans notre alimentation, c'est le cas des coumestanes. D'autres au contraire sont très présentes mais faiblement œstrogéniques, il s'agit des stilbènes et des lignanes. Enfin, les isoflavones, membres de la famille des phyto-œstrogènes, présentent un compromis entre leur concentration dans l'alimentation et leur œstrogénicité, qui les rend particulièrement intéressantes sur un plan biologique.

### **2.3. Les isoflavones dans l'alimentation humaine**

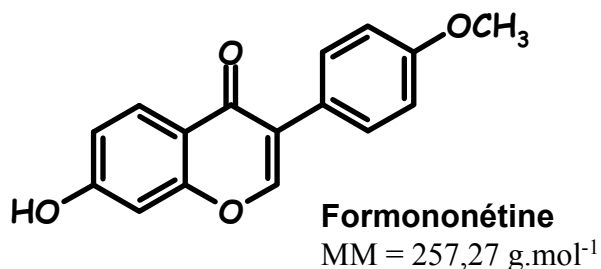
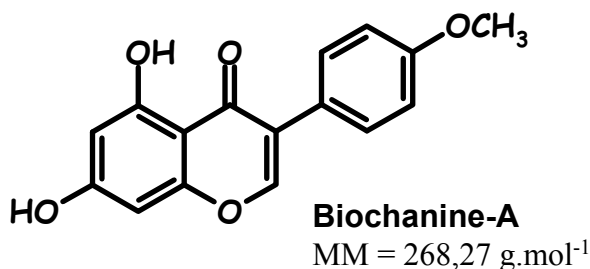
#### **2.3.1. La structure chimique des isoflavones**

Les composés présentant une substitution en position 3 sont désignés par le terme isoflavonoïdes. Les isoflavones, 3-phenyl-4H-1-benzopyran-4-ones, sont les composés les

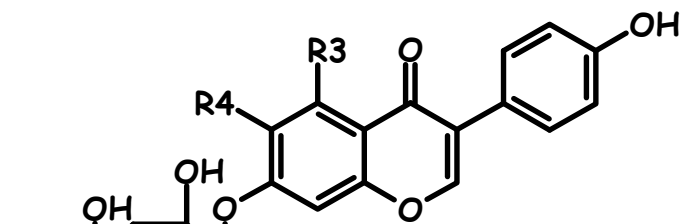


R1	R2	Composés	MM (g.mol <sup>-1</sup> )
H	H	Daïdzéine	254
OH	H	Génistéine	270
H	OCH <sub>3</sub>	Glycitéine	284

*Figure 20. Structure chimique des isoflavones aglycones*



*Figure 21. Structure chimique de la biochanine A et de la formononétine*



R3	R4	R5	Composés	MM (g.mol <sup>-1</sup> )
H	H	H	Daïdzine	416
OH	H	H	Génistine	432
H	OCH <sub>3</sub>	H	Glycitrine	446
H	H	COCH <sub>3</sub>	Acetyldaïdzine	458
OH	H	COCH <sub>3</sub>	Acetylgénistine	474
H	OCH <sub>3</sub>	COCH <sub>3</sub>	Acetylglycitrine	488
H	H	COCH <sub>2</sub> COOH	Malonyldaïdzine	502
OH	H	COCH <sub>2</sub> COOH	Malonylgénistine	518
H	OCH <sub>3</sub>	COCH <sub>2</sub> COOH	Malonylglycitrine	532



*Figure 22. Structure chimique des isoflavones glycosilées*



plus étudiés. Leurs structures sont proches de celle de l'E<sub>2</sub>, un système plan qui inclut un noyau aromatique substitué en *para*. Deux groupements hydroxyles sont opposés sur la molécule. Distants de 12 Å, les groupements hydroxyles forment un angle dièdre sur la molécule.

Les principales isoflavones qui existent sont la génistéine et son précurseur méthylé en 4' la biochanine A, la daïdzéine et son précurseur méthylé en 4' la formononétine, ainsi que la glycitéine (Figures 20 et 21). Cette thèse se focalisera sur deux isoflavones particulières : la génistéine et la daïdzéine.

D'autre part, les isoflavones de l'alimentation existent sous quatre formes chimiques différentes de part la nature du glycoside associé (Chun *et al.*, 2005) (Figure 22) :

- les aglycones : daïdzéine, génistéine
- les glucosides : daïdzine, génistine
- les acétylglucosides : 6''-*o*-acétyl – daïdzine, – génistine
- les malonylglucosides : 6''-*o*-malonyl – daïdzine, – génistine

## 2.3.2. Les sources alimentaires en isoflavones

### 2.3.2.1. Les matières premières

En comparaison avec la plupart des flavonoïdes, les isoflavones présentent une distribution très limitée dans le règne des végétaux (Messina *et al.*, 2004). Les isoflavones sont très majoritairement issues des plantes de la famille des légumineuses, des genres : *Baptisia*, *Cytisus*, *Genista*, *Lupinus*, *Medicago*, *Teline*, *Trifolium*, *Ulex* (Farnsworth *et al.*, 1975a ; Farnsworth *et al.*, 1975b). Parmi les légumineuses également, le soja (*Glycine max.*) est la plante qui contient le plus d'isoflavones. Les isoflavones se présentent sous forme glycosilée majoritairement (Anderson et Wolf, 1995).

Dans le soja, la graine et les cotylédons sont plus riches en génistéine glycosilée qu'en daïdzéine glycosilée, alors que le germe de la plante présente quant à lui un rapport inverse (10 à 15 % de génistéine dans le germe vs 35 à 65 % de daïdzéine, respectivement, selon les cultivars (Hubert *et al.*, 2005)). Les graines de soja contiennent entre 470 et 1 420 mg d'isoflavones par kg de poids frais (Liggins *et al.*, 2000b).

La luzerne contient entre 17 mg et 75 mg de daïdzéine et de génistéine par kg de poids frais (Thompson *et al.*, 2006). Les feuilles de trèfle rouge contiennent 56 mg de génistéine, 4,2 mg de daïdzéine, 417 mg de biochanine A et 647 mg de formononétine pour 100 g de poids sec (De Rijke *et al.*, 2001). De plus, une plante de la pharmacopée chinoise, le kudzu (*Pueraria lobata*), contient, principalement dans ses racines, entre 13 et 42 mg de génistéine

***Tableau 2. Composition de fruits et graines de consommation courante en isoflavones***

D'après Liggins *et al.*, 2000a et Liggins *et al.*, 2000b

Fruits	Quantité d'isoflavones par kg de poids sec ( $\mu\text{g.kg}^{-1}$ )		Quantité d'isoflavones par kg de poids total ( $\mu\text{g.kg}^{-1}$ )	
	Daïdzéine	Génistéine	Daïdzéine	Génistéine
Clémentine	27	270	3	29
Figues	28	77	5	14
Mangue	251	212	38	32
Maracudja	245	403	66	108
Raisins	690	1 458	590	1 247
Fraise	45	457	5	46
Cacahuète	77	158	77	158
Sésame	37	17	37	17
Noisette	58	193	55	185

pour 100 g de poids sec et entre 185 et 220 mg pour 100 g de poids sec de daïdzéine (Bennetau-Pelissero *et al.*, 2000 ; Mazur et Adlercreutz, 1998 ).

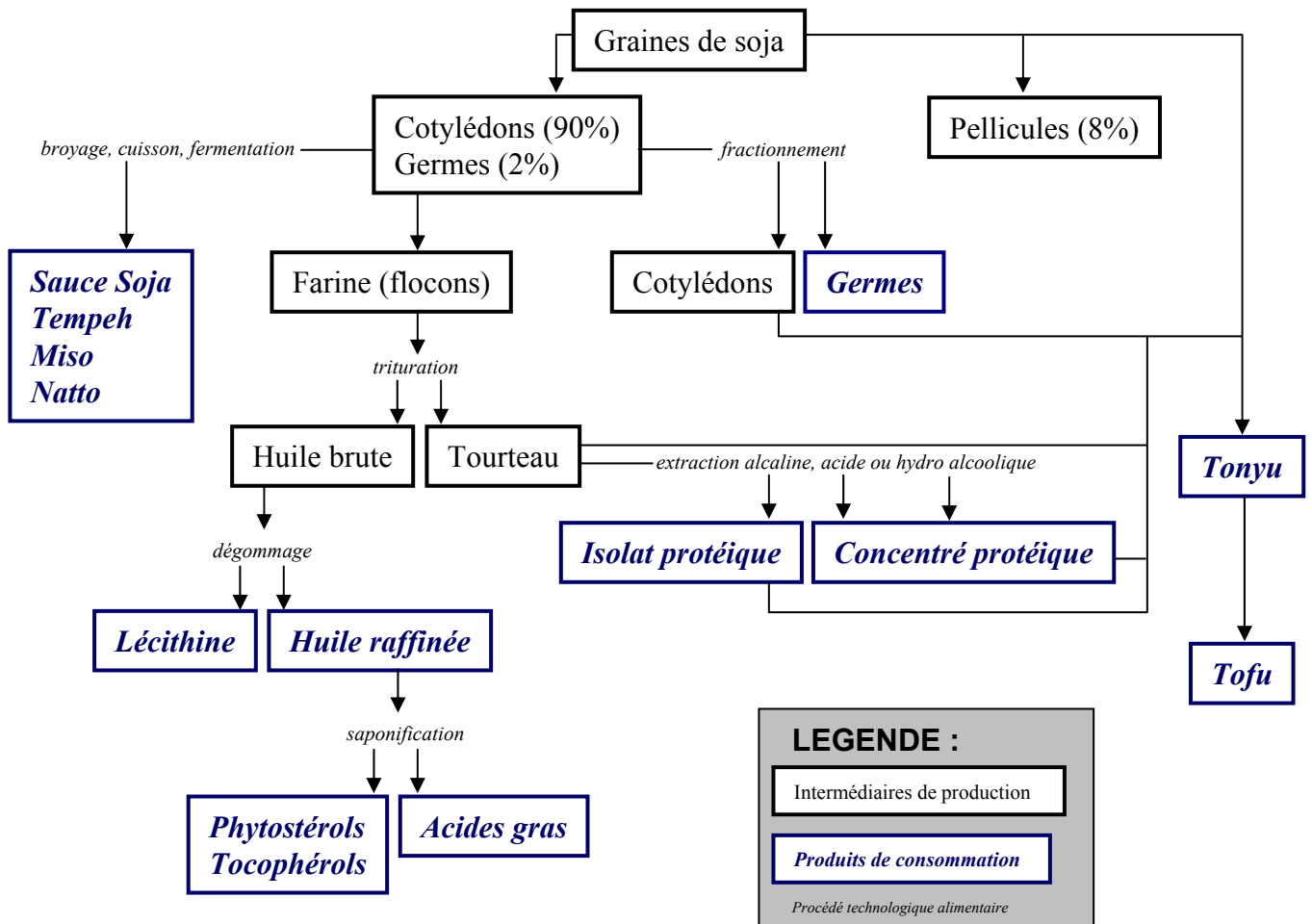
Les isoflavones sont également présentes dans d'autres végétaux. Un article rapporte les concentrations en daïdzéine et génistéine de 114 fruits et légumes : 48 ne contiennent pas de daïdzéine et de génistéine (la limite de détection étant de 0,1 µg par kg de poids frais) et 41 légumes contenaient moins de 100 µg par kg de poids frais. Les concentrations les plus élevées allaient jusqu'à 5 750 µg d'isoflavones par kg de poids frais, pour des pousses d'haricots mungos (Liggins *et al.*, 2000b). Une autre étude de Liggins et collaborateurs a également mesuré les concentrations en isoflavones de 80 fruits et noix. Parmi tous, 43 ne contiennent pas de quantités détectables, soient des quantités inférieures à 1 µg par kg de poids frais. Enfin, 28 fruits contiennent moins de 100 µg d'isoflavones totales par kg de fruits frais et 9 enfin en contiennent plus de 100 µg (Liggins *et al.*, 2000a) (*Tableau 2*).

Il existe des bases de données consacrées exclusivement aux concentrations de phyto-œstrogènes dans les plantes et les produits alimentaires dérivés : il s'agit notamment des bases de données issues du programme VENUS (Vegetable Estrogens in Nutrition and the Skeleton) (Kiely *et al.*, 2003) et d'une étude menée par Horn-Ross et collaborateurs (Horn-Ross *et al.*, 2000). Plus spécifiquement pour les isoflavones, Murphy et collaborateurs ont constitué une base de données disponibles en ligne sur Internet ; il s'agit de l'USDA-Iowa database (Murphy *et al.*, 1999).

### **2.3.2.2. Les aliments traditionnels asiatiques dérivés du soja**

Les graines et les feuilles de soja présentant des concentrations élevées en composés anti-nutritionnels (acide phytique, facteurs anti-trypsiques ...), les aliments traditionnels asiatiques ont été élaborés au cours des âges grâce à l'utilisation de processus de fabrications ancestraux susceptibles de réduire les concentrations de ces facteurs dans le produit final (Barrett, 1996). Ainsi on distingue deux grands types d'aliments en Asie : ceux dérivés du tofu obtenu par trempage successif et ceux obtenus par fermentation (Arai *et al.*, 2000 ; Yamamoto *et al.*, 2001).

Le tofu est un jus de soja caillé en présence de sel de calcium, de sel de magnésium ou de glucono-delta-lactone pour les procédés alimentaires chimiques plus récents. Le caillé subit au moins 5 trempages successifs selon les recettes traditionnelles. Des doses d'isoflavones allant de 3,6 à 67,5 mg pour 100 g de tofu ont été rapportées (Cornwell *et al.*, 2004). Le tofu peut être présenté sous des formes diverses et porte alors les noms de yushidofu, de koyadofu, d'aburrage ...



**Figure 23. Les procédés industriels de transformation du soja**

D'après Choi et al., 2006



Les produits dérivés de la fermentation du soja peuvent être : (1) Le tempeh, qui est un produit plus spécifiquement indonésien pour lequel le soja est inoculé par *Rhizopus oligosporus*. Des concentrations de 103 mg d'isoflavones totales pour 100 g de tempeh sont rapportées, selon le cultivar de soja utilisé (Nakajima *et al.*, 2005). D'autre part, sur le plan nutritionnel, le tempeh présente l'avantage certain de contenir des quantités appréciables de vitamine B12, quasi-absente dans les régimes végétariens. (2) Le natto est inoculé par *Bacillus Natto*. Les graines de soja sont cuites entières comme pour le tempeh, mais la surface de chacune d'elles est recouverte d'une substance très visqueuse, constituée de polymères d'acide glutamique produits par les bactéries. (3) Le miso est un aliment japonais traditionnel qui se présente sous forme de pâte fermentée, dont les concentrations en isoflavones totales sont de 65 mg pour 100 g (Anderson et Wolf, 1995). Le miso est composé d'un mélange de graines de soja, riz ou orge, sel, eau et un ferment qui est un mélange de blé ou de riz inoculé avec un champignon *Aspergillus Sojæ*. Il peut être consommé en bouillon sous forme de soupe au miso.

Dans les produits fermentés, l'étape de fermentation coupe les liaisons chimiques entre la molécule d'isoflavone et le groupement glycosilé. Les formes aglycones y sont alors majoritaires (Setchell *et al.*, 2001).

### **2.3.2.2. Les aliments « occidentaux » dérivés du soja**

Une large gamme de produits dérivés du soja, issue de procédés industriels complexes, est commercialisée sur les marchés mondiaux (Choi et Rhee, 2006). Ces produits peuvent être consommés tels quels ou peuvent entrer dans la formulation d'autres produits (*Figure 23*).

Le tonyu ou jus de soja, est un produit d'origine américaine. Il s'agit d'un jus obtenu par broyage des graines de soja en présence d'eau, après cuisson et filtration (Barrett, 1996). Des quantités d'isoflavones de 2 à 21 mg pour 100 g de tonyu sont décrites (Murphy *et al.*, 1999).

Un nombre important de produits, dans lesquels on trouve du soja, est disponible sur les marchés occidentaux ; il s'agit par exemple de laits pour nourrissons, de saucisses, de steaks, de pâtes, de yaourts, de crèmes desserts ou de Protéines Végétales Texturées (PVT). Le PVT est fabriqué à partir de farine de soja. Il peut être utilisé en remplacement de la viande chez les végétariens. Les teneurs en isoflavones de tous ces produits se trouvent dans le *tableau 3*.

**Tableau 3. Concentrations en isoflavones d'aliments dérivés du soja**  
D'après Bennetau-Pelissero *et al.*, 2003 et Thompson *et al.*, 2005

Aliment à base de soja	Génistéine	Daïdzéine	IF	Volume ingéré	Quantité d'IF ingérée (mg)
<i>Aliments liquides (µg.mL<sup>-1</sup>)</i>					
Yoghourt au soja	44,7	37,4	82,1	2 x 110 mL	18,1
Lait de soja chocolaté	115,0	70,0	185,0	250 mL	46,3
Crème dessert vanillée	120,0	60,0	180,0	2 x 110 mL	39,6
<i>Aliments liquides pour nourrissons (µg.mL<sup>-1</sup>)</i>					
Modilas Soja	17,4	13,1	30,5	900 mL	27,5
Nutrilon Soja	26,5	11,6	38,1	900 mL	34,3
Gallia Soja	22,2	11,2	33,4	900 mL	30,1
Prosobee Soja	11,2	6,4	17,5	900 mL	15,8
<i>Aliments solides (µg.g<sup>-1</sup>)</i>					
Fromage à base de soja 1	351,1	300,9	652	2 x 25 g	32,6
Fromage à base de soja 2	285,8	185,2	471,0	2 x 25 g	23,5
Saucisse de soja	82,2	40,6	122,9	2 x 45 g	11,1
Burger végétarien	111,2	46,2	157,4	350 g	55,1

IF : Isoflavones

**Tableau 4. Concentrations en isoflavones dans des compléments alimentaires à base de soja**  
D'après Bennetau-Pelissero *et al.*, 2003

Compléments alimentaires	Fabricants	Génistéine (mg)	Daïdzéine (mg)	Isoflavones (mg)	Utilisation journalière	Quantité ingérée (mg/jour)
Biopause	Monin Chatenaud	1,43	1,02	2,45	2	4,90
Bi optimum Soja	Boiron	3,11	8,97	12,08	2	24,16
Efodyne	Yves Ponroy	1,49	6,69	8,18	1	8,18
Elugyne	Dolisos	2,66	10,64	13,30	1	13,30
Estronat	Lescuyer	6,62	6,48	13,10	3	39,30
Evestrel	Theramex	11,61	9,19	20,80	2	41,60
Feminine	Medikem	3,27	1,46	4,73	2	9,46
Gydrelle	Iprad	4,48	13,27	17,75	2	35,50
Gynalpha	CCD	28,60	64,20	92,80	1	92,80
Gynosoya	Codifra	27,00	7,36	34,36	2	68,72
Isoyam	Starvital	1,69	1,45	3,14	3	9,42
Macasoyam	Fenioux	2,22	4,85	7,07	6	42,42
Menolig	Vichy	11,30	5,57	16,87	4	67,48
Oligoforme 50	IDO	0,43	0,17	0,60	4	2,40
Preluzelle	LPF	8,65	10,75	19,40	2	38,80
Phytofemme	Superdiet	4,89	3,97	8,86	2	17,72
Phytosoya	Arkopharma	1,58	6,59	8,17	2	16,34
Sojacal	Novagyn	9,55	6,31	15,86	2	31,72
Sojamag	Novagyn	10,70	6,10	16,80	2	33,60
Sojyam	Tonipharm	5,91	2,80	8,71	3	26,13
Soyalig	Vichy	11,86	6,66	18,52	2	37,04

### **2.3.2.3. Les compléments alimentaires**

Dans les pays occidentaux, le nombre de compléments alimentaires à base d'isoflavones de soja disponibles dans les pharmacies, les parapharmacies, voire les supermarchés a considérablement augmenté ces dix dernières années. En France, le marché des compléments alimentaires représentait 759 M€ en 2004 et 824 M€ en 2005 (source « Intelligence Market Source Health »). Le marché des compléments alimentaires à base de soja s'est fortement amplifié depuis 1998 avec en 2006 une répartition en valeur de la distribution de 1,8 M€ en grandes et moyennes surfaces, 24 M€ en parapharmacie et 48 M€ en pharmacie. Fin 2006, on comptait 141 compléments alimentaires accessibles en français sur le marché ou sur Internet. Le secteur des compléments alimentaires pour les symptômes de la ménopause représente ainsi le troisième segment de vente du marché des compléments alimentaires après les compléments dits « minceur » et ceux dits « vitamines ».

Bennetau-Pelissero et collaborateurs rapportent les concentrations en isoflavones de 22 compléments alimentaires commercialisés dans plusieurs pays occidentaux. L'apport total en isoflavones, exprimé en équivalent aglycone, est compris entre 2,45 et 92,80 mg par jour selon les recommandations des industriels (Bennetau-Pelissero *et al.*, 2003) (*Tableau 4*).

## **2.4. L'exposition alimentaire aux isoflavones**

### **2.4.1. L'exposition des asiatiques**

Par rapport aux populations occidentales, la consommation de soja par les Asiatiques, Chinois et Japonais en particulier, est traditionnellement élevée depuis des millénaires, en raison de leur faible coût et de leur apport protéique important (Anupongsanugool *et al.*, 2005). Même si la consommation de soja est quasi-journalière, les quantités consommées restent tout de même modérées : de l'ordre de 60 g de soja par jour dans un bol alimentaire total de 1,2 kg (Adlercreutz *et al.*, 1991).

Les isoflavones consommées en Asie proviennent ainsi essentiellement des aliments à base de soja. Les apports en isoflavones dans l'alimentation asiatique n'ont cependant pu être estimés que récemment avec le développement des premières tables de composition des aliments en 1996 (Gerber *et al.*, 2005). Les données de la consommation en isoflavones proviennent d'études menées principalement à Hong Kong en Chine, au Japon et à Singapour. Ces études concluent à une prise quotidienne d'isoflavones de 25 à 50 mg en moyenne (Messina *et al.*, 2006). Plus précisément, les apports moyens en isoflavones, équivalents aglycones, sont de : 45 mg par jour au Japon, où les articles scientifiques relatent des minima de 8 mg par jour et des maxima de 118 mg par jour, 35 mg par jour dans les zones urbaines de



Chine (5-60 mg), 9 mg par jour dans les zones rurales de Chine (0-35 mg), 15 mg par jour en Corée et 13 mg par jour à Singapour.

Une étude a montré que des migrants asiatiques consommaient moins d'isoflavones que la population locale de Grande-Bretagne. Les valeurs médianes des isoflavones ingérées sont de 184,2 et 333,9 µg par jour et les valeurs moyennes sont de 321,7 et 366,0 µg par jour, respectivement pour ces deux populations (Bhakta *et al.*, 2006). Cette population était originaire des pays issus des anciennes colonies britanniques, principalement d'Inde, du Pakistan et du Bangladesh, où le soja et ses produits dérivés sont moins consommés qu'en Asie sud orientale. Ainsi une autre étude, menée aux USA chez des migrantes issues de Corée, a montré une consommation d'isoflavones semblable à celle rapportée en Asie : 20,3 mg par jour en moyenne. Cette consommation varie de 3,12 à 60,32 mg par jour (Kim *et al.*, 2006). Bien que le comportement alimentaire des asiatiques évolue avec l'urbanisation croissante et l'occidentalisation progressive de leur mode de vie, il semble donc que les apports quotidiens en isoflavones restent encore élevés à l'heure actuelle.

#### **2.4.2. L'exposition des occidentaux**

Bien que le soja soit apparu dans les années 1940 en Europe, sa consommation reste faible, mais variable selon les profils alimentaires de chacun, notamment pour les végétariens et les végétaliens. Les apports alimentaires en isoflavones sont directement corrélés à la consommation de soja. Aussi, il est estimé que les apports moyens en isoflavones dans une alimentation occidentale typique représentent moins de 1 % des apports en Asie. Les apports moyens ont été estimés à 0,4 mg par jour par l'AFSSA dans les populations européennes et américaines (Gerber *et al.*, 2005).

Une première étude a quantifié la consommation d'isoflavones dans 10 pays occidentaux (Keinan-Boker *et al.*, 2002). Cette étude montre qu'en France et au Royaume-Uni, les produits à base de soja consommés sont surtout les produits de substitution des produits laitiers, comme le tonyu ou le lait de soja, alors que les germes et les graines de soja sont surtout consommés aux Pays-Bas, en Allemagne et en Espagne. En Italie, ce sont les produits céréaliers qui apportent le plus de phyto-œstrogènes alors qu'au Danemark, ce sont les substituts de viande.

Une seconde étude a été menée plus récemment dans 4 pays européens sur un nombre assez important de participants. Cette étude a montré des taux d'isoflavones consommées de l'ordre de centaines de µg d'isoflavones par jour : en moyenne 726 en Irlande (n = 1 379),



554 en Italie (n = 1 513), 913 aux Pays-Bas (n = 4 085) et 718 Royaume-Uni (n = 335) (van Erp-Baart *et al.*, 2003).

Toutes les études s'accordent à montrer des taux ingérés d'isoflavones bien plus faibles dans les régimes alimentaires occidentaux. Il existe toutefois des exceptions ; il s'agit des végétariens et végétaliens par rapport aux régimes alimentaires orientaux. D'autre part, compte-tenu de l'image véhiculée par le soja, des cas d'orthorexiques consommant des quantités assez élevées de soja commencent à émerger.





La présence d'isoflavones dans notre alimentation n'induit cependant pas forcément un effet physiologique. Tout composé doit nécessairement être biodisponible pour être actif au niveau des tissus cibles. Avant qu'un nutriment soit biodisponible au niveau d'une cellule, il doit, en effet, être absorbé, métabolisé, puis transporté jusqu'à cette cellule. Une partie des nutriments ingérés ne sont alors plus accessibles car ils sont éliminés par voie urinaire ou biliaire. Autant de mécanismes impliqués sont autant de sources de variations de la biodisponibilité entre les individus. L'absorption, le métabolisme et l'élimination des isoflavones sont donc des paramètres essentiels à considérer dans l'interprétation des effets physiologiques des isoflavones.



### **3. La biodisponibilité des isoflavones**

#### **3.1. Définitions**

La notion de biodisponibilité est une notion plus classiquement utilisée en pharmacologie. Le plus souvent, elle permet de décrire la fraction de la dose ingérée qui atteint la circulation sanguine. La biodisponibilité est donc seulement prise en considération lors du calcul de doses pour des voies d'administration autres qu'intraveineuse. Dans ce dernier cas, en effet, la biodisponibilité est absolue. La biodisponibilité est caractérisée par la vitesse et l'intensité auxquelles le principe actif d'une forme galénique devient disponible au niveau du site d'action du médicament ou le plus souvent, dans le sang pouvant être perçu comme le reflet de la quantité disponible au niveau d'un site d'action.

Par élargissement, on définit alors la biodisponibilité d'un nutriment comme la fraction de l'apport alimentaire capable de remplir un rôle biologique. La biodisponibilité relative d'un nutriment se définit comme le rapport entre la quantité ingérée et les concentrations circulantes atteintes. La biodisponibilité englobe de fait les notions d'absorption, de transport, de métabolisme, de distribution, de stockage, et d'élimination d'un nutriment. Plusieurs facteurs, intrinsèques et extrinsèques, peuvent moduler la biodisponibilité d'un nutriment.

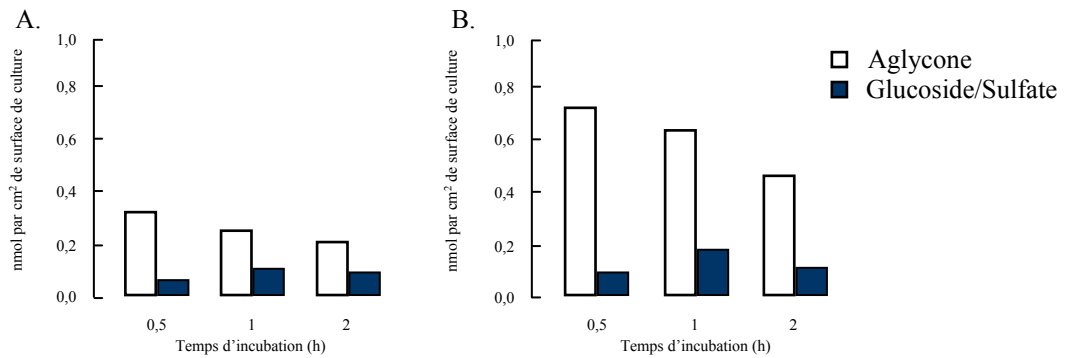
Les polyphénols de l'alimentation et les isoflavones ont des propriétés physico-chimiques semblables et peuvent donc être en compétition dans les mécanismes d'absorption, au niveau des enzymes du métabolisme ou dans les mécanismes d'élimination que nous allons décrire.

#### **3.2. L'absorption des isoflavones**

Une corrélation entre la quantité ingérée et les paramètres pharmacocinétiques de l'absorption a été démontrée pour des doses allant de 0,4 à 1,0 mg d'isoflavones par kg de poids corporel chez 10 volontaires (5 femmes pré-ménopausées et 5 femmes post-ménopausées) (Setchell *et al.*, 2003b). Pour des doses plus élevées, 2 mg par kg de poids corporel dans cette étude, la corrélation n'est plus observée au niveau plasmatique, suggérant un facteur limitant à l'absorption de ces composés. Quels sont donc les mécanismes mis en jeu dans l'absorption intestinale des isoflavones ?

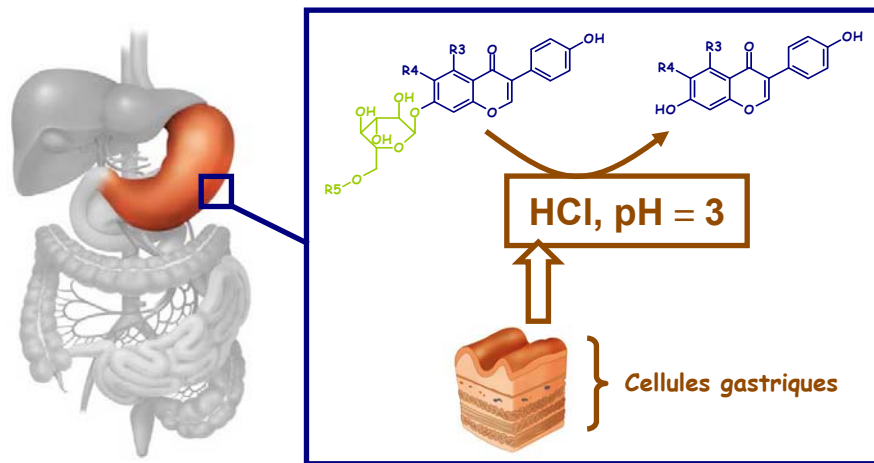
##### **3.2.1. Les hydrolyses pré-intestinales**

Dans la plupart des aliments ingérés, les isoflavones sont majoritairement présentes sous formes de glycosides. Les isoflavones ne semblent pas être absorbées sous de telles

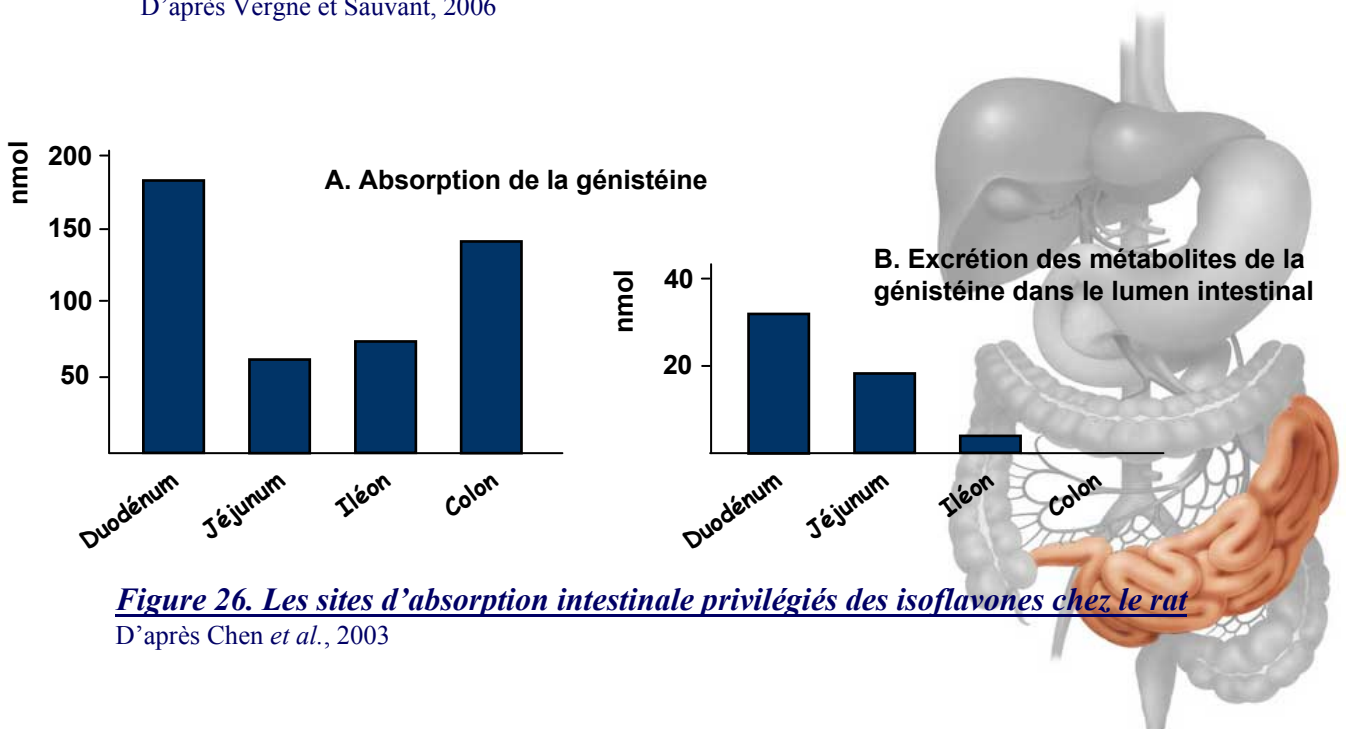


Quantités de génistéine aglycone et glucuronide/sulfate (A.) et de daïdzéine aglycone et glucuronide/sulfate (B.) dans des extraits cellulaires après l'incubation des isoflavones sur une couche cellulaire de cellules Caco-2.

**Figure 24. Seules les isoflavones aglycones sont absorbées au niveau intestinal**  
D'après Muriota *et al.*, 2002



**Figure 25. La déglycosilation partielle stomacale des isoflavones conjuguées**  
D'après Vergne et Sauvant, 2006



**Figure 26. Les sites d'absorption intestinale privilégiés des isoflavones chez le rat**  
D'après Chen *et al.*, 2003

formes dans la mesure où ces composés glycosilés n'ont jamais été identifiés dans le plasma. Il était déjà établi qu'une hydrolyse était nécessaire aux flavonoïdes pour être absorbés (Day *et al.*, 1998). Ceci a été confirmé par les arguments d'une étude *in vitro* de Murota et collaborateurs sur un système de simple couche cellulaire de type Caco-2 (lignée de cellules coliques humaines) au travers de laquelle la génistéine peut pénétrer alors que la génistine ne le peut pas. (Murota *et al.*, 2002) (*Figure 24*).

Une étape d'hydrolyse des composés glycosilés est donc préalablement nécessaire. Après ingestion des isoflavones, la première étape d'hydrolyse semble avoir lieu au niveau buccal. Des  $\beta$ -glycosidases ont, en effet, été identifiées dans des cellules épithéliales buccales humaines. Ces cellules desquament et sont présentes dans la salive, ce qui augmente leur rendement d'hydrolyse. Des bactéries, présentes également dans la salive, sont responsables en partie de l'hydrolyse des isoflavones glycosilées : *cocci*, bactéries gram-positives et *diplococci*, bactéries gram-négatives, ont d'ores et déjà été identifiées (Walle *et al.*, 2005).

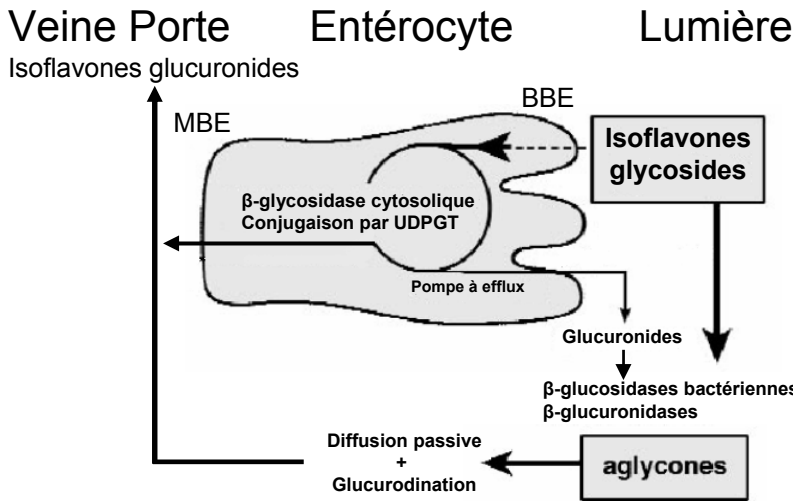
Xu et collaborateurs ainsi que Piskula et collaborateurs suggèrent l'existence d'une hydrolyse partielle du sucre lié aux isoflavones par l'acidité gastrique (Piskula *et al.*, 1999 ; Xu *et al.*, 1995). Le pH stomacal étant de l'ordre de 3 (*Figure 25*). Toutefois, ces études ont été menées sur des rats, chez qui la présence de bactéries stomacales est avérée. Ces bactéries pourraient être responsables de l'hydrolyse de la partie sucrée. L'hydrolyse stomacale des isoflavones conjuguées n'a pas été démontrée jusqu'alors chez l'Homme.

### **3.2.2. L'absorption intestinale : définition**

L'absorption digestive proprement dite, c'est-à-dire la quantité de principe actif atteignant la circulation systémique, est difficile à mesurer puisque la circulation porte-hépatique est d'accès peu aisé. L'approche de cette quantité disponible au niveau systémique se fait donc de manière indirecte à partir de la quantité d'isoflavones mesurée dans le plasma prélevé au niveau périphérique, c'est-à-dire après extraction splanchnique. La quantité d'isoflavones, qui atteint la circulation générale est fonction de la quantité absorbée par l'épithélium digestif, mais également, d'autres processus d'élimination pré-systémique : (1) dégradation dans la lumière intestinale, (2) métabolisme au niveau des entérocytes et (3) captage hépatique important au premier.

### **3.2.3. Les processus d'hydrolyse des formes glycosilées au niveau intestinal**

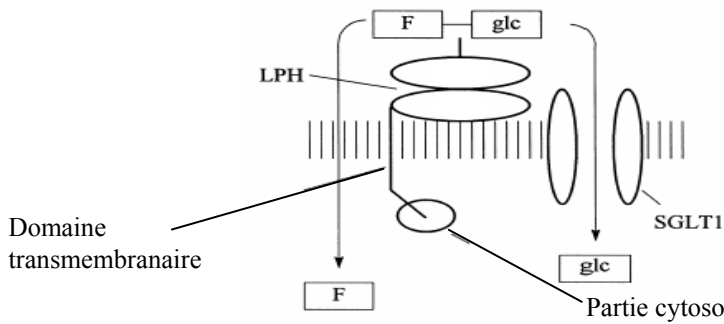
Chez le rat, les sites d'absorption intestinale des isoflavones ont été mis en évidence. Toutes les parties de l'intestin sont impliquées, même si une absorption privilégiée a



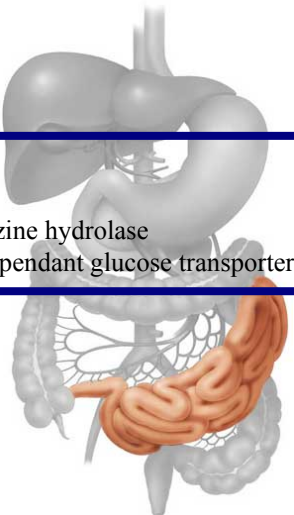
BBE : Bordure en brosse des entérocytes  
MBE : Membrane basale des entérocytes  
UDPGT : UDP - glucuronosyltransferase



**Figure 27. Absorption et conjugaison intestinale des isoflavones**  
D'après Setchell *et al.*, 2002



F: Flavonoïdes  
glc: glucose  
LPH : lactase phlorizine hydrolase  
SGLT-1 : sodium dependant glucose transporter-1



**Figure 28. Mécanisme d'absorption intestinale des isoflavones via une enzyme de type  $\beta$ -glucosidase**  
D'après Day *et al.*, 2000

lieu au niveau du duodénum (*Figure 26*). Des expériences ont également montré que des métabolites de la génistéine étaient excrétés par les entérocytes dans la lumière intestinale, corroborant (1) l'action de conjugaison réalisée au niveau des entérocytes et (2) l'existence de mécanismes actifs de transport (Chen *et al.*, 2003).

Les isoflavones liées à des glycosides (glucosides, malonyles et acétyles) ne sont pas absorbées intactes au travers de la barrière intestinale mais leur biodisponibilité requiert une hydrolyse initiale de la partie sucrée par des  $\beta$ -glycosidases avant de rejoindre la circulation périphérique (Setchell *et al.*, 2002b) (*Figure 27*). Plusieurs études suggèrent, d'autre part, que les  $\beta$ -glycosidases de la flore microbienne colique (enzymes présentes chez plusieurs espèces de bactéries telles que *Lactobacilli*, *Bifidobacteria* et *Bacteroides*) peuvent contribuer à l'hydrolyse du sucre lié aux isoflavones (Xu *et al.*, 1995).

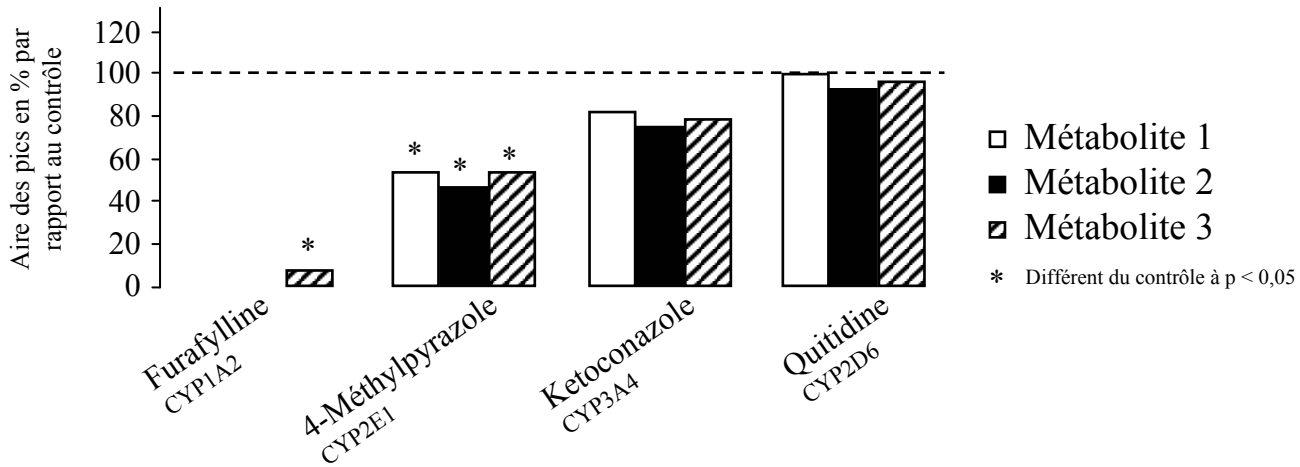
Plusieurs enzymes de la famille des  $\beta$ -glycosidases sont exprimées au niveau de l'intestin grêle, plus particulièrement du jéjunum, et en font un site privilégié de l'hydrolyse des isoflavones glycosilées. La lactase phlorizine hydrolase appartient à la famille des  $\beta$ -glycosidases. Cette enzyme se trouve, de façon caractéristique pour une  $\beta$ -glycosidase, sur la membrane des cellules épithéliales intestinales qui constituent la bordure en brosse. Cette enzyme est capable d'hydrolyser les glycosides liés aux isoflavones *in vitro*, ce qui suggère sa possible intervention dans l'absorption et le métabolisme intestinal des isoflavones (Day *et al.*, 2000) (*Figure 28*). Le mécanisme par lequel les isoflavones traversent la barrière intestinale n'a pas été complètement élucidé. Les isoflavones seraient alors absorbées par diffusion passive consécutivement à l'hydrolyse (Setchell *et al.*, 2003b). En effet, les isoflavones, composés lipophiles, peuvent aisément traverser les membranes cellulaires.

D'autre part, des protéines, telles que les Sodium Dependent Glucose Transporter 1 (SGLT1) et les Multidrug Resistance associated Proteins (MRP) sont impliquées dans des mécanismes de passage des isoflavones au travers de la barrière entérocytaire. Les MRP sont impliquées à la fois dans le passage entre l'entérocyte et le sang et entre l'entérocyte et la lumière intestinale (Walle, 2004).

#### **3.2.4. L'intestin est également un site de conjugaison pour les isoflavones**

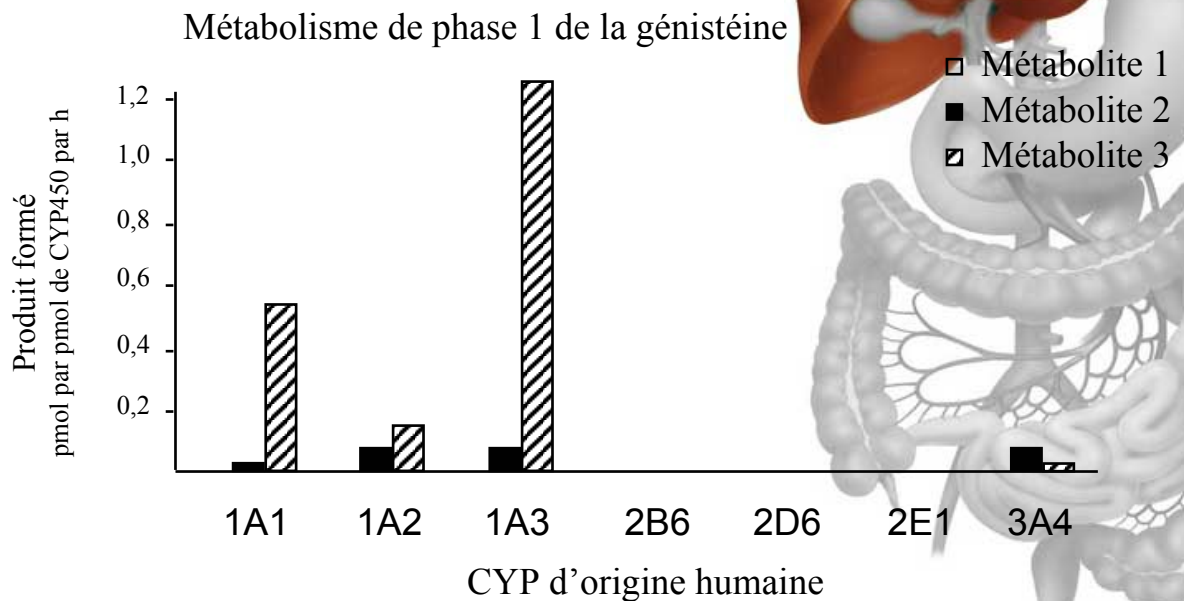
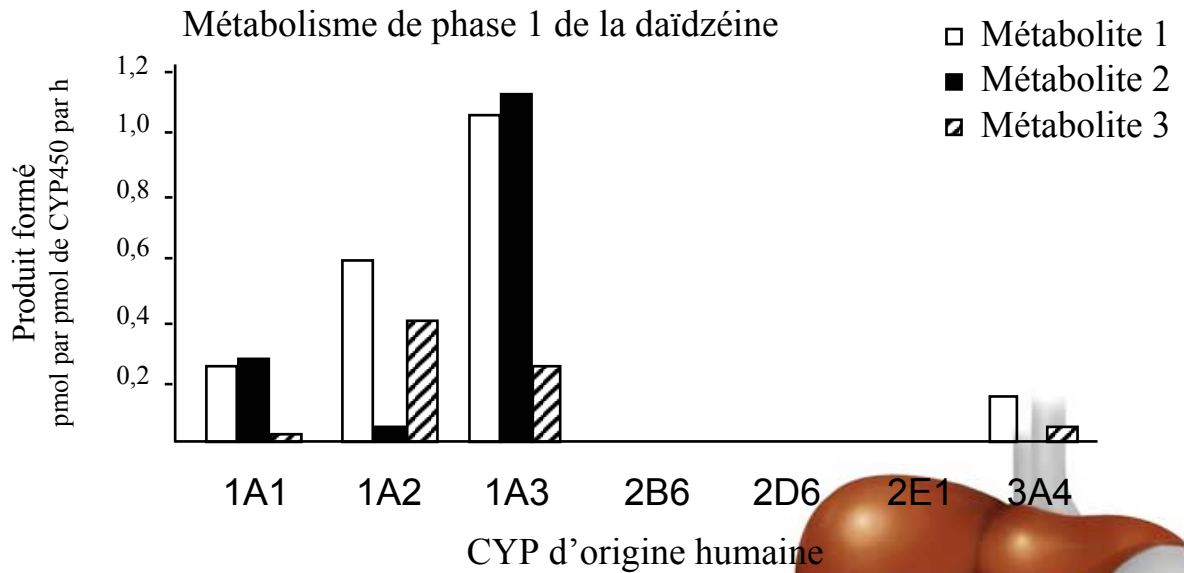
Initialement, la conjugaison des isoflavones était supposée avoir lieu au niveau du foie exclusivement. Or, il est désormais évident que la conjugaison des isoflavones a lieu également dans les entérocytes lors de leur premier passage. Ainsi, de l'équol conjugué à l'acide glucuronique a été détecté dans la veine porte de volontaires humains. L'équol est un

### Métabolisme de phase 1 de la daïdzéine



**Figure 29. La mise en évidence par des inhibiteurs spécifiques de l'action des CYP450**

D'après Atherton *et al.*, 2006



**Figure 30. Le métabolisme hépatique des isoflavones via l'action des CYP450**

D'après Atherton *et al.*, 2006



métabolite de la daïdzéine dont la production est permise par la flore bactérienne et a donc lieu exclusivement au niveau de la lumière du côlon (Setchell et Aldercreutz, 1988).

Une conjugaison rapide des isoflavones en glucuronides ou sulfates dans l'entérocyte, puis leur passage dans la circulation sanguine permet de maintenir un gradient de concentration des aglycones du lumen intestinal vers les entérocytes (Day *et al.*, 2000). Chez le rat, une partie des isoflavones peut passer la barrière intestinale sans être glucuro-conjuguée lorsque la quantité d'isoflavones est très importante (Sfakianos *et al.*, 1997).

### **3.2.5. Les paramètres pharmacocinétiques associés à l'absorption des isoflavones**

Les études conduites chez l'Homme montrent une absorption rapide des isoflavones pour laquelle des pics d'absorption vont de 2 à 12 h suivant l'ingestion des isoflavones. Rowland et collaborateurs rapportent même la présence d'isoflavones dans le sang 15 min après la prise de protéines de soja (Rowland *et al.*, 2003). D'autre part, les paramètres pharmacocinétiques étudiés sont classiquement ceux de la pharmacologie : la concentration maximale atteinte dans le plasma ( $C_{max}$ ) est le reflet de l'intensité de l'absorption. Elle est observée au temps  $T_{max}$ , reflet de la vitesse d'absorption. La  $C_{max}$  des isoflavones est classiquement comprise entre 0,02 et 0,05 nmol.mL<sup>-1</sup> par mg d'isoflavone ingérée. Le  $T_{max}$  est atteint entre 4 et 9 h selon les études.

## **3.3. Le métabolisme hépatique des isoflavones**

Le terme de métabolisme fait référence à la transformation, par une réaction enzymatique d'un nutriment en un ou plusieurs autres composés, dits métabolites, actifs ou inactifs sur le plan pharmacologique. De nombreux tissus peuvent réaliser cette transformation, néanmoins, le principal site de biotransformation est situé au niveau hépatique. Trois phases sont caractérisées selon les processus de transformation induits par ses enzymes : ce sont les réactions de phase I, II et III.

Très peu d'articles relatent de l'action des enzymes de phase III sur les isoflavones au niveau hépatique. Les actions des MRP en particulier décrites jusqu'alors ont lieu au niveau intestinal (cf. 3.2.3.). Les réactions de phase I et II hépatiques seront donc principalement décrites par la suite.

### **3.3.1. Les biotransformations hépatiques des isoflavones lors des réactions de phase I**

Les réactions de phase I sont des réactions d'oxydation, majoritairement mesurables au niveau de la fraction microsomiale hépatique et passent par les cytochromes P450

**Tableau 5. Action des enzymes hépatiques de phase 2 : constantes cinétiques de formation du génistéine-7-glucuronide à partir de la génistéine**

D'après Doerge *et al.*, 1999

UDPGT Isoforme : Substrat Spécifique	$k_{cat}$ pmol.min <sup>-1</sup> .mg <sup>-1</sup>	$K_m$ μM
1A10: phenols	6.25	27
1A9: bulky phenols	125	600
1A1: major bilirubin	1.2	114
1A6: planar phenols	1.7	220
1A7: phenols	0.52	500
1A4: minor bilirubin	< 0.03	

**Tableau 6. Action des enzymes hépatiques de phase 2 : constantes cinétiques de formation de la daïdzéine-7-glucuronide à partir de la daïdzéine**

D'après Doerge *et al.*, 1999

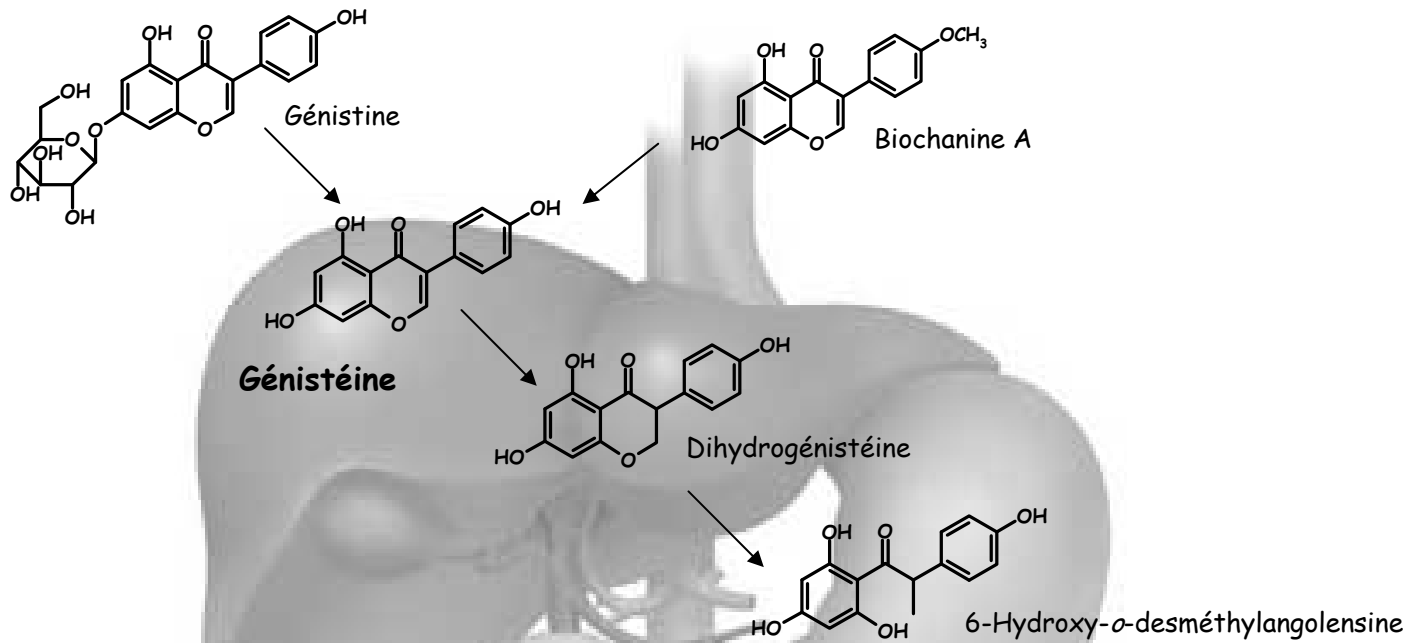
UDPGT Isoforme : Substrat Spécifique	$k_{cat}$ pmol.min <sup>-1</sup> .mg <sup>-1</sup>	$K_m$ μM
1A10: phenols	< 0.03	
1A9: bulky phenols	67	200
1A1: major bilirubin	10.4	333
1A6: planar phenols	< 0.13	
1A7: phenols	< 0.03	
1A4: minor bilirubin	1.6	400

(CYP450). Le métabolite de phase I le plus connu est l'orobol, qui est en fait le métabolite de la génistéine hydroxylée en position 3', formé exclusivement par le CYP1A2 (Breinholt *et al.*, 2003). Des expériences *in vitro* ont permis d'identifier précisément les CYP450 impliqués dans le métabolisme des isoflavones. Il existe des inhibiteurs spécifiques de chaque isoforme des CYP450. La furafylline et le 4-méthylpyrazole, inhibiteurs des cytochromes 1A2 et 2E1 respectivement, inhibent également *in vitro* les biotransformations des isoflavones (Figure 29). Pour chaque isoflavone, trois métabolites hydroxylés ont été identifiés. Les mêmes isoformes des cytochromes semblent être impliquées dans les réactions de phase I de la génistéine et de la daïdzéine (Atherton *et al.*, 2006) (Figure 30). Ces expériences ont été confirmées par l'ajout d'anticorps monoclonal anti-cytochrome dans des préparations de microsomes hépatiques humains. De plus, il a été montré que le cytochrome 1A2 est également responsable de la biotransformation de la biochanine A en génistéine et de la formononétine en daïdzéine (Hu *et al.*, 2003).

### 3.3.2. Les biotransformations hépatiques des isoflavones lors des réactions de phase II

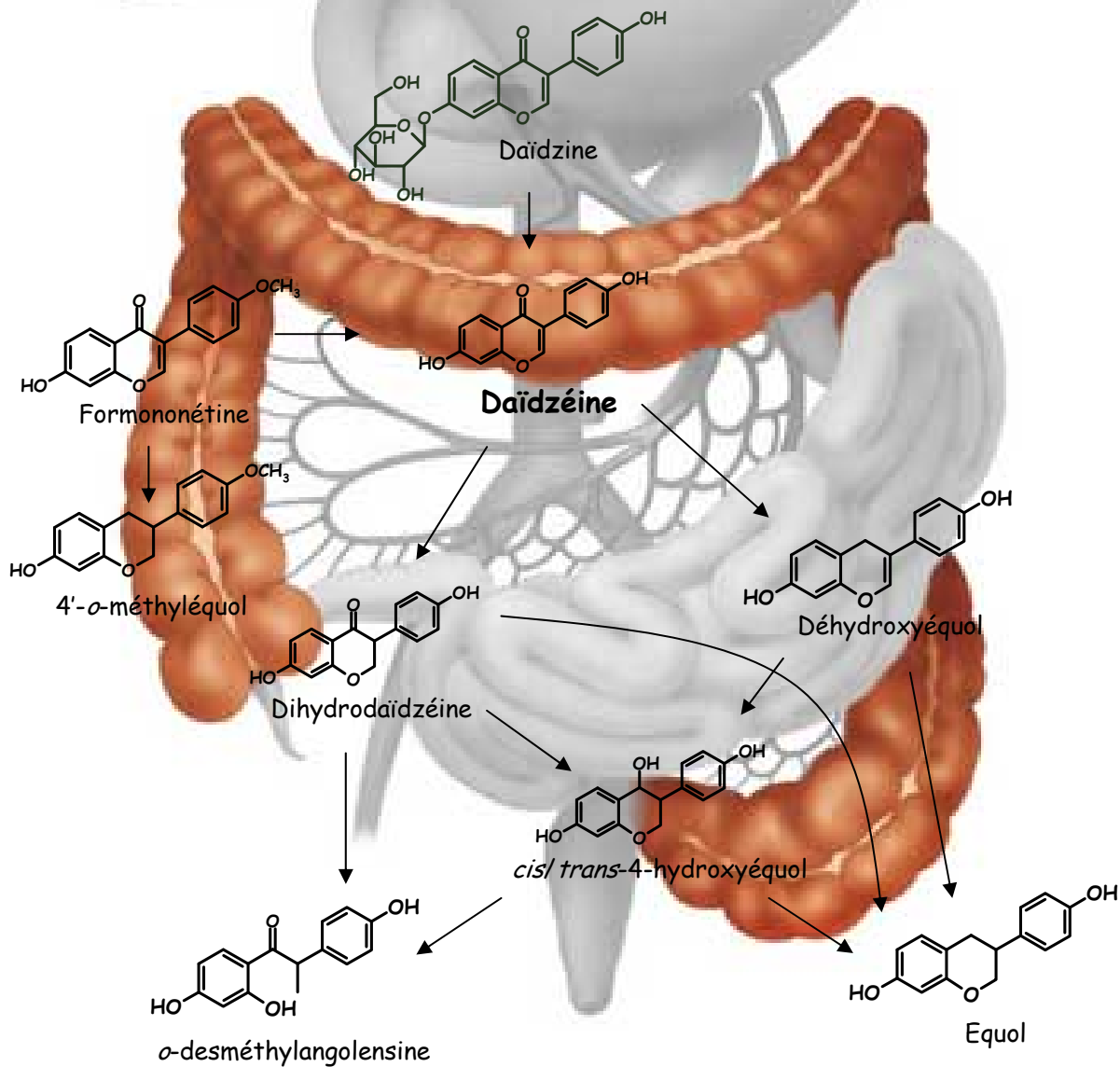
Les groupements fonctionnels issus des réactions de phase I peuvent ensuite être conjugués. Les métabolites issus des réactions de phase II seront couplés à des molécules telles que l'acide glucuronique ou des groupes sulfates.

En phase II du métabolisme hépatique, la conjugaison des isoflavones à l'acide glucuronique ou à l'acide sulfurique passe par l'action de l'UDP-glucuronosyltransferase (UDPGT) et de la sulfotransférase (SULT) du foie (Sfakianos *et al.*, 1997). Ces enzymes sont localisées à la surface du réticulum endoplasmique des cellules hépatiques et sur l'enveloppe nucléaire de différents types cellulaires (O'Leary *et al.*, 2001). Chez l'Homme, ce sont les enzymes UDPGT qui exercent une action plus importante sur les isoflavones, c'est pourquoi les métabolites majoritaires sont les isoflavones glucuronidées (Zhang *et al.*, 2003). L'activité globale des enzymes UDPGT hépatiques est relativement comparable entre la génistéine et la daïdzéine. En revanche, il existe des différences notables pour l'activité des différentes isoformes des enzymes. En effet, les UDPGT hépatiques 1A1, 1A9 et 1A4 sont plus affines pour la daïdzéine, alors que les 1A7 et 1A6 sont plus affines pour la génistéine (Doerge *et al.*, 2000). Ceci suggère une glucuronidation plus importante de la daïdzéine au niveau hépatique alors que la glucuronidation de la génistéine aurait lieu de façon préférentielle au niveau du côlon, où d'autres UDPGT, les 1A10 notamment, exercent leur activité (Tableaux 5 et 6).



**Figure 31. Le métabolisme de la génistéine**

D'après Rowland *et al.*, 2003



**Figure 32. Le métabolisme de la daïdzéine**

D'après Rowland *et al.*, 2003

Les activités des formes recombinantes SULT (1A1, 1A3, 1E1 et 2A1), testées *in vitro*, a été montrée avec les molécules de génistéine et de daïdzéine (Nishiyama *et al.*, 2002). Les valeurs de Km enzymatiques obtenues suggèrent que les SULT1A1 et SULT1E1 sont les isoformes principalement impliquées.

D'autre part, il existe plusieurs sites de conjugaison sur les isoflavones. C'est pourquoi, des métabolites couplés avec plusieurs groupes glucuronides, sulfates, voire un groupe glucuronide et un groupe sulfate sur une molécule d'isoflavone peuvent être détectés dans les échantillons biologiques (Kinjo *et al.*, 2004 ; Shelnut *et al.*, 2002 ). Enfin, la molécule d'équol semble être celle qui subit le moins ces transformations hépatiques, ce qui peut être lié à sa structure particulière : non plane avec un carbone chiral (Setchell *et al.*, 2002a).

### **3.3.3. Le foie est également un site de déconjugaison**

Bien que les activités de conjugaison soient majoritaires, des enzymes comme les  $\beta$ -glucuronidases ont été isolées au niveau du foie, mettant en évidence des activités de déconjugaison hépatique. Les  $\beta$ -glucuronidases sont situées à la surface interne du réticulum endoplasmique. La présence des enzymes de conjugaison et de déconjugaison dans les mêmes cellules et au sein des mêmes organites cellulaires semble être le mécanisme de régulation de la formation nette de glucuronides (Setchell *et al.*, 2002b).

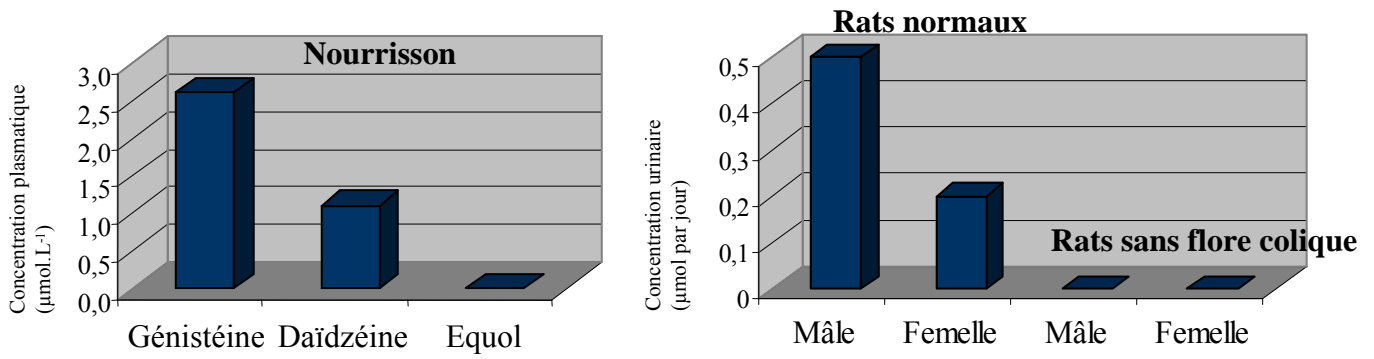
## **3.4. Les biotransformations des isoflavones par la microflore intestinale**

### **3.4.1. Le rôle de la microflore intestinale**

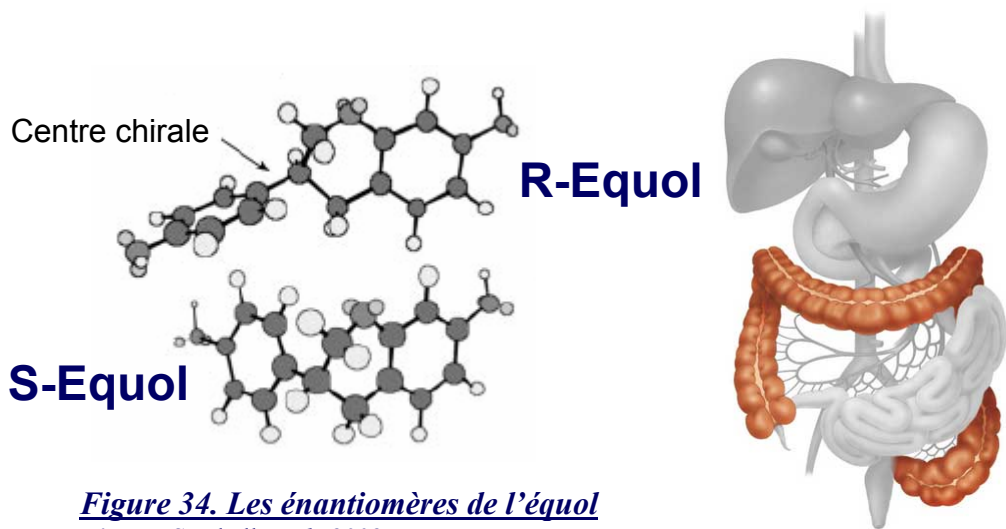
La microflore intestinale indigène est impliquée dans plusieurs mécanismes physiologiques, important pour la santé de leur hôte. Les principales implications des bactéries intestinales sont (1) un rôle métabolique, comme la fermentation des nutriments non digestibles et le métabolisme de la muqueuse endogène, (2) un rôle trophique, comme le contrôle de la prolifération et la différenciation des cellules épithéliales et (3) un rôle de protection puisqu'elles agissent comme une barrière de protection contre les pathogènes (Atkinson *et al.*, 2005).

### **3.4.2. L'action de la microflore intestinale : hydrolyse des formes conjuguées**

Le rôle de la flore bactérienne dans le métabolisme des isoflavones a largement été démontré *in vitro* et *in vivo*. En 1981, Setchell et collaborateurs rapportaient une excrétion



***Figure 33. Les preuves de l'origine bactérienne de l'équol***  
D'après Setchell *et al.*, 2002



***Figure 34. Les énantiomères de l'équol***  
D'après Setchell *et al.*, 2002

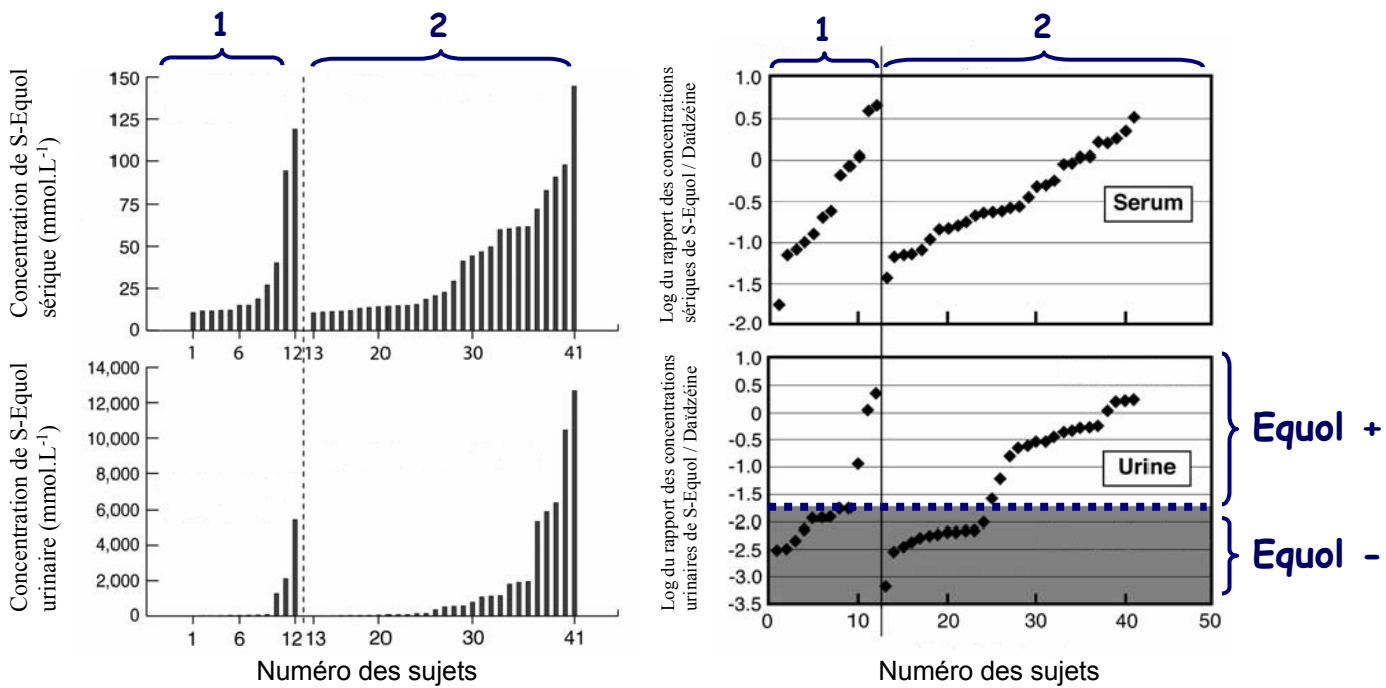
réduite des métabolites des isoflavones chez des volontaires sous traitement antibiotique (Setchell *et al.*, 1981). Parallèlement, Chang et Nair montraient la conversion de la daïdzéine en dihydrodaïdzéine et de génistéine en dihydrogénistéine (Chang *et al.*, 1995).

Il a été montré que les isoflavones aglycones peuvent subir plusieurs fermentations par les bactéries du côlon avant même l'absorption. Il en résulte un nombre important de métabolites de la génistéine et de la daïdzéine (*Figures 31 et 32*). Ces métabolites apparaissent au niveau plasmatique plusieurs heures après une ingestion de soja ; ce qui correspond au temps nécessaire aux isoflavones non absorbées ou issues du recyclage entéro-hépatique pour atteindre le côlon. Plusieurs études ont isolé des souches bactériennes impliquées dans le métabolisme des isoflavones. Afin d'illustrer ce propos, Hur et collaborateurs ont isolé deux souches bactériennes dont la première est impliquée dans la biotransformation de la daïdzéine en daïdzéine et de la génistéine en génistéine ; il s'agit d'*E.Coli* HGH21. La seconde souche (HGH6) réalise la transformation de la daïdzéine en dihydrodaïdzéine et de la génistéine en dihydrogénistéine (Hur *et al.*, 2000).

### **3.4.3. Le cas particulier de la biotransformation de la daïdzéine en équol**

En 1932, Marrian et Haslewood isolent pour la première fois la molécule d'équol dans l'urine d'une jument gravide et caractérisent sa structure : 7-hydroxy-3-(4'-hydroxyphenyl) - chromane (Marrian et Haslewood, 1932). Les concentrations d'équol sont corrélées alors avec les saisons : élevées en été et faibles en hiver. Nous savons aujourd'hui que ces concentrations sont en fait corrélées avec une alimentation plus riche en pâture de trèfle durant l'été.

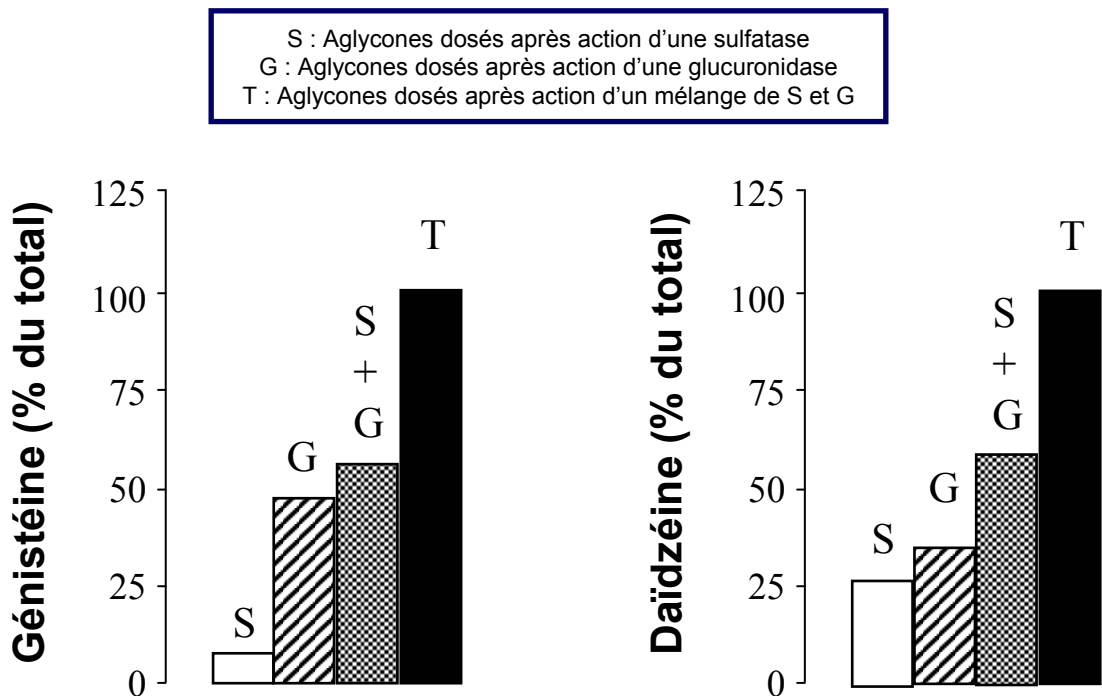
La production d'équol est issue du métabolisme de la daïdzéine par les bactéries de la flore colique. Les transformations métaboliques bactériennes incluent une déhydroxylation, une réduction, un clivage du cycle C et une déméthylation. L'implication d'une ou de plusieurs souches bactériennes dans ces 4 étapes n'est pas encore élucidée. L'équol n'est pas excrété chez des rats dont la flore bactérienne est altérée, ni chez des nourrissons chez qui la flore n'est pas encore mature, ce qui démontre bien l'importance des bactéries coliques pour cette transformation (Setchell *et al.*, 2002a) (*Figure 33*). L'inoculation de micro-organismes de la flore intestinale humaine dans des milieux de culture contenant des protéines de soja conduit à la production d'équol (Setchell *et al.*, 1984). Les espèces bactériennes responsables n'ont pas encore été toutes identifiées. Trois souches de bactéries sont néanmoins connues pour convertir la daïdzéine en équol *in vitro* : *Streptococcus intermedius*, *Ruminococcus productus* et *Bacteroides ovatus* (Setchell *et al.*, 2002a). L'équol ne peut donc pas, à ce titre,



1. Non végétariens (n = 12) ; 2. Végétariens (n = 29)

**Figure 35. Définition d'un producteur d'équol**

D'après Setchell et Cole, 2006



**Figure 36. Les métabolites circulants des isoflavones**

D'après Shelnutt *et al.*, 2002



être considéré comme un phyto-œstrogène, car il n'a jamais été isolé dans des produits végétaux.

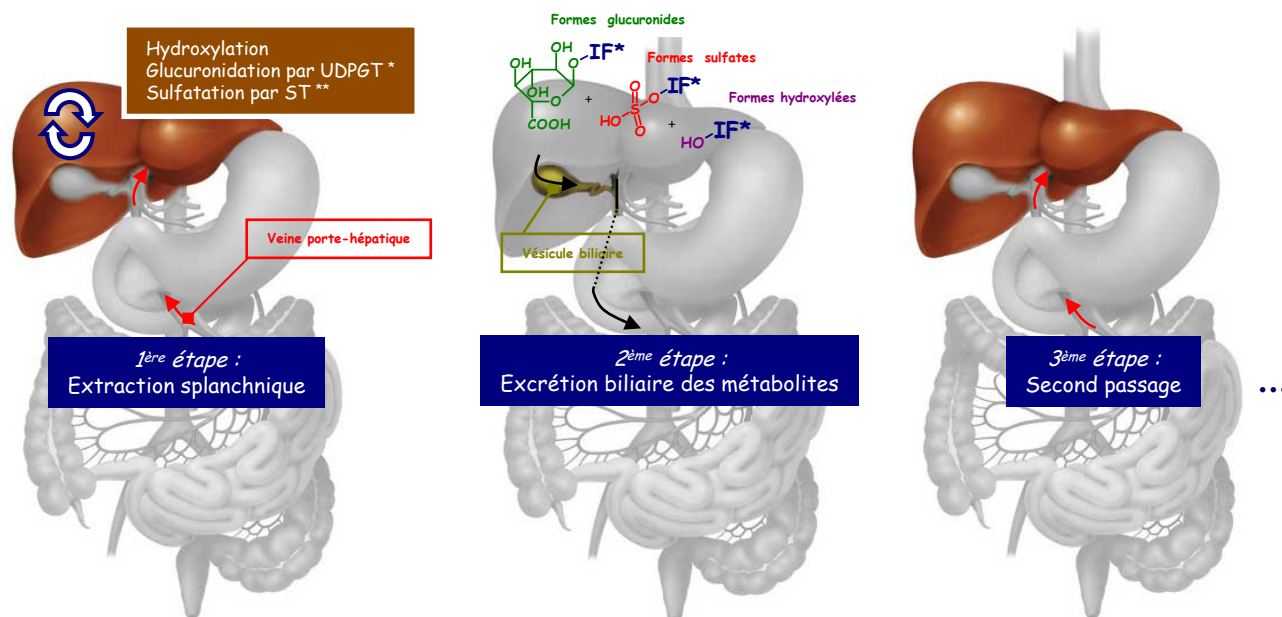
Sur un plan strictement chimique, l'équol est en fait un isoflavane, qui possède un atome de carbone chiral, ce qui lui confère des propriétés d'énantiométrie (*Figures 34*). Chez l'Homme, seul le S-équol serait métabolisé (Setchell *et al.*, 2005b). Néanmoins l'équol est produit seulement par une partie de la population, de 30 à 50 % selon les études, les méthodes d'analyse, les populations étudiées et leurs modes alimentaires (Setchell *et al.*, 2002a). Très récemment, il a même été avancé que 70 % de la population est équol-productrice au Japon (Messina, 2006), sans pour autant que cette valeur soit confirmée par d'autres études. Il existe également différents niveaux de production d'équol, ce qui peut justifier, en partie, les divergences selon les études. C'est pourquoi Setchell et Cole ont proposé une méthode pour classer les individus et définir leur statut de producteur d'équol. Il s'agit, en fait, de calculer le logarithme du rapport entre les quantités de S-équol et de daïdzéine excrétées dans les urines (Setchell et Cole, 2006) (*Figure 35*). Lorsque les valeurs obtenues à partir de plusieurs patients sont placées sur un même graphique, un seuil apparaît nettement et permet de différencier de façon rigoureuse les producteurs, des non-producteurs d'équol. Enfin, le phénotype « producteur d'équol » est stable avec le temps. Une étude a montré que 82 % des volontaires producteurs d'équol, produisaient encore de l'équol de 1 à 3 années plus tard (Frankenfeld *et al.*, 2005).

Enfin, la glycitéine, une autre isoflavone du soja, dont la structure est proche de la daïdzéine, pourrait également être un précurseur de l'équol directement ou *via* la daïdzéine (Simons *et al.*, 2005).

### **3.5. Le transport des isoflavones dans la circulation systémique**

#### **3.5.1. Les métabolites circulants et le transport des isoflavones dans le sang**

La conjugaison au niveau hépatique des isoflavones à des groupements polaires augmente leur solubilité dans les fluides biologiques. Les isoflavones conjuguées aux glucuronides représentent approximativement 50 et 30 % des métabolites circulants de la génistéine et de la daïdzéine respectivement, alors que les conjugués sulfates représentent 10 et 25 % des isoflavones totales. La détermination des concentrations en isoflavones conjuguées montrent bien que les isoflavones glucuronidées sont les métabolites circulants majoritaires chez l'Homme (Shelnutt *et al.*, 2002) (*Figure 36*). Une étude dans laquelle du sérum humain est incubé en présence d'équol montre que 49,7 % d'équol circule sous forme



\* UDPGT = Uridine DiPhospho Glucuronyl Transférase  
 \*\* ST = Sulfo Transférase

\* IF = Isoflavones

**Figure 37. Le recyclage entéro-hépatique des isoflavones**  
 D'après Vergne et Sauvant, 2006

libre (Nagel *et al.*, 1998). Les autres molécules sont liées à des protéines plasmatiques. Ces dernières peuvent être des protéines impliquées spécifiquement dans le transport d'hormones, telles que la SHBG. L'affinité de ces protéines pour les isoflavones est néanmoins bien plus faible : la constante d'affinité de la génistéine pour la SHBG est environ 1 000 fois moins élevée que celle de l'E<sub>2</sub> (Dechaud *et al.*, 1999). Comme d'autres xéno-œstrogènes, les isoflavones libres pourraient également se lier par des liaisons de faibles énergies, comme des liaisons hydrogène et/ou liaisons de Van Der Waals, à des protéines sériques qui ne remplissent pas des fonctions spécifiques premières de transport : c'est le cas de l'albumine (Reed et Fotherby, 1980).

### **3.5.2. La distribution des isoflavones**

A titre d'illustration, une prise alimentaire journalière de 50 mg d'isoflavones peut engendrer des taux circulants allant de 0,2 à 3,2  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  (de 50 à 800  $\text{ng.mL}^{-1}$ ) (Setchell et Cassidy, 1999). La relation entre la quantité totale d'un nutriment présent dans l'organisme et la concentration observée au niveau plasmatique est le volume de distribution (Vd). Les données de pharmacocinétique chez 19 volontaires indiquent que la daïdzéine et la génistéine, ingérées sous formes pures, ont un Vd important : 236 et 161 L respectivement (Setchell *et al.*, 2001).

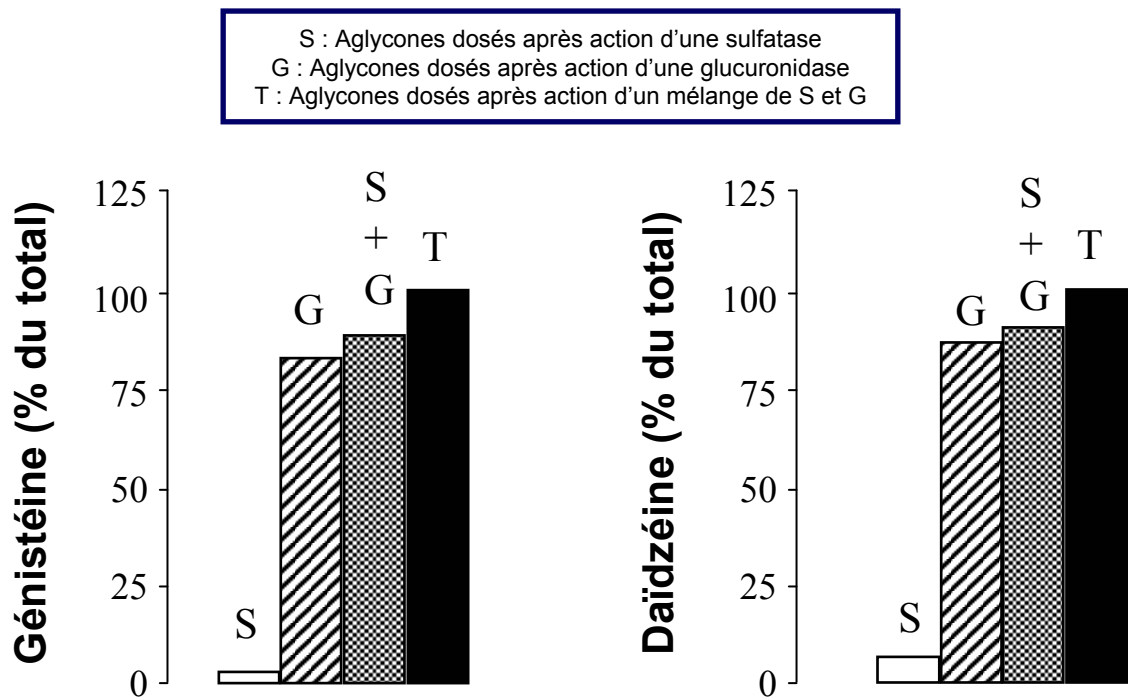
La façon dont les isoflavones traversent les parois des capillaires sanguins et rejoignent les cellules n'est pas encore élucidée. L'entrée des molécules liposolubles, telles que les hormones stéroïdiennes ou les xéno-œstrogènes, serait passive, alors que les enzymes de phase III interviendraient dans la sortie de ces molécules. De ce fait, les concentrations d'isoflavones aux niveaux intra-cellulaire et plasmatique sont différentes (Gu *et al.*, 2005).

De fortes concentrations d'isoflavones ont été mesurées dans des cellules mammaires de femmes pré-ménopausées (Hargreaves *et al.*, 1999), dans le lait maternel (Franke *et al.*, 2006) ou encore dans les fluides prostatiques (Morton *et al.*, 1997). Il a également été montré que les isoflavones sont capables de traverser la barrière hémato-encéphalique chez le rat (Setchell et Cassidy, 1999). Le passage des isoflavones dans ces compartiments particuliers peut suggérer de potentielles actions biologiques dans ces mêmes compartiments.

## **3.6. L'élimination des isoflavones**

### **3.6.1. L'élimination biliaire des isoflavones**

Outre ses capacités métaboliques, le foie participe à l'excrétion des nutriments hors de l'organisme par le biais du système biliaire. Après excrétion dans la bile, le métabolite se



**Figure 38. Les métabolites des isoflavones excrétés par voie urinaire**  
 D'après Shelnutt *et al.*, 2002

retrouve dans la lumière intestinale où il peut être réabsorbé : c'est le cycle entéro-hépatique (Figure 37).

Les isoflavones conjuguées, excrétées par la bile, subissent une recirculation entéro-hépatique dans la mesure où, une fois dans l'intestin, les  $\beta$ -glucuronidases et  $\beta$ -sulfatases de la flore bactérienne hydrolysent de nouveau les isoflavones conjuguées. Elles peuvent alors de nouveau être réabsorbées. En revanche, une partie des isoflavones est définitivement excrétée par les fèces. Plusieurs études ont analysé cette quantité excrétée chez l'Homme et toutes s'accordent sur le fait que les taux d'excrétion dans les fèces sont très faibles : des taux allant de 0,1 à 8,0 % de la dose ingérée sont rapportés (Watanabe *et al.*, 1998 ; Xu *et al.*, 1995 ; Zheng *et al.*, 2003).

Les variations inter-individuelles de l'excrétion fécale des isoflavones sont importantes puisque l'excrétion de daïdzéine peut varier d'un facteur 99 selon les patients, 110 pour la génistéine, 71 pour l'équol et 78 pour l'*o*-DMA. Toutefois, la fraction éliminée de génistéine est plus faible que celle de daïdzéine (Watanabe *et al.*, 1998 ; Wiseman *et al.*, 2004).

### 3.6.2. L'élimination urinaire des isoflavones

La plupart des molécules ingérées sont éliminées dans les urines, soit sous forme inchangée, soit sous forme de produits de dégradation. De façon intéressante, les formes chimiques des métabolites excrétés sont *quasi* exclusivement des formes glucuronides ; ce qui laisse à penser que des mécanismes de déconjugaison et de reconjugaison interviennent de nouveau lors de l'élimination rénale (Shelnutt *et al.*, 2002) (Figure 38). Ceci est corroboré par la présence d'enzymes de phase I et II au niveau rénal (Bock et Kohle, 2005).

L'excrétion urinaire des isoflavones est la voie majoritaire d'excrétion dans la mesure où les métabolites hépatiques des isoflavones sont hydrosolubles. Les données actuelles montrent un taux moyen d'excrétion urinaire de 8 à 60 % des isoflavones ingérées (Rowland *et al.*, 2003 ; Wiseman *et al.*, 2004). Ce paramètre est toutefois largement soumis aux variations inter-individuelles et à la durée de collection des échantillons urinaires. Wiseman et collaborateurs rapportent des excrétions urinaires variant d'un facteur 24 pour la génistéine, 85 pour la daïdzéine et 54 pour l'équol dans une étude incluant 76 personnes (Wiseman *et al.*, 2004).

Une étude de King et Bursill rapporte des fractions éliminées de  $62 \pm 6$  % de daïdzéine et de  $22 \pm 4$  % de génistéine (King et Bursill, 1998). Les mesures ont été effectuées sur une période de 35 h après la prise d'un repas à base de farine de soja. Le profil d'excrétion est une

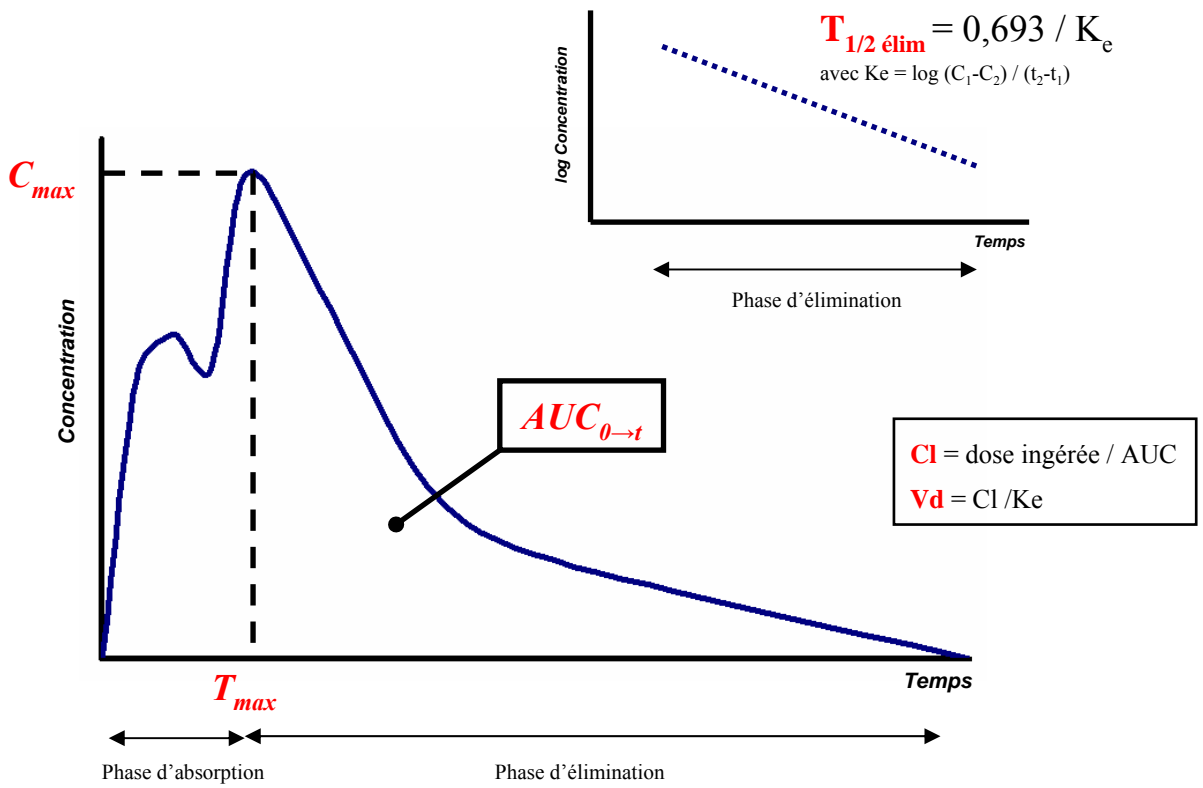


Figure 39. Profil pharmacocinétique des isoflavones et définition des paramètres associés

courbe en cloche pour les deux isoflavones avec un maximum d'excrétion entre 6 et 12 h. La décroissance n'est pas complète puisqu'à 35 h la quantité excrétée d'isoflavones n'est pas nulle. Dans cette même étude, les auteurs quantifient l'équol excrété. Il est intéressant de noter qu'il n'apparaît que 6 h après la prise d'aliments à base de soja, correspondant au temps nécessaire pour métaboliser la daïdzéine en équol, puis au passage de l'équol dans la circulation systémique, puis à la filtration rénale.

La fraction éliminée de daïdzéine est plus importante que celle de génistéine (25 % vs 8 %) sur une période de 24 h (Wiseman *et al.*, 2004). Ceci s'explique, en partie, par un plus fort poids moléculaire et une moins grande solubilité de la génistéine (Xu *et al.*, 1994). Zhang et collaborateurs rapportent, sur une période de 48 h suivant l'ingestion de lait de soja, des fractions urinaires de daïdzéine supérieures à celles de génistéine ( $48,6 \pm 23,1$  % vs  $29,7 \pm 17,8$  %), ceci malgré des concentrations plasmatiques plus élevées en génistéine. Ces dernières concentrations sont plus proches de l'étude de Wiseman et collaborateurs décrite précédemment. En effet, une partie des variations des fractions éliminées des isoflavones rapportées par différentes études peut être due à la durée d'échantillonnage pendant laquelle est évaluée cette fraction : 24 h pour certaines, 36 h ou 48 h pour d'autres. Or, des isoflavones sont encore excrétées par voie urinaire entre 24 et 48 h (Setchell *et al.*, 2003b). Il semble donc plus pertinent d'exprimer la fraction totale éliminée sur une période d'au moins 48 h.

L'excrétion urinaire des isoflavones est corrélée avec les doses ingérées d'isoflavones en prise unique, pour des doses allant de 9 à 36 mg d'isoflavones (Karr *et al.*, 1997). D'autre part, l'excrétion urinaire de la génistéine est également corrélée avec ses paramètres pharmacocinétiques plasmatiques, ce qui n'est pas le cas pour la daïdzéine (Setchell *et al.*, 2003b).

Dans tous les cas, les fractions éliminées sont relativement faibles. La transformation des composés initiaux en métabolites secondaires, issus de la flore bactérienne en particulier, explique en majeure partie la faible fraction éliminée dans les urines.

### **3.6.3. Les paramètres pharmacocinétiques associés à l'élimination des isoflavones**

La demi-vie d'élimination ( $T_{1/2 \text{ élim}}$ ) correspond au temps nécessaire pour passer d'une concentration plasmatique à sa moitié, quelle que soit la concentration plasmatique atteinte. Selon les études de biodisponibilité chez l'Homme, les valeurs de  $T_{1/2 \text{ élim}}$  des isoflavones s'étalent de 4 à 10 h. Seule l'étude de Richelle et collaborateurs présente des  $T_{1/2 \text{ élim}}$  allant jusqu'à 17 h (Richelle *et al.*, 2002).

**Tableau 7. Les paramètres pharmacocinétiques plasmatiques des isoflavones**

Références	Sujets inclus	Matrice des IF	Dose ingérée	Durée	Paramètres pharmacologiques plasmatiques			
					AUC (nmol.mL <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> )	Cmax (nmol.mL <sup>-1</sup> )	Tmax (h)	T <sub>1/2</sub> (h)
(Xu <i>et al.</i> , 1994)	n = 12, pre-♀	Lait de soja lyophilisé (D:G = 1,3:1)	0,31 mg par kg G 0,39 mg par kg D 0,57 mg par kg G 0,73 mg par kg D 0,87 mg par kg G 1,13 mg par kg D	24 h		0,74 ± 0,13 0,79 ± 0,01 1,07 ± 0,18 1,22 ± 0,19 2,15 ± 0,39 2,24 ± 0,34		
(King et Bursill, 1998)	n = 6, ♂	Farine de soja mélangé à du lait	0,97 mg par kg G 0,67 mg par kg D	24 h		4,1 ± 0,9 3,1 ± 0,4	8,0 ± 0,7 7,4 ± 0,7	5,7 ± 1,3 4,7 ± 1,1
(Setchell <i>et al.</i> , 2001)	n = 6, pre-♀ n = 6, pre-♀ n = 3, pre-♀ n = 4, pre-♀	Composés purs	50 mg G 50 mg D 50 mg G-Gly 50 mg D-Gly	48 h	16,7 11,6 18,3 17,7	1,26 ± 0,27 0,76 ± 0,12 1,26 ± 0,47 1,55 ± 0,24	9,3 ± 1,3 6,6 ± 1,4 9,3 ± 1,3 9,0 ± 1,0	6,8 ± 0,8 9,3 ± 1,3 7,0 ± 0,8 4,6 ± 0,5
(Richelle <i>et al.</i> , 2002)	n = 6, post-♀	Boisson à base de soja contenant 1mg IF par kg	G D G-Gly D-Gly	34 h	20 ± 5 44 ± 4 21 ± 4 50 ± 5	0,8 ± 0,1 3,3 ± 0,2 0,8 ± 0,1 3,5 ± 0,4	8,2 ± 1,0 8,3 ± 1,0 7,3 ± 2,0 9,2 ± 1,1	16,6 ± 5,3 6,7 ± 0,4 17,8 ± 2,7 6,8 ± 0,7
(Setchell <i>et al.</i> , 2003a)	n = 10, peri-♀ et pre-♀	10 g de soja 20 g de soja 40 g de soja	9,8 mg G 6,6 mg D 19,6 mg G 13,2 mg D 39,2 mg G 26,4 mg D	48 h	10,1 ± 2,1 5,7 ± 0,8 17,3 ± 3,9 10,1 ± 2,0 31,2 ± 6,7 18,09 ± 2,2	0,59 ± 0,11 0,43 ± 0,08 1,22 ± 0,30 0,84 ± 0,19 2,2 ± 0,4 1,65 ± 0,2	4,9 ± 0,8 5,8 ± 0,7 4,0 ± 0,7 6,4 ± 0,9 6,0 ± 0,6 6,0 ± 0,5	10,8 ± 0,7 8,7 ± 0,7 10,0 ± 0,5 7,9 ± 0,7 9,6 ± 0,4 7,5 ± 0,2



La capacité globale de l'organisme à éliminer une molécule est la clairance (Cl), définie comme le volume de plasma totalement épuré par unité de temps : les valeurs vont de 4,7 à 14,8 L.h<sup>-1</sup> (Cassidy *et al.*, 2006b ; Setchell *et al.*, 2003a ).

### **3.7. Les profils pharmacocinétiques des isoflavones**

L'allure générale des profils pharmacocinétiques des isoflavones se caractérise généralement par (1) une augmentation rapide de la concentration des isoflavones par rapport au temps, due à une absorption rapide des composés, (2) la présence de plusieurs pics d'absorption, qui sont les reflets d'une recirculation entéro-hépatique de ces composés et/ou de plusieurs sites d'absorption et (3) d'une élimination linéaire en échelle logarithmique. Une courbe pharmacocinétique théorique des isoflavones est représentée en *figure 39*.

L'aire sous la courbe (AUC<sub>0→t</sub>) est le paramètre pharmacocinétique qui correspond à l'intégrale de la concentration plasmatique sur un intervalle de temps défini. Ce paramètre est évidemment dépendant de la dose ingérée et, selon les études, l'AUC des isoflavones varie de 0,2 à 1 nmol.mL<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup> par mg d'isoflavone ingérée.

L'ensemble des paramètres pharmacocinétiques décrits dans la littérature, est toutefois assez variable selon les études (*Tableau 7*). Des raisons strictement expérimentales, comme la durée de l'étude, l'échantillonnage ou bien encore la technique de dosage des isoflavones, peuvent expliquer ces variations. Néanmoins, de nombreux autres facteurs causent ces variations.

### **3.8. Les facteurs influant sur la biodisponibilité des isoflavones**

Malgré de contraignantes restrictions alimentaires avant et pendant les essais cliniques, de nombreuses études ont rapporté des données de biodisponibilité variables selon les sujets d'une même étude, que ce soit des données plasmatiques ou des données urinaires. Plusieurs paramètres ont été proposés pour expliquer cette variabilité.

(Setchell <i>et al.</i> , 2003b)	n = 8, pre-♀	[ <sup>13</sup> C] D	0,4 mg par kg	72 h	5,0	0,31	8,2
			0,8 mg par kg		8,7	0,71	7,2
		[ <sup>13</sup> C] G	0,4 mg par kg	6,0	0,55	7,5	
			0,8 mg par kg	9,8	0,88	7,4	
(Zubik et Meydani, 2003)	n = 15, peri-♀ et pre-♀	Gélules	14,2 mg G	48 h	8,3 ± 4,2	0,53 ± 0,33	
			15,9 mg D		8,3 ± 2,6	0,53 ± 0,21	
			27,5 mg G-Glu		8,9 ± 4,7	0,57 ± 0,30	
			20,5 mg D-Glu		6,2 ± 1,7	0,40 ± 0,10	
(Kano <i>et al.</i> , 2006)	n = 12, 9♂ et 3♀	Lait de soja	21,6 mg D (équi)	24 h	4,35 ± 0,46	0,47 ± 0,06	6,0 ± 0,4
			23,9 mg G (équi)		4,51 ± 0,09	0,41 ± 0,06	5,9 ± 0,4

---

### 3.8.1. L'effet de la microflore intestinale

L'importance du rôle joué par les micro-organismes coliques a été mis en évidence, aussi bien au niveau de l'absorption que du métabolisme proprement dit. Or, chaque individu est caractérisé par une flore qui lui est propre. La preuve irréfutable est la production d'équol dans une partie de la population : seulement 30 à 50 % des individus (Rowland *et al.*, 2003). Aussi Rowland et collaborateurs rapportent une excrétion urinaire d'équol variant d'un facteur 664 entre les patients étudiés (Rowland *et al.*, 2000).

L'exemple de l'équol est sûrement le mieux caractérisé. Toutefois, il existe plusieurs métabolites secondaires de la daïdzéine et de la génistéine (*Figures 31 et 32*), issus de biotransformations bactériennes, qui peuvent être autant de sources de variations interindividuelles du métabolisme des isoflavones.

### 3.8.2. L'effet du genre

Il n'existe à l'heure actuelle aucun métabolite qui serait spécifiquement présent dans une population de même sexe. Une étude suggère toutefois que les femmes et les hommes ne répondent pas de la même façon à une ingestion chronique d'isoflavones de soja. Lu et collaborateurs ont montré que les fractions éliminées de daïdzéine et de génistéine diminuaient chez des femmes consommant du soja pendant un mois, alors que ces fractions augmentaient chez les hommes (Lu et Anderson, 1998). En revanche, Wiseman et collaborateurs ne montrent aucun effet du genre sur les taux sériques d'isoflavones atteints ainsi que sur les excrétions urinaire et fécale (Wiseman *et al.*, 2004). Plus récemment, la biodisponibilité comparée des isoflavones chez 21 hommes et 21 femmes pré-ménopausées, ne montre pas de différences majeures dans les paramètres pharmacocinétiques des isoflavones, à l'exception du Cmax et de la Cl de la daïdzéine (Cassidy *et al.*, 2006b).

### 3.8.3. L'effet de l'âge

Setchell et collaborateurs rapportaient en 1997 que l'âge n'est pas une source avérée de variations interindividuelles du métabolisme des isoflavones. Il a seulement été démontré que pendant les premiers mois de la vie, la biotransformation de la daïdzéine en équol n'est pas observée ; ceci étant la conséquence d'une flore bactérienne immature (Setchell *et al.*, 1997). Ils ajoutent, en 2003, que le statut ménopausique n'induit pas de variation de la biodisponibilité des isoflavones (Setchell *et al.*, 2003b).

Plus récemment, la biodisponibilité comparée des isoflavones chez 21 femmes pré-ménopausées et 17 femmes post-ménopausées, montre que seule l'AUC<sub>0→∞</sub> de la daïdzéine est plus forte chez les femmes post-ménopausées. Tous les autres paramètres



pharmacologiques de la daïdzéine et de la génistéine sont les mêmes dans ces deux groupes. Cette étude ne montre ainsi aucun effet majeur de l'âge sur la biodisponibilité des isoflavones (Cassidy *et al.*, 2006b).

#### **3.8.4. L'effet de l'exposition précoce au soja**

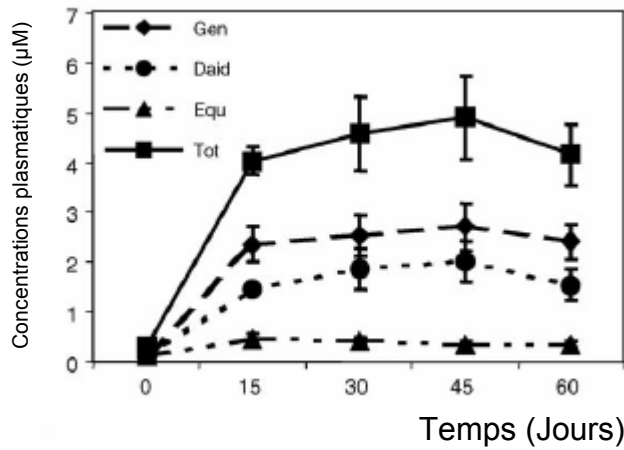
En premier lieu, il est intéressant de rappeler que des dosages de phyto-œstrogènes dans des plasmas de cordons ombilicaux ou dans des liquides amniotiques ont montré que ces composés pouvaient passer au travers de la barrière placentaire (Adlercreutz *et al.*, 1999). Les concentrations d'isoflavones atteintes dans le fluide amniotique sont de l'ordre de la centaine de ng.mL<sup>-1</sup> (Setchell, 1998).

D'autre part, les formulations de lait de soja pour nourrissons contiennent des concentrations importantes d'isoflavones, de 17,50 à 38,10 mg.L<sup>-1</sup> (Bennetau-Pelissero *et al.*, 2003), alors que les concentrations retrouvées dans les laits maternels sont bien plus faibles et sont de l'ordre de 5 à 6 µg.L<sup>-1</sup> (Setchell *et al.*, 1997). En relation avec le poids corporel, les apports d'isoflavones alimentaires sont 6 à 11 fois plus élevés chez les nourrissons que chez les adultes. Les enfants nourris au lait de soja représentent ainsi aujourd'hui la population la plus exposée, bien qu'elle soit considérée comme la plus vulnérable. Aussi, les concentrations sériques d'isoflavones sont très élevées puisque des doses allant de 654 à 1 775 µg.L<sup>-1</sup> ont été décrites (Setchell *et al.*, 1997). D'autre part, la microflore bactérienne des nourrissons n'étant pas mature, il ne semble pas que les composés tels que la génistéine et la daïdzéine soient métabolisés. Toutefois, aucune étude ne relate à ce jour l'effet d'une exposition précoce aux isoflavones de soja sur la biodisponibilité chez l'adulte de ces molécules.

#### **3.8.5. L'effet de l'exposition chronique au soja**

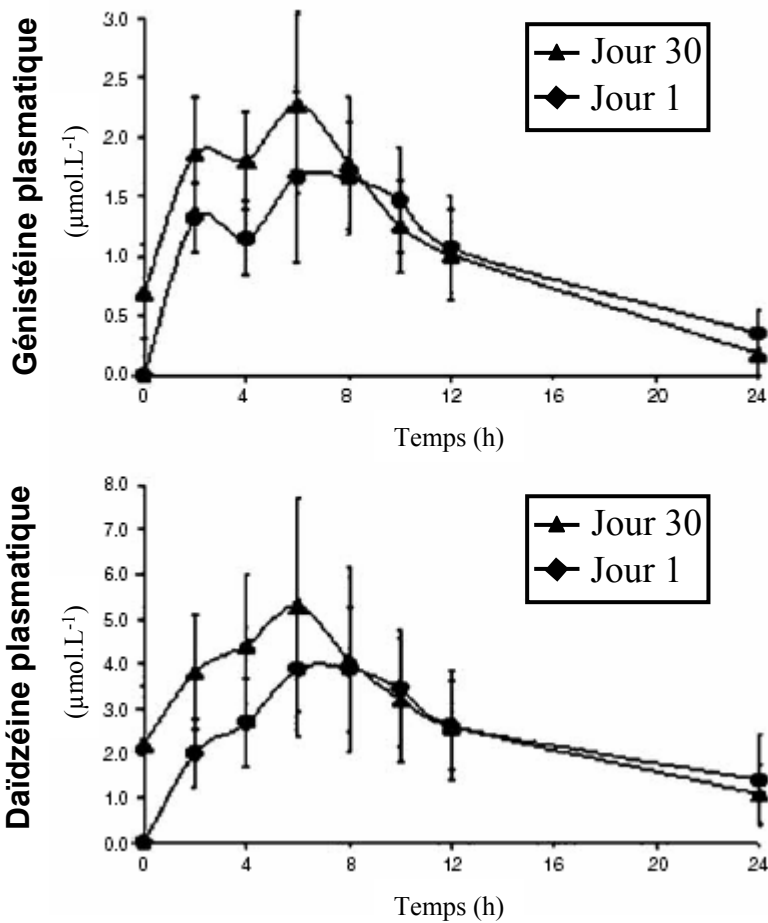
Quelques études ont démontré qu'une exposition chronique au soja n'entraînait pas de changement majeur dans le métabolisme des isoflavones, mais pouvait modifier les profils d'excrétion de la génistéine et de la daïdzéine en augmentant les T<sub>1/2</sub> élim. (Lu *et al.*, 1995). Wiseman et collaborateurs concluent également après une intervention de 10 semaines chez 76 femmes qu'une consommation chronique de soja (104 vs 0,54 mg d'isoflavones ingérées par jour) n'induit pas d'effet majeur sur le métabolisme intestinal des isoflavones et que l'activité des bactéries responsables de la transformation de la daïdzéine en équol n'est pas stimulée par une forte consommation de soja (Wiseman *et al.*, 2004).

Une exposition chronique, avec des prises suffisamment rapprochées, peut en revanche, entraîner des variations des profils pharmacocinétiques des isoflavones. Dans la mesure où les T<sub>1/2</sub> élim des isoflavones sont d'environ 8 h, ces composés peuvent s'accumuler



**Figure 40. Plateau pharmacocinétique atteint après ingestion chronique d'isoflavones**

D'après Mathey *et al.*, 2006



**Figure 41. Profils pharmacocinétiques à J1 et après ingestion chronique d'isoflavones (J30)**

D'après Védrine *et al.*, 2006

et atteindre des plateaux pharmacocinétiques. Mathey et collaborateurs ont montré l'existence d'un tel plateau atteint chez des femmes ménopausées consommant régulièrement, durant 60 jours, une grande quantité d'isoflavones de soja, en une prise bijnournalière (matin et soir) de 50 mg d'isoflavones, équivalent aglycone (Mathey *et al.*, 2006) (*Figure 40*).

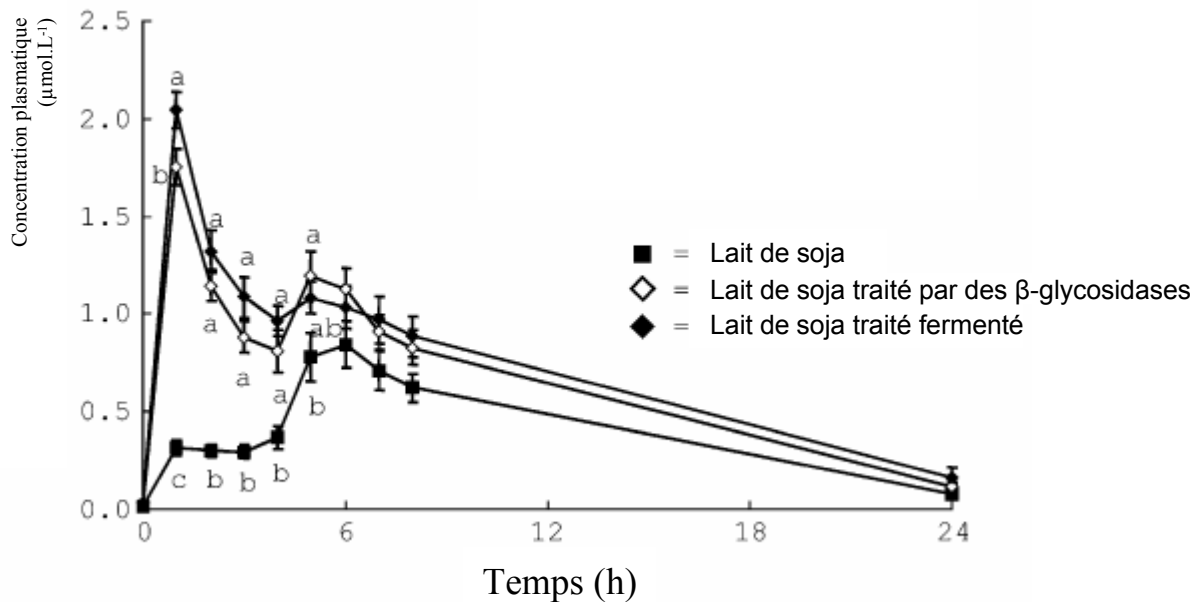
Des auteurs s'intéressent également à l'effet d'une exposition prolongée du soja sur la production d'équol. Une exposition prolongée aux isoflavones, durant 1 mois, n'induit pas la capacité de produire de l'équol chez des femmes initialement non-productrices et ne modifie donc pas les voies métaboliques des isoflavones. Les profils pharmacocinétiques plasmatique et urinaire sont similaires au début de l'étude et 30 jours après consommation d'isoflavones de soja (Vedrine *et al.*, 2006) (*Figure 41*). Enfin, Frankenfeld et collaborateurs ont mené une étude de stabilité du métabolisme de la daïdzéine sur 2 années. Chez 92 patients, 90 % et 41 % de ces patients produisaient de l'*o*-DMA et de l'équol, respectivement. Dans cette même cohorte, deux ans plus tard, les auteurs trouvaient un taux de conservation respectif de 89 % et 82 % de ces profils métaboliques et concluaient à une stabilité des phénotypes du métabolisme de la daïdzéine chez un même individu (Frankenfeld *et al.*, 2005).

### **3.8.6. L'effet de la forme chimique ingérée**

#### **3.8.6.1. Daïdzéine vs génistéine**

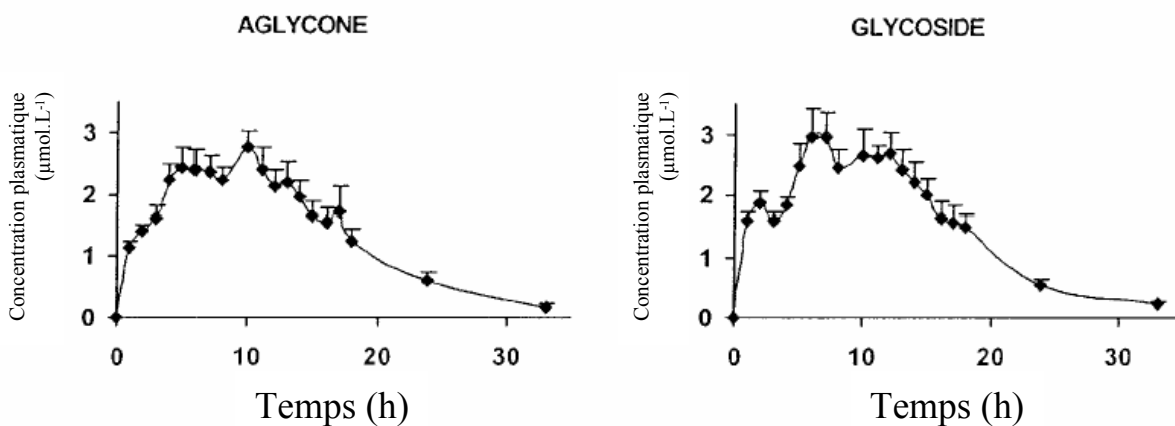
Les résultats des études de biodisponibilité qui visent à comparer la daïdzéine et la génistéine sont assez controversés. Une première étude a montré une meilleure biodisponibilité de la daïdzéine par rapport à celle de la génistéine (Xu *et al.*, 1994). Une seconde étude décrit une biodisponibilité semblable des deux composés après ingestion d'un repas à base de farine de soja (King et Bursill, 1998) et insiste sur l'échantillonnage insuffisant de l'étude de Xu et collaborateurs pour conclure à une meilleure biodisponibilité. Enfin, plus récemment, une étude de Setchell et collaborateurs relate une biodisponibilité relative plus importante pour la génistéine ( $AUC = 168 \text{ nmol}\cdot\text{mL}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ ) que pour la daïdzéine ( $AUC = 114 \text{ nmol}\cdot\text{mL}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ ) après ingestion de ces composés sous forme pure (Setchell *et al.*, 2001).

Néanmoins, lorsque des volontaires ingèrent la même quantité (exprimée en mole) de daïdzéine et de génistéine, la daïdzéine atteint des concentrations plasmatiques plus élevées (Setchell *et al.*, 2001 ; Setchell *et al.*, 2003b). Toutefois, dans la plupart des études cliniques, la comparaison de la biodisponibilité de ces deux isoflavones n'est pas le but premier et aucune étude n'a été construite et menée pour conclure sur ce point. Ceci est probablement dû



**Figure 42. Effet de la forme chimique ingérée (aglycone vs glycoside) sur la biodisponibilité des isoflavones**

D'après Kano *et al.*, 2006



**Figure 43. Effet de la forme chimique ingérée (aglycone vs glycoside) sur la biodisponibilité des isoflavones**

D'après Richelle *et al.*, 2002



au fait que les paramètres pharmacologiques sanguins de ces deux composés sont relativement proches.

En revanche, des différences notables ont été mises en évidence concernant l'excrétion de ces deux composés. Plusieurs auteurs ont décrit une fraction éliminée de la daïdzéine bien plus importante que celle de la génistéine (Bloedon *et al.*, 2002 ; Busby *et al.*, 2002 ; King et Bursill, 1998 ) et, ce parfois, même en dépit d'une biodisponibilité sérique équivalente.

### 3.8.6.2. Formes aglycones vs formes glycosilées

Plusieurs études montrent que les formes aglycones, que l'on peut trouver dans des aliments à base de soja fermenté comme le tofu ou le tempeh, présentent une meilleure biodisponibilité. Une ingestion chronique de tempeh conduit à des taux urinaires de daïdzéine et de génistéine plus élevés que les taux retrouvés chez des patients consommant des produits à base de soja non fermenté (Hutchins *et al.*, 1995). Izumi et collaborateurs ont démontré que les isoflavones aglycones présentent une biodisponibilité globale plus importante que leurs équivalents glycosilés, principalement en raison de pics d'absorption plus élevés (Izumi *et al.*, 2000). La biodisponibilité des isoflavones a également été comparée dans trois laits de soja : (1) un lait classique ou non traité, (2) un lait traité par des  $\beta$ -glycosidases (ESM) et (3) un lait de soja fermenté (FSM). Les isoflavones aglycones des laits dits traités sont absorbées plus rapidement et en plus grande quantité que les isoflavones glycosilées du lait classique (Kano *et al.*, 2006) (*Figure 42*).

Enfin, la biodisponibilité des isoflavones a été comparée après une ingestion de tempeh ou de protéines végétales texturées (PVT) dans lequel les isoflavones sont majoritairement sous forme glycosilée (Cassidy *et al.*, 2006b). Les  $T_{max}$  et les  $T_{1/2 \text{ élim}}$  sont les mêmes, quelque soit la forme ingérée. En revanche, les  $C_{max}$  des isoflavones sont supérieures après une ingestion de tempeh. Il en est de même pour les  $AUC_{0 \rightarrow \infty}$  (+ 20 à 120 % pour la daïdzéine, selon les individus).

Toutefois la controverse existe et plusieurs études relatent une biodisponibilité équivalente des formes aglycones ou des formes glycosilées, voire même une meilleure biodisponibilité de cette dernière forme. Par ailleurs, une hydrolyse enzymatique préalable à l'ingestion des isoflavones glycosilées en isoflavones aglycones n'augmente pas leur biodisponibilité (Richelle *et al.*, 2002) (*Figure 43*).

L'utilisation de composés purs a montré une meilleure biodisponibilité des composés glycosilés comparée à leurs formes aglycones respectives. En outre, il n'existe pas de production d'équol chez des volontaires ingérant des aglycones alors que 30 % d'entre eux en



produisent suite à une ingestion de glycosides (Setchell *et al.*, 2001). En revanche, une consommation de tempeh, comparée à une consommation de PVT, entraîne une excrétion urinaire plus forte en équol chez des équol-producteurs (Faughnan *et al.*, 2004).

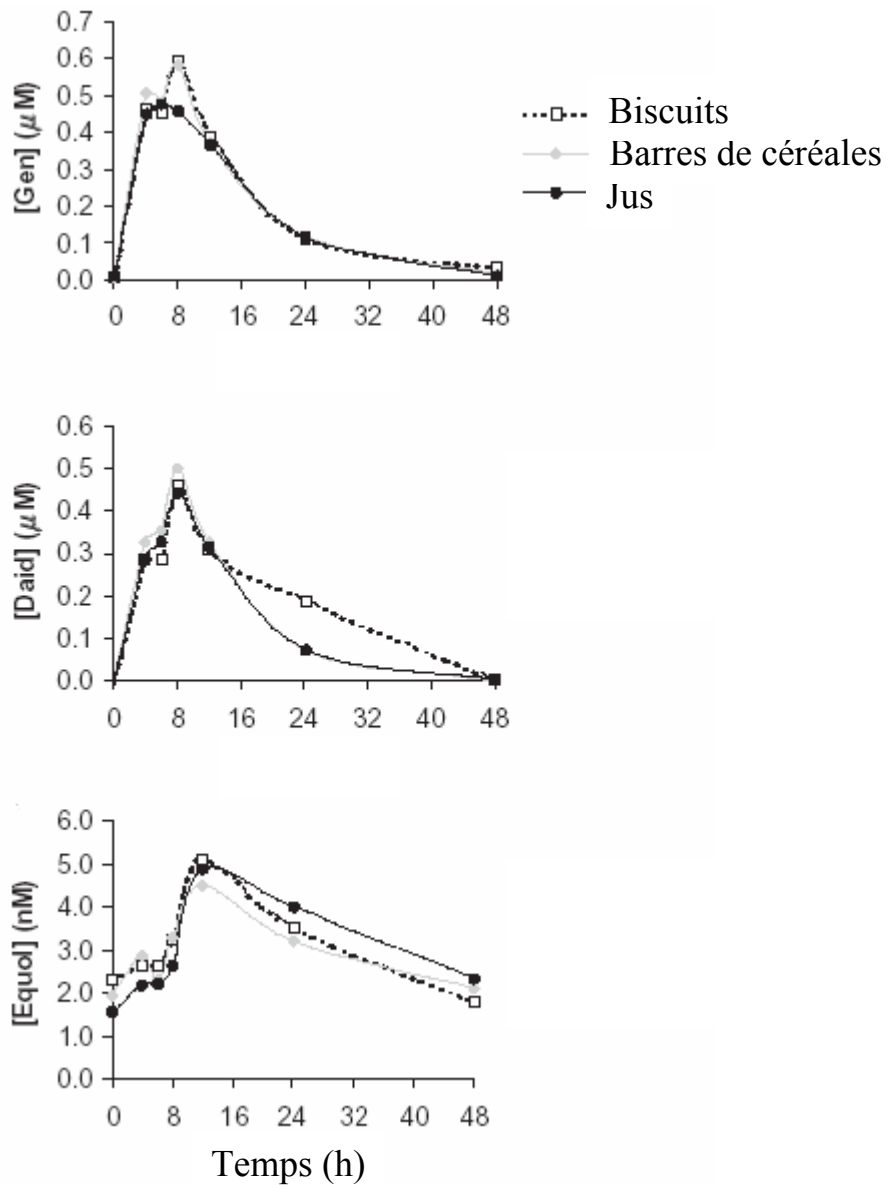
### 3.8.7. L'effet des matrices alimentaires

Les isoflavones sont absorbées à partir d'un large panel de produits alimentaires dérivés du soja et certaines études ont montré que la matrice alimentaire avait un effet sur les profils pharmacocinétiques d'absorption et d'élimination des isoflavones. Plusieurs études de biodisponibilité utilisent des matrices liquides comme des laits de soja ou bien des boissons protéiques à base de soja. La solubilité d'un nutriment dans l'intestin influence la capacité d'absorption. Les isoflavones contenues dans ces boissons sont majoritairement sous forme glycosilée et sont donc plus solubles. Les isoflavones issues d'une matrice liquide seront donc absorbées plus rapidement et en plus grande quantité, que les isoflavones contenues dans une matrice solide, pour laquelle la vidange stomacale est plus longue (Cassidy, 2006).

Une étude récente a montré que les Tmax de la daïdzéine et de la génistéine étaient plus courts de 2 h environ après ingestion de lait de soja comparé à du PVT et un Cmax de la daïdzéine également plus élevé ( $2,55 \pm 1,07$  vs  $1,09 \pm 0,39$  nmol.mL<sup>-1</sup> par mg de daïdzéine ingérée). Il en résulte une AUC de la daïdzéine plus élevée ( $28,94 \pm 10,02$  vs  $15,41 \pm 4,02$  nmol.h<sup>-1</sup>.mL<sup>-1</sup> par mg de daïdzéine ingérée) et donc une meilleure biodisponibilité globale (Cassidy *et al.*, 2006b).

Une autre étude compare la biodisponibilité des isoflavones ajoutées pour les besoins de l'étude dans trois produits alimentaires : des biscuits, des barres chocolatées et du jus d'orange. Les paramètres de biodisponibilité de la daïdzéine restent inchangés, le Tmax de la génistéine est atteint plus tôt après consommation du jus d'orange comparé aux deux autres produits, validant une nouvelle fois l'hypothèse d'une absorption plus rapide des isoflavones contenues dans les liquides (de Pascual-Teresa *et al.*, 2006) (*Figure 44*).

D'autre part, dans un cadre pharmacologique pratique, il est intéressant de contrôler les paramètres d'absorption, si bien que certaines études utilisent des matrices de compléments alimentaires volontairement complexes. Une étude de Setchell et collaborateurs décrit la formulation d'une gélule à base d'isoflavones compactées dans de la cellulose microcristalline puis recouverte d'un mélange d'éthyl cellulose et d'hydroxypropyl cellulose. Cette formulation permet ainsi d'atteindre des T<sub>1/2 élim</sub> plus importants que ceux classiquement décrits :  $11,4 \pm 1,2$  h pour la daïdzéine et  $10,2 \pm 0,9$  h pour la génistéine (Setchell *et al.*, 2005a). Ces matrices permettent ainsi de libérer progressivement les isoflavones dans



**Figure 44. Effet de la matrice sur la biodisponibilité des isoflavones**  
D'après de Pascual-Teresa *et al.*, 2005

**Tableau 8. Composition des régimes alimentaires**

D'après Xu *et al.*, 2000

	« Basic Food »	« Self-Selected »	« Ad Libitum »
Protéines (g)	58 ± 3	81 ± 7	85 ± 8
Acides gras totaux (g)	44 ± 2	57 ± 5	63 ± 6
Cholestérol (mg)	54 ± 0	127 ± 7	118 ± 6
Acides gras saturés (g)	15 ± 0	24 ± 2	25 ± 2
Acides gras mono insaturés (g)	23 ± 1	27 ± 3	31 ± 3
Fibres alimentaires solubles (g)	2,5 ± 0,1	2,7 ± 0,7	2,5 ± 0,8
Fibres alimentaires non solubles (g)	9,2 ± 0,3	10,2 ± 2,9	9,7 ± 1,2

l'intestin, d'augmenter le  $T_{1/2 \text{ élim}}$  des composés et d'atteindre un plateau pharmacologique après une prise chronique.

### 3.8.8. L'effet des régimes alimentaires

L'effet de trois régimes alimentaires différents sur la biodisponibilité chez 8 femmes entre 20 et 41 ans a été comparé (Xu *et al.*, 2000). Ces régimes sont désignés comme suit : « basic food », « self-selected » et « ad libitum ». La composition de ces régimes est présentée dans le [tableau 8](#). Malgré un apport plus important en lipides et protéines des deux derniers régimes (+ 40 %) par rapport au « basic food », aucune différence des paramètres plasmatiques et urinaires des isoflavones n'est observée. En prise unique, le régime alimentaire ne semble pas entraîner de variation de la biodisponibilité des isoflavones.

Une majeure partie des études, qui visent à comparer les effets des régimes alimentaires, s'est focalisée sur les moyens, *via* l'alimentation, d'augmenter la production d'équol. Adlercreutz et collaborateurs suggèrent que les personnes, dont les repas sont composés majoritairement de graisses animales, possèdent une flore bactérienne capable de métaboliser la daïdzéine en équol. En fait, Adlercreutz a corrélé de façon significative l'excrétion d'équol avec l'apport total de graisse et la consommation de viande ( $p < 0,01$  et  $p < 0,05$ , respectivement) (Adlercreutz *et al.*, 1991). Lampe et collaborateurs ont confirmé que les corrélations entre la production d'équol et la consommation de produits carnés ainsi que de graisses animales sont également significatives ( $r^2 = 0,31$ ,  $p = 0,002$  et  $r^2 = 0,27$ ,  $p = 0,007$ , respectivement) (Lampe *et al.*, 1998). La consommation de glucides et de fibres alimentaires favoriseraient, par ailleurs, la production d'équol (Song *et al.*, 2006). De tels régimes alimentaires favoriseraient l'environnement bactérien nécessaire à la production d'équol.

### 3.8.9. L'effet de l'appartenance à une ethnie

Une étude récente rapporte des différences dans le métabolisme des isoflavones en fonction de l'ethnie. Cette étude compare la capacité à produire de l'équol et de l'*o*-DMA au sein d'une population asiatique de Corée ( $n = 91$ ) et d'une population caucasienne des Etats-Unis ( $n = 222$ ). La prévalence du phénotype « équol-productrice » est plus forte chez les coréennes (51 vs 36 %,  $p = 0,015$ ), alors que la prévalence du phénotype « *o*-DMA productrice » est moins forte (84 vs 92 %,  $p = 0,03$ ) (Song *et al.*, 2006). Il semble bien que ce soit le facteur ethnie qui soit responsable de la différence reportée. Cette différence concernant l'*o*-DMA, laisse à penser que c'est tout le métabolisme de la daïdzéine qui est différent entre les deux populations.

**Tableau 9. Concentrations plasmatiques d'isoflavones suite à une exposition chronique, selon l'appartenance à une ethnie**

Références	Sujet	IF ingérées	Composition (Ge – Dz)	Ingestion	Concentration plasmatique en IF	
		mg	mg	en ? fois par jour – sur ? durée	ng.mL <sup>-1</sup> (Ge – Dz)	μmol.L <sup>-1</sup>
Xu <i>et al.</i> , 1994	F Oc	126	55,7 – 70,7	3 – NR	1149 (580 – 569)*	4,4
Xu <i>et al.</i> , 1994	F Oc	82	36,2 – 45,9	3 – NR	599 (269 – 310)	2,3
Xu <i>et al.</i> , 1994	F Oc	44	19,3 – 24,7	3 – NR	400 (200 – 200)	1,5
Bennetau-Pelissero <i>et al.</i> , 2003	F Oc	9,8	5,7 – 4,1	NR – > 6 mois	177 (87 – 91)*	0,71
Bennetau-Pelissero <i>et al.</i> , 2003	F Oc	4,9	2,9 – 2,0	NR – > 6 mois	146 (70 – 77)*	0,49
McMichael-Philips <i>et al.</i> , 1998	F Oc	45	NR	NR – 14 jours	235 (135 – 76,2)*	1,1
Grace <i>et al.</i> , 2004	F Oc	0,44	0,24 – 0,19	NR – NR	6 (4,1 – 2,0)	0,05
Mathey <i>et al.</i> , 2006	F Oc	100	NR	2 – 30 jours	1142 (658 – 392)*	4,56
Sanders <i>et al.</i> , 2002	H et F Oc	56	34,8 – 21,2	NR – 17 jours	252 (152 – 76,2)*	1,15
Gooderham <i>et al.</i> , 1996	H Oc	70	48 – 22	NR – 28 jours	371 (246 – 125)	1,5
Izumi <i>et al.</i> , 2000	H As	130	71 – 59	NR – 4 sem	290 (189 – 101)	1,1
Morton <i>et al.</i> , 2002	H As	≈ 45	NR	NR – NR	227 (132 – 71)	0,87
Adlercreutz <i>et al.</i> , 1999	F As	≈ 50	NR	NR – NR	60 (23 – 12)	0,23
Arai <i>et al.</i> , 2000	F As	46,5	30,1 – 16,4	NR – NR	74 (56 – 19)	0,27
Morton <i>et al.</i> , 2002	F As	≈ 45	NR	NR – NR	213 (135 – 64)*	0,8
Yamamoto <i>et al.</i> , 2001	F As	56,3	23,4 – 14,5	NR – NR	158 (127 – 31)	0,59

IF : Isoflavones ; Ge : Génistéine ; Dz : Daïdzéine ; H : Hommes ; F : Femmes ; Oc : Occidentaux ; As : Asiatiques ; NR : Non Renseigné ; \* le total prend en compte l'équol et l'o-DMA, en plus de Ge et de Dz.

Beaucoup d'études relatent les paramètres pharmacologiques des isoflavones sur une population particulière. Celle-ci est, la plupart du temps, qualifiée par sa nationalité plutôt que par son appartenance à une ethnie. Très peu d'études complètes de biodisponibilité existent donc actuellement sur ce point. Il est donc nécessaire de comparer les concentrations plasmatiques moyennes mesurées après une exposition chronique chez des Asiatiques et chez des Occidentaux pour juger de l'effet d'une appartenance à une ethnie. Le *tableau 9* présente des données ponctuelles recueillies chez des sujets asiatiques et caucasiens après plusieurs jours ou semaines d'ingestion chronique d'isoflavones de soja.

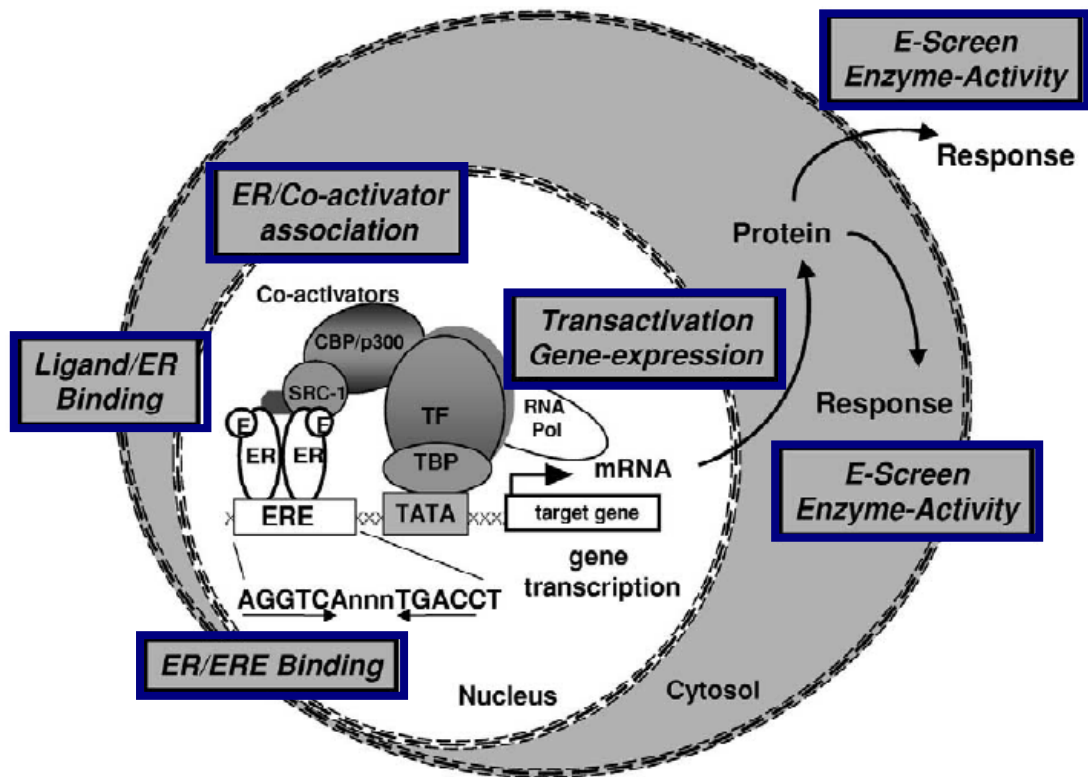
Pour toutes ces études, les mesures ont été faites chez des personnes consommant régulièrement du soja ou des extraits d'isoflavones sans jeûne prolongé avant la mesure. Les concentrations circulantes sont en général obtenues après une nuit de jeûne et correspondent donc à des valeurs prises pendant la phase d'élimination des isoflavones. Il n'est pas simple de comparer ces études dans la mesure où, outre les temps de prélèvement qui ne sont pas précis et les contextes alimentaires d'étude, des variations liées aux méthodes de dosage peuvent être à l'origine des différences de concentrations plasmatiques que l'on mesure entre asiatiques et occidentaux.

Toutefois, les études rapportant, chez les asiatiques, des concentrations plasmatiques d'isoflavones supérieures à 1  $\mu\text{M}$  sont rares alors que plusieurs travaux estiment que les concentrations plasmatiques des occidentaux consommant du soja varient entre 0,3 à 3,5  $\mu\text{M}$ .





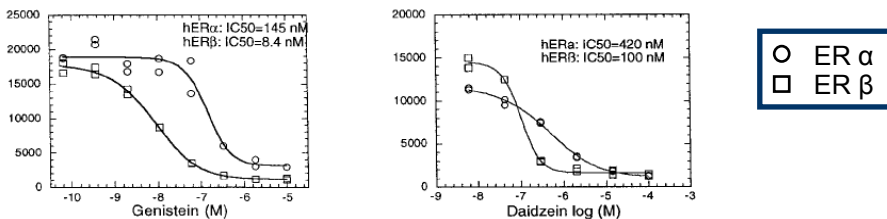
La biodisponibilité globale d'un nutriment et des isoflavones en particulier, est le reflet plasmatique de nombreux mécanismes physiologiques : les mécanismes d'absorption, le métabolisme entérocytaire, hépatique et rénal principalement, les mécanismes de transport et le processus d'élimination. Outre des facteurs intrinsèques propres à chacun, la biodisponibilité des isoflavones peut également être modulée par des facteurs tels que la fréquence d'exposition aux isoflavones de soja, la forme ingérée des isoflavones ou la matrice dans laquelle sont contenues les isoflavones. Les études de biodisponibilité sont cruciales dans le sens où les isoflavones doivent être présentes au niveau tissulaire et cellulaire pour être biologiquement actives. Une fois biodisponibles au niveau des tissus et cellules cibles, ils peuvent exercer une pléiade d'effets physiologiques, décrits par une littérature très fournie. Quels sont les effets des isoflavones sur la physiologie humaine ? Quels sont les mécanismes d'action des isoflavones au niveau cellulaire et moléculaire?



**Figure 45. Techniques moléculaires de caractérisation de l'action classique des molécules œstrogéniques**  
D'après Mueller *et al.*, 2002

Composé	RBA <sup>a</sup>		RBA <sup>b</sup>	
	ER $\alpha$	ER $\beta$	ER $\alpha$	ER $\beta$
E <sub>2</sub>	100	100	100	100
Génistéine	4	87	0,7	13
Daïdzéine	0,1	0,5	0,2	1
Formononétine	< 0,01	< 0,01	ND	ND
Biochanine-A	< 0,01	< 0,01	ND	ND

RBA : Relative Binding Affinity  
<sup>a</sup> : valeurs déterminées à partir d'une compétition en phase solide (Scintiscrip)  
<sup>b</sup> : valeurs déterminées à partir d'une compétition avec des récepteurs solubilisés



**Figure 46. Affinité des isoflavones pour les récepteurs aux œstrogènes**  
D'après Kuiper *et al.*, 1998

**Tableau 10. Affinité relative des isoflavones pour les récepteurs aux œstrogènes**  
D'après Muthyala *et al.*, 2005

Ligand	RBA (%)		$\beta/\alpha$
	hER $\alpha$	hER $\beta$	
E <sub>2</sub>	100	100	1
Daïdzéine	0,01 ± 0,006	0,04 ± 0,001	4
Génistéine	0,017 ± 0,003	7,4 ± 0,5	440
Equol	0,2 ± 0,02	1,6 ± 0,04	8
R-Equol	0,4 ± 0,04	0,3 ± 0,02	0,7
S-Equol	0,1 ± 0,01	3,2 ± 0,06	32

RBA : Relative Binding Affinity ; hER : human Estrogen Receptor

## 4. Les effets biologiques des isoflavones

### 4.1. Les effets cellulaires des isoflavones

#### 4.1.1. Les effets génomiques classiques

Plusieurs techniques permettent de caractériser les effets œstrogéniques des isoflavones au niveau moléculaire. Leur liaison aux ERs, leur interaction avec les ERE et avec les facteurs de transcription, puis leur activité de transcription ont ainsi été étudiées (Mueller, 2002) (*Figure 45*).

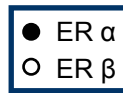
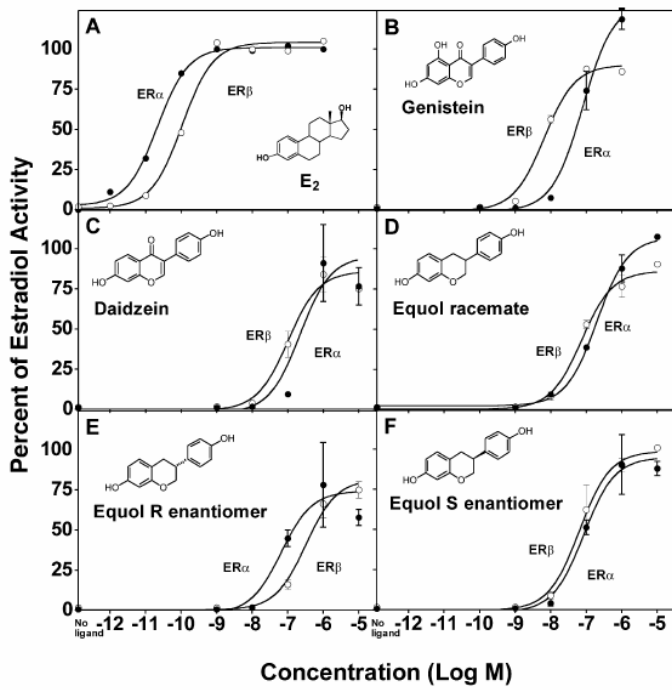
##### 4.1.1.1. La liaison aux récepteurs aux œstrogènes

Les effets génomiques classiques des isoflavones ont rapidement été imputés à la similarité chimique de ces composés avec les molécules d'œstrogènes endogènes, notamment à la présence de deux groupements hydroxyles opposés sur les molécules. Cette hypothèse s'est avérée vraie et plusieurs études d'affinité ont montré que les isoflavones pouvaient se lier aux deux ERs (*Figure 46*). L'affinité de la génistéine pour ER $\beta$  est 20 fois plus grande que pour ER $\alpha$ . La daïdzéine se lie également de façon préférentielle à la forme  $\beta$  avec un rapport entre les constantes d'association d'ER $\beta$  et d'ER $\alpha$  égal à 14 (Kuiper *et al.*, 1998). Des expériences de cristallographie ont également mis en évidence l'importance de la structure chimique des isoflavones et en particulier celle des groupes hydroxyles dans l'interaction avec le LBD (Pike *et al.*, 1999).

Selon les systèmes d'étude d'affinité (cellulaires ou acellulaires), les valeurs peuvent varier. Néanmoins, l'affinité des isoflavones est plus forte pour ER $\beta$ . Par ailleurs, l'affinité de l'équol est également plus forte pour ER $\beta$  (*Tableau 10*). De façon intéressante, l'énantiomère S-équol, jusqu'alors seul isolé dans les fluides biologiques humains, a une affinité de liaison préférentielle pour ER $\beta$  plus forte que son précurseur la daïdzéine ( $3,2 \pm 0,06$  vs  $0,04 \pm 0,001$  respectivement, en base 100 pour E<sub>2</sub>) (Muthyala *et al.*, 2004).

##### 4.1.1.2. Interaction du complexe isoflavone-récepteurs aux œstrogènes avec les Estrogen Responsive Elements

Les isoflavones sont capables, non seulement de se lier aux ERs, mais aussi d'induire leur interaction avec l'ADN au niveau des ERE. Les constantes de dissociation et les affinités de liaison relatives du complexe isoflavone-ER aux ERE du gène de la vitellogénine du xénope et du gène pS2 humain montrent qu'il n'existe pas de relation claire entre l'affinité des isoflavones pour un ER et l'affinité du complexe isoflavone-ER pour l'ERE. En effet, le complexe daïdzéine-ER $\beta$  a une affinité de liaison plus forte que le complexe génistéine-ER $\beta$



Ligand	EC <sub>50</sub> (nM)		β/α
	hERα	hERβ	
E <sub>2</sub>	0,021	0,11	0,1 9
Daïdzéine	250	100	2,5
Génistéine	80	6,6	12
Equol	200	74	2,7
R-Equol	66	330	0,2
S-Equol	85	65	1,3

***Figure 47. Activité transcriptionnelle des isoflavones mise en évidence dans un système de lignées HEC-1 cotransfectées***

D'après Muthyala *et al.*, 2005

pour l'ERE du gène pS2 humain, bien que l'affinité de la daïdzéine soit moins forte que celle de la génistéine pour ER $\beta$  (Nikov *et al.*, 2000). Ceci met en exergue l'importance du promoteur pour l'activité transcriptionnelle, l'importance des modifications conformationnelles induites par la liaison des isoflavones sur les ERs impliqués dans la capacité de recrutement des cofacteurs de transcription et enfin, l'importance des contextes cellulaires dans lesquels se trouvent les promoteurs.

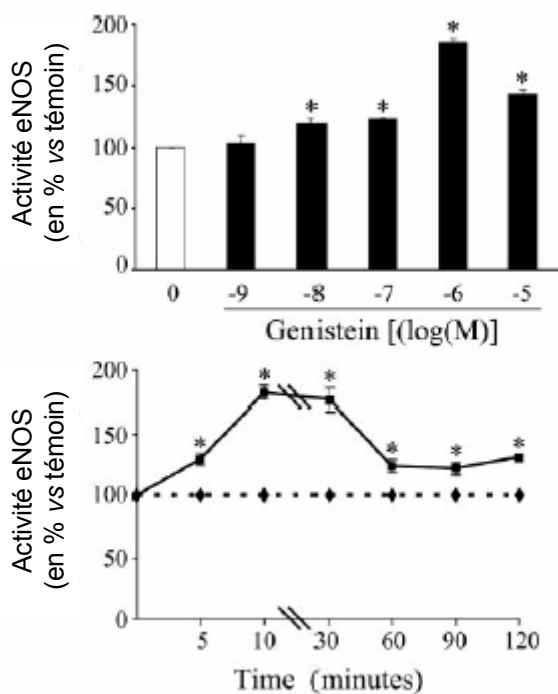
#### **4.1.1.3. Interaction avec les cofacteurs de transcription**

Les cofacteurs sont déterminants dans l'activité de la machinerie transcriptionnelle des ERs. Ce sont eux qui constituent le contexte d'une cellule. La capacité pour les ERs de recruter des cofacteurs comme TIF-2 et SRC-1 a été évaluée en présence d'E<sub>2</sub> ou de génistéine. Le complexe génistéine-ER $\beta$  recrute 12 000 fois plus le cofacteur TIF-2 et 33 fois plus le coactivateur SRC-1, que le complexe génistéine-ER $\alpha$  (Routledge *et al.*, 2000). An et collaborateurs confirment que l'action privilégiée des cofacteurs sur le complexe isoflavone-ER passe par la forme  $\beta$  de l'ER et montrent que le domaine de transactivation AF-2 sur ER $\beta$  est nécessaire pour la liaison des cofacteurs (An *et al.*, 2001).

#### **4.1.1.4. Activité de transactivation des récepteurs aux œstrogènes induite par les isoflavones**

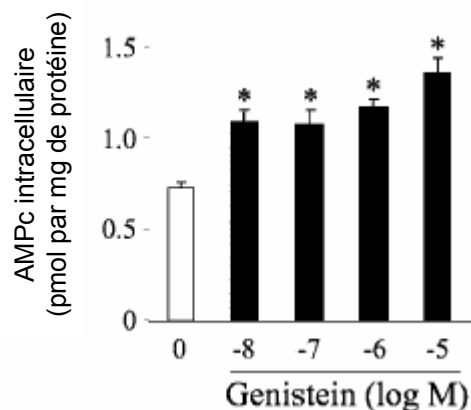
Il a été aussi montré que les isoflavones induisent l'activité transcriptionnelle des ERs, à l'aide de systèmes des gènes rapporteurs (Muthyala *et al.*, 2004). Là encore, la transcription passe préférentiellement par l'ER $\beta$  pour la génistéine, la daïdzéine et l'équol (racémique ou l'énantiomère S) (*Figure 47*) et elle est effective à partir de 10<sup>-8</sup> M pour ces trois composés. Dans les cellules utilisées pour les besoins de l'étude, les Human Endometrial Carcinoma - 1 (HEC-1), le fait que la médiation passe préférentiellement par ER $\beta$  pourrait être dû au meilleur recrutement des cofacteurs de transcription.

Dans la mesure où les isoflavones et l'équol modulent l'activité transcriptionnelles des ERs, on peut classer ces molécules dans la famille des SERMs (Selective Estrogen Receptor Modulators). Ils peuvent agir comme des agonistes partiels des œstrogènes en induisant une réaction œstrogénique et ce, même en présence de faibles concentrations d'E<sub>2</sub> (10<sup>-11</sup> M). Toutefois, ils peuvent également agir comme des antagonistes des œstrogènes, si la concentration en E<sub>2</sub> est forte (10<sup>-9</sup> M) (Hwang *et al.*, 2006).



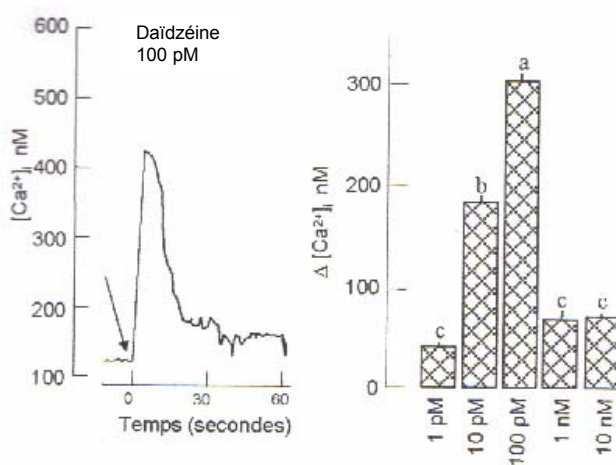
**Figure 48. Action de la génistéine sur la eNOS**

D'après Liu *et al.*, 2004



**Figure 49. Effet de la génistéine sur le contenu en AMPc à 5 min**

D'après Liu *et al.*, 2004



**Figure 50. Effet de la daïdzéine sur le contenu en Ca<sup>2+</sup> intracellulaire**

D'après de Wilde *et al.*, 2006

## 4.1.2. Les effets non classiques, non génomiques des isoflavones

### 4.1.2.1. Les actions membranaires des isoflavones

Très récemment des études *in vitro* ont montré que les isoflavones pouvaient engendrer des actions non génomiques très rapides entre la seconde et la minute, même si jusqu'alors ces actions étaient supposées (Belcher et Zsarnovszky, 2001). Liu et collaborateurs ont montré que la génistéine activait la nitric oxyde synthétase endothéliale (eNOS) (Figure 48), via une série de phosphorylations et une augmentation de l'AMPc (Figure 49), après une courte stimulation (à partir de 10 min). Ces effets ne sont pas inhibés par des antagonistes spécifiques des mécanismes génomiques des œstrogènes (Liu *et al.*, 2004).

La daïdzéine, à faible concentration (100 pM), induit une réorganisation rapide (en 1 min) du cytosquelette d'actine des ostéoblastes, impliquée dans la migration cellulaire (de Wilde *et al.*, 2006). Cette action est due à la liaison de la daïdzéine à une protéine membranaire dont la structure est proche de ER $\beta$  dans la mesure où certains anticorps anti-ER $\beta$  peuvent inhiber les effets rapides de la daïdzéine. Cette liaison entraîne une augmentation du contenu intracellulaire en Ca<sup>2+</sup> (Figure 50) et une cascade de phosphorylation, qui implique des protéines telles que des Gbeta1, des PI3K, des protéines kinases C, ERK1/2 ... L'action de la daïdzéine sur le cytosquelette et les autres paramètres est insensible à l'action de l'ICI 182,780, un antagoniste spécifique de la voie génomique des œstrogènes.

### 4.1.2.2. Les actions cellulaires des isoflavones

Les isoflavones peuvent exercer des effets sur plusieurs enzymes cellulaires et donc, interférer avec les voies de signalisation intracellulaire. Le plus connu est l'effet anti-tyrosine kinase de la génistéine. *In vitro*, la génistéine à 2,6  $\mu$ M inhibe l'action de la tyrosine kinase par inhibition compétitive (Akiyama *et al.*, 1987). De plus, 7,4  $\mu$ M de génistéine inhibe de 50 % l'action de l'ADN topoisomérase et 110  $\mu$ M de génistéine inhibe 50 % de l'activité des protéines kinases C. La daïdzéine présente moins d'activité inhibitrice ; 10  $\mu$ M de daïdzéine inhibe tout de même 50 % de l'activité des MAP kinases (Dubey *et al.*, 1999). D'autre part, les isoflavones inhibent également l'action des  $\alpha$ -réductases (Adlercreutz *et al.*, 1993) et des aromatasés (Evans *et al.*, 1995). Les doses inhibitrices à 50 % de ces dernières enzymes sont extrêmement élevées et relèvent plus de la pharmacologie que de conditions physiologiques.

**Tableau 11. Effets des isoflavones de soja sur les bouffées de chaleur**

Références	Participants	Prise journalière	Durée de l'étude	Résultats obtenus
(Albertazzi <i>et al.</i> , 1998)	n = 79	76 mg par jour d'isoflavones, éq aglyc, contenues dans des protéines de soja	12 semaines	Baisse significative de 45 % des bouffées de chaleur <i>vs</i> baisse de 30 % obtenu avec le placebo
(Upmalis <i>et al.</i> , 2000)	n = 112, plus de 5 bouffées de chaleur par jour	32 mg d'isoflavones, éq aglyc	12 semaines	Baisse de la fréquence et de l'intensité des bouffées de chaleur de 28 % <i>vs</i> placebo
(Knight <i>et al.</i> , 2001)	n = 24	85 mg d'isoflavones, éq aglyc	12 semaines	Aucun effet observé sur les bouffées de chaleur
(Faure <i>et al.</i> , 2002)	n = 75, plus de 7 bouffées de chaleur par jour	70 mg par jour d'isoflavones totales (génistéine et daïdzéine)	16 semaines	Fréquence des bouffées de chaleur réduite de 61 % alors que le placebo réduit de 21 % les bouffées, p = 0,01
(Han <i>et al.</i> , 2002)	n = 80	63 mg d'isoflavones, éq aglyc	4 mois	Baisse significative ( <i>vs</i> placebo) des symptômes de la ménopause (score de Kupperman)
(Van Patten <i>et al.</i> , 2002)	n = 123, atteintes d'un cancer du sein	90 mg d'isoflavones	12 semaines	Aucun effet. Effet placebo très fort (-40 %) <i>vs</i> effet isoflavone (-30 %)
(Nikander <i>et al.</i> , 2003)	n = 56, patientes atteintes d'un cancer du sein	72 mg d'isoflavones, éq aglyc	12 semaines	Aucun effet des isoflavones sur les symptômes de la ménopause (score de Kupperman évalué)
(Crisafulli <i>et al.</i> , 2004)	n = 90	54 mg par jour de génistéine ou 1 mg par jour d'œstradiol avec noresthisterone	1 an	Fréquence des bouffées de chaleur réduite avec la génistéine (24 % de moins que le placebo, p < 0,01 ; 30 % de moins avec l'œstradiol, p < 0,05)
(MacGregor <i>et al.</i> , 2005)	n = 72, patientes atteintes d'un cancer du sein	35 mg d'isoflavones	12 semaines	Aucun effet bénéfique observé tant en fréquence qu'en intensité des bouffées de chaleur
(Lewis <i>et al.</i> , 2006)	n = 87	42 mg d'isoflavones	16 semaines	Aucun effet des isoflavones sur les symptômes de la ménopause et l'amélioration de la qualité de la vie

éq aglyc : équivalent aglycone



Enfin, les isoflavones sont des molécules anti-oxydantes, qui peuvent inhiber partiellement les phénomènes de peroxydation menant à la formation de radicaux libres en jouant le rôle d'accepteur d'électrons (Cassidy, 2003).

## **4.2. Les effets physiologiques des isoflavones**

Les isoflavones ont des propriétés cellulaires très diverses et leurs actions impliquent généralement les ERs. Les nombreux effets des œstrogènes sur la physiologie humaine sont bien répertoriés et particulièrement leurs actions dans le traitement de substitution œstrogénique à la ménopause et leurs effets secondaires. C'est donc précisément (et uniquement) dans ce contexte de substitution des œstrogènes par les isoflavones de soja à la ménopause que nous allons présenter les effets physiologiques des isoflavones.

### **4.2.1. Les isoflavones et les symptômes de la ménopause**

La principale motivation d'une complémentation alimentaire à base d'isoflavones de soja reste aujourd'hui le traitement des symptômes liés à la ménopause. Les bouffées de chaleur sont parmi les symptômes de la ménopause les plus rapportés par les patientes auprès de leurs gynécologues, avec les sueurs nocturnes et la sécheresse vaginale (Jamin *et al.*, 2005). Plus de 50 % des femmes sont touchées par ces désagréments, qui peuvent durer plusieurs années (Nelson *et al.*, 2006). Les bouffées de chaleur sont des sensations spontanées de chaleur associées à des sueurs et des palpitations résultant d'une réponse du système circulatoire au déficit en œstrogènes. Des données épidémiologiques recueillies auprès des femmes asiatiques ménopausées montrent que la consommation traditionnelle, le plus souvent depuis l'enfance, des produits dérivés du soja est associée à une réduction des bouffées de chaleur, tant en fréquence qu'en intensité (Nagata *et al.*, 1999). Plusieurs études d'intervention ont permis de mieux caractériser les effets des protéines de soja ou d'isoflavones de soja sur les troubles du climatère (*Tableau 11*). L'ensemble de ces études rapporte des effets placebo particulièrement élevés, de l'ordre de 20 à 30 % et les données actuelles suggèrent une réduction de 30 à 50 % des bouffées de chaleur consécutive à une prise de 30 mg d'isoflavones par jour (Kurzer, 2003). Une méta-analyse plus récente conclut également que les isoflavones de soja sont responsables d'une réduction faible à modeste du nombre de bouffées de chaleur. Cette réduction est d'autant plus forte que le nombre initial de bouffées de chaleur est important (Howes *et al.*, 2006).

De plus, l'étude clinique de Kotsopoulos et collaborateurs a montré une réduction de la sécheresse vaginale chez 44 femmes consommant des isoflavones (118 mg par jour pendant 3 mois) en comparaison avec un groupe placebo (Kotsopoulos *et al.*, 2000). D'autre part,



l'étude de Chiechi et collaborateurs a permis de déterminer l'effet d'une alimentation riche en isoflavones de soja (47 mg en moyenne par jour pendant 6 mois) sur l'index de maturation vaginale. Cet essai clinique randomisé, dans lequel 187 volontaires étaient incluses, a mis en évidence une augmentation de la maturation vaginale et de l'index caryopycnotique chez des femmes consommant des isoflavones par rapport à un groupe placebo (Chiechi *et al.*, 2003).

#### **4.2.2. Les isoflavones, la lipémie et les maladies cardiovasculaires**

La consommation de soja rencontre un large succès dans les pays anglo-saxons dans la prévention des maladies cardiovasculaires. De ce fait, les autorités sanitaires recommandent ces produits pour lutter contre l'hypercholestérolémie, principal facteur de risque aggravant des maladies cardio-vasculaires. Au Royaume-Uni, la Joint Health Claims Initiative (JHCI) autorise la mention suivante sur les emballages de produits à base de soja : «L'apport d'au moins 25 g de protéines de soja par jour dans une alimentation pauvre en graisses saturées réduit le taux de cholestérol sanguin». Cet argument sanitaire est similaire à celui avalisé par la Food and Drug Agency (FDA) américaine (Henkel, 2000).

Ces recommandations sont basées sur plusieurs études, qui démontrent qu'une consommation de soja ou d'isolats protéiques de soja a des effets bénéfiques sur les marqueurs lipidiques des facteurs de risque cardiovasculaire. Les résultats d'une méta-analyse regroupant 38 études cliniques montrent que la consommation de protéines de soja entraîne une diminution significative du cholestérol total, du LDL-cholestérol et des triglycérides, sans modifier les concentrations de HDL-cholestérol (Anderson *et al.*, 1995). Cette étude montre également que la substitution en protéines de soja (47 g de protéines en moyenne), par rapport à une ration protéique normale, permet de diminuer de 9 % en moyenne les teneurs en cholestérol total et de 12,9 % les teneurs en LDL-cholestérol moyennes. Enfin, les résultats de cette méta-analyse montrent une grande variabilité inter-individuelle des effets du soja. Les effets les plus significatifs sont observés chez les sujets les plus hypercholestérolémiques. L'addition de 60 g/j d'isolats de protéines de soja chez l'Homme normo-cholestérolémique n'entraîne pas de changement significatif des paramètres lipidiques plasmatiques. Il faut noter que les protéines de soja contiennent des saponines, des sapogénols et des phyto-stérols. Ces derniers présentent une activité inhibitrice de l'absorption alimentaire du cholestérol alimentaire, qui pourrait expliquer l'effet hypocholestérolémiant du soja (Hubert *et al.*, 2005).

Une méta-analyse plus récente regroupe les études cliniques menées de 1995 à 2002 sur la relation entre les isoflavones de soja et la cholestérolémie (Weggemans et Trautwein, 2003). L'ensemble des études regroupe environ 1 000 volontaires dont la cholestérolémie



basale est de 5,42 à 6,60 mmol.L<sup>-1</sup>. La consommation de protéines de soja varie de 19 à 60 g par jour et les quantités ingérées d'isoflavones vont alors de 1 à 95 mg par jour. Une dose ingérée de 36 g de protéines de soja, contenant 52 mg d'isoflavones, réduit le LDL-cholestérol de  $0,17 \pm 0,04$  mmol.L<sup>-1</sup> et augmente le HDL-cholestérol de  $0,03 \pm 0,01$  mmol.L<sup>-1</sup>. Il n'existe pas de relation entre la dose ingérée d'isoflavones et la cholestérolémie, ce qui suggère l'existence d'autres molécules du soja impliquées dans l'effet hypocholestérolémiant. Les mécanismes physiologiques et cellulaires permettant d'expliquer les effets hypocholestérolémiants du soja ne sont pas encore complètement élucidés, mais les résultats laissent à penser que ces effets sont plus liés à une consommation de protéines de soja qu'à un effet des seules isoflavones de soja (Albertazzi, 2006 ; Dodin *et al.*, 2003). Une seule étude montre une corrélation entre des taux de HDL plus importants quand l'apport en isoflavones, contenues dans des protéines de soja, est plus élevé (Reynolds *et al.*, 2006).

Enfin, une méta-analyse, qui inclut 17 essais cliniques, conclut à la non efficacité des seuls extraits d'isoflavones sur la cholestérolémie (Yeung et Yu, 2003). La consommation des seules isoflavones semble, en particulier, améliorer la fonction endothéliale *in vivo* (Squadrito *et al.*, 2003). Sur le plan cellulaire, des mécanismes non génomiques semblent être mis en jeu avec notamment l'activation de la eNOS (Joy *et al.*, 2006).

#### **4.2.3. Les isoflavones et les cancers du sein et de l'endomètre**

Les cancers surviennent dans des organismes dont les tissus se renouvellent constamment. Ils correspondent à l'acquisition progressive de propriétés anormales représentant le phénotype de cancer. Le phénotype acquis par les cellules, qui deviennent cancéreuses, comporte les caractéristiques suivantes : (1) perte de contrôle de la croissance due à un cancérogène, d'origine chimique ou physique, c'est l'initiation, (2) résistance à l'apoptose et multiplication cellulaire infinie, c'est la promotion, puis (3) faculté de créer un réseau vasculaire, d'envahir les tissus voisins, et de pouvoir coloniser et survivre dans un environnement ectopique, qui sont les étapes de la progression.

Dans ce cadre de recherche, il est difficile de trouver des études d'intervention. Seules ces études pourraient pourtant permettre d'établir une relation entre isoflavones et cancers. Dans ce cas précis, une étude basée sur le critère d'apparition d'un cancer demanderait d'abord un effectif très large, mais serait surtout répréhensible d'un point de vue éthique. Les études épidémiologiques sont donc les plus utilisées pour montrer les effets des isoflavones sur les cancers du sein et de l'endomètre, complétées par des études *in vitro* pour mettre en évidence les mécanismes cellulaires et moléculaires mis en jeu.



La consommation de produits dérivés du soja ainsi que celles d'isoflavones dès l'adolescence, dans des contextes alimentaires favorables (apports importants de fruits et légumes, d'acides gras appartenant à la famille des oméga 3, relativement peu de lipides saturés ...) et dans des contextes médicaux également différents du contexte médical français (notamment en terme d'utilisation de contraceptifs œstrogéniques oraux) réduit le risque de cancer du sein et de l'endomètre de façon significative chez les femmes en Asie. Cet effet favorable n'étant retrouvé que chez les femmes asiatiques laisse supposer que les facteurs à prendre en considération dans l'effet protecteur des isoflavones de soja vis-à-vis du développement des cancers du sein sont (1) la dose consommée par ces femmes (30 à 40 mg par jour d'isoflavones aglycones), (2) la durée d'exposition (souvent depuis l'enfance, voire *in utero*) et (3) le fait qu'il ne faut pas négliger dans les études épidémiologiques réalisées jusqu'à ce jour, le rôle confondant joué par la génétique et par certains nutriments comme les polyphénols, les acides gras appartenant à la famille des oméga 3 ... (Cassidy *et al.*, 2006a ; Gerber *et al.*, 2005 ; Grace *et al.*, 2004 ). Ceci laisse donc supposer que des apports alimentaires même aussi importants quantitativement et qualitativement que les apports décrits pour les populations asiatiques (entre 40 et 60 g de soja par jour) ne seraient pas forcément bénéfiques dans les pays occidentaux dans le cadre de la prévention du cancer du sein et de l'endomètre.

Bien que des données épidémiologiques tendent à montrer l'effet bénéfique des isoflavones dans la prévention des cancers du sein, plusieurs études ont montré un effet prolifératif de cellules mammaires saines ou issues de tumeurs œstrogéno-dépendantes (Allred *et al.*, 2001 ; Hsieh *et al.*, 1998 ; McMichael-Phillips *et al.*, 1998). Pourtant récemment une méta-analyse, incluant 21 études cas-témoins et 15 études prospectives, a montré qu'aucune preuve claire n'a été établie entre la consommation des isoflavones et le risque de développer un cancer du sein (Gikas et Mokbel, 2005). Toutefois, les isoflavones peuvent stimuler la prolifération de cellules ayant déjà acquis le phénotype cancéreux. Ces expériences de prolifération ont été menées sur des lignées d'adénocarcinome mammaire, les MCF-7, *in vitro* (Soto *et al.*, 1995).

Plusieurs études ont montré, chez la femme, qu'il n'existe pas de corrélation entre une forte consommation d'isoflavones et l'épaisseur de l'endomètre (Hale *et al.*, 2002). De plus, il n'existe pas de données permettant d'attribuer un rôle protecteur vis-à-vis du cancer de l'endomètre aux isoflavones de soja (Gerber *et al.*, 2005).





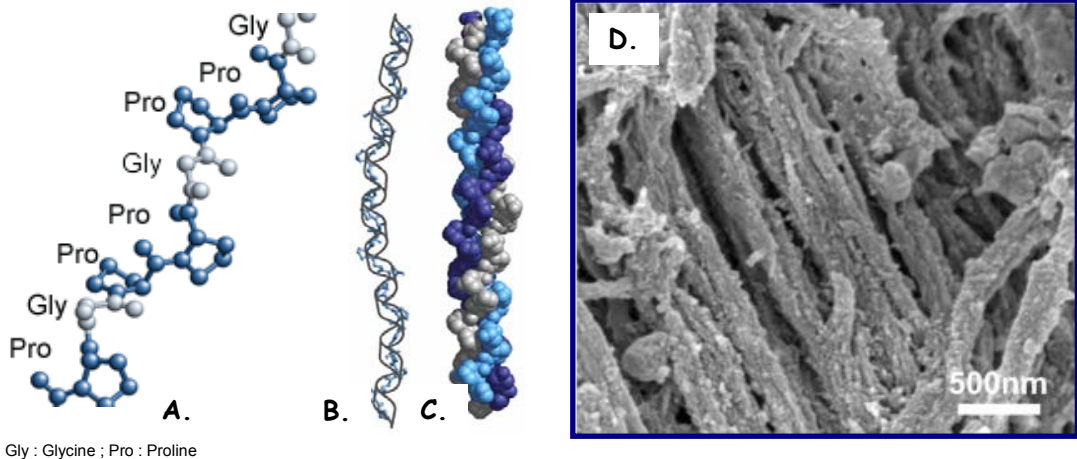
#### **4.2.4. Les isoflavones et la cognition**

Très peu d'études existent sur ce sujet. Jusqu'alors seule une étude a montré un effet intéressant des isoflavones sur la cognition, en particulier une amélioration à 6 mois de la mémoire verbale et de mémoire logique, chez 56 femmes ménopausées entre 55 et 74 ans consommant 69 mg d'isoflavones, équivalent aglycone (Kritz-Silverstein *et al.*, 2003).

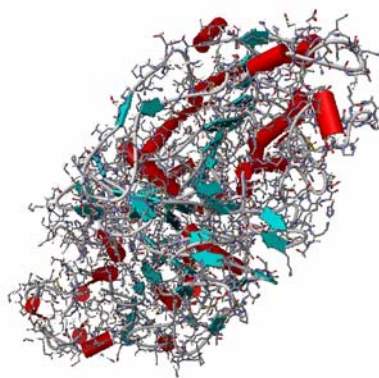
Deux autres études cliniques n'ont pas montré d'effets sur les fonctions cognitives. La prise d'isoflavones était de 29,5 mg d'isoflavones pendant 6 mois (Howes *et al.*, 2004) et de 99 mg d'isoflavones pendant 12 mois (Kreijkamp-Kaspers *et al.*, 2004).



En conclusion, les isoflavones de soja sont des microconstituants qui ont des effets de type œstrogénique et qui, comme les œstrogènes endogènes, modulent les voies de signalisation cellulaire. A un niveau plus global, les isoflavones exercent ou semblent exercer différents types d'effets sur la santé en agissant sur les symptômes de la ménopause, les maladies cardiovasculaires, les cancers et la cognition. De plus, ces dix dernières années, un intérêt croissant a été porté sur les effets des isoflavones sur le métabolisme osseux afin d'évaluer l'opportunité de leur utilisation dans le cadre du traitement de l'ostéoporose en remplacement de l'hormonothérapie de substitution. Les actions des isoflavones sur le métabolisme osseux vont être décrites dans le paragraphe suivant.



**Figure 51. Séquence d'acides aminés caractéristiques (A.), structure secondaire (B.), structure tertiaire (C.) et fibrilles de collagène de type I observées au microscope électronique (D.)**



**Figure 52. Structure 3D de la phosphatase alcaline, réalisée à partir de la séquence d'acides aminés**

## 5. Un cas particulier : les effets des isoflavones sur l'os

### 5.1. Le tissu osseux

#### 5.1.1. Les fonctions physiologiques du tissu osseux

Le tissu osseux, de par sa composition et ses propriétés intrinsèques, remplit trois fonctions essentielles à la physiologie humaine :

- mécanique : l'os, avec le cartilage, est le site et le support d'attachement des muscles, ce qui permet d'exercer des fonctions locomotrices
- protectrice : l'os, de par sa rigidité, protège des organes vitaux (cerveau, cœur et poumons)
- métabolique : l'os est essentiel à l'homéostasie et au métabolisme phospho-calcique.

#### 5.1.2. La composition du tissu osseux

L'os est un tissu conjonctif calcifié, constitué d'une matrice organique entourant les cellules osseuses. La minéralisation de la matrice confère alors à l'os ses propriétés mécaniques.

##### 5.1.2.1. L'ostéoïde

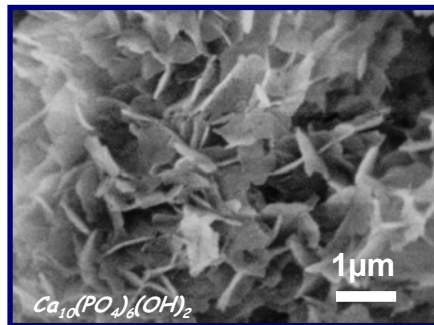
L'ostéoïde correspond à la partie organique extracellulaire de la matrice. Il est constitué de 90 % de collagène et de 10 % de protéine non-collagénique.

###### 5.1.2.1.1. Le collagène de type I

Le collagène de type I osseux est synthétisé par les ostéoblastes (*Figure 51*). Les molécules de collagène, après clivage des propeptides N et C terminaux, s'assemblent en fibrilles, elles-mêmes associées en fibres de collagène puis stabilisées par des pontages covalents non-réductibles, dont les plus connus sont la pyridinoline et la désoxypyridinoline, utilisées aujourd'hui comme marqueurs de la dégradation de la matrice osseuse.

###### 5.1.2.1.2. Les protéines non-collagéniques

Les protéines non-collagéniques (PNC) sont distribuées entre la phase minérale et la trame collagénique. Les PNC incluent des protéines contenant des résidus d'acide- $\gamma$ -carboxyglutamique ou gla-protéines comme l'ostéocalcine. Les PNC comprennent également des protéoglycanes et des protéines d'origine plasmatique. Les PNC incluent enfin des glycoprotéines, comme la phosphatase alcaline (ALP) osseuse (*Figure 52*). Cette enzyme est impliquée dans les processus de minéralisation (Torii *et al.*, 1996). L'inactivation du gène ALP chez la souris induit ainsi une anomalie de la minéralisation, ce qui souligne le rôle prépondérant de cette enzyme dans ce processus (Wennberg *et al.*, 2000). Au niveau



**Figure 53. Cristaux d'hydroxyapatite observés au microscope électronique**

cellulaire, cette enzyme est liée de façon covalente aux complexes phosphatidyl-inositols de la membrane plasmique.

### **5.1.2.2. La phase minérale**

L'os est caractérisé par sa dureté, résultant de la calcification de la matrice organique extracellulaire. Les minéraux sont composés de 85 % de phosphates de calcium, cristallisés sous forme d'hydroxyapatite  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$  (*Figure 53*) à l'intérieur et autour des fibres de collagène.

Le carbonate de calcium, le phosphate de magnésie, le fluorure de calcium et le chlorure de sodium ou de calcium constituent le reste de cette matrice.

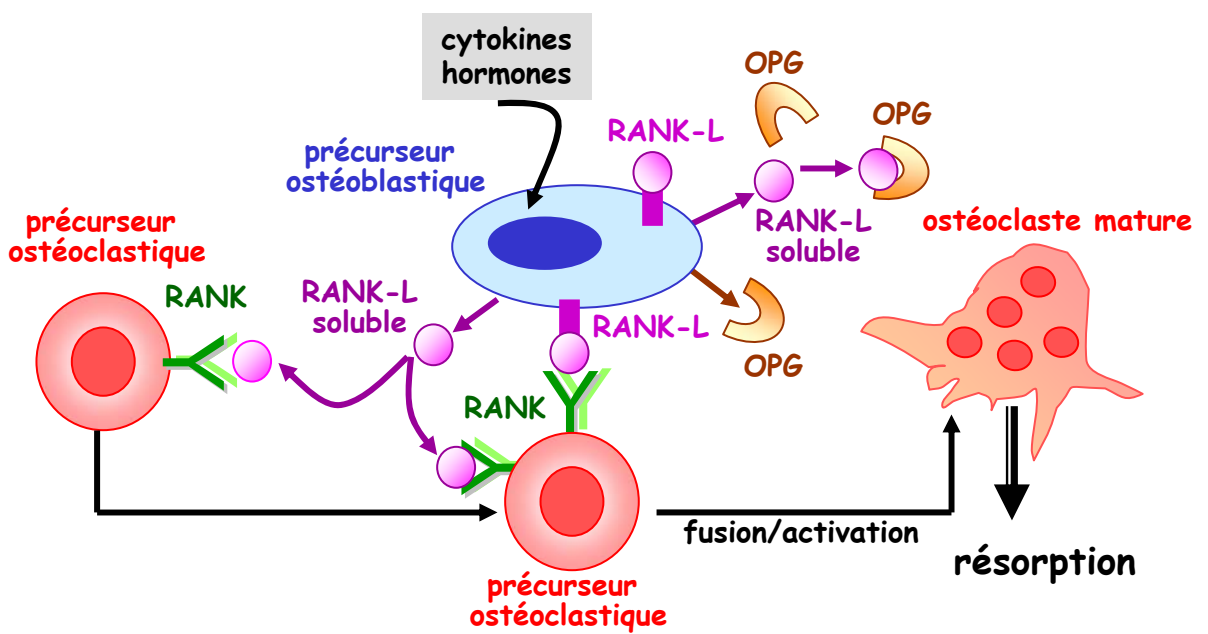
### **5.1.3. Les cellules osseuses**

Le développement et le renouvellement osseux sont rendus possible par l'action de deux types cellulaires : les ostéoclastes, responsables de la résorption osseuse et les ostéoblastes, responsables de la formation osseuse.

#### **5.1.3.1. Les ostéoclastes et la résorption osseuse**

Les ostéoclastes sont les cellules responsables de la résorption de la matrice osseuse. Ces cellules sécrètent des protons  $\text{H}^+$ , qui en acidifiant le milieu environnant, permettent la dissolution acide de la phase minérale de l'os (Blair *et al.*, 2005). Les ostéoclastes dégradent également la phase organique de la matrice osseuse en sécrétant des enzymes comme des collagénases acides et des protéinases comme les cathepsines.

Les ostéoclastes sont des cellules multinucléées, d'origine hématopoïétique. Les précurseurs des ostéoclastes appartiennent aux lignées myéloïdes et dérivent des pré-monocytes. Ces cellules peuvent se différencier en cellules dendritiques ou en ostéoclastes suivant leur environnement. La différenciation de ces précurseurs en ostéoclastes est placée sous le contrôle d'une cascade de facteurs, chacun agissant à une étape donnée. La différenciation nécessite des interactions étroites avec les cellules stromales/ostéoblastiques. Ces interactions font intervenir des protéines synthétisées par ces dernières, mais aussi des interactions directes entre ces deux types cellulaires. Parmi les facteurs paracrines impliqués dans l'activation de la différenciation ostéoclastique, on retrouve en particulier le M-CSF (Macrophage-Colony Stimulating Factor) et le RANK-L (Receptor Activator of Nuclear factor  $\kappa\text{B}$  - Ligand). L'action de RANK-L implique une liaison avec le récepteur RANK, exprimé à la surface des ostéoclastes, ce qui induit des cascades de signalisation conduisant à la transcription de gènes spécifiques. RANK-L reconnaît également un autre récepteur :



**Figure 54. Action combinée de RANK-L/RANK/OPG dans la différenciation des ostéoclastes**  
 D'après Hofbauer et al., 2000



l'ostéoprotégérine (OPG), elle aussi membre de la famille des récepteurs du TNF. Synthétisée puis secrétée par les ostéoblastes, l'OPG joue le rôle d'un récepteur leurre, qui en se liant à RANK-L, le rend indisponible pour une liaison avec RANK ; elle bloque ainsi son effet inducteur de la différenciation ostéoclastique (Hofbauer *et al.*, 2000) (Figure 54).

### 5.1.3.2. Les ostéoblastes et la formation osseuse

Les ostéoblastes sont des cellules responsables de la formation osseuse. Ils participent à la synthèse de la matrice organique et organisent, en terme d'architecture, le processus de minéralisation. Quatre stades du développement des ostéoblastes ont été mis en évidence *in situ* : le pré-ostéoblaste, l'ostéoblaste, l'ostéocyte et la cellule bordante (Aubin *et al.*, 1995).

Les ostéoblastes sont des cellules mononucléées dérivant de cellules souches mésenchymateuses pluripotentes, qui sont également à l'origine d'autres types cellulaires différenciés comme les adipocytes, les myocytes ou les chondrocytes. L'engagement dans l'une ou l'autre voie cellulaire est conditionné par l'expression de facteurs de transcription. Le facteur de transcription Cbfa 1 est le marqueur spécifique le plus précoce de la différenciation ostéoblastique (Ducy *et al.*, 1997). La durée de vie moyenne d'un ostéoblaste est de 3 mois. Une grande partie (65 %) meurt par apoptose et l'autre partie des ostéoblastes s'emmure dans la matrice qu'ils viennent de former et se différencient en ostéocytes. Enfin, une partie des ostéoblastes, qui se trouvent sur la surface osseuse au repos, constituent les cellules bordantes. Ces cellules seraient capables d'émettre un signal chimiotactique à destination des précurseurs ostéoclastiques (Manolagas, 2000).

*In vitro*, le développement de modèles de cultures de cellules ostéoblastiques a facilité l'étude de l'ostéogénèse. Des cultures de cellules primaires animales ou humaines sont réalisables et offrent l'avantage de conserver des caractéristiques morphologiques et biochimiques ainsi que des réponses hormonales, assez proches des conditions physiologiques. Elles représentent toutefois une certaine hétérogénéité cellulaire et des cultures difficiles à obtenir en grande quantité surtout pour les cellules d'origine humaine. Un certain nombre de lignées humaines d'ostéosarcomes sont disponibles et permettent d'avoir des cellules en nombre important (Aubin *et al.*, 1995).

*In vitro*, le développement de l'ostéoblaste se déroule en deux étapes : la première correspond à une période de prolifération active pendant laquelle des gènes du cycle cellulaire et de synthèse de la matrice extracellulaire (collagène de type I, fibronectine ...) sont exprimés. Lorsque les cellules sont confluentes, la prolifération ralentit et ces gènes sont réprimés. La seconde étape correspond à la période de différenciation cellulaire, elle-même

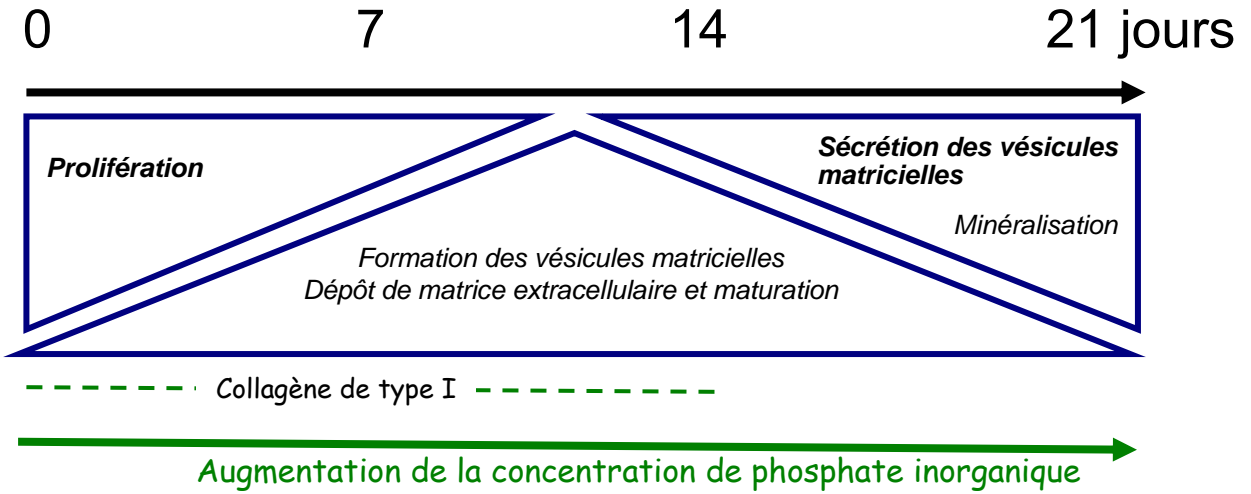


Figure 55. La différenciation théorique des ostéoblastes in vitro  
D'après Beck *et al.*, 2003

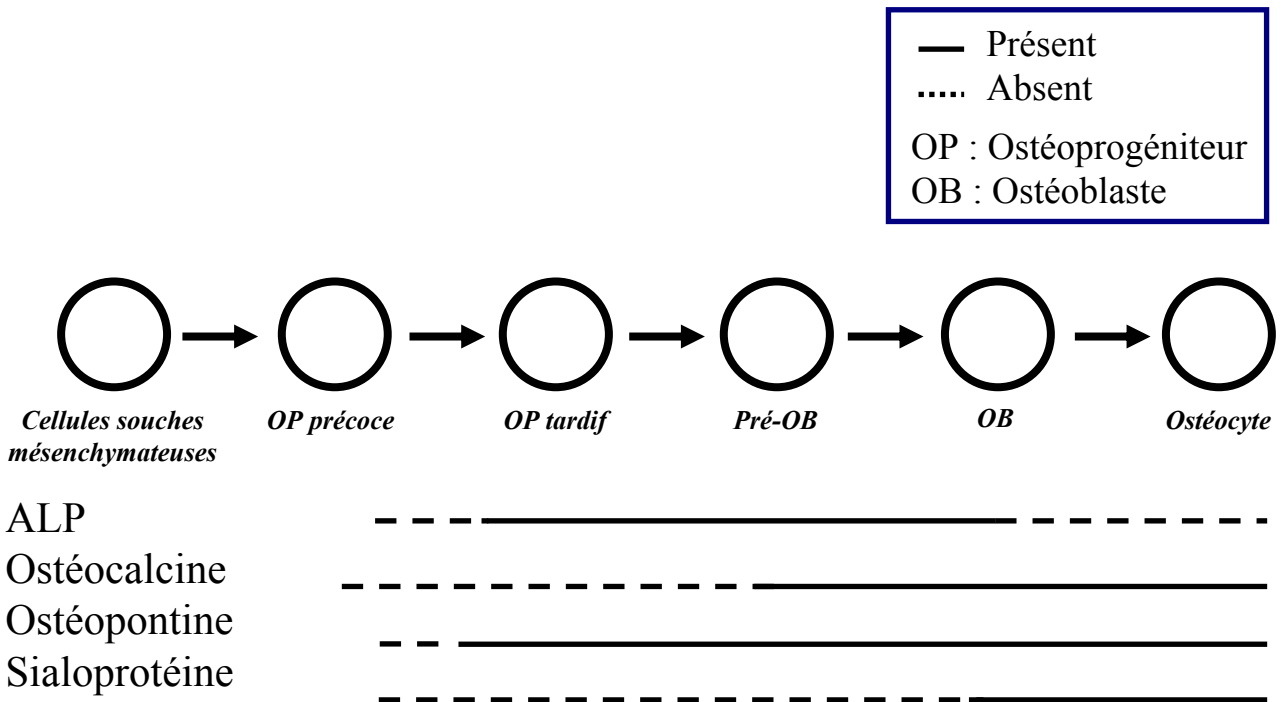


Figure 56. Déterminisme du stade de différenciation des ostéoblastes via l'expression de marqueurs protéiques  
D'après Aubin *et al.*, 1995

constituée de deux sous étapes. La première sous étape est liée à la maturation de la matrice caractérisée par l'augmentation de la synthèse de la phosphatase alcaline (ALP) et son activation, la deuxième correspond au processus de minéralisation de cette dernière (Beck, 2003) (*Figure 55*).

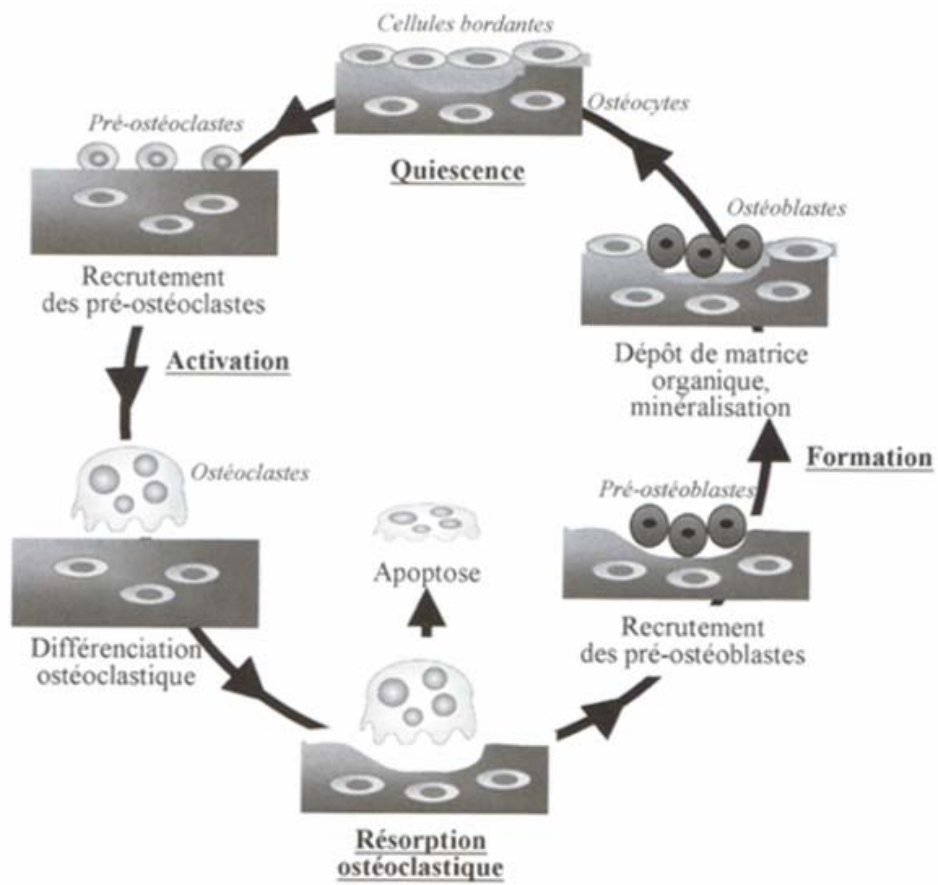
Le processus de minéralisation est biphasique : une phase de nucléation permettant l'apparition des premiers cristaux de phosphate de calcium, puis, dès que le mécanisme de nucléation est amorcé, une phase de propagation pendant laquelle les cristaux se multiplient (nucléation secondaire) et croissent jusqu'à atteindre leur taille et leur forme définitive (Boivin et Anderson, 1996). Plusieurs mécanismes ont été proposés pour expliquer la nucléation au cours du processus de minéralisation. Les ostéoblastes forment par bourgeonnement des vésicules matricielles, véritables structures qui pourraient être le support d'une nucléation hétérogène. Le rôle de l'ALP vésiculaire dans la calcification est suggéré par un certain nombre de travaux *in vitro* (Bellows *et al.*, 1991). Elle serait impliquée dans : (1) l'hydrolyse d'un ester phosphaté dans les fluides extracellulaires ou le milieu vésiculaire afin de produire un orthophosphate incorporable dans les foyers natifs de phosphate de calcium, (2) une translocation de phosphate d'une molécule donneuse (comme les nucléosides triphosphates des fluides extracellulaires ou du milieu vésiculaire) vers un récepteur moléculaire (phosphate de calcium natif) et (3) l'hydrolyse d'un pyrophosphate inorganique, inhibiteur connu de la croissance cristalline apatitique.

Au cours des étapes successives de la différenciation ostéoblastique, des marqueurs biochimiques, souvent protéiques, sont exprimés. Leur étude permet finalement de déterminer et de caractériser le stade de différenciation des ostéoblastes en culture (Aubin *et al.*, 1995) (*Figure 56*).

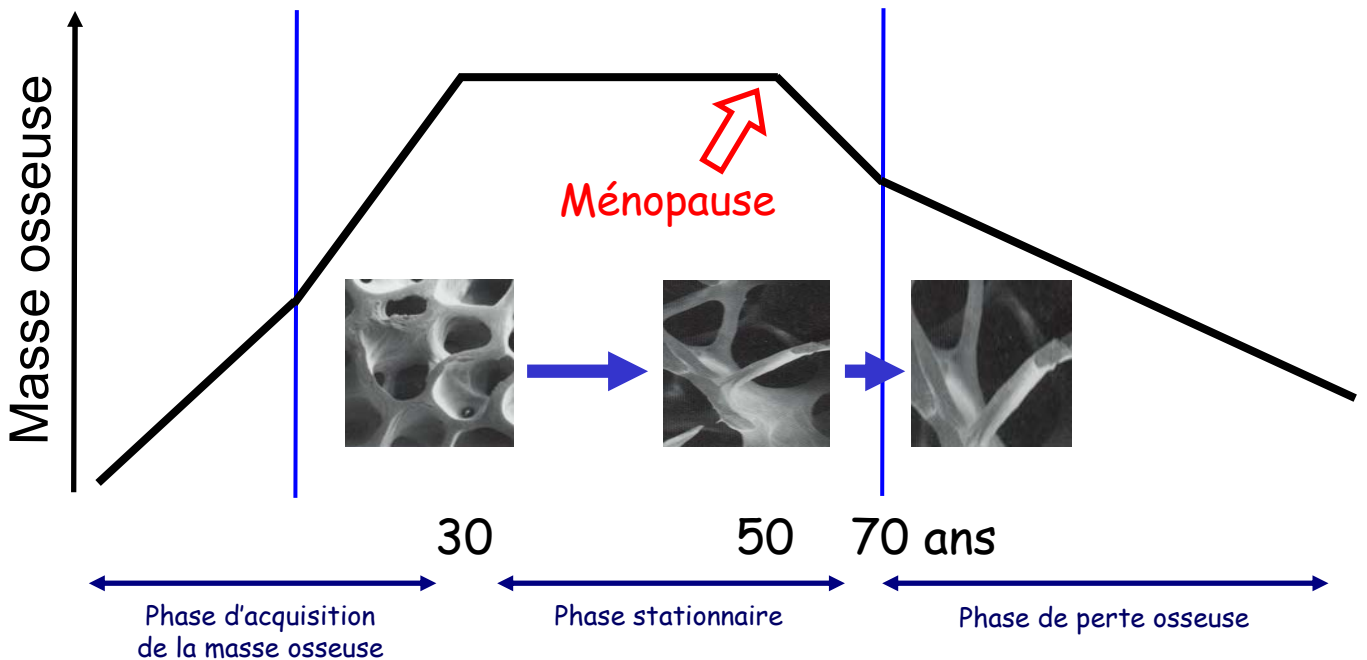
Outre leur rôle dans la formation osseuse, les ostéoblastes jouent aussi un rôle dans la régulation de l'ostéoclastogénèse par le contrôle de la prolifération et de la différenciation des ostéoclastes. Ces mécanismes impliquent plusieurs mécanismes de communication cellulaire illustrés par le système RANK / RANK-L / OPG (Hofbauer, 1999). Cette dernière fonction assurée par les ostéoblastes est capitale dans la physiologie osseuse car elle participe au couplage entre les activités de formation et de résorption osseuses, indispensables au renouvellement de l'os.

#### **5.1.4. Le remodelage osseux**

L'os, malgré une apparente structure statique, est un tissu tout à fait dynamique. Ce perpétuel renouvellement est permis par l'action concertée des deux types cellulaires osseux



**Figure 57. Le remodelage osseux**  
D'après Coxam et Horcajada, 2004



**Figure 58. Evolution de la masse osseuse au cours de la vie**  
D'après Coxam et Horcajada, 2004

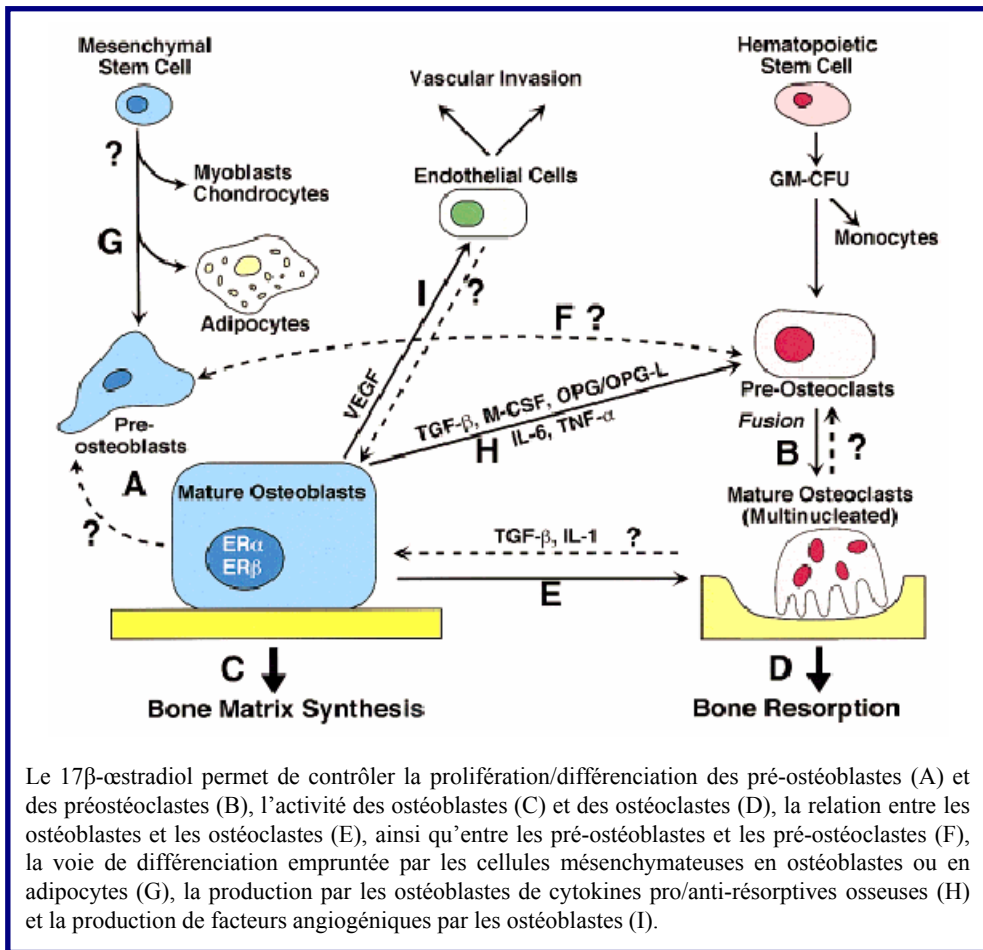
différenciés. Le cycle de remodelage osseux débute par une première phase de recrutement et d'activation des précurseurs ostéoclastiques de la surface osseuse quiescente (*Figure 57*). Ces précurseurs prolifèrent et fusionnent pour former les ostéoclastes matures. Cette phase d'activation est suivie par une phase de résorption pendant laquelle l'ostéoclaste dégrade l'os et y creuse des lacunes. Cette phase est suivie d'une phase intermédiaire ou d'inversion au cours de laquelle les ostéoclastes se détachent ou meurent et sont remplacés par des cellules mononucléées de type macrophagique. C'est au cours de cette phase que s'effectue et se transmet le signal inducteur de la phase de formation osseuse. Des précurseurs ostéoblastiques migrent jusqu'aux sites de résorption, prolifèrent et se différencient en ostéoblastes. Ces derniers synthétisent une nouvelle matrice osseuse, qui sera ensuite minéralisée. Une fois la matrice organique minéralisée, on assiste au retour à un nouvel état de quiescence. Chez l'adulte, la durée totale d'un cycle entre deux états de quiescence est de l'ordre de 160 jours (Coxam et Horcajada, 2004).

L'équilibre entre formation et résorption osseuses est ainsi responsable d'une évolution de la masse osseuse au cours de la vie (*Figure 58*). Dans les 20 premières années de la vie, l'activité des ostéoblastes prédomine et le squelette se développe et croît. A l'âge adulte, le capital osseux est maintenu par un équilibre entre formation et résorption osseuses. Au cours du vieillissement, le déséquilibre en faveur de la résorption par rapport à la formation entraîne une perte de la masse osseuse, ce qui conduit à une ostéopénie. La perte osseuse est lente dans un premier temps quelque soit le sexe, mais elle peut s'accélérer chez les femmes au moment de la ménopause. Il s'agit de l'ostéoporose post-ménopausique de type 1 résultant d'une carence œstrogénique.

## **5.2. Les œstrogènes et le tissu osseux**

Le phénomène de couplage entre activités de formation et de résorption requiert la mise en place des mécanismes locaux de régulation. La régulation du remodelage osseux implique des interactions complexes entre l'action des hormones systémiques (hormone parathyroïdienne, vitamine D, hormones stéroïdes) et des facteurs locaux (cytokines, facteurs de croissance ...). La complexité des interactions entre hormones et facteurs locaux est responsable de la régulation précise et localisée des multiples effets de chaque partenaire sur la prolifération et la différenciation des deux types cellulaires.

Parmi ces facteurs, les œstrogènes semblent jouer un rôle essentiel dans la régulation du remodelage osseux. C'est l'équipe de Fuller Albright (Reifenstein et Albright, 1947) qui a été la première à associer, dans les années 1940, l'importance du statut œstrogénique aux



***Figure 59. Action du 17β-œstradiol sur les cellules osseuses***  
D'après Rickard *et al.*, 1999

descriptions cliniques de l'ostéoporose chez des femmes ovariectomisées. Le dimorphisme sexuel est un autre exemple du rôle capital des hormones stéroïdes dans la physiologie osseuse ; en effet, la vitesse de croissance, la longueur, l'épaisseur, le poids, la teneur en cendres des os sont souvent différents entre les mâles et les femelles, suggérant le rôle de ces hormones dans la croissance osseuse.

Une autre preuve directe de l'efficacité des œstrogènes sur le tissu osseux est l'étude WHI chez les femmes ménopausées. En effet, cette étude a montré l'intérêt d'un traitement hormonal sur la prévention des fractures et l'augmentation de la Densité Minérale Osseuse (DMO) (Cauley *et al.*, 2003). 733 fractures (8,6 % des femmes incluses) dans le groupe traité et 896 fractures (11,1 % des femmes incluses) dans le groupe placebo ont été recensées [HR = 0,76 (0,69-0,83)]. Lors des 3 premières années de cette étude, au niveau de la hanche, la DMO a augmenté de 3,7 % dans le groupe traité pour une augmentation de 0,14 % dans le groupe placebo. Cette étude montre l'intérêt thérapeutique d'un THS de la ménopause dans le traitement de l'ostéoporose.

L'étude des souris dont les ERs sont déficients nous montre également le rôle crucial de l'intervention des œstrogènes (Curtis Hewitt *et al.*, 2000). Les souris ERKO femelles présentent des os plus courts et plus fins en terme de diamètre, alors que la DMO est normale. Les souris BERKO ne présentent pas de différences particulières avec la souche sauvage.

Au niveau tissulaire, le principal effet des œstrogènes est de diminuer la résorption osseuse *via* une modulation du nombre et de l'activité des ostéoclastes. D'une part, ces actions sur la résorption osseuse ont été longtemps considérées comme indirectes car modulées par des facteurs paracrines sécrétés par les cellules stromales/ostéoblastiques, qui diminuent la différenciation et l'activité des ostéoclastes (Manolagas *et al.*, 2002). L'action anti-résorptive des œstrogènes s'exerce *via* la diminution de la production de cytokines pro-résorptives, tels que IL-1, TNF $\alpha$ , IL-6 et granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF) (Jilka *et al.*, 1992), et l'augmentation de la production de TGF- $\beta$  (Rickard *et al.*, 1999) (Figure 59). En effet, une augmentation de la production d'IL-1, d'IL-6, de TNF $\alpha$ , et de GM-CSF par les monocytes circulants est observée après ovariectomie. De même, chez des femmes ostéoporotiques, il existe une augmentation de l'activité IL-1 des monocytes circulants corrélée à une augmentation des paramètres de la résorption (Pacifci, 1996). Enfin, d'autres cytokines, dont l'expression est régulée par les œstrogènes, sont impliquées dans le remodelage osseux ; c'est le cas de RANK-L et de l'OPG. Le niveau d'expression cellulaire de RANK-L est corrélé négativement avec les concentrations sériques en E<sub>2</sub>. Les œstrogènes sont capables d'inhiber RANK-L et d'augmenter la production d'OPG, faisant de cette





protéine un médiateur paracrine de l'effet anti-résorptif des œstrogènes (Eghbali-Fatourehchi *et al.*, 2003 ; Yano *et al.*, 1999). D'autre part, la mise en évidence d'ERs dans le cytoplasme d'ostéoclastes aviaires (Oursler *et al.*, 1991) et dans les précurseurs des ostéoclastes porcins (Rassi *et al.*, 2002) suggère que les œstrogènes ont des effets directs dans ces cellules. En effet, les œstrogènes réduisent l'expression et la sécrétion de plusieurs enzymes lysosomales dont les cathepsines L et K ainsi que les  $\beta$ -glucuronidases par les ostéoclastes (Compston, 2001).

### **5.3. Les isoflavones et l'ostéoporose**

#### **5.3.1. Les études épidémiologiques**

L'incidence des fractures ostéoporotiques est plus faible chez les asiatiques que chez les occidentaux. Au début des années quatre vingt dix, le nombre de fractures était deux fois plus important au sein des populations occidentales (Ross *et al.*, 1991). Des facteurs morphologiques ont d'abord été proposés pour expliquer cette moindre incidence. Les femmes asiatiques ont, en effet, un centre de gravité plus bas (elles seraient donc moins sujettes à des chutes), une géométrie du squelette particulière, notamment au niveau du col du fémur (Gerber *et al.*, 2005). D'autre part, l'activité physique, dont le rôle bénéfique sur la bonne santé du tissu osseux est connu, peut être différente entre les populations et conduire à des différences de l'incidence des fractures osseuses. Des facteurs nutritionnels ont également été proposés parmi lesquels, une alimentation traditionnellement riche en isoflavones de soja, qui pourrait expliquer la moindre incidence de ces fractures (Messina *et al.*, 2004).

Les effets de la consommation d'isoflavones de soja sur la DMO de populations asiatiques ont été à l'origine de plusieurs études épidémiologiques. Une première étude menée au Japon et dans laquelle 995 femmes entre 40 et 49 ans ont été recrutées, a montré une corrélation positive entre la DMO du second métacarpe et la consommation en soja (Tsuchida *et al.*, 1999). Une autre étude japonaise a montré une corrélation positive entre la DMO vertébrale et la consommation en isoflavones, chez 478 femmes âgées de 44 à 80 ans. La quantité moyenne d'isoflavones totales ingérées quotidiennement était alors de 54 mg (Somekawa *et al.*, 2001). Trois autres études, menées à Hong-Kong, ont également montré une association positive entre la consommation d'isoflavones et la DMO d'un ou de plusieurs sites du tissu osseux (Ho *et al.*, 2001 ; Ho *et al.*, 2003 ; Mei *et al.*, 2001). L'étude de Mei et collaborateurs, par exemple, a classé les femmes selon leur consommation en isoflavones en trois catégories. Les 325 femmes recrutées consommaient en moyenne 25,8 mg d'isoflavones totales. Après ajustement des variables, le groupe des femmes qui consomment le plus

**Tableau 12. Principaux essais cliniques visant à montrer les effets des isoflavones sur les paramètres osseux**

Références	Design de l'étude	Traitement phyto-œstrogénique	Résultats
(Potter <i>et al.</i> , 1998)	24 semaines, n = 66 entre 39 et 83 ans	Protéines de soja avec des concentrations moyennes (ISP-56 mg) ou fortes (ISP-90 mg) d'isoflavones	DMO et CMO lombaires supérieurs à 24 semaines chez des femmes ayant ingéré ISP90.
(Alekel <i>et al.</i> , 2000)	24 mois, n = 69 femmes en péri-ménopause	3 groupes : soja riche en isoflavones (80,4 mg par jour), soja pauvre en isoflavones, et un placebo	Les isoflavones de soja sont responsables du maintien de la DMO et du CMO
(Morabito <i>et al.</i> , 2002)	12 mois, n = 90 entre 47 et 57 ans	3 groupes : placebo, 54 mg de génistéine ou HRT	Augmentation de la DMO fémorale de 3,6 et de 2,4% pour la génistéine et le HRT, respectivement. Diminution des paramètres de la résorption osseuse (-54% de l'excrétion de pyridinoline à 6 mois) et augmentation des paramètres de l'ossification (+23 % ALP sérique à 6 mois) pour le groupe « génistéine »
(Chen <i>et al.</i> , 2003)	12 mois, n = 203 entre 48 et 62 ans, ménopause passée de 1 à 10 ans.	3 groupes : placebo, 40 mg isoflavones et 80 mg isoflavones. Tous les groupes sont supplémentés en calcium et vitamine D	Seuls 80 mg d'isoflavones sont efficaces sur le maintien du CMO chez des femmes ayant un CMO initial faible.
(Gallagher <i>et al.</i> , 2004)	15 mois (9 de traitement + 6 de suivi), n = 65 entre 40 et 62 ans	Protéines de soja avec 96 mg d'isoflavones, 52 mg, ou moins de 4 mg d'isoflavones par jour	Aucun effet significatif de ces trois traitements sur la DMO fémorale et vertébrale.
(Lydeking-Olsen <i>et al.</i> , 2004)	24 mois, n = 89 postménopausées et ostéoporotiques avérées	4 groupes : lait de soja (76 mg d'isoflavones), progestérone transdermale, lait de soja + progestérone, et placebo	DMO et CMO lombaires ne décroissent pas dans les groupes « lait de soja » et « progestérone » seulement. Au niveau fémoral, pas de décroissance observée dans les 4 groupes.

d'isoflavones a une DMO lombaire plus forte que celles en consommant le moins ( $0,820 \pm 0,145$  vs  $0,771 \pm 0,131$  g.cm<sup>-2</sup>,  $p < 0,05$ ). De plus, cette étude a montré l'existence de cette corrélation seulement sur des patientes post-ménopausées et ces résultats n'ont pas été obtenus dans la population de femmes pré-ménopausées (Mei *et al.*, 2001).

Bien que l'incidence des fractures ostéoporotiques soit plus faible dans les pays asiatiques, il serait erroné de corrélérer seulement cette observation avec une consommation importante d'isoflavones.

De la même façon, chez les femmes ménopausées occidentales, une association entre la quantité ingérée d'isoflavones et marqueurs biochimiques ou la DMO semble exister. Kritz-Silverstein et collaborateurs ont ainsi enregistré une baisse de 18 % du N-télopeptide, un marqueur biochimique de la résorption osseuse, chez des femmes californiennes qui consomment de fortes concentrations de génistéine par rapport à des non consommatrices (Kritz-Silverstein et Goodman-Gruen, 2002).

Les études épidémiologiques et les études d'intervention nutritionnelle réalisées chez l'Homme permettent de conclure (1) que les résultats obtenus chez l'Homme confirment le plus souvent les résultats observés avec les différents types d'expériences (*in vitro* sur lignées cellulaires ou cellules primaires et *in vivo* chez l'animal) et (2) que ces résultats sont encourageants et peuvent justifier la poursuite d'études cliniques qui permettront de mettre en évidence le rôle des isoflavones dans les mécanismes précis de construction et de résorption osseuses (Cassidy *et al.*, 2006a ; Gerber *et al.*, 2005 ; Setchell et Lydeking-Olsen, 2003 ).

### 5.3.2. Les études cliniques

Plusieurs études et rapports d'experts ont depuis confirmé l'effet des isoflavones de soja sur le maintien de la DMO. Les études les plus remarquables par leur durée, le nombre de volontaires inclus et la dose ingérée sont présentées dans le [tableau 12](#).

Plusieurs approches sont proposées dans ces études et l'effet des isoflavones est caractérisé (1) par l'étude des mesures physiques tels que de la DMO et le contenu minéral osseux (CMO), (2) par l'étude de marqueurs biologiques sériques ou urinaires de la formation et de la résorption osseuse ou (3) pour les études les plus complètes, par une combinaison de tous ces marqueurs.

L'étude la plus surprenante est celle de Morabito et collaborateurs, qui amène une preuve directe du rôle de la génistéine sur le métabolisme osseux chez 90 patientes post-ménopausées recevant un placebo, un THS (1 mg d'E<sub>2</sub> + 0,5 mg de norethisterone), ou 54 mg/jour de génistéine de synthèse (Morabito *et al.*, 2002). Chez des patientes consommant

(Kreijkamp-Kaspers <i>et al.</i> , 2004)	12 mois, n = 176 entre 60 et 75 ans	2 groupes : protéines de soja contenant 99 mg d'isoflavones ou protéines de lait	Pas de différences significatives observées entre les 2 groupes d'études. Pas d'amélioration des DMO lombaires et de la hanche.
(Atkinson <i>et al.</i> , 2004)	12 mois, n = 177 entre 49 et 65 ans	2 groupes : placebo et 43,5 mg isoflavones issus du trèfle rouge	DMO et CMO lombaires décroissent, mais sont moins réduites dans le groupe traité. Pas de différence au niveau de la hanche et des marqueurs de la résorption. Augmentation des marqueurs de la formation osseuse ALP sérique, N-telopeptide du collagène de type 1.
(Arjmandi <i>et al.</i> , 2005)	12 mois, n = 62 entre 47 et 61 ans	2 groupes : 25 g de protéines contenant 60 mg d'isoflavones et le groupe placebo	Augmentation des paramètres de la formation osseuse, mais pas de prévention de la perte osseuse lombaire et globale.
(Wu <i>et al.</i> , 2006)	12 mois, n = 136	4 groupes : placebo, 45 min de marche journalière, 75 mg d'isoflavones et une combinaison des deux derniers groupes	Effet significatif observé sur la DMO de la région du triangle de Ward pour les isoflavones seulement. Effet significatif meilleur sur la DMO de la hanche entière pour le groupe avec traitement combiné.

---

ISP : Isolate Soy Protein ; HRT : Hormone Replacement Therapy ; Vit D : Vitamine D ; DMO : Densité Minérale Osseuse ; CMO : Contenu Minéral Osseux ; ALP : Alkaline Phosphatase

la génistéine, les résultats de cette étude montrent une diminution de la résorption osseuse ( $-54 \pm 10$  % de l'excrétion de pyridinoline à 6 mois de traitement) équivalente à celle des femmes sous THS. De plus, ces résultats montrent une augmentation de la synthèse osseuse chez les patientes sous génistéine seulement ( $+ 23 \pm 4$  % d'ALP sérique à 6 mois). Enfin, cette étude montre une augmentation de la DMO à la fois dans le « groupe génistéine » et dans le « groupe THS » ( $+ 3,6 \pm 3$  % et  $+ 2,4 \pm 2$  % respectivement pour la densité minérale fémorale). Cette étude reste très controversée dans la mesure où l'effet même de la génistéine est supérieur à celui du THS (Messina *et al.*, 2004).

Dans la plupart des essais cliniques décrits, les isoflavones ne sont pas efficaces sur tous les paramètres étudiés. Ce qui apparaît d'abord, c'est une grande hétérogénéité des designs d'étude, avec des panels de volontaires très différents (âge, indice de masse corporel, statut hormonal (en rapport avec la ménopause), état osseux normal / ostéopénique / ostéoporotique), des durées d'études différentes, des doses d'isoflavones ingérées différentes, des isoflavones contenues dans des matrices alimentaires différentes ...

Malgré ces hétérogénéités apparentes, ces études supportent l'hypothèse d'une protection relative du squelette avec toutefois nécessairement une durée d'exposition d'au moins 6 mois, une dose minimale journalière de 80 mg d'isoflavones totales, équivalent aglycones, à consommer quotidiennement. Il semble également que les isoflavones soient seulement intéressantes dans le cadre d'une prévention nutritionnelle chez des patientes récemment ménopausées, puisqu'il a été montré que cette protection était inefficace chez des patientes plus âgées (Messina *et al.*, 2004).

Dans certaines études plus récentes, une tendance à différencier les patientes capables de métaboliser de l'équol apparaît. Certains auteurs considèrent même que deux populations existent : les non-productrices et les productrices d'équol. Ces dernières seraient, en effet, celles qui répondraient le mieux en terme de prévention ostéoporotique à la consommation d'isoflavones de soja (Setchell *et al.*, 2002a). Une confirmation de cette hypothèse est apportée dans un essai clinique où les bienfaits des isoflavones et de l'exercice physique sont évalués. L'étude ancillaire de ce dernier essai a montré, après 6 mois d'un régime contenant 75 mg d'isoflavones totales (formes malonyl, acétyl et glucosides), que le sous-groupe des productrices d'équol a une DMO qui se maintient mieux que celle des non-productrices au niveau de la hanche ( $- 0,53$  % vs  $- 1,35$  %) et au niveau global ( $+ 0,13$  % vs  $- 1,77$  %) (Wu *et al.*, 2006).

Jusqu'alors aucune étude n'a démontré l'effet des isoflavones de soja sur l'architecture de la trame osseuse qui, en plus de la densité osseuse, est l'autre composante à prendre en



compte dans la prévention de l'ostéoporose. De plus, aucune étude n'a également démontré les effets des isoflavones sur une éventuelle réduction du risque des fractures.

### **5.3.3. Les études chez l'animal**

#### **5.3.3.1. Les études sur modèles simiens**

La consommation de protéines de soja (comparable à une prise de 148 mg d'isoflavones totales par jour) n'a pas d'effet sur le remodelage osseux des guenons ovariectomisées (Lees et Ginn, 1998). La prise journalière de 35-40 mg d'isoflavones, équivalent aglycone, ne rétablit pas le remodelage osseux induit par l'ovariectomie (seul un effet transitoire est observé à 3 mois de traitement) et ne compense pas la baisse du CMO chez les guenons ovariectomisées (Register *et al.*, 2003).

Les seules études sur modèles simiens ne semblent pas attribuer aux isoflavones d'effets protecteurs de l'ostéoporose, bien que ces animaux (1) soient forts producteurs d'équol et (2) semblent être les plus proches de l'Homme, chez qui plusieurs études cliniques relatent un effet ostéoprotecteur des isoflavones.

#### **5.3.3.2. Les études sur modèles murins**

Une première étude, réalisée chez la rate ovariectomisée, a démontré une efficacité de la consommation de soja comparable à un traitement œstrogénique pour limiter la perte osseuse consécutive à l'ovariectomie (Arjmandi *et al.*, 1996). Deux études démontrent alors que l'effet du soja peut être attribué aux seules isoflavones (Arjmandi *et al.*, 1998 ; Picherit *et al.*, 2001b). L'effet de la consommation pendant 3 mois de génistéine (10 µg par g de poids corporel par jour), de daïdzéine (10 µg par g de poids corporel par jour) ou de 17α-éthinyloestradiol (30 ng par g de poids corporel par jour) a été étudiée chez des rates ovariectomisées (Picherit *et al.*, 2001b). Les mesures de l'ostéocalcine circulante et de l'excrétion urinaire de déoxyypyridinoline, marqueurs du remodelage osseux, ne sont pas différentes entre les groupes « génistéine », « daïdzéine », « 17α-éthinyloestradiol » et « sham-operated », mais restent plus élevées que chez les rates ovariectomisées non traitées. Toutefois, la mesure du CMO et l'analyse d'images de coupes d'os montrent que, parmi les traitements testés, seule la consommation de daïdzéine permet d'obtenir des résultats similaires à ceux obtenus chez des rates « sham-operated » (Picherit *et al.*, 2000). Bien que les isoflavones de soja puissent vraisemblablement limiter le turn-over osseux et ce, de façon dose-dépendante (de 20 à 80 µg par g de poids corporel), elles ne peuvent pas rétablir le CMO chez des animaux ostéopéniques (Picherit *et al.*, 2001a).

**Tableau13. Effets des isoflavones sur les cellules osseuses**

Références	Modèles d'études	Traitement phyto-œstrogénique	Résultats
(Rassi <i>et al.</i> , 2002)	Cultures d'ostéoclastes primaires de porcelets femelles	Vit D, E <sub>2</sub> et daïdzéine à 10 <sup>-8</sup> M	Le nombre d'ostéoclastes diminuent de 51% avec la daïdzéine et la Vit D, de 33 % avec E <sub>2</sub> et Vit D par rapport à la seule Vit D. Cette apoptose est induite <i>via</i> l'activation des caspase-3. L'expression des ERs est augmentée. L'ICI bloque ces effets.
(Garcia Palacios <i>et al.</i> , 2005)	Cultures de lignées murines de monocytes RAW264.7	3 x 10 <sup>-6</sup> M de daïdzéine et de génistéine Témoin positif : E <sub>2</sub> à 10 <sup>-8</sup> M	Les isoflavones augmentent l'expression de ER $\alpha$ , augmentent la prolifération des cellules mais diminuent leur capacité à fusionner pour devenir multinucléées et donc actives sur la résorption avec des effets E <sub>2</sub> $\geq$ daïdzéine > génistéine.
(Sugimoto et Yamaguchi, 2000)	Cultures de lignées d'ostéoblastes de souris, les MC3T3-E1	10 <sup>-7</sup> à 10 <sup>-5</sup> M de daïdzéine avec ou sans cycloheximide. Témoin positif : E <sub>2</sub> à 10 <sup>-9</sup> M Témoin négatif : tamoxifène à 10 <sup>-6</sup> M	La daïdzéine augmente l'activité ALP et le contenu cellulaire d'ADN et protéique. Cette action est bloquée en présence de cycloheximide et de tamoxifène. Une action similaire de E <sub>2</sub> a été reportée.
(Choi <i>et al.</i> , 2001)	Cultures de lignées d'ostéoblastes de souris, les MC3T3-E1	Extrait alcoolique de soja en présence ou non de tamoxifène à 10 <sup>-7</sup> M	L'extrait de soja augmente l'activité ALP et la synthèse de collagène et inhibe l'apoptose cellulaire. En présence de tamoxifène, ces effets sont bloqués.
(Jia <i>et al.</i> , 2003)	Cultures primaires d'ostéoblastes de rats Wistar nouveau-nés	Daïdzéine : de 2 à 50 x 10 <sup>-6</sup> M	La daïdzéine augmente l'expression d'ALP et d'ostéocalcine (de 1,4 à 2,0 fois plus). La daïdzéine augmente aussi la transcription et l'expression de la BMP2 suggérant que les effets de la daïdzéine sur l'action des ostéoblastes dans le remodelage osseux pourraient passer par la BMP2.



D'après les conclusions de ces études sur les modèles murins, la daïdzéine pourrait alors être considérée comme molécule de choix dans le cadre d'une supplémentation nutritionnelle préventive de l'ostéoporose. Or, il semble important de rappeler que ces modèles d'études expérimentaux sont des rates. Les murins sont tous capables de convertir la daïdzéine en équol. Aussi les effets préventifs de la daïdzéine peuvent être imputés à son métabolite, l'équol. Ainsi, Fujioka et collaborateurs ont montré une DMO semblable chez des souris ovariectomisées consommant 0,5 mg d'équol par kg de poids corporel par jour à celles recevant 0,03 µg d'E<sub>2</sub> (Fujioka *et al.*, 2004). Cette étude démontre clairement que l'équol peut inhiber la perte osseuse chez des souris ovariectomisées.

Les différentes lignées murines n'ont pas la même capacité à produire de l'équol. Fort de cette observation, Ward et collaborateurs n'ont pas réussi à mettre en évidence une corrélation entre la capacité à produire de l'équol en grande quantité et la protection vis-à-vis de l'ostéoporose. Ces résultats suggèrent l'existence d'autres paramètres impliqués dans l'ostéoprotection (Ward *et al.*, 2005).

Les modèles murins semblent montrer des effets des isoflavones beaucoup plus intéressants sur l'ostéoporose que les modèles simiens, bien que ces deux modèles soient des excellents producteurs d'équol. Des études *in vitro* devraient donc permettre une meilleure compréhension de l'action cellulaire et moléculaire des isoflavones sur les cellules osseuses.

#### **5.3.4. Les études *in vitro***

L'utilisation de culture de tissus, de cellules ostéoblastiques et ostéoclastiques, a fourni des données importantes sur les effets des isoflavones sur l'activité osseuse. Le *tableau 13* présente les effets des isoflavones relatés par plusieurs études *in vitro*.

##### **5.3.4.1. Les études sur ostéoclastes**

Les études disponibles sur les effets *in vitro* des isoflavones sont limitées mais montrent clairement un effet direct de ces molécules non seulement sur la formation mais aussi sur l'activité des ostéoclastes. L'action des isoflavones sur les ostéoclastes semble entraîner l'induction de l'apoptose cellulaire (Gao et Yamaguchi, 1999 ; Rassi *et al.*, 2002), l'activation de protéine tyrosine phosphatase (Blair *et al.*, 1996 ; Williams *et al.*, 1998), l'inhibition de cytokines, le changement de concentration de Ca<sup>2+</sup> intracellulaire (Gao et Yamaguchi, 1999) et la dépolarisation membranaire (Gao et Yamaguchi, 2000). Ces résultats indiquent que les isoflavones peuvent inhiber la résorption osseuse en diminuant le recrutement et la formation d'ostéoclastes matures. Ceci met en exergue le degré de complexité des paramètres qui régulent l'activité des ostéoclastes.

(Kanno <i>et al.</i> , 2002)	Cultures de lignées murines d'ostéoblastes, les MC3T3-E1	Génistéine et daïdzéine : $10^{-8}$ à $10^{-5}$ M Témoin positif : $E_2$ de $10^{-10}$ à $10^{-6}$ M	Les isoflavones augmentent l'activité ALP, la minéralisation et le contenu en calcium et phosphore cellulaires, mais ne stimulent pas la prolifération de ces cellules.
(Chen <i>et al.</i> , 2002)	Cultures de lignées d'ostéoblastes humains transfectés de façon stable avec ER	Génistéine et daïdzéine : $10^{-10}$ à $10^{-6}$ M Témoin positif : $E_2$ à $10^{-8}$ M Témoin négatif : ICI 182 780	Les isoflavones inhibent la sécrétion d'IL6 mais augmentent la production d'OPG. Ces effets sont bloqués par l'ICI, un ligand spécifique d'ER.
(Rickard <i>et al.</i> , 2003)	Cultures de lignées d'ostéoblastes humains transfectés de façon stable avec ER $\alpha$ ou ER $\beta$	Génistéine $10^{-8}$ à $10^{-5}$ M Témoin positif : $E_2$ Témoin négatif : Raloxifène	A forte concentration, la génistéine inhibe la prolifération des ostéoblastes. La génistéine et $E_2$ augmentent l'expression d'ALP, d'une protéoglycane, du PR mais inhibe l'expression d'ostéopontine et d'IL-6 dans le système où ER $\alpha$ est transfecté. Dans le système ER $\beta$ , seule l'expression de PR est stimulée et la production d'IL6 inhibée par la génistéine et $E_2$ . La génistéine se comporte comme un agoniste de $E_2$ <i>via</i> ER $\alpha$ ou ER $\beta$ indépendamment.
(Heim <i>et al.</i> , 2004)	Cultures primaires de cellules stromales de moelle osseuse humaine	Génistéine : $10^{-6}$ et $10^{-8}$ M Témoin positif : $E_2$ à $10^{-8}$ M	La génistéine (et l' $E_2$ ) engage(nt) préférentiellement des cellules non différenciées vers une voie ostéoblastique, plutôt que vers des cellules adipeuses, mais elle n'influence pas l'expression de marqueurs tardifs. L'engagement vers une différenciation préférentielle passe par une action des ERs, impliquant aussi des mécanismes auto- et paracrines de TGF $\beta$ 1.
(De Wilde <i>et al.</i> , 2004)	Cultures primaires d'ostéoblastes de porcelets femelles	$10^{-9}$ M de daïdzéine Témoin positif : $E_2$ à $10^{-9}$ M	La daïdzéine augmente l'activité ALP, la sécrétion d'ostéocalcine et la minéralisation alors que $E_2$ n'augmente que l'activité ALP. La daïdzéine augmente l'expression de ER $\beta$ alors que $E_2$ augmente l'expression des deux ERs. La daïdzéine et $E_2$ augmentent l'expression d'OPG, de RANK-L et des récepteurs de la vitamine D et de la progestérone. Ces effets sont bloqués par l'ICI.

### 5.3.4.2. Les études sur ostéoblastes

Une littérature plus fournie existe sur les effets des isoflavones *in vitro* sur les ostéoblastes et les données s'accordent à montrer que les isoflavones agissent à différents stades du lignage ostéoblastique, des précurseurs à la cellule mature (Aubin *et al.*, 1995). La présence des deux types de ERs a été démontrée dans de nombreuses lignées ostéoblastiques humaines (Bord *et al.*, 2003 ; Morris *et al.*, 2006) ou animales (Choi *et al.*, 2001 ; De Wilde *et al.*, 2004). L'expression des ERs varie considérablement avec la différenciation des ostéoblastes vers une moindre expression d'ER $\alpha$  et une plus large expression d'ER $\beta$  (Arts *et al.*, 1997).

#### 5.3.4.2.1. Effet sur l'engagement des précurseurs ostéoblastiques

La génistéine favorise l'engagement des cellules stromales primaires de moelle osseuse, prélevées chez des femmes en péri-ménopause vers le lignage ostéoblastique aux dépens des lignées adipogéniques (Heim *et al.*, 2004). De même, la daïdzine et la génistéine à des doses comprises entre  $10^{-9}$  et  $10^{-5}$  M modulent l'engagement des cellules stromales de la moelle osseuse vers la voie des ostéoblastes (Li *et al.*, 2005). Bien que la daïdzine et la génistéine ne soit pas les formes circulantes, ce sont des formes également conjuguées à un groupement polaire, tout comme les formes circulantes majoritaires issues du métabolisme des isoflavones. Cette dernière expérience suggère donc l'activité de telles molécules conjuguées sur les cellules osseuses.

#### 5.3.4.2.2. Effet sur les stades précoces de la différenciation ostéoblastique

Les isoflavones à fortes concentrations ( $10^{-6}$  à  $10^{-5}$  M) augmentent de manière significative le contenu en ADN, la synthèse de collagène de type 1 et une synthèse protéique dans les ostéoblastes murins (Choi *et al.*, 2001 ; Rickard *et al.*, 2003) alors qu'une concentration de  $10^{-9}$  M de daïdzéine n'a aucune action sur ces paramètres liés à la phase de prolifération des ostéoblastes porcins (De Wilde *et al.*, 2004). Par contre, quelle que soit leur concentration, la génistéine et la daïdzéine augmentent l'activité de l'ALP, un marqueur précoce de la différenciation ostéoblastique (Choi *et al.*, 2001 ; De Wilde *et al.*, 2004 ; Morris *et al.*, 2006). Tous ces effets sont bloqués par l'ICI 182,780, antagoniste spécifique des ERs, démontrant que l'effet des isoflavones passe, au moins en partie, par un mécanisme d'action commun aux œstrogènes.

#### 5.3.4.2.3. Effets sur les stades tardifs : minéralisation et fonction ostéoblastique

L'effet des isoflavones sur les stades plus tardifs est peu documenté. Les isoflavones augmentent la sécrétion et la synthèse d'ostéocalcine, un marqueur tardif de la différenciation, et la minéralisation, stade ultime de la maturation ostéoblastique (Chen *et al.*, 2002 ; De

(Kim <i>et al.</i> , 2005)	Cultures de lignées humaines d'ostéoblastes, les MG-63	Génistéine à $10^{-9}$ M, daïdzéine à $10^{-6}$ M et mélanges de ces isoflavones Témoin positif : E2 à $10^{-9}$ M	Les isoflavones stimulent la prolifération des MG-63 et augmentent l'expression d'IGF-1, d'ER $\alpha$ et d'ER $\beta$ .
(Morris <i>et al.</i> , 2006)	Cultures de lignées humaines d'ostéoblastes, les MG-63	Génistéine de 2,5 à $30 \times 10^{-6}$ M en présence de milieu ostéogénique ou non	Les cellules traitées présentent un cytosquelette plus organisé, ce qui permet la libération facilitée de vésicules de matrice. Les cellules traitées synthétisent plus d'ALP et de collagène quelque soit le milieu de culture associé. Il semble que tous les composants pour faciliter la libération de vésicules matricielles soient réunis en présence de génistéine.

---

ALP : Alkaline Phosphatase ; RANK-L : Receptor of Activator N- $\kappa$  – Ligand ; IGF-1 : Insulin Growth Factor-1 ; IL6 : Interleukin-6 ; Vit D : Vitamine D ; BMP-2 : Bone Morphogenetic Protein-2 ; PR : Progesteron Receptor ; OPG : Osteoprotegerin ; TGF $\beta$ 1 : Transforming Growth Factor-1

Wilde *et al.*, 2004 ; Jia *et al.*, 2003 ). Les isoflavones diminuent la synthèse d'IL-6, une cytokine pro-résorptive, suggérant une modulation des mécanismes paracrines de régulation de la fonction ostéoclastique par les ostéoblastes (Chen *et al.*, 2002).

Outre des effets sur la synthèse de matrice osseuse et sa maturation, les isoflavones peuvent aussi moduler les communications entre ostéoblastes et ostéoclastes, mettant en exergue une autre voie d'action des isoflavones dans la prévention de l'ostéoporose. Plusieurs études montrent, en effet, que les isoflavones augmentent la synthèse d'OPG et de RANK-L ainsi que leur sécrétion par les ostéoblastes (Chen *et al.*, 2002 ; De Wilde *et al.*, 2004). La sécrétion simultanée d'OPG et de RANK-L pourrait favoriser la liaison de RANK-L à l'OPG, diminuant aussi la quantité de RANK-L disponible pour influencer la formation et l'activité des ostéoclastes. Cette hypothèse conduirait *in vivo* à une réduction de la résorption osseuse.



Les experts européens du groupe PhytoHealth, ainsi que les experts nationaux du groupe de travail AFSSA, chargés de faire un état de l'art sur les phyto-œstrogènes et leurs effets concluent qu'en raison du nombre limité d'études appropriées, en particulier clinique, et des différences méthodologiques entre ces études, il est possible de supposer l'effet préventif des isoflavones de soja sur la prévention de l'ostéoporose, mais il n'existe à l'heure actuelle pas de preuves claires et définitives.





# Matériel et Méthodes

« L'argent est le nerf de la guerre. »  
*Bismarck*



## **1. Le dosage des isoflavonoïdes dans les aliments, compléments alimentaires et fluides biologiques**

Quelques dosages en isoflavones, notamment ceux des compléments alimentaires Phytosoya<sup>®</sup> ainsi que des fromages à base de soja Tartimi<sup>®</sup> ont été réalisés par le service du développement analytique des laboratoires pharmaceutiques Arkopharma. La méthode de dosage utilisée est la chromatographie liquide haute pression (HPLC) décrite par Murphy et collaborateurs (Murphy *et al.*, 1999).

La majorité des dosages en isoflavones et en équol a été réalisée avec la technique ELISA, mise au point au laboratoire Unité Micronutriments Reproduction Santé (UMRS). Ces derniers travaux ont fait l'objet de plusieurs publications (Bennetau-Pelissero *et al.*, 2003 ; Bennetau-Pelissero *et al.*, 2000 ; Le Houerou *et al.*, 2000 ).

La composition des tampons cités est présentée à la fin de cette première partie.

### **1.1. La digestion et l'extraction des isoflavones**

#### **1.1.1. Préparation des échantillons alimentaires et biologiques**

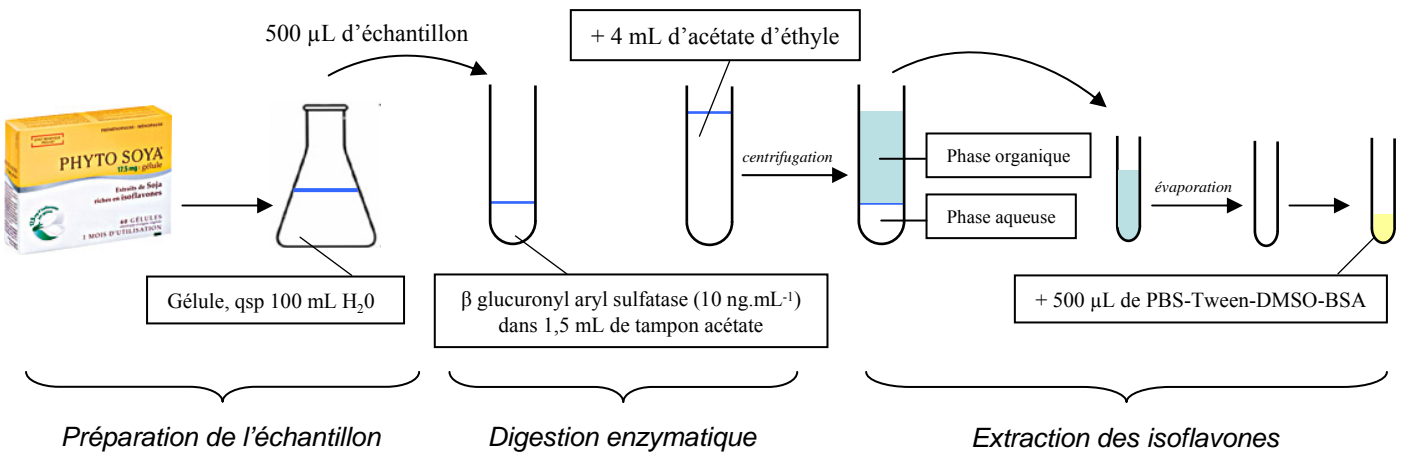
Divers aliments à base de soja comme des fromages à tartiner, du tonyu, des yaourts, des crèmes desserts et des compléments alimentaires, sous forme de gélules ou de comprimés ont été dosés durant ces travaux de thèse. Dans un premier temps, les produits à doser sont dilués dans de l'eau distillée au 1/100<sup>ème</sup>. Lorsque la dilution de certains produits est difficile, un générateur d'ultrasons (Fischer Bioblock Scientific, Illkirch, France) est utilisé (2W pendant 30 secondes). Chaque produit est préparé en triplicat (N = 3). Les isoflavones sont essentiellement sous forme glycosylée. Elles sont donc solubles dans l'eau et passent dans la phase liquide.

Les isoflavones contenues dans des échantillons de plasma et d'urine ont été également dosées. Ces derniers échantillons ne nécessitent pas d'étape préalable de préparation.

#### **1.1.2. Digestion enzymatique**

Avant de doser les isoflavones, une digestion est réalisée grâce à une enzyme de type  $\beta$  glucuronidase-arylsulfatase (Roche, Mannheim, Allemagne). Cette enzyme permet de couper les liaisons entre les isoflavones et les groupements glycosides conjugués. La digestion enzymatique permet donc de doser les concentrations en isoflavones aglycones.

Un volume de 500  $\mu$ L de l'échantillon à doser est prélevé sous agitation. L'enzyme est préparée dans du tampon acétate, pH 5. Un volume de 1,5 mL est ajouté au volume de



*Figure 60. Digestion et extraction des isoflavones contenues dans un complément alimentaire à base de soja*

l'échantillon. La dilution finale de l'enzyme est de  $10 \mu\text{L.mL}^{-1}$ . Le mélange est placé sous agitation pendant 48 h à  $37^\circ\text{C}$ .

Des témoins de digestion sont également préparés. Des solutions mères de génistéine à  $1 \mu\text{g.mL}^{-1}$  sont utilisées. Au final, une concentration de  $0,625 \mu\text{g.mL}^{-1}$  de génistéine doit valider l'étape de digestion enzymatique.

### 1.1.3. L'extraction des isoflavones

Un volume de 4 mL d'acétate d'éthyle acidifié est ajouté alors au mélange. Le nouveau mélange est homogénéisé pendant 2 min. Une étape de centrifugation (5 500 g, 2 min,  $4^\circ\text{C}$ ) permet de séparer deux phases : une phase organique et une phase aqueuse. La phase organique contient l'acétate d'éthyle acidifié dans lequel les isoflavones aglycones sont préférentiellement passées. L'acidification permet aux groupes hydroxyles situés sur les molécules d'isoflavones d'être sous forme OH et non pas  $\text{O}^-$ . Les molécules sont ainsi peu polaires et passent préférentiellement dans le solvant organique.

Les tubes sont alors placés à  $-18^\circ\text{C}$  pendant 1 h. Seule la phase aqueuse est congelée. La phase organique, encore liquide, peut être transvasée dans de nouveaux tubes. Ces derniers tubes étaient préalablement siliconés à l'aide de Sigmacote® (Sigma, St Quentin Fallavier, France), de manière à ce que les isoflavones n'adhèrent pas aux parois du verre. L'acétate d'éthyle est évaporé à l'aide d'un SpeedVac (Savant, Fischer Bioblock Scientific, Illkirch, France). Lors de cette manipulation, les isoflavones ne sont pas évaporées et restent au fond du tube.

L'extraction est ainsi répétée deux fois. Il a été déterminé, par HPLC, que plus de 99 % des isoflavones sont extraites avec ces trois manipulations. Suite à la dernière évaporation, le culot est repris dans 500  $\mu\text{L}$  de Phosphate Buffered Saline-Tween-Diméthylsulfoxyde-Bovine Serum Albumin (PBS-Tween-DMSO-BSA).

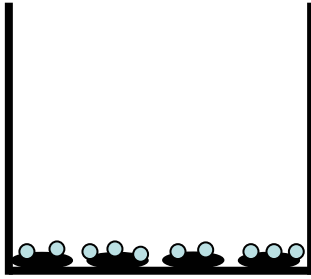
Des témoins d'extraction permettent de valider cette étape du dosage. Ce sont des solutions de génistéine pure à  $1 \mu\text{g.mL}^{-1}$  que l'on doit retrouver quasi-intégralement au final.

La préparation, la digestion enzymatique et l'extraction des isoflavones sont représentées en *figure 60*.

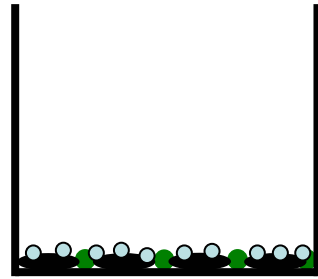
## 1.2. L'Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA)

L'ELISA repose sur un phénomène de compétition de l'anticorps pour deux antigènes. Le premier est libre dans l'échantillon ou la gamme, l'autre est fixe au fond de la plaque 96 puits de dosage (Nunc Maxisorp, Dutscher, Brumath, France). La génistéine, la daïdzéine ou l'équol seront les antigènes en question.

## 1. coating



## 2. saturation

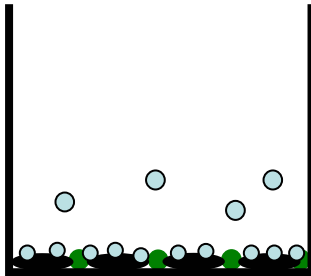


● Thyroglobuline greffée au puits

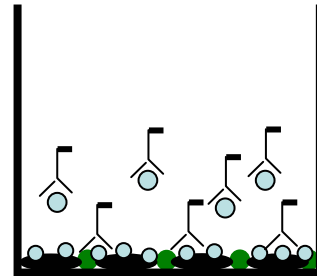
● BSA

- Composé à doser (génistéine, daïdzéine ou équol)

## 3. compétition

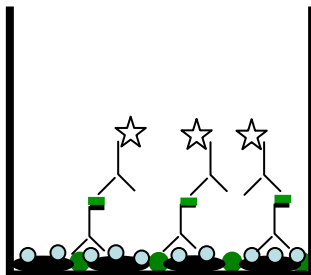


- Composé à doser dans l'échantillon



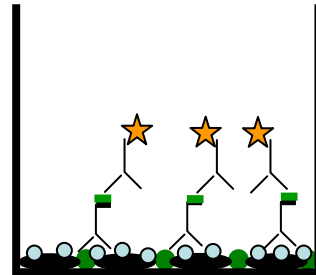
Y Anticorps primaire

## 4. anticorps secondaire



Y Anticorps secondaire

## 5. révélation



*Figure 61. Les principales étapes du dosage des isoflavones en ELISA*

La formation d'anticorps spécifique de chaque isoflavonoïde a été décrite pour la génistéine et la daïdzéine (Le Houerou *et al.*, 2000) et pour l'équol (Bennetau-Pelissero *et al.*, 2000). Brièvement, elle nécessite une première manipulation de conjugaison des isoflavones sur des molécules de BSA, puis une seconde étape d'immunisation de lapin. Lors de ces expérimentations, les isoflavones joueront le rôle de véritables haptènes, qui couplés avec la BSA vont déclencher une réaction immunitaire chez le lapin. Le sérum des lapins sera récupéré, il contient les anticorps anti-génistéine, anti-daïdzéine ou anti-équol.

Sur la plaque, seules les colonnes 1 et 12 ne sont pas utilisées afin d'éviter les « effets-bords » des plaques 96 puits, responsables de variations de dosage importantes. La colonne 2 est utilisée pour les contrôles négatifs (B) et contrôles positifs (B<sub>0</sub>). Une gamme de l'isoflavone à doser est réalisée dans les colonnes 3, 4 et 5. Les échantillons sont disposés dans les colonnes 6 à 11.

Les différentes étapes sont représentées en *figures 61 et 62*.

### **1.2.1. Le coating**

Il correspond à la fixation des isoflavones à doser au fond des puits de la plaque. Les isoflavones sont couplées à une protéine de fort poids moléculaire, la thyroglobuline. Le complexe thyroglobuline - génistéine, - daïdzéine ou - équol est dilué dans un tampon carbonate (0,05 M, pH 9,6). 200 µL de cette solution sont ajoutés dans chaque puits pour une nuit complète. Les plaques sont placées à 4 °C. A un tel pH, la thyroglobuline acquiert des propriétés basiques et se charge négativement. Elle peut ainsi se fixer aux parois des puits, chargées elles positivement.

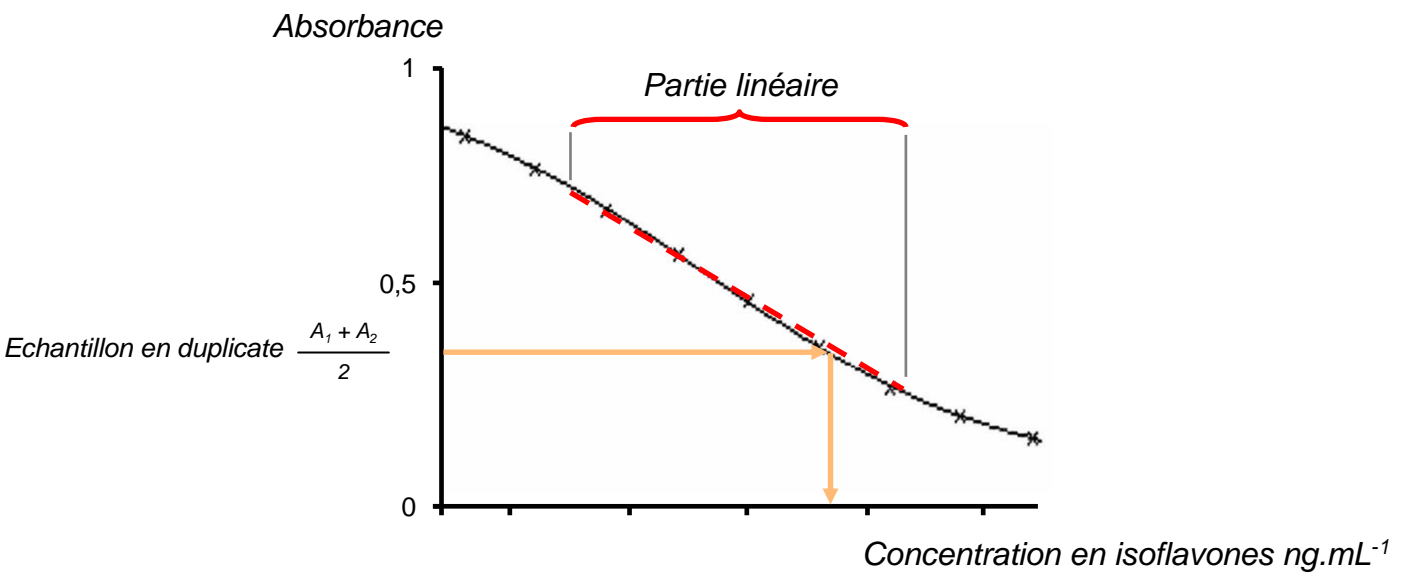
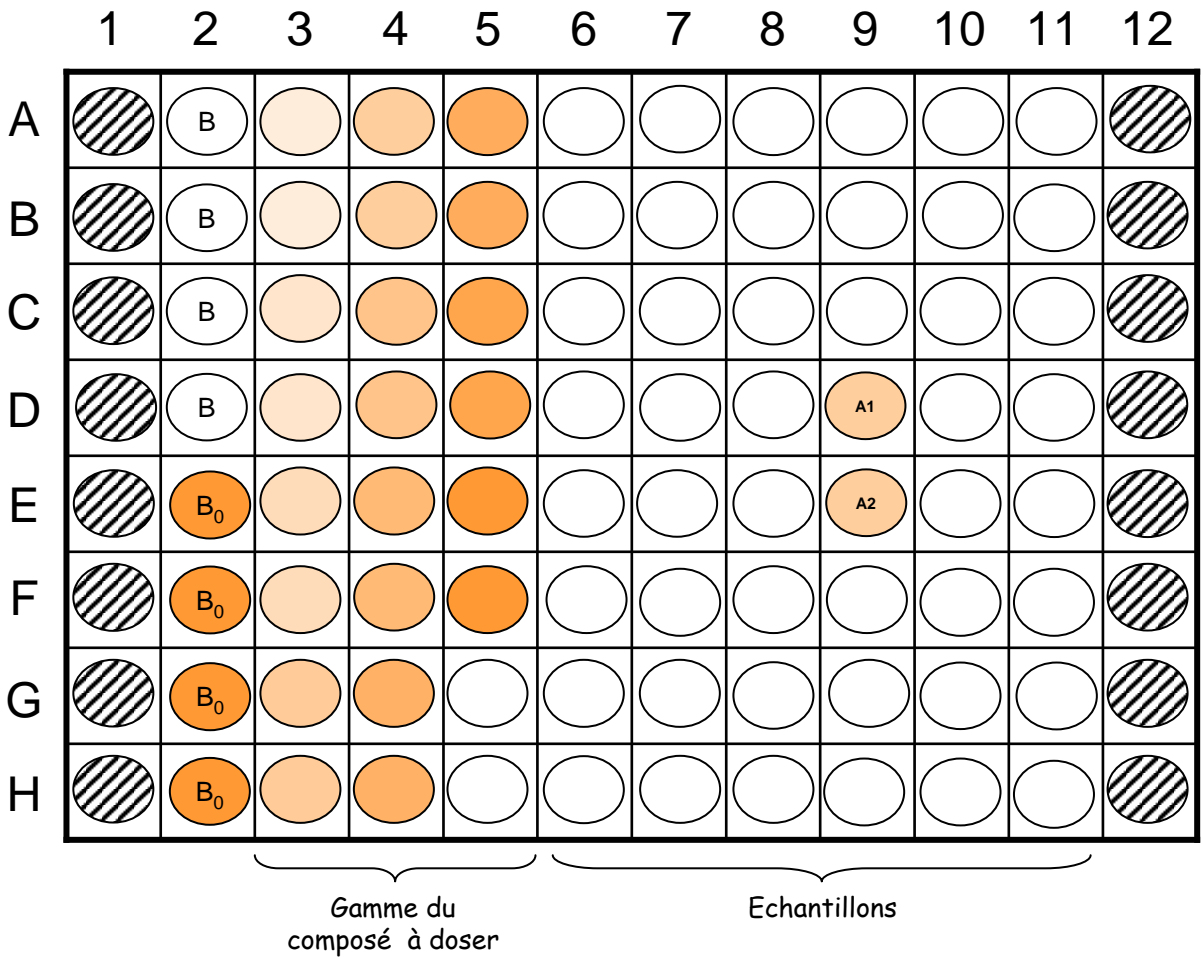
Le coating d'une partie de la colonne 2 est particulier dans la mesure où les puits des contrôles négatifs ne sont pas coatés avec le complexe thyroglobuline-isoflavones. Dans ce cas, ainsi que dans les colonnes 1 et 12, 200 µL de tampon carbonate sont ajoutés.

### **1.2.2. La saturation**

Une fois les puits vidés, 200 µL de PBS-Tween-DMSO-BSA sont ajoutés dans chaque puits pendant 30 min à 37 °C. La BSA va s'immiscer dans les espaces laissés vacants par le complexe thyroglobuline – isoflavone. Le DMSO permet de favoriser la solubilité des isoflavones aglycones.

### **1.2.3. La compétition**

Les puits des plaques sont rincées 3 fois avec du tampon PBS-Tween-DMSO. La distribution dans la plaque est différente selon les colonnes. Dans la colonne 1, 2 et 12,



*Figure 62. Calcul des concentrations en isoflavones à partir d'une gamme*



100  $\mu\text{L}$  de tampon PBS-Tween-DMSO-BSA sont ajoutés. Des colonnes 3 à 5, 100  $\mu\text{L}$  par puits d'une gamme de l'isoflavone à doser sont distribués. Le premier point de gamme pour la génistéine et l'équol est de  $500 \text{ ng.mL}^{-1}$  ; pour la daïdzéine, il est de  $1\ 000 \text{ ng.mL}^{-1}$ . Pour ces 3 composés, le pas successif des gammes est de 2. Onze points de gamme sont réalisés pour la daïdzéine et l'équol, 9 points de gamme sont réalisés pour la génistéine. Chaque point de gamme est réalisé en duplicat ( $n = 2$ ) sur la plaque. Les échantillons sont également distribués en duplicat sur la plaque. 100  $\mu\text{L}$  d'échantillon sont distribués dans les puits des colonnes 6 à 11.

Les solutions d'anticorps anti-génistéine, anti-daïdzéine ou anti'équol sont préparées extemporanément dans du tampon PBS-Tween-DMSO-BSA et 100  $\mu\text{L}$  d'une solution d'anticorps primaire sont distribués sur toute la plaque. Les plaques 96 puits sont placées à  $37^\circ\text{C}$  sous agitation légère pendant 2 h. Les anticorps reconnaissent à la fois les isoflavones contenues dans les échantillons à doser et les isoflavones couplées à la thyroglobuline : il y a donc une compétition.

Dans les puits B, il n'y a ni isoflavone couplée à la thyroglobuline, ni isoflavone libre. Les anticorps ne peuvent donc pas se lier. En revanche, dans les puits  $B_0$ , les anticorps reconnaissent les seules isoflavones couplées à la thyroglobuline : les liaisons sont maximales.

#### **1.2.4. L'anticorps secondaire**

Les puits des plaques sont rincées 3 fois avec du tampon PBS-Tween-DMSO. Tous les anticorps liés aux isoflavones libres sont éliminés des puits. Seuls subsistent les complexes anticorps-isoflavones couplées à la thyroglobuline.

Une solution d'anticorps secondaire anti-Ig G de lapin, couplé à la peroxydase (Dako, Trappes, France) est préparée dans du tampon PBS-Tween-DMSO-BSA et 200  $\mu\text{L}$  sont distribués dans tous les puits, puis la plaque est incubée à  $37^\circ\text{C}$ , sous agitation légère pendant 30 min.

#### **1.2.5. La révélation**

Les puits des plaques sont rincées 3 fois avec du tampon PBS-Tween-DMSO. Une solution d'orthophénylène-diamine (OPD) (0,005 M) est préparée extemporanément dans un tampon citrate-phosphate (pH 5 ; 0,15 M), auquel 0,025 % de  $\text{H}_2\text{O}_2$  sont ajoutés. La réaction d'oxydation de l'orthophénylènediamine (OPD) dure 30 min dans l'obscurité. Pour arrêter la réaction, 50  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (4 M) sont ajoutés dans chaque puits. Le produit formé est de



(pH 7,4, tris base, 1 M et NaCl, 1,5 M) pendant 30 min à 37 °C. A la fin de l'incubation, la réaction est arrêtée 10 min sur glace et l'absorbance est mesurée à 405 nm à l'aide d'un spectrophotomètre. L'activité ALP est le rapport entre l'ALP brute et le nombre de cellules, elle est exprimée en fmoles de paranitrophénol phosphate libérées par minute et par cellule.

## **2.5. La mesure de la minéralisation**

Le processus de minéralisation a été étudié sur des culturesensemencées à très forte densité. Nous avons travaillé avec 200 000 cellulesensemencées par puits en boîte de 6 puits. Les cellules sont cultivées en présence des molécules à tester ou du solvant jusqu'à l'apparition des nodules de minéralisation, environ 30 jours aprèsensemencement. Au terme de la culture, les milieux sont éliminés. Les cellules sont rincées dans un tampon de type PBS (2 mL tris base 1 M, pH 7,6, 20 mL NaCl 1,5 M, 78 mL eau distillée). Les cellules sont fixées dans de l'éthanol 75 % froid pendant 30 min, puis rincées trois fois avec de l'eau distillée. L'alizarin Red S (Sigma, St Quentin Fallavier, France) 40 mM, dilué dans un tampon borate (0,1 M, pH 4), est ajouté sur les cultures pendant 15 min à l'obscurité. Les cultures sont alors rincées trois fois avec de l'eau distillée puis trois fois avec du PBS. Une fois sec, les cristaux sont décolorés par du cétylpyridinium chloride sodium (Sigma, St Quentin Fallavier, France) à 10 % dilué dans un tampon phosphate (10 mM, pH 7). La solution issue de cette décoloration est lue au spectrophotomètre à 570 nm. La minéralisation est calculée à partir d'une gamme établie extemporanément.

## **2.6. Les western blots des récepteurs aux oestrogènes**

### **2.6.1. L'obtention des fractions cellulaires**

Les cellules sont grattées dans un tampon d'extraction (tris HCl 20 mM, EGTA 0,5 mM, 0,5 mM EDTA, dithiothréitol 1 mM, pepstatine 0,6 mM, benzamidine 0,1 mM, phénylméthylsulfonidenfluoride 2 mM, aprotinine 0,125 mM, leupeptine 0,1 mM), pH 7,5. Après trois sonications de 10 secondes à 2 W, les extraits totaux sont placés sous glace et les protéines totales sont dosées par la méthode de Lowry (Lowry *et al.*, 1951).

### **2.6.2. La séparation des protéines et immunoblotting**

Les extraits totaux sont repris dans du tampon de Laemmli contenant du bleu de bromophénol (0,02 %), du glycérol (5 %), du sodium dodécyl sulfate (SDS) (1 %), du  $\beta$ -mercaptoéthanol (2,5 %) et du tris base (31,25 mM), pH 6,8, puis portés à ébullition pendant 3 min.

*Tableau 14. Tests de spécificité des anticorps anti-équol, -génistéine et -daïdzéine*

<i>Composés testés</i>	<i>Réaction croisée (%)</i>		
	<i>Anti-équol</i>	<i>Anti-génistéine</i>	<i>Anti-Daïdzéine</i>
Daïdzéine	0,120 ± 0,030	2,050 ± 1,200	
Génistéine	0,015 ± 0,004		5,220 ± 10,000
Equol		0,062 ± 0,02	0,190 ± 0,050
Formononétine	0,013 ± 0,005	2,080 ± 1,100	51,500 ± 10,000
Biochanine A	0,025 ± 0,005	53,000 ± 12,000	1,780 ± 0,500
<i>o</i> -Desméthylangolensine	0,050 ± 0,006	< 0,015	< 0,016

couleur orange. L'absorbance de chaque puits est lue à 490 nm avec un spectrophotomètre Dynex MRX-II (Issy-les-Moulineaux, France).

### **1.3. Les caractéristiques techniques de ce dosage**

Les variations inter-dosages sont de 13,1 % pour la génistéine, de 12,8 % pour la daïdzéine et de 13,6 % pour l'équol (Bennetau-Pelissero *et al.*, 2003). Les variations intra-dosages sont de 4,8 % pour la génistéine, de 5% pour la daïdzéine et de 5% pour l'équol. La sensibilité de ces dosages, mesurée par le point de gamme moyen obtenu, est de 15,6 ng.mL<sup>-1</sup> pour la génistéine, 40 ng.mL<sup>-1</sup> pour la daïdzéine et de 10 ng.mL<sup>-1</sup> pour l'équol. La limite de détection est de 3,9 ng.mL<sup>-1</sup> pour la génistéine, 10 ng.mL<sup>-1</sup> pour la daïdzéine et de 2,5 ng.mL<sup>-1</sup> pour l'équol.

Des tests de spécificité des anticorps ont été réalisés. Ils permettent de déterminer les réactions croisées entre chaque composé (*Tableau 14*).

### **1.4. Les tampons utilisés au cours du dosage ELISA des isoflavones**

#### 1.4.1. Tampon carbonate 0,05 M pH 9,6

Solution A : 0,05 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>

Solution B : 0,05 M NaHCO<sub>3</sub>

Verser la solution A dans la solution B jusqu'à pH 9,6

#### 1.4.2. Tampon phosphate 0,1 M pH 7,3

Solution A : 0,1 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2H<sub>2</sub>O

Solution B : 0,1 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

Verser la solution A dans la solution B jusqu'à pH 7,3

#### 1.4.3. Tampon citrate-phosphate 0,15 M pH 5,0

Solution A : 0,2 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

Solution B : 0,1 M acide citrique, H<sub>2</sub>O

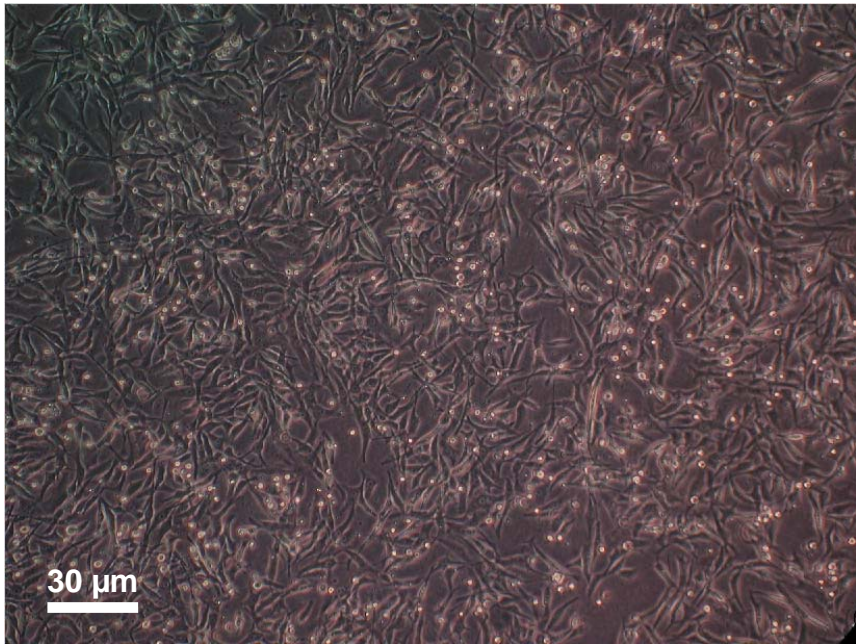
Verser la solution A dans la solution B jusqu'à pH 5,0

#### 1.4.5. Tampon PBS-Tween-DMSO

100 mL de tampon phosphate à 0,1 M + 9 g de NaCl + 10 mL de DMSO + 500 µL de Tween 20. Compléter à 1 L avec de l'eau distillée

#### 1.4.6. Tampon PBS-Tween-DMSO-BSA

0,1 g de BSA pour 100 mL de tampon PBS-Tween-DMSO



*Figure 63. La lignée d'ostéosarcomes MG-63*

## 2. Les expériences *in vitro*

### 2.1. Le matériel d'étude

#### 2.1.1. Le matériel biologique, les cellules MG-63

Les lignées d'ostéoblastes MG-63 proviennent de l'ATCC (CRL-1427). Ces cellules sont des ostéosarcomes humains, prélevées chez un garçon caucasien de 14 ans. La lignée a été établie en 1977 (Billiau *et al.*, 1977). La morphologie de ces cellules est de type fibroblastique (*Figure 63*) et elles expriment les ERs.

#### 2.1.2. Les produits chimiques

L'E<sub>2</sub> (Sigma, St Quentin Fallavier, France) est utilisé comme témoin positif de l'activité œstrogénique. Une solution mère est préparée à 2.10<sup>-6</sup> M dans du DMSO.

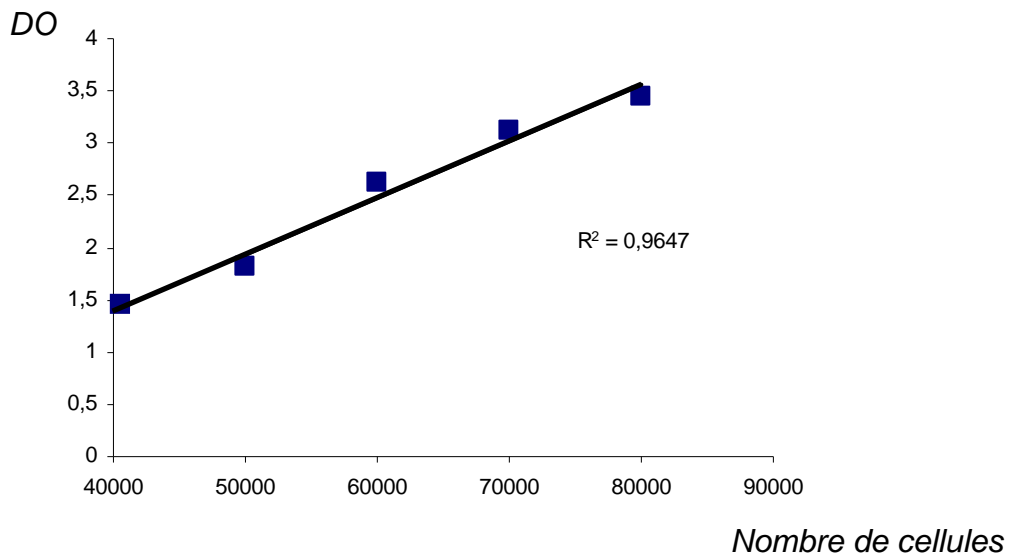
Les isoflavones et l'équol sont issus de synthèses chimiques réalisées par le Laboratoire de Chimie Organique et Organométallique (LCOO) UMR 5802 CNRS, Bordeaux, France. L'équol obtenu est un mélange racémique. Ces composés sont dissous dans du DMSO et les solutions mères sont préparées et concentrées 2 000 fois plus que l'utilisation finale désirée (de 2.10<sup>-2</sup> à 2.10<sup>-6</sup> M pour chaque composé). La quantité de DMSO dans les milieux expérimentaux est ainsi de 0,05 %. L'ensemble de ces solutions est stocké à 4 °C et à l'abri de la lumière.

D'autre part, l'ensemble des produits chimiques provient des laboratoires Sigma (St Quentin Fallavier, France). Les exceptions seront précisées au cours des paragraphes suivants.

### 2.2. La culture cellulaire

#### 2.2.1. Les milieux de culture et expérimentaux

Les milieux de culture sont préparés à partir de Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM). Dans les milieux de culture, le DMEM contient du rouge phénol alors que dans les milieux expérimentaux, le DMEM n'en contient pas. Les autres constituants des milieux, communs à la culture et à l'expérimentation, sont (1) 1 % (v/v) d'un mélange d'antibiotiques et d'antimycotiques contenant streptomycine (10 mg.mL<sup>-1</sup>) et pénicilline (10 000 U.mL<sup>-1</sup>), (2) 1 % (v/v) de L-Glutamine et (3) 10 % de Sérum de Veau Fœtale (SVF) (Life Technologies, Cergy Pontoise, France, Lot No 40G5311K). Avant utilisation en milieu de culture, le SVF est décomplémenté par chauffage à 56 °C pendant 30 min. Avant utilisation en milieu expérimental, le SVF décomplémenté est en plus déstéroïdé par incubation (2 fois 1 h sous agitation dans de la glace) avec un mélange charbon végétal actif (1 %, w/v) et dextran (0,1



*Figure 64. Relation entre densité optique et nombre de cellules*



%, w/v). Le charbon et le dextran sont éliminés par centrifugation, le SVF déstéroïdé est ensuite stérilisé par filtration.

### **2.2.2. L'entretien et la congélation des cellules**

Les cellules MG-63 sont cultivées dans des flacons de culture Greiner® à 37 °C en atmosphère humide enrichie en 5 % de CO<sub>2</sub>. Lorsqu'elles atteignent la confluence (en 3-4 jours), les cellules sont repiquées en réduisant leur densité d'un facteur 5. Brièvement, les cellules sont rincées avec du PBS, puis décollées par l'action de la trypsine. La suspension cellulaire ainsi obtenue est centrifugée pour éliminer la trypsine. Les cellules sont reprises dans du milieu de culture et re-ensemencées dans de nouveaux flacons de culture.

Des lots de congélation sont également réalisés de manière à limiter le nombre de passages. Les cellules sont récupérées par action de la trypsine (voir ci-dessus), puis le culot cellulaire ainsi obtenu est repris dans un mélange de congélation (Milieu de culture / DMSO, 92/8, v/v) préalablement réfrigéré à 4 °C. Environ 10<sup>6</sup> cellules par mL de la solution de congélation sont réparties dans des cryotubes, progressivement congelées jusqu'à - 80 °C.

### **2.3. La mesure de la prolifération**

La croissance cellulaire est évaluée par dénombrement des cellules. Les cellules sont ensemencées à une densité de 6 000 cellules par puits en plaques 96 puits et cultivées dans le milieu expérimental à J0. Les molécules étudiées ou le solvant sont ajoutés à J1. Dans certains cas, 1 µM d'ICI 182, 780 (Tocris, Fischer Bioblock Scientific, Illkirch, France) est également ajouté au cours de l'ensemencement. Les cellules sont dénombrées à J5, J7, J9, J11 et J13 par dosage colorimétrique. A chaque mesure, les cellules sont fixées et colorées au bleu de méthylène, comme décrit dans la littérature (Katzburg *et al.*, 1999). Le colorant est élué à 37 °C en présence de HCl à 0,1 N. L'absorbance est lue à 620 nm à l'aide d'un spectrophotomètre. Le nombre de cellules est calculé à partir d'une gamme établie expérimentalement (*Figure 64*).

### **2.4. La mesure de l'activité phosphatase alcaline osseuse**

De la même façon que pour la mesure de la prolifération, les cellules sont ensemencées à une densité de 6 000 cellules par puits en plaque 96 puits. L'activité ALP est mesurée aux mêmes jours que le nombre de cellules. La mesure de l'ALP est également un dosage colorimétrique, décrit par Katzburg et collaborateurs (Katzburg *et al.*, 1999). Brièvement, les cellules sont incubées en présence d'un substrat, le paranitrophényl phosphate (Sigma, St Quentin Fallavier, France) dilué à 1,33 mg.mL<sup>-1</sup> dans du Tris Buffer Saline (TBS)



Les protéines sont séparées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide à 10 % (SDS/PAGE) dans du tampon (tris base 25 mM, pH 8,3, glycine 192 mM, SDS 0,1 %) en condition dénaturante. Elles sont ensuite transférées en milieu liquide (tris base 25 mM, pH 8,3, glycine 192 mM, SDS 0,1 %, éthanol 20 %), pendant 2 h sous l'effet d'une tension électrique de 100 mA, sur une membrane de polyvinylidifluoride (Amersham, Saclay, France). La membrane est saturée par un tampon de saturation (tris 10 mM, pH 8, NaCl 150 mM, 4 % lait écrémé, 0,05 % Tween 20). La membrane est ensuite incubée une nuit à 4 °C avec des anticorps polyclonaux de lapin reconnaissant les ER $\alpha$  (1  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , HC20, TEBU) et ER $\beta$  (1  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , H150, TEBU) d'origine humaine. Les anticorps non liés à la membrane sont éliminés par 3 lavages successifs (5, 10 et 15 min) dans un tampon TBS Tween (tris 10 mM, pH 8, NaCl 150 mM, 0,05 % Tween). Les anticorps liés à la membrane sont détectés par incubation de 1 h à température ambiante dans un anti-sérum de chèvre anti-lapin marqué à la peroxydase, dilué dans le tampon de saturation. Après 3 rinçages successifs (5, 10 et 15 min) dans du tampon TBS Tween, les protéines immunoréactives sont révélées par chimioluminescence (Kit ECL TM, Amersham, Saclay, France). Les membranes sont exposées à des films XR Kodak (Sigma, St Quentin Fallavier, France). Les signaux sont numérisés et l'intensité des signaux est quantifiée à l'aide d'un logiciel Image J (NIH software, USA).

## **2.7. L'analyse statistique**

Toutes les valeurs sont exprimées sous forme de moyenne  $\pm$  SEM (écart standard à la moyenne). L'analyse statistique des différences obtenues entre les valeurs observées chez les cellules traitées ou les cellules témoins a été effectuée par un Student's t-test (apparié ou non selon les paramètres étudiés), soit par une analyse de variance (ANOVA) suivie par un post-test de comparaison multiple des moyennes (Tukey test).



# Résultats

« La vérité vaut bien qu'on passe quelques années sans la trouver »

*Jules Renard*



## **1. Une étude de bioéquivalence des isoflavones de deux formulations de compléments alimentaires à base de soja, Phytosoya®**

VERGNE S., TITIER K., BERNARD V., ASSELINEAU J., DURAND M., LAMOTHE V., POTIER M., PEREZ P., DESMOTES-MAINARD J., CHANTRE P., BENNETAU-PELISSERO C., MOORE N. AND SAUVANT P. “Plasmatic and urinary pharmacokinetics of isoflavones after oral administration of two formulations of a soy based capsule, in healthy human volunteers” *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2007, 43(4):1488-94.

VERGNE S.\*, TITIER K., BERNARD V., ASSELINEAU J., DURAND M., LAMOTHE V., POTIER M., PEREZ P., DESMOTES-MAINARD J., CHANTRE P., BENNETAU-PELISSERO C., MOORE N. AND SAUVANT P. “Soy proteins of food supplements do not affect the bioavailability of isoflavones: a human study.” 4<sup>th</sup> PhytoHealth Congress, Lausanne, Switzerland, 2005 (communication orale) \*orateur.

VERGNE S., CHANTRE P., BENNETAU-PELISSERO C. AND SAUVANT P. “Phytoestrogen bioavailability of two formulations of a soy based food supplement.” 2<sup>ème</sup> congrès de la Société Française de Nutrition, Marseille, France, 2005 (poster).

### **1.1. Contexte de l'étude**

Les Laboratoires Arkopharma ont montré dans une étude clinique réalisée chez les femmes ménopausées, que leur produit Phytosoya entraînait une diminution significative des bouffées de chaleur comparativement au groupe placebo (Faure *et al.*, 2002). Cette étude a été réalisée dans le cadre d'un développement diététique avec un produit contenant de la farine de soja titrée à 2,5 % d'isoflavones associée à un extrait de soja standardisé à 10 % en isoflavones ; l'association avec l'extrait se justifiant par rapport à la quantité journalière d'isoflavones de soja nécessaire à l'activité du produit sur les bouffées vasomotrices de la femme ménopausée.

Lorsque les laboratoires Arkopharma ont décidé de déposer une demande d'Autorisation de Mise sur le Marché (AMM) pour Phytosoya<sup>®</sup>, la formule contenant la farine ne correspondait plus aux exigences d'un développement pharmaceutique. Ainsi, les études pharmaceutiques et pré-cliniques requises dans le cadre d'un dossier d'AMM ont donc été réalisées avec l'extrait de soja standardisé à 10 % en isoflavones apportant la même quantité d'isoflavones totales que la formule contenant la farine de soja et l'extrait standardisé de soja.

Dans le dossier d'AMM, la comparaison de la composition en isoflavones du lot clinique (extrait de soja standardisé à 10 % en isoflavones et farine de soja titrée à 2.5 % d'isoflavones totales) et du lot pilote (extrait de soja standardisé à 10 % en isoflavones) a été étudiée afin de démontrer leur équivalence. Il ressort de cette analyse que les deux formules présentent la même quantité d'isoflavones totales, soit environ 17,5 mg par gélule. La proportion des différentes formes d'isoflavones des deux formules est tout à fait comparable. Les formes glycosilées sont présentes dans les mêmes proportions, la daïdzine est majoritaire à 62 %, la génistine est présente à 13 %.

La transposition des résultats cliniques de la formule contenant farine et extrait de soja à la formule contenant seulement l'extrait de soja nécessite la démonstration que ces deux formules sont bioéquivalentes. C'est pour répondre à cet objectif que nous avons entrepris une étude dont l'objectif était de comparer les paramètres pharmacocinétiques des isoflavones contenues dans les deux formules à base de soja chez 12 volontaires sains.

### **1.2. Résumé et intérêt de l'étude**

L'étude réalisée a d'abord permis de conclure à la bioéquivalence des isoflavones contenues dans les deux formulations de Phytosoya<sup>®</sup>, somme toute assez semblable. Cette étude a également permis d'appréhender chez des volontaires sains, les profils pharmacocinétiques des isoflavones consécutifs à l'ingestion de tels compléments



alimentaires à base de soja et les paramètres associés à ces profils pharmacocinétiques. D'autre part, cette étude a permis de valider la technique ELISA de dosage des isoflavones, mise au point à l'UMRS, sur une étude complète de biodisponibilité. La sensibilité de cette technique est apparue suffisante et comparable à celle développée en HPLC couplée à la masse.

De façon plus intéressante, cette étude a permis de comparer la biodisponibilité et l'excrétion urinaire des isoflavones selon la capacité des volontaires à produire de l'équol. Jusqu'alors la littérature ne démontrait pas de différence entre ces deux sous-populations dans la biodisponibilité ni même dans l'excrétion urinaire des isoflavones, et du précurseur de l'équol, la daïdzéine en particulier (Karr *et al.*, 1997 ; Lampe *et al.*, 1998; Slavin *et al.*, 1998 ). Notre étude apporte une donnée nouvelle, dans la mesure où pour la première fois, nous avons démontré que la production d'équol limite l'excrétion urinaire de daïdzéine, son précurseur. Nous avons pu obtenir de telles données grâce à un échantillonnage recueilli sur une durée de 48 h, au lieu de 24 h comme l'avait fait les études précédentes. Les isoflavones ne sont, en effet, pas complètement éliminées à 24 h et il est donc nécessaire de travailler sur la durée complète d'élimination des isoflavones.

### **1.3. Bioavailability and urinary excretion of isoflavones in humans: effects of soy-based supplements formulation and equol production**

**Bioavailability and urinary excretion of isoflavones in humans: effects of soy-based supplements formulation and equol production.**

Sébastien Vergne<sup>a,b</sup>, Karine Titier<sup>c</sup>, Virginie Bernard<sup>d</sup>, Julien Asselineau<sup>e</sup>, Marlène Durand<sup>d</sup>, Valérie Lamothe<sup>a</sup>, Mylène Potier<sup>a</sup>, Paul Perez<sup>e</sup>, Jacques Demotes-Mainard<sup>d</sup>, Philippe Chantre<sup>b</sup>, Nicholas Moore<sup>c</sup>, Catherine Bennetau-Pelissero<sup>a</sup>, Patrick Sauvant<sup>a\*</sup>.

\* Corresponding author: Dr. Patrick Sauvant, ENITA de Bordeaux, 1, cours du Général de Gaulle, ENITA de Bordeaux, CS 40201, 33175 Gradignan Cedex, France. E-mail: [p-sauvant@enitab.fr](mailto:p-sauvant@enitab.fr). Tel: + 33 (0)5 57 35 07 54. Fax: + 33 (0)5 57 35 07 59

<sup>a</sup> ENITA, Unité Micronutriments, Reproduction, Santé, Bordeaux, France. <sup>b</sup> Arkopharma, Laboratoires Pharmaceutiques, Carros, France. <sup>c</sup> Université Victor Segalen, Département de Pharmacologie, INSERM U657 Bordeaux, France. <sup>d</sup> Centre d'Investigation Clinique (CIC), INSERM - CHU de Bordeaux, France. <sup>e</sup> CHU de Bordeaux, Unité de Soutien Méthodologique à la Recherche clinique et épidémiologique, Bordeaux, France.

This study was supported by Arkopharma, Pharmaceutical Laboratories.

Sébastien Vergne is the recipient of a fellowship (CIFRE N°856/2003) from Arkopharma, Pharmaceutical Laboratories and National Association of Technical Research, Research Ministry of France.

**Abstract**

Soy isoflavones (IF) are of particular interest for their possible estrogenic effects on the symptoms of menopause. The bioavailability of IF is clearly a factor influencing their biological activity. The first aim of this study was to elucidate the impact of the matrix process and especially the formulation of soy based capsules, on IF bioavailability. Twelve healthy volunteers were recruited for a randomized, double-blind, two-way crossover trial and received a single dose of the two soy-based formulations, one containing a pure soy standardized extract of IF, and the other containing soy flour in addition to the standardized extract of IF. Using a new and validated ELISA method, we measured the plasma and urinary concentrations of genistein, daidzein and its metabolite equol. Based on European Medicine Evaluation Agency recommendations, the main pharmacokinetic parameters allowed us to demonstrate the bioequivalence of the two formulations, indicating that the presence or absence of soy flour did not alter either the absorption or the elimination of daidzein and genistein. As bioequivalence was demonstrated, we pooled data collected during the two study-periods to address another original issue: Did the ability to produce equol affect the bioavailability of daidzein? We demonstrated that daidzein excretion was significantly lower in equol producers compared with equol non producers over the entire elimination period of the soy IF. This difference disappeared when equol excretion was added to daidzein excretion in equol producers. Our results indicated that the production of equol could partly explain the difference in daidzein bioavailability after IF ingestion.

**Key-Words**

Isoflavones, Equol, Bioavailability, Urinary excretion, ELISA

## 1. Introduction

Soy (*Glycine max*) isoflavones (IF) such as genistein and daidzein belong to the well known phytoestrogen family. These polyphenolic compounds from soy are of interest, due to their estrogenic activity. They have been proposed as a replacement to estrogen deficiency consecutive to menopause. Indeed, the side effects of hormonal replacement therapy have caused a fair amount of apprehension amongst menopausal women [1-3]. For several years, a large volume of controversial scientific literature has been dealing with the efficacy of phytoestrogens in menopausal treatment. To our knowledge, few clear conclusive statements about the efficacy of soy IF on human health have been written [4,5]. In all cases, to assess the potential benefits of soy IF and their metabolites, and the mechanisms by which beneficial effects on health occur, it is essential to have a more complete understanding of the pharmacokinetics of IF after the consumption of soy IF, and particularly after the consumption of soy-based supplements. The differences in the processing methods for soy-based supplements and/or the inter-individual variabilities in IF metabolism could be responsible for these discrepancies [4,6,7]. Indeed, soy extracts are obtained through various industrial processes (alcohol or water extraction, resin separation, or combinations of these techniques), leading to numerous soy-based supplement formulations. Despite the great number of commercialized soy-based supplements, little data is available on soy IF bioavailability according to the raw materials used in the production of particular formulations.

Furthermore, the variability of IF bioavailability can also be due to inter-individual differences in IF metabolism [6]. As a matter of fact only 20-35% of the adult population is able to convert daidzein into equol after ingesting soy or soy derivative products [8]. This conversion is carried out by the intestinal bacteria [9,10]. These inter-individual differences could at least partly explain the differences in the biological effects observed following soy consumption. In this case, the combination of the greater estrogenicity of equol [8] and the longer elimination half life from systemic circulation could result in greater physiological effects in equol producers as suggested by Karr *et al.* [11]. Very little data exists on the impact of the ability to produce equol on the bioavailability of daidzein and its excretion in urine. Karr *et al.* and Lampe *et al.* both studied the impact of equol production on the urinary elimination of daidzein [11,12]. Both failed to find any significant difference in the daily urine IF excretion between equol excreters and non-excreters. However, this appears to be inconsistent due to the biotransformation of daidzein into equol. To investigate this issue further, soy-based capsules with high daidzein vs genistein ratio, were used. Moreover this

study was performed during a 48 hour period, *i.e.* a longer period than that previously published [11,12].

The present paper gives new data on the bioavailability and the urinary excretion of IF in humans for ingested doses that reflect the IF concentrations of current soy-based supplements. The study was originally performed using an ELISA assay. The objective of this study was to determine the impact of (1) the formulation of soy-based supplements, and (2) the inter-individual gut microflora metabolism of daidzein into equol, on plasma pharmacokinetics of IF and their urinary excretion.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. *Phytosoya*<sup>®</sup> capsules

Capsules containing soy extracts were provided by Arkopharma, Pharmaceutical Laboratories (Carros, France) and adjusted with soy extract or soy flour to 17.85 mg and 17.20 mg of IF glycosides respectively for capsules A and B. Capsule A formulation was 53.0% soy extract, containing 10.0% total IF and 46.1% microcrystallin cellulose as the excipient. Capsule B was 38.8% soy extract containing 10% total IF and 59.7% soy flour containing 2.5% total IF. According to a comparison test, there was no difference in appearance between capsules A and B. Before the clinical trial, each formulation was assessed for daidzein and genistein, measured in aglycone equivalents using the ELISA methods developed in our laboratory [13,14]. Total IF ingestion per study period was 46.12 mg equivalent aglycone for form A and 40.27 mg equivalent aglycone for form B, *i.e.* five capsules.

### 2.2. *Study subjects and design*

Twelve healthy male volunteers, aged 21 to 35 years with a body mass index between 20 to 25 kg.m<sup>-2</sup>, gave informed consent to enter the study. Prior to the study, all subjects underwent a full clinical examination. None of the subjects had an allergy or intolerance to soy. The subjects had to abstain from consuming any drugs, especially antibiotics, for at least 30 days prior to the beginning of the study and thereafter during the study. Soy foods and their derivatives were prohibited for 10 days prior to and during the study. The study was performed at the Clinical Investigation Center (Haut-Levêque Hospital, Pessac, France) and was approved by the local Medical Ethics Committee (Comité Consultatif pour la Protection des Personnes se prêtant à des Recherches Biomédicales, CCPPRB, Bordeaux, France).

The design was a randomized, double-blind, two-way crossover study. Volunteers were hospitalized at 12:00 a.m. for a 24 h period and randomly received a single dose of either *Phytosoya*<sup>®</sup> formulation. After intake of the soy-based capsules, volunteers had lunch at 12:00 a.m., dinner at 7:00 p.m. and breakfast at 7:00 a.m. the following morning. After a two week wash-out period, the study was repeated in the same conditions to complete the crossover design.

### 2.3. *Sample collection and analytical methods*

Ten ml blood samples were drawn into Vacutainer<sup>®</sup> glass tubes (Becton Dickinson, Le Pont-De-Claix, France) containing heparin and lithium as anticoagulants, through an indwelling cannula, before (0) and at 2, 4, 6, 8, 12, 18, 24, and 48 h after capsule intake. Plasma samples were prepared by centrifugation at 5,000 g, 5 min, 4°C and stored frozen at -20°C until further analysis. Urinary samples were collected before (0) and at 6, 12, 18, 24 h after capsule

ingestion. Volunteers were instructed to collect all their urine in plastic bottles containing ascorbic acid ( $1\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ ) during the second day of the experiment. A 10 ml aliquot of each urinary sample was removed and stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  until analysis. Daidzein, equol and genistein concentrations in blood and urinary samples were measured by the ELISA method as previously described [13,14], based on homologous competition tests, specific to each IF. Briefly, total compounds were assayed since samples were first hydrolysed with  $\beta$  glucuronidase-aryl sulfatase (Roche, Mannheim, Germany) and extracted using ethyl acetate before assay. Standard solutions were prepared from synthetic phytoestrogens [15]. The techniques used polyclonal antibodies raised in rabbits. Each plate contained a standard curve run in parallel with unknown samples. The secondary antibody was swine anti-rabbit immunoglobulin linked to peroxidase. *o*-phenylenediamine was used as substrate for peroxidase. Hydrolysis and extractions were checked on external standards. The inter- and intra-assay variations and the limit of detection of the techniques are reported in previous works [13]. The technique was validated against HPLC method [7].

#### 2.4. Determination of the serum and urinary IF pharmacokinetics

Non-compartmental pharmacokinetic (PK) analysis was used to analyze plasma drug concentration-time data. The parameters  $C_{\text{max}}$  (maximum observed concentration) and  $T_{\text{max}}$  (time to reach peak concentration) were obtained directly from experimental observations without interpolation. The terminal slope ( $K_e$ ) of the concentration-time curve was determined by log-linear regression of at least the last three points. Elimination half-life ( $T_{1/2}$ ) of the terminal log-linear phase was calculated following the equation  $0,693/K_e$ . Area under the plasma concentration-time curve extrapolated to infinity ( $AUC_{0\rightarrow\infty}$ ) was determined by summing the areas from time 0 to the time of last quantifiable concentration by trapezoidal and log-trapezoidal methods ( $AUC_{0\rightarrow t}$ ) and the extrapolated area. The extrapolated area was determined by dividing the last detectable concentration by the slope of terminal log-linear phase. The volume of distribution ( $V_d/F$ ) was determined by dividing the administered dose by the area under the plasma concentration-time curve extrapolated to infinity, and the terminal slope ( $K_e$ ) of the concentration-time curve:  $D / AUC_{0\rightarrow\infty} \times K_e$ . The total body drug clearance ( $Cl/F$ ) was determined by dividing the administered dose by the area under the plasma concentration-time curve extrapolated to infinity:  $D / AUC_{0\rightarrow\infty}$ .

#### 2.5. Statistical analysis

All pharmacokinetic parameters, particularly  $C_{\text{max}}$  and  $AUC_{0\rightarrow\infty}$  required in determining bioequivalence, and statistical evaluation of the crossover study design, were performed by

the pharmacokinetic software PK-FIT version 1.2 (RDPP, Montpellier, France). Formulations A and B were considered bioequivalent if mean ratio (B/A) of  $C_{max}$ ,  $AUC_{0 \rightarrow \infty}$ , and their 90% confidence interval (CI) were within 70-143% for  $C_{max}$  and within 80-125% for  $AUC_{0 \rightarrow \infty}$  (recommendations of the European Medicine Evaluation Agency (EMA) CPM/EPW/QWP/1401/98). Pharmacokinetic parameters were evaluated using the two one sided tests procedure for logarithmic transformed data.

The comparison of plasma pharmacokinetic parameters and urinary excretion between equal producer and non producer volunteers was analyzed using Student t-test. Differences were considered significant at  $p < 0.05$ .



### 3. Results and discussion

#### 3.1. Pharmacokinetic parameters of IF

Fig. 1.A. represents the mean plasma concentration-time profiles of daidzein and genistein respectively from 0 to 48 h after intake of the two formulations. The kinetics of daidzein and genistein appear very similar for both formulations. At baseline, patients had no detectable concentrations of genistein and daidzein. The absorption of IF is biphasic and takes place from  $t=0$  to  $t=8$ h, indicating an entero-hepatic recirculation as already suggested by several authors [6,16,17]. The elimination of IF is linear, which allowed us to determine the elimination  $T_{1/2}$  of daidzein  $9.7 \pm 2.6$  and  $8.4 \pm 2.4$  h and the elimination  $T_{1/2}$  of genistein  $20.0 \pm 6.7$  and  $14.9 \pm 3.8$  h for formulations A and B respectively. Absorption and bioavailability parameters were in agreement with those classically described in literature [6] validating the assay technique if still necessary. Nevertheless elimination  $T_{1/2}$  were found to be longer than  $T_{1/2}$  previously described, especially for genistein. Only Richelle *et al.* reported a similar elimination half-life of  $17.8 \pm 2.7$  h for ingested glycoside genistein. Ideally the goal for pharmaceutical products and bioactive agents is to remain bioavailable for target tissues and cells for a long time in order to exert their health effects. Therefore, previous authors have microencapsulated IF in order to limit their absorption and increase their mean residence time [18]. With long elimination  $T_{1/2}$ , both genistein and daidzein are potentially able to accumulate in plasma, achieving a steady state level. Shorter  $T_{1/2}$  do not allow such a kinetic pattern, except in the case of repeated ingestion throughout the day. Such a practice is common to Asian people consuming soy foods as a natural component of the traditional diet [18]. In western countries soy is not consumed as much but soy capsules can be ingested at this rhythm. Therefore such kinetic because they lead to a steady-state level [7] can lead to a reduction of daily IF capsule intake to achieve the same plasma level.

#### 3.2. Assessment of bioequivalence

Table 1 reports the main pharmacokinetic parameters of IF. According to the statistical analysis and the EMEA criteria, the two formulations of soy-based supplements are bioequivalent. In previous studies, the bioavailability of IF was investigated using either pure compounds, whether glycosylated or not [19-24], or single soy foods [17,25-27]. To our knowledge, there is little data on the bioavailability of the different forms of soy capsules according to the extraction and preparation procedures of IF [20]. In the aim of capsules processing improvement, the present study brings some new relevant data.

#### 3.3. Urinary excretion of IF

For formulations A and B respectively, 51.4 % and 33.2 % of the total ingested genistein was excreted in urine 48 h after soy-based capsule intake (Fig. 2A). From 0 to 24 h, the genistein excretion profile was a bell-curve with a maximal excretion peak at 12 h. The daidzein excretion profile is similar. For both formulations, 65 % of ingested daidzein was eliminated during the study period (Fig. 2B). The mean Vd/F of daidzein was 61.8 and 53.8 l and the mean Cl/F was 4.85 and 4.54 l.h<sup>-1</sup> for A and B formulations respectively (Table 1). The lower urinary elimination recovery of genistein compared with daidzein on a 48 h study period is in accordance with literature [26] and with the longer elimination T<sub>1/2</sub> of genistein compared with daidzein.

#### 3.4. Plasma kinetics and urinary excretion of equol

Four out of 12 volunteers were found to be equol producers. As shown in Fig. 1B, the pharmacokinetic profiles are very similar for both formulations. The mean C<sub>max</sub> of equol were 133.6 ± 54.0 and 141.4 ± 23.10 ng.ml<sup>-1</sup> at 16.0 and 16.5 h for A and B formulations respectively. Pharmacokinetic analysis of the plasma concentration-time curves determined that the mean AUC<sub>0→∞</sub> of equol was 3660 ± 872 and 3566 ± 904 ng.ml<sup>-1</sup> respectively for formulation A and B. Volunteers with urine equol excretion greater than 2 μmol per day were defined as equol producers according to Lampe *et al.* [12]. The mean equol excretion of the 4 equol producers is represented in Fig. 2C. Equol appeared mainly at t = 12 h in urine. The maximal urinary equol excretion was observed at t = 18h, although excretion continued from 18 to 48 h after capsule intake. Although equol concentration in plasma is lower than that of daidzein, some evidences indicate that it could be advantageous to convert daidzein into equol. First, 49.7% of equol circulates freely in plasma due to its greater solubility [28] compared to the 18.7% of free circulating daidzein [28]. Moreover, free equol is able to bind the two sub-types of estrogen receptor (ER) and shows a stronger affinity for ERβ than that of its precursor [29]. Only the unbound fraction is considered to be available for estrogen receptor activation. Consequently, it could be advantageous to convert daidzein into equol to enhance its estrogenic potency *in vivo* [30], especially in the case of estrogen deficiency occurring during menopause.

#### 3.5. Comparison of pharmacokinetic parameters and urinary excretion of daidzein in equol producers and non producers

As bioequivalence between formulations A and B was demonstrated and no statistical period effect was found, data from the two crossover periods were pooled to address another question: Does equol production influence the bioavailability and excretion of daidzein ? Interestingly, no statistical differences were found for the plasma PK parameters

between equol and non equol producers. This lack of significance could be due to (1) the low number of equol producer volunteers, (2) the large inter-individual variability for plasma PK parameter data, (3) the low daidzein/equol conversion rate in the volunteers and (4) the low ingested dose of daidzein. Previous studies have also failed to find a significant difference in daily IF excretion between equol producers and non producers [11,12,31] even though, in all studies performed over a 24h period, daidzein excretion tended to be lower for equol producers. On the contrary, we were able to show that equol producers excreted significantly lower amounts of daidzein than equol non producers after extending the analytical period to 48 hours following IF ingestion (Fig. 3). Indeed, in our study the average daidzein concentration was still  $117.26 \pm 11.20 \text{ ng.ml}^{-1}$  at 24 h and therefore the elimination process was not finished by that time. When urinary excretion of daidzein is considered on its own, a significant difference is recorded between equol excretors and non excretors. However, when daidzein and its metabolite equol are considered the difference previously mentioned disappears. Several authors have concluded that the urine excretion parameter of IF is largely inter-variable [6,7,26]. Kelly *et al.* demonstrated that the inter-individual variations may reflect differences in gut microflora populations [32]. The present work adds some new evidence on the fundamental role of gut bacteria on the urinary excretion of IF and illustrates the importance of defining equol producers for further clinical studies aiming at studying soy IF.

#### **4. Conclusions**

This randomized double-blind, two-way crossover study has shown the bioequivalence between two formulations of a soy-based capsule, one containing a pure soy standardized extract of IF, and the other soy flour in addition to the standardized extract of IF. The matrix differences between the two formulations did not alter either the absorption or the elimination of IF. Elevated elimination  $T_{1/2}$  sustained a long elimination process for both daidzein and genistein and therefore a potential accumulation of daidzein and genistein during chronic ingestion, with the appearance of the steady state level in such ingestion conditions. Moreover the data obtained in this study has shown a significant difference in daidzein excretion between equol producers and non equol producers, while no difference in plasma pharmacokinetic parameters of IF was revealed between these population subtypes. This may be taken into account when IF effects are interpreted on the basis of urine excretion.

**Acknowledgments:**

The authors wish to thank the volunteers who have entered the study, Danièle Lamazière, the dietician who checked food composition for the study period, Marcelle Pontgahet and Claude Mais, the nurses and Géraldine Seymour-Koyé, a member of the clinical research unit for their help. Special thanks to Russell Wallace for his kind help with English language.

**References:**

- [1] V. Beral, *Lancet* 362 (2003) 419-27.
- [2] A. Fournier, F. Berrino, E. Riboli, V. Avenel, F. Clavel-Chapelon, *Int J Cancer* 114 (2004) 448-454.
- [3] J.E. Rossouw, G.L. Anderson, R.L. Prentice, A.Z. LaCroix, C. Kooperberg, M.L. Stefanick, R.D. Jackson, S.A. Beresford, B.V. Howard, K.C. Johnson, J.M. Kotchen, J. Ockene, *Jama* 288 (2002) 321-33.
- [4] A. Cassidy, J.E. Brown, A. Hawdon, M.S. Faughnan, L.J. King, J. Millward, L. Zimmer-Nechemias, B. Wolfe, K.D. Setchell, *J Nutr* 136 (2006) 45-51.
- [5] M. Gerber, C.-L. Leger, A.-M. Mariotte, D. Rieu, J. Tulliez, C. Bennetau-Pelissero, M.C. Canivenc-Lavier, V. Coxam, T. Maudelonde, M. Pugeat, S. Tennailleau, M. Touillaud, N. Bemrah Aouachria, J.-L. Berta, I. Berta Vanrullen, M. Oseredczuk, A. Tard, C. Caulin, N. Dumarcet (2005), pp. 440 AFSSA (Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments) et AFSSAPS (Agence Française de Sécurité des Produits de Santé), France.
- [6] I. Rowland, M. Faughnan, L. Hoey, K. Wahala, G. Williamson, A. Cassidy, *Br J Nutr* 89 Suppl 1 (2003) S45-58.
- [7] J. Mathey, V. Lamothe, V. Coxam, M. Potier, P. Sauvant, C.B. Pelissero, *J Pharm Biomed Anal* 41 (2006) 957-65.
- [8] K.D. Setchell, C. Clerici, E.D. Lephart, S.J. Cole, C. Heenan, D. Castellani, B.E. Wolfe, L. Nechemias-Zimmer, N.M. Brown, T.D. Lund, R.J. Handa, J.E. Heubi, *Am J Clin Nutr* 81 (2005) 1072-9.
- [9] K.D. Setchell, S.P. Borriello, P. Hulme, D.N. Kirk, M. Axelson, *Am J Clin Nutr* 40 (1984) 569-78.
- [10] C. Atkinson, C.L. Frankenfeld, J.W. Lampe, *Exp Biol Med (Maywood)* 230 (2005) 155-70.
- [11] S.C. Karr, J.W. Lampe, A.M. Hutchins, J.L. Slavin, *Am J Clin Nutr* 66 (1997) 46-51.
- [12] J.W. Lampe, S.C. Karr, A.M. Hutchins, J.L. Slavin, *Proc Soc Exp Biol Med* 217 (1998) 335-9.
- [13] C. Bennetau-Pelissero, B. Arnal-Schnebelen, V. Lamothe, P. Sauvant, J.L. Sagne, M.A. Verbruggen, J. Mathey, O. Laviaille, *Food Chemistry* 82 (2003) 645-658.
- [14] C. Bennetau-Pelissero, C. Le Houerou, V. Lamothe, F. Le Menn, P. Babin, B. Bennetau, *J Agric Food Chem* 48 (2000) 305-11.

- [15] C. Pelissero, B. Bennetau, P. Babin, F. Le Menn, J. Dunoguès, J. Steroid. Biochem. Molec. Biol. 38 (1991) 293-299.
- [16] M. Richelle, S. Pridmore-Merten, S. Bodenstab, M. Enslen, E.A. Offord, J Nutr 132 (2002) 2587-92.
- [17] S. Watanabe, M. Yamaguchi, T. Sobue, T. Takahashi, T. Miura, Y. Arai, W. Mazur, K. Wahala, H. Adlercreutz, J Nutr 128 (1998) 1710-5.
- [18] K.D. Setchell, A. Brzezinski, N.M. Brown, P.B. Desai, M. Melhem, T. Meredith, L. Zimmer-Nechimias, B. Wolfe, Y. Cohen, Y. Blatt, J Agric Food Chem 53 (2005) 1938-44.
- [19] K.D. Setchell, N.M. Brown, P. Desai, L. Zimmer-Nechemias, B.E. Wolfe, W.T. Brashear, A.S. Kirschner, A. Cassidy, J.E. Heubi, J Nutr 131 (2001) 1362S-75S.
- [20] L.T. Bloedon, A.R. Jeffcoat, W. Lopaczynski, M.J. Schell, T.M. Black, K.J. Dix, B.F. Thomas, C. Albright, M.G. Busby, J.A. Crowell, S.H. Zeisel, Am J Clin Nutr 76 (2002) 1126-37.
- [21] M.G. Busby, A.R. Jeffcoat, L.T. Bloedon, M.A. Koch, T. Black, K.J. Dix, W.D. Heizer, B.F. Thomas, J.M. Hill, J.A. Crowell, S.H. Zeisel, Am J Clin Nutr 75 (2002) 126-36.
- [22] L. Zubik, M. Meydani, Am J Clin Nutr 77 (2003) 1459-65.
- [23] T. Izumi, M.K. Piskula, S. Osawa, A. Obata, K. Tobe, M. Saito, S. Kataoka, Y. Kubota, M. Kikuchi, J Nutr 130 (2000) 1695-9.
- [24] K.D. Setchell, M.S. Faughnan, T. Avades, L. Zimmer-Nechemias, N.M. Brown, B.E. Wolfe, W.T. Brashear, P. Desai, M.F. Oldfield, N.P. Botting, A. Cassidy, Am J Clin Nutr 77 (2003) 411-9.
- [25] K.D. Setchell, N.M. Brown, P.B. Desai, L. Zimmer-Nechimias, B. Wolfe, A.S. Jakate, V. Creutzinger, J.E. Heubi, J Nutr 133 (2003) 1027-35.
- [26] R.A. King, D.B. Bursill, Am J Clin Nutr 67 (1998) 867-72.
- [27] Y. Zhang, G.J. Wang, T.T. Song, P.A. Murphy, S. Hendrich, J Nutr 129 (1999) 957-62.
- [28] S.C. Nagel, F.S. vom Saal, W.V. Welshons, Proc Soc Exp Biol Med 217 (1998) 300-9.
- [29] R.S. Muthyala, Y.H. Ju, S. Sheng, L.D. Williams, D.R. Doerge, B.S. Katzenellenbogen, W.G. Helferich, J.A. Katzenellenbogen, Bioorg Med Chem 12 (2004) 1559-67.

- [30] K.D. Setchell, N.M. Brown, E. Lydeking-Olsen, *J Nutr* 132 (2002) 3577-84.
- [31] J.L. Slavin, S.C. Karr, A.M. Hutchins, J.W. Lampe, *Am J Clin Nutr* 68 (1998) 1492S-1495S.
- [32] G.E. Kelly, C. Nelson, M.A. Waring, G.E. Joannou, A.Y. Reeder, *Clin Chim Acta* 223 (1993) 9-22.



**Table Legends:**

Table 1. Pharmacokinetic parameters for daidzein and genistein and relative bioavailability of the two formulations.

	<b>Daidzein</b>			<b>Genistein</b>		
	Mean		Ratio	Mean		Ratio
	(95 % CI)		(90% CI)	(95% CI)		(90% CI)
	Formulation A	Formulation B	B/A	Formulation A	Formulation B	B/A
AUC <sub>0→∞</sub> (ng.ml <sup>-1</sup> .h)	7978	8425	1.06	6150	5863	0.95
	(6220-9736)	(6573-10276)	(0.93-1.18)	(4483-7817)	(4293-7432)	(0.80-1.10)
C <sub>max</sub> (ng.ml <sup>-1</sup> )	508.1	567.7	1.12	254.6	261.9	1.03
	(414.6-601.7)	(379.6-756.0)	(0.84-1.39)	(182.3-327.0)	(197.3-326.4)	(0.75-1.30)
T <sub>max</sub> (h)	8.67	8.17	0.94	7.67	7.67	1.00
	(7.20-10.13)	(5.90-10.43)	(0.63-1.25)	(5.97-9.37)	(6.48-8.86)	(0.84-1.16)
T <sub>1/2</sub> (h)	9.71	8.43	0.87	20.0	14.9	0.74
	(7.17-12.3)	(6.0-10.9)	(0.55-1.18)	(13.3-26.7)	(11.0-18.7)	(0.43-1.01)
Vd (l)	61.6	53.8	0.87	38.7	30.8	0.80
	(49.5-73.8)	(37.5-70.0)	(0.79-1.08)	(29.2-48.2)	(24.0-37.5)	(0.75-1.16)
Clearance (l.h <sup>-1</sup> )	4.85	4.54	1.09	1.59	1.57	0.98
	(3.87-5.83)	(3.73-5.34)	(0.54-1.14)	(1.09-2.10)	(1.21-1.92)	(0.81-1.16)

Table 2. Pharmacokinetic parameters for daidzein according to the ability of volunteers to produce equol and the relative influence of the biotransformation of daidzein into equol on the bioavailability of daidzein.

	<b>Daidzein</b>		
	Equol producers	Non equol producers	<i>p</i> -value of the equol production effect
	Mean (S.E.M.)	Mean (S.E.M.)	
AUC <sub>0→∞</sub> (ng.ml <sup>-1</sup> .h)	8191 (6892-9490)	8207 (7188-9226)	0.99
C <sub>max</sub> (ng.ml <sup>-1</sup> )	585.1 (470.3-699.8)	514.4 (449.9-578.9)	0.57
T <sub>max</sub> (h)	9.50 (8.54-10.5)	7.88 (7.53-8.23)	0.11
T <sub>1/2</sub> (h)	9.19 (7.28-11.1)	9.01 (8.29-9.73)	0.92
Vd (l)	56.5 (47.3-65.6)	58.3 (52.9-63.7)	0.86
Clearance (l.h <sup>-1</sup> )	4.72 (3.94-5.50)	4.68 (4.28-5.08)	0.96

**Figure Legends:**

Fig. 1A.: Time-course of plasma daidzein (square) and genistein (triangle) concentrations (mean  $\pm$  SEM) in twelve volunteers following formulation A (*solid form*) and B (*open form*) capsule intake. Fig. 1B.: Time-course of plasma equol concentrations (mean  $\pm$  SEM) in the 4 equol producer volunteers following formulation A (*solid circle*) and B (*open circle*) capsule intake.

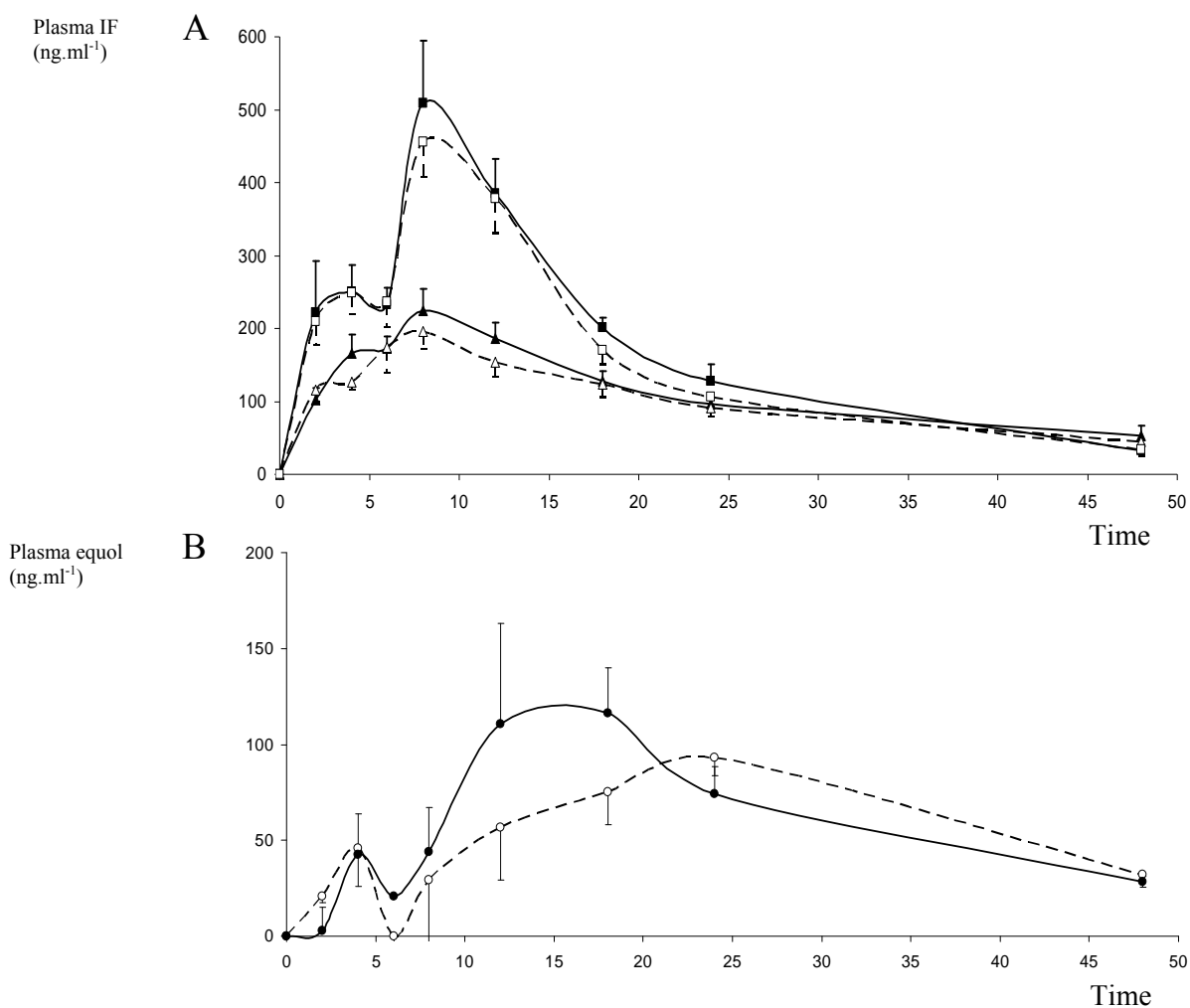


Fig. 2: Urinary genistein (A), daidzein (B) and equol (C) excretion profiles following the ingestion of formulation A capsules (*black bars*) and formulation B capsules (*open bars*). Results are expressed as mean  $\pm$  SEM. Values indicated at the top of the bars represent the eliminated fraction as a percentage of intake.

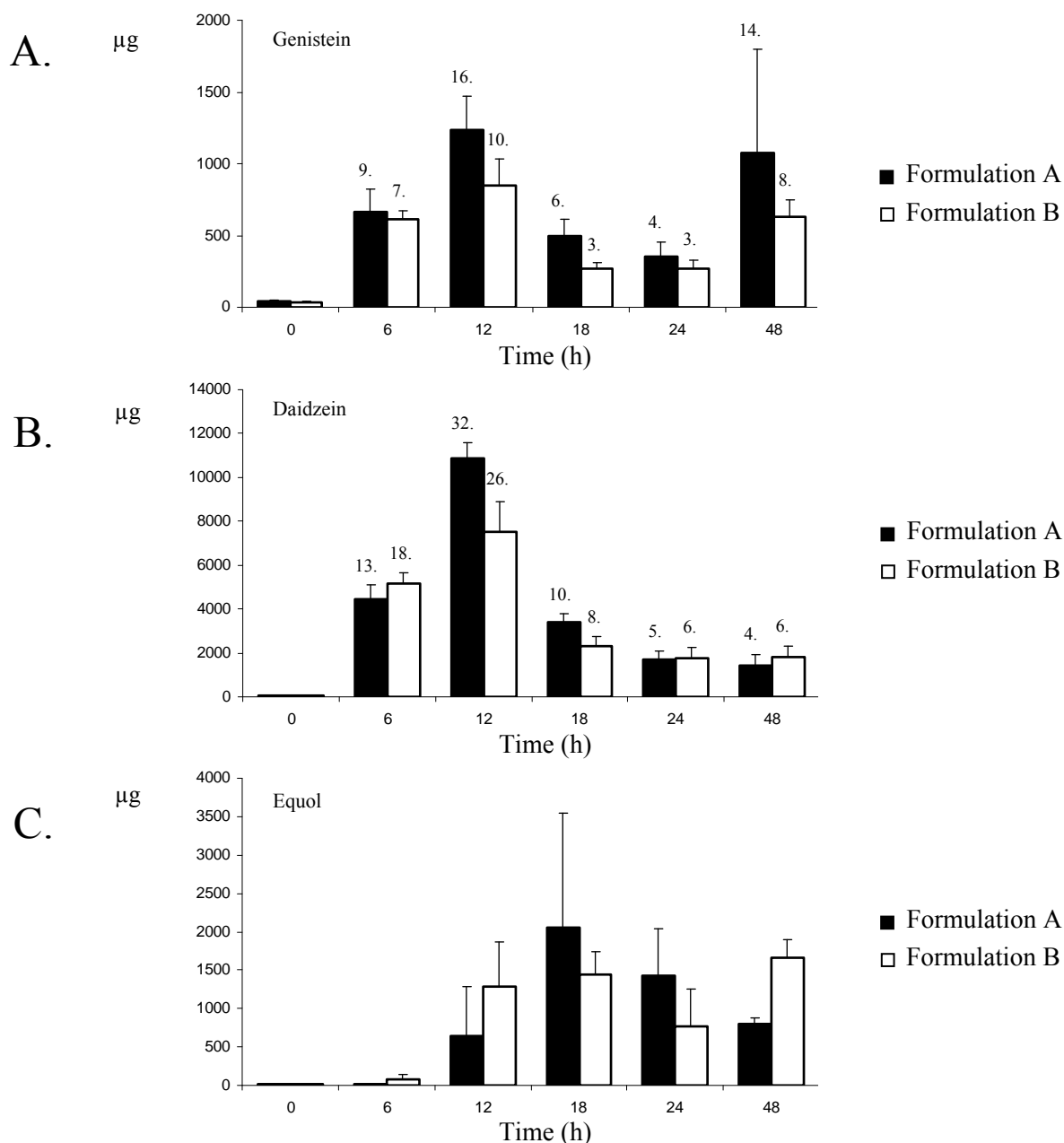
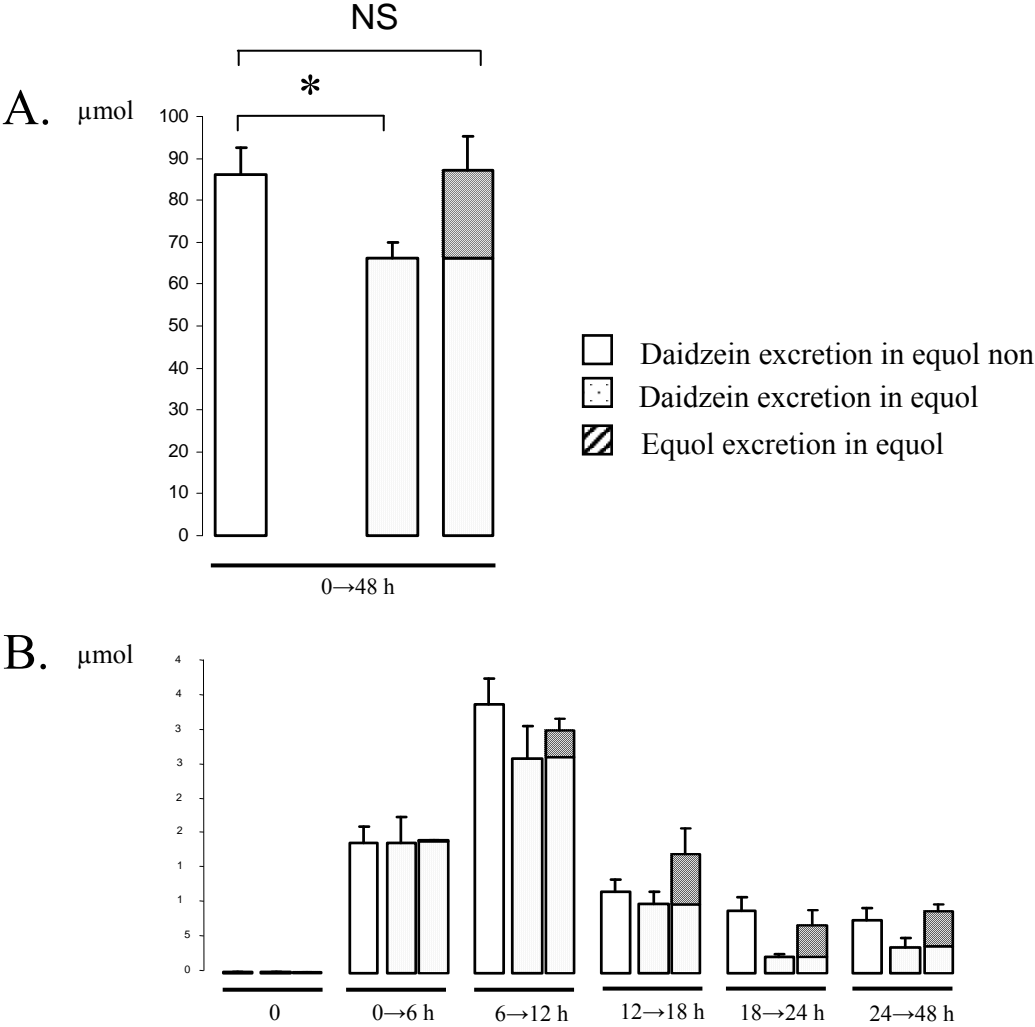
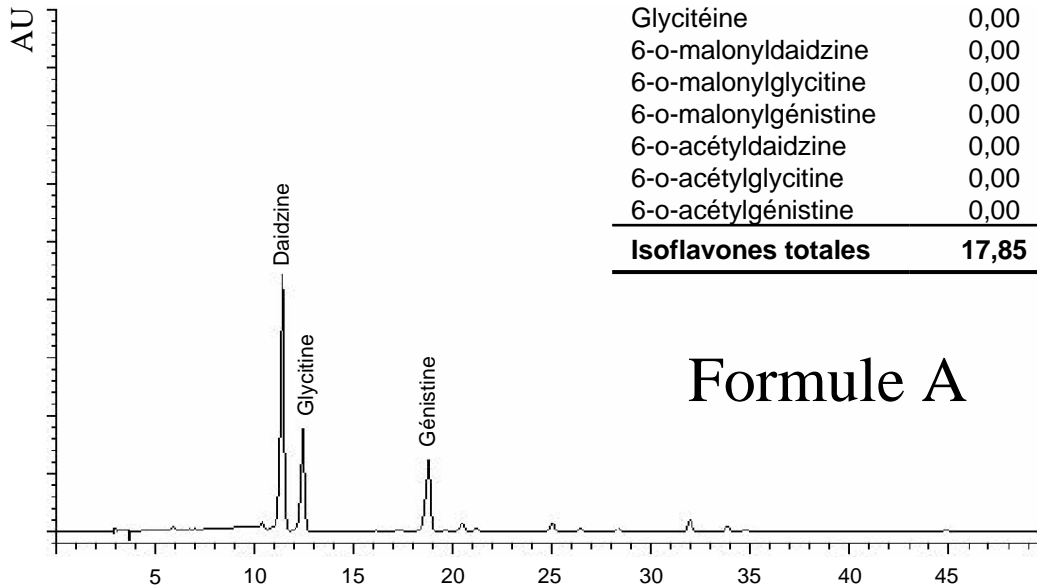


Fig. 3: Total (A) and detailed (B) urinary excretion of (1) daidzein in equol non producers, (2) daidzein in equol producers and (3) daidzein + equol in equol producers. Results are expressed as mean  $\pm$  SEM. \* indicates significant difference using Student t-test with  $p < 0.05$ , NS indicates a non significant difference.

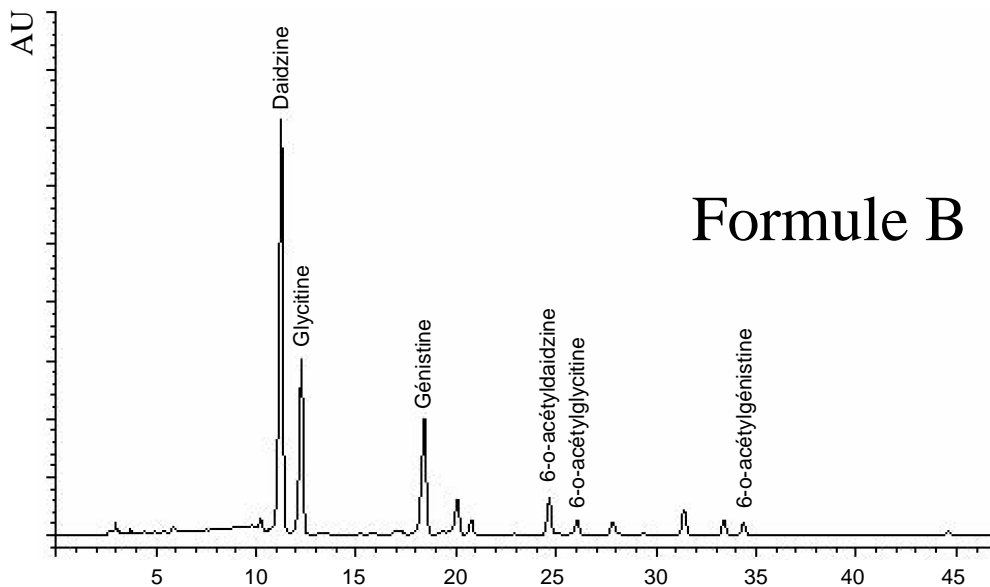


**Isoflavones en mg par gélules de Phytosoya®**

	<i>Formule A</i>	<i>Formule B</i>
Daidzine	11,00	8,30
Glycitrine	4,47	5,00
Génistine	2,38	2,30
Daidzéine	0,00	0,00
Génistéine	0,00	0,00
Glycitéine	0,00	0,00
6-o-malonyldaidzine	0,00	0,00
6-o-malonylglycitrine	0,00	0,00
6-o-malonylgénistine	0,00	0,00
6-o-acétyldaidzine	0,00	1,08
6-o-acétylglycitrine	0,00	0,26
6-o-acétylgénistine	0,00	0,26
<b>Isoflavones totales</b>	<b>17,85</b>	<b>17,20</b>



**Formule A**



**Formule B**

**Figure 65. Profils HPLC des isoflavones contenues dans deux formulations de Phytosoya®**

#### **1.4. Résultats complémentaires**

La *figure 65* présente les profils HPLC des isoflavones des deux formulations de Phytosoya<sup>®</sup>. Ces profils n'ont pas été présentés dans l'article. Ils montrent simplement une légère différence quant aux formes chimiques des isoflavones dans les deux formulations : l'une d'elles contient des isoflavones sous forme acétylglucoside et glucoside, l'autre ne contient que des isoflavones sous forme glucoside.

Le *tableau 15* présente les valeurs de Vd et de Cl obtenues au cours de la réalisation de cette étude. Ces valeurs sont également en accord avec celles de la littérature et montrent que le Vd et la Cl de la daïdzéine sont supérieurs à ceux de la génistéine.

***Tableau 15. Valeurs de volume de distribution et de clairance au cours de l'étude de bioéquivalence***

	Génistéine			Daidzéine		
	Formulation A	Formulation B	p-value de l'effet	Formulation A	Formulation B	p-value de l'effet
Vd (L)	38,7 (29,2-48,2)	30,7 (24,0-37,5)	0,11	61,6 (49,5-73,8)	53,8 (37,5-70,0)	0,27
Cl (L.h <sup>-1</sup> )	1,59 (1,08-2,10)	1,57 (1,21-1,92)	0,88	4,84 (3,87-5,83)	4,54 (3,73-5,34)	0,64



## **2. L'effet de la matrice alimentaire sur la biodisponibilité des isoflavones de soja : un complément alimentaire vs un fromage à base de soja**

VERGNE S., CHANTRE P., ASSELINEAU J., DURAND M., LAMOTHE V., POTIER M., BENNETAU-PELISSERO C., MOORE N. AND SAUVANT P. "Isoflavones contained in soy based capsules are more bioavailable compared with soy based cheese after single ingestion in Humans" *en revision au British Journal of Nutrition.*

VERGNE S., CHANTRE P., LAMOTHE V., ASSELINEAU J., DURAND M., POTIER M., BENNETAU-PELISSERO C., MOORE N. AND SAUVANT P. "Isoflavones contained in soy based capsules are more bioavailable compared with soy based cheese after single ingestion in Humans" 4<sup>th</sup> International Soy and Health Conference, Düsseldorf, Germany, 2006 (poster).

VERGNE S., CHANTRE P., LAMOTHE V., ASSELINEAU J., DURAND M., POTIER M., BENNETAU-PELISSERO C., MOORE N. AND SAUVANT P. "Influence of food matrix on bioavailability of isoflavones after a single ingestion in Humans" 10<sup>th</sup> European Nutrition conference, Paris, France, 2007 (poster).

## 2.1. Contexte de l'étude

La biodisponibilité des isoflavones a fait l'objet de plusieurs articles. Des groupes de recherche ont déterminé leurs paramètres pharmacocinétiques à partir des molécules ingérées sous formes pures (Setchell *et al.*, 2001 ; Zubik et Meydani, 2003).

Dans la mesure où, à ce jour, les isoflavones de soja ne sont pas considérées par les autorités compétentes comme des substances médicamenteuses, elles ne sont pas disponibles dans le commerce sous formes pures. Il apparaît donc nécessaire de connaître et de comparer la biodisponibilité des isoflavones de soja dans les matrices alimentaires des produits vendus.

Jusqu'alors, en Occident, les isoflavones de soja sont distribuées par deux catégories de produits : les aliments à base de soja et les compléments alimentaires à base de soja, voire de trèfle rouge. Les aliments à base de soja seront consommés de façon discontinue dans le temps par des femmes qui n'ont pas forcément la volonté de consommer un aliment à valeur santé, même si souvent les consommatrices d'aliments à base de soja sont des femmes qui prennent soin de leur alimentation. En revanche, les compléments alimentaires de soja seront consommés de façon régulière, quotidienne ou biquotidienne, par des femmes qui désirent réellement prévenir la survenue de pathologie, soigner des symptômes liés à leur ménopause, ou même simplement un effet de bien-être.

Cette étude présente donc la biodisponibilité comparée des isoflavones suite à une ingestion unique d'un aliment et un complément alimentaire à base de soja : un fromage Le Sojami<sup>®</sup> et les gélules de Phytosoya<sup>®</sup> ont été utilisés, respectivement.

## 2.2. Résumé et intérêt de l'étude

La première partie de cette étude rapporte les quantités d'isoflavones contenues dans 15 aliments solides, 5 aliments liquides et 49 compléments alimentaires à base de soja commercialisés principalement sur le marché français. Il existe actuellement des bases de données des isoflavones contenues dans les matières premières que sont les fruits et légumes (Liggins *et al.*, 2000; Murphy *et al.*, 1999), ou dans des aliments plus complexes ou plats préparés (Ritchie *et al.*, 2006 ; Thompson *et al.*, 2006). Il convient toutefois de mettre à jour régulièrement ces bases de données. L'intérêt particulier des bases de données réside majoritairement (1) dans l'estimation des apports en isoflavones à partir de questionnaires alimentaires mais également (2) dans l'information à l'égard des professionnels de santé sur les aliments qui contiennent des isoflavones s'ils veulent conseiller ou interdire leur consommation.

La question principale de l'étude est développée dans la seconde partie. Quel est l'effet de la matrice alimentaire : fromage vs gélules à base de soja, sur la biodisponibilité des isoflavones ? Douze volontaires sains masculins ont été inclus dans un essai clinique en cross-over, randomisé en double aveugle. Chaque volontaire a ingéré 35 mg d'isoflavones totales, équivalent aglycone, dans l'une ou l'autre des matrices, espacée par une période de wash-out de 2 semaines.

Les deux matrices ne contenaient pas le même rapport en génistéine et daïdzéine. C'est pourquoi la comparaison des paramètres pharmacocinétiques tels que l' $AUC_{0 \rightarrow \infty}$  et  $C_{max}$  n'a été possible qu'après pondération par la dose ingérée de daïdzéine ou de génistéine. Le choix d'utiliser les mêmes quantités d'isoflavones totales ingérées, équivalent aglycones, par les volontaires réside dans le fait que les voies d'absorption, de métabolisme, de transport et d'élimination sont similaires pour la daïdzéine et la génistéine. Ce choix est discuté dans l'article associé à cette étude.

La détermination des paramètres pharmacocinétiques montre une meilleure biodisponibilité des isoflavones contenues dans les gélules de complément alimentaire que dans les fromages. Dans les gélules, les isoflavones de soja sont préalablement extraites, ce qui modifie probablement leurs interactions avec les autres composés de la gélule, facilitant ainsi leur absorption. Une autre piste de discussion peut être que la matrice alimentaire des fromages est beaucoup plus complexe. Les isoflavones pourraient, en effet, être liées par des liaisons de type hydrogène ou de Van der Waals à des lipides ou à des protéines du fromage, limitant ainsi leur absorption en terme de vitesse, voire d'intensité.

Les dosages des isoflavones au niveau urinaire montrent une excrétion plus importante suite à l'ingestion des compléments alimentaires, conséquente à une meilleure biodisponibilité plasmatique.

### ***2.3. Higher bioavailability of isoflavones after a single ingestion of a soy-based supplement than a soy-based food in young healthy males***

**Higher bioavailability of isoflavones after a single ingestion of a soy-based supplement than a soy-based food in young healthy males**

Sébastien Vergne<sup>a,b</sup>, Catherine Bennetau-Pelissero<sup>a</sup>, Valérie Lamothe<sup>a</sup>, Philippe Chantre<sup>b</sup>, Mylène Potier<sup>a</sup>, Julien Asselineau<sup>c</sup>, Paul Perez<sup>c</sup>, Marlène Durand<sup>d</sup>, Nicholas Moore<sup>e</sup>, Patrick Sauvant<sup>a\*</sup>.

\* Corresponding author: Dr. Patrick Sauvant, ENITA de Bordeaux, 1, cours du Général de Gaulle, CS 40201, 33175 Gradignan Cedex, France. E-mail: [p-sauvant@enitab.fr](mailto:p-sauvant@enitab.fr). Tel: + 33 (0)5 57 35 07 54. Fax: + 33 (0)5 57 35 07 59

<sup>a</sup>ENITA de Bordeaux, Unité Micronutriments, Reproduction, Santé, Bordeaux, France.

<sup>b</sup>Arkopharma, Laboratoires Pharmaceutiques, Carros, France. <sup>c</sup>CHU de Bordeaux, Unité de Soutien Méthodologique à la Recherche clinique et épidémiologique, Bordeaux, France.

<sup>d</sup>Centre d'Investigation Clinique (CIC), INSERM - CHU de Bordeaux, France. <sup>e</sup>Université Victor Segalen, Département de Pharmacologie, INSERM U657 Bordeaux, France.

This study was supported by Research Ministry of France, RARE Program N°03P221 and by the Région Aquitaine.

Sébastien Vergne is the recipient of a fellowship (CIFRE N°856/2003) from Arkopharma, Pharmaceutical Laboratories and National Association of Technical Research, Research Ministry of France.

**Abstract**

Soy products are freely available on the market, either as soy-based supplements or as soy-based foods. Soy isoflavones, genistein and daidzein, are the focus of numerous studies, to investigate their potential effects on health, but this remains controversial to date. However, the bioavailability of these compounds is clearly a crucial factor influencing their biological effectiveness.

First, this study aimed at assessing the isoflavone content on 69 European soy derivative products, sold on the French market. Furthermore, this study also focused on the bioavailability of isoflavones comparing supplement to food. Twelve healthy volunteers were recruited in a randomized two-way crossover trial. They received 35 mg of isoflavones, equivalent aglycone, contained in two soy-based products differing in their matrices: a soy-based supplement and a soy-based cheese. A specific ELISA method was used to assess the plasma and urinary concentrations of isoflavones, allowing the pharmacokinetic parameters to be determined, which were then normalized to one mg of each isoflavone ingested.

Results showed that the normalized  $C_{max}$  of daidzein from soy-based capsules was higher than that from soy-based cheese ( $p=0.002$ ). Similarly, the normalized  $AUC_{0 \rightarrow \infty}$  and  $C_{max}$  of genistein were higher for capsules than those measured for cheese ( $p=0.002$ ).

This work is in line with existing studies on isoflavone bioavailability. In conclusion, it brings to light new data concerning isoflavone concentrations in soy derivative products and shows that isoflavones contained in capsules are more bioavailable than those contained in cheese.

**Key Words** Soy: Isoflavones: Bioavailability

## 1. Introduction

The role of dietary flavonoids in the prevention of several chronic diseases is the subject of intense research interest and soy isoflavones have been the focus of particular attention (Cassidy *et al.*, 2006a; Usui, 2006). To exert their action on health, micronutrients, such as soy isoflavones, have to be bioavailable. There have been major advances in the past few years regarding the absorption and the metabolism of soy isoflavones (Rowland *et al.*, 2003), and it is apparent that soy isoflavones are sufficiently absorbed to exert biological effects (Cassidy *et al.*, 1994), reaching micromolar concentrations in blood (Rowland *et al.*, 2003).

Isoflavones are mainly present as glucoside conjugates in most commercially available soy containing products, except products resulting from soy fermentation, such as tempeh, tofu, or several soy-based cheeses (Choi & Rhee, 2006). After ingestion, isoflavones are not absorbed in this form; their absorption requires hydrolysis of the sugar moiety of these compounds by gastric acid (Xu *et al.*, 1995; Piskula *et al.*, 1999) and intestinal and bacterial  $\beta$ -glucosidases (Day *et al.*, 1998; Setchell *et al.*, 2002). A proportion of isoflavones are then absorbed, and reconjugated mainly into glucuronic acid and, to a lesser extent into sulphuric acid, increasing their solubility and consequently their ability to circulate in plasma. Another proportion of the isoflavones are metabolized by intestinal bacteria into other metabolites, such as equol (Axelson *et al.*, 1984) or *o*-desmethylangolensin (Adlercreutz *et al.*, 1986).

Isoflavones are abundant in soy, and soy derivative products such as dietary supplements. The range of different dietary soy-based supplements available through chemists, health-food shops and supermarkets, has been growing many fold over the last decade in Western countries (Nurmi *et al.*, 2002). In previous studies, the bioavailability of isoflavones was investigated using either glycosylated pure compounds or aglycone pure compounds (Setchell *et al.*, 2001; Bloedon *et al.*, 2002; Busby *et al.*, 2002), or single soy-based foods (Richelle *et al.*, 2002; Vergne *et al.*, 2006). Interestingly, four recent articles aimed at studying factors affecting the bioavailability of isoflavones and especially compared different soy food matrices (Anupongsanugool *et al.*, 2005; Cassidy *et al.*, 2006b; de Pascual-Teresa *et al.*, 2006; Kano *et al.*, 2006). Finally it still remains essential to understand whether serum and urine levels are similar following consumption of a known dose of isoflavones, which are present in different food matrices (de Pascual-Teresa *et al.*, 2006).

In the present study, isoflavones content of 69 soy derivative products, available on the French and European commercial market, were analyzed using an ELISA method. Isoflavones were measured after the hydrolysis of the sugar moiety, *i.e.* in their aglycone forms. The data on the concentrations of daidzein and genistein in foodstuffs reported in this

article can be used in future studies to assess the dietary intake of these compounds and their impact on health in epidemiological studies. Moreover, the current study examined the effect of the food matrix on the apparent bioavailability of isoflavones from a soy-based cheese compared with soy-based supplements. A group of 12 healthy Caucasian males were recruited to perform a double-blind crossover trial, in which each volunteer randomly consumed the two soy derivative products, containing 35 mg of soy isoflavones, equivalent aglycone.

## 2. Subjects and Methods

### *Soy-based foods*

The commercial soy derivative products were obtained from chemists, supermarkets or special organic food shops depending on the distribution circuits. For each trademark, a sample was used for the analysis and the measurements were performed in triplicate.

To examine the food matrix effect on the bioavailability of isoflavones, two soy-containing foods were used. A soy-based supplement was in capsule form, provided by Arkopharma, Pharmaceutical Laboratories (Carros, France) and a soy-based cheese was provided by Le Sojami (Agen, France). Before the clinical trial, each formulation was assessed for daidzein and genistein content measured with an ELISA method and expressed in aglycone equivalents. The amount of each soy-based food consumed by the subjects was adjusted to ensure that the total intake of isoflavones, equivalent aglycone, was similar throughout the study. Soy-based supplements and cheese ingested during the study meal, provided a solid matrix.

The chemical composition of the isoflavones, contained in the two particular food products tested for isoflavone bioavailability comparison, was assessed using the extraction and HPLC methods described by Murphy *et al.* (Murphy *et al.*, 1997). Furthermore, nutritional composition of these two products are given in Table 1.

### *Study subjects*

Twelve healthy male Caucasian volunteers, aged 20 to 29 years with a body mass index between 20 to 25 kg.m<sup>-2</sup>, gave informed consent to enter the study. Prior to the study, all subjects underwent a full clinical examination. None of the subjects had allergy nor intolerance to soy. The subjects had to abstain from consuming any drugs, especially antibiotics, for at least 30 days prior to the beginning of the study and during the study. Soy foods and their derivatives were prohibited for 10 days prior to and during the study. The main foods containing polyphenols, such as red fruits, red wine, chocolates, tea or coffee, were prohibited for 3 days prior to the beginning of the study and during the study. The study was performed at the Clinical Investigation Center (Haut-Levêque Hospital, Pessac, France) and was approved by the local Medical Ethics Committee (Comité Consultatif pour la Protection des Personnes se prêtant à des Recherches Biomédicales, CCPPRB, Bordeaux A, France). During the kinetic analysis, meals were controlled by a dietician and were strictly the



same for every subject. No adverse effect in relation to the ingestion of the soy-based products was reported.

### ***Design of the study***

The design was a randomized, two-way crossover study, including 12 young male volunteers, which were fed a soy derivative product containing 35 mg of isoflavones, as either supplements or cheese. On the basis of the 35 mg of total aglycone isoflavones, each subjects consumed 4 pills of Phytosoya<sup>®</sup> (Arkopharma, Carros, France), *i.e.* 28.24 mg of daidzein and 6.76 mg of genistein, and 56 g of cheese Le Tartimi<sup>®</sup> (Le Sojami, Agen, France), *i.e.* 15.78 mg of daidzein and 19.22 mg of genistein. Volunteers were hospitalized at 12:00 a.m. for a 24 h period and randomly received a single dose of either Phytosoya<sup>®</sup> or soy-based cheese. After intake of the soy-based capsules or cheese, volunteers had lunch at 12:00 a.m., dinner at 7:00 p.m. and breakfast at 7:00 a.m. the following morning. After a two week wash-out period, the study was repeated in the same conditions to complete the crossover design. Ten mL of blood samples were drawn into Vacutainer<sup>®</sup> glass tubes (Becton Dickinson, Le Pont-De-Claix, France) containing heparin and lithium as anticoagulants, through an indwelling cannula, before (0) and 2, 4, 6, 8, 12, 18, 24, and 48 h after the intake of soy-based products. Plasma samples were prepared by centrifugation at 5,000 g, 5 min, 4°C and stored frozen at -20°C until further analysis. Urinary samples were collected before (0) and 6, 12, 18, 24 h after the ingestion of soy derivative products. During the second day of experiment, volunteers were instructed to collect all their urine in plastic bottles containing ascorbic acid (1 g.L<sup>-1</sup>). The volume of each micturition was measured and a 10 mL aliquot of each sample was removed and stored at -20°C until analysis.

### ***Serum and urinary isoflavone analysis***

Daidzein, equol and genistein concentrations in blood samples were measured by the ELISA method previously described (Bennetau-Pelissero *et al.*, 2000; Bennetau-Pelissero *et al.*, 2003). Briefly, samples were first digested during 48 hours with  $\beta$  glucuronidase aryl sulfatase from *Helix pomatia* (Roche Diagnostics, Meylan, France) in acetate buffer, pH=5. Aglycone isoflavones were then extracted three times with acidified ethyl acetate buffer (Fluka, Buchs, Switzerland). Finally, assays were performed following the classical indirect competitive ELISA using primary rabbit antibodies for daidzein, equol, and genistein developed in the laboratory (Bennetau-Pelissero *et al.*, 2000; Le Houerou *et al.*, 2000). The secondary antibody was polyclonal swine anti-rabbit immunoglobulin G, complexed with a peroxidase enzyme (Dako, Trappes, France) used with o-phenylenediamine as a substrate for revelation. OD was read at 490 nm (MRX II, Dynex Technologies, France) and the

concentration of isoflavones was determined from standard curves of each isoflavone. Hydrolysis and extractions were checked against external standards. The detection limits of this specific analytical method are  $10 \text{ ng.mL}^{-1}$  for daidzein,  $3.9 \text{ ng.mL}^{-1}$  for genistein,  $2.5 \text{ ng.mL}^{-1}$  for equol. The inter- and intra-assay variations and were reported in previous works (Bennetau-Pelissero *et al.*, 2003). The technique was validated against HPLC method coupled to a UV detector for the supplements and foods, and coupled to a cool array detector for biological fluid samples (Mathey *et al.*, 2006). This technique was previously used for isoflavone pharmacokinetic measurements in humans (Vergne *et al.*, 2006).

#### ***Determination of the serum and urinary isoflavone pharmacokinetics***

All pharmacokinetic parameters were performed by the pharmacokinetic software PK-FIT version 1.2 (RDPP, Montpellier, France). A non-compartmental pharmacokinetic analysis was used to analyze plasma isoflavones concentration-time data. The  $C_{\text{max}}$  (maximum observed concentration) and  $T_{\text{max}}$  (time to reach peak concentration) parameters were obtained directly from experimental observations without interpolation. The terminal slope ( $K_e$ ) of the concentration-time curve was determined by log-linear regression. Elimination half-life ( $T_{1/2}$ ) of the terminal log-linear phase was calculated following the equation  $0,693/K_e$ . The area under the plasma concentration-time curve was extrapolated to infinity ( $AUC_{0 \rightarrow \infty}$ ). It was determined by summing the areas from time 0 to the time of the last quantifiable concentration ( $t$ ) (obtained by trapezoidal and log-trapezoidal methods:  $AUC_{0 \rightarrow t}$ ) and the extrapolated area from  $t$  to infinity ( $AUC_{t \rightarrow \infty}$ ). The extrapolated area was determined by dividing the last detectable concentration by the slope of the terminal log-linear phase. To ensure that statistical comparisons were valid,  $C_{\text{max}}$  and  $AUC_{0 \rightarrow \infty}$  values for daidzein and genistein were dose-adjusted to take into account the differences in the proportion of isoflavones within each soy food product.

#### ***Statistical analysis***

All data are expressed as mean  $\pm$  SD. Comparison of the pharmacokinetic parameters of each isoflavone was based on a crossover analysis using intra-subject comparisons of the two food matrices. It consisted of a two-step strategy as proposed by Grizzle (Grizzle, 1965). First, interaction between the food matrix and the intake period was studied. If significant at a nominal significance level 0.10, the comparison between the two food matrices only used the data from first intake period. Otherwise, comparison between the two food matrices was performed using the two intake periods. All comparisons used the Wilcoxon sign rank test.

Except for the interaction analysis, all tests were considered statistically significant at a  $p$  value less than 0.05.

Statistical differences between the mean urinary excretion of isoflavones, according to the soy food matrix ingested, were carried out using the Student t-test. Differences were considered significant at  $p < 0.05$ .

### 3. Results

#### *Isoflavone contents in commercial soy foods*

Tables 2, 3.A. and 3.B. present respectively the isoflavone content assessed by ELISA in 49 soy-based supplements and in 20 soy-based foods available on the French and European market. From this table, it can be observed that content can vary greatly according to the brand. Indeed, consumers can ingest from 0.07 mg up to 92.8 mg of aglycone isoflavones per day according to the soy-based supplement. Of the 69 soy food products reported in this article, 46 exhibit a major content of genistein in comparison of daidzein. Despite the lower concentrations of isoflavones in soy foods compared with soy-based capsules, isoflavone level intakes are similar due to the size of the food portions ingested.

#### *Isoflavone contents in foods used for clinical study*

Figures 1.A and 1.B represent the HPLC chromatograms corresponding to the soy-based products ingested during the clinical study. Isoflavones are mainly present as glycoside forms in the capsules: 97.4% of daidzein and 98.1% of genistein ingested were in glycoside form. For cheese, a larger proportion of aglycone isoflavones were measured. 57.8% of daidzein and 43.7% of genistein ingested were in glycoside form.

#### *Serum kinetics of isoflavones*

The mean plasma concentration time-profiles of daidzein and genistein from 0 to 48 h after a single oral dose of both soy-based foodstuffs are represented in Figure 2. At baseline, patients had no detectable concentrations of genistein and daidzein. The kinetics of both isoflavones present a similar pattern. Absorption is biphasic and occurs between 0 and 8 h. A first peak of daidzein concentration was reached at 2 h for both soy-based foodstuffs and the second one at 8 h following isoflavone intake, leading to a mean  $T_{max}$  of  $6.9 \pm 3.4$  and  $6.1 \pm 5.0$  h for capsules and cheese respectively. In the case of genistein,  $T_{max}$  values were  $6.7 \pm 4.0$  and  $4.6 \pm 2.4$  for capsules and cheese respectively. Pharmacokinetic analysis of the plasma concentration-time curves showed that the elimination  $T_{1/2}$  of genistein was  $15.3 \pm 7.4$  and  $11.9 \pm 4.4$  h for capsules and cheese respectively. In the present study, no equol producers were found within the recruited population of volunteers.

#### *Comparison of isoflavone bioavailability between soy-based cheese and soy-based capsules*

The mean pharmacokinetic parameters of isoflavones and the  $p$ -values of the food matrix effect are shown in Table 4. Despite the equal amount of total isoflavone intake, the bioavailability varied according to the food matrix. The adjusted  $C_{max}$  of daidzein from soy-based cheese is significantly lower than that from soy-based capsules ( $p=0.002$ ). Similarly,

the adjusted C<sub>max</sub> of genistein was significantly lower for cheese than that measured for capsules ( $p=0.002$ ). The adjusted AUC<sub>0→∞</sub> of genistein was  $171.3 \pm 47.2$  and  $331.7 \pm 155.5$  ng.mL<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup> per mg ingested for cheese and capsules respectively, and were significantly different ( $p=0.002$ ).

Moreover the adjusted AUC<sub>0→∞</sub> for both the isoflavones in cheese was  $1.32 \mu\text{mol.l}^{-1}.\text{h}^{-1}$  per mg of isoflavones ingested ( $0.63 \pm 0.17$  and  $0.69 \pm 0.29 \mu\text{mol.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$  per mg, for genistein and daidzein respectively). On the other hand, the globally adjusted AUC<sub>0→∞</sub> for capsules is  $1.92 \mu\text{mol.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$  per mg ingested ( $1.23 \pm 0.58$  and  $0.69 \pm 0.22 \mu\text{mol.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$  per mg for genistein and daidzein respectively), leading to an adjusted AUC<sub>0→∞</sub> ratio of 1.45 between the two soy-based products.

### ***Urinary excretion of isoflavones***

From 0 to 24 h, the daidzein excretion profile was a bell-curve shaped with a maximal excretion peak between 6 and 12 h (Figure 3.A). For capsules and cheese respectively,  $82.6 \pm 6.1$  % and  $65.4 \pm 7.2$  % of ingested daidzein was eliminated during the study period. The genistein excretion profile is similar to that observed for daidzein (Figure 3.B). For the capsules and cheese respectively,  $46.3 \pm 7.4$  and  $26.9 \pm 4.6$  % of the total ingested genistein was excreted in urine. Whatever the isoflavone ingested, the total urinary excretion was higher for the intake of capsules than that for the intake of cheese. Particular differences appeared in the urinary excretion of daidzein during the 6-12 h and 12-18 h periods and in the urinary excretion of genistein during the 6-12 h period.

#### 4. Discussion

To assess fully the dietary impact of phytoestrogens on the health of the population it is necessary to know their concentrations in the foods consumed and their circulating concentrations following intake.

Isoflavones are mainly present as glucoside conjugates in most commercially available soy containing products (Hubert *et al.*, 2005). However, isoflavones are hydrolyzed as a free form before their intestinal absorption. Even if a conjugation with glucuronide or sulphate takes place during the metabolism of isoflavones, the isoflavone molecule still remain the active party due to its ability to bind to the estrogen receptors (Muthyala *et al.*, 2004) after entering the target cells. Provider claims often take into account the whole weight of the isoflavone molecules, including sugar moiety, which explain the discrepancies observed between the provider claims and the data measured in our laboratory (Bennetau-Pelissero *et al.*, 2003). The weight of the glucose unit is approximately 40% of the total glucoside weight and in the case of malonyl- and acetyl-forms the weight of the inactive sugar moiety increases up to 50%. In addition, the relative proportions of each glycoside form are known to be influenced by the extraction steps taken before analysis (Verbruggen & van Roojen, 2001). Consequently, as already suggested by Nurmi *et al.* and the French Food Safety Agency (AFSSA), the recommended way to express isoflavone content in soy food products is to use the aglycone weight (Nurmi *et al.*, 2002; Gerber *et al.*, 2005).

Our study presents isoflavone content data in a selection of foodstuffs, which could be included in an existing phytoestrogen database (Ritchie *et al.*, 2006). Nevertheless, these food products represent only a small proportion of the “Western” soy-based products freely available on the market. In France, the isoflavone intake for a traditional meal was estimated to be of the order of 22.1 µg, from the database published by AFSSA (Gerber *et al.*, 2005). However, more isoflavones could be ingested by consuming several soy-based products, such as those presented in this study. Regularly consumed, these products can induce non negligible isoflavone concentrations in plasma and may lead to physiological effects.

Although, there has been interest in the potential risks and benefits of consuming diets enriched in soy isoflavones, to date relatively limited research has been conducted to determine the bioavailability of isoflavones and to define the impact of factors such as food matrices on concentrations reached in blood and urine (Faughnan *et al.*, 2004). The soy-based products selected for our clinical trial represented two forms of isoflavone intake since one is a food supplement, *i.e.* taken daily, and several times throughout the day, and the other is a cheese, eaten occasionally during a meal. In all cases, to exert their biological effects,

isoflavones have to be bioavailable. The aim of our clinical study was to investigate the effect of food matrix on the concentrations of isoflavones reached in serum and urine in a group of healthy male volunteers given an oral dose of two different food products containing 35 mg of isoflavones, equivalent aglycone.

In the present study, absorption and bioavailability parameters were in agreement with those classically described in literature. Unfortunately, out of the 12 volunteers, none produced equol. Analytical methods, design and duration of the study can not be responsible for this finding. A trial was recently performed in the same conditions and 4 of 12 volunteers were equol producers (Vergne *et al.*, 2007). Only probability may explain why no equol producers was included in this trial. Indeed equol is only produced by only 30 to 50 % of the population. Moreover, a previous clinical study did not find any equol producers among 12 volunteers (de Pascual-Teresa *et al.*, 2006). Moreover elimination  $T_{1/2}$  was found to be longer than  $T_{1/2}$  previously described in the literature (Rowland *et al.*, 2003). With the present results, we confirmed longer elimination  $T_{1/2}$  which had already been demonstrated in our previous study, in which the same soy-based capsules of Phytosoya<sup>®</sup> were ingested by healthy volunteers (Vergne *et al.*, 2006). Moreover Richelle *et al.* reported a similar elimination half-life of  $17.8 \pm 2.7$  h for ingested glycoside genistein (Richelle *et al.*, 2002). With long elimination  $T_{1/2}$ , both genistein and daidzein are potentially able to accumulate in plasma, achieving a steady state level. Shorter  $T_{1/2}$  do not allow this kind of kinetic pattern, except in the case of daily repeated ingestion. Such a practice is common to Asian people consuming soy foods as a natural component of the traditional diet (Kano *et al.*, 2006).

In any study dealing with bioavailability, the accuracy of pharmacokinetic parameters is dependent on obtaining sufficient plasma samples during the elimination phase. The 48 h point samples showed values near zero  $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ , giving significance to this work. When pharmacokinetic parameter adjustment is performed with the real amounts ingested, the genistein concentrations are consistently higher in plasma than daidzein concentrations. The daidzein parameters of volume of distribution and a clearance rate, were classically admitted to be higher and faster than those of genistein (Setchell *et al.*, 2001) and can explain this observation. Furthermore, whatever the food matrix ingested, the higher urinary excretion of daidzein compared with that of genistein can be observed, in accordance with literature (Watanabe *et al.*, 1998; Vergne *et al.*, 2006). Moreover the total urinary excretion of added isoflavones was higher for capsule intake than that of cheese intake, which is in accordance with the higher intestinal absorption of isoflavones contained in capsules.

The same amounts of total isoflavones, in aglycone equivalent, contained in two solid forms, were given to subjects. Isoflavones from soy-based capsules were found to be more bioavailable than those from soy-based cheese. This result could be due to the high complexity of the cheese matrix, with a high content of lipids and proteins, which may limit intestinal absorption. Indeed in a such matrix, isoflavones are expected to bind to other molecules by hydrogen or Van Der Waals bonds. Concomitantly, capsules are filled with a soy extract containing 10% isoflavones. The extract results from a complex manufacturing process (Choi & Rhee, 2006), which may weaken or break the links between isoflavones and other molecular structures in the supplement matrices. This may explain why the isoflavones contained in capsules were absorbed faster and in greater amounts than those contained in soy-based cheese. Moreover nutrient solubility in the intestinal fluid influences the rate of absorption. In this regard, glycosilated conjugates are more hydrophilic than aglycones, which may also explain their better absorption. Therefore in solution, faster absorption rates were expected for volunteers given soy capsules compared with soy cheese. These results were in accordance with the behaviour of single purified forms of aglycones which showed that the bioavailability of the glucosides was greater than that of aglycons (Setchell *et al.*, 2001). However Izumi *et al.* showed that aglycone isoflavones are absorbed more quickly and in a greater amounts than glycoside isoflavones when soy extracts are ingested (Izumi *et al.*, 2000). More recently, Cassidy *et al.* concluded that aglycones in a fermented food are absorbed more rapidly than conjugates (Cassidy *et al.*, 2006b). Furthermore, even if the cheese was manufactured from fermented soymilk, the level of glycoside isoflavones was still elevated.

In the present study, isoflavones contained in capsules were more bioavailable of 45.5 % than those contained in cheese, when global  $AUC_{0 \rightarrow \infty}$  of both isoflavones are considered. A comparison with Asian populations could be attempted using as a reference the study from Arai *et al.*, 2000 (Arai *et al.*, 2000). The isoflavone intake of 115 Japanese women was found to be of 47.2 mg per day, with an inter-individual variation reported from 12.0 to 118.9 mg. Whether soy-based cheese is assumed to be equivalent in value to other categories of soy-based Japanese food, 75.52 g of soy-based cheese is necessary to mimic the mean Japanese isoflavone intake. Concerning soy-based supplements, this would be achieved with 33.04 mg of isoflavone, i.e. 3.8 capsules of Phytosoya<sup>®</sup>. Moreover the great variation in isoflavone intake, reported by Arai *et al.*, may be equivalent to a range of 8 to 83 mg ingested by soy-based supplements. However, it must be kept in mind that this extrapolation is based on



various hypotheses which are far from being generally accepted. This parallel is merely theoretical and it has to be taken with caution.

In conclusion, this work shows that isoflavones contained in soy-based capsules are more bioavailable than those contained in soy-based cheese, after a single ingestion in 12 young male volunteers. Nevertheless it exists little evidence to conclude that soy-based supplements are biologically active to date (Faure *et al.*, 2002). Further studies are needed to establish the effectiveness of soy isoflavones on health. However the bioavailability of an active compound must be known before investigating the potential physiological effects. As a consequence, it seems crucial to understand the mechanism by which all these compounds are absorbed and to increase the knowledge on factors influencing their absorption.

### **Acknowledgments**

The authors wish to thank the volunteers who have participated to the study, Danièle Lamazière, the dietician who checked food composition for the study period, Jean-James Garreau for providing the cheese, Patricia Baile and Philippe Abbe for their kind assistance with the HPLC method and Christelle Rosier-Sala for her kind help in reviewing the manuscript. Special thanks to Russell Wallace for his kind help with English language.

---

**References**

- Adlercreutz H, Musey PI, Fotsis T, Bannwart C, Wahala K, Makela T, Brunow G & Hase T (1986) Identification of lignans and phytoestrogens in urine of chimpanzees. *Clin Chim Acta* **158**, 147-154.
- Anupongsanugool E, Teekachunhatean S, Rojanasthien N, Pongsatha S & Sangdee C (2005) Pharmacokinetics of isoflavones, daidzein and genistein, after ingestion of soy beverage compared with soy extract capsules in postmenopausal Thai women. *BMC Clin Pharmacol* **5**, 2.
- Arai Y, Watanabe S, Kimira M, Shimoi K, Mochizuki R & Kinae N (2000) 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**, 2243-2250.
- Axelsson M, Sjovalld J, Gustafsson BE & Setchell KD (1984) Soya--a dietary source of the non-steroidal oestrogen equol in man and animals. *J Endocrinol* **102**, 49-56.
- Bennetau-Pelissero C, Arnal-Schnebelen B, Lamothe V, Sauvant P, Sagne JL, Verbruggen MA, Mathey J & Lavalie O (2003) ELISA as a new method to measure genistein and daidzein in food and human fluids. *Food Chemistry* **82**, 645-658.
- Bennetau-Pelissero C, Le Houerou C, Lamothe V, Le Menn F, Babin P & Bennetau B (2000) Synthesis of haptens and conjugates for ELISAs of phytoestrogens. Development of the immunological tests. *J Agric Food Chem* **48**, 305-311.
- Bloedon LT, Jeffcoat AR, Lopaczynski W, Schell MJ, Black TM, Dix KJ, Thomas BF, Albright C, Busby MG, Crowell JA & Zeisel SH (2002) Safety and pharmacokinetics of purified soy isoflavones: single-dose administration to postmenopausal women. *Am J Clin Nutr* **76**, 1126-1137.
- Busby MG, Jeffcoat AR, Bloedon LT, Koch MA, Black T, Dix KJ, Heizer WD, Thomas BF, Hill JM, Crowell JA & Zeisel SH (2002) Clinical characteristics and pharmacokinetics of purified soy isoflavones: single-dose administration to healthy men. *Am J Clin Nutr* **75**, 126-136.
- Cassidy A, Albertazzi P, Lise Nielsen I, Hall W, Williamson G, Tetens I, Atkins S, Cross H, Manios Y, Wolk A, Steiner C & Branca F (2006a) Critical review of health effects of soyabean phyto-oestrogens in post-menopausal women. *Proc Nutr Soc* **65**, 76-92.
- Cassidy A, Bingham S & Setchell KDR (1994) Biological effects of soy protein rich isoflavones on the menstrual cycle of premenopausal women. *Am. J. Clin. Nutr.* **60**, 333-340.

- Cassidy A, Brown JE, Hawdon A, Faughnan MS, King LJ, Millward J, Zimmer-Nechemias L, Wolfe B & Setchell KD (2006b) Factors affecting the bioavailability of soy isoflavones in humans after ingestion of physiologically relevant levels from different soy foods. *J Nutr* **136**, 45-51.
- Choi MS & Rhee KC (2006) Production and processing of soybeans and nutrition and safety of isoflavone and other soy products for human health. *J Med Food* **9**, 1-10.
- Day AJ, DuPont MS, Ridley S, Rhodes M, Rhodes MJ, Morgan MR & Williamson G (1998) Deglycosylation of flavonoid and isoflavonoid glycosides by human small intestine and liver beta-glucosidase activity. *FEBS Lett* **436**, 71-75.
- de Pascual-Teresa S, Hallund J, Talbot D, Schroot J, Williams CM, Bugel S & Cassidy A (2006) Absorption of isoflavones in humans: effects of food matrix and processing. *J Nutr Biochem* **17**, 257-264.
- Faughnan MS, Hawdon A, Ah-Singh E, Brown J, Millward DJ & Cassidy A (2004) Urinary isoflavone kinetics: the effect of age, gender, food matrix and chemical composition. *Br J Nutr* **91**, 567-574.
- 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**, 329-334.
- Gerber M, Leger C-L, Mariotte A-M, Rieu D, Tulliez J, Bennetau-Pelissero C, Canivenc-Lavier MC, Coxam V, Maudelonde T, Pugeat M, Tennailleau S, Touillaud M, Bemrah Aouachria N, Berta J-L, Berta Vanrullen I, Oseredczuk M, Tard A, Caulin C & Dumarcet N (2005) Sécurité et Bénéfice des phyto-oestrogènes apportés par l'alimentation - Recommandations, pp. 440. France: AFSSA (Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments) et AFSSAPS (Agence Française de Sécurité des Produits de Santé).
- Grizzle JE (1965) The Two-Period Change-over Design and Its Use in Clinical Trials. *Biometrics* **21**, 467-480.
- Hubert J, Berger M & Dayde J (2005) Use of a simplified HPLC-UV analysis for soyasaponin B determination: study of saponin and isoflavone variability in soybean cultivars and soy-based health food products. *J Agric Food Chem* **53**, 3923-3930.
- Izumi T, Piskula MK, Osawa S, Obata A, Tobe K, Saito M, Kataoka S, Kubota Y & Kikuchi M (2000) Soy isoflavone aglycones are absorbed faster and in higher amounts than their glucosides in humans. *J Nutr* **130**, 1695-1699.

- Kano M, Takayanagi T, Harada K, Sawada S & Ishikawa F (2006) Bioavailability of isoflavones after ingestion of soy beverages in healthy adults. *J Nutr* **136**, 2291-2296.
- Le Houerou C, Bennetau-Pelissero C, Lamothe V, Le Menn F, Babin P & Bennetau B (2000) Syntheses of Novel Hapten-Protein Conjugates for Production of Highly Specific Antibodies to Formononetin, Daidzein and Genistein. *Tetrahedron* **56**, 295-301.
- Mathey J, Lamothe V, Coxam V, Potier M, Sauvart P & Pelissero CB (2006) Concentrations of isoflavones in plasma and urine of post-menopausal women chronically ingesting high quantities of soy isoflavones. *J Pharm Biomed Anal* **41**, 957-965.
- Murphy PA, Song T, Buseman G & Barua K (1997) Isoflavones in soy-based infant formulas. *J Agric Food Chem* **45**, 4635-4638.
- Muthyala RS, Ju YH, Sheng S, Williams LD, Doerge DR, Katzenellenbogen BS, Helferich WG & Katzenellenbogen JA (2004) Equol, a natural estrogenic metabolite from soy isoflavones: convenient preparation and resolution of R- and S-equols and their differing binding and biological activity through estrogen receptors alpha and beta. *Bioorg Med Chem* **12**, 1559-1567.
- Nurmi T, Mazur W, Heinonen S, Kokkonen J & Adlercreutz H (2002) Isoflavone content of the soy based supplements. *J Pharm Biomed Anal* **28**, 1-11.
- Piskula MK, Yamakoshi J & Iwai Y (1999) Daidzein and genistein but not their glucosides are absorbed from the rat stomach. *FEBS Lett* **447**, 287-291.
- Richelle M, Pridmore-Merten S, Bodenstab S, Enslin M & Offord EA (2002) Hydrolysis of isoflavone glycosides to aglycones by beta-glycosidase does not alter plasma and urine isoflavone pharmacokinetics in postmenopausal women. *J Nutr* **132**, 2587-2592.
- Ritchie MR, Cummings JH, Morton MS, Michael Steel C, Bolton-Smith C & Riches AC (2006) A newly constructed and validated isoflavone database for the assessment of total genistein and daidzein intake. *Br J Nutr* **95**, 204-213.
- Rowland I, Faughnan M, Hoey L, Wahala K, Williamson G & Cassidy A (2003) Bioavailability of phyto-oestrogens. *Br J Nutr* **89 Suppl 1**, S45-58.
- Setchell KD, Brown NM, Desai P, Zimmer-Nechemias L, Wolfe BE, Brashear WT, Kirschner AS, Cassidy A & Heubi JE (2001) Bioavailability of pure isoflavones in healthy humans and analysis of commercial soy isoflavone supplements. *J Nutr* **131**, 1362S-1375S.
- Setchell KD, Brown NM, Zimmer-Nechemias L, Brashear WT, Wolfe BE, Kirschner AS & Heubi JE (2002) Evidence for lack of absorption of soy isoflavone glycosides in

- 
- humans, supporting the crucial role of intestinal metabolism for bioavailability. *Am J Clin Nutr* **76**, 447-453.
- Usui T (2006) Pharmaceutical prospects of phytoestrogens. *Endocr J* **53**, 7-20.
- Verbruggen MA & van Roojen JJM (2001) Analysis of isoflavones-results of a ring test. *Fourth International Symposium on the role of soy preventing and treating chronic disease*.
- Vergne S, Titier K, Bernard V, Asselineau J, Durand M, Lamothe V, Potier M, Perez P, Demotes-Mainard J, Chantre P, Moore N, Bennetau-Pelissero C & Sauvant P (2007) Bioavailability and urinary excretion of isoflavones in humans: effects of a soy-based supplements formulation and equol production. *J Pharm Biomed Anal* **43**, 1488-1494.
- Watanabe S, Yamaguchi M, Sobue T, Takahashi T, Miura T, Arai Y, Mazur W, Wahala K & Adlercreutz H (1998) Pharmacokinetics of soybean isoflavones in plasma, urine and feces of men after ingestion of 60 g baked soybean powder (kinako). *J Nutr* **128**, 1710-1715.
- Xu X, Harris KS, Wang HJ, Murphy PA & Hendrich S (1995) Bioavailability of soybean isoflavones depends upon gut microflora in women. *J Nutr* **125**, 2307-2315.

Figure 1.A.

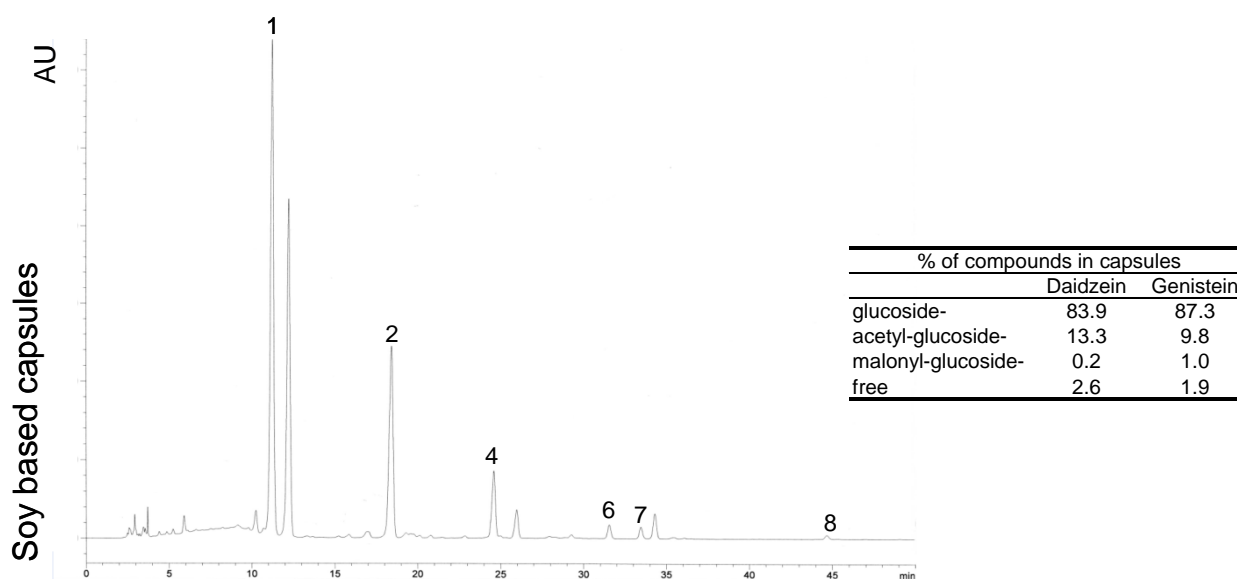


Figure 1.B.

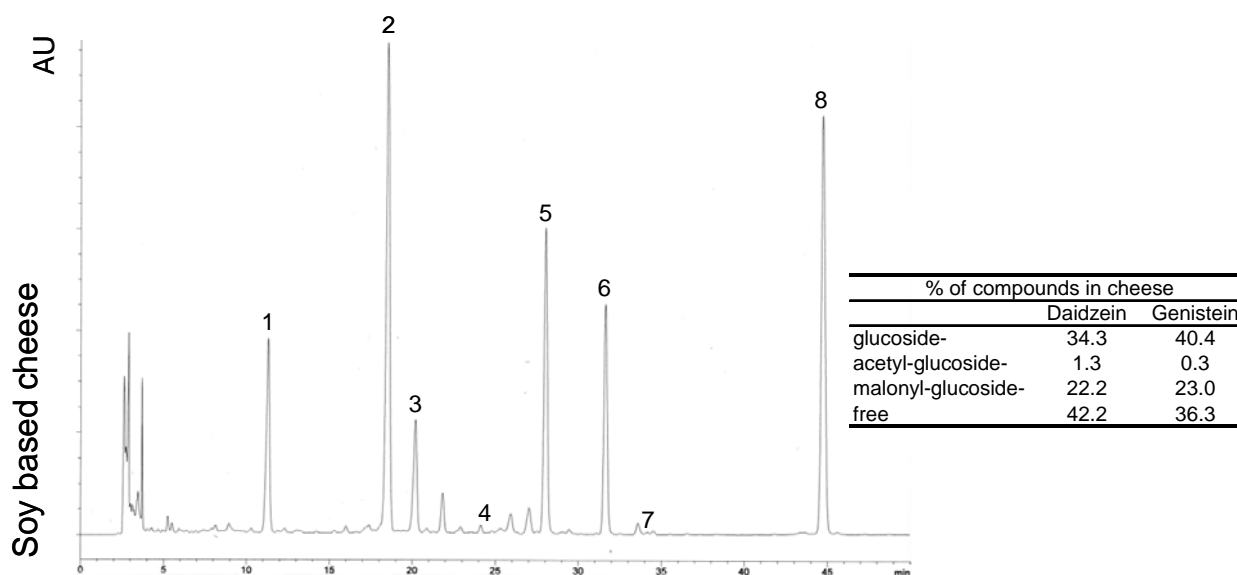


Figure 1: HPLC chromatographic profiles of soy-based capsules (1.A.) and soy-based cheese (1.B.) ingested by the twelve volunteers. Peak identification: 1. daidzin; 2: genistin; 3: malonyl-daidzin; 4: acetyl-daidzin; 5: malonyl-genistin; 6: daidzein; 7: acetyl-genistin; 8: genistin. Tables represent the percentage of each isoflavone and their associated glycosides found in the food matrix.

Figure 2.A.

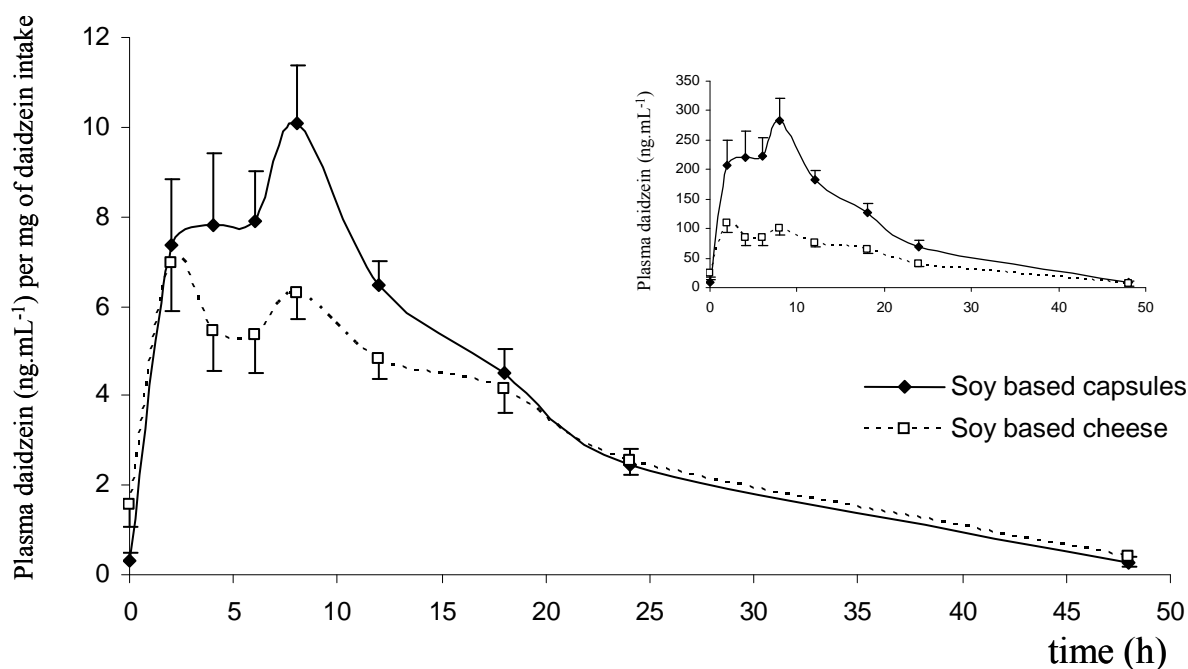


Figure 2.B.

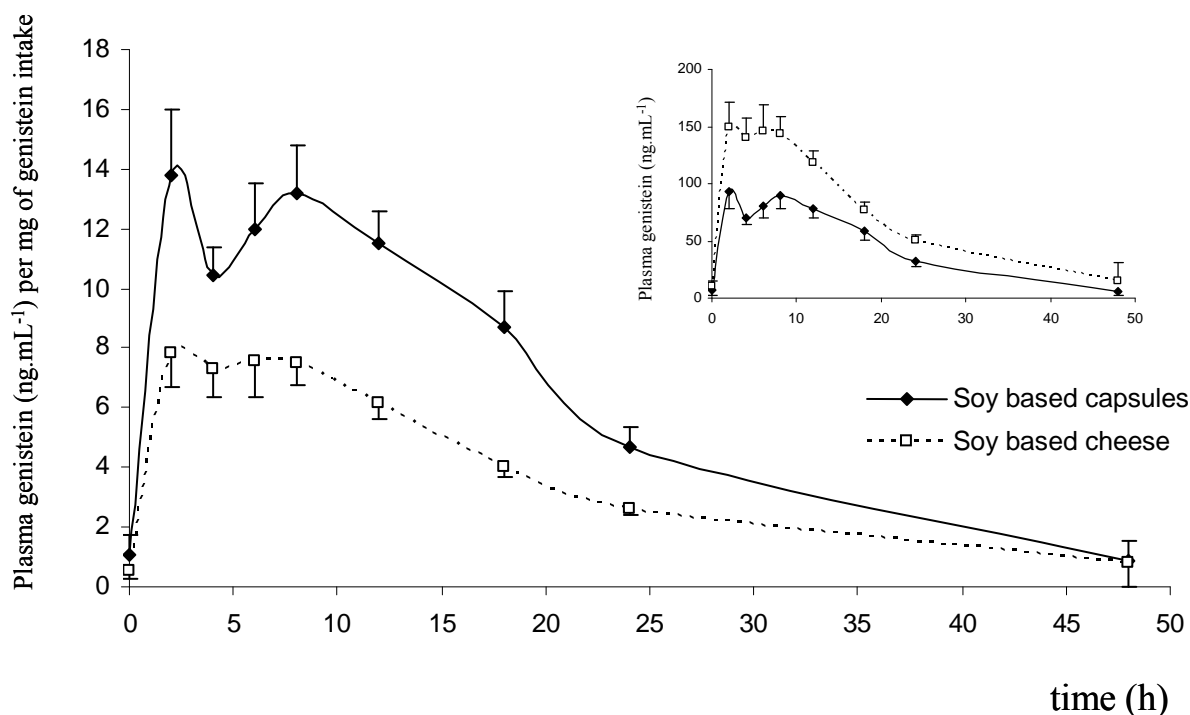


Figure 2: Time-course of plasma daidzein (2.A) and genistein (2.B) concentrations, adjusted to the intake of each isoflavone, in twelve volunteers (mean  $\pm$  SEM) following soy-based cheese (open square) or soy-based capsules (solid diamond) intake. Graphics at the top represented time-course of plasma isoflavones without the dose intake adjustment.



Figure 3.A.

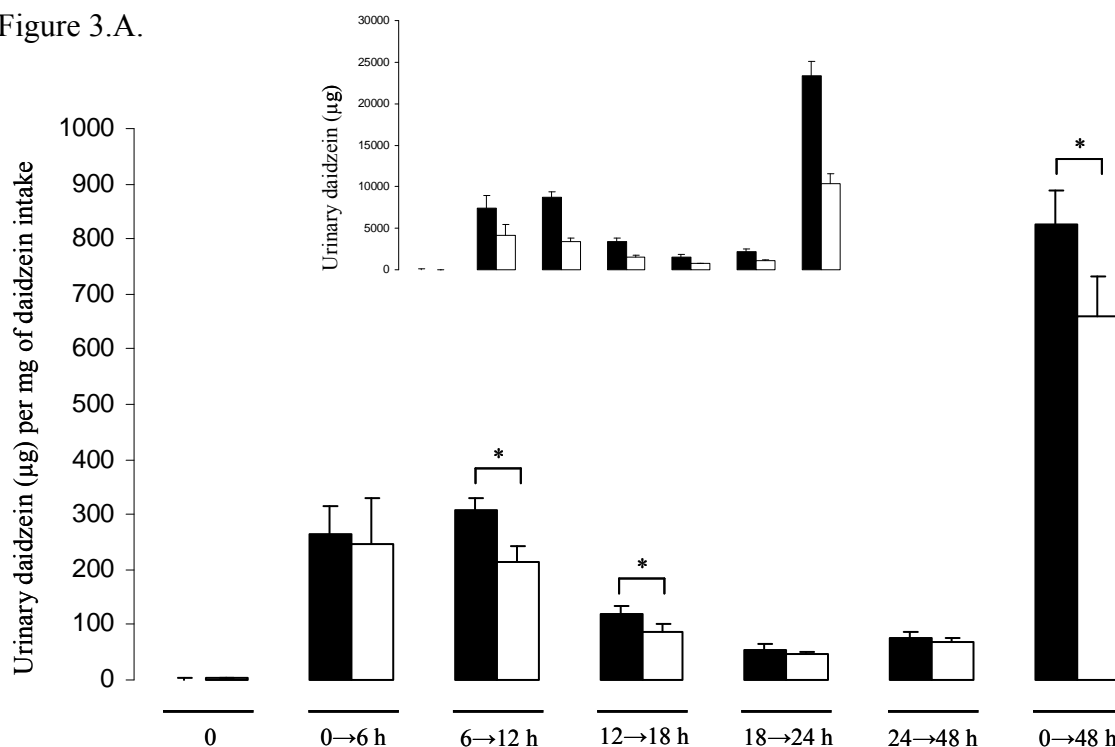


Figure 3.B.

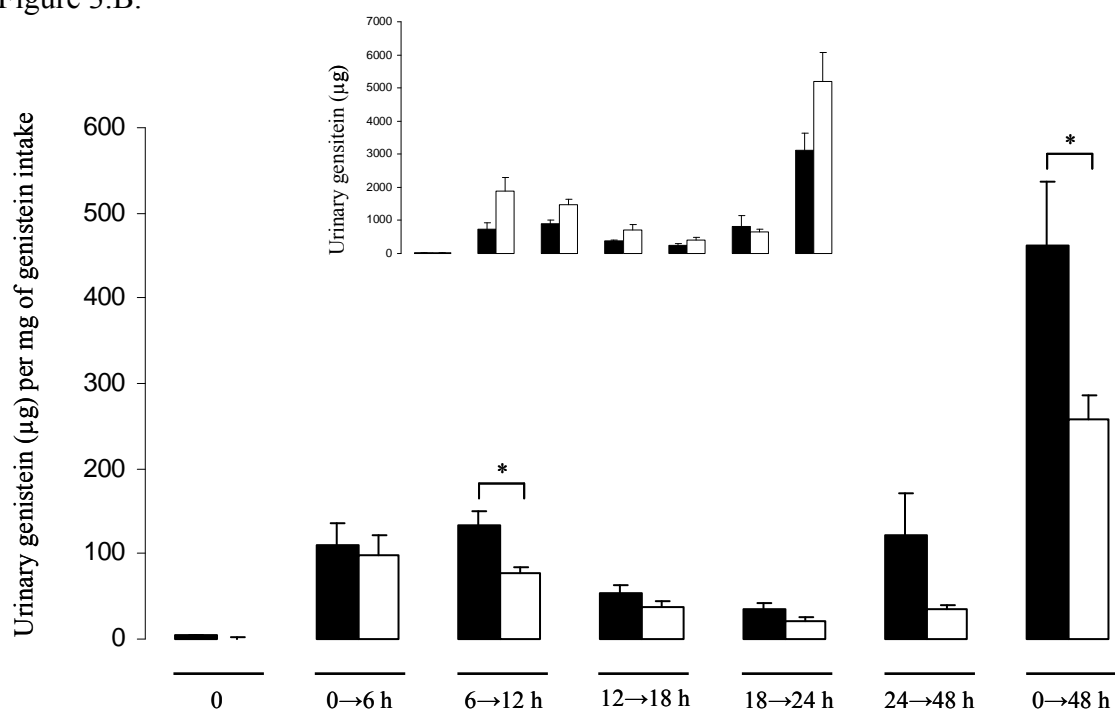


Figure 3: Urinary daidzein (3.A) and genistein (3.B) excretion profiles following the ingestion of capsules (black bars) or cheese (white bars), adjusted to the intake of each isoflavones. Results are expressed as mean  $\pm$  SEM. Histograms at the top represented values without the dose intake adjustment.

Table 1: Food composition of the two soy-based matrix used for the bioavailability study.

	56 g-portion of soy-based cheese	4 pills of soy-based supplement
Energy (kJ)	370	16.8
Proteins (g)	5.77	0.26
Carbohydrates (g)	0.44	0.52
Lipids (g)	7.06	0.10
Saturated (g)	1.23	ND
Monounsaturated (g)	3.00	ND
Polyunsaturated (g)	2.70	ND
Cholesterol (g)	0	ND
Fibres (g)	0.22	ND
Isoflavones (mg)	35	35
Daidzein (mg)	15.78	28.24
Genistein (mg)	19.22	6.76

ND: Non Determined

Table 2: Isoflavone content in diet supplement based on soy and freely available on the European market. nd means non detectable.

	Soy based supplements	Manufacturer	Claimed dose (mg)	Genistein (mg per tablet)	Daidzein (mg per tablet)	Total isoflavones (mg per tablet)	Recommended prescription	Intake per day (mg)
1	Anacaps	Ducray	?	0.76 ± 0.07	0.63 ± 0.07	1.39 ± 0.15	2	2.8 ± 0.30
2 <sup>†</sup>	Biopause	Monin Chanteaud	?	1.4 ± 0.2	1.0 ± 0.1	2.45 ± 0.22	2	4.9 ± 0.44
3	Biopause Fort	Monin Chanteaud	?	0.4 ± 0.1	1.5 0 ± 0.2	1.9 ± 0.22	2	3.8 ± 0.44
4 <sup>†</sup>	Bioptimum Soja	Boiron	?	3.1 ± 0.5	9 ± 1.3	12.1 ± 0.55	2	24.2 ± 1.10
5	Compléal	Besins Int. Nutraceutique	45	28.5 ± 2.9	13.9 ± 0.7	42.4 ± 0.77**	2	84.8 ± 1.5
6	Cybestron	Vital	250	0.07 ± 0.01	< 0.001	0.07 ± 0.01	1	0.07 ± 0.01
7 <sup>†</sup>	Efodyne	Yves Ponroy	20	1.5 ± 0.2	6.7 ± 1.0	8.20 ± 0.45	1	8.20 ± 0.45
8 <sup>†</sup>	Elugyne	Dolisos	?	2.7 ± 0.4	10.6 ± 1.6	13.30 ± 0.58	1	13.30 ± 0.58
9	Estrofort	Rotapharm	60	21.5 ± 1.9	10.0 ± 0.14	31.5 ± 0.58*	1	31.5 ± 0.58
10 <sup>†</sup>	Estronat	Lescuyer	40	6.6 ± 1.0	6.5 ± 1.0	13.10 ± 0.58	3	39.3 ± 1.74
11 <sup>†</sup>	Evestrel	Theramex MERCK	37.5	11.6 ± 1.7	9.2 ± 1.4	20.80 ± 0.72*	2	41.6 ± 1.44
12	Evestrel jour/nuit	Théramex MERCK	37.5	20.4 ± 2.3	6.6 ± 0.3	27.0 ± 0.66*	2	54.0 ± 1.22
13	Féminibiane	Pilege La Micronutrition	25	6.5 ± 0.2	5.2 ± 0.2	11.7 ± 0.26*	1	11.7 ± 0.26
14 <sup>†</sup>	Feminine	Medikem	?	3.3 ± 0.5	1.5 ± 0.2	4.8 ± 0.34	2	9.6 ± 0.68
15	Féminité Soja D3	Genobiol	20	4.2 ± 0.4	5.8 ± 0.7	10.0 ± 0.43*	2	20.0 ± 0.86
16 <sup>†</sup>	Gydrelle	Iprad Santé	45	4.5 ± 0.7	13.3 ± 2	17.7 ± 0.67	2	35.0 ± 1.34
17	Gydrelle phyto fort	Iprad Santé	90	17.9 ± 1.4	9.4 ± 0.2	27.3 ± 0.52	1	27.3 ± 0.52
18 <sup>†</sup>	Gynalpha fort	CCD	76	28.6 ± 4.3	64.2 ± 9.6	92.8 ± 15.2	1	92.8 ± 15.2
19 <sup>†</sup>	Gynalpha	CCD	38	12.1 ± 1.8	15.0 ± 2.2	27.1 ± 0.82*	2	54.2 ± 1.64
20	Gynalpha plus	CCD	38	12.0 ± 0.7	10.1 ± 0.8	22.1 ± 0.5*	1	22.1 ± 0.5
21 <sup>†</sup>	Gynosoya	Codifra	37.5	27.0 ± 4.0	7.4 ± 1.1	34.4 ± 0.92**	2	68.8 ± 1.84
22	Inneov fermenté	Inneov	16.6	4.9 ± 0.7	3.9 ± 0.4	8.8 ± 0.43*	2	17.6 ± 0.86
23	IF super concentrés	Solgar- SoyLife	38	5.1 ± 0.3	18.5 ± 3.3	23.6 ± 0.77*	1	23.6 ± 0.77
24	Isoflavone de soja	Vitarmony	20	10.7 ± 1.9	5.0 ± 0.6	15.7 ± 0.65*	2	31.4 ± 1.30
25	Isopro	Eko Bio	100	4.4 ± 0.1	21.1 ± 1.7	25.5 ± 0.55	1	25.5 ± 0.55
26 <sup>†</sup>	Isoyam	Starvital	10	1.7 ± 0.2	1.5 ± 0.2	3.2 ± 0.26	3	9.6 ± 0.78

27 <sup>†</sup>	Macasoyam	Fenioux	15	2.2 ± 0.3	4.8 ± 0.7	7.0 ± 0.41	6	42.0 ± 2.46
28	Ménocomplexe	Biotechnie	35	18.3 ± 0.2	9.3 ± 0.2	27.6 ± 0.26*	2	55.2 ± 0.52
29	Ménoflore	Floessance	?	< 0.001	< 0.001	< 0.001	3	< 0.003
30 <sup>†</sup>	Menolig	Vichy	20	11.3 ± 1.7	5.6 ± 0.8	16.9 ± 0.65*	4	67.6 ± 2.60
31	Ménopause	Juvamine	?	2.7 ± 0.1	1.2 ± 0.1	3.9 ± 0.18	4	15.6 ± 0.72
32 <sup>†</sup>	Oligoforme 50	IDO	?	0.4 ± 0.06	0.2 ± 0.03	0.6 ± 0.12	4	2.4 ± 0.48
33	Pausanorm	Alkimson	50	0.04 ± 0.04	0.2 ± 0.02	6.2 ± 0.55 <sup>‡</sup>	1	0.24 ± 0.04
34 <sup>†</sup>	Preluzelle	LPF	30	8.6 ± 1.3	10.7 ± 1.6	19.4 ± 0.70*	2	38.8 ± 1.4
35	Promensil	Novogen	40	0.7 ± 0.02	0.3 ± 0.005	44.4 ± 2.16 <sup>‡</sup>	1	1.0 ± 0.06
36 <sup>†</sup>	Phytofemme (iso)	Superdiet	20	4.9 ± 0.7	4 ± 0.6	8.9 ± 0.47	2	17.8 ± 0.94
<b>37</b>	<b>Phytosoya</b>	<b>Arkopharma</b>	<b>17.5</b>	<b>1.7 ± 0.2</b>	<b>7.1 ± 0.9</b>	<b>8.7 ± 1.0*</b>	<b>2</b>	<b>17.4 ± 2.00</b>
38 <sup>†</sup>	Sojocal	Novagyn	?	9.5 ± 1.4	6.3 ± 0.9	15.8 ± 0.62	2	31.6 ± 1.24
39	Sojalia	Biocentury	17.5	6.6 ± 0.5	3.7 ± 0.7	10.0 ± 0.45*	2	20.0 ± 0.90
40 <sup>†</sup>	Sojamag	Novagyn	?	10.7 ± 1.6	6.1 ± 0.9	16.8 ± 0.65	2	33.6 ± 1.30
41	Sojapause	Oligo pharma	35	14.7 ± 0.4	7.2 ± 0.25	21.9 ± 0.33*	2	43.8 ± 0.66
42 <sup>†</sup>	Sojyam	Tonipharm	?	5.9 ± 0.9	2.8 ± 0.4	8.7 ± 0.47	3	26.1 ± 1.41
43	Soya femme 24 jour	Forté Pharma	25	12.7 ± 0.5	9.8 ± 1.2	22.5 ± 0.53**	1	22.5 ± 0.53
44	Soya femme 24 nuit	Forté Pharma	25	13.0 ± 0.5	9.9 ± 1.9	22.9 ± 0.63**	1	22.9 ± 0.63
45	Soya Ménopause	Nutrisanté	20	9.2 ± 0.9	4.9 ± 0.5	14.1 ± 0.48*	2	28.2 ± 0.96
46 <sup>†</sup>	Soyolig	Vichy	37.5	11.9 ± 1.8	6.7 ± 1	18.6 ± 0.68*	2	37.2 ± 1.36
47	Thalassovital	Diététique et Santé	31	2.1 ± 0.1	7.4 ± 0.5	9.5 ± 0.32	1	9.5 ± 0.32
48	Ymea	Chefaro-Ardeval	?	0.7 ± 0.02	2.5 ± 0.04	3.2 ± 0.10	2	6.4 ± 0.20
49	Ysoflavone complexe	Ysonut	100	5.0 ± 0.5	12.9 ± 0.5	17.9 ± 0.58	2	36.8 ± 1.16

\* Values resulting from ELISA assessment are less than the 50% of the claim values of isoflavones. The differences between claim doses and assessment doses may represent the weight of sugar conjugated with isoflavones.

\*\* Claimed values are similar to the ELISA assessment values of isoflavones. Manufacturers have ever indicated the isoflavones in aglycone equivalent

<sup>†</sup> Results already measured and published by Bennetau *et al.* (Bennetau-Pelissero *et al.*, 2003) and were measured again for this study

<sup>‡</sup> High values are due to the presence of another isoflavone, the biochanin A (data not shown)

Tables 3: Isoflavone concentration of solid matrix (3.A) or liquid matrix (3.B) soy-based foodstuffs, available on the European market.

3.A.

	<b>Soy based foodstuffs</b>	<b>Manufacturer</b>	<b>Portion (g)</b>	<b>Genistein (mg per g)</b>	<b>Daidzein (mg per g)</b>	<b>Total isoflavone (mg per g)</b>	<b>Intake per portion (mg)</b>
1	Croq soja provençal	Gerblé	100	0.32 ± 0.03	0.22 ± 0.02	0.54 ± 0.13	54.1 ± 13.0
2	Croque tofou	Soy	100	0.29 ± 0.02	0.31 ± 0.02	0.60 ± 0.12	59.83 ± 12.0
3	Hyperprotéinés gourmand	Slimexcell	46	0.45 ± 0.06	0.27 ± 0.03	0.73 ± 0.17	33.4 ± 7.8
<b>4</b>	<b>Le Tartimi</b>	<b>Le Sojami</b>	<b>40</b>	<b>0.34 ± 0.03</b>	<b>0.28 ± 0.02</b>	<b>0.62 ± 0.13</b>	<b>24.8 ± 5.2</b>
5	Senjà	Danone	100	0.09 ± 0.01	0.08 ± 0.02	0.17 ± 0.01	17.13 ± 1.0
6	Sojasun cuisine	Sojasun	20	0.13 ± 0.01	0.12 ± 0.01	0.25 ± 0.08	4.91 ± 1.6
7	Soja dessert chocolat	Bjorg	100	0.04 ± 0.01	0.03 ± 0.01	0.08 ± 0.01	7.8 ± 1.0
8	Tofu nature	Bjorg	125	0.42 ± 0.01	0.34 ± 0.01	0.77 ± 0.08	95.8 ± 10.3
9	Yoghourt	Soja Douceur	120	0.13 ± 0.01	0.13 ± 0.01	0.26 ± 0.03	30.5 ± 3.6
10	Chocolate cream	Biosoy	100	0.10 ± 0.01	0.11 ± 0.01	0.21 ± 0.02	20.6 ± 2.0
11	Sausages	Soycisses	90	0.26 ± 0.01	0.23 ± 0.02	0.49 ± 0.05	44.1 ± 4.5
12	Tofu pancake	Tossolia	100	0.23 ± 0.01	0.15 ± 0.01	0.38 ± 0.04	38.3 ± 4.0
13	Vanilla Cream	Sokoya	46	0.29 ± 0.02	0.19 ± 0.01	0.48 ± 0.05	22.1 ± 2.3
14	Soup	Sokoya	46	0.22 ± 0.01	0.14 ± 0.01	0.36 ± 0.04	16.5 ± 1.8
15	Breakfast	Sokoya	46	0.19 ± 0.01	0.10 ± 0.01	0.28 ± 0.03	13.0 ± 1.4

3.B.

	<b>Soy based foodstuffs</b>	<b>Manufacturer</b>	<b>Portion (mL)</b>	<b>Genistein (µg per mL)</b>	<b>Daidzein (µg per mL)</b>	<b>Total isoflavone (µg per mL)</b>	<b>Intake per portion (mg)</b>
1	Tonyu, chocolate flavoured	Bjorg	250	55.8 ± 11.7	31.4 ± 0.4	87.2 ± 11.4	21.8 ± 2.9
2	Biosoy	Soy	250	143.3 ± 40.2	138.2 ± 21.3	281.5 ± 25.4	70.4 ± 6.4
3	Soymilk, vanilla flavoured	Regain	250	82.7 ± 8.5	46.3 ± 7.0	129.0 ± 15.6	32.3 ± 3.9
4	Soya drink	Sojasun	250	78.3 ± 20.6	63.7 ± 1.8	142.0 ± 3.9	35.5 ± 1.0
5	Biosoya	Provamel	250	51.5 ± 11.0	31.7 ± 1.7	83.2 ± 12.7	20.8 ± 3.2

Table 4: Pharmacokinetic parameters for daidzein and genistein and relative bioavailability of isoflavones contained either in soy-based cheese or soy-based capsules.

	Daidzein			Genistein		
	Mean ± SD		p-value of the matrix effect	Mean ± SD		p-value of the matrix effect
	Capsule	Cheese		Capsule	Cheese	
AUC <sub>0→∞</sub> (ng.mL <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> )	4948 ± 1580	2571 ± 1167	NP	2242 ± 1051	3292 ± 907	NP
AUC <sub>0→∞</sub> (ng.mL <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> ) /mg intake *	175.2 ± 55.9	162.9 ± 74.0	0.59	331.7 ± 155.5	171.3 ± 47.2	0.002
C <sub>max</sub> (ng.mL <sup>-1</sup> )	370.4 ± 131.3	143.1 ± 36.9	NP	129.9 ± 29.8	200.6 ± 52.8	NP
C <sub>max</sub> (ng.mL <sup>-1</sup> ) /mg intake *	13.1 ± 4.6	9.1 ± 2.3	0.002	19.2 ± 4.4	10.4 ± 2.7	0.002
T <sub>max</sub> (h)	6.9 ± 3.4	6.1 ± 5.0	0.67	6.7 ± 4.0	4.6 ± 2.4	0.09
T <sub>1/2</sub> (h)	9.6 ± 2.7 <sup>†</sup>	19.0 ± 8.7 <sup>†</sup>	0.04 <sup>†</sup>	15.3 ± 7.4 <sup>†</sup>	11.9 ± 4.4 <sup>†</sup>	0.59 <sup>†</sup>

NP means that statistical analysis was not performed due to differences in oral administered doses between both soy containing foods

\* Pharmacokinetic parameters were adjusted for oral administered intake of individual isoflavone

<sup>†</sup> The interaction between period and food matrix effect was significant. As recommended Grizzle, elimination T<sub>1/2</sub> data and p-value effect reported are only those of the first period of the crossover (Grizzle, 1965).

### **3. Les effets de l'appartenance à une ethnie et du contexte alimentaire sur la biodisponibilité des isoflavones de soja, après une exposition unique ou prolongée au soja**

VERGNE S., CHANTRE P., ASSELINEAU J., DURAND M., LAMOTHE V., POTIER M., MOORE N., SAUVANT P. AND BENNETAU-PELISSERO C. "Influence of ethnic origin: Asian *versus* Caucasian and of background dietary habits on the bioavailability of isoflavones" *en préparation*.

VERGNE S., CHANTRE P., LAMOTHE V., ASSELINEAU J., DURAND M., POTIER M., BENNETAU-PELISSERO C., MOORE N. AND SAUVANT P. "Influence of ethnicity on bioavailability of isoflavones in Human: Caucasian vs Asian" 10<sup>th</sup> European Nutrition conference, Paris, France, 2007 (poster).

### 3.1. Contexte de l'étude

Les isoflavones du soja ont des propriétés œstrogéniques dans certains contextes. Ainsi elles pourraient avoir, chez les Asiatiques, des vertus préventives pour les maladies cardio-vasculaires, l'ostéoporose et certains cancers. Par ailleurs, elles semblent dans le même temps protéger les femmes asiatiques des cancers œstrogéno-dépendants *via* des effets anti-œstrogéniques. De ce fait, ces composés sont couramment utilisés dans des compléments alimentaires destinés aux femmes ménopausées et sont employés pour lutter contre les désordres de la ménopause. Le soja en tant qu'ingrédient peut donc tout à fait permettre de développer de nouveaux aliments à valeur santé.

Toutefois, certains résultats expérimentaux montrent que les isoflavones de soja pourraient également avoir un effet proliférateur sur des cellules cancéreuses œstrogéno-dépendantes. Les effets sont clairement dose-dépendants. Il nous semble donc prudent, pour l'alimentation, de ne pas dépasser dans la relation quantités ingérées / quantités plasmatiques les valeurs que l'on retrouve dans le plasma des Asiatiques chez qui l'effet semble positif. Or, des données récentes sur les taux plasmatiques mesurés chez les Asiatiques font apparaître des valeurs relativement faibles et nos données ainsi que celles de la littérature chez les occidentaux font état de taux plasmatiques environ 5 fois supérieurs.

Cet état de fait pourrait s'expliquer si, chez les Asiatiques, des mécanismes d'absorption ou d'élimination particuliers avaient été mis en place suite à une exposition millénaire. L'origine de ces mécanismes pourrait être génétique ou être la conséquence d'un environnement alimentaire particulier. Les objectifs généraux de l'étude sont donc d'évaluer l'influence, sur la pharmacocinétique des isoflavones du soja administrées par voie orale : (1) **de l'origine ethnique** : occidentale ou asiatique, pour une même forme orale ou (2) du type **de l'alimentation concomitante** : occidentale ou asiatique, pour une même origine ethnique (asiatique).

De plus, les objectifs spécifiques de cette étude sont (1) de comparer, **entre sujets occidentaux et asiatiques**, la pharmacocinétique des isoflavones du soja administrées en doses répétées (10 jours) sous forme d'aliment, un fromage frais au soja, (2) de comparer, chez des sujets asiatiques, la pharmacocinétique des isoflavones du soja administrés en doses répétées (10 jours), **dans le contexte d'une alimentation concomitante de type occidental et de type asiatique** et (3) de comparer chez les sujets asiatiques et occidentaux la pharmacocinétique des isoflavones **suite à une ingestion unique et suite à une ingestion répétée** (10 jours).



### 3.2. Résumé et intérêt des essais cliniques

Cette étude a inclus 24 jeunes volontaires : 12 français d'ethnie caucasienne et 12 chinois d'ethnie asiatique. La plupart des volontaires chinois étaient étudiants et n'étaient arrivés en France que peu de temps avant l'étude.

Le premier essai, mené en parallèle, a comparé la biodisponibilité des isoflavones de soja en fonction de l'appartenance à l'ethnie caucasienne ou asiatique, dans un contexte alimentaire occidental. Cette étude a montré que, suite à une prise unique de 35 mg d'isoflavones de soja (équivalent aglycone), plusieurs paramètres pharmacocinétiques dont l' $AUC_{0 \rightarrow \infty}$  de la daïdzéine et la  $C_{max}$  de la daïdzéine et de la génistéine étaient supérieurs chez les sujets asiatiques. La biodisponibilité des isoflavones de soja en prise unique chez les 12 sujets asiatiques est donc plus grande que chez les 12 sujets occidentaux. En revanche, après 10 jours d'exposition aux isoflavones de soja, seule la biodisponibilité de la génistéine reste supérieure.

Le second essai, mené en cross-over, a comparé la biodisponibilité des isoflavones de soja en fonction du contexte alimentaire : occidental ou asiatique, chez des volontaires asiatiques. Cette étude a démontré que quelque soit le contexte alimentaire, en prise unique ou après 10 jours d'exposition, la biodisponibilité des isoflavones est semblable chez les 12 sujets asiatiques.

Afin d'éviter le biais occasionné par l'effet de transition alimentaire chez les asiatiques sous régime occidental, la biodisponibilité des isoflavones des deux ethnies consommant leurs alimentations traditionnelles respectives a été comparée. De nouveau, en prise unique, la biodisponibilité des isoflavones est supérieure chez les volontaires asiatiques.

Dans la mesure où les  $T_{1/2 \text{ élim}}$  ne sont pas différents, les différences d' $AUC_{0 \rightarrow \infty}$  et de  $C_{max}$  sont donc essentiellement liées à des différences d'absorption. Les  $T_{max}$  sont globalement inchangés. L'absorption des isoflavones est donc plus efficace chez les volontaires asiatiques. Cela peut être lié à des activités enzymatiques différentes de part leur métabolisme et leur expression ou à des activités bactériennes intestinales différentes entre les deux ethnies. Cette dernière hypothèse pourrait être conforter par le fait que la flore bactérienne intestinale s'acquière en partie avec l'alimentation (Edwards et Parrett, 2002). Or les populations asiatiques et occidentales ont des alimentations très différentes.

Cette étude était motivée par le fait que les taux d'isoflavones circulantes chez les Asiatiques, dont font état les publications actuelles, sont toujours faibles et inférieurs à ceux rapportés chez des occidentaux qui consomment du soja. Dans la mesure où les asiatiques ne semblent retirer que les bienfaits des isoflavones de soja, il paraît cohérent de chercher à

apporter aux occidentaux les quantités d'isoflavones nécessaires pour obtenir les mêmes concentrations que les asiatiques au niveau plasmatique.

Dans la mesure où les paramètres pharmacocinétiques ne montrent pas une biodisponibilité plus faible des isoflavones chez les volontaires asiatiques, la raison pour laquelle de faibles taux circulants sont rapportés dans la littérature reste à être élucidée. Une hypothèse pourrait être le fait que l'exposition des asiatiques est rapportée en isoflavones totales (aglycones et glycosilées) alors que l'exposition des occidentaux est souvent décrite en isoflavones aglycones. Les données de la littérature sont souvent peu précises quant à la nature aglycone ou glycosilée des isoflavones.

Outre des données de biodisponibilité des isoflavones, de telles études peuvent permettre à terme de proposer des recommandations quant aux doses journalières en isoflavones à ingérer et/ou à ne pas dépasser.

### ***3.3. Influence of ethnic origin: Asian vs Caucasian, and background dietary habits on the bioavailability of isoflavones***

**Influence of ethnic origin: Asian vs Caucasian, and of background dietary habits on the bioavailability of isoflavones.**

Sébastien Vergne<sup>1,2</sup>, Patrick Sauvart<sup>1</sup>, Valérie Lamothe<sup>1</sup>, Philippe Chantre<sup>2</sup>, Julien Asselineau<sup>3</sup>, Paul Perez<sup>3</sup>, Mylène Potier<sup>1</sup>, Marlène Durand<sup>4</sup>, Nicholas Moore<sup>5</sup>, Catherine Bennetau-Pelissero<sup>1\*</sup>.

\*Corresponding author: Pr. Catherine Bennetau-Pelissero, ENITA de Bordeaux, 1, cours du Général de Gaulle, CS 40201, 33175 Gradignan Cedex, France. Email: [c-bennetau@enitab.fr](mailto:c-bennetau@enitab.fr). Tel: + 33 (0)5 57 35 07 52. Fax: + 33 (0)5 57 35 07 59

<sup>1</sup>ENITA de Bordeaux, Unité Micronutriments, Reproduction, Santé, Bordeaux, France.

<sup>2</sup>Arkopharma, Laboratoires Pharmaceutiques, Carros, France. <sup>3</sup>CHU de Bordeaux, Unité de Soutien Méthodologique à la Recherche clinique et épidémiologique, Bordeaux, France.

<sup>4</sup>Centre d'Investigation Clinique (CIC), INSERM - CHU de Bordeaux, France. <sup>5</sup>Université Victor Segalen, Département de Pharmacologie, INSERM U657, Bordeaux, France.

This study was supported by Research Ministry of France, RARE Program N°03P221 and by the Région Aquitaine.

Sébastien Vergne is the recipient of a fellowship (CIFRE N°856/2003) from Arkopharma, Pharmaceutical Laboratories and National Association of Technical Research, Research Ministry of France.

**ABSTRACT**

**Background:** Soy isoflavones are increasingly consumed in Western countries for their putative beneficial effects but they are not traditional.

**Objectives:** To investigate the influence of ethnic origin and dietary context on isoflavone bioavailability following a single and a short term ingestion of controlled soy-based food.

**Design:** 12 Chinese Asian and 12 French Caucasian young healthy men were enrolled in a parallel design to a controlled soy isoflavone intake for 10 days in a Western diet context. The 12 Asian volunteers, also enrolled in a cross-over study, consumed a soy-based cheese for 10 days in a Western or Asian dietary context. In both trials, plasma concentrations were measured at days 1 and 10 by specific ELISA method.

**Results:** Following a single ingestion of a soy-based cheese associated with a Western diet, the  $C_{max}$  of daidzein and genistein ( $p=0.006$  and  $p=0.05$ , respectively) were higher in Asians than in Caucasians. Following 10-d consumption of the soy-based food,  $C_{max}$  of both isoflavones remained higher in Asians. The pharmacokinetic parameters of isoflavones were similar in Asians whatever the dietary context assessed. Finally, when Asian and Caucasians were compared on their own traditional diets, the  $AUC_{0 \rightarrow \infty}$  and  $C_{max}$  of daidzein tended to be higher in Asian subjects ( $p=0.06$  and  $p=0.06$ , respectively).

**Conclusions:** The bioavailability of isoflavones is globally higher in Asian volunteers following soy-based food consumption and it remains unaffected by the dietary context in the 12 Asian volunteers recruited. These results may lead to make soy intake recommendations, influencing health outcomes.

**KEY WORDS:** Soy isoflavones, bioavailability, pharmacokinetics, Humans

## INTRODUCTION

Isoflavones are biologically active plant food components, highly concentrated in soybeans and soy-based products. The current interest in isoflavones in Human health resulted in a significant number of publications on their potential efficacy to improve well-being and health in postmenopausal women. Although, soy isoflavones have received considerable attention, numerous data on their consumption and their bioavailability are still lacking.

Isoflavone concentrations in biological fluids, reported for Asians under their traditional diet, were found to be higher than those reported for non-Asians under typical Western diet (1). Since several centuries, soy products are traditionally used in many Asian countries leading to rather high soy isoflavones levels of exposure. In Japan, the mean total intake of isoflavones was estimated at 47.2 mg per day (2). In China, isoflavones intake has been reported to be 17.7 to 25.4 mg of total isoflavones per day (3, 4). In Korea, this amount has been recently estimated to be 14.2 mg of daidzein and 6.7 mg of genistein (5). As a comparison, the study of Keinan-Boker *et al.*, including 10 European countries, reported that less than 2 mg of isoflavones were ingested daily (6). Furthermore, de Kleijn *et al.* reported a mean consumption of 0.76 mg per day in the USA (7). However, nowadays the soy-based products market is increasing and isoflavone supplements are freely available. This leads to an increased exposure of non-Asians to isoflavones (8).

A better knowledge of the isoflavone bioavailability is required to interpret data regarding their different physiological effects among ethnic groups (9) and to make appropriate soy intake recommendations. However, to date, no study deals with the influence of the ethnic origin on the bioavailability of isoflavones.

Other factors, linked to the ethnic origin, may also modulate differently the bioavailability of isoflavones in Asian or Caucasian populations, such as background diet. Asian traditional diet is well-known to be largely different from Western food (10). To our knowledge, the influence of Asian or Western diets on soy isoflavones bioavailability has not been studied.

Among the different factors, influencing isoflavones bioavailability reviewed by Rowland *et al.* (11), we also focus on chronic soy exposure. Lu *et al.* have demonstrated that chronic soy exposure did not change the metabolism of isoflavones but may alter the time course of isoflavone excretion after 2 weeks of soy consumption (12). Wiseman *et al.* reported only low variations in isoflavone metabolism in male subjects on soy diet during 10 weeks (13). However, the influence of a short-term chronic exposure on bioavailability parameters have never been described.

The current study investigates the influence of *(i)* the ethnicity (Asians vs Caucasians) *(ii)* the background diet (Asian vs Western diets) and *(iii)* a 10-d chronic soy exposure on isoflavones bioavailability.

## SUBJECTS AND METHOD

### *Experimental design*

Two pharmacokinetic studies were carried out. The first trial was a parallel controlled study design, to investigate the influence of the ethnic group on isoflavone bioavailability i.e. Caucasian versus Asian. For this study, the dietary context was a Western diet. In a second design, Asian volunteers were included in a trial, to evaluate the effect of a Western dietary context compared with an Asian one on isoflavone bioavailability. This last trial was a randomized, double-blind, two-way cross-over trial with a 18 days wash-out-period.

### *Subjects*

A total of 24 male volunteers were recruited to perform the two clinical trials: 12 were French Caucasian and 12 were Chinese Asian. Most of the Asian volunteers were visiting students at the University of Bordeaux, France and were freshly immersed in a Western context. Each subject was interviewed, in its native language, on its usual dietary preferences. Asian volunteers were mainly on an Asian traditional diet. Caucasian volunteers were invited to follow Western dietary habits. All subjects were aged between 20 and 30 y, with a body mass index (BMI) of 19.4 to 25.5 kg.m<sup>-2</sup>. Since it was noted that the mean weight of volunteers was significantly different between the two ethnic groups ( $74.0 \pm 7.7$  and  $68.6 \pm 8.1$  kg for Caucasians and Asians respectively), pharmacokinetic parameters were adjusted on individual weight.

The protocol was then explained to subjects in their native language and they provided informed consent. Prior to the study, all subjects underwent a full clinical examination and none of the subjects had preexisting gastrointestinal, liver or kidney diseases. The subjects had to abstain from consuming any drugs, especially antibiotics, for at least 30 days prior to the beginning of the study and during the study. Subjects refrained from consuming soy-containing foods for 10 days before the study until its completion. Moreover, the main foods containing polyphenols, such as red fruits, red wine, chocolates, tea or coffee, were prohibited for 3 days prior to the beginning of the study and during the study. During the first trial, one Caucasian and one Asian volunteers dropped out the study for personal reasons. During the second trial, 4 Asian volunteers were excluded because they did not respect the nutritional protocol of the trial. The study was performed at the Clinical Investigation Center (Haut-Levêque Hospital, Pessac, France) and approved by the local Medical Ethics Committee (Comité Consultatif pour la Protection des Personnes se prêtant à des Recherches Biomédicales, CCPPRB, Bordeaux, France).

### *Dietary intervention*

Each volunteer received daily a 56-g portion of a soy-based cheese during 10 days, associated either with a Western or an Asian traditional diet according to the trial. Soy-based-cheese were from Le Sojami<sup>®</sup> (Agen, France). Concentration of isoflavones in the soy-based cheese was  $45.97 \pm 1.57$  mg per portion, containing  $25.45 \pm 0.85$  and  $20.51 \pm 0.80$  mg of genistein and daidzein, respectively. Isoflavones were mainly under the glycosylated form, i.e. aglycones represent 37.3 % of total genistein and 42.2 % of total daidzein. Meals were prepared and eaten in the hospital unit during the kinetic analysis and takeaway meals were prepared as appropriate to ensure maximum compliance. During the entire study volunteers had no soy, except that tested in the trial. Meals were also controlled by dietician and were strictly identical, during pharmacokinetic analyses, according to the trials. During the wash-out-period subjects were asked to strictly avoid soy.

#### ***Collection, handling, and storage of biological samples***

In both trials, a baseline 10 mL blood sample was collected before soy food ingestion. On day 1 a blood sample was withdrawn before ingestion. Then the soy-based cheese was taken over a period of a few minutes and under supervision, and further blood samples were collected after 4, 6, 8, 10, 12, 18 and 24 h. On the tenth day of trial, a kinetic was performed at 0, 4, 6, 8, 10, 12, 18, 24, 48 and 72 h following the last ingestion of soy-based cheese. Blood samples were withdrawn into Vacutainer<sup>®</sup> glass tubes (Becton Dickinson, Le Pont-De-Claix, France) containing heparin and lithium as anticoagulants, through an indwelling cannula for samples up to 24 h, and thereafter by venipuncture. Plasma samples were prepared by centrifugation at 5,000 g, 5 min, 4°C and stored frozen at -20°C until analysis.

#### ***Analytical methods***

Daidzein and genistein concentrations of blood samples were measured by ELISA as previously described (14, 15) using primary rabbit antibodies for daidzein, equol, and genistein developed in the laboratory (14, 16). The method was validated against HPLC method (17) and previously used for isoflavone pharmacokinetic measurements in human (18).

#### ***Pharmacological analysis***

All pharmacokinetic parameters were performed by the pharmacokinetic software PK-FIT version 1.2 (RDPP, Montpellier, France). Non-compartmental pharmacokinetic analysis was used to analyze plasma isoflavones concentration-time data. The parameters C<sub>max</sub> and T<sub>max</sub> were obtained directly from experimental observations without interpolation. The terminal slope (K<sub>e</sub>) of the concentration-time curve was determined by log-linear regression. Elimination half-life (T<sub>1/2</sub>) of the terminal log-linear phase was calculated following the



equation  $0,693/Ke$ . The area under the plasma concentration-time curve was extrapolated to infinity ( $AUC_{0 \rightarrow \infty}$ ). It was determined by summing the areas from time 0 to the time of the last quantifiable concentration (t) (obtained by trapezoidal and log-trapezoidal methods:  $AUC_{0 \rightarrow t}$ ) and the extrapolated area from t to infinity ( $AUC_{t \rightarrow \infty}$ ). The extrapolated area was determined by dividing the last detectable concentration by the slope of the terminal log-linear phase. To ensure that statistical comparisons were valid in the parallel controlled study,  $C_{max}$  and  $AUC_{0 \rightarrow \infty}$  values for daidzein and genistein were adjusted to take into account the differences in the body weight within Chinese and French volunteers. As such, values presented, concerning only this trial, are adjusted to body weight of each volunteers.

### ***Statistical analysis***

In figures data were expressed as mean  $\pm$  standard error of mean (SEM). In tables they were expressed as mean  $\pm$  standard deviation (SD). Comparison of pharmacokinetic parameters of each isoflavone was based on a cross-over analysis using intra-subject comparisons of the two food matrices. It consisted in a two-step strategy as proposed by Grizzle (19). First, interaction between food matrix and intake period was studied. If significant at a nominal significance level 0.10, comparison of food matrices only used first intake period. Otherwise, comparison of food matrices was performed using the two intake periods. All comparisons used the Wilcoxon sign rank test. Except for interaction analysis, all tests were considered statistically significant at p-value less than 0.05.

## RESULTS

### ***Effect of the ethnic group: Asian vs Caucasian, on isoflavone bioavailability, following a single and a short-term soy-based cheese consumption, in a Western dietary context***

The plasma appearance and disappearance curves for daidzein and genistein concentrations at days 1 and 10 are presented in Figures 1. Following single ingestion of the soy-based cheese, plasma concentrations of daidzein rapidly increased to reach a maximum  $8.8 \pm 3.5$  and  $7.8 \pm 1.9$  h after ingestion for Asian and Caucasian volunteers, respectively (Table 1). Similarly,  $T_{max}$  for genistein reached  $8.7 \pm 3.9$  and  $6.9 \pm 2.3$  h for Asian and Caucasian volunteers, respectively. For both ethnic groups, plasma isoflavone concentrations had not returned to baseline concentrations 24 h following soy-based cheese ingestion. Following the single ingestion of soy-based cheese, the  $C_{max}$  of both isoflavones were higher in Asians than those observed in Caucasians ( $p=0.006$  and  $p=0.005$  for daidzein and genistein, respectively) and the  $AUC_{0 \rightarrow \infty}$  of daidzein tended to be higher ( $p=0.09$ ) in Asians.

The pharmacokinetic curves of isoflavones are globally similar at day 10 compared with those recorded at day 1. Two phases can be identified (i) a rapid absorption (ii) a log-linear elimination leading to a progressive return to baseline at 72h. Daidzein and genistein plasma concentrations were not nil, when volunteers ingested their last soy-based cheese. The  $C_{max}$  of isoflavones were different between ethnic groups after a 10-d period of daily soy-based cheese ingestion ( $p=0.03$  and  $p=0.05$  for daidzein and genistein, respectively). Furthermore, the  $AUC_{0 \rightarrow \infty}$  and  $C_{max}$  of both isoflavones increased for Caucasian volunteers between day 1 and day 10, although the  $AUC_{0 \rightarrow \infty}$  and  $C_{max}$  of individual genistein increased for Asian volunteers ( $p=0.007$  and  $p=0.01$ , respectively).

### ***Effect of the dietary context: Asian vs Western diets, on isoflavone bioavailability for Asian volunteers***

Both isoflavone pharmacokinetic curves appeared very similar and shaped bell-curves whatever the dietary contexts at days 1 and 10 (Figures 2). Associated pharmacokinetic parameters were summarized in Table 2. All pharmacokinetic parameters of daidzein and genistein were unaffected by the dietary context for Asian volunteers. The  $AUC_{0 \rightarrow \infty}$  of daidzein were  $36.1 \pm 14.5$  and  $39.8 \pm 20.2$   $\text{ng.mL}^{-1}.\text{h}^{-1}$  per kg bw for the Asian and Western dietary contexts, respectively. For genistein, the  $AUC_{0 \rightarrow \infty}$  values were  $55.8 \pm 27.0$  and  $57.1 \pm 25.5$   $\text{ng.mL}^{-1}.\text{h}^{-1}$  per kg bw, respectively.

There was no difference in isoflavone pharmacokinetic parameters according to the dietary context following a 10-d chronic ingestion of soy-based cheese. The  $AUC_{0 \rightarrow \infty}$  for daidzein

were  $43.6 \pm 15.4$  and  $39.8 \pm 20.5$   $\text{ng.mL}^{-1}.\text{h}^{-1}$  per kg bw for Asian and Western dietary contexts, respectively, although that the  $\text{AUC}_{0 \rightarrow \infty}$  for genistein were  $82.7 \pm 28.4$  and  $90.8 \pm 43.9$   $\text{ng.mL}^{-1}.\text{h}^{-1}$  per kg bw.

The  $\text{AUC}_{0 \rightarrow \infty}$  of both isoflavones increased between day 1 and day 10, when Asian volunteers consumed soy-based cheese associated with an Asian dietary context. When they consumed a Western dietary context, the only  $\text{AUC}_{0 \rightarrow \infty}$  of genistein increased ( $p=0.007$ ). In this last case, the  $\text{C}_{\text{max}}$  of genistein also increased between day 1 and day 10 ( $p=0.01$ ).

#### ***Effects of traditional diet according to the ethnicity on isoflavone bioavailability***

It was suspected that an exposure to a Western diet may alter digestive function in Asian subjects, which may influence the pharmacokinetic parameters of isoflavones. Consequently, a third comparison was attempted between Asian and Caucasian volunteers on their own usual diet (Table 3 and Figure 3). These data showed that the  $\text{AUC}_{0 \rightarrow \infty}$  and  $\text{C}_{\text{max}}$  of daidzein tended to be higher in Asians ( $p=0.06$  and  $p=0.06$ , respectively) following the single ingestion. No statistical difference of pharmacokinetic parameters was found following a 10-d soy isoflavone exposure. Elimination  $T_{1/2}$  and  $T_{\text{max}}$  were similar between ethnic groups on their own usual diet.

## DISCUSSION

To date, this is the first time that isoflavone bioavailability has been compared between two ethnic groups in the same study using the same assay method and in the same dietary context and the same environment. Furthermore, it is also the first time that the effect of a traditional dietary context has been examined for its ability to modify the bioavailability of isoflavones. Several remarks must be made at first on the design of the trial. We compared 12 healthy young male subjects in order to avoid the interaction with estrogens in women (20, 21). The wash-out period was fixed at 18 days considering that it might have been of 7 elimination  $T_{1/2}$  and might have taken into account recent data mentioning elimination  $T_{1/2}$  over 25 h (18) (22). We chose to chronically expose volunteers for a 10-d duration since 10-d adaptation phenomena have already been registered for macronutrients, such as carbohydrates (23). Since it was noted that the mean weight of volunteers was significantly different between the two ethnic groups ( $74.0 \pm 7.7$  kg vs  $68.6 \pm 8.1$  kg for Caucasians and Asians, respectively), pharmacokinetic parameters were adjusted on individual weight.

### *Comparison between ethnic groups in a Western dietary context*

The general shape of the pharmacokinetic curves registered at day 1 fit with previous data from other authors (24) and from our laboratory (18). Data show that the elimination  $T_{1/2}$  can vary greatly inter-subjects as suggested by SD values. In addition, when parameters are examined at day 1 they show that the elimination  $T_{1/2}$  of genistein is superior to that of daidzein, in accordance with the literature (25, 26).

The  $AUC_{0 \rightarrow \infty}$  of genistein tended to be higher in Asian subjects sustained by a significantly higher  $C_{max}$ . However, this effect is antagonized by a greater elimination  $T_{1/2}$  suggesting a greater residence time of genistein in Caucasian volunteers. These results suggest that Asian volunteers react differently to isoflavones compared to Caucasian subjects. The  $AUC_{0 \rightarrow \infty}$  of daidzein tended to be greater in Asian volunteers. This is in accordance with daidzein  $C_{max}$  which is significantly higher in Asians than in Caucasians. For daidzein, differences in  $AUC_{0 \rightarrow \infty}$  and  $C_{max}$  can only be due to a greater intestinal absorption since the elimination  $T_{1/2}$  were not different.

To our knowledge, our study is one of the first pharmacokinetic studies performed on isoflavones in humans after a chronic ingestion. It is relevant to observe greater plasma levels of genistein than of daidzein because (i) the soy-based cheese used in this study contained more genistein (25.45 mg aglycone equivalent) than daidzein (20.51 mg aglycone equivalent) and (ii) daidzein plasma residence time is known to be lower than that of genistein (25, 26). In

addition, it is also relevant that at T0 of day 10 the mean levels of isoflavones in plasma were not nil, because the elimination  $T_{1/2}$  for isoflavones can vary from 6 to 24 h according to the occurrence of recirculation phenomena (22, 18). Indeed, since isoflavones remained in plasma at T0 of day 10, it appears logical that  $AUC_{0 \rightarrow \infty}$  and  $C_{max}$  were higher than those observed at day 1. This is confirmed by the experimental data in all cases except for daidzein  $AUC_{0 \rightarrow \infty}$  in Asian volunteers eating Western diets. In this case, the  $AUC_{0 \rightarrow \infty}$  and  $C_{max}$  of daidzein at day 10 were equivalent to those observed at day 1. This could indicate a modification of the daidzein metabolism pathways in these specific conditions. In this case (Asian under a Western diet), when parameters recorded at days 1 and 10 are examined, the only parameter which tends to be affected by the chronic intake is  $T_{max}$ , indicating that the absorption process might be affected. Therefore, an interaction with unusual nutrients at the gut level might be involved in the modified absorption of daidzein, in Asian volunteers. Daidzein would be the only compound to be influenced by the unusual diet because of its lower intake and its shorter residence time in plasma. Indeed, because it is eliminated more rapidly, its remaining quantity at T0 of day 10 is lower than for genistein.

#### ***Comparison between Asian and Western dietary contexts within the Asian ethnic group***

No statistical difference appeared when parameters were compared for daidzein or genistein in one or the other dietary context. When data collected at day 1 and day 10 were compared within the same diet, it appeared, that  $AUC_{0 \rightarrow \infty}$  was maintained equal between day 1 and day 10 for daidzein when Asian volunteers were under a Western diet as already mentioned. This is not the case in Asians under Asian diets and in this case the  $AUC_{0 \rightarrow \infty}$  increased as expected between day 1 and day 10 for both daidzein and genistein. These data sustained those previously discussed and lead to the same conclusion, that of a transient light digestive dysfunction caused by an unusual Western diet in Asians, even though it is of importance to note that none of the subject ever reported any digestive problem during the clinical study.

#### ***Comparison between Asian and Caucasian volunteers in their own usual diet***

Because we hypothesized a light digestive dysfunction in Asian fed unusual Western diet and to get rid of this potential bias effect, we decided to compare each ethnic group in its own usual diet. Between day 1 and day 10, the expected increase of  $AUC_{0 \rightarrow \infty}$  and  $C_{max}$  was observed showing a normal absorption process. Because  $T_{max}$  and  $T_{1/2}$  were very close in each case the difference between the two ethnic groups probably resides in a difference of intensity of absorption at the intestinal level. This difference in absorption could be due to differences in gut flora activity (27). Indeed, diet context is known to influence gut bacterial

flora (11) suggesting that gut microflora is probably different between Asians and Caucasians. Indeed, Song *et al.* have described different percentage of equol producers in American and Korean population, which suggests different intestinal flora in these two populations (28). It could be interesting in the future to analyze more closely the main flora characteristics in the different ethnic groups.

Lastly, we showed an increase in the elimination  $T_{1/2}$  of daidzein between day 1 and day 10. This does not necessarily mean that there is an adaptation to chronic ingestion. It is more likely due to the fact that elimination  $T_{1/2}$  was calculated at day 1 on a 24 h period when it was calculated at day 10 on a 72 h period. The relatively rapid elimination of daidzein in urine may emphasize the difference due to this methodological point when compared to genistein. This difference could be due to recirculation phenomena which is exhibited over a 72 h period and not over a 24 h period (18).

#### ***Comparison of the present results to ecological data***

A higher absorption of isoflavone was observed in this study when Asians were compared to Caucasians because several parameters show the same outcomes with a strong consistency. To validate these results further we compared our findings to ecological data obtained by others (Table 4). This table presents plasma concentrations of isoflavones in Asians and Caucasians. Generally, plasma isoflavones concentrations were described to be lower in Asian than in Caucasian volunteers after a chronic soy intake. Therefore, our results were not in accordance with these previous findings. This can be due to (i) different amounts of isoflavone intake, (ii) ingested amounts expressed either in glycosylated or in aglycone forms, and (iii) different periods of duration between the last soy or isoflavone intake and blood samplings. However, this duration is likely never to exceed 12 hours (currently an over-night fasting). Other parameters such as food matrix and assay techniques can be also confusing. This therefore, opens up several questions. Is the exposure of Asian people to isoflavone as high as that tested in Western subjects? Is it expressed as glycoside or aglycone equivalent? Is there a long term adaptation leading to reduced plasma levels with very long exposure? The last question has already been addressed by several authors (12, 13, 17, 29) but no fundamental changes in isoflavone bioavailability with the time of exposure have been reported so far. However, all the works cited above were necessarily performed on Caucasian subjects and for a duration shorter than a life time in Asian adults.

To conclude, this original work performed in the same conditions in 12 Asians and 12 Caucasians showed that there is a better bioavailability of isoflavones in Asians. A greater

understanding of isoflavone pharmacokinetics that may differ according to ethnic groups or chronic ingestion may help explaining some of the heterogeneity of results among the large and growing number of trials testing the effects of soy isoflavones on a variety of potential health outcomes.

**REFERENCES**

1. Adlercreutz H, Markkanen H, Watanabe S. Plasma concentrations of phyto-oestrogens in Japanese men. *Lancet* 1993;342:1209-10.
2. Arai Y, Watanabe S, Kimira M, Shimoi K, Mochizuki R, Kinane N. Dietary intakes of flavonols, flavones and isoflavones by Japanese women and the inverse correlation between quercetin intake and plasma LDL cholesterol concentration. *J Nutr* 2000;130:2243-50.
3. Liu Z, Li W, Sun J, et al. Intake of soy foods and soy isoflavones by rural adult women in China. *Asia Pac J Clin Nutr* 2004;13:204-9.
4. Mei J, Yeung SS, Kung AW. High dietary phytoestrogen intake is associated with higher bone mineral density in postmenopausal but not premenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86:5217-21.
5. Surh J, Kim MJ, Koh E, Kim YK, Kwon H. Estimated intakes of isoflavones and coumestrol in Korean population. *Int J Food Sci Nutr* 2006;57:325-44.
6. Keinan-Boker L, Peeters PH, Mulligan AA, et al. Soy product consumption in 10 European countries: the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC) study. *Public Health Nutr* 2002;5:1217-26.
7. de Kleijn MJ, van der Schouw YT, Wilson PW, et al. Intake of dietary phytoestrogens is low in postmenopausal women in the United States: the Framingham study(1-4). *J Nutr* 2001;131:1826-32.
8. Messina M, Nagata C, Wu AH. Estimated Asian adult soy protein and isoflavone intakes. *Nutr Cancer* 2006;55:1-12.
9. Greendale GA, FitzGerald G, Huang MH, et al. Dietary soy isoflavones and bone mineral density: results from the study of women's health across the nation. *Am J Epidemiol* 2002;155:746-54.
10. Adlercreutz H, Honjo H, Higashi A, et al. Urinary excretion of lignans and isoflavonoid phytoestrogens in Japanese men and women consuming a traditional Japanese diet. *Am J Clin Nutr* 1991;54:1093-100.
11. Rowland I, Faughnan M, Hoey L, Wahala K, Williamson G, Cassidy A. Bioavailability of phyto-oestrogens. *Br J Nutr* 2003;89 Suppl 1:S45-58.
12. Lu LJ, Grady JJ, Marshall MV, Ramanujam VM, Anderson KE. Altered time course of urinary daidzein and genistein excretion during chronic soya diet in healthy male subjects. *Nutr Cancer* 1995;24:311-23.



13. Wiseman H, Casey K, Bowey EA, et al. Influence of 10 wk of soy consumption on plasma concentrations and excretion of isoflavonoids and on gut microflora metabolism in healthy adults. *Am J Clin Nutr* 2004;80:692-9.
14. Bennetau-Pelissero C, Le Houerou C, Lamothe V, Le Menn F, Babin P, Bennetau B. Synthesis of haptens and conjugates for ELISAs of phytoestrogens. Development of the immunological tests. *J Agric Food Chem* 2000;48:305-11.
15. Bennetau-Pelissero C, Arnal-Schnebelen B, Lamothe V, et al. ELISA as a new method to measure genistein and daidzein in food and human fluids. *Food Chemistry* 2003;82:645-658.
16. Le Houerou C, Bennetau-Pelissero C, Lamothe V, Le Menn F, Babin P, Bennetau B. Syntheses of Novel Hapten-Protein Conjugates for Production of Highly Specific Antibodies to Formononetin, Daidzein and Genistein. *Tetrahedron* 2000;56:295-301.
17. Mathey J, Lamothe V, Coxam V, Potier M, Sauvant P, Pelissero CB. Concentrations of isoflavones in plasma and urine of post-menopausal women chronically ingesting high quantities of soy isoflavones. *J Pharm Biomed Anal* 2006;41:957-65.
18. Vergne S, Titier K, Bernard V, et al. Bioavailability and urinary excretion of isoflavones in humans: effects of soy-based supplements formulation and equol production. *J Pharm Biomed Anal* 2007;43:1488-94.
19. Grizzle JE. The Two-Period Change-over Design and Its Use in Clinical Trials. *Biometrics* 1965;21:467-80.
20. Pfeiffer E, Treiling CR, Hoehle SI, Metzler M. Isoflavones modulate the glucuronidation of estradiol in human liver microsomes. *Carcinogenesis* 2005;26:2172-8.
21. Nagel SC, vom Saal FS, Welshons WV. The effective free fraction of estradiol and xenoestrogens in human serum measured by whole cell uptake assays: physiology of delivery modifies estrogenic activity. *Proc Soc Exp Biol Med* 1998;217:300-9.
22. Richelle M, Pridmore-Merten S, Bodenstab S, Enslin M, Offord EA. Hydrolysis of isoflavone glycosides to aglycones by beta-glycosidase does not alter plasma and urine isoflavone pharmacokinetics in postmenopausal women. *J Nutr* 2002;132:2587-92.
23. Albert JD, Legaspi A, Horowitz GD, Tracey KJ, Brennan MF, Lowry SF. Peripheral tissue metabolism in man with varied disease states and similar weight loss. *J Surg Res* 1986;40:374-81.
24. Setchell KD, Brown NM, Desai PB, et al. Bioavailability, disposition, and dose-response effects of soy isoflavones when consumed by healthy women at physiologically typical dietary intakes. *J Nutr* 2003;133:1027-35.

25. Watanabe S, Yamaguchi M, Sobue T, et al. Pharmacokinetics of soybean isoflavones in plasma, urine and feces of men after ingestion of 60 g baked soybean powder (kinako). *J Nutr* 1998;128:1710-5.
26. Setchell KD, Brown NM, Desai P, et al. Bioavailability of pure isoflavones in healthy humans and analysis of commercial soy isoflavone supplements. *J Nutr* 2001;131:1362S-75S.
27. Atkinson C, Frankenfeld CL, Lampe JW. Gut bacterial metabolism of the soy isoflavone daidzein: exploring the relevance to human health. *Exp Biol Med (Maywood)* 2005;230:155-70.
28. Song KB, Atkinson C, Frankenfeld CL, et al. Prevalence of daidzein-metabolizing phenotypes differs between Caucasian and Korean American women and girls. *J Nutr* 2006;136:1347-51.
29. Vedrine N, Mathey J, Morand C, et al. One-month exposure to soy isoflavones did not induce the ability to produce equol in postmenopausal women. *Eur J Clin Nutr* 2006;60:1039-45.
30. Gooderham MH, Adlercreutz H, Ojala ST, Wahala K, Holub BJ. 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* 1996;126:2000-6.
31. Rannikko A, Petas A, Rannikko S, Adlercreutz H. Plasma and prostate phytoestrogen concentrations in prostate cancer patients after oral phytoestrogen supplementation. *Prostate* 2006;66:82-7.
32. Izumi T, Piskula MK, Osawa S, et al. Soy isoflavone aglycones are absorbed faster and in higher amounts than their glucosides in humans. *J Nutr* 2000;130:1695-9.
33. Uehar M, Arai Y, Watanabe S, Adlercreutz H. Comparison of plasma and urinary phytoestrogens in Japanese and Finnish women by time-resolved fluoroimmunoassay. *Biofactors* 2000;12:217-25.
34. Yamamoto S, Sobue T, Sasaki S, et al. 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* 2001;131:2741-7.
35. Morton MS, Arisaka O, Miyake N, Morgan LD, Evans BA. Phytoestrogen concentrations in serum from Japanese men and women over forty years of age. *J Nutr* 2002;132:3168-71.
36. Ozasa K, Nakao M, Watanabe Y, et al. Association of serum phytoestrogen concentration and dietary habits in a sample set of the JACC Study. *J Epidemiol* 2005;15 Suppl 2:S196-202.

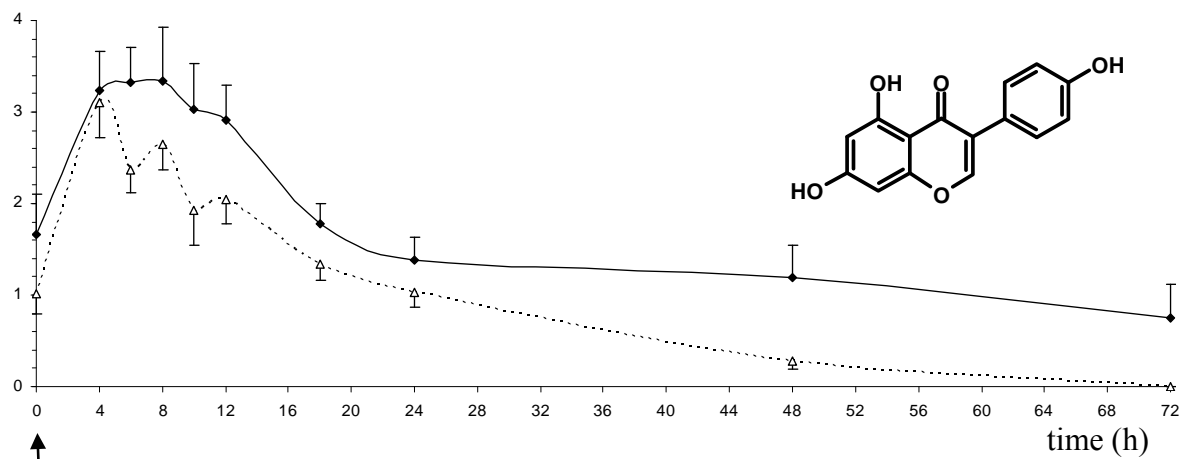
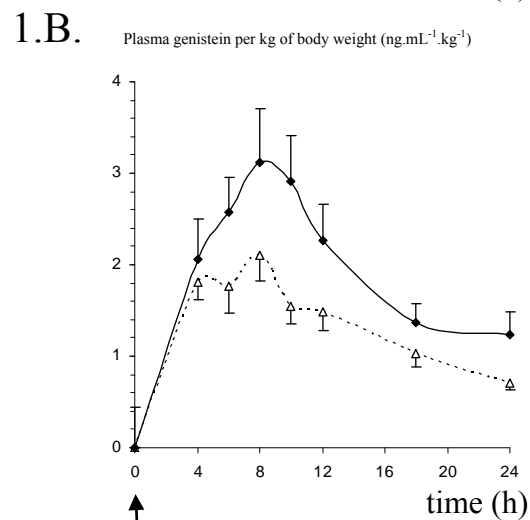
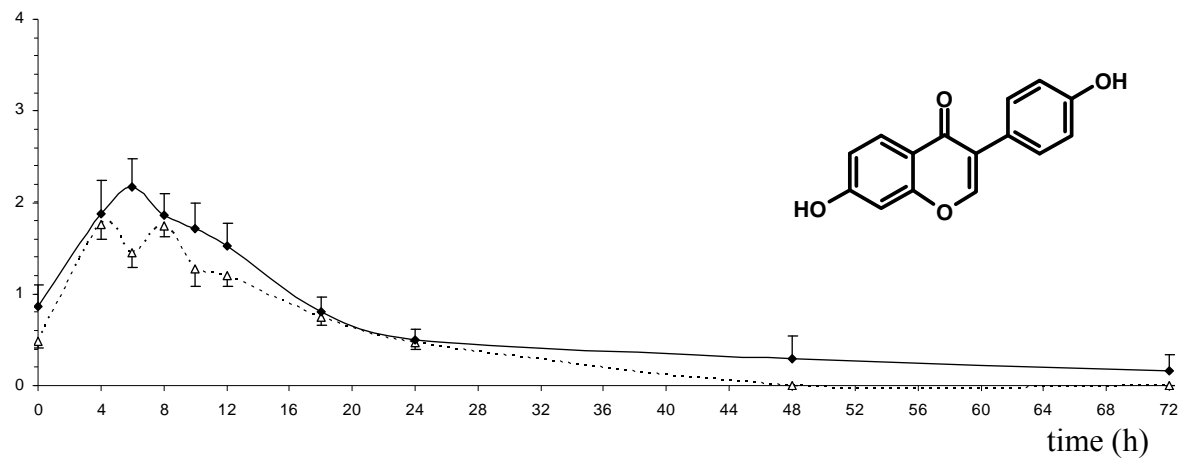
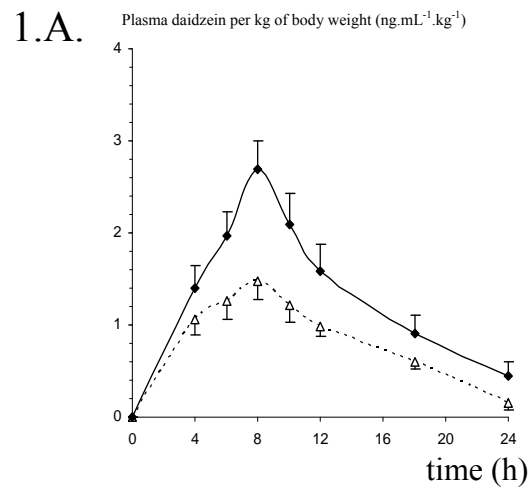
37. Wu AH, Yu MC, Tseng CC, Twaddle NC, Doerge DR. Plasma isoflavone levels versus self-reported soy isoflavone levels in Asian-American women in Los Angeles County. *Carcinogenesis* 2004;25:77-81.

**LEGENDS FOR FIGURES**

Figures 1. Mean ( $\pm$  SEM) plasma concentrations of daidzein (A) and genistein (B) after a single and a 10-d period of daily ingestion of a soy-based cheese containing  $20.51 \pm 0.80$  of daidzein and  $25.45 \pm 0.85$  mg of genistein, associated with traditional Western diets, in 11 Caucasian men (open triangle) and 11 Asian men (black diamond).

Figures 2. Mean ( $\pm$  SEM) plasma concentrations of daidzein (A) and genistein (B) after a single and a 10-d period of daily ingestion of a soy-based cheese containing  $20.51 \pm 0.80$  of daidzein and  $25.45 \pm 0.85$  mg of genistein, in 8 Asian men who consumed traditional Western diets (black diamond) and traditional Asian diets (open circle).

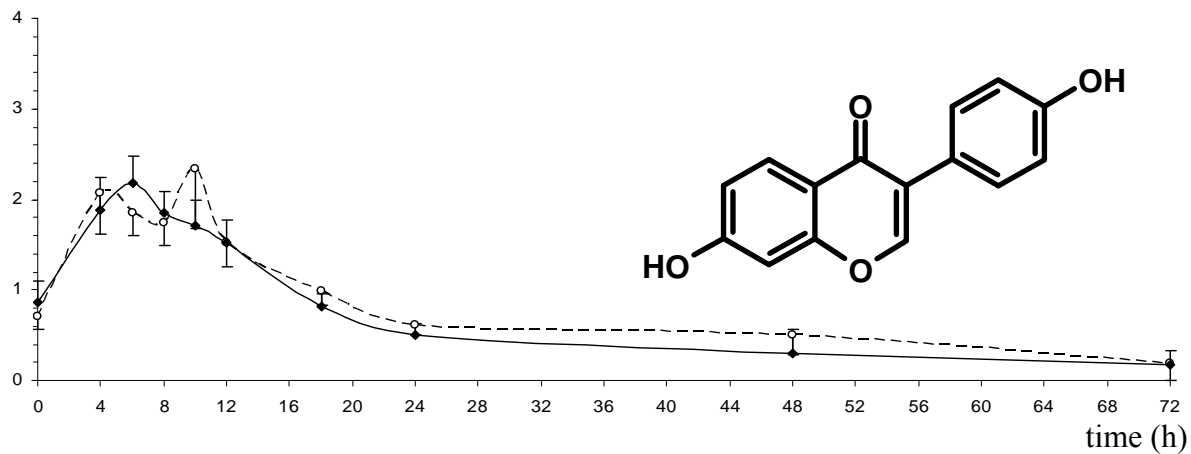
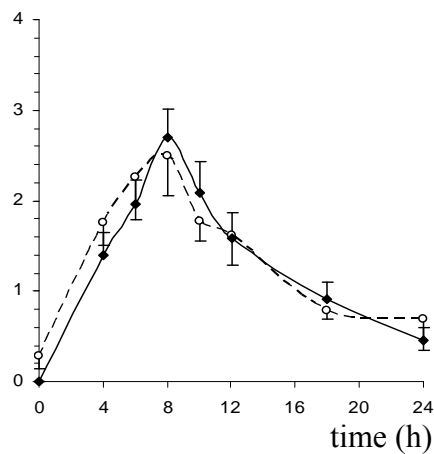
Figures 3. Mean ( $\pm$  SEM) plasma concentrations of daidzein (A) and genistein (B) after a single and a 10-d period of daily ingestion of a soy-based cheese containing  $20.51 \pm 0.80$  of daidzein and  $25.45 \pm 0.85$  mg of genistein, in 11 Caucasian men consuming their traditional Western diets (open triangle) and 8 Asian men consuming their traditional Asian diets (open circle).



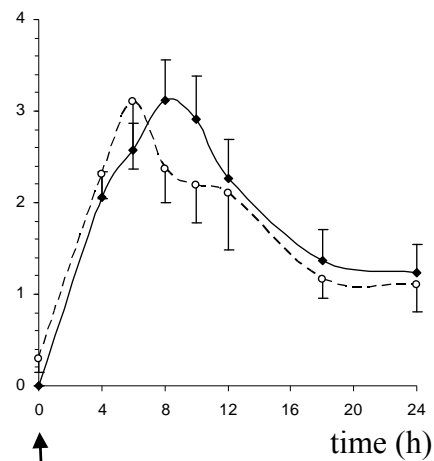
Day 1

Day 10

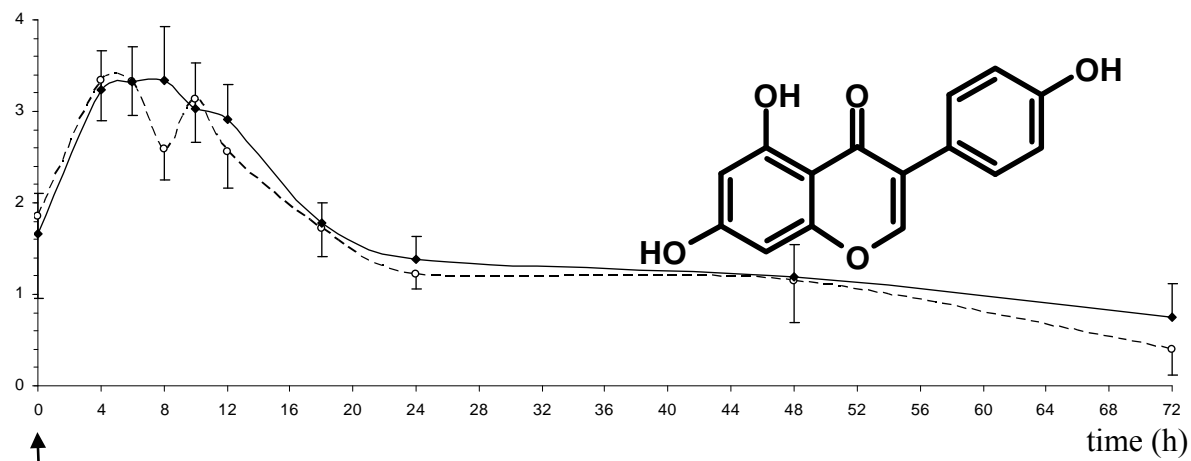
2.A. Plasma daidzein per kg of body weight (ng.mL<sup>-1</sup>.kg<sup>-1</sup>)



2.B. Plasma genistein per kg of body weight (ng.mL<sup>-1</sup>.kg<sup>-1</sup>)



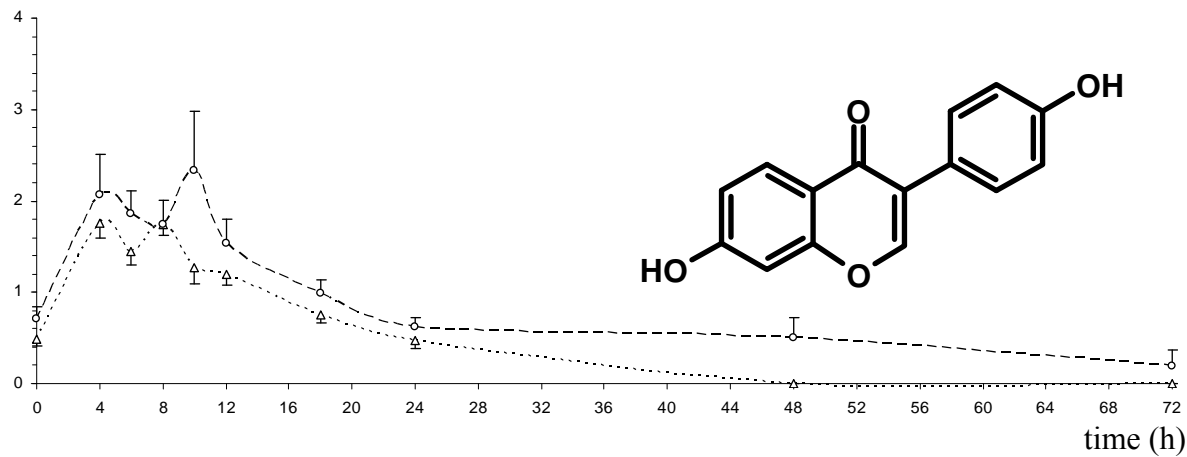
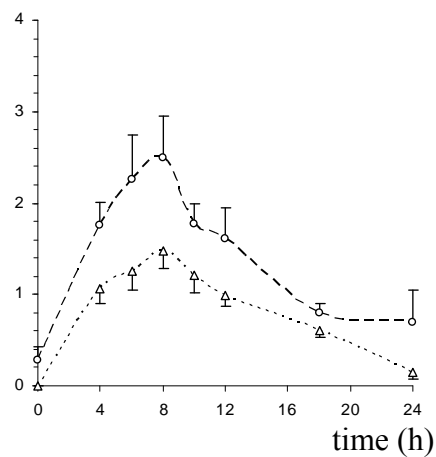
Day 1



Day 10

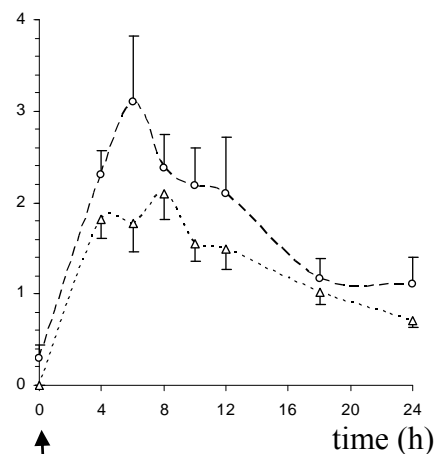
3.A.

Plasma daidzein per kg of body weight ( $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}\cdot\text{kg}^{-1}$ )

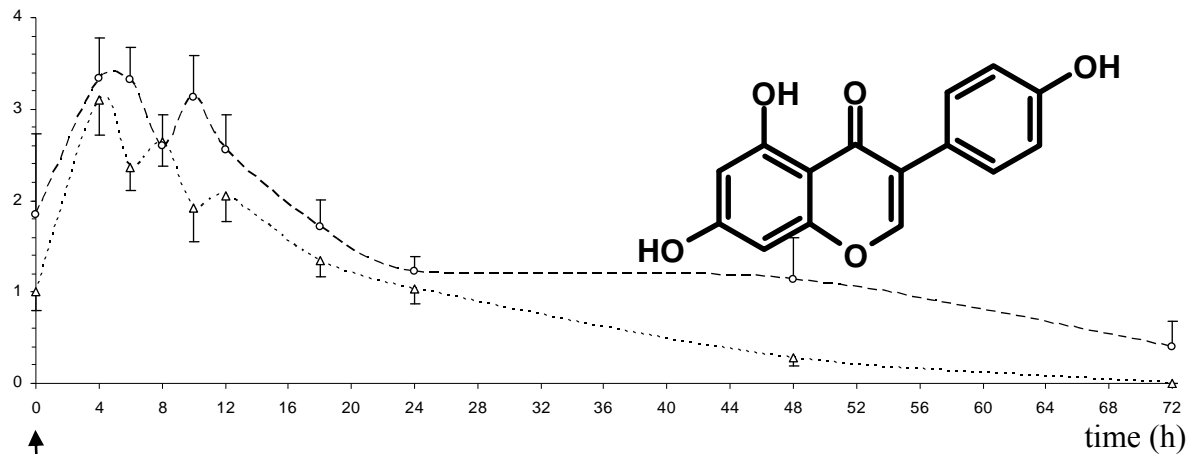


3.B.

Plasma genistein per kg of body weight ( $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}\cdot\text{kg}^{-1}$ )



Day 1



Day 10

Table 1. Pharmacokinetic parameters for plasma isoflavones after a single and a 10-d period of daily ingestion of a soy-based cheese, associated with traditional western diets, in 11 Caucasian men vs 11 Asian men.

	Single ingestion (day 1)			Chronic ingestion (day 10)			p-value of the chronically ingestion effect		p-value of interaction "ethnic group × ingestion"
	Asian volunteers	Caucasian volunteers	p-value of ethnic group effect	Asian volunteers	Caucasian volunteers	p-value of ethnic group effect	Asian origin	Caucasian origin	
<i>Daidzein</i>									
AUC <sub>0→∞</sub> (ng.mL <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> ) per kg of body weight	37.2 ± 19.4	24.1 ± 9.0	0.09	37.7 ± 18.0	33.5 ± 11.1	0.83	0.32	0.002	0.22
C <sub>max</sub> (ng.mL <sup>-1</sup> ) per kg of body weight	2.9 ± 1.1	1.7 ± 0.5	0.006	2.8 ± 0.9	2.0 ± 0.5	0.03	0.83	0.08	0.14
T <sub>max</sub> (h)	8.8 ± 3.5	7.8 ± 1.9	0.89	6.4 ± 2.1	6.5 ± 2.7	1.00	0.09	0.14	0.49
T <sub>1/2</sub> (h)	8.1 ± 6.0	7.2 ± 2.4	0.65	7.6 ± 2.9	10.6 ± 4.5	0.13	0.47	0.08	0.15
<i>Genistein</i>									
AUC <sub>0→∞</sub> (ng.mL <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> ) per kg of body weight	55.2 ± 23.5	42.6 ± 16.9	0.24	83.8 ± 39.8	64.0 ± 30.6	0.26	0.007	0.01	0.54
C <sub>max</sub> (ng.mL <sup>-1</sup> ) per kg of body weight	3.7 ± 1.1	2.4 ± 0.7	0.005	4.5 ± 1.6	3.2 ± 1.2	0.051	0.01	0.01	0.92
T <sub>max</sub> (h)	8.7 ± 3.9	6.9 ± 2.3	0.35	6.7 ± 2.6	5.2 ± 1.8	0.12	0.41	0.10	0.91
T <sub>1/2</sub> (h)	8.7 ± 3.5	11.3 ± 3.3	0.07	11.7 ± 4.0	13.6 ± 6.3	0.69	0.32	0.97	0.77



Table 2. Pharmacokinetic parameters for plasma isoflavones in 8 Asian men, after a single and a 10-d period of daily ingestion of a soy-based cheese, associated with traditional western diets vs traditional asian diets.

	Single ingestion (day 1)			Chronic ingestion (day 10)			p-value of the chronically ingestion effect		p-value of interaction "dietary context × ingestion "
	Asian diet	Western diet	p-value of dietary context effect	Asian diet	Western diet	p-value of dietary context effect	Asian diet	Western diet	
<i>Daidzein</i>									
AUC <sub>0→∞</sub> (ng.mL <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> ) per kg of body weight	36.1 ± 14.5	39.8 ± 20.2	0.55	43.6 ± 15.4	39.8 ± 20.5	0.20	0.02	0.32	0.12
C <sub>max</sub> (ng.mL <sup>-1</sup> ) per kg of body weight	2.9 ± 1.5	3.0 ± 1.0	0.42	3.0 ± 1.8	2.5 ± 0.8	1.00	0.30	0.83	0.24
T <sub>max</sub> (h)	8.0 ± 1.9	8.6 ± 3.7	0.81	7.2 ± 2.8	6.8 ± 2.4	0.89	0.98	0.09	0.23
T <sub>1/2</sub> (h)	6.7 ± 1.6	8.3 ± 6.4	0.84	10.8 ± 4.7	8.2 ± 2.9	0.34	0.03	0.46	0.10
<i>Genistein</i>									
AUC <sub>0→∞</sub> (ng.mL <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> ) per kg of body weight	55.8 ± 27.0	57.1 ± 25.5	0.84	82.7 ± 28.4	90.8 ± 43.9	0.89	0.02	0.007	1.00
C <sub>max</sub> (ng.mL <sup>-1</sup> ) per kg of body weight	3.8 ± 2.4	3.6 ± 1.2	0.84	4.2 ± 1.8	4.5 ± 1.9	0.49	0.30	0.01	0.65
T <sub>max</sub> (h)	6.6 ± 2.1	8.2 ± 4.1	0.047	5.2 ± 3.4	7.5 ± 2.5	0.86	0.81	0.41	0.67
T <sub>1/2</sub> (h)	11.3 ± 4.4	9.6 ± 3.1	0.42	14.2 ± 8.5	12.5 ± 4.3	0.89	0.58	0.32	0.99

Table 3. Pharmacokinetic parameters for plasma isoflavones after a single and a 10-d period of daily ingestion of a soy-based cheese, associated with traditional western diets in 11 Caucasian men vs traditional asian diets in 8 Asian men.

	Single ingestion (day 1)			Chronic ingestion (day 10)			p-value of the chronically ingestion effect		p-value of interaction "ethnic group × ingestion "
	Asian volunteers	Caucasian volunteers	p-value of ethnic group and/or dietary context effect	Asian volunteers	Caucasian volunteers	p-value of ethnic group and/or dietary context effect	Asian origin	Caucasian origin	
<i>Daidzein</i>									
AUC <sub>0→∞</sub> (ng.mL <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> ) per kg of body weight	36.1 ± 14.5	24.1 ± 9.0	0.06	49.9 ± 23.8	33.5 ± 11.1	0.049	0.02	0.002	0.22
C <sub>max</sub> (ng.mL <sup>-1</sup> ) per kg of body weight	2.9 ± 1.5	1.7 ± 0.5	0.06	3.2 ± 1.8	2.0 ± 0.5	0.22	0.30	0.08	0.60
T <sub>max</sub> (h)	8.0 ± 1.9	7.8 ± 1.9	0.88	7.8 ± 3.1	6.5 ± 2.7	0.51	0.98	0.14	0.35
T <sub>1/2</sub> (h)	6.7 ± 1.6	7.2 ± 2.4	0.97	10.6 ± 4.4	10.6 ± 4.5	0.86	0.03	0.08	0.79
<i>Genistein</i>									
AUC <sub>0→∞</sub> (ng.mL <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> ) per kg of body weight	55.8 ± 27.0	42.6 ± 16.9	0.20	97.3 ± 51.1	64.0 ± 30.6	0.10	0.02	0.01	0.23
C <sub>max</sub> (ng.mL <sup>-1</sup> ) per kg of body weight	3.8 ± 2.4	2.4 ± 0.7	0.43	4.6 ± 2.1	3.2 ± 1.2	0.13	0.30	0.01	0.66
T <sub>max</sub> (h)	6.6 ± 2.1	6.9 ± 2.3	0.44	6.0 ± 3.9	5.2 ± 1.8	0.87	0.81	0.10	0.39
T <sub>1/2</sub> (h)	11.3 ± 4.4	11.3 ± 3.3	0.97	14.3 ± 7.9	13.6 ± 6.3	0.97	0.58	0.97	0.84

Table 4. Ecological data comparing the plasma concentrations of isoflavones following soy or isoflavone intake according to the ethnic origin of volunteers included in studies reported.

Reference	Ethnos	Gender	Ingested quantity per day	Forms considered	Compounds analysed	Duration	Time between last intake and blood sampling	Plasma concentrations (ng.mL <sup>-1</sup> )
<i>Western subject under controlled soy consumption</i>								
(30)	Cauc	M	131 mg	Eq aglycone	G, D	4 weeks	NP	371
(31)	Cauc	M	240 mg	NP	G, D, E	2 weeks	NP	462
(15)	Cauc	W	>5 mg	Eq aglycone	G, D	> 1 year	NP	146
(15)	Cauc	W	>10 mg	Eq aglycone	G, D	> 1 year	NP	177
(29)	Cauc	W	100 mg	Eq aglycone	G, D, E	1 month	12 h	941
(17)	Cauc	W	100 mg	Eq aglycone	G, D, E	2 months	12 h - 14h	1508
<i>Asian subject under either traditional diet with a controlled or not controlled soy consumption</i>								
(1)	Asi	M	Trad. diet <sup>1</sup>	NP	G, D, E	> 1 year	NP	107
(32)	Asi	M	80 mg	Eq aglycone	G, D	4 weeks	11 h	264
(33)	Asi	W	Trad. diet <sup>1</sup>	NP	G, D	> 1 year	NP	185
(34)	Asi	M&W	37.9 mg	NP	G, D	> 1 year	NP	150
(35)	Asi	M	Trad. diet <sup>1</sup>	NP	G, D, E	> 1 year	3 - 6 h	219
(35)	Asi	W	Trad. Diet <sup>1</sup>	NP	G, D, E	> 1 year	3 - 6 h	212
(36)	Asi	M	Trad. diet <sup>1</sup>	NP	G, D, E	> 1 year	NP	148
<i>Asian subject in occidental environment with a controlled isoflavone consumption</i>								
(37)	Asi	W	23.7 mg	NP	G, D	> 1 year	NP	32*

Cauc: Caucasians; Asi: Asians; M: Men; W: Women; Trad: Traditional; Eq: Equivalent; NP: Not Precised; G: Genistein; D: Daidzein; E: Equol.

<sup>1</sup>. The mean traditional intake is considered to be between 39 mg/day up to 46.5 mg/day in Japan, according to {Kimira, 1998 #43;Arai, 2000 #14;Nagata, 2002 #44}

\* dihydrogenistein and dihydrodaidzein were also assayed in this study but not considered here for homogeneity.

#### **4. L'effet des isoflavones de soja et de l'équol sur la différenciation ostéoblastique : une étude *in vitro*.**

VERGNE S., CHAUMAZ G., ROSIER-SALA C., POTIER M., BENNETAU-PELISSERO C., LIEBERHERR M. AND SAUVANT P. “*Equol-increased alkaline phosphatase activity in MG-63, a human osteosarcoma cell line, is mediated through estrogen receptors*” *en preparation*.

VERGNE S.\*, CHAUMAZ G., ROSIER-SALA C., POTIER M., BENNETAU-PELISSERO C., LIEBERHERR M. AND SAUVANT P. “Equol modulates alkaline phosphatase expression” 2<sup>ème</sup> congrès de la Société Française de Nutrition, Marseille, France, 2005 (communication orale)  
\*orateur.

VERGNE S., CHAUMAZ G., GUILLOU M., POTIER M., ROSIER-SALA C., BENNETAU-PELISSERO C., LIEBERHERR M. AND SAUVANT P. “Soy isoflavones modulate alkaline phosphatase activity in the human bone cells, MG-63” 5<sup>th</sup> PhytoHealth Congress, Norwich, UK, 2005 (poster).

VERGNE S., CARREAU C., CHAUMAZ G., POTIER M., ROSIER-SALA C., BENNETAU-PELISSERO C., LIEBERHERR M. AND SAUVANT P. “The crucial role of estrogen receptor, involved in the alkaline phosphatase modulation by equol, in the human bone cells MG-63” 1<sup>st</sup> International Congress on Food Safety, Budapest, Hungary, 2006 (poster).

VERGNE S., CHAUMAZ G., POTIER M., ROSIER-SALA C., BENNETAU-PELISSERO C., LIEBERHERR M. AND SAUVANT P. “The effects of physiological concentrations of soy isoflavones on bone cell differentiation, an *in vitro* study” 4<sup>th</sup> International Soy and Health Conference, Düsseldorf, Germany, 2006 (poster).

#### 4.1. Contexte de l'étude

Les études de biodisponibilité ont permis d'appréhender la relation entre les doses ingérées et les concentrations circulantes d'isoflavones. Connaissant les concentrations circulantes en isoflavones consécutives à une prise de compléments alimentaires à base de soja, il semblait intéressant d'étudier les effets *in vitro* des isoflavones sur une pathologie particulière ; l'ostéoporose a été choisie. Le modèle étudié est une lignée d'ostéosarcomes humains : les MG-63. Le choix de ce modèle d'ostéoblastes a été orienté par (1) l'origine humaine de cette lignée, référencée par l'ATCC, (2) l'expression constitutive des ERs : la littérature décrit l'expression des protéines ER $\alpha$  66 kDa et ER $\beta$  53 kDa, (3) une originalité dans la mesure où très peu d'articles relatent les effets de composés œstrogéniques sur cette lignée et (4) la praticité des cultures et le coût raisonnable de la lignée.

L'objectif de ce travail était donc d'étudier l'effet des isoflavones sur la différenciation des ostéoblastes. Plusieurs marqueurs permettent de caractériser la différenciation ostéoblastique. Deux marqueurs, impliqués dans un rôle de synthèse osseuse, ont été retenus : l'activité ALP et la minéralisation. De plus, ces marqueurs présentent l'avantage de représenter un stade précoce (l'activité ALP) et un stade tardif de la différenciation ostéoblastique (minéralisation).

#### 4.2. Résumé et intérêt de l'étude

Des études montrent également, sur des cellules primaires osseuses, une expression différentielle des ERs avec le temps. Bien que les ERs soient exprimés constitutivement dans la lignée MG-63, leurs expressions en fonction du temps n'ont pas encore été caractérisées.

Cette étude s'inscrit dans le cadre de la nutrition préventive, c'est pourquoi les doses utilisées dans cette étude *in vitro* encadrent les doses physiologiques. La génistéine, la daïdzéine et l'équol sont testés seuls avec des doses allant de  $10^{-9}$  M à  $10^{-5}$  M sur l'activité ALP. L'E $_2$  à  $10^{-9}$  M est utilisé comme contrôle positif.

L'ALP est un marqueur de la différenciation ostéoblastique précoce. Son activité varie donc avec le temps. La majorité des articles présente l'activité ALP en un temps précis. Or cette activité s'inscrit dans la durée. Il convient donc d'étudier et de présenter les effets des isoflavonoïdes sur l'activité ALP tout au long du processus de différenciation précoce, soit jusqu'à 14 jours de culture selon Beck et collaborateurs (Beck, 2003). C'est là une première originalité de notre travail.

Les isoflavonoïdes, considérés isolément, ont des effets variés sur l'activité ALP. Globalement, la génistéine n'induit pas d'effet particulier sur ce paramètre, à l'exception de la

dose  $10^{-6}$  M au jour 5 de culture. Les fortes concentrations de daïdzéine ( $10^{-5}$  et  $10^{-6}$  M) induisent une augmentation de l'activité ALP aux premiers jours de mesure. L'équol est le composé qui présente les effets les plus intéressants. L'effet significatif de l'induction de l'activité ALP se décale dans le temps avec la décroissance des concentrations d'équol : les fortes doses ( $10^{-5}$  et  $10^{-6}$  M) vont induire l'activité ALP en début de mesure (J5 et J7) alors que les très faibles doses ( $10^{-9}$  M) vont induire cette activité en fin de mesure (J13). Tous les effets significatifs sont inhibés par l'ajout d'ICI 182,780, un antagoniste spécifique des ERs, dans le milieu expérimental. Ces actions passent donc par les ERs.

De façon intéressante, les cinétiques d'expression des ERs montre une décroissance de la quantité d'ER $\alpha$  et une croissance de la quantité d'ER $\beta$  de J5 à J13. Ces données suggèrent donc l'importance d'ER $\beta$  dans l'effet de l'équol sur l'activité ALP, d'autant plus que ce composé présente une affinité et une activité transcriptionnelle plus forte pour ER $\alpha$  que pour ER $\beta$  dans certains modèles d'étude cellulaires (Muthyala *et al.*, 2004).

Enfin cette étude présente les effets de mélange d'isoflavonoïdes sur l'activité ALP chez les cellules MG-63. Les doses d'isoflavonoïdes testées correspondent à des concentrations circulantes dosées chez 14 femmes ménopausées. Ces femmes ménopausées, recrutées dans le cadre d'un essai clinique de tolérabilité des compléments alimentaires à base de soja sur le sein et l'endomètre, consommaient une gélule de Phytosoya<sup>®</sup> 2 fois par jour, *i.e.* 2 fois 16,6 mg d'isoflavones aglycones. Suite à un tel traitement, les concentrations plasmatiques en isoflavones atteignaient probablement un plateau pharmacocinétique, déjà décrit dans la littérature (Mathey *et al.*, 2006). Ainsi des échantillons plasmatiques ont pu être prélevés entre 8 à 12 h après ingestion d'un complément alimentaire. Une autre originalité de ce travail réside donc dans les effets d'un mélange de doses similaires aux concentrations circulantes atteintes chez 14 femmes ménopausées dans le contexte d'une prise de complément alimentaire en isoflavones de soja. Des effets d'interaction entre isoflavonoïdes existent probablement dans la mesure où (1) la génistéine à 0,5  $\mu$ M peut moduler l'effet de la daïdzéine seule à 1  $\mu$ M et (2) l'équol (0,2 et 0,5  $\mu$ M) module l'effet d'un mélange daïdzéine 1  $\mu$ M et génistéine 0,5  $\mu$ M.

#### **4.3. Equol-increased alkaline phosphatase activity is mediated through estrogen receptors in MG-63, a human osteosarcoma cell line**

**Equol-increased alkaline phosphatase activity in MG-63, a human osteosarcoma cell line, is mediated through estrogen receptors**

Sébastien Vergne<sup>1,2</sup>, Gilles Chaumaz<sup>3</sup>, Charlotte Carreau<sup>1</sup>, Mylène Potier<sup>1</sup>, Christelle Rosier-Sala<sup>2</sup>, Svitlana Poix-Shinkaruk<sup>1</sup>, Catherine Bennetau-Pelissero<sup>1</sup>, Michèle Lieberherr<sup>3</sup>, Patrick Sauvant<sup>1\*</sup>.

<sup>1</sup>ENITA, Unité Micronutriments, Reproduction, Santé (UMRS), Bordeaux, France.

<sup>2</sup>Arkopharma, Laboratoires Pharmaceutiques, Carros, France. <sup>3</sup>INRA, Laboratoire Nutrition et Sécurité Alimentaire (LNSA), Jouy-en-Josas, France.

\* Corresponding author: Dr. Patrick Sauvant, ENITA de Bordeaux, 1, cours du Général de Gaulle, CS 40201, 33175 Gradignan Cedex, France. E-mail: [p-sauvant@enitab.fr](mailto:p-sauvant@enitab.fr). Tel: + 33 (0)5 57 35 07 54. Fax: + 33 (0)5 57 35 07 59

Sébastien Vergne is the recipient of a PhD fellowship (CIFRE N°856/2003) from Arkopharma, Pharmaceutical Laboratories and National Association of Technical Research, Research Ministry of France.

---

**Abstract**

*Background:* The estrogen deficiency that follows menopause may play a primary role in osteoporosis, an increasingly prevalent disorder throughout the world. Soy isoflavones and their metabolite equol are phenolic compounds which have chemical structure similar to that of 17 $\beta$ -estradiol.

*Aim of the study:* We have therefore investigated the effects of physiological concentrations of IF on the alkaline phosphatase (ALP) activity of the human osteoblast cell line, MG-63. The ALP is a marker of the early osteoblast differentiation and its increased activity may be an important step in the mineralization process. The content of estrogen receptors (ERs) was also studied.

*Results:* Chronical incubation with IF did not affect cell proliferation. Genistein had no effect on ALP activity, whereas high ( $10^{-5}$  and  $10^{-6}$  M) concentrations of daidzein increased ALP activity (from 30 to 50 % compared with vehicle,  $p < 0.05$ ). High ( $10^{-5}$  and  $10^{-6}$  M) concentrations of equol increased ALP activity from day 5 to day 9 whereas low ( $10^{-7}$  to  $10^{-9}$  nM) concentrations stimulated ALP activity from day 9 to day 13. These effects are mediated through ERs. Finally, ER $\alpha$  decreased during differentiation of MG-63, although ER $\beta$  increased.

*Discussion:* Physiological concentrations of IF increased the ALP activity in the human bone cells MG-63 showing an effect on the early stage of osteoblast differentiation. These experiments also showed that equol is the most potent activator of ALP activity. In this respect, it could be hypothesized that producing equol is of great interest in osteoporosis prevention.



## Introduction

Nowadays osteoporosis is a major and growing public health problem in developed countries, due to the increase in the lifespan of the population. When bone resorption outpaces bone formation at menopause, the estrogen deficiency makes osteoporosis more severe (Rickard et al., 1999). Although estrogen replacement therapy has been the main therapy to prevent and treat osteoporosis, there are concerns about its safety (Beral, 2003; Fournier et al., 2005; Rossouw et al., 2002). Recent studies have focused on the development of estrogen-related compounds that selectively affect bone metabolism without exhibiting adverse effects. In this regard, soy isoflavones and their metabolites are of particular interest. A high intake of soy-based food, which provides isoflavones, has been associated with the decreased incidence of osteoporosis in Asian women (Adlercreutz, 1998), and some clinical trials suggest that soy protein intake is associated with a higher bone mineral density (Ho et al., 2001; Horiuchi et al., 2000; Mei et al., 2001). However, some data do not support a positive association between bone mineral density and soy isoflavone intake or serum isoflavone concentrations (Arjmandi et al., 2005; Nagata et al., 2002). Setchell *et al.* hypothesized that equol, a metabolite of daidzein resulting from intestinal bacterial metabolism, could be responsible for these discrepancies (Setchell et al., 2002). But, few data are available on the effects of equol on bone formation *in vitro*.

The soy-derived isoflavonoids have similar structure to estradiol (Miksicek, 1995), and are capable of binding to the two known estrogen receptors ER $\alpha$  and ER $\beta$  (Kuiper et al., 1997; Kuiper et al., 1998). Although the affinity of isoflavonoids for ER $\alpha$  and ER $\beta$  is lower than that of 17- $\beta$  estradiol, their relative binding affinity is greater for ER $\beta$  than for ER $\alpha$  (Barkhem et al., 1998; Kuiper et al., 1998). Osteoblasts of various origins co-express both ER subtypes, and their distribution vary according to the stage of the osteoblast differentiation (Arts et al., 1997; Onoe et al., 1997). The greatly increased expression of ER $\beta$  during bone mineralization is particularly relevant to the potential effects of isoflavonoids because compounds such as equol show a much higher affinity for ER $\beta$  than for ER $\alpha$  (Kuiper et al., 1998; Morito et al., 2001).

Bone remodeling consists of two phases: bone resorption by osteoclasts followed by bone formation by osteoblasts. Bone formation progresses through distinctive developmental stages, including mitogenic growth of stromal-osteoblast precursor cells, osteoblast differentiation, and osteoblast maturation, whose endpoint is the mineralization of the bone matrix. The osteoblast differentiation is a complex process of sequential expression of marker proteins such as alkaline phosphatase (ALP). ALP has been involved in the mineralization of

extracellular bone matrix, possibly through the regulation of extracellular concentrations of phospho-compounds. The enzyme is localized in the plasma membrane through a phosphatidyl-glycolipid anchor and catalyses the hydrolysis of monophosphate esters (Torii et al., 1996). ALP activity and protein synthesis are increased by isoflavones, mainly daidzein and genistein, in various types of osteoblasts (Setchell and Lydeking-Olsen, 2003). But, no data are available on the *in vitro* effects of equol in human osteoblasts.

The MG-63 cells are widely used to study the effects of hormones, estrogens and estrogen-related compounds (Morris et al., 2006; Prouillet et al., 2004). We have therefore examined the effects of equol, daidzein and genistein, alone or in association, on the human osteosarcoma cell line MG-63. We also investigate the content and role of estrogen receptors (ER $\alpha$  and ER $\beta$ ) during the culture of MG-63.

## Material and Methods

### Materials

Human osteosarcoma MG-63 cells were obtained from ATCC (CRL-1427; LOT # 1919258). Phenol red-free Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), penicillin, streptomycin, trypsin-EDTA, L-glutamine, Foetal Bovine Serum (FBS), mouse monoclonal anti- $\beta$ -actin, peroxydase-conjugated rabbit anti-mouse IgG, *para*-nitrophenyl phosphate and NBT-BCIP (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate - NitroBlue Tetrazolium),  $17\beta$ -estradiol (E2), dimethylsulfoxide (DMSO) and all other chemicals were purchased from Sigma-Aldrich (St Quentin Fallavier, France). *Para*-nitrophenyl phosphate and NBT-BCIP (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate / NitroBlue Tetrazolium) were used as ALP substrate for ALP activity assessment and immunoblotting revelation, respectively. Molecular size standards for western blot were from InVitrogen (Cergy Pontoise, France). Rabbit polyclonal anti-estrogen receptor ER $\alpha$  and ER $\beta$  antibodies, peroxydase-conjugated goat anti-rabbit IgG, alkaline phosphatase-conjugated goat anti-rabbit IgG were obtained from Santa Cruz Biotechnologies, Inc. (Tebu, Le Perray en Yvelines, France). ICI 182,780 ( $7\alpha$ -[9-(4,4,5,5,5,-pentafluoropentyl)sulphonyl]-estra-1,3,5(10)-triene-3,17 $\beta$ -diol) was from Tocris (Fischer Bioblock Scientific, Illrich, France).

### Isoflavonoids

Genistein, daidzein and equol were synthesized in the Institute of Molecular Sciences, Bordeaux, France (UMR 5255 CNRS). Purity of these compounds was assessed with a Thin Layer Chromatography coupled to Nuclear Magnetic Resonance, and was found to be up to 98%. Genistein, daidzein, equol were dissolved in DMSO to obtain stock solutions of  $2 \cdot 10^{-2}$ ,  $2 \cdot 10^{-3}$ ,  $2 \cdot 10^{-4}$ ,  $2 \cdot 10^{-5}$  and  $2 \cdot 10^{-6}$  M. The final concentration of the vehicle in the medium was 0,05%, and the vehicle concentration had no toxic effect assessed by methyl tetrazolium (MTT) (Denizot and Lang, 1986) and no effect on any parameters tested (data not shown).

### Cell Culture

MG-63 cells were cultured in phenol red-free DMEM containing 10% charcoal-stripped FBS, 50 IU/ml penicillin, 50  $\mu$ g/ml streptomycin and 2 mM L-glutamine, at 37°C in 5% CO<sub>2</sub> / 95% air condition, until confluence. They were harvested with trypsin-EDTA and seeded at appropriate density. During culture or experiments, cell culture mediums were removed every 4-5 days in new culture mediums. DMEM devoid of phenol red was used, because of the previously reported estrogen-like activity of the latter compound (Berthois et al., 1986).

### Isoflavonoid concentrations

Isoflavonoids (daidzein, genistein and equol) were tested alone or in association. The range of concentrations was similar to the plasma concentrations already described in literature (Rowland et al., 2003; Vergne et al., 2007). For equol, the concentrations were chosen from data originating from clinical studies. Blood samples of 14 women included in a long-term clinical study were collected between 8 and 12 h following a 4-month daily consumption of soy-based supplements containing 35 mg of glycosilated isoflavones (*i.e.* 16.6 mg of isoflavones, equivalent aglycone). Isoflavonoid concentrations in blood samples were measured by the ELISA method as previously described (Bennetau-Pelissero et al., 2003; Bennetau-Pelissero et al., 2000), based on homologous competition tests, specific to each isoflavonoids. The mean concentrations of isoflavonoids found in blood allowed to discriminate three groups: no, low and high equol producers.

#### ***Cell proliferation and alkaline phosphatase activity***

Cells were seeded at 6,000 cells/well in 96-well plates, and cultured for 14 days in phenol red-free DMEM plus 10% charcoal-stripped FBS containing 1 nM E2, genistein, daidzein, equol, or the vehicle. To demonstrate the involvement of ERs in the pathway actions of E2, genistein daidzein and equol, ICI 182,780 at 1  $\mu$ M was added. Cell growth was assayed by staining the cells with methylene blue, as previously described (Katzburg et al., 1999). The optical density (OD) was read at 620 nm using a plate reader (MRX II, Dynex, Issy-les-Moulineaux, France). Alkaline phosphatase (ALP) activity was assayed as previously described (Katzburg et al., 1999). Briefly, ALP activity was assayed by a spectrophotometric method using *para*-nitrophenyl phosphate as substrate, and was normalized with the cell proliferation. Currently, the specific ALP activity is expressed as fmoles of paranitrophenyl phosphate hydrolyzed/min/cell.

#### ***Immunoblot analysis***

After treatment, cells were harvested in phosphate buffered saline (PBS) by scrapping and then centrifuged. The pellet was lysed in ice-cold buffer containing 20 mM Tris-HCl, pH 7.4, 140 mM NaCl, 3 mM EDTA, 10% glycerol, 10 mM Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>, 10 mM NaF, 2 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 10  $\mu$ g/ml aprotinin and 10  $\mu$ g/ml leupeptin, 50  $\mu$ M PMSF, 1.5 mM benzamidine and 1% Triton X-100. Whole cell proteins were extracted and boiled at 100°C for 2 min in Laemli buffer (bromophenol buffer 0.1%,  $\beta$ -mercapto-ethanol 5%, SDS (sodium dodecyl sulphate) 2.3%, glycerol 10%, Tris base 62.5 mM) and submitted to a 10% SDS- polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) in 25 mM tris-base, pH 8.3, 192 mM glycine and 0.1 % SDS. Following the electrophoresis, transfer of proteins in the same buffer with 20% ethanol was done onto a nitrocellulose membrane (Amersham, Saclay, France). The free sites on the

membrane were blocked by immersion in tris buffer saline (TBS) containing 4% of skim milk during 2 h at room temperature. Membranes were incubated overnight at 4°C with the appropriate antibody. Unbound antibodies were removed by three washes with skim milk/TBS plus 0.1% Tween 20. Membranes were incubated for 1 h at room temperature with peroxidase- or alkaline phosphatase-conjugated goat anti-rabbit IgG, washed three times with TBS plus 0.1 % Tween 20. For peroxidase-conjugated secondary antibody, immunoreactive proteins were detected by chemiluminescence using luminol reagent kit (Santa Cruz-Tebu, Le Perray en Yvelines, France) and membranes were exposed to XR films (Amersham, Saclay, France). For alkaline phosphatase-conjugated secondary antibody, NBT-BCIP was used as a substrate. Films or membranes were analysed by densitometry using ImageJ software, version 1.32j (NIH, USA)

### ***Statistical analysis***

The data for specific ALP activity were analyzed by two-way (treatment x time) ANOVA. Treatment pairs were compared using Student's *t*-test. The value n represents n different experiments, and the data are expressed as means  $\pm$  SEM. Differences were considered significant at  $p < 0.05$ .

The data resulting for the image analysis of the western immunoblotting were analyzed using a one-way ANOVA, associated with a Tukey-Test. Differences were considered significant at  $p < 0.05$ .

## Results

### *Cell proliferation*

The number of control cells incubated with vehicle significantly increased at day 9. Chronic incubation with 1 nM 17 $\beta$ -estradiol did not affect MG-63 proliferation (Fig. 1.A.). The range of concentrations from 1 nM to 10  $\mu$ M of daidzein, equol, genistein or mixed isoflavonoids did not affect MG-63 proliferation (data not shown). No toxic effects of 17 $\beta$ -estradiol, isoflavonoids or ICI 182,780 was shown according to the MTT (data not shown).

### *Effects of various concentrations of 17 $\beta$ -estradiol and isoflavonoids on the specific activity of ALP*

The endogenous steroid 17 $\beta$ -estradiol increased the ALP activity (~ 140 %) in MG-63 from day 5 to day 13 (Fig. 1.B.). These effects are inhibited by ICI 182,780, a specific antagonist of both ERs. High (10  $\mu$ M and 1  $\mu$ M) concentrations of daidzein significantly increased ALP activity the first days of culture whereas low concentrations (100 nM to 1 nM) had no effect (Fig. 2.A.). The increases were  $+ 25.4 \pm 2.3$  % and  $+ 32.8 \pm 7.4$  % for  $10^{-5}$  M at days 5 and 7, respectively, and  $+ 31.0 \pm 7.2$  % for  $10^{-6}$  M at day 7, as compared to the vehicle,  $p < 0.05$  (Fig. 2.A.). High (10  $\mu$ M and 1  $\mu$ M) concentrations of equol increased ALP activity from day 5 to day 9 whereas low (100 nM to 1 nM) concentrations stimulated ALP activity from day 9 to day 13 (Fig. 2.B.). ALP activity was increased by 1 nM 17 $\beta$ -estradiol from day 5 to day 13. All the effects of isoflavonoids on the increase in ALP activity were abolished when 1  $\mu$ M ICI 182,780 was added 4 h before the compound (data not shown), showing that the isoflavonoids act *via* estrogen receptors. Concerning genistein, only 1  $\mu$ M increased ALP activity at day 5 ( $25.1 \pm 2.8$  % vs vehicle,  $p < 0.05$ ) (Fig. 2.C.).

### *Effects of mixed isoflavonoids on the specific activity of ALP*

It has been shown that the metabolism of isoflavones, particularly daidzein, in humans fed standardized extracts of soy depends on their ability to produce equol (Vergne et al., 2007). Thus, we studied various associations of isoflavones on ALP activity (Fig. 3). Daidzein and genistein mixtures, which represent equol non producers, increased significantly the ALP activity at day 5 ( $27.6 \pm 3.9$  % vs vehicle,  $p < 0.05$ ). The first mixture, daidzein (1  $\mu$ M) plus genistein (0.5  $\mu$ M), increased the ALP activity at day 5 similarly to daidzein treatment alone. This was not the case at day 7 suggesting that genistein could inhibit the response of daidzein alone on ALP activity. When equol (0.2  $\mu$ M) was added to the first mixture, the increase of

ALP activity was more important and took place at days 9 and 11. Furthermore, when equol 0.5  $\mu$ M was added, these effects took place at days 7 and 9.

***Basal ER $\alpha$  and ER $\beta$  content of MG-63 cells***

ER $\alpha$  content was the highest on day 5, then progressively decreased until day 13 in MG-63 cells (Fig. 4). Conversely, ER $\beta$  content, which was the lowest on day 5 and significantly increased to reach a maximum on day 13. The average induction of ER $\beta$  was  $8.91 \pm 0.26$  fold (n = 3 cultures) between days 5 and 13.

## Discussion

This study demonstrated in MG-63 cells that while genistein did not present any effect on ALP activity, daidzein and equol induced the ALP activity of MG-63 cells. Furthermore, equol was able to potentiate daidzein plus genistein effects on this bone differentiation marker. Finally ER $\alpha$  content decreased as a function of time, while ER $\beta$  increased.

Soy-rich diets may reduce the incidence of osteoporosis. Several research works have focused on the potential of isoflavones, genistein and daidzein, to induce the expression of differentiation markers by osteoblasts, such as interleukin-6, bone morphogenetic protein or osteoprotegerin (Chen et al., 2002; De Wilde et al., 2004; Jia et al., 2003). However the effects of equol, an intestinal microflora metabolite of daidzein, on osteoblast marker differentiation have not yet been studied. The osteoblast phenotype is acquired in two stages. There is an initial period of proliferation and biosynthesis of the extracellular matrix, followed by a period of cell differentiation: the matrix matures and specific proteins associated with the bone cell phenotype, such as ALP, are detected (Stein et al., 1990). The present study is the first one to show the time- and concentration-dependant effect of equol on the ALP specific activity in MG-63 cell line. As a comparison, the effects of 17 $\beta$ -estradiol, daidzein and genistein on ALP activity have also been studied.

In our study, isoflavonoids and 17 $\beta$ -estradiol did not have any effect on cell toxicity or on cell proliferation. However, previous works on osteoblast proliferation have shown the ability of 17 $\beta$ -estradiol and isoflavones to enhance proliferation (Disilvio et al., 2006; Kim et al., 2005; Sugimoto and Yamaguchi, 2000). In the present study, cell proliferation was assessed from day 5 of culture when second stage of osteoblast differentiation has already started: cell confluency was reached and ALP was expressed. During this stage, osteoblast proliferation reach progressively a steady-state. It may be the reason why no increase in cell proliferation was observed when the tested compounds were added to MG-63.

An increase of ALP activity by 17 $\beta$ -estradiol, daidzein and equol is evident when data are considered on a per cell basis. In the current study, we demonstrated that a low concentration (1 nM) of the isoflavonoid, equol, is able to increase the ALP activity. This effect of equol on ALP activity is mediated through ERs since ICI 182,780, a specific antagonist of ERs completely abolished the equol-induced ALP increase. De Wilde *et al.* established first, in trabecular osteoblasts isolated from piglets, the effect of such a low concentration of isoflavonoid (daidzein 1 nM) on early stage markers of osteoblast differentiation, such as ALP activity (De Wilde et al., 2004). Very low concentrations of equol increased ALP activity at day 13 while high concentrations were needed to increase



ALP activity at days 5 and 7. We hypothesize that this dual effect of equol on ALP activity may result from the differential expression of ERs. For the first time we show that in MG-63, ER $\alpha$  content decreased, while ER $\beta$  content increased with time even though cell number is similar (day 9 to Day 13). Similar results regarding the time dependant changes of ERs contents were shown in osteoblasts (Arts et al., 1997; De Wilde et al., 2004). Equol possess a high binding affinity for ERs and is able to increase transcriptional activity through ER $\beta$  in HEC-1 cells co-transfected with both ERs (Muthyala et al., 2004). Consequently, we hypothesized that the effects of equol at low concentrations are mediated preferentially through ER $\beta$ . Our finding that ER $\beta$  content increased with osteoblast differentiation reinforce this hypothesis.

Moreover, different contents of ERs as a function of cell stage *i.e.* proliferation or differentiation in MG-63 could involve selective and/or different recruitment of transcription co-factors. Consequently, cell context have to be taken into account due to the specific expression of co-factors that trigger both ERs mediated transcription pathways (Couse and Korach, 1999). It has been suggested that the promoter of human ALP gene contain an AP-1 binding site (Peverali et al., 2001). It is thus, possible to assume that 17 $\beta$ -estradiol-, equol- or daidzein-induced activation of ALP gene expression are mediated by ER through AP-1 in osteoblasts. Further molecular studies are needed to elucidate the precise mechanisms of actions of isoflavonoids on ALP induced gene expression.

Our data indicated no effect of genistein on the ALP activity, except for 1  $\mu$ M at day 5. This lack of effect on ALP activity could be explained by the well-known inhibitory effect of genistein on tyrosine kinases (Akiyama et al., 1987). However, our results are in agreement with a recent work of Morris *et al.*, demonstrating that there was no effect of genistein on ALP activity for concentrations lower than 2 mM (Morris et al., 2006).

We also measured ALP activity induced by three different mixtures of isoflavonoids in MG-63 cells. These mixtures mimicked physiological concentrations of isoflavonoids measured in women after consumption of a soy-based supplement for several months. When equol (0.2 and 0.5  $\mu$ M) was added to daidzein plus genistein mixture, the increase of ALP activity was more important. Equol is a chiral molecule that exists as two enantiomers R-equol and S-equol. Even though, Setchell *et al.* described recently that Human can produce only S-equol (Setchell et al., 2005) it has been confirmed that both enantiomers induce ER $\alpha$  and ER $\beta$  transcriptionnal activities, therefore we choose to use racemic equol throughout our study. Our findings with these different isoflavonoids mixtures led us to conclude that equol modulates osteoblast differentiation in a different fashion as a function of time and presence

or absence of other isoflavonoids. This could be due to 1) direct interactions with the other isoflavonoids 2) to direct competition for binding for ERs between the different compounds 3) involvement of selective and/or different transcription co-factors due to cellular context.

Lastly, activation of ALP measured *in vitro* suggests subsequent formation of mineralized extracellular matrix (Torii et al., 1996). This could explain partly the beneficial effect of equol on the bone mineral density improvement reported in the few clinical or animal studies highlighting the importance of this compound (Fujioka et al., 2004; Mathey et al., 2007; Setchell et al., 2002). In this respect, it could be hypothesized that production of equol is of great interest in osteoporosis prevention, but further clinical studies are needed, with special attention on population of equol or non-equol producers.

---

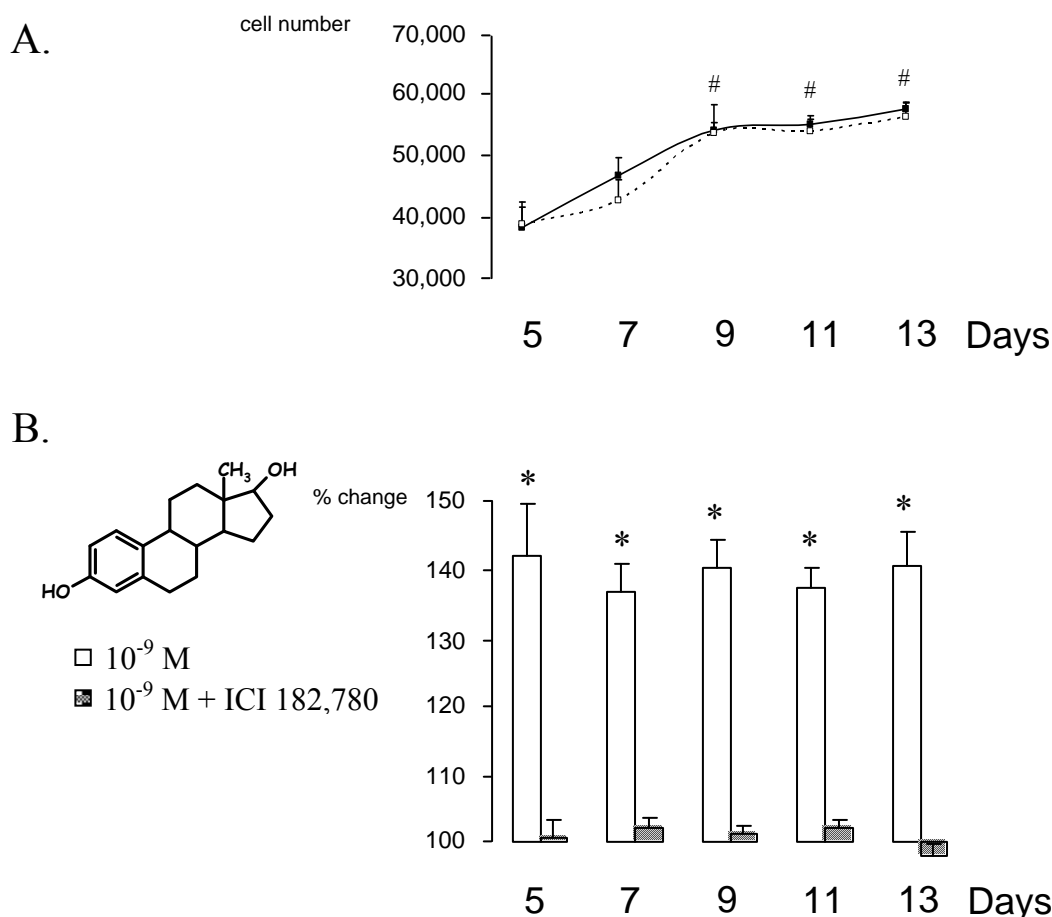
**References**

- Adlercreutz, H. 1998. Epidemiology of phytoestrogens. *Baillieres Clin Endocrinol Metab.* 12:605-23.
- Akiyama, T., J. Ishida, S. Nakagawa, H. Ogawara, S. Watanabe, N. Itoh, M. Shibuya, and Y. Fukami. 1987. Genistein, a specific inhibitor of tyrosine-specific protein kinases. *J Biol Chem.* 262:5592-5.
- Arjmandi, B.H., E.A. Lucas, D.A. Khalil, L. Devareddy, B.J. Smith, J. McDonald, A.B. Arquitt, M.E. Payton, and C. Mason. 2005. One year soy protein supplementation has positive effects on bone formation markers but not bone density in postmenopausal women. *Nutr J.* 4:8.
- Arts, J., G.G. Kuiper, J.M. Janssen, J.A. Gustafsson, C.W. Lowik, H.A. Pols, and J.P. van Leeuwen. 1997. Differential expression of estrogen receptors alpha and beta mRNA during differentiation of human osteoblast SV-HFO cells. *Endocrinology.* 138:5067-70.
- Barkhem, T., B. Carlsson, Y. Nilsson, E. Enmark, J. Gustafsson, and S. Nilsson. 1998. Differential response of estrogen receptor alpha and estrogen receptor beta to partial estrogen agonists/antagonists. *Mol Pharmacol.* 54:105-12.
- Bennetau-Pelissero, C., B. Arnal-Schnebelen, V. Lamothe, P. Sauvart, J.L. Sagne, M.A. Verbruggen, J. Mathey, and O. Laviolle. 2003. ELISA as a new method to measure genistein and daidzein in food and human fluids. *Food Chemistry.* 82:645-658.
- Bennetau-Pelissero, C., C. Le Houerou, V. Lamothe, F. Le Menn, P. Babin, and B. Bennetau. 2000. Synthesis of haptens and conjugates for ELISAs of phytoestrogens. Development of the immunological tests. *J Agric Food Chem.* 48:305-11.
- Beral, V. 2003. Breast cancer and hormone-replacement therapy in the Million Women Study. *Lancet.* 362:419-27.
- Berthois, Y., J.A. Katzenellenbogen, and B.S. Katzenellenbogen. 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.* 83:2496-500.
- Chen, X.W., S.C. Garner, and J.J. Anderson. 2002. Isoflavones regulate interleukin-6 and osteoprotegerin synthesis during osteoblast cell differentiation via an estrogen-receptor-dependent pathway. *Biochem Biophys Res Commun.* 295:417-22.
- Couse, J.F., and K.S. Korach. 1999. Estrogen receptor null mice: what have we learned and where will they lead us? *Endocr Rev.* 20:358-417.

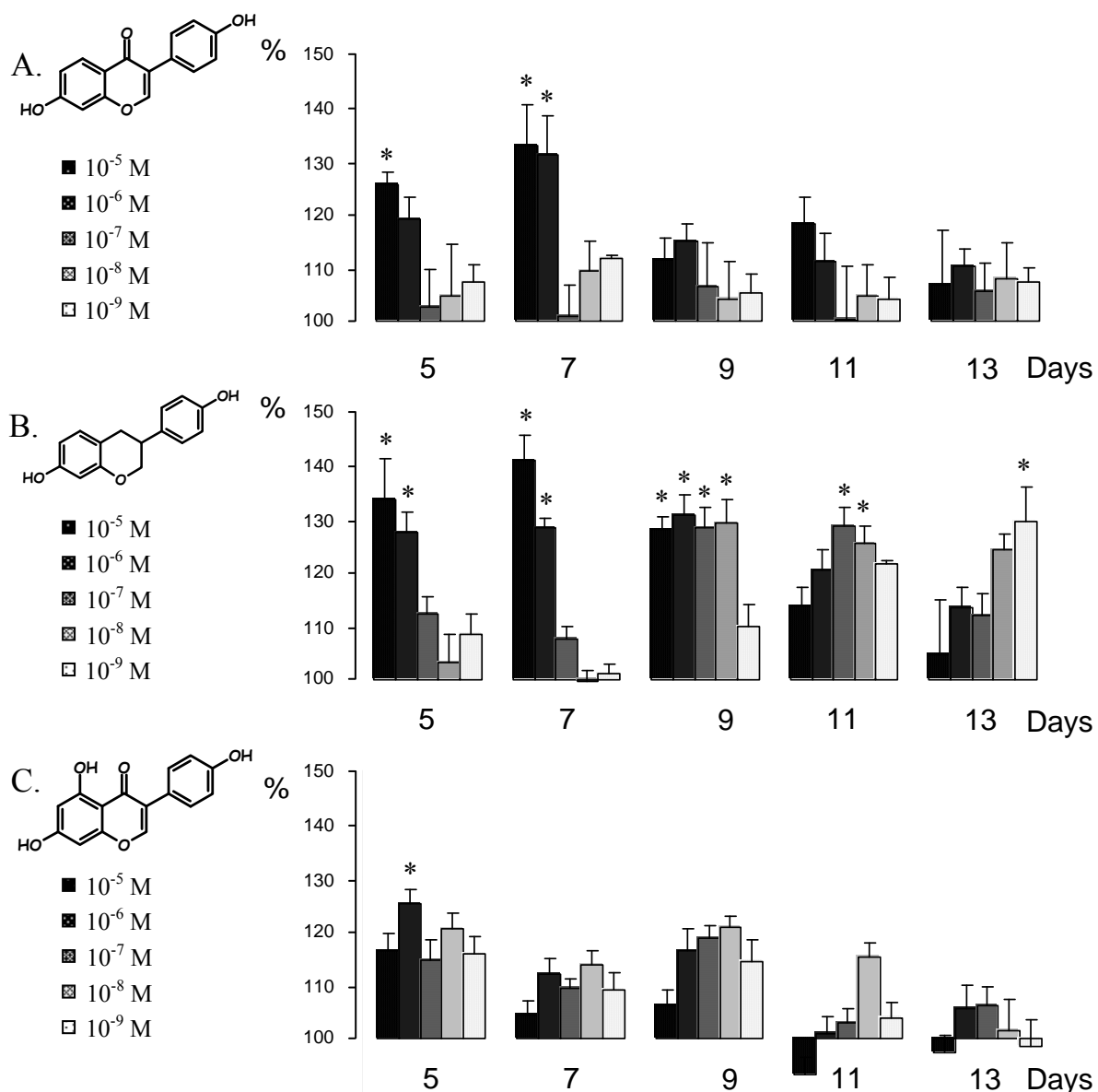
- De Wilde, A., M. Lieberherr, C. Colin, and A. Pointillart. 2004. A low dose of daidzein acts as an ERbeta-selective agonist in trabecular osteoblasts of young female piglets. *J Cell Physiol.* 200:253-62.
- Denizot, F., and R. Lang. 1986. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *J Immunol Methods.* 89:271-7.
- Disilvio, L., J. Jameson, Z. Gamie, P.V. Giannoudis, and E. Tsiridis. 2006. In vitro evaluation of the direct effect of estradiol on human osteoblasts (HOB) and human mesenchymal stem cells (h-MSCs). *Injury.* 37:S33-S42.
- Fournier, A., F. Berrino, E. Riboli, V. Avenel, and F. Clavel-Chapelon. 2005. Breast cancer risk in relation to different types of hormone replacement therapy in the E3N-EPIC cohort. *Int J Cancer.* 114:448-54.
- Fujioka, M., M. Uehara, J. Wu, H. Adlercreutz, K. Suzuki, K. Kanazawa, K. Takeda, K. Yamada, and Y. Ishimi. 2004. Equol, a metabolite of daidzein, inhibits bone loss in ovariectomized mice. *J Nutr.* 134:2623-7.
- Ho, S.C., S.G. Chan, Q. Yi, E. Wong, and P.C. Leung. 2001. Soy intake and the maintenance of peak bone mass in Hong Kong Chinese women. *J Bone Miner Res.* 16:1363-9.
- Horiuchi, T., T. Onouchi, M. Takahashi, H. Ito, and H. Orimo. 2000. Effect of soy protein on bone metabolism in postmenopausal Japanese women. *Osteoporos Int.* 11:721-4.
- Jia, T.L., H.Z. Wang, L.P. Xie, X.Y. Wang, and R.Q. Zhang. 2003. Daidzein enhances osteoblast growth that may be mediated by increased bone morphogenetic protein (BMP) production. *Biochem Pharmacol.* 65:709-15.
- Katzburg, S., M. Lieberherr, A. Ornoy, B.Y. Klein, D. Hendel, and D. Somjen. 1999. Isolation and hormonal responsiveness of primary cultures of human bone-derived cells: gender and age differences. *Bone.* 25:667-73.
- Kim, J., S.J. Um, J. Woo, J.Y. Kim, H.A. Kim, K.H. Jang, S.A. Kang, B.O. Lim, I. Kang, R.W. Choue, and Y. Cho. 2005. Comparative effect of seeds of *Rhynchosia volubilis* and soybean on MG-63 human osteoblastic cell proliferation and estrogenicity. *Life Sci.* 78:30-40.
- Kuiper, G.G., B. Carlsson, K. Grandien, E. Enmark, J. Haggblad, S. Nilsson, and J.A. Gustafsson. 1997. Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors alpha and beta. *Endocrinology.* 138:863-70.

- Kuiper, G.G., J.G. Lemmen, B. Carlsson, J.C. Corton, S.H. Safe, P.T. van der Saag, B. van der Burg, and J.A. Gustafsson. 1998. Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor beta. *Endocrinology*. 139:4252-63.
- Mathey, J., J. Mardon, N. Fokialakis, C. Puel, S. Kati-Coulibaly, S. Mitakou, C. Bennetau-Pelissero, V. Lamothe, M.J. Davicco, P. Lebecque, M.N. Horcajada, and V. Coxam. 2007. Modulation of soy isoflavones bioavailability and subsequent effects on bone health in ovariectomized rats: the case for equol. *Osteoporos Int*. 18:671-9.
- Mei, J., S.S. Yeung, and A.W. Kung. 2001. High dietary phytoestrogen intake is associated with higher bone mineral density in postmenopausal but not premenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab*. 86:5217-21.
- Miksicek, R.J. 1995. Estrogenic flavonoids: structural requirements for biological activity. *Proc Soc Exp Biol Med*. 208:44-50.
- Morito, K., T. Hirose, J. Kinjo, T. Hirakawa, M. Okawa, T. Nohara, S. Ogawa, S. Inoue, M. Muramatsu, and Y. Masamune. 2001. Interaction of phytoestrogens with estrogen receptors alpha and beta. *Biol Pharm Bull*. 24:351-6.
- Morris, C., J. Thorpe, L. Ambrosio, and M. Santin. 2006. The soybean isoflavone genistein induces differentiation of MG63 human osteosarcoma osteoblasts. *J Nutr*. 136:1166-70.
- Muthyala, R.S., Y.H. Ju, S. Sheng, L.D. Williams, D.R. Doerge, B.S. Katzenellenbogen, W.G. Helferich, and J.A. Katzenellenbogen. 2004. Equol, a natural estrogenic metabolite from soy isoflavones: convenient preparation and resolution of R- and S-equols and their differing binding and biological activity through estrogen receptors alpha and beta. *Bioorg Med Chem*. 12:1559-67.
- Nagata, C., H. Shimizu, R. Takami, M. Hayashi, N. Takeda, and K. Yasuda. 2002. Soy product intake and serum isoflavonoid and estradiol concentrations in relation to bone mineral density in postmenopausal Japanese women. *Osteoporos Int*. 13:200-4.
- Onoe, Y., C. Miyaura, H. Ohta, S. Nozawa, and T. Suda. 1997. Expression of estrogen receptor beta in rat bone. *Endocrinology*. 138:4509-12.
- Peverali, F.A., E.K. Basdra, and A.G. Papavassiliou. 2001. Stretch-mediated activation of selective MAPK subtypes and potentiation of AP-1 binding in human osteoblastic cells. *Mol Med*. 7:68-78.
- Prouillet, C., J.C. Maziere, C. Maziere, A. Wattel, M. Brazier, and S. Kamel. 2004. Stimulatory effect of naturally occurring flavonols quercetin and kaempferol on

- alkaline phosphatase activity in MG-63 human osteoblasts through ERK and estrogen receptor pathway. *Biochem Pharmacol.* 67:1307-13.
- Rickard, D.J., M. Subramaniam, and T.C. Spelsberg. 1999. Molecular and cellular mechanisms of estrogen action on the skeleton. *J Cell Biochem. Suppl* 32-33:123-32.
- Rossouw, J.E., G.L. Anderson, R.L. Prentice, A.Z. LaCroix, C. Kooperberg, M.L. Stefanick, R.D. Jackson, S.A. Beresford, B.V. Howard, K.C. Johnson, J.M. Kotchen, and J. Ockene. 2002. Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results From the Women's Health Initiative randomized controlled trial. *Jama.* 288:321-33.
- Rowland, I., M. Faughnan, L. Hoey, K. Wahala, G. Williamson, and A. Cassidy. 2003. Bioavailability of phyto-oestrogens. *Br J Nutr.* 89 Suppl 1:S45-58.
- Setchell, K.D., N.M. Brown, and E. Lydeking-Olsen. 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., C. Clerici, E.D. Lephart, S.J. Cole, C. Heenan, D. Castellani, B.E. Wolfe, L. Nechemias-Zimmer, N.M. Brown, T.D. Lund, R.J. Handa, and J.E. Heubi. 2005. Sequol, a potent ligand for estrogen receptor beta, is the exclusive enantiomeric form of the soy isoflavone metabolite produced by human intestinal bacterial flora. *Am J Clin Nutr.* 81:1072-9.
- Setchell, K.D., and E. Lydeking-Olsen. 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.
- Stein, G.S., J.B. Lian, and T.A. Owen. 1990. Relationship of cell growth to the regulation of tissue-specific gene expression during osteoblast differentiation. *Faseb J.* 4:3111-23.
- Sugimoto, E., and M. Yamaguchi. 2000. Stimulatory effect of Daidzein in osteoblastic MC3T3-E1 cells. *Biochem Pharmacol.* 59:471-5.
- Torii, Y., K. Hitomi, Y. Yamagishi, and N. Tsukagoshi. 1996. Demonstration of alkaline phosphatase participation in the mineralization of osteoblasts by antisense RNA approach. *Cell Biol Int.* 20:459-64.
- Vergne, S., K. Titier, V. Bernard, J. Asselineau, M. Durand, V. Lamothe, M. Potier, P. Perez, J. Demotes-Mainard, P. Chantre, N. Moore, C. Bennetau-Pelissero, and P. Sauvant. 2007. Bioavailability and urinary excretion of isoflavones in humans: Effects of soy-based supplements formulation and equol production. *J Pharm Biomed Anal.* 43:1488-94.

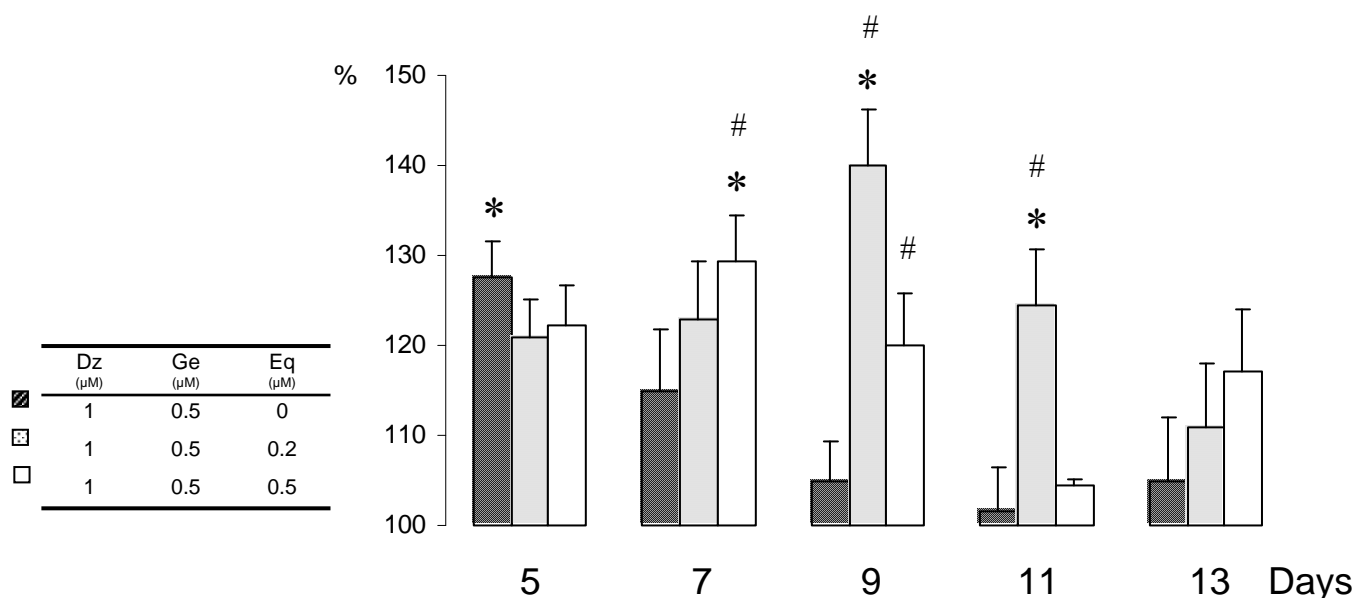


Figures 1. Effects of estradiol on MG-63 proliferation (A). Cells were cultured for 13 days with  $10^{-9}$  M estradiol (dotted line) or the vehicle (black line) and were counted on days 5, 7, 9, 11 and 13. The values are mean  $\pm$  SEM, n=3. Data were analyzed by two-way (treatment x time) ANOVA. #  $p < 0.05$ , significant time effect in treated and untreated cells *versus* treated and untreated cells at day 5. The effects of estradiol  $10^{-9}$  M and estradiol  $10^{-9}$  M plus  $10^{-6}$  M ICI182,780 on ALP activity was assayed on the same days (B). The values are expressed as a mean percentage of increase from control values  $\pm$  SEM, n=3. Data were analyzed by Student's test. \* $p < 0.05$ , significant differences between treated cells and vehicle controls.

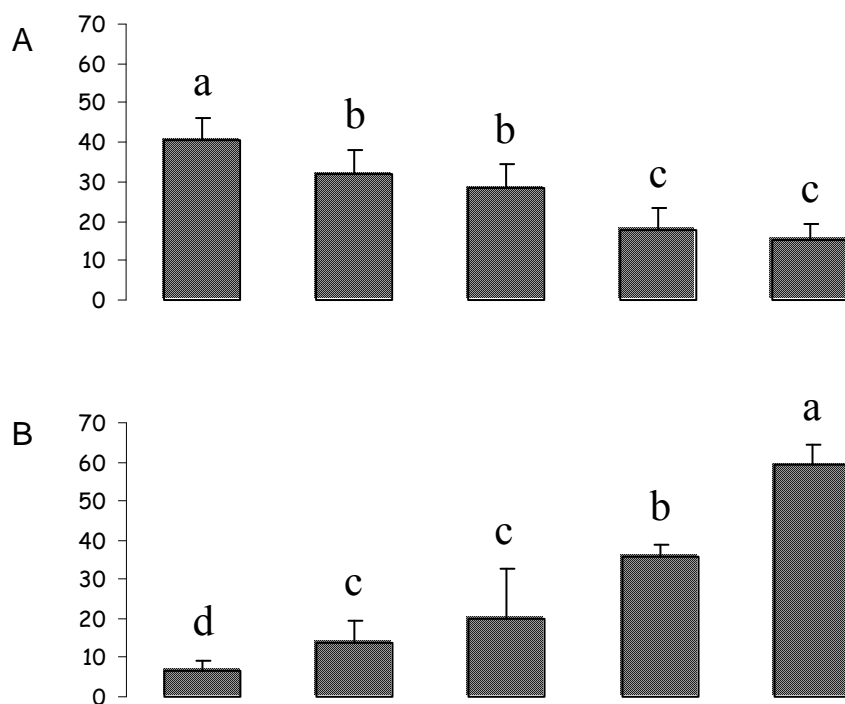


Figures 2. Effects of daidzein (A), equol (B), and genistein (C) on ALP activity at days 5, 7, 9, 11 and 13. The values are expressed as a mean percentage of increase from control values  $\pm$  SEM, n=3. Data were analyzed by Student's test. \* $p < 0.05$ , significant differences between treated cells and vehicle controls.

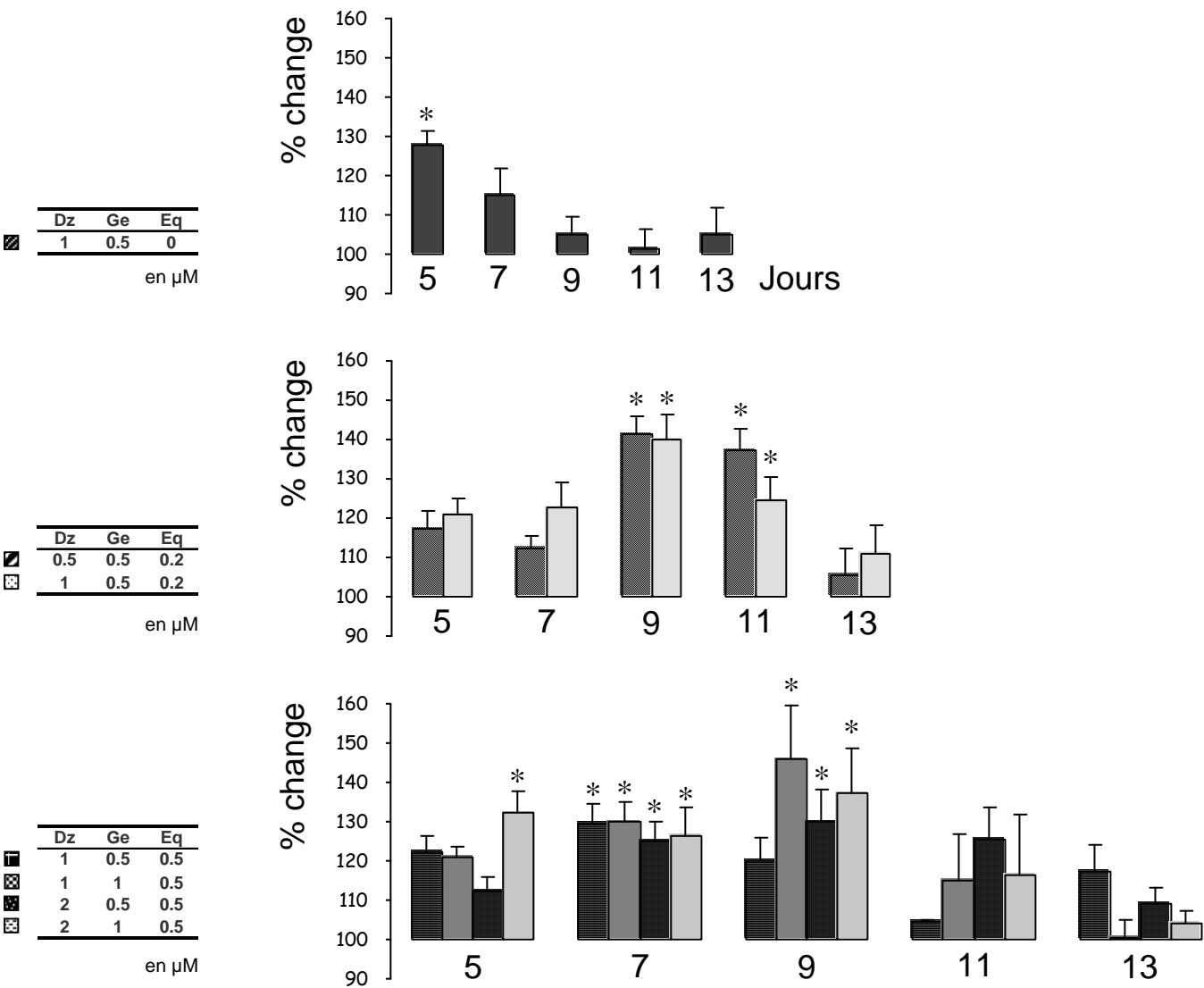




Figures 3. Effects of 3 different mix of IF physiological concentrations on ALP activity, depending on the ability to be (1) no-, (2) low - or (3) high-equal producers. The values are expressed as a mean percentage of increase from control values  $\pm$  SEM,  $n=3$ . Data were analyzed by two-way ANOVA (treatment vs control and treatment without equal vs treatment with equal). Significant differences between treated cells and controls are indicated with \* with  $p<0.05$ , whereas a significant difference between the first mix without equal and the two others are indicated with # with  $p<0.05$ .



Figures 4. Time course of the relative changes in ER $\alpha$  and ER $\beta$  protein expression during osteoblast differentiation. Histograms are performed with values of image analysis software ImageJ. Values are mean  $\pm$  SD, n=3. Data were analyzed with a one-way ANOVA, Tukey-test and expressed as a>b>c>d.

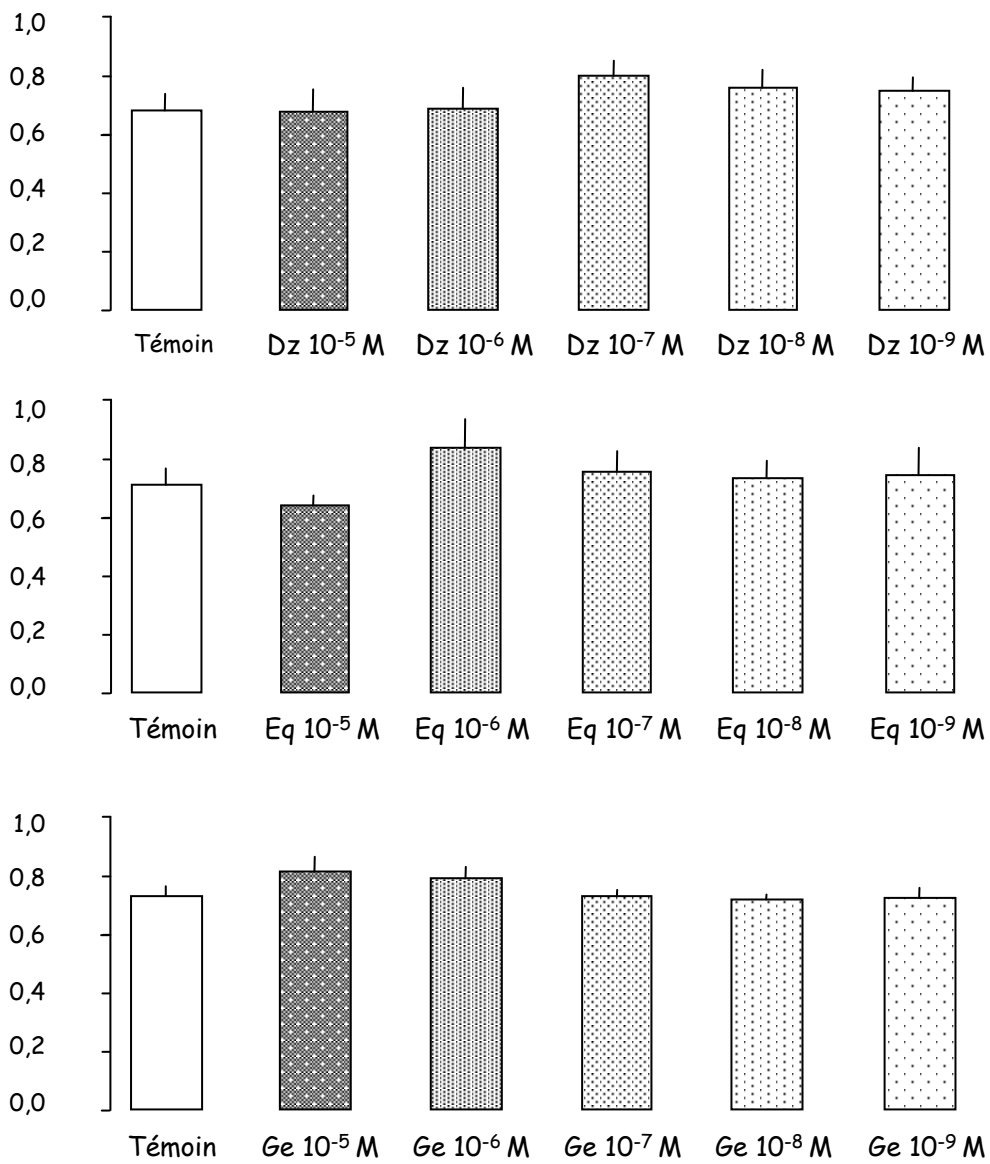


**Figure 67. Effets de différents mélanges d'isoflavonoïdes sur l'activité de la phosphatase alcaline**

#### **4.4. Résultats complémentaires**

Les effets de doses simples de génistéine, daïdzéine et éuol ont été testés sur la minéralisation des ostéoblastes. Aucun composé n'a augmenté la minéralisation des MG-63 en culture (*Figure 66*). Cependant la mise au point de la mesure de la minéralisation nécessite encore quelques perfectionnements. De plus, dans la mesure où les isoflavonoïdes peuvent induire l'activité ALP et où plusieurs études ont décrit les effets inducteurs de composés semblables sur la minéralisation, nos résultats sont donc à considérer avec précaution.

Enfin les concentrations en isoflavonoïdes mesurées chez des femmes consommant des gélules Phytosoya® sont rapportées dans le *tableau 16*. Des mélanges de doses d'isoflavonoïdes ont donc été utilisés pour induire les ostéoblastes MG-63 en culture et mesurer alors l'activité ALP, dans un but industriel (*Figure 67*). Il s'agissait également de mettre en évidence d'éventuels effets d'antagonisme ou de synergie.



***Figure 66. Effets des isoflavonoïdes sur la minéralisation des MG-63***

***Tableau 16. Concentrations plasmatiques en isoflavonoïdes de femmes ménopausées consommant 2 gélules de Phytosoya® (2 x 35 mg d'isoflavones totales par jour) depuis 4 mois***

Volontaires	Daidzéine (ng.mL <sup>-1</sup> )	Génistéine (ng.mL <sup>-1</sup> )	Equol (ng.mL <sup>-1</sup> )	
BOMA	24,18	22,93	ND	Non-productrices d'équol
PIAN	238,11	70,08	ND	
FRBE	361,82	126,92	ND	
DURE	302,73	80,11	ND	
SIMI	164,68	51,92	ND	
DACH	245,76	91,18	ND	
ANAN	515,84	182,02	ND	
DEMA	202,34	66,19	ND	
JOHE	308,73	133,14	ND	
BAHU	129,81	49,56	41,16	
BRDO	343,26	103,23	54,56	
CAMO	111,42	70,92	40,24	
BEEL	115,24	110,09	61,25	Fortes
JACH	843,94	296,80	97,45	
PIGE	84,34	55,64	125,73	
JINE	195,39	79,53	108,57	
BENA	564,64	193,89	188,02	
LAAN	169,08	159,32	114,06	productrices d'équol

# Discussion générale

« Toute science crée une nouvelle ignorance. »

*Henri Michaux*





## 1. La biodisponibilité des isoflavones

Une large partie de ce travail de thèse est centrée sur la biodisponibilité des isoflavones de soja chez l'Homme. Plusieurs études cliniques ont permis d'apporter des données nouvelles en particulier concernant les facteurs qui peuvent influencer la biodisponibilité des isoflavones : le procédé industriel de fabrication des compléments alimentaires, la matrice alimentaire, l'appartenance à une ethnie, le régime alimentaire associé à la prise d'isoflavones, une exposition prolongée ont été successivement étudiés.

La définition de la biodisponibilité est un sujet de débat au sein de la communauté scientifique, en particulier la biodisponibilité de nutriments. Une première définition ne prenait en compte que l'absorption intestinale, englobant l'intensité et la vitesse d'absorption. Par la suite, les phénomènes post-digestifs tels que le métabolisme, la distribution et l'excrétion ont été pris en compte. Cette dernière définition a été retenue tout au long de ce manuscrit. Pour certains, ces 4 mécanismes ne reflètent que la manière dont les nutriments sont délivrés au niveau des tissus. Petit à petit la notion de biodisponibilité tend vers celle de bio-efficacité, qui est la fraction du nutriment qui peut entraîner une activité biologique (Rowland *et al.*, 2003). Les isoflavones doivent pénétrer dans les cellules et donc traverser leurs membranes plasmiques afin d'exercer une action sur les divers enzymes cellulaires ou *via* les ERs.

Une approche de la bio-efficacité des isoflavones peut être tentée en raisonnant sur des isoflavones aglycones circulantes. Les concentrations physiologiques de l'E<sub>2</sub> sont de l'ordre de 10 pg.mL<sup>-1</sup> chez des femmes ménopausées. Les concentrations plasmatiques d'isoflavones totales peuvent atteindre 4 μM soit approximativement 10<sup>4</sup> pg.mL<sup>-1</sup>. De plus, des expériences d'affinité sur les ERs de MCF-7 (lignée cancéreuse mammaire humaine), dans un milieu de culture reconstitué à partir de sérum humain ont montré que l'accès des isoflavones aux ERs était environ 10 fois supérieur à celui de l'E<sub>2</sub> (Nagel *et al.*, 1998). Les valeurs issues de ces expériences prennent donc en considération l'affinité des différentes protéines porteuses pour l'E<sub>2</sub> et les isoflavones (SHBG, albumine ...) ainsi que le passage de la membrane plasmique par ces composés. Enfin, des expériences *in vitro* ont montré que le potentiel transcriptionnel des isoflavones était environ 10<sup>3</sup> fois moins élevé que celui de l'E<sub>2</sub>. Il résulte de ce raisonnement, une bio-efficacité de transcription, *via* les ERs, 10 fois plus forte pour les isoflavones que pour l'E<sub>2</sub>, ce qui dénote donc toute la considération qu'il faut attribuer aux isoflavones. Ce calcul est bien entendu très grossier, car (1) la valeur plasmatique prise en



considération est très forte, (2) les valeurs d'affinité et de potentiel transcriptionnel ont été obtenues à partir d'études *in vitro* qui ne reflètent pas la physiologie globale, (3) le temps d'exposition de ces composés aux cellules n'est pas le même : les stéroïdes endogènes sont présents dans le fluide sanguin de façon continue alors que les isoflavones ne sont présentes qu'au gré des ingestions de soja ou produits dérivés et (4) les formes circulantes des isoflavones sont majoritairement couplées et non pas liées à des protéines sanguines. La nature hydrophile des isoflavones conjuguées pourrait retarder, en effet, le passage de la bicouche lipidique qui constitue la membrane plasmique et ainsi limiter l'action de ces molécules au niveau cellulaire (Doerge *et al.*, 2000). Il a toutefois été démontré que lors de processus inflammatoires, diverses cellules pouvaient sécréter dans le compartiment extracellulaire des  $\beta$ -glucuronidases, *via* les lysosomes (Shimoi *et al.*, 2000). Ces données suggèrent donc de bien prendre en considération toutes les formes circulantes des isoflavones.

Jusqu'alors, en effet, seules les formes aglycones étaient considérées comme les seules formes actives, capables d'entraîner un effet biologique. De plus, que ce soit la technique ELISA que nous avons utilisée ou bien des techniques d'HPLC couplées à la spectrométrie de masse, une étape d'hydrolyse (de digestion et/ou d'extraction) est préalablement nécessaire au dosage des isoflavones dans les échantillons biologiques. C'est pourquoi, les concentrations des isoflavones sont exprimées en molaire ou en équivalent aglycone dans la majeure partie des études. Toutefois, 40 % des isoflavones seulement, au maximum, circulent sous forme aglycone dans le sang (Shelnutt *et al.*, 2002). Or, la plupart des effets décrits *in vitro* ou *in vivo* montrent que des concentrations supérieures au  $\mu\text{M}$  en isoflavones totales sont atteintes. Trois hypothèses peuvent alors être formulées : (1) les formes conjuguées sont inactives et les seules isoflavones aglycones sont responsables de l'effet décrit, à une concentration sanguine maximale de 400 nM, (les effets des isoflavones à de telles doses sont peu souvent décrits dans la littérature *in vitro*), (2) les isoflavones pourraient être captées par certains tissus grâce à des activités enzymatiques locales, dans la prostate par exemple (Hedlund *et al.*, 2005) ou (3) les formes conjuguées sont actives, par des déconjugaisons locales ou par d'autres mécanismes. En effet, il apparaît dans les articles récents, que l'effet des formes conjuguées est testé et ces molécules s'avèrent être actives sur des systèmes biologiques (Hwang *et al.*, 2006; Totta *et al.*, 2005). L'étude du métabolisme des isoflavones apparaît donc essentielle dans la mesure où les métabolites peuvent avoir une bio-efficacité différente des molécules ingérées (Doerge *et al.*, 2000).

L'équol semble justement être un métabolite tout aussi actif que son précurseur sur des activités biologiques. Muthyala et collaborateurs ont montré, par exemple, que l'équol



induisait une activité transcriptionnelle plus forte que la daïdzéine chez des lignées humaines de cellules de l'endomètre (Muthyala *et al.*, 2004). Seule une partie de la population peut produire de l'équol. Avant ces travaux de thèse, il n'avait jamais été montré que la production d'équol induisait une baisse de l'excrétion urinaire de daïdzéine. Nous n'avons toutefois pas démontré que la production d'équol diminuait la biodisponibilité de la daïdzéine. Des variabilités inter-individuelles importantes ainsi qu'un faible nombre de volontaires équol-producteurs ont probablement empêché une telle démonstration. En effet, aucune pré-inclusion n'a été effectuée quant à la capacité des volontaires à produire de l'équol. Dans la première étude de bioéquivalence, 4 volontaires sur 12 inclus étaient des producteurs d'équol. Dans la seconde (résultats 2 et 3), de façon très étonnante, parmi les 24 volontaires inclus (12 français et 12 chinois), aucun n'était producteur d'équol. Là encore, des précautions de recrutement avaient pourtant été prises : les volontaires ne devaient pas être traités médicalement par des antibiotiques au moins 30 jours avant le début de l'étude. D'autre part, des informations ont été recueillies durant les essais cliniques et aucun volontaire n'a souffert de troubles digestifs. Il semble donc étonnant qu'aucun individu sur 24 ne soit en mesure de produire de l'équol. Les seules probabilités semblent pouvoir expliquer cela, puisque 30 à 50 % des individus seulement produisent de l'équol.

A l'heure actuelle, il existe un intérêt croissant des scientifiques pour la molécule d'équol. Ses propriétés structurales particulières sur le plan chimique ainsi que ses activités biologiques démontrées ont permis de poser plusieurs hypothèses quant à ses effets physiologiques. Il existe, toutefois, d'autres métabolites des isoflavones moins étudiés jusqu'alors : c'est le cas de la dihydrogénistéine, de la dihydrodaïdzéine, du dihydroéquol, du 4'-o-méthyléquol, du 4 hydroxyéquol, de l'o-DMA ... La plupart de ces molécules résultent de biotransformations bactériennes. Ces métabolites sont-ils produits chez tous les consommateurs de soja ? Ces métabolites ont-ils un effet sur la biodisponibilité de leur précurseur ? Nous n'avons pas étudié la biodisponibilité de ces métabolites au cours de ces travaux de thèse car le dosage de ces molécules en ELISA n'est pas encore au point. De même, il eût été intéressant de connaître la biodisponibilité de la glycitéine, autre molécule de la famille des isoflavones. Il a été démontré de surcroît que la glycitéine était un précurseur potentiel de l'équol (Simons *et al.*, 2005). A l'heure actuelle, les dosages de certaines de ces molécules sont en cours de validation à l'UMRS.

La méthode d'analyse employée pour ces travaux de thèse a permis de dégager des paramètres pharmacocinétiques classiquement obtenus dans la littérature. Cependant l'exception des  $T_{1/2 \text{ élim}}$  est à noter. Dans la plupart des articles, les  $T_{1/2 \text{ élim}}$  sont de l'ordre de



6 à 10 h. Setchell et collaborateurs ont même mis au point une formulation dite retard car les isoflavones sont libérées progressivement dans la lumière de l'intestin et sont donc absorbées progressivement. Ceci permet d'augmenter le temps de résidence plasmatique des isoflavones et donc d'augmenter leurs  $T_{1/2 \text{ élim}}$  : les  $T_{1/2 \text{ élim}}$  sont alors de l'ordre de 10 à 11 h pour les isoflavones (Setchell *et al.*, 2005a). Or, les valeurs de  $T_{1/2 \text{ élim}}$  que nous avons obtenues sont d'environ 12 h pour la daïdzéine et de 18 h pour la génistéine. Cette observation peut être due à notre échantillonnage, en particulier pendant la phase d'élimination : 8, 10, 12, 18, 24 et 48 h. Il permet ainsi de mettre en évidence plusieurs rebonds sur la courbe pharmacocinétique, reflets de recirculation entéro-hépatique, qui peuvent allonger la  $T_{1/2 \text{ élim}}$ . Cette observation peut également être due à la technique de dosage ELISA. Les anticorps primaires anti-isoflavone sont spécifiques mais peuvent éventuellement reconnaître d'autres composés dans les échantillons. Lorsque les concentrations en isoflavones sont faibles dans les échantillons, en particulier au cours de l'élimination des isoflavones, les réactions croisées peuvent anormalement augmenter la valeur des isoflavones, redressant la pente de la courbe d'élimination de ces composés et augmentant finalement la valeur de  $T_{1/2 \text{ élim}}$ . C'est pourquoi Muir conclut dans un article récent que les méthodes analytiques influencent beaucoup notre compréhension des systèmes biologiques (Muir, 2006). Toutefois, une autre étude rapporte des  $T_{1/2 \text{ élim}}$  semblables à celles que nous obtenons. La technique de dosages utilisée alors dans cette étude était une technique HPLC.

Outre la  $T_{1/2 \text{ élim}}$ , les paramètres pharmacocinétiques des isoflavones sont en accord avec ceux obtenus classiquement dans la littérature. De même, les grandes variations inter-individuelles des paramètres pharmacologiques des isoflavones sont également observées dans d'autres études de biodisponibilité. Nous avons donc apporté un soin particulier à essayer de limiter ces variations. Ainsi les volontaires inclus dans les essais cliniques que nous avons réalisés étaient de sexe masculin, bien qu'actuellement la cible préférentielle des compléments alimentaires à base de soja soit des femmes ménopausées. Les œstrogènes et les isoflavones sont pris en charge par des enzymes communs au cours de leur métabolisme, aussi des interactions entre ces molécules auraient été possibles. Le recrutement de femmes préménopausées n'était donc pas possible, car il aurait pu augmenter la variabilité de la biodisponibilité des isoflavones. De plus, bien que les concentrations en œstrogènes des femmes ménopausées et des hommes soient semblables, une pré-inclusion de volontaires féminines ménopausées aurait été nécessaire afin de doser les hormones sexuelles et la FSH et la LH préalablement. Ceci aurait entraîné des coûts supplémentaires, voire des inclusions supplémentaires dans le cas où les dosages de FSH et de LH auraient conclu à un état de





périménopause. Néanmoins, avec du recul (et la connaissance des résultats obtenus), il était peut-être tout aussi judicieux d'inclure des femmes ménopausées pour les deux premiers essais cliniques. Il eût été plus compliqué de recruter 12 femmes ménopausées asiatiques fraîchement arrivées en France pour le troisième essai. Plusieurs études ont été publiées au cours de la réalisation de ce travail de thèse, incluant des femmes ménopausées (Anupongsanugool *et al.*, 2005 ; Cassidy *et al.*, 2006b). Ces études n'ont pas pris la précaution de doser les hormones sexuelles. Les variations inter-individuelles sont finalement similaires à celles que nous avons obtenues chez des jeunes hommes. Enfin, le choix d'inclure des femmes postménopausées aurait été plus simple à valoriser.

Les grandes variations inter-individuelles dans les mêmes études de biodisponibilité suggèrent que ces variations sont d'origine génétique. En effet, les facteurs génétiques sont impliqués dans l'absorption, dans le métabolisme, dans la distribution et dans l'excrétion des isoflavones. Le patrimoine génétique de chaque individu est responsable de l'expression et de l'activité des protéines. Elles peuvent être des enzymes comme les glycosidases entérocytaires impliquées dans l'absorption, des enzymes de phase 1 du métabolisme hépatique, des UDPGT et des SULT impliqués dans le métabolisme entérocytaire, hépatique et rénal ... Ces protéines peuvent également servir au transport comme la SHBG, responsable du transport et de la distribution d'une partie des isoflavones. Ces protéines peuvent enfin être des glycoprotéines de la bordure en brosse entérocytaire dont les motifs sont reconnus par les micro-organismes. Ces derniers y adhèrent et forment de fait la flore colique propre à chaque individu. Le génotype est donc en partie responsable de la spécificité de la flore de chaque individu, elle-même impliquée dans le métabolisme des isoflavones par des déconjugaisons intestinales ou la production d'équol, d'*o*-DMA ... C'est pourquoi l'étude de certains paramètres extrinsèques, proposés pour influencer la variabilité de la biodisponibilité des isoflavones, peut finalement sembler obsolète. Parmi les facteurs que nous avons étudiés, l'effet matrice alimentaire a engendré la plus grande variation de biodisponibilité : un facteur de 48,4 % existe entre la valeur moyenne de l' $AUC_{0 \rightarrow \infty}$  de la génistéine des gélules et celle du fromage. Néanmoins, pour ce même paramètre dans la même étude, les valeurs de SD représentent 46,8 et 27,6 % des valeurs moyennes suite à l'ingestion respective de gélules et de fromages. Les valeurs de variations inter-individuelles sont donc quasi-semblables à celles d'un effet extrinsèque, la forme d'apport des isoflavones de soja en l'occurrence. Il apparaît donc que la grande variabilité inter-individuelle de biodisponibilité des isoflavones pourrait donc être la cause de la variabilité des résultats obtenus lors d'essais cliniques visant à montrer un effet



physiologique des isoflavones. Il est donc encore dommageable que très peu d'études ne corrélaient pas les effets obtenus avec les concentrations en isoflavones circulantes.

Les premiers effets physiologiques décrits montraient que les isoflavones de soja sont des perturbateurs endocriniens. Un perturbateur endocrinien est un agent exogène qui interfère avec la synthèse, la sécrétion, le transport, la liaison, l'action ou l'élimination corporelle des hormones naturelles responsables de l'homéostasie, de la reproduction, du développement et du comportement (Kavlock *et al.*, 1996). Des troubles de la fertilité et de la reproduction ont été initialement décrits chez les brebis paissant du trèfle. Cassidy et collaborateurs ont démontré, chez 6 femmes avec des cycles ovariens normaux, que la consommation quotidienne de 60 g de protéines de soja, soit 45 mg d'isoflavones, pendant un mois, augmentait la phase folliculaire, diminuait les pics de FSH et de LH et augmentait les taux d'E<sub>2</sub> circulants pendant la phase folliculaire (Cassidy *et al.*, 1994). Il a également été démontré que les isoflavones de soja augmentaient les taux de SHBG chez des femmes post-ménopausées (Pino *et al.*, 2000). Afin d'éviter des problèmes de santé liés à des dérégulations hormonales induites par les isoflavones de soja, il semble judicieux de développer un marqueur sérique. Ce marqueur serait le reflet d'une bio-efficacité des isoflavones, qui pourrait engendrer des effets néfastes, notamment sur les systèmes endocriniens. Bien que des effets non classiques non génomiques soient connus à ce jour, il semble que la voie d'action privilégiée passe par les ERs. Aussi ce marqueur pourrait être une protéine dont l'expression est sous la dépendance d'un ERE : Vascular Endothelium Growth Factor (VEGF), globuline  $\alpha_{2u}$  hépatique ... (Klinge, 2001). Toutefois, avant d'utiliser l'expression de tels marqueurs, il conviendrait de corrélérer avec elle, les concentrations circulantes en isoflavones ainsi que les effets (œstrogéniques ou non-œstrogéniques) engendrés. Outre ces effets plus souvent décrits, les isoflavones de soja exercent aussi des effets anti-androgéniques, anti-thyroïdiens et anti-gonadotropes (Gerber *et al.*, 2005). Sont-elles toxiques pour autant ?

Les isoflavones sont avant tout des microconstituants, contenues principalement dans le soja, lui-même consommé de façon séculaire dans les contrées asiatiques. A ce jour, les isoflavones de soja n'ont ainsi pas montré d'effet toxique, y compris dans les études où de très fortes quantités d'isoflavones sont ingérées. Bloedon et collaborateurs rapportent l'effet de fortes doses ingérées en administration unique chez 24 femmes post-ménopausées. Les doses maximales ingérées sont de 25,08 mg d'isoflavones aglycones par kg de poids corporel. Les effets observés sont alors une baisse de la pression artérielle, une baisse de la numération plasmatisque de neutrophiles, des tensions mammaires et des nausées chez quelques volontaires (Bloedon *et al.*, 2002). La dose ingérée dans cette étude équivaut environ chez une



femme de 60 kg à consommer environ 7,5 L de lait de soja ! Les études de toxicité après administration répétée ont été réalisées essentiellement chez des rongeurs ou des chiens Beagle. Il est toutefois très difficile de comparer les effets chez des animaux et chez l'Homme dans la mesure où leurs biodisponibilités sont différentes. Ainsi, une ingestion de 10 mg par kg de poids corporel entraîne une concentration plasmatique de 1  $\mu$ M chez un rat, alors que chez un Homme, cette concentration est atteinte avec moins de 1 mg d'isoflavones ingérées par kg de poids corporel (Setchell *et al.*, 2001). Dans ce contexte, il apparaît difficile de définir une dose toxique à ne pas dépasser tant le métabolisme des isoflavones varie selon les individus et donc tant les variations inter-individuelles sont importantes. Seul s'applique alors le principe de précaution ...

Une fois biodisponible, les isoflavones de soja sont des molécules actives sur les systèmes biologiques. Les isoflavones de soja pourraient être impliquées dans la prévention de différentes pathologies, l'ostéoporose en particulier. Dans ce contexte, plusieurs approches expérimentales existent ; nous avons retenu une approche *in vitro*.

## **2. Les effets des isoflavones sur des systèmes biologiques osseux**

Il est important de mettre en œuvre des stratégies préventives, compte tenu de la prévalence et des conséquences de cette pathologie dans une population vieillissante. Dans ce cadre de recherche, la nutrition peut être considérée comme une stratégie préventive. Outre les apports nutritionnels en vitamines et minéraux nécessaires à la bonne santé du tissu osseux, les isoflavones de soja pourraient également être bénéfiques. Plusieurs études cliniques ont d'ores et déjà été menées. Aucune étude ne montre jusqu'alors d'effet délétère des isoflavones sur le tissu osseux. Certaines montrent même clairement un effet ostéoprotecteur des isoflavones de soja, alors que d'autres ne montrent pas d'effet intéressant de ces composés. La biodisponibilité des molécules au niveau du tissu osseux est une première hypothèse de travail, qui peut justifier de la non-efficacité des isoflavones chez certaines volontaires. Toutefois, ces divergences montrent clairement le besoin de continuer des recherches de biologie cellulaire et moléculaire afin d'appréhender le bon fonctionnement du tissu osseux et d'apporter ainsi les solutions adéquates. C'est pourquoi nous avons entrepris d'étudier les effets des isoflavones *in vitro* sur la différenciation osseuse.



D'après la chronologie du phénotype ostéoblastique en culture observé sur des cellules humaines par Siggelkow et collaborateurs, la différenciation des ostéoblastes *in vitro* se déroule en trois étapes : (1) une phase de prolifération active associée au dépôt de la matrice extracellulaire, (2) une phase de maturation de la matrice caractérisée par l'augmentation et le maximum de l'activité ALP et enfin (3) une phase de minéralisation associée à la chute de l'activité ALP (Siggelkow *et al.*, 1999). L'expression des ERs varie également au cours du temps. Nous avons montré que ER $\alpha$  est abondant dans les stades de prolifération et diminue au cours de la différenciation alors que la quantité d'ER $\beta$  augmente au cours de la différenciation des ostéosarcomes MG-63. Chaque étape du développement séquentiel du phénotype ostéoblastique est caractérisée par un ratio ER $\alpha$ /ER $\beta$ .

En dépit de l'absence d'effet sur la prolifération, nos résultats montrent une action des isoflavonoïdes sur la différenciation ostéoblastique précoce. L'absence d'effet des isoflavonoïdes et de l'E<sub>2</sub> sur la prolifération souligne une action spécifique sur la différenciation et en particulier sur la phase de maturation de la matrice. Nos données montrent également que les isoflavonoïdes exercent leurs actions *via* les ERs, en partie au moins. Bien que plusieurs études relatent l'effet stimulateur des isoflavonoïdes sur l'activité ALP, c'est la première fois que l'effet de l'équol testé à des doses de l'ordre du nanomolaire, en traitement continu, est avéré. La daïdzéine est active avec des doses plus fortes, de l'ordre du micromolaire. Les différences d'action entre l'E<sub>2</sub> et les isoflavonoïdes au cours du temps sont difficiles à expliquer et pourraient être liées (1) à l'expression différentielle des ERs au cours du temps, (2) à l'affinité de liaison et l'activité transcriptionnelle de chaque composé pour chacun des deux ERs et (3) à un effet distinct de chaque composé sur les niveaux d'expressions protéiques de chaque isoforme des ERs. Il est, en effet, envisageable que l'action tardive (J13) d'une dose de 1 nM d'équol soit le fait (1) d'une forte expression d'ER $\beta$  à J13 et (2) d'une relativement forte affinité de liaison et d'une relativement forte activité transcriptionnelle de l'équol *via* ER $\beta$  (Muthyala *et al.*, 2004).

En mélange avec la génistéine et la daïdzéine, la molécule d'équol semble potentialiser l'effet des autres isoflavones, daïdzéine et génistéine. Actuellement plusieurs études montrent l'importance de l'équol dans la prévention vis-à-vis de l'ostéoporose. Certains auteurs suggèrent même que cette molécule est la clé de l'effet des isoflavones sur le tissu osseux, mais également sur d'autres cibles biologiques (Setchell *et al.*, 2002a). Jusqu'alors, aucune étude n'a montré clairement que la prévalence des symptômes ou pathologies associés à la ménopause et à la vieillesse était plus faible chez les producteurs d'équol.





Il semble très difficile d'extrapoler nos résultats obtenus à partir d'expériences *in vitro* à des résultats issus d'études cliniques. Dans la mesure où les résultats issus des études cliniques sont divergents, des travaux fondamentaux semblent encore nécessaires. Des mécanismes complets de signalisation et d'action cellulaires doivent encore être appréhendés avant de proposer des doses efficaces. Ces doses devront encore être modulées selon la biodisponibilité de chacun, dans la mesure où les isoflavones s'inscrivent dans le simple cadre de la nutrition.



# Conclusion et Perspectives

« Conclure, c'est finir un peu. »  
*Anonyme*



Cette thèse s'inscrit dans le cadre de la relation entre la nutrition et la santé. La majeure partie de ce travail a trait à la biodisponibilité des isoflavones de soja. La biodisponibilité des composés ingérés sous des formes pures, voire marquées aux  $^{13}\text{C}$ , est désormais connue chez l'Homme. Toutefois, les isoflavones de soja sont commercialisées au travers de nombreux produits : principalement des aliments traditionnels asiatiques ou issus de procédés de transformation plus modernes et des compléments alimentaires. Il convenait donc de comparer la biodisponibilité des isoflavones suivant l'ingestion de tels produits.

Le procédé de fabrication des compléments alimentaires ne semble pas avoir d'effet sur la biodisponibilité des isoflavones de soja. Les molécules sont déjà extraites et peuvent donc être assimilées rapidement. En revanche, une matrice plus complexe, comme celle d'un fromage à base de soja, peut limiter l'absorption des isoflavones de soja et diminuer ainsi leur biodisponibilité par rapport aux isoflavones contenues dans les compléments alimentaires.

Dans la mesure où les isoflavones de soja, consommées en plus grande quantité dans les pays asiatiques, pourraient exercer des bienfaits sur la santé des populations et en particulier des femmes ménopausées, il apparaissait alors pertinent de comparer la biodisponibilité des isoflavones de soja entre ces populations et des populations pas ou peu exposées au soja, comme la nôtre. Une étude de biodisponibilité a permis de mettre en évidence une meilleure biodisponibilité des isoflavones chez des volontaires asiatiques lorsque l'exposition des produits au soja est unique. Dans le cas d'une ingestion répétée, des volontaires asiatiques et caucasiens présentent une biodisponibilité assez semblable. De plus, le contexte alimentaire, asiatique ou occidental, associé à la consommation de produits à base de soja n'a pas d'effet sur la biodisponibilité des isoflavones chez des volontaires asiatiques.

Ces études cliniques s'inscrivent dans le cadre de récentes études sur les facteurs influant la biodisponibilité des isoflavones. Ces recherches doivent, à court terme, orienter les consommateurs ou les professionnels de santé dans leur choix du produit qui leur conviendra le mieux, selon les effets désirés. Les études menées sont originales et apportent de nouvelles données de biodisponibilité. En effet, elles ont permis de dégager des paramètres pharmacocinétiques, reflets de l'ensemble des mécanismes d'absorption, de métabolisme, de distribution et d'excrétion des isoflavones. Toutefois, il est encore nécessaire d'étudier ces phénomènes, un à un, sur des modèles cellulaires, des modèles animaux, voire sur des volontaires humains et de comprendre chaque étape.

Des doses physiologiques d'isoflavones montrent que ces molécules sont actives *in vitro*, sur une lignée ostéoblastique humaine. Cette étude a également montré la capacité de



l'équol, métabolite de la daïdzéine, à stimuler la différenciation ostéoblastique à très faible dose. L'identification des voies de signalisation induites par l'action des isoflavonoïdes *via* les ERs permettrait d'apporter des réponses aux effets de ces composés sur le tissu osseux dans sa globalité. De plus, l'équol est l'objet de plusieurs études très récentes dans le cadre de la prévention nutritionnelle de l'ostéoporose et focalise l'attention de beaucoup de scientifiques. De nombreuses questions restent encore en suspens, sur sa production d'abord : quelles souches bactériennes sont responsables de la biotransformation de la daïdzéine en équol ? Quelle alimentation pourrait favoriser sa production ? Peut-on imaginer produire de l'équol à échelle industrielle et commercialiser des compléments alimentaires enrichis en équol ?

Outre ces considérations particulières sur l'équol et la prévention de l'ostéoporose, on impute de nombreux effets santé aux isoflavones. Ces effets ont été démontrés dans certaines études. Bien que les résultats de ces études soient parfois controversés, ils suffisent à démontrer que les isoflavones sont des molécules biologiques actives. Il est donc nécessaire d'utiliser ces molécules dans un cadre particulier où la prudence est de mise. Le rapport AFSSA conseillait de ne pas dépasser la dose de 1 mg par kg de poids corporel et par jour. Les futures études cliniques et études de biodisponibilité permettront justement d'affiner cette valeur.

En conclusion, les recherches sur les isoflavones de soja et plus généralement sur les polyphénols s'intègrent parfaitement aux recherches de nutrition préventive et plus particulièrement à l'exploration des effets santé des produits végétaux.





# Références bibliographiques

## A

- Adams, N. R. (1995). Detection of the effects of phytoestrogens on sheep and cattle. *J Anim Sci* 73, 1509-1515.
- Adlercreutz, H. (1990). Western diet and Western diseases: some hormonal and biochemical mechanisms and associations. *Scand J Clin Lab Invest Suppl* 201, 3-23.
- Adlercreutz, H., Bannwart, C., Wahala, K., Makela, T., Brunow, G., Hase, T., Arosemena, P. J., Kellis, J. T., Jr., et Vickery, L. E. (1993). Inhibition of human aromatase by mammalian lignans and isoflavonoid phytoestrogens. *J Steroid Biochem Mol Biol* 44, 147-153.
- Adlercreutz, H., Honjo, H., Higashi, A., Fotsis, T., Hamalainen, E., Hasegawa, T., et Okada, H. (1991). Urinary excretion of lignans and isoflavonoid phytoestrogens in Japanese men and women consuming a traditional Japanese diet. *Am J Clin Nutr* 54, 1093-1100.
- Adlercreutz, H., et Mazur, W. (1997). Phyto-oestrogens and Western diseases. *Ann Med* 29, 95-120.
- Adlercreutz, H., Yamada, T., Wahala, K., et Watanabe, S. (1999). Maternal and neonatal phytoestrogens in Japanese women during birth. *Am J Obstet Gynecol* 180, 737-743.
- Akiyama, T., Ishida, J., Nakagawa, S., Ogawara, H., Watanabe, S., Itoh, N., Shibuya, M., et Fukami, Y. (1987). Genistein, a specific inhibitor of tyrosine-specific protein kinases. *J Biol Chem* 262, 5592-5595.
- Albertazzi, P. (2006). A review of non-hormonal options for the relief of menopausal symptoms. *Treat Endocrinol* 5, 101-113.
- Albertazzi, P., Pansini, F., Bonaccorsi, G., Zanotti, L., Forini, E., et De Aloysio, D. (1998). The effect of dietary soy supplementation on hot flushes. *Obstet Gynecol* 91, 6-11.
- Alekel, D. L., Germain, A. S., Peterson, C. T., Hanson, K. B., Stewart, J. W., et 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.
- Allred, C. D., Ju, Y. H., Allred, K. F., Chang, J., et Helferich, W. G. (2001). Dietary genistin stimulates growth of estrogen-dependent breast cancer tumors similar to that observed with genistein. *Carcinogenesis* 22, 1667-1673.
- Alperovitch, A., Bachelot, A., Balmain, N., Belmin, J., Bourgeois, M., Caro, D., Carrere D'Encausse, M., Castot, A., De Bels, F., Dosquet, P., et al. (2004). Traitements hormonaux substitutifs de la ménopause (France, AFSSAPS (Agence Française de Sécurité Sanitaire des Produits de Santé)), pp. 78.
- An, J., Tzagarakis-Foster, C., Scharschmidt, T. C., Lomri, N., et Leitman, D. C. (2001). Estrogen receptor beta-selective transcriptional activity and recruitment of coregulators by phytoestrogens. *J Biol Chem* 276, 17808-17814.
- Anderson, J. W., Johnstone, B. M., et Cook-Newell, M. E. (1995). Meta-analysis of the effects of soy protein intake on serum lipids. *N Engl J Med* 333, 276-282.
- Anderson, R. L., et Wolf, W. J. (1995). Compositional changes in trypsin inhibitors, phytic acid, saponins and isoflavones related to soybean processing. *J Nutr* 125, 581S-588S.
- Anupongsanugool, E., Teekachunhatean, S., Rojanasthien, N., Pongsatha, S., et Sangdee, C. (2005). Pharmacokinetics of isoflavones, daidzein and genistein, after ingestion of soy beverage compared with soy extract capsules in postmenopausal Thai women. *BMC Clin Pharmacol* 5, 2.
- Arai, Y., Watanabe, S., Kimira, M., Shimoi, K., Mochizuki, R., et Kinase, N. (2000). 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, 2243-2250.
- Arjmandi, B. H., Alekel, L., Hollis, B. W., Amin, D., Stacewicz-Sapuntzakis, M., Guo, P., et Kukreja, S. C. (1996). Dietary soybean protein prevents bone loss in an ovariectomized rat model of osteoporosis. *J Nutr* 126, 161-167.
- Arjmandi, B. H., Birnbaum, R., Goyal, N. V., Getlinger, M. J., Juma, S., Alekel, L., Hasler, C. M., Drum, M. L., Hollis, B. W., et Kukreja, S. C. (1998). Bone-sparing effect of soy protein in ovarian hormone-deficient rats is related to its isoflavone content. *Am J Clin Nutr* 68, 1364S-1368S.
- Arjmandi, B. H., Lucas, E. A., Khalil, D. A., Devareddy, L., Smith, B. J., McDonald, J., Arquitt, A. B., Payton, M. E., et Mason, C. (2005). One year soy protein supplementation has positive effects on bone formation markers but not bone density in postmenopausal women. *Nutr J* 4, 8.
- Arts, J., Kuiper, G. G., Janssen, J. M., Gustafsson, J. A., Lowik, C. W., Pols, H. A., et van Leeuwen, J. P. (1997). Differential expression of estrogen receptors alpha and beta mRNA during differentiation of human osteoblast SV-HFO cells. *Endocrinology* 138, 5067-5070.
- Atherton, K. M., Mutch, E., et Ford, D. (2006). Metabolism of the soybean isoflavone daidzein by CYP1A2 and the extra-hepatic CYPs 1A1 and 1B1 affects biological activity. *Biochem Pharmacol* 72, 624-631.
- Atkinson, C., Compston, J. E., Day, N. E., Dowsett, M., et Bingham, S. A. (2004). The effects of phytoestrogen isoflavones on bone density in women: a double-blind, randomized, placebo-controlled trial. *Am J Clin Nutr* 79, 326-333.
- Atkinson, C., Frankenfeld, C. L., et Lampe, J. W. (2005). Gut bacterial metabolism of the soy isoflavone daidzein: exploring the relevance to human health. *Exp Biol Med (Maywood)* 230, 155-170.

Aubin, J. E., Liu, F., Malaval, L., et Gupta, A. K. (1995). Osteoblast and chondroblast differentiation. *Bone* 17, 77S-83S.

Axelsson, M., Sjövall, J., Gustafsson, B. E., et Setchell, K. D. (1982). Origin of lignans in mammals and identification of a precursor from plants. *Nature* 298, 659-660.

## B

Barrett, J. (1996). Phytoestrogens. Friends or foes? *Environ Health Perspect* 104, 478-482.

Beck, G. R., Jr. (2003). Inorganic phosphate as a signaling molecule in osteoblast differentiation. *J Cell Biochem* 90, 234-243.

Belcher, S. M., et Zsarnovszky, A. (2001). Estrogenic actions in the brain: estrogen, phytoestrogens, and rapid intracellular signaling mechanisms. *J Pharmacol Exp Ther* 299, 408-414.

Bellows, C. G., Aubin, J. E., et Heersche, J. N. (1991). Initiation and progression of mineralization of bone nodules formed in vitro: the role of alkaline phosphatase and organic phosphate. *Bone Miner* 14, 27-40.

Bennetau-Pelissero, C., Arnal-Schnebelen, B., Lamothe, V., Sauviant, P., Sagne, J. L., Verbruggen, M. A., Mathey, J., et Lavialle, O. (2003). ELISA as a new method to measure genistein and daidzein in food and human fluids. *Food Chemistry* 82, 645-658.

Bennetau-Pelissero, C., Le Houerou, C., Lamothe, V., et Bennetau, B. (2000a). Dosages ELISA de la génistéine et de la daidzéine dans des préparations et aliments à base de soja (Glycine Max) et dans un extrait de kudzu (Radix Pueraria). Paper presented at: Premières rencontres internationales sur les plantes médicinales des régions d'outre-mer (St Denis de la Réunion).

Bennetau-Pelissero, C., Le Houerou, C., Lamothe, V., Le Menn, F., Babin, P., et Bennetau, B. (2000b). Synthesis of haptens and conjugates for ELISAs of phytoestrogens. Development of the immunological tests. *J Agric Food Chem* 48, 305-311.

Bennetts, H. W., Underwood, E. J., et Shier, F. L. (1946). A specific breeding problem of sheep on subterranean clover pastures in western australia. *Aust Vet* 22, 2-12.

Beral, V. (2003). Breast cancer and hormone-replacement therapy in the Million Women Study. *Lancet* 362, 419-427.

Beyer, C., et Raab, H. (1998). Nongenomic effects of oestrogen: embryonic mouse midbrain neurones respond with a rapid release of calcium from intracellular stores. *Eur J Neurosci* 10, 255-262.

Bhakta, D., Higgins, C. D., Sevak, L., Mangtani, P., Adlercreutz, H., McMichael, A. J., et dos Santos Silva, I. (2006). Phyto-oestrogen intake and plasma concentrations in South Asian and native British women resident in England. *Br J Nutr* 95, 1150-1158.

Bhat, K. P. L., Kosmeder, J. W., 2nd, et Pezzuto, J. M. (2001). Biological effects of resveratrol. *Antioxid Redox Signal* 3, 1041-1064.

Billiau, A., Edy, V. G., Heremans, H., Van Damme, J., Desmyter, J., Georgiades, J. A., et De Somer, P. (1977). Human interferon: mass production in a newly established cell line, MG-63. *Antimicrob Agents Chemother* 12, 11-15.

Blair, H. C., Jordan, S. E., Peterson, T. G., et 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.

Blair, H. C., Robinson, L. J., et Zaidi, M. (2005). Osteoclast signalling pathways. *Biochem Biophys Res Commun* 328, 728-738.

Bloedon, L. T., Jeffcoat, A. R., Lopaczynski, W., Schell, M. J., Black, T. M., Dix, K. J., Thomas, B. F., Albright, C., Busby, M. G., Crowell, J. A., et Zeisel, S. H. (2002). Safety and pharmacokinetics of purified soy isoflavones: single-dose administration to postmenopausal women. *Am J Clin Nutr* 76, 1126-1137.

Bock, K. W., et Kohle, C. (2005). UDP-glucuronosyltransferase 1A6: structural, functional, and regulatory aspects. *Methods Enzymol* 400, 57-75.

Boivin, G., et Anderson, H. C. (1996). Mécanismes de la minéralisation osseuse et extraosseuse. In *Maladies métaboliques osseuses de l'adulte*, D. Kuntz, ed. (Paris), pp. 36-48.

Bord, S., Ireland, D. C., Beavan, S. R., et Compston, J. E. (2003). The effects of estrogen on osteoprotegerin, RANKL, and estrogen receptor expression in human osteoblasts. *Bone* 32, 136-141.

Borel, J. P., Macquart, F. X., Le Peuch, C., Randoux, A., Guillery, P., Bellon, G., et Monboisse, J. C. (1997). *Biochimie Dynamique*, De Boeck Université Edition edn.

Breinholt, V. M., Rasmussen, S. E., Brosen, K., et Friedberg, T. H. (2003). In vitro metabolism of genistein and tangeretin by human and murine cytochrome P450s. *Pharmacol Toxicol* 93, 14-22.

Busby, M. G., Jeffcoat, A. R., Bloedon, L. T., Koch, M. A., Black, T., Dix, K. J., Heizer, W. D., Thomas, B. F., Hill, J. M., Crowell, J. A., et Zeisel, S. H. (2002). Clinical characteristics and pharmacokinetics of purified soy isoflavones: single-dose administration to healthy men. *Am J Clin Nutr* 75, 126-136.

## C

Cassidy, A. (2003). Potential risks and benefits of phytoestrogen-rich diets. *Int J Vitam Nutr Res* 73, 120-126.

- Cassidy, A. (2006). Factors affecting the bioavailability of soy isoflavones in humans. *J AOAC Int* 89, 1182-1188.
- Cassidy, A., Albertazzi, P., Lise Nielsen, I., Hall, W., Williamson, G., Tetens, I., Atkins, S., Cross, H., Manios, Y., Wolk, A., *et al.* (2006a). Critical review of health effects of soyabean phyto-oestrogens in postmenopausal women. *Proc Nutr Soc* 65, 76-92.
- Cassidy, A., Bingham, S., et 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, 333-340.
- Cassidy, A., Brown, J. E., Hawdon, A., Faughnan, M. S., King, L. J., Millward, J., Zimmer-Nechemias, L., Wolfe, B., et Setchell, K. D. (2006b). Factors affecting the bioavailability of soy isoflavones in humans after ingestion of physiologically relevant levels from different soy foods. *J Nutr* 136, 45-51.
- Cauley, J. A., Robbins, J., Chen, Z., Cummings, S. R., Jackson, R. D., LaCroix, A. Z., LeBoff, M., Lewis, C. E., McGowan, J., Neuner, J., *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, 1729-1738.
- Caulin, C., Alperovitch, A., Amarenco, P., Bonneterre, J., Canonico, M., Carlier, P., Christin-Maître, S., Clavel-Chapelon, F., Conard, J., Cornier, C., *et al.* (2006). Le traitement hormonal de la ménopause (Agence Française de Sécurité Sanitaire des Produits de Santé (AFSSAPS)).
- Chang, Y. C., Nair, M. G., et Nitiss, J. L. (1995). Metabolites of daidzein and genistein and their biological activities. *J Nat Prod* 58, 1901-1905.
- Chen, J., Lin, H., et Hu, M. (2003a). Metabolism of flavonoids via enteric recycling: role of intestinal disposition. *J Pharmacol Exp Ther* 304, 1228-1235.
- Chen, X. W., Garner, S. C., et Anderson, J. J. (2002). Isoflavones regulate interleukin-6 and osteoprotegerin synthesis during osteoblast cell differentiation via an estrogen-receptor-dependent pathway. *Biochem Biophys Res Commun* 295, 417-422.
- Chen, Y. M., Ho, S. C., Lam, S. S., Ho, S. S., et Woo, J. L. (2003b). 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, L. M., Putignano, G., Guerra, V., Schiavelli, M. P., Cisternino, A. M., et Carriero, C. (2003). The effect of a soy rich diet on the vaginal epithelium in postmenopause: a randomized double blind trial. *Maturitas* 45, 241-246.
- Choi, E. M., Suh, K. S., Kim, Y. S., Choue, R. W., et Koo, S. J. (2001). Soybean ethanol extract increases the function of osteoblastic MC3T3-E1 cells. *Phytochemistry* 56, 733-739.
- Choi, M. S., et Rhee, K. C. (2006). Production and processing of soybeans and nutrition and safety of isoflavone and other soy products for human health. *J Med Food* 9, 1-10.
- Chun, H. S., Chang, H. J., Choi, E. H., Kim, H. J., et Ku, K. H. (2005). Molecular and absorption properties of 12 soy isoflavones and their structure-activity relationship with selected biological activities. *Biotechnol Lett* 27, 1105-1111.
- Chung, M. I., Teng, C. M., Cheng, K. L., Ko, F. N., et Lin, C. N. (1992). An antiplatelet principle of *Veratrum formosanum*. *Planta Med* 58, 274-276.
- Compston, J. E. (2001). Sex steroids and bone. *Physiol Rev* 81, 419-447.
- Cornwell, T., Cohick, W., et Raskin, I. (2004). Dietary phytoestrogens and health. *Phytochemistry* 65, 995-1016.
- Couse, J. F., et Korach, K. S. (1999). Estrogen receptor null mice: what have we learned and where will they lead us? *Endocr Rev* 20, 358-417.
- Coxam, V., et Horcajada, M. N. (2004). Prévention nutritionnelle de l'ostéoporose, Lavoisier edn (France, Europe Media Duplication S.A.).
- Crisafulli, A., Marini, H., Bitto, A., Altavilla, D., Squadrito, G., Romeo, A., Adamo, E. B., Marini, R., D'Anna, R., Corrado, F., *et al.* (2004). Effects of genistein on hot flushes in early postmenopausal women: a randomized, double-blind EPT- and placebo-controlled study. *Menopause* 11, 400-404.
- Curtis Hewitt, S., Couse, J. F., et Korach, K. S. (2000). Estrogen receptor transcription and transactivation: Estrogen receptor knockout mice: what their phenotypes reveal about mechanisms of estrogen action. *Breast Cancer Res* 2, 345-352.
- Cutolo, M., Capellino, S., Sulli, A., Seriola, B., Secchi, M. E., Villaggio, B., et Straub, R. H. (2006). Estrogens and autoimmune diseases. *Ann N Y Acad Sci* 1089, 538-547.
- D**
- Day, A. J., Canada, F. J., Diaz, J. C., Kroon, P. A., McLauchlan, R., Faulds, C. B., Plumb, G. W., Morgan, M. R., et Williamson, G. (2000). Dietary flavonoid and isoflavone glycosides are hydrolysed by the lactase site of lactase phlorizin hydrolase. *FEBS Lett* 468, 166-170.
- Day, A. J., DuPont, M. S., Ridley, S., Rhodes, M., Rhodes, M. J., Morgan, M. R., et Williamson, G. (1998). Deglycosylation of flavonoid and isoflavonoid glycosides by human small intestine and liver beta-glucosidase activity. *FEBS Lett* 436, 71-75.

- de Pascual-Teresa, S., Hallund, J., Talbot, D., Schroot, J., Williams, C. M., Bugel, S., et Cassidy, A. (2006). Absorption of isoflavones in humans: effects of food matrix and processing. *J Nutr Biochem* 17, 257-264.
- De Rijke, E., Zafra-Gomez, A., Ariese, F., Brinkman, U. A., et Gooije, C. (2001). Determination of isoflavone glucoside malonates in *Trifolium pratense* L. (red clover) extracts: quantification and stability studies. *J Chromatogr A* 932, 55-64.
- de Wilde, A., Heberden, C., Chaumaz, G., Bordat, C., et Lieberherr, M. (2006). Signaling networks from Gbeta1 subunit to transcription factors and actin remodeling via a membrane-located ERbeta-related protein in the rapid action of daidzein in osteoblasts. *J Cell Physiol* 209, 786-801.
- De Wilde, A., Lieberherr, M., Colin, C., et Pointillart, A. (2004). A low dose of daidzein acts as an ERbeta-selective agonist in trabecular osteoblasts of young female piglets. *J Cell Physiol* 200, 253-262.
- Dechaud, H., Ravard, C., Claustrat, F., de la Perriere, A. B., et Pugeat, M. (1999). Xenoestrogen interaction with human sex hormone-binding globulin (hSHBG). *Steroids* 64, 328-334.
- Dodin, S., Blanchet, C., et Marc, I. (2003). [Phytoestrogens in menopausal women: a review of recent findings]. *Med Sci (Paris)* 19, 1030-1037.
- Doerge, D. R., Chang, H. C., Churchwell, M. I., et Holder, C. L. (2000). Analysis of soy isoflavone conjugation in vitro and in human blood using liquid chromatography-mass spectrometry. *Drug Metab Dispos* 28, 298-307.
- Doolan, C. M., et Harvey, B. J. (2003). A Galpha protein-coupled membrane receptor, distinct from the classical oestrogen receptor, transduces rapid effects of oestradiol on [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> in female rat distal colon. *Mol Cell Endocrinol* 199, 87-103.
- Duax, W. L., et Weeks, C. M. (1980). Estrogens in the environment. In *Molecular basis of estrogenicity / X ray crystallographic studies*, J. A. McLachlan, ed. (Elsevier Inc), pp. 11-31.
- Dubey, R. K., Gillespie, D. G., Imthurn, B., Rosselli, M., Jackson, E. K., et Keller, P. J. (1999). Phytoestrogens inhibit growth and MAP kinase activity in human aortic smooth muscle cells. *Hypertension* 33, 177-182.
- Ducy, P., Zhang, R., Geoffroy, V., Ridall, A. L., et Karsenty, G. (1997). Osf2/Cbfa1: a transcriptional activator of osteoblast differentiation. *Cell* 89, 747-754.
- E**
- Edwards, C. A., et Parrett, A. M. (2002). Intestinal flora during the first months of life: new perspectives. *Br J Nutr* 88 Suppl 1, S11-18.
- Eghbali-Fatourehchi, G., Khosla, S., Sanyal, A., Boyle, W. J., Lacey, D. L., et Riggs, B. L. (2003). Role of RANK ligand in mediating increased bone resorption in early postmenopausal women. *J Clin Invest* 111, 1221-1230.
- Evans, B. A., Griffiths, K., et Morton, M. S. (1995). Inhibition of 5 alpha-reductase in genital skin fibroblasts and prostate tissue by dietary lignans and isoflavonoids. *J Endocrinol* 147, 295-302.
- F**
- Falkenstein, E., Tillmann, H. C., Christ, M., Feuring, M., et Wehling, M. (2000). Multiple actions of steroid hormones--a focus on rapid, nongenomic effects. *Pharmacol Rev* 52, 513-556.
- Farnsworth, N. R., Bingel, A. S., Cordell, G. A., Crane, F. A., et Fong, H. H. (1975a). Potential value of plants as sources of new antifertility agents I. *J Pharm Sci* 64, 535-598.
- Farnsworth, N. R., Bingel, A. S., Cordell, G. A., Crane, F. A., et Fong, H. S. (1975b). Potential value of plants as sources of new antifertility agents II. *J Pharm Sci* 64, 717-754.
- Faughnan, M. S., Hawdon, A., Ah-Singh, E., Brown, J., Millward, D. J., et Cassidy, A. (2004). Urinary isoflavone kinetics: the effect of age, gender, food matrix and chemical composition. *Br J Nutr* 91, 567-574.
- Faure, E. D., Chantre, P., et Mares, P. (2002). Effects of a standardized soy extract on hot flushes: a multicenter, double-blind, randomized, placebo-controlled study. *Menopause* 9, 329-334.
- Findlay, J. K., Buckmaster, J. M., Chamley, W. A., Cumming, I. A., Hearnshaw, H., et Goding, J. R. (1973). Release of luteinizing hormone by oestradiol-17 and a gonadotrophin-releasing hormone in ewes affected with clover disease. *Neuroendocrinology* 11, 57-66.
- Flouriot, G., Brand, H., Denger, S., Metivier, R., Kos, M., Reid, G., Sonntag-Buck, V., et Gannon, F. (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, 4688-4700.
- Fournier, A., Berrino, F., Riboli, E., Avenel, V., et Clavel-Chapelon, F. (2004). Breast cancer risk in relation to different types of hormone replacement therapy in the E3N-EPIC cohort. *Int J Cancer* 114, 448-454.
- Franke, A. A., Halm, B. M., Custer, L. J., Tatsumura, Y., et Hebshi, S. (2006). Isoflavones in breastfed infants after mothers consume soy. *Am J Clin Nutr* 84, 406-413.

- Frankenfeld, C. L., Atkinson, C., Thomas, W. K., Gonzalez, A., Jokela, T., Wahala, K., Schwartz, S. M., Li, S. S., et Lampe, J. W. (2005). High concordance of daidzein-metabolizing phenotypes in individuals measured 1 to 3 years apart. *Br J Nutr* *94*, 873-876.
- Fujioka, M., Uehara, M., Wu, J., Adlercreutz, H., Suzuki, K., Kanazawa, K., Takeda, K., Yamada, K., et Ishimi, Y. (2004). Equol, a metabolite of daidzein, inhibits bone loss in ovariectomized mice. *J Nutr* *134*, 2623-2627.

## G

- Gallagher, J. C., Satpathy, R., Rafferty, K., et Haynatzka, V. (2004). The effect of soy protein isolate on bone metabolism. *Menopause* *11*, 290-298.
- Gao, Y. H., et Yamaguchi, M. (1999). Suppressive effect of genistein on rat bone osteoclasts: apoptosis is induced through Ca<sup>2+</sup> signaling. *Biol Pharm Bull* *22*, 805-809.
- Gao, Y. H., et 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.
- Garcia Palacios, V., Robinson, L. J., Borysenko, C. W., Lehmann, T., Kalla, S. E., et Blair, H. C. (2005). Negative regulation of RANKL-induced osteoclastic differentiation in RAW264.7 Cells by estrogen and phytoestrogens. *J Biol Chem* *280*, 13720-13727.
- Gerber, M., Leger, C.-L., Mariotte, A.-M., Rieu, D., Tulliez, J., Bennetau-Pelissero, C., Canivenc-Lavier, M. C., Coxam, V., Maudelonde, T., Pugeat, M., *et al.* (2005). Sécurité et Bénéfice des phyto-oestrogènes apportés par l'alimentation - Recommandations (France, AFSSA (Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments) et AFSSAPS (Agence Française de Sécurité des Produits de Santé)), pp. 440.
- Gikas, P. D., et Mokbel, K. (2005). Phytoestrogens and the risk of breast cancer: a review of the literature. *Int J Fertil Womens Med* *50*, 250-258.
- Grace, P. B., Taylor, J. I., Low, Y. L., Luben, R. N., Mulligan, A. A., Botting, N. P., Dowsett, M., Welch, A. A., Khaw, K. T., Wareham, N. J., *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.
- Green, S., Walter, P., Kumar, V., Krust, A., Bornert, J. M., Argos, P., et Chambon, P. (1986). Human oestrogen receptor cDNA: sequence, expression and homology to v-erb-A. *Nature* *320*, 134-139.
- Gu, L., Laly, M., Chang, H. C., Prior, R. L., Fang, N., Ronis, M. J., et Badger, T. M. (2005). Isoflavone conjugates are underestimated in tissues using enzymatic hydrolysis. *J Agric Food Chem* *53*, 6858-6863.

## H

- Hale, G. E., Hughes, C. L., et Cline, J. M. (2002). Endometrial cancer: hormonal factors, the perimenopausal "window of risk," and isoflavones. *J Clin Endocrinol Metab* *87*, 3-15.
- Han, K. K., Soares, J. M., Jr., Haidar, M. A., de Lima, G. R., et Baracat, E. C. (2002). Benefits of soy isoflavone therapeutic regimen on menopausal symptoms. *Obstet Gynecol* *99*, 389-394.
- Hargreaves, D. F., Potten, C. S., Harding, C., Shaw, L. E., Morton, M. S., Roberts, S. A., Howell, A., et Bundred, N. J. (1999). Two-week dietary soy supplementation has an estrogenic effect on normal premenopausal breast. *J Clin Endocrinol Metab* *84*, 4017-4024.
- Hedlund, T. E., Maroni, P. D., Ferucci, P. G., Dayton, R., Barnes, S., Jones, K., Moore, R., Ogden, L. G., Wahala, K., Sackett, H. M., et Gray, K. J. (2005). Long-term dietary habits affect soy isoflavone metabolism and accumulation in prostatic fluid in caucasian men. *J Nutr* *135*, 1400-1406.
- Heim, M., Frank, O., Kampmann, G., Sochocky, N., Pennimpede, T., Fuchs, P., Hunziker, W., Weber, P., Martin, I., et Bendik, I. (2004). The phytoestrogen genistein enhances osteogenesis and represses adipogenic differentiation of human primary bone marrow stromal cells. *Endocrinology* *145*, 848-859.
- Henkel, J. (2000). SOY. Health claims for soy protein, questions about other components. *FDA Consum* *34*, 13-15, 18-20.
- Ho, S. C., Chan, S. G., Yi, Q., Wong, E., et Leung, P. C. (2001). Soy intake and the maintenance of peak bone mass in Hong Kong Chinese women. *J Bone Miner Res* *16*, 1363-1369.
- Ho, S. C., Woo, J., Lam, S., Chen, Y., Sham, A., et Lau, J. (2003). Soy protein consumption and bone mass in early postmenopausal Chinese women. *Osteoporos Int* *14*, 835-842.
- Hofbauer, L. C. (1999). Osteoprotegerin ligand and osteoprotegerin: novel implications for osteoclast biology and bone metabolism. *Eur J Endocrinol* *141*, 195-210.
- Hofbauer, L. C., Khosla, S., Dunstan, C. R., Lacey, D. L., Boyle, W. J., et Riggs, B. L. (2000). The roles of osteoprotegerin and osteoprotegerin ligand in the paracrine regulation of bone resorption. *J Bone Miner Res* *15*, 2-12.

- Horn-Ross, P. L., Barnes, S., Lee, M., Coward, L., Mandel, J. E., Koo, J., John, E. M., et Smith, M. (2000). Assessing phytoestrogen exposure in epidemiologic studies: development of a database (United States). *Cancer Causes Control* 11, 289-298.
- Howes, J. B., Bray, K., Lorenz, L., Smerdely, P., et Howes, L. G. (2004). The effects of dietary supplementation with isoflavones from red clover on cognitive function in postmenopausal women. *Climacteric* 7, 70-77.
- Howes, L. G., Howes, J. B., et Knight, D. C. (2006). Isoflavone therapy for menopausal flushes: a systematic review and meta-analysis. *Maturitas* 55, 203-211.
- Hsieh, C. Y., Santell, R. C., Haslam, S. Z., et 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, 3833-3838.
- Hu, M., Krausz, K., Chen, J., Ge, X., Li, J., Gelboin, H. L., et Gonzalez, F. J. (2003). Identification of CYP1A2 as the main isoform for the phase I hydroxylated metabolism of genistein and a prodrug converting enzyme of methylated isoflavones. *Drug Metab Dispos* 31, 924-931.
- Hubert, J., Berger, M., et Dayde, J. (2005). Use of a simplified HPLC-UV analysis for soyasaponin B determination: study of saponin and isoflavone variability in soybean cultivars and soy-based health food products. *J Agric Food Chem* 53, 3923-3930.
- Hulley, S., Furberg, C., Barrett-Connor, E., Cauley, J., Grady, D., Haskell, W., Knopp, R., Lowery, M., Satterfield, S., Schrott, H., 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, 58-66.
- Hulley, S., Grady, D., Bush, T., Furberg, C., Herrington, D., Riggs, B., et Vittinghoff, E. (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, 605-613.
- Hur, H. G., Lay, J. O., Jr., Beger, R. D., Freeman, J. P., et Rafii, F. (2000). Isolation of human intestinal bacteria metabolizing the natural isoflavone glycosides daidzin and genistin. *Arch Microbiol* 174, 422-428.
- Hutchins, A. M., Slavin, J. L., et Lampe, J. W. (1995). Urinary isoflavonoid phytoestrogen and lignan excretion after consumption of fermented and unfermented soy products. *J Am Diet Assoc* 95, 545-551.
- Hwang, C. S., Kwak, H. S., Lim, H. J., Lee, S. H., Kang, Y. S., Choe, T. B., Hur, H. G., et Han, K. O. (2006). Isoflavone metabolites and their in vitro dual functions: they can act as an estrogenic agonist or antagonist depending on the estrogen concentration. *J Steroid Biochem Mol Biol* 101, 246-253.
- I**
- Izumi, T., Piskula, M. K., Osawa, S., Obata, A., Tobe, K., Saito, M., Kataoka, S., Kubota, Y., et Kikuchi, M. (2000). Soy isoflavone aglycones are absorbed faster and in higher amounts than their glucosides in humans. *J Nutr* 130, 1695-1699.
- J**
- Jamin, C., Leutenegger, E., Senoussi, S., et Devaux, C. (2005). [Age fifty and menopause. Complaints expressed and unexpressed by women. Practitioners' perception and therapeutic impact]. *Gynecol Obstet Fertil* 33, 119-125.
- Jensen, E. V., et Jacobson, H. I. (1962). Basic guides to the mechanism of estrogen action. *Recent Prog Horm Res* 18, 387-414.
- Jia, T. L., Wang, H. Z., Xie, L. P., Wang, X. Y., et Zhang, R. Q. (2003). Daidzein enhances osteoblast growth that may be mediated by increased bone morphogenetic protein (BMP) production. *Biochem Pharmacol* 65, 709-715.
- Jilka, R. L., Hangoc, G., Girasole, G., Passeri, G., Williams, D. C., Abrams, J. S., Boyce, B., Broxmeyer, H., et Manolagas, S. C. (1992). Increased osteoclast development after estrogen loss: mediation by interleukin-6. *Science* 257, 88-91.
- Joy, S., Siow, R. C., Rowlands, D. J., Becker, M., Wyatt, A. W., Aaronson, P. I., Coen, C. W., Kallo, I., Jacob, R., et Mann, G. E. (2006). The isoflavone Equol mediates rapid vascular relaxation: Ca<sup>2+</sup>-independent activation of endothelial nitric-oxide synthase/Hsp90 involving ERK1/2 and Akt phosphorylation in human endothelial cells. *J Biol Chem* 281, 27335-27345.
- K**
- Kanno, J., Kato, H., Iwata, T., et Inoue, T. (2002). Phytoestrogen-low diet for endocrine disruptor studies. *J Agric Food Chem* 50, 3883-3885.
- Kano, M., Takayanagi, T., Harada, K., Sawada, S., et Ishikawa, F. (2006). Bioavailability of isoflavones after ingestion of soy beverages in healthy adults. *J Nutr* 136, 2291-2296.
- Karr, S. C., Lampe, J. W., Hutchins, A. M., et 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.

- Katzburg, S., Lieberherr, M., Ornoy, A., Klein, B. Y., Hendel, D., et Somjen, D. (1999). Isolation and hormonal responsiveness of primary cultures of human bone-derived cells: gender and age differences. *Bone* 25, 667-673.
- Kavlock, R. J., Daston, G. P., DeRosa, C., Fenner-Crisp, P., Gray, L. E., Kaattari, S., Lucier, G., Luster, M., Mac, M. J., Maczka, C., et al. (1996). Research needs for the risk assessment of health and environmental effects of endocrine disruptors: a report of the U.S. EPA-sponsored workshop. *Environ Health Perspect* 104 Suppl 4, 715-740.
- Keinan-Boker, L., Peeters, P. H., Mulligan, A. A., Navarro, C., Slimani, N., Mattisson, I., Lundin, E., McTaggart, A., Allen, N. E., Overvad, K., et al. (2002). Soy product consumption in 10 European countries: the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC) study. *Public Health Nutr* 5, 1217-1226.
- Kiely, M., Faughnan, M., Wahala, K., Brants, H., et Mulligan, A. (2003). Phyto-oestrogen levels in foods: the design and construction of the VENUS database. *Br J Nutr* 89 Suppl 1, S19-23.
- Kim, H. W., Kwon, M. K., Kim, N. S., et Reame, N. E. (2006). Intake of dietary soy isoflavones in relation to perimenstrual symptoms of Korean women living in the USA. *Nurs Health Sci* 8, 108-113.
- Kim, J., Um, S. J., Woo, J., Kim, J. Y., Kim, H. A., Jang, K. H., Kang, S. A., Lim, B. O., Kang, I., Choue, R. W., et Cho, Y. (2005). Comparative effect of seeds of *Rhynchosia volubilis* and soybean on MG-63 human osteoblastic cell proliferation and estrogenicity. *Life Sci* 78, 30-40.
- Kimura, Y. (2005). New anticancer agents: in vitro and in vivo evaluation of the antitumor and antimetastatic actions of various compounds isolated from medicinal plants. *In Vivo* 19, 37-60.
- King, R. A., et Bursill, D. B. (1998). Plasma and urinary kinetics of the isoflavones daidzein and genistein after a single soy meal in humans. *Am J Clin Nutr* 67, 867-872.
- Kinjo, J., Tsuchihashi, R., Morito, K., Hirose, T., Aomori, T., Nagao, T., Okabe, H., Nohara, T., et Masamune, Y. (2004). Interactions of phytoestrogens with estrogen receptors alpha and beta (III). Estrogenic activities of soy isoflavone aglycones and their metabolites isolated from human urine. *Biol Pharm Bull* 27, 185-188.
- Klinge, C. M. (2001). Estrogen receptor interaction with estrogen response elements. *Nucleic Acids Res* 29, 2905-2919.
- Knight, D. C., Howes, J. B., Eden, J. A., et Howes, L. G. (2001). Effects on menopausal symptoms and acceptability of isoflavone-containing soy powder dietary supplementation. *Climacteric* 4, 13-18.
- Kotsopoulos, D., Dalais, F. S., Liang, Y. L., McGrath, B. P., et Teede, H. J. (2000). The effects of soy protein containing phytoestrogens on menopausal symptoms in postmenopausal women. *Climacteric* 3, 161-167.
- Kreijkamp-Kaspers, S., Kok, L., Grobbee, D. E., de Haan, E. H., Aleman, A., Lampe, J. W., et van der Schouw, Y. T. (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., et Goodman-Gruen, D. L. (2002). Usual dietary isoflavone intake, bone mineral density, and bone metabolism in postmenopausal women. *J Womens Health Gend Based Med* 11, 69-78.
- Kritz-Silverstein, D., Von Muhlen, D., Barrett-Connor, E., et Bressel, M. A. (2003). Isoflavones and cognitive function in older women: the SOy and Postmenopausal Health In Aging (SOPHIA) Study. *Menopause* 10, 196-202.
- Kuiper, G. G., Enmark, E., Peltö-Huikko, M., Nilsson, S., et Gustafsson, J. A. (1996). Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 5925-5930.
- Kuiper, G. G., Lemmen, J. G., Carlsson, B., Corton, J. C., Safe, S. H., van der Saag, P. T., van der Burg, B., et Gustafsson, J. A. (1998). Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor beta. *Endocrinology* 139, 4252-4263.
- Kurzer, M. S. (2003). Phytoestrogen supplement use by women. *J Nutr* 133, 1983S-1986S.
- L**
- Lampe, J. W., Karr, S. C., Hutchins, A. M., et Slavin, J. L. (1998). Urinary equol excretion with a soy challenge: influence of habitual diet. *Proc Soc Exp Biol Med* 217, 335-339.
- Lamuela-Raventos, R. M., Romero-Perez, A. I., Waterhouse, A. L., et de la Torre-Boronat, M. C. (1995). Direct HPLC analysis of cis- and trans-resveratrol and piceid isomers in Spanish red vitis vinifera wines. *J Agric Food Chem* 43, 281-283.
- Lapcik, O., Stursa, J., Kleinova, T., Vitkova, M., Dvorakova, H., Klejdus, B., et Moravcova, J. (2003). Synthesis of hapten and conjugates of coumestrol and development of immunoassay. *Steroids* 68, 1147-1155.
- Le Houerou, C., Bennetau-Pelissero, C., Lamothe, V., Le Menn, F., Babin, P., et Bennetau, B. (2000). Syntheses of Novel Hapten-Protein Conjugates for Production of Highly Specific Antibodies to Formononetin, Daidzein and Genistein. *Tetrahedron* 56, 295-301.
- Lees, C. J., et Ginn, T. A. (1998). Soy protein isolate diet does not prevent increased cortical bone turnover in ovariectomized macaques. *Calcif Tissue Int* 62, 557-558.



- Lewis, J. E., Nickell, L. A., Thompson, L. U., Szalai, J. P., Kiss, A., et Hilditch, J. R. (2006). A randomized controlled trial of the effect of dietary soy and flaxseed muffins on quality of life and hot flashes during menopause. *Menopause* 13, 631-642.
- Li, X. H., Zhang, J. C., Sui, S. F., et Yang, M. S. (2005). Effect of daidzin, genistin, and glycitin on osteogenic and adipogenic differentiation of bone marrow stromal cells and adipocytic transdifferentiation of osteoblasts. *Acta Pharmacol Sin* 26, 1081-1086.
- Lieberherr, M., Grosse, B., Kachkache, M., et Balsan, S. (1993). Cell signaling and estrogens in female rat osteoblasts: a possible involvement of unconventional nonnuclear receptors. *J Bone Miner Res* 8, 1365-1376.
- Liggins, J., Bluck, L. J., Runswick, S., Atkinson, C., Coward, W. A., et Bingham, S. A. (2000a). Daidzein and genistein content of fruits and nuts. *J Nutr Biochem* 11, 326-331.
- Liggins, J., Bluck, L. J., Runswick, S., Atkinson, C., Coward, W. A., et Bingham, S. A. (2000b). Daidzein and genistein contents of vegetables. *Br J Nutr* 84, 717-725.
- Liu, D., Homan, L. L., et Dillon, J. S. (2004). Genistein acutely stimulates nitric oxide synthesis in vascular endothelial cells by a cyclic adenosine 5'-monophosphate-dependent mechanism. *Endocrinology* 145, 5532-5539.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., et Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193, 265-275.
- Lu, L. J., et Anderson, K. E. (1998). Sex and long-term soy diets affect the metabolism and excretion of soy isoflavones in humans. *Am J Clin Nutr* 68, 1500S-1504S.
- Lu, L. J., Grady, J. J., Marshall, M. V., Ramanujam, V. M., et Anderson, K. E. (1995). Altered time course of urinary daidzein and genistein excretion during chronic soya diet in healthy male subjects. *Nutr Cancer* 24, 311-323.
- Lubahn, D. B., Moyer, J. S., Golding, T. S., Couse, J. F., Korach, K. S., et Smithies, O. (1993). Alteration of reproductive function but not prenatal sexual development after insertional disruption of the mouse estrogen receptor gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 11162-11166.
- Lydeking-Olsen, E., Beck-Jensen, J. E., Setchell, K. D., et Holm-Jensen, T. (2004). Soymilk or progesterone for prevention of bone loss--a 2 year randomized, placebo-controlled trial. *Eur J Nutr* 43, 246-257.
- M**
- MacGregor, C. A., Canney, P. A., Patterson, G., McDonald, R., et Paul, J. (2005). A randomised double-blind controlled trial of oral soy supplements versus placebo for treatment of menopausal symptoms in patients with early breast cancer. *Eur J Cancer* 41, 708-714.
- Manolagas, S. C. (2000). Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis. *Endocr Rev* 21, 115-137.
- Manolagas, S. C., Kousteni, S., et Jilka, R. L. (2002). Sex steroids and bone. *Recent Prog Horm Res* 57, 385-409.
- Marrian, G. F., et Haslewood, G. A. D. (1932). Equol, a new inactive phenol isolated from the ketohydroxyestrin fraction of mare's urine. *Biochemical Journal* 26, 1226-1232.
- Mathey, J., Lamothe, V., Coxam, V., Potier, M., Sauvant, P., et Pelissero, C. B. (2006). Concentrations of isoflavones in plasma and urine of post-menopausal women chronically ingesting high quantities of soy isoflavones. *J Pharm Biomed Anal* 41, 957-965.
- Mauvais-Charvis, P., Sitruck-Ware, R., et Labrie, F. (1983). Médecine de la reproduction, gynécologie endocrinienne. In, Flammarion, ed., pp. 89-101.
- Mazur, W. (1998). Phytoestrogen content in foods. *Baillieres Clin Endocrinol Metab* 12, 729-742.
- Mazur, W., et Adlercreutz, H. (1998). Naturally occurring oestrogens in food. *Pure & Applied Chem* 70, 1759-1776.
- Mazur, W., Fotsis, T., Wahala, K., Ojala, S., Salakka, A., et Adlercreutz, H. (1996). Isotope dilution gas chromatographic-mass spectrometric method for the determination of isoflavonoids, coumestrol, and lignans in food samples. *Anal Biochem* 233, 169-180.
- McEwen, B. S., et Alves, S. E. (1999). Estrogen actions in the central nervous system. *Endocr Rev* 20, 279-307.
- McLachlan, J. A., Korach, K. S., Newbold, R. R., et Degen, G. H. (1984). Diethylstilbœstrol and other estrogens in the environment. *Fund Appl Toxicol* 4, 646-691.
- McMichael-Phillips, D. F., Harding, C., Morton, M., Roberts, S. A., Howell, A., Potten, C. S., et Bundred, N. J. (1998). Effects of soy-protein supplementation on epithelial proliferation in the histologically normal human breast. *Am J Clin Nutr* 68, 1431S-1435S.
- Mei, J., Yeung, S. S., et Kung, A. W. (2001). High dietary phytoestrogen intake is associated with higher bone mineral density in postmenopausal but not premenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab* 86, 5217-5221.
- Messina, M. (2006). 4th International Soy and Health Conference (Düsseldorf, Germany).

- Messina, M., Ho, S., et Alekel, D. L. (2004). Skeletal benefits of soy isoflavones: a review of the clinical trial and epidemiologic data. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 7, 649-658.
- Messina, M., Nagata, C., et Wu, A. H. (2006). Estimated Asian adult soy protein and isoflavone intakes. *Nutr Cancer* 55, 1-12.
- Moore, J. T., McKee, D. D., Slentz-Kesler, K., Moore, L. B., Jones, S. A., Horne, E. L., Su, J. L., Kliever, S. A., Lehmann, J. M., et Willson, T. M. (1998). Cloning and characterization of human estrogen receptor beta isoforms. *Biochem Biophys Res Commun* 247, 75-78.
- Morabito, N., Crisafulli, A., Vergara, C., Gaudio, A., Lasco, A., Frisina, N., D'Anna, R., Corrado, F., Pizzoleo, M. A., Cincotta, M., *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, 1904-1912.
- Morris, C., Thorpe, J., Ambrosio, L., et Santin, M. (2006). The soybean isoflavone genistein induces differentiation of MG63 human osteosarcoma osteoblasts. *J Nutr* 136, 1166-1170.
- Morton, M. S., Chan, P. S., Cheng, C., Blacklock, N., Matos-Ferreira, A., Abranches-Monteiro, L., Correia, R., Lloyd, S., et Griffiths, K. (1997). Lignans and isoflavonoids in plasma and prostatic fluid in men: samples from Portugal, Hong Kong, and the United Kingdom. *Prostate* 32, 122-128.
- 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, 155-165.
- Muir, A. D. (2006). Flax lignans--analytical methods and how they influence our understanding of biological activity. *J AOAC Int* 89, 1147-1157.
- Murota, K., Shimizu, S., Miyamoto, S., Izumi, T., Obata, A., Kikuchi, M., et Terao, J. (2002). Unique uptake and transport of isoflavone aglycones by human intestinal caco-2 cells: comparison of isoflavonoids and flavonoids. *J Nutr* 132, 1956-1961.
- Murphy, P. A., Song, T., Buseman, G., Barua, K., Beecher, G. R., Trainer, D., et Holden, J. (1999). Isoflavones in retail and institutional soy foods. *J Agric Food Chem* 47, 2697-2704.
- Muthyala, R. S., Ju, Y. H., Sheng, S., Williams, L. D., Doerge, D. R., Katzenellenbogen, B. S., Helferich, W. G., et Katzenellenbogen, J. A. (2004). Equol, a natural estrogenic metabolite from soy isoflavones: convenient preparation and resolution of R- and S-equols and their differing binding and biological activity through estrogen receptors alpha and beta. *Bioorg Med Chem* 12, 1559-1567.
- Nagata, C., Shimizu, H., Takami, R., Hayashi, M., Takeda, N., et Yasuda, K. (1999). Hot flushes and other menopausal symptoms in relation to soy product intake in Japanese women. *Climacteric* 2, 6-12.
- ## N
- Nagel, S. C., vom Saal, F. S., et Welshons, W. V. (1998). The effective free fraction of estradiol and xenoestrogens in human serum measured by whole cell uptake assays: physiology of delivery modifies estrogenic activity. *Proc Soc Exp Biol Med* 217, 300-309.
- Nakajima, N., Nozaki, N., Ishihara, K., Ishikawa, A., et Tsuji, H. (2005). Analysis of isoflavone content in tempeh, a fermented soybean, and preparation of a new isoflavone-enriched tempeh. *J Biosci Bioeng* 100, 685-687.
- Nelson, H. D., Vesco, K. K., Haney, E., Fu, R., Nedrow, A., Miller, J., Nicolaidis, C., Walker, M., et Humphrey, L. (2006). Nonhormonal therapies for menopausal hot flashes: systematic review and meta-analysis. *Jama* 295, 2057-2071.
- Netter, A. (1991). La ménopause. In *La reproduction chez les mammifères et chez l'Homme*, INRA, ed. (Thibault and Levasseur).
- Nijveldt, R. J., van Nood, E., van Hoorn, D. E., Boelens, P. G., van Norren, K., et van Leeuwen, P. A. (2001). Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. *Am J Clin Nutr* 74, 418-425.
- Nikander, E., Kilkkinen, A., Metsa-Heikkilä, M., Adlercreutz, H., Pietinen, P., Tiitinen, A., et Ylikorkala, O. (2003). A randomized placebo-controlled crossover trial with phytoestrogens in treatment of menopause in breast cancer patients. *Obstet Gynecol* 101, 1213-1220.
- Nikov, G. N., Hopkins, N. E., Boue, S., et 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, 867-872.
- Nishiyama, T., Ogura, K., Nakano, H., Kaku, T., Takahashi, E., Ohkubo, Y., Sekine, K., Hiratsuka, A., Kadota, S., et Watabe, T. (2002). Sulfation of environmental estrogens by cytosolic human sulfotransferases. *Drug Metab Pharmacokin* 17, 221-228.
- ## O
- Obst, J. M., et Seamark, R. F. (1970). Plasma progesterone concentrations during the reproductive cycle of ewes grazing Yarloop clover. *J Reprod Fertil* 21, 545-547.

- O'Leary, K. A., Day, A. J., Needs, P. W., Sly, W. S., O'Brien, N. M., et Williamson, G. (2001). Flavonoid glucuronides are substrates for human liver beta-glucuronidase. *FEBS Lett* 503, 103-106.
- Osterlund, M. K., Witt, M. R., et Gustafsson, J. A. (2005). Estrogen action in mood and neurodegenerative disorders: estrogenic compounds with selective properties-the next generation of therapeutics. *Endocrine* 28, 235-242.
- Oursler, M. J., Osdoby, P., Pyfferoen, J., Riggs, B. L., et Spelsberg, T. C. (1991). Avian osteoclasts as estrogen target cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 6613-6617.
- Pacifici, R. (1996). Estrogen, cytokines, and pathogenesis of postmenopausal osteoporosis. *J Bone Miner Res* 11, 1043-1051.

**P**

- Petit, F., Le Goff, P., Cravedi, J. P., Valotaire, Y., et Pakdel, F. (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, 321-335.
- Picherit, C., Bennetau-Pelissero, C., Chanteranne, B., Lebecque, P., Davicco, M.-J., Barlet, J.-P., et 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, M. J., Lebecque, P., Barlet, J. P., et 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, M. J., Lebecque, P., et Barlet, J. P. (2000). Daidzein is more efficient than genistein in preventing ovariectomy-induced bone loss in rats. *J Nutr* 130, 1675-1681.
- Pike, A. C., Brzozowski, A. M., Hubbard, R. E., Bonn, T., Thorsell, A. G., Engstrom, O., Ljunggren, J., Gustafsson, J. A., et Carlquist, M. (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, 4608-4618.
- Pino, A. M., Valladares, L. E., Palma, M. A., Mancilla, A. M., Yanez, M., et Albala, C. (2000). Dietary isoflavones affect sex hormone-binding globulin levels in postmenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab* 85, 2797-2800.
- Piskula, M. K., Yamakoshi, J., et Iwai, Y. (1999). Daidzein and genistein but not their glucosides are absorbed from the rat stomach. *FEBS Lett* 447, 287-291.
- Potter, S. M., Baum, J. A., Teng, H., Stillman, R. J., Shay, N. F., et Erdman, J. W., Jr. (1998). Soy protein and isoflavones: their effects on blood lipids and bone density in postmenopausal women. *Am J Clin Nutr* 68, 1375S-1379S.
- Psychoyos, A. (1983). La reproduction. In *Physiologie humaine*, P. Meyer, ed. (Malesherbes).

**R**

- Rassi, C. M., Lieberherr, M., Chaumaz, G., Pointillart, A., et Cournot, G. (2002). Down-regulation of osteoclast differentiation by daidzein via caspase 3. *J Bone Miner Res* 17, 630-638.
- Reed, M. J., et Fotherby, K. (1980). Interaction of ethinyloestradiol sulphate with plasma proteins. *J Steroid Biochem* 13, 495-497.
- Register, T. C., Jayo, M. J., et Anthony, M. S. (2003). Soy phytoestrogens do not prevent bone loss in postmenopausal monkeys. *J Clin Endocrinol Metab* 88, 4362-4370.
- Reifenstein, E. C., et Albright, F. (1947). The Metabolic Effects of Steroid Hormones in Osteoporosis. *J Clin Invest* 26, 24-56.
- Reinli, K., et Block, G. (1996). Phytoestrogen content of foods--a compendium of literature values. *Nutr Cancer* 26, 123-148.
- Reynolds, K., Chin, A., Lees, K. A., Nguyen, A., Bujnowski, D., et He, J. (2006). A meta-analysis of the effect of soy protein supplementation on serum lipids. *Am J Cardiol* 98, 633-640.
- Richelle, M., Pridmore-Merten, S., Bodenstab, S., Enslin, M., et Offord, E. A. (2002). Hydrolysis of isoflavone glycosides to aglycones by beta-glycosidase does not alter plasma and urine isoflavone pharmacokinetics in postmenopausal women. *J Nutr* 132, 2587-2592.
- Rickard, D. J., Monroe, D. G., Ruesink, T. J., Khosla, S., Riggs, B. L., et Spelsberg, T. C. (2003). Phytoestrogen genistein acts as an estrogen agonist on human osteoblastic cells through estrogen receptors alpha and beta. *J Cell Biochem* 89, 633-646.
- Rickard, D. J., Subramaniam, M., et Spelsberg, T. C. (1999). Molecular and cellular mechanisms of estrogen action on the skeleton. *J Cell Biochem Suppl* 32-33, 123-132.
- Ritchie, M. R., Cummings, J. H., Morton, M. S., Michael Steel, C., Bolton-Smith, C., et Riches, A. C. (2006). A newly constructed and validated isoflavone database for the assessment of total genistein and daidzein intake. *Br J Nutr* 95, 204-213.

- Ross, P. D., Norimatsu, H., Davis, J. W., Yano, K., Wasnich, R. D., Fujiwara, S., Hosoda, Y., et Melton, L. J., 3rd (1991). A comparison of hip fracture incidence among native Japanese, Japanese Americans, and American Caucasians. *Am J Epidemiol* 133, 801-809.
- Rossouw, J. E., Anderson, G. L., Prentice, R. L., LaCroix, A. Z., Kooperberg, C., Stefanick, M. L., Jackson, R. D., Beresford, S. A., Howard, B. V., Johnson, K. C., *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, 321-333.
- Routledge, E. J., White, R., Parker, M. G., et Sumpter, J. P. (2000). Differential effects of xenoestrogens on coactivator recruitment by estrogen receptor (ER) alpha and ERbeta. *J Biol Chem* 275, 35986-35993.
- Rowland, I., Faughnan, M., Hoey, L., Wahala, K., Williamson, G., et Cassidy, A. (2003). Bioavailability of phyto-oestrogens. *Br J Nutr* 89 Suppl 1, S45-58.
- Rowland, I. R., Wiseman, H., Sanders, T. A., Adlercreutz, H., et Bowey, E. A. (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.

## S

- Sacks, F. M., et Walsh, B. W. (1994). Sex hormones and lipoprotein metabolism. *Curr Opin Lipidol* 5, 236-240.
- 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., Borriello, S. P., Hulme, P., Kirk, D. N., et Axelson, M. (1984). Nonsteroidal estrogens of dietary origin: possible roles in hormone-dependent disease. *Am J Clin Nutr* 40, 569-578.
- Setchell, K. D., Brown, N. M., Desai, P., Zimmer-Nechemias, L., Wolfe, B. E., Brashear, W. T., Kirschner, A. S., Cassidy, A., et Heubi, J. E. (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., Desai, P. B., Zimmer-Nechemias, L., Wolfe, B., Jakate, A. S., Creutzinger, V., et Heubi, J. E. (2003a). Bioavailability, disposition, and dose-response effects of soy isoflavones when consumed by healthy women at physiologically typical dietary intakes. *J Nutr* 133, 1027-1035.
- Setchell, K. D., Brown, N. M., et Lydeking-Olsen, E. (2002a). The clinical importance of the metabolite equol—a clue to the effectiveness of soy and its isoflavones. *J Nutr* 132, 3577-3584.
- Setchell, K. D., Brown, N. M., Zimmer-Nechemias, L., Brashear, W. T., Wolfe, B. E., Kirschner, A. S., et Heubi, J. E. (2002b). Evidence for lack of absorption of soy isoflavone glycosides in humans, supporting the crucial role of intestinal metabolism for bioavailability. *Am J Clin Nutr* 76, 447-453.
- Setchell, K. D., Brzezinski, A., Brown, N. M., Desai, P. B., Melhem, M., Meredith, T., Zimmer-Nechemias, L., Wolfe, B., Cohen, Y., et Blatt, Y. (2005a). Pharmacokinetics of a slow-release formulation of soybean isoflavones in healthy postmenopausal women. *J Agric Food Chem* 53, 1938-1944.
- Setchell, K. D., et Cassidy, A. (1999). Dietary isoflavones: biological effects and relevance to human health. *J Nutr* 129, 758S-767S.
- Setchell, K. D., Clerici, C., Lephart, E. D., Cole, S. J., Heenan, C., Castellani, D., Wolfe, B. E., Nechemias-Zimmer, L., Brown, N. M., Lund, T. D., *et al.* (2005b). S-equol, a potent ligand for estrogen receptor beta, is the exclusive enantiomeric form of the soy isoflavone metabolite produced by human intestinal bacterial flora. *Am J Clin Nutr* 81, 1072-1079.
- Setchell, K. D., et Cole, S. J. (2006). Method of defining equol-producer status and its frequency among vegetarians. *J Nutr* 136, 2188-2193.
- Setchell, K. D., Faughnan, M. S., Avades, T., Zimmer-Nechemias, L., Brown, N. M., Wolfe, B. E., Brashear, W. T., Desai, P., Oldfield, M. F., Botting, N. P., et Cassidy, A. (2003b). 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, 411-419.
- Setchell, K. D., Lawson, A. M., Borriello, S. P., Harkness, R., Gordon, H., Morgan, D. M., Kirk, D. N., Adlercreutz, H., Anderson, L. C., et Axelson, M. (1981). Lignan formation in man—microbial involvement and possible roles in relation to cancer. *Lancet* 2, 4-7.
- Setchell, K. D., et 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.
- Setchell, K. D., Zimmer-Nechemias, L., Cai, J., et Heubi, J. E. (1997). Exposure of infants to phyto-oestrogens from soy-based infant formula. *Lancet* 350, 23-27.
- Setchell, K. D. R., et Adlercreutz, H. (1988). Mammalian lignans and phyto-oestrogens recent studies on their formation, metabolism and biological role in health and disease. In *Role of gut flora in toxicity and cancer*, I. R. Rowland, ed. (Bibra, Carshalton, UK, Academic press limited), pp. 315-345.
- Sfakianos, J., Coward, L., Kirk, M., et Barnes, S. (1997). Intestinal uptake and biliary excretion of the isoflavone genistein in rats. *J Nutr* 127, 1260-1268.

- Shelnutt, S. R., Cimino, C. O., Wiggins, P. A., Ronis, M. J., et Badger, T. M. (2002). Pharmacokinetics of the glucuronide and sulfate conjugates of genistein and daidzein in men and women after consumption of a soy beverage. *Am J Clin Nutr* 76, 588-594.
- Shemesh, M., Lindner, H. R., et Ayalon, N. (1972). Affinity of rabbit uterine oestradiol receptor for phyto-oestrogens and its use in a competitive protein-binding radioassay for plasma coumestrol. *J Reprod Fertil* 29, 1-9.
- Shimoi, K., Saka, N., Kaji, K., Nozawa, R., et Kinae, N. (2000). Metabolic fate of luteolin and its functional activity at focal site. *Biofactors* 12, 181-186.
- Shutt, D. A., et Cox, R. I. (1972). Steroid and phyto-oestrogen binding to sheep uterine receptors in vitro. *J Endocrinol* 52, 299-310.
- Siggelkow, H., Rebenstorff, K., Kurre, W., Niedhart, C., Engel, I., Schulz, H., Atkinson, M. J., et Hufner, M. (1999). Development of the osteoblast phenotype in primary human osteoblasts in culture: comparison with rat calvarial cells in osteoblast differentiation. *J Cell Biochem* 75, 22-35.
- Simons, A. L., Renouf, M., Hendrich, S., et Murphy, P. A. (2005). Metabolism of glycitein (7,4'-dihydroxy-6-methoxy-isoflavone) by human gut microflora. *J Agric Food Chem* 53, 8519-8525.
- Simpson, E. R. (2003). Sources of estrogen and their importance. *J Steroid Biochem Mol Biol* 86, 225-230.
- Sizomenko, P. M. (1983). Les gonades. In *Physiologie humaine*, P. Meyer, ed. (Malesherbes).
- Slavin, J. L., Karr, S. C., Hutchins, A. M., et Lampe, J. W. (1998). Influence of soybean processing, habitual diet, and soy dose on urinary isoflavonoid excretion. *Am J Clin Nutr* 68, 1492S-1495S.
- Somekawa, Y., Chiguchi, M., Ishibashi, T., et Aso, T. (2001). Soy intake related to menopausal symptoms, serum lipids, and bone mineral density in postmenopausal Japanese women. *Obstet Gynecol* 97, 109-115.
- Song, K. B., Atkinson, C., Frankenfeld, C. L., Jokela, T., Wahala, K., Thomas, W. K., et Lampe, J. W. (2006). Prevalence of daidzein-metabolizing phenotypes differs between Caucasian and Korean American women and girls. *J Nutr* 136, 1347-1351.
- Soto, A. M., Sonnenschein, C., Chung, K. L., Fernandez, M. F., Olea, N., et Serrano, F. O. (1995). The E-SCREEN assay as a tool to identify estrogens: an update on estrogenic environmental pollutants. *Environ Health Perspect* 103 Suppl 7, 113-122.
- Squadrito, F., Altavilla, D., Crisafulli, A., Saitta, A., Cucinotta, D., Morabito, N., D'Anna, R., Corrado, F., Ruggeri, P., Frisina, N., et Squadrito, G. (2003). Effect of genistein on endothelial function in postmenopausal women: a randomized, double-blind, controlled study. *Am J Med* 114, 470-476.
- Sugimoto, E., et Yamaguchi, M. (2000). Stimulatory effect of Daidzein in osteoblastic MC3T3-E1 cells. *Biochem Pharmacol* 59, 471-475.
- T**
- Thompson, L. U., Boucher, B. A., Liu, Z., Cotterchio, M., et Kreiger, N. (2006). Phytoestrogen content of foods consumed in Canada, including isoflavones, lignans, and coumestrol. *Nutr Cancer* 54, 184-201.
- Torii, Y., Hitomi, K., Yamagishi, Y., et Tsukagoshi, N. (1996). Demonstration of alkaline phosphatase participation in the mineralization of osteoblasts by antisense RNA approach. *Cell Biol Int* 20, 459-464.
- Tostes, R. C., Nigro, D., Fortes, Z. B., et Carvalho, M. H. (2003). Effects of estrogen on the vascular system. *Braz J Med Biol Res* 36, 1143-1158.
- Totta, P., Acconcia, F., Virgili, F., Cassidy, A., Weinberg, P. D., Rimbach, G., et Marino, M. (2005). Daidzein-sulfate metabolites affect transcriptional and antiproliferative activities of estrogen receptor-beta in cultured human cancer cells. *J Nutr* 135, 2687-2693.
- Tsuchida, K., Mizushima, S., Toba, M., et Soda, K. (1999). Dietary soybeans intake and bone mineral density among 995 middle-aged women in Yokohama. *J Epidemiol* 9, 14-19.
- U**
- Upmalis, D. H., Lobo, R., Bradley, L., Warren, M., Cone, F. L., et Lamia, C. A. (2000). Vasomotor symptom relief by soy isoflavone extract tablets in postmenopausal women: a multicenter, double-blind, randomized, placebo-controlled study. *Menopause* 7, 236-242.
- Valloton, M. B. (1983). Les glandes endocrines. In *Physiologie humaine*, P. Meyer, ed. (Malesherbes).
- van Erp-Baart, M. A., Brants, H. A., Kiely, M., Mulligan, A., Turrini, A., Sermoneta, C., Kilkkinen, A., et Valsta, L. M. (2003). Isoflavone intake in four different European countries: the VENUS approach. *Br J Nutr* 89 Suppl 1, S25-30.
- Van Patten, C. L., Olivotto, I. A., Chambers, G. K., Gelmon, K. A., Hislop, T. G., Templeton, E., Wattie, A., et Prior, J. C. (2002). Effect of soy phytoestrogens on hot flashes in postmenopausal women with breast cancer: a randomized, controlled clinical trial. *J Clin Oncol* 20, 1449-1455.
- V**

Vedrine, N., Mathey, J., Morand, C., Brandolini, M., Davicco, M. J., Guy, L., Remesy, C., Coxam, V., et Manach, C. (2006). One-month exposure to soy isoflavones did not induce the ability to produce equol in postmenopausal women. *Eur J Clin Nutr* 60, 1039-1045.

Vergne, S., et Sauvant, P. (2006). Les isoflavones de soja dans le traitement de la ménopause. *Phytothérapie* 4, 172-180.

## W

Walle, T. (2004). Absorption and metabolism of flavonoids. *Free Radic Biol Med* 36, 829-837.

Walle, T., Browning, A. M., Steed, L. L., Reed, S. G., et Walle, U. K. (2005). Flavonoid glucosides are hydrolyzed and thus activated in the oral cavity in humans. *J Nutr* 135, 48-52.

Walsh, D. E., Dockery, P., et Doolan, C. M. (2005). Estrogen receptor independent rapid non-genomic effects of environmental estrogens on [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> in human breast cancer cells. *Mol Cell Endocrinol* 230, 23-30.

Ward, W. E., Kim, S., Chan, D., et Fonseca, D. (2005). Serum equol, bone mineral density and biomechanical bone strength differ among four mouse strains. *J Nutr Biochem* 16, 743-749.

Watanabe, S., Yamaguchi, M., Sobue, T., Takahashi, T., Miura, T., Arai, Y., Mazur, W., Wahala, K., et Adlercreutz, H. (1998). Pharmacokinetics of soybean isoflavones in plasma, urine and feces of men after ingestion of 60 g baked soybean powder (kinako). *J Nutr* 128, 1710-1715.

Watson, C. S., Norfleet, A. M., Pappas, T. C., et Gametchu, B. (1999). Rapid actions of estrogens in GH3/B6 pituitary tumor cells via a plasma membrane version of estrogen receptor-alpha. *Steroids* 64, 5-13.

Weggemans, R. M., et Trautwein, E. A. (2003). Relation between soy-associated isoflavones and LDL and HDL cholesterol concentrations in humans: a meta-analysis. *Eur J Clin Nutr* 57, 940-946.

Wennberg, C., Hessel, L., Lundberg, P., Mauro, S., Narisawa, S., Lerner, U. H., et Millan, J. L. (2000). Functional characterization of osteoblasts and osteoclasts from alkaline phosphatase knockout mice. *J Bone Miner Res* 15, 1879-1888.

Wiegel, N. L. (1996). Steroid hormone receptors and their regulation by phosphorylation. *Biochem J* 319, 657-667.

Williams, J. P., Jordan, S. E., Barnes, S., et Blair, H. C. (1998). Tyrosine kinase inhibitor effects on avian osteoclastic acid transport. *Am J Clin Nutr* 68, 1369S-1374S.

Wiseman, H., Casey, K., Bowey, E. A., Duffy, R., Davies, M., Rowland, I. R., Lloyd, A. S., Murray, A., Thompson, R., et Clarke, D. B. (2004). Influence of 10 wk of soy consumption on plasma concentrations and excretion of isoflavonoids and on gut microflora metabolism in healthy adults. *Am J Clin Nutr* 80, 692-699.

Wu, J., Oka, J., Tabata, I., Higuchi, M., Toda, T., Fuku, N., Ezaki, J., Sugiyama, F., Uchiyama, S., Yamada, K., et Ishimi, Y. (2006). Effects of isoflavone and exercise on BMD and fat mass in postmenopausal Japanese women: a 1-year randomized placebo-controlled trial. *J Bone Miner Res* 21, 780-789.

## X

Xu, X., Harris, K. S., Wang, H. J., Murphy, P. A., et Hendrich, S. (1995). Bioavailability of soybean isoflavones depends upon gut microflora in women. *J Nutr* 125, 2307-2315.

Xu, X., Wang, H. J., Murphy, P. A., Cook, L., et Hendrich, S. (1994). Daidzein is a more bioavailable soymilk isoflavone than is genistein in adult women. *J Nutr* 124, 825-832.

Xu, X., Wang, H. J., Murphy, P. A., et Hendrich, S. (2000). Neither background diet nor type of soy food affects short-term isoflavone bioavailability in women. *J Nutr* 130, 798-801.

Yamamoto, S., Sobue, T., Sasaki, S., Kobayashi, M., Arai, Y., Uehara, M., Adlercreutz, H., Watanabe, S., Takahashi, T., Itoi, Y., 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, 2741-2747.

## Y

Yano, K., Tsuda, E., Washida, N., Kobayashi, F., Goto, M., Harada, A., Ikeda, K., Higashio, K., et Yamada, Y. (1999). Immunological characterization of circulating osteoprotegerin/osteoclastogenesis inhibitory factor: increased serum concentrations in postmenopausal women with osteoporosis. *J Bone Miner Res* 14, 518-527.

Yeung, J., et Yu, T. F. (2003). Effects of isoflavones (soy phyto-estrogens) on serum lipids: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Nutr J* 2, 15.

## Z

Zhang, Y., Hendrich, S., et Murphy, P. A. (2003). Glucuronides are the main isoflavone metabolites in women. *J Nutr* 133, 399-404.

Zheng, Y., Hu, J., Murphy, P. A., Alekel, D. L., Franke, W. D., et Hendrich, S. (2003). Rapid gut transit time and slow fecal isoflavone disappearance phenotype are associated with greater genistein bioavailability in women. *J Nutr* 133, 3110-3116.

Zubik, L., et Meydani, M. (2003). Bioavailability of soybean isoflavones from aglycone and glucoside forms in American women. *Am J Clin Nutr* 77, 1459-1465.





# **Annexes**



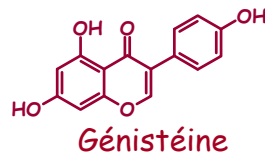
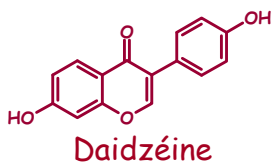
# Etude de biodisponibilité des isoflavones de deux formulations d'un complément alimentaire à base de soja, Phytosoya®

Sébastien Vergne<sup>1,2</sup>, Karine Titier<sup>3</sup>, Philippe Chantre<sup>2</sup>, Valérie Lamothe<sup>1</sup>, Paul Pérez<sup>4</sup>, Julien Asselineau<sup>4</sup>, Jacques Desmotes<sup>5</sup>, Marlène Durand<sup>5</sup>, Mylène Potier<sup>1</sup>, Nicholas Moore<sup>3</sup>, Catherine Bennetau-Pelissier<sup>1</sup>, Patrick Sauvant<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>ENITA, Unité Micronutriments, Reproduction, Santé (UMRS), Bordeaux, France; <sup>2</sup>Arkopharma, Laboratoires Pharmaceutiques, Carros, France; <sup>3</sup>Université Victor Segalen, Département de Pharmacologie, INSERM U657, Bordeaux, France; <sup>4</sup>CHU de Bordeaux, Unité de soutien Méthodologique à la Recherche clinique et méthodologique, Bordeaux, France; <sup>5</sup>CIC, INSERM-CHU de Bordeaux, France;

## Introduction

Les résultats d'études épidémiologiques de grande envergure, parmi lesquelles la Women's Health Initiative<sup>(1)</sup>, la Million Women Study<sup>(2)</sup>, ainsi que l'European Prospective Into Cancer -E3N<sup>(3)</sup>, ont apporté des résultats qui ont remis en cause la balance bénéfique/risque du traitement hormonal substitutif. Les phyto-œstrogènes, composés polyphénoliques extraits des plantes et doués d'activités œstrogéniques, présentent alors des intérêts thérapeutiques accrus. Les isoflavones (IF) de soja, daidzéine et génistéine, sont des phyto-œstrogènes qui semblent particulièrement intéressants pour leurs effets sur la santé et ceux sur les symptômes de la ménopause.



## But de l'étude

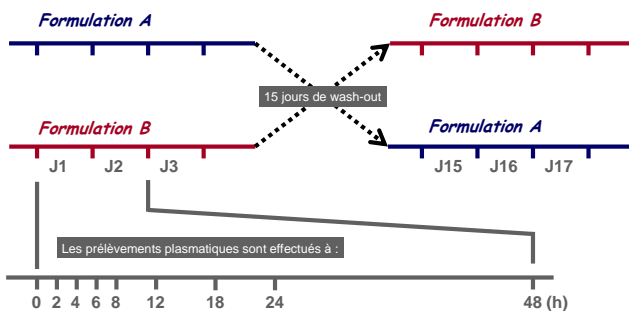
Différents procédés industriels permettent d'extraire les IF du soja. Le but de cette étude est de comparer la biodisponibilité des IF dans deux compléments alimentaires à base de soja, Phytosoya® (Arkopharma, Carros, France) dont les formulations diffèrent principalement par leur contenu en protéines de soja.

	PHYTOSOYA®	
	Formulation A	Formulation B
Extrait de soja à 10% IF	175	128
Farine de soja à 2,5% IF	0	197
Cellulose microcristalline	152	0

Composition de chaque formulation (A et B) de Phytosoya®. Les résultats sont exprimés en mg par gélule.

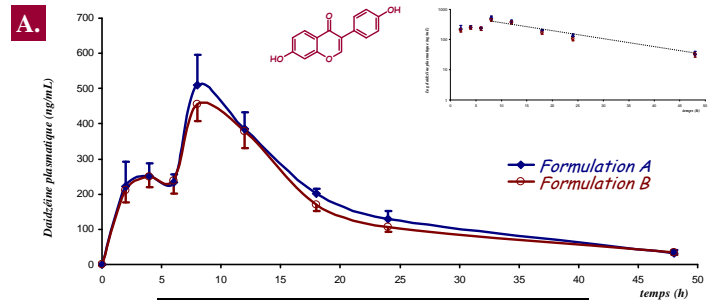
## Matériels et Méthodes

Cet essai clinique est une étude cross over randomisée, en double aveugle. Les 12 volontaires sont de jeunes hommes et reçoivent chacun en prise aigüe 5 gélules de Phytosoya®, soient 87,5 et 88,63 mg d'IF totales pour les formulations A et B respectivement. Les concentrations d'IF plasmatiques sont mesurées par ELISA.<sup>(4)</sup>

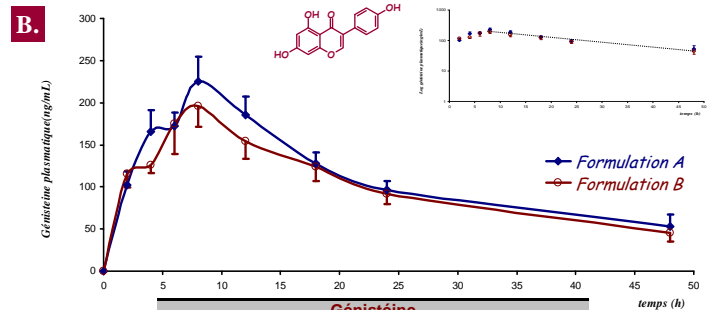


Les formulations sont considérées bioéquivalentes si la moyenne du rapport de l'AUC<sub>0-∞</sub> et du C<sub>max</sub> des deux formulations ainsi que leur intervalle de confiance à 90% (IC<sub>90</sub>) sont compris dans l'intervalle 0,7-1,43 et 0,8-1,25 respectivement, en accord avec les règles en vigueur de l'European Medicine Evaluation Agency.

## Résultats



	Moyenne		Rapport (±IC <sub>90</sub> )
	Formulation A	Formulation B	
AUC (ng.mL <sup>-1</sup> .h)	7978	8425	1,06 (0,93-1,18)
C <sub>max</sub> (ng.mL <sup>-1</sup> )	508	567	1,12 (0,84-1,39)
T <sub>max</sub> (h)	8,7	8,2	0,94 (0,63-1,25)
T <sub>1/2</sub> (h)	9,7	8,4	0,87 (0,55-1,18)



	Moyenne		Rapport (±IC <sub>90</sub> )
	Formulation A	Formulation B	
AUC (ng.mL <sup>-1</sup> .h)	6150	5863	0,95 (0,80-1,10)
C <sub>max</sub> (ng.mL <sup>-1</sup> )	254	261	1,03 (0,75-1,30)
T <sub>max</sub> (h)	7,7	7,7	1,00 (0,84-1,16)
T <sub>1/2</sub> (h)	20,0	14,9	0,74 (0,43-1,01)

Profil pharmacocinétiques des concentrations plasmatiques (moyenne ± s.e.m.) en IF, daidzéine (fig A) et génistéine (fig B), des 12 volontaires sains pour la formulation A et la formulation B. Les valeurs des paramètres pharmacologiques principaux, AUC, C<sub>max</sub>, T<sub>max</sub> et T<sub>1/2</sub>, sont également représentées dans les tableaux sous leurs figures respectives.

## Discussion - Conclusion

Les IF sont absorbées rapidement par l'organisme. Les profils pharmacocinétiques présentent un double pic d'absorption, qui laisse supposer que les IF subissent un recyclage entéro-hépatique. Les valeurs des paramètres pharmacocinétiques sont cohérentes avec la littérature.<sup>(5)</sup>

**Cette étude démontre la bioéquivalence de deux formulations du complément alimentaire à base de soja, Phytosoya®.**

Les farines de soja, contenant principalement des protéines de soja, n'influent donc pas sur l'absorption ni l'élimination des IF.

## Bibliographie

- (1) Rossouw *et al.*, Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results from the Women's Health Initiative randomized controlled trial, JAMA, 2002.
- (2) Beral, Breast cancer and hormone-replacement therapy in the Million Women Study, Lancet.2003.
- (3) Fournier *et al.*, Breast cancer risk in relation to different types of hormone replacement therapy in the E3N-EPIC cohort, Int J Cancer, 2005.
- (4) Bennetau *et al.*, ELISA as a new method to measure genistein and daidzein in food and human fluids, Food Chem, 2003.
- (5) Richelle *et al.*, Hydrolysis of isoflavone glycosides to aglycones by beta-glycosidase does not alter plasma and urine isoflavone pharmacokinetics in postmenopausal women, J Nutr, 2002.





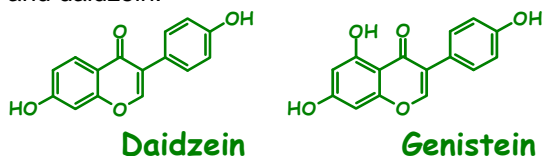
# Isoflavones contained in soy based capsules are more bioavailable compared with soy based cheese after single ingestion in Humans

Sébastien Vergne<sup>1,2</sup>, Philippe Chantre<sup>2</sup>, Jean-James Garreau<sup>3</sup>, Valérie Lamothe<sup>1</sup>, Paul Pérez<sup>4</sup>, Jacques Desmotes<sup>5</sup>, Mylène Potier<sup>1</sup>, Nicholas Moore<sup>6</sup>, Catherine Bennetau-Pelissero<sup>1</sup>, Patrick Sauvant<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>ENITA, Unité Micronutriments, Reproduction, Santé (UMRS), Bordeaux, France; <sup>2</sup>Arkopharma, Laboratoires Pharmaceutiques, Carros, France; <sup>3</sup>Le Sojami, Agen, France; <sup>4</sup>CHU de Bordeaux, Unité de soutien Méthodologique à la Recherche clinique et méthodologique, Bordeaux, France; <sup>5</sup>CIC, INSERM-CHU de Bordeaux, France; <sup>6</sup>Université Victor Segalen, Département de Pharmacologie, INSERM U657, Bordeaux, France.

## Introduction

It is now considered that the risks of hormone replacement therapy (HRT) for menopausal women outweigh their potential net benefits<sup>1</sup>. Therefore, it is now of interest to find compounds limiting the risks and emphasizing the benefits of HRT. Beside these medical issues, there is a renewed interest in plant extracts containing polyphenolic compounds with estrogenic activity, the so-called phytoestrogens. Soy isoflavones (IF) seem to be particularly interesting according to their effects on menopausal symptoms and justify the success of soy food supplements. However scientific discrepancies exist on the physiological effects of IF, mainly genistein and daidzein.

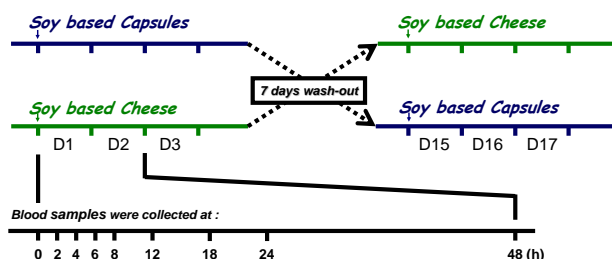


## Aim of the study

The bioavailability of IF could merely explain their different physiological effects described by numerous authors during the twenty past years. Different forms of soy-based food are available on the market. The aim of the present study was to compare the bioavailability of IF after ingestion of two soy food matrix in Humans: soy based capsule vs soy based cheese.

## Materials and Methods

The whole intake of IF remain the same for each soy food matrix. Study was performed with 12 healthy volunteers in a randomized, double-blind, 2-way crossover.



IF concentrations in blood were assessed by a validated ELISA method<sup>2</sup>.

All pharmacokinetic parameters ( $C_{max}$ ,  $AUC_{0 \rightarrow \infty}$ ,  $T_{max}$  and elimination  $T_{1/2}$ ) and statistical evaluation of the crossover study design, were performed by the pharmacokinetic software PK-FIT version 1.2 (RDPP, Montpellier, France).

## Results

**A.**

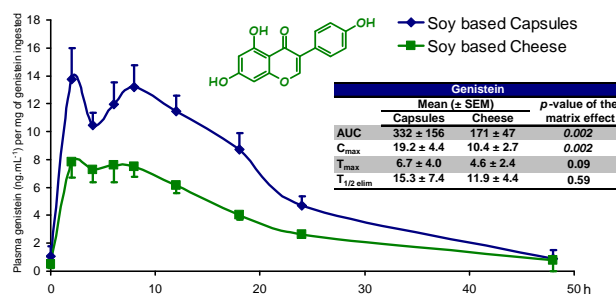
	Phytosoya®	Le Sojami®
Genistein	6.76	19.04
Daidzein	28.24	15.68
<b>Total Aglycone IF</b>	<b>35.00</b>	<b>34.72</b>

Values are expressed in mg

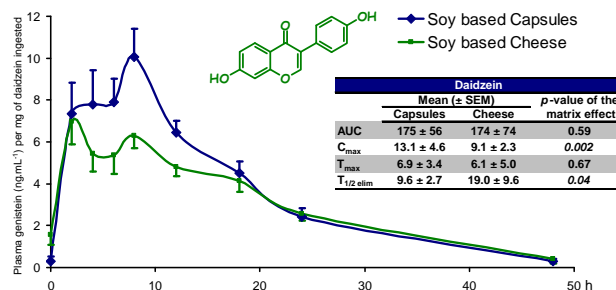


IF concentrations in food matrix: 4 capsules of Phytosoya® were used and 56 mg of cheese, in order to equilibrate the whole isoflavones intake.

**B.**



**C.**



Time-course of plasma genistein (B) and daidzein (C) concentrations (mean ± SEM) in twelve volunteers following soy-based capsules and cheese capsule intake. Plasma IF concentrations are expressed in ng.mL<sup>-1</sup> per mg of IF ingested. Main pharmacokinetic parameters can be found in tables associated with graphics.

## Discussion - Conclusion

Pharmacokinetic values are in accordance with those found in previous studies<sup>3</sup>. **These results demonstrate that IF contained in soy based capsules are more bioavailable compared than those contained in soy based cheese.**

The assessment of the pharmacokinetic characteristics of IF after the intake of different soy food matrix provides valuable data that can improve our understanding of isoflavone bioavailability.

## Bibliography

- (1) Fournier *et al.*, Breast cancer risk in relation to different types of hormone replacement therapy in the E3N-EPIC cohort, *Int J Cancer*, 2005.
- (2) Bennetau *et al.*, ELISA as a new method to measure genistein and daidzein in food and human fluids, *Food Chem*, 2003.
- (3) Richelle *et al.*, Hydrolysis of isoflavone glycosides to aglycones by beta-glycosidase does not alter plasma and urine isoflavone pharmacokinetics in postmenopausal women, *J Nutr*, 2002.



# Soy isoflavones modulate the phosphatase alkaline activity in human bone cells MG-63.

Sébastien Vergne<sup>1,2</sup>, Gilles Chaumaz<sup>3</sup>, Myriam Guillou<sup>1</sup>, Mylène Potier<sup>1</sup>, Christelle Rosier-Sala<sup>2</sup>, Catherine Bennetau-Pelissero<sup>1</sup>, Michèle Lieberherr<sup>3</sup>, Patrick Sauvant<sup>1</sup>.  
 1: ENITA, Micronutrients, Reproduction and Health Unit (UMRS), Bordeaux, France; 2: Arkopharma, Laboratoires Pharmaceutiques, Carros, France; 3: LNSA, Nationale Institute of Agronomic Research INRA, Jouy-en-Josas, France.



## Introduction

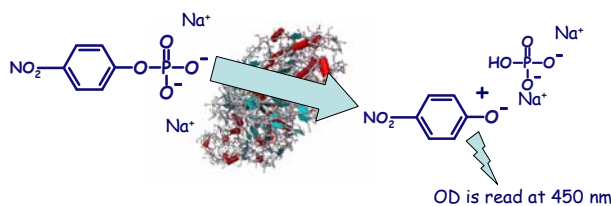
Osteoporosis is now recognized as an increasingly prevalent disorder throughout the world. The estrogen deficiency that follows menopause may play a primary role in osteoporosis. Although estrogen replacement has been the main therapy used to prevent and treat osteoporosis, there are concerns about its safety. These concerns have provided the rationale for the development of new therapeutic and preventive approaches, such as nutrition. Food containing soybeans provides isoflavone phytoestrogens that can preserve bone loss in postmenopausal women and prevent bone loss in ovariectomized rats.

## Aim of the study

The effects of daidzein, equol and genistein on the alkaline phosphatase (ALP) activity of MG-63, a human osteoblast cell line, were investigated. The ALP activity is a marker of the early osteoblast differentiation and its increased activity may be an important step in the bone mineralization process.

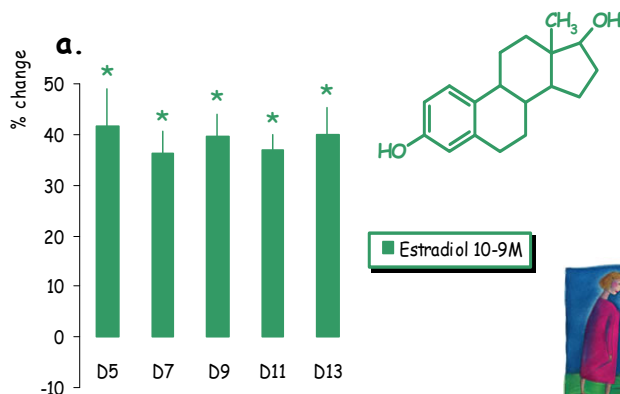
## Material and methods

MG-63 cells were seeded at 6,000 cells per well in 96-wells plate in phenol red free medium containing 10% charcoal stripped foetal calf serum. Concentrations of genistein, daidzein and equol ranging from  $10^{-5}$  M to  $10^{-9}$  M are used. Cell growth was assayed by staining the cells with methylene blue. The OD was measured at 620 nm and OD of 1 equals to  $5 \times 10^4$  cells. The alkaline phosphatase was assayed in living cells at 37°C with *p*-nitrophenylphosphate.

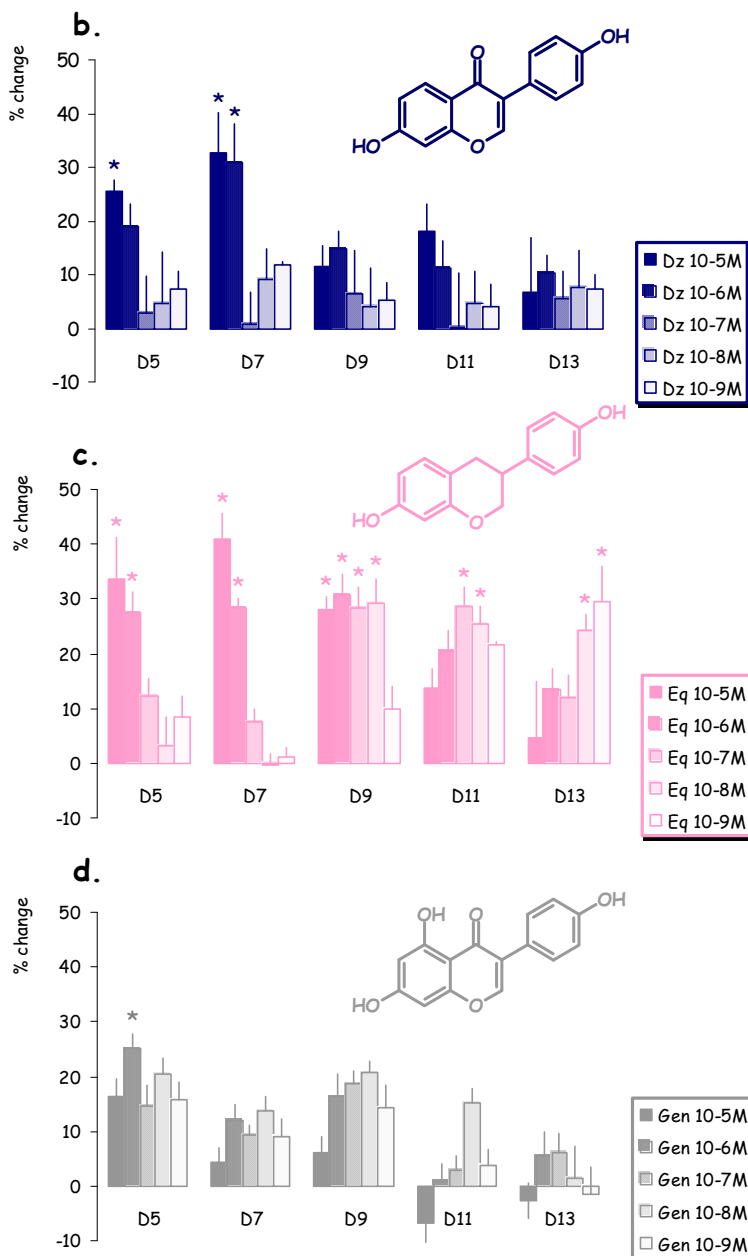


The ALP activity is the ratio between ALP and cell growth.

## Results



## Results



Effects of  $10^{-9}$  M estradiol (a), daidzein (b), equol (c), and genistein (d) on ALP activity. The values are expressed as a mean percentage of increase from control values  $\pm$  SEM, n=3. Data were analysed by Student's test. \*p<0.05, significant differences between treated cells and vehicle controls.

## Conclusion

The high concentrations of isoflavones, genistein and daidzein as well as its metabolite equol increase the ALP activity in the human bone cells MG-63 showing an effect on the early stage of osteoblast differentiation. In this case, equol is the most potent activator of ALP activity. Equol displays a sequential increase of ALP activity according to the concentration used. In this respect, it could be hypothesized the great interest of producing equol in osteoporosis prevention.





# The effects of physiological concentrations of soy isoflavones on bone cell differentiation, an *in vitro* study

Sébastien Vergne<sup>1,2</sup>, Gilles Chaumaz<sup>3</sup>, Laurence Aubert<sup>1</sup>, Christelle Rosier-Sala<sup>1</sup>, Mylène Potier<sup>2</sup>, Catherine Bennetau-Pelissero<sup>2</sup>, Michèle Lieberherr<sup>3</sup>, Patrick Sauvant<sup>2</sup>.  
<sup>1</sup>Arkopharma, Pharmaceutical Laboratories, Carros, France; <sup>2</sup>ENITA, Micronutrients, Reproduction and Health Unit, Bordeaux, France; <sup>3</sup>LNSA, Nationale Institute of Agronomic Research, Jouy-en-Josas, France.

## Introduction

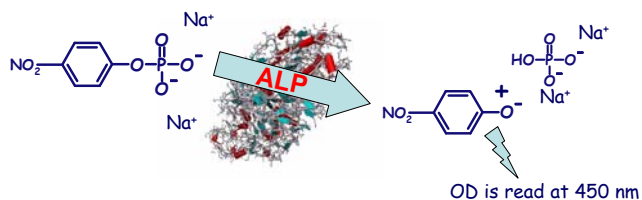
The estrogen deficiency that follows menopause may play a primary role in osteoporosis, an increasingly prevalent disorder throughout the world. Soy isoflavones (IF) are phenolic compounds which have chemical structure similar to that of 17 $\beta$ -estradiol.

## Aim of the study

We have therefore investigated the effects of physiological concentrations of IF on the alkaline phosphatase (ALP) activity of the human osteoblast cell line, MG-63. The ALP is a marker of the early osteoblast differentiation and its increased activity may be an important step in the mineralization process.

## Material and Methods

Blood samples were collected on 17 women who regularly consumed Phytosoya<sup>®</sup> pills. Concentrations of genistein, daidzein and equol were determined using ELISA method allowing us to determine 7 mixtures of physiological IF concentrations, representative for equol non-, low- and high-producers. Then, MG-63 cells were cultured for 13 days in phenol red-free DMEM supplemented with 10% fetal calf serum, and IF mixtures or vehicle. Cell growth was assayed by staining with methylene blue. The ALP was measured with *p*-nitrophenylphosphate as substrate.

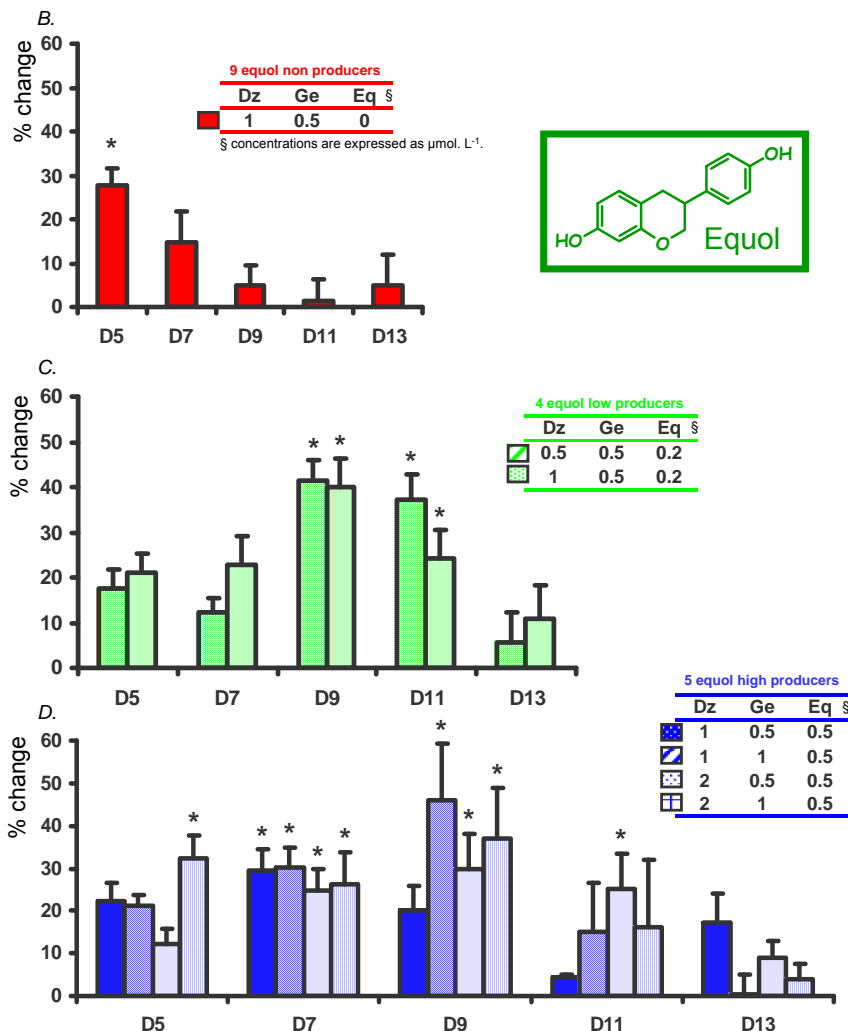


## Results (1)

A. The concentrations of IF in blood: results are expressed in  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ .

Volunteers	Daidzein	Genistein	Equol	
BOMA	0.10	0.08	ND	Non producers
PIAN	0.94	0.26	ND	
FRBE	1.42	0.47	ND	
DURE	1.19	0.30	ND	
SIMI	0.65	0.19	ND	
DACH	0.97	0.34	ND	
ANAN	2.03	0.67	ND	
DEMA	0.80	0.24	ND	Low
JOHE	1.21	0.49	ND	
BAHU	0.51	0.18	0.17	
BRDO	1.35	0.38	0.23	
CAMO	0.44	0.26	0.17	High
BEEL	0.45	0.41	0.25	
JACH	3.32	1.10	0.40	
PIGE	0.33	0.21	0.52	
JINE	0.77	0.29	0.45	
BENA	2.22	0.72	0.78	
LAAN	0.67	0.59	0.47	

## Results (2)



Effects of 7 different mix of IF physiological concentrations on ALP activity. The values are expressed as a mean percentage of increase from control values  $\pm$  SEM,  $n=3$ . Data were analysed by Student *t*-test. \* $p<0.05$ , significant differences between treated cells and vehicle controls.

## Discussion

Physiological concentrations of IF increased the ALP activity in the human bone cells MG-63 showing an effect on the early stage of osteoblast differentiation. These experiments also showed that equol is the most potent activator of ALP activity. In this respect, it could be hypothesized that producing equol is of interest in osteoporosis prevention.



# Equl-increased alkaline phosphatase activity in bone cells is mediated through estrogen receptors.

Sébastien Vergne<sup>1,2</sup>, Charlotte Carreau<sup>1</sup>, Gilles Chaumaz<sup>3</sup>, Mylène Potier<sup>1</sup>, Christelle Rosier-Sala<sup>2</sup>, Catherine Bennetau-Pelissero<sup>1</sup>, Michèle Lieberherr<sup>3</sup>, Patrick Sauvart<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>ENITA, Unité Micronutriments, Reproduction, Santé (UMRS), Bordeaux, France; <sup>2</sup>Arkopharma, Laboratoires Pharmaceutiques, Carros, France; <sup>3</sup>INRA, Laboratoire Nutrition et Sécurité Alimentaire, Jouy-en-Josas, France.

## Introduction

The estrogen deficiency that follows menopause may play a primary role in osteoporosis, an increasingly prevalent disorder throughout the world. Equl is a phenolic compound which has similar chemical structure than 17 $\beta$ -estradiol. It binds to estrogen receptors (ERs) and has estrogenic and/or anti-estrogenic actions. The extent of conversion of daidzein to its metabolite equl by intestinal microflora may be a critical step that determines if a diet rich in daidzein protects against the deterioration of bone after estrogen withdrawal [1]. The ALP is a marker of the early osteoblast differentiation and its increased activity may be an important step in the mineralization process.

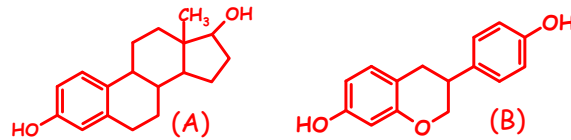


Fig.1. Chemical structures and similarities between of 17 $\beta$ -estradiol (A) and equl (B)

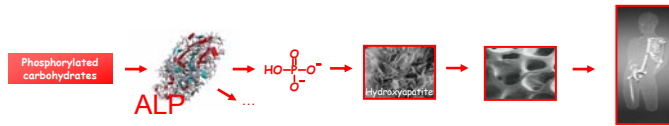


Fig.2. ALP is involved in the mineralization process and in the bone formation

## Aim of this study

This *in vitro* study focuses on the effects of equl on osteoblast differentiation and examines whether the ERs  $\alpha$  and  $\beta$  are involved in this mechanism.

## Methods

Human MG-63 osteosarcoma osteoblast cells were cultured for 13 days in phenol red-free DMEM supplemented with 10% fetal calf serum containing equl or vehicle. Concentrations of equl ranging from 10<sup>-9</sup> to 10<sup>-5</sup> M were used. Cell growth was assayed by staining the cells with methylene blue. ALP was measured in living cells at 37°C with *p*-nitrophenylphosphate as substrate [2]. The expression of ER $\alpha$  and ER $\beta$  were performed by western blots. Band densities were measured by ImageJ software.

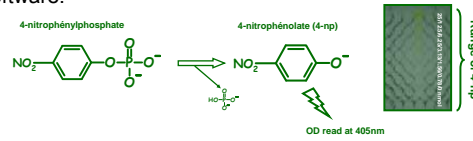


Fig.3. Biochemical method of ALP assessment

## Results

### 1. ER $\alpha$ and ER $\beta$ protein expression is function of time

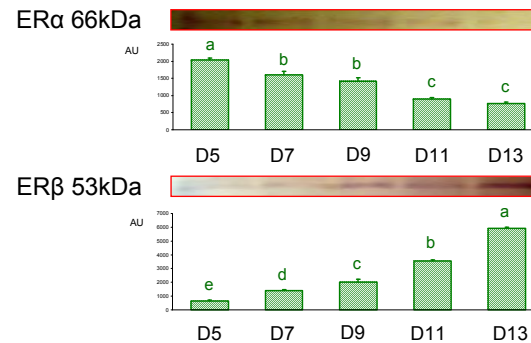


Fig.4. Time course of the relative changes in ERs  $\alpha$  and  $\beta$  protein expression during osteoblast differentiation. Values are mean  $\pm$  SD, n=3. Data were analysed with a one-way ANOVA, Tukey-test, and expressed as a>b>c>d>e. (D: Day of culture)

Expression of ER $\beta$  protein is increased with time, while the expression of ER $\alpha$  protein decreased.

### 2. Equl increases ALP activity in MG-63 through ERs

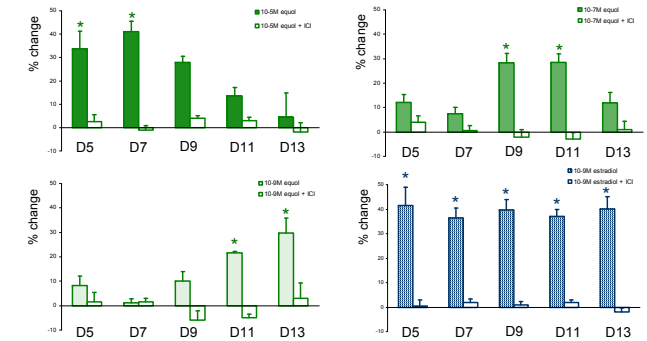


Fig.5. Effects of equl, equl + ICI182,780(1 $\mu$ M), estradiol and estradiol + ICI182,780(1 $\mu$ M) on ALP activity. Values are expressed as a mean percentage of increase from values obtained with vehicle  $\pm$  SEM, n=3. Data were analysed by Student's test. \*p<0.05, significant differences between experimental conditions.

Chronically incubation with equl or equl + ICI182,780 did not affect cell proliferation (data not shown). High concentrations of equl (10<sup>-5</sup>M) increased ALP activity from D5 to D9 of treatment whereas very low concentrations (10<sup>-9</sup>M) stimulate ALP activity from D9 to D13.

## Conclusion

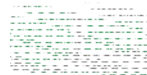
A range of equl concentrations increased ALP activity. ICI inhibited equl effects on ALP activity, showing that this mechanism is ER-dependent. Interestingly, very low physiological concentrations of equl (10<sup>-9</sup>M) increased ALP activity at D13. This effect could be due to: (1) the highest expression of estrogen receptor  $\beta$  at D13, and (2) the high affinity of equl to this receptor, as shown Setchell *et al.* in a recent review [3].

## Bibliography

- Ward WE *et al.* 2005. J Nutr Biochem
- Katzburg S *et al.* 1999. Bone
- Setchell KD *et al.* 2005. Am J Clin Nutr

More information on this study can be obtained at:

<http://www.enitab.fr/recherches/umrs> or please contact [s-vergne@enitab.fr](mailto:s-vergne@enitab.fr)





# Les isoflavones de soja : Leur biodisponibilité chez l'Homme et leurs actions sur une lignée ostéoblastique humaine

Sébastien Vergne, Philippe Chantre, Catherine Bennetau-Pelissero, Patrick Sauvant

## Introduction

Les résultats d'études épidémiologiques de grande envergure, parmi lesquelles la Women's Health Initiative, la Million Women Study, ainsi que l'European Prospective Into Cancer -E3N, ont apporté des résultats qui ont remis en cause la balance bénéfice/risque du traitement hormonal substitutif. Les phyto-œstrogènes, composés polyphénoliques extraits des plantes et doués d'activités œstrogéniques, présentent alors des intérêts thérapeutiques accrus. Les isoflavones de soja, daidzéine et génistéine, sont des phyto-œstrogènes qui semblent particulièrement intéressants pour leurs effets sur la santé et ceux sur les symptômes de la ménopause.

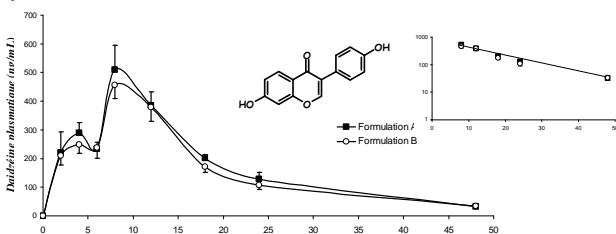


## Contexte de la thèse

A ce jour, plus de 9 000 études (recherche MedLine) ont trait aux isoflavones de soja. Leurs résultats sont parfois contradictoires, en particulier lorsqu'ils se rapportent à des effets cliniques des isoflavones. Dans ce contexte, il nous a semblé pertinent d'étudier la biodisponibilité des isoflavones, dans la mesure où c'est un préalable indispensable à leur efficacité biologique. Des études de biodisponibilité ont permis de déterminer les paramètres pharmacocinétiques des isoflavones lorsque celles-ci sont ingérées sous forme pure. Toutefois, les formes d'apport en isoflavones de soja sont des formes alimentaires ; il s'agit de nombreux produits dérivés du soja, incluant des compléments alimentaires commercialisés le plus souvent par des laboratoires pharmaceutiques.

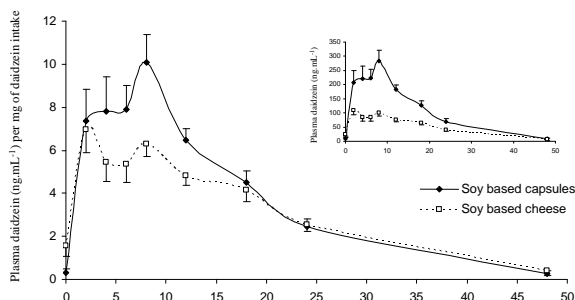
## Première étude

Différents procédés industriels permettent d'extraire les isoflavones du soja contenues dans les compléments alimentaires. Une étude clinique randomisée, en double aveugle chez 12 sujets sains, a permis de dégager les paramètres pharmacocinétiques principaux des isoflavones et de déterminer la bioéquivalence de deux formulations d'un complément alimentaire à base de soja, préparées par deux procédés différents.



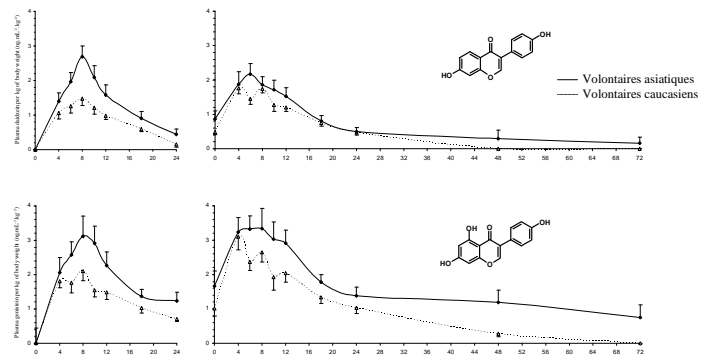
## Deuxième étude

Divers produits à base de soja sont commercialisés. Il semblait donc pertinent de comparer la biodisponibilité des isoflavones de soja ingérées dans des matrices alimentaires différentes : un complément alimentaire et un fromage à base de soja. Un essai clinique randomisé chez 12 sujets sains a montré que les isoflavones contenues dans les compléments alimentaires sont plus biodisponibles que celles contenues dans les fromages.



## Troisième étude

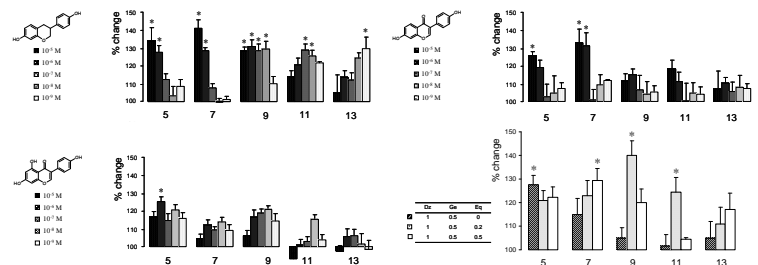
Le soja est traditionnellement plus consommé par les populations asiatiques, chez qui des effets bénéfiques ont été décrits. Ceci conduit des occidentaux, soucieux de leur santé, à consommer de grandes quantités d'isoflavones. Or jusqu'alors, aucune comparaison de biodisponibilité des isoflavones n'a été décrite entre les ethnies asiatique et occidentale. Un essai clinique, incluant 12 volontaires caucasiens et 12 volontaires asiatiques, a montré une meilleure biodisponibilité des isoflavones après une prise unique d'un fromage à base de soja chez les volontaires asiatiques.



## Quatrième étude

L'ostéoporose est ainsi aujourd'hui considérée comme un problème de santé publique dans les pays occidentaux. La carence œstrogénique liée à la ménopause est principalement responsable de cette pathologie. Une stratégie de prévention nutritionnelle de l'ostéoporose vise à pallier cette carence par l'ingestion d'isoflavones de soja.

Les isoflavones n'ont pas d'effet sur la prolifération des ostéoblastes. L'activité de la phosphatase alcaline, marqueur précoce de la différenciation des ostéoblastes peut être induite par les isoflavones de façon dose- et temps-dépendant.



Activité ALP de la lignée MG-63 après induction par des isoflavonoïdes



Cinétique d'expression des récepteurs aux œstrogènes de la lignée MG-63

## Conclusion

Ce travail de thèse apporte des informations originales sur la biodisponibilité des isoflavones de soja et sur l'effet ostéoprotecteur des isoflavones. Ce dernier n'est toutefois abordé qu'au travers d'une étude *in vitro*, et nécessite d'être complétée par des études cliniques.



Les récentes études publiées sur les traitements hormonaux substitutifs remettent en cause la balance entre leurs bénéfices et leurs risques. Ces études fortement médiatisées ont suscité une relative appréhension chez les femmes ménopausées, les conduisant à rechercher des alternatives pour traiter les symptômes liés à l'apparition de leur ménopause. Les scientifiques et les industriels du complément alimentaire ont profité de plusieurs études épidémiologiques menées chez des migrants asiatiques pour proposer les effets bénéfiques de l'alimentation asiatique et des phyto-œstrogènes en particulier. Les phyto-œstrogènes sont des composés polyphénoliques extraits des plantes et doués d'activités œstrogéniques. Les isoflavones de soja sont des phyto-œstrogènes et semblent particulièrement intéressants pour leurs effets bénéfiques potentiels sur la santé, notamment sur les symptômes de la ménopause.

A ce jour, plus de 9 000 études (recherche MedLine) ont trait aux isoflavones de soja. Leurs résultats sont parfois contradictoires, en particulier lorsqu'ils se rapportent aux effets cliniques des isoflavones. **Dans ce contexte, il nous a semblé pertinent d'étudier la biodisponibilité des isoflavones, dans la mesure où c'est un préalable indispensable à leur efficacité biologique.** Des études de biodisponibilité ont permis de déterminer les paramètres pharmacocinétiques des isoflavones lorsque celles-ci sont ingérées sous forme pure. Toutefois, les formes d'apport en isoflavones de soja sont des formes alimentaires ; il s'agit de nombreux produits dérivés du soja, incluant des compléments alimentaires commercialisés le plus souvent par des laboratoires pharmaceutiques.

(1) Différents procédés industriels permettent d'extraire les isoflavones du soja contenues dans les compléments alimentaires. Une étude clinique randomisée, en double aveugle chez 12 sujets sains, a permis de dégager les paramètres pharmacocinétiques principaux des isoflavones et de déterminer la bioéquivalence de deux formulations d'un complément alimentaire à base de soja, préparées par deux procédés différents.

(2) Divers produits à base de soja sont commercialisés. Il semblait donc pertinent de comparer la biodisponibilité des isoflavones de soja ingérées dans des matrices alimentaires différentes : un complément alimentaire et un fromage à base de soja. Un essai clinique randomisé chez 12 sujets sains a montré que les isoflavones contenues dans les compléments alimentaires sont plus biodisponibles que celles contenues dans les fromages.

(3) Le soja est traditionnellement plus consommé par les populations asiatiques, chez qui des effets bénéfiques ont été décrits. Ceci conduit certains occidentaux, soucieux de leur santé, à consommer de grandes quantités d'isoflavones. Jusqu'alors, aucune comparaison de biodisponibilité des isoflavones n'a été décrite entre les ethnies asiatique et occidentale. Un essai clinique, incluant 12 volontaires caucasiens et 12 volontaires asiatiques, a montré une meilleure biodisponibilité des isoflavones après une prise unique d'un fromage à base de soja chez les volontaires asiatiques. La supériorité asiatique ne peut être expliquée que par une adaptation enzymatique (phase I ou II). Elle concerne essentiellement l'absorption et pourrait être liée à une flore intestinale particulière chez les volontaires asiatiques.

(4) Le vieillissement des populations a entraîné une augmentation des maladies dégénératives. L'ostéoporose est ainsi aujourd'hui considérée comme un problème de santé publique dans les pays occidentaux. La carence œstrogénique liée à la ménopause est principalement responsable de cette pathologie. Une stratégie de prévention nutritionnelle de l'ostéoporose vise à pallier cette carence par l'ingestion d'isoflavones de soja. Forts de nos connaissances en biodisponibilité, l'effet de mélanges d'isoflavones de soja, reflète de concentrations circulantes, a été étudié sur la différenciation d'une lignée ostéoblastique humaine. Les isoflavones n'ont pas d'effet sur la prolifération des ostéoblastes. L'activité de la phosphatase alcaline, marqueur précoce de la différenciation des ostéoblastes, peut être induite par les isoflavones de façon dose- et temps-dépendant.

Ce travail de thèse apporte des informations originales sur la biodisponibilité des isoflavones de soja et sur l'effet ostéoprotecteur des isoflavones. Ce dernier n'est toutefois abordé qu'au travers d'une étude *in vitro* et nécessite d'être complétée par des études cliniques.

**Mots clés :** Isoflavones, Biodisponibilité, Nutrition, Pharmacologie, Ostéoblastes, Récepteurs aux œstrogènes, Marqueurs de différenciation.







Les isoflavones, contenues en quantité substantielle dans le soja, sont actuellement considérées comme une alternative naturelle aux traitements hormonaux substitutifs de la ménopause. En effet, certains effets bénéfiques leur ont été attribués par l'observation des populations asiatiques. Les résultats des études, ayant trait aux isoflavones, sont parfois contradictoires, en particulier lorsque leurs effets cliniques sont recherchés. Il apparaît donc important d'étudier la biodisponibilité des isoflavones, nécessaire préalable à leur efficacité biologique. L'objet de cette thèse est donc de caractériser les facteurs influant sur la biodisponibilité des isoflavones de soja : la formulation des compléments alimentaires, la matrice alimentaire, le contexte alimentaire, la chronicité d'ingestion et l'appartenance à une ethnie seront étudiés. Enfin, l'effet des isoflavones de soja sur l'ostéoporose sera étudié au travers d'une étude *in vitro* sur une lignée ostéoblastique humaine. Elle suggère l'intérêt d'une prévention nutritionnelle de l'ostéoporose par les isoflavones de soja.

**Mots clés :** Isoflavones, Biodisponibilité, Nutrition, Pharmacologie, Ostéoblastes, Récepteurs aux œstrogènes, Marqueurs de différenciation.

Soy isoflavones are currently considered as an alternative to menopausal hormone replacement therapy. Indeed, some of their beneficial effects are known with data resulting from Asian epidemiological studies. However results obtained from clinical studies are discrepant. As a consequence, it appears important to study the bioavailability of isoflavones, a prerequisite of their biological activity. The aim of this thesis has been to study the effect of factors influencing their bioavailability, such as industrial processes used in the making of soy-based supplements, dietary matrix, dietary context, chronic ingestion of soy-based products, ethnic appurtenance. The effect of isoflavones on osteoporosis was suggested with an *in vitro* study, with a human osteoblast line being used. Soy isoflavones may be taken into consideration for the nutritional prevention of osteoporosis.

**Key words :** Isoflavone, Bioavailability, Nutrition, Pharmacology, Osteoblast, Estrogen receptor, Differentiation markers.