



anses

Valeurs toxicologiques
de référence

VTR long terme par voie orale pour les isoflavones

Avis de l'Anses
Rapport d'expertise collective

Mars 2025

Connaître, évaluer, protéger

Le directeur général

Maisons-Alfort, le 08 janvier 2025

AVIS

de l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail

relatif à l'élaboration de VTR long terme par voie orale pour les isoflavones

*L'Anses met en œuvre une expertise scientifique indépendante et pluraliste.
L'Anses contribue principalement à assurer la sécurité sanitaire dans les domaines de l'environnement, du travail et de l'alimentation et à évaluer les risques sanitaires qu'ils peuvent comporter.
Elle contribue également à assurer d'une part la protection de la santé et du bien-être des animaux et de la santé des végétaux et d'autre part à l'évaluation des propriétés nutritionnelles des aliments.
Elle fournit aux autorités compétentes toutes les informations sur ces risques ainsi que l'expertise et l'appui scientifique technique nécessaires à l'élaboration des dispositions législatives et réglementaires et à la mise en œuvre des mesures de gestion du risque (article L.1313-1 du code de la santé publique).
Ses avis sont publiés sur son site internet.*

L'Anses a été saisie le 29 octobre 2022 par la Direction générale de la santé (DGS) et la Direction générale de l'alimentation (DGAL) pour la réalisation de l'expertise suivante : évaluation du risque sanitaire lié à la consommation d'aliments contenant des isoflavones. D'autre part, l'Anses évalue les teneurs en isoflavones dans les aliments tels que consommés, notamment dans le cadre des Etudes Alimentation Totale (EAT), dont l'EAT3 actuellement en cours.

1. CONTEXTE ET OBJET DE LA SAISINE

Les phytoœstrogènes sont naturellement présents dans certaines plantes. Leur appellation provient de leur activité œstrogénique. Celle-ci découle de leur similitude structurale avec le 17 β -estradiol et/ou de leur capacité à se fixer sur les récepteurs aux œstrogènes. Les phytoœstrogènes se répartissent en 2 grandes familles :

- les flavonoïdes dont les coumestanes et les isoflavones, qui sont retrouvés principalement dans les légumineuses (haricots, pois, fèves), parfois à des taux physiologiquement actifs, notamment dans le soja et les produits dérivés,

- les non-flavonoïdes dont les entérolignanes et leurs précurseurs (lignanes), qui sont présents dans la plupart des produits végétaux à usage alimentaire, riches en fibres (fruits, légumes, céréales et graines oléagineuses) et qui ont une activité œstrogénique plus modérée.

L'Anses a été saisie par la Direction générale de la santé (DGS) et la Direction générale de l'alimentation (DGAL) le 29 octobre 2022 afin d'évaluer le risque sanitaire lié à la consommation d'aliments contenant des isoflavones. Dans ce cadre, il a été, entre autres, demandé de proposer une valeur toxicologique de référence (VTR) long terme par voie orale pour les isoflavones, en tenant compte des différentes catégories de population.

D'autre part, l'Anses évalue les teneurs en isoflavones dans les aliments tels que consommés, notamment dans le cadre des Etudes Alimentation Totale (EAT) (Anses, 2011 ; Anses, 2016). Ces études, conduites par l'Anses à l'échelle nationale, selon une méthode standardisée et recommandée par l'organisation mondiale de la santé (OMS), visent à surveiller l'exposition des populations à des agents chimiques présents dans les aliments. Des évaluations quantitatives des risques sanitaires ont été réalisées quand cela a été possible. En l'absence de VTR, les apports estimés en isoflavones, équol et coumestrol pour la population générale dans l'EAT2 ont été comparés à la limite maximale d'apport de $1 \text{ mg.kg pc}^{-1}.\text{j}^{-1}$ pour ces substances, proposée en 2005 par l'Agence (Afssa, 2005). Ils y étaient inférieurs pour 99,9% des adultes et 99,5% des enfants. Cependant, parmi les consommateurs de produits à base de soja (boissons au soja, desserts au soja, tofu, etc.), ces apports dépassaient parfois cette limite maximale. De fait, si un risque sanitaire semblait pouvoir être écarté pour la population générale, il ne pouvait l'être pour cette catégorie de consommateurs (Anses, 2011).

En 2016, dans le cadre de l'EAT infantile (EATi), les plus fortes concentrations en isoflavones étaient également retrouvées dans les produits contenant du soja. Cependant, l'absence de points de repère toxicologiques pour les enfants de moins de 3 ans n'avait pas permis de conclure sur le risque sanitaire lié à l'exposition à ces substances, à l'exception de la génistéine. Pour celle-ci, les données ne permettaient pas d'écarter le risque pour les enfants consommateurs de produits à base de soja, sur la base d'un LOAEL¹ de $35 \text{ mg.kg pc}^{-1}.\text{j}^{-1}$ (NCTR, 2005 ; Rozman *et al.*, 2006), sans pour autant permettre l'établissement d'une VTR (Anses, 2016). A titre provisoire, une marge d'exposition critique de 300 avait été retenue (10 et 10 pour les variabilités inter et intra-individuelles et 3 car le point de départ était un LOAEL). Or, l'exposition moyenne à la génistéine chez 14 enfants de 1 à 36 mois consommateurs de soja était de $0,88 \text{ mg.kg pc}^{-1}.\text{j}^{-1}$, correspondant à une marge de sécurité de 40². Les isoflavones sont également recherchées dans l'étude EAT3 actuellement en cours.

Ainsi, évaluer les risques d'une exposition aux isoflavones requiert de disposer de VTR long terme par voie orale pour les isoflavones, en prenant en compte les différentes catégories de population, notamment la population adulte, les femmes ménopausées, les femmes enceintes et allaitantes, et les enfants.

¹ Lowest observed adverse effect level (= dose minimale entraînant un effet néfaste observé).

² La marge de sécurité est calculée en divisant le LOAEL (ici $35 \text{ mg.kg pc}^{-1}.\text{j}^{-1}$) par l'exposition de la population considérée (ici $0,88 \text{ mg.kg pc}^{-1}.\text{j}^{-1}$).

2. ORGANISATION DE L'EXPERTISE

L'expertise a été réalisée dans le respect de la norme NF X 50-110 « Qualité en expertise – Prescriptions générales de compétence pour une expertise (Mai 2003) ».

L'expertise relève du domaine de compétences du comité d'expert spécialisé (CES) « valeurs sanitaires de référence » (CES VSR).

Les travaux d'expertise des rapporteurs ont été soumis régulièrement au CES VSR pour avis et discussion, sur les aspects tant méthodologiques que scientifiques. Ceux-ci ont également été présentés au groupe de travail sur les perturbateurs endocriniens (GT PE). Le présent rapport tient compte des observations et éléments complémentaires transmis par les membres du CES VSR et/ou du GT PE.

Ces travaux sont ainsi issus d'un collectif d'experts aux compétences complémentaires.

Ils ont été adoptés par le CES « valeurs sanitaires de références » réuni le 28 juin 2024.

L'Anses analyse les liens d'intérêts déclarés par les experts avant leur nomination et tout au long des travaux, afin d'éviter les risques de conflits d'intérêts au regard des points traités dans le cadre de l'expertise.

Les déclarations d'intérêts des experts sont publiées sur le site internet : <https://dpi.sante.gouv.fr/>.

3. ANALYSE ET CONCLUSIONS DU CES

Les isoflavones sont des composés non-stéroïdiens polyphénoliques ayant des activités biologiques variées, mais qui ont en commun d'exercer des activités œstrogéniques. Celles-ci découlent de leur similitude structurale plus ou moins grande avec le 17 β -œstradiol et de leur capacité à activer les récepteurs aux œstrogènes, notamment les récepteurs nucléaires α et β , et le récepteur membranaire. Des effets œstrogéniques ont été notés *in vitro* à des concentrations d'isoflavones 10 à 1000 fois supérieures à celles de l'estradiol et également *in vivo*.

Les isoflavones peuvent exister sous forme libres (i.e. les aglycones), à l'origine des effets biologiques et liées (i.e. les formes conjuguées glycosidées), dépourvues d'activité biologique, ainsi que leurs dérivés acétylés ou malonylés.

Parmi les isoflavones, la génistéine et la daïdzéine sont les aglycones les plus étudiées. Ainsi, seuls ces composés sont traités dans cette expertise.

3.1. Synthèse des données toxicologiques

Les données décrites dans ce chapitre sont issues de rapports de synthèse identifiés dans la littérature (Afssa, 2005, Efsa 2015, Anses 2016, VKM 2017, NCM 2020, SCCS 2022) complétées par une recherche bibliographique réalisée sur la période 2021-2024. Les études citées et résumées dans ces synthèses sont souvent peu détaillées et issues elles-mêmes de la synthèse de l'Efsa de 2015. Ainsi, les études citées dans ces rapports ne seront détaillées que succinctement, sauf si elles sont retenues comme études clés pour élaborer une VTR. Les données récentes identifiées sur la période 2021-2024 seront détaillées dans ce chapitre.

Les données faisant référence aux effets potentiellement bénéfiques des isoflavones ne font pas l'objet de ce chapitre et ne seront pas abordées dans cet avis.

Seuls les résultats statistiquement significatifs sont décrits dans cette synthèse.

Les données issues de la littérature rapportent le plus souvent des doses administrées, chez l'Homme ou l'animal, exprimées en « isoflavones totales ». Il est à noter que ce vocable exprime selon les études, soit une dose en isoflavones (sans que l'on sache précisément de quelles isoflavones, il s'agit), soit en génistéine. Cette définition variant selon les études, elle sera précisée pour chaque étude décrite.

3.1.1. Toxicocinétique

Les formes glycosidiques (génistéine et daïdzine), telles que retrouvées dans les aliments, sont peu ou pas absorbées par le tractus gastro-intestinal lors de leur consommation. Ces formes O-glycosylées doivent être hydrolysées par les enzymes bactériennes de la microflore intestinale pour donner des composés aglycones (génistéine et daïdzéine) qui sont absorbables au niveau de la barrière intestinale. Ceux-ci sont alors rapidement et presque complètement absorbés, au niveau du tractus gastro-intestinal, tant chez l'Homme que l'animal. Ces composés aglycones subissent ensuite une métabolisation dans les cellules intestinales et hépatiques par des mono-oxygénases à cytochrome P450 (enzymes de phase I). Les enzymes de phase II, comme les UDPGT (uridine diphospho glucuronyl transférase) ou les sulfotransférases fixent ensuite sur les fonctions hydroxyles natives ou néoformées par les enzymes de phase I, des groupements glucuronides et/ou sulfates. Il est à noter que les composés glycosidiques peuvent également subir une métabolisation et une dégradation complète par la flore microbienne dans le tractus intestinal. L'élimination fécale s'avère être une voie minoritaire.

Pour la génistéine, quelques études décrivent des modèles pharmacocinétiques (PK) chez le rat (Hakami *et al.*, 2021 ; Zager *et al.*, 2007 ; Schlosser *et al.*, 2006) mais aucun modèle chez l'Homme n'a été identifié dans la littérature. Pour la daïdzéine, seul un modèle pharmacocinétique à base physiologique (PBPK) humain a été identifié (Wang *et al.*, 2022) dont l'intérêt réside dans la possibilité d'estimer le taux de conversion de la daïdzéine en équol par la flore intestinale humaine.

3.1.2. Toxicité aiguë

3.1.2.1. Données chez l'Homme

Aucune donnée de toxicité aiguë chez l'Homme n'a été retrouvée dans la littérature.

3.1.2.2. Données chez l'animal

• Génistéine

Dans son rapport de 2015, l'Efsa cite deux études de toxicité aiguë (Mc Clain *et al.*, 2005 ; 2006b cités dans Efsa, 2015), l'une menée sur des chiens Beagle et l'autre menée sur deux souches de rats Wistar. Dans la première expérience de Mc Clain *et al.*, des chiens ont été exposés par voie orale à de la génistéine pendant 4 semaines à des doses de 0, 50, 150 et 500 mg.kg pc⁻¹.j⁻¹. Le poids des organes, les paramètres hématologiques et biochimiques ont été mesurés. Une analyse toxicocinétique a également été réalisée avec dosage de génistéine

dans le sang et le foie. Tous les organes ont été prélevés pour une analyse histopathologique. Les résultats montrent que l'administration de génistéine à des chiens, pendant une période de 4 semaines n'entraîne pas d'effets néfastes. Les auteurs concluent que la dose sans effet néfaste observé (NOAEL) pour la génistéine est supérieure à 500 mg.kg pc⁻¹.j⁻¹(Mc Clain *et al.*, 2005 cité dans Efsa, 2015).

Dans la seconde étude, une première expérience a été réalisée chez des rats Wistar Han-lbm (mâles et femelles) nourris avec un régime sans génistéine et une seconde chez des rats Wistar CrI : (WI)BR (mâles et femelles) nourris avec un régime animal standard. Dans la première expérience, les animaux ont été exposés à une seule dose de 2000 mg.kg pc⁻¹ de génistéine (pureté de 99,5 %) par gavage et ont été observés pendant 2 semaines (mortalité et signes cliniques). Tous les rats ont survécu au traitement. Après euthanasie, la nécropsie n'a révélé aucun effet, ni aucune modification du poids corporel ou de celui des organes (foie et reins). Aucune étude histopathologique n'a été menée.

Dans la seconde expérience, conduite selon le même protocole, les résultats sont similaires : tous les rats Wistar CrI : (WI)BR ont survécu. Une léthargie a été observée chez tous les mâles et chez une femelle un jour après l'exposition ; une alopécie 14 et 15 jours après l'exposition est rapportée à la dose de 2000 mg.kg pc⁻¹ de génistéine chez les femelles. Les auteurs de l'étude ont conclu que la génistéine présente une faible toxicité aiguë avec une DL₅₀ supérieure à 2000 mg.kg pc⁻¹ (McClain *et al.*, 2006b cité dans Efsa, 2015).

Daïdzéine

Dans une étude de toxicité aiguë par voie orale, des rats ($n = 3/\text{groupe}$) ont reçu de la daïdzéine par gavage à 0, 300, 2000 et 5000 mg.kg pc⁻¹.j⁻¹ pendant les 24 premières heures. Les animaux ont toléré la dose la plus élevée sans changement significatif sur le plan toxicologique. Sur la base de cette étude et des observations, les auteurs ont estimé que la dose maximale tolérée était supérieure à 5000 mg.kg pc⁻¹.j⁻¹ et que la daïdzéine avait une toxicité aiguë faible chez le rat (Laddha *et al.*, 2020).

3.1.3.Toxicité répétée et chronique

3.1.3.1. Données chez l'Homme

Plusieurs rapports de synthèse ont décrit les données épidémiologiques étudiant l'association entre une exposition aux isoflavones administrées sous différentes formes (extraits de soja, protéine de soja, mélange d'isoflavones, génistéine, daïdzéine, extrait de trèfle rouge) et les effets observés chez les hommes, les femmes péri- et post-ménopausées, les femmes pré-ménopausées, les enfants, et les adolescents (Efsa, 2015 ; VKM, 2017 ; NCM, 2020). Seules les conclusions de ces rapports de synthèse sont rapportées dans le présent avis.

Dans son rapport de 2015, l'Efsa a réalisé une évaluation des risques ciblée sur la population des femmes péri- et post-ménopausées en considérant les organes cibles d'intérêt suivants : seins, utérus et thyroïde. L'Efsa a conclu qu'il n'était pas possible de proposer une valeur de référence unique ou un niveau d'apport sans effet néfaste pour les suppléments alimentaires contenant des isoflavones.

Dans son rapport de 2017, le VKM (comité scientifique norvégien pour la sécurité alimentaire) concluait qu'une supplémentation en isoflavones de 40 ou 80 mg.j⁻¹ prise sur un ou 3 mois, ne représentait pas un risque d'effet néfaste sur les concentrations hormonales chez les femmes pré-ménopausées, les hommes, les adolescents de sexe masculin et féminin, et sur le cycle menstruel chez les adolescentes. Le VKM souligne que les données sont insuffisantes pour conclure sur un potentiel effet néfaste chez les enfants âgés de 10 à 14 ans.

Dans son rapport de 2020, le NCM (Nordic council of ministers) concluait qu'il n'y avait pas de risque identifié pour les femmes enceintes (pour les enfants à naître) sur la base de la VTR établie à partir d'expérimentations animales. Pour les filles et les garçons (âgés de 4 à 10 ans), en revanche, le NCM identifiait un risque potentiel pour les enfants sur la base de la VTR établie à partir d'expérimentations animales.

Il n'a pas été identifié de données récentes permettant de retenir une ou plusieurs études basées sur des données humaines présentant une relation dose-réponse pour construire de VTR.

3.1.3.2. Données chez l'animal

Dans une étude de toxicité répétée (OCDE 407), des rats Sprague-Dawley (SD) ($n = 10/\text{doses}$) ont reçu des doses orales de daïdzéine de 0, 25, 50 et 100 mg.kg pc⁻¹.j⁻¹ pendant 28 jours (Laddah *et al.*, 2020). Le poids corporel, la consommation de nourriture et d'eau des rats traités à la daïdzéine n'étaient pas différents de ceux des témoins. Aucune différence n'a été observée pour les paramètres hématologiques et biochimiques par rapport aux témoins. Les niveaux d'électrolytes (sodium, potassium, phosphates) se sont également révélés normaux par rapport au groupe témoin. La fonction rénale n'a pas été altérée (récolte des urines sur 24

heures en cage métabolique). Aucune différence significative n'a été observée dans les poids absolus et relatifs des organes et l'examen histologique était normal après le traitement. Selon les auteurs, le NOAEL peut être considéré comme supérieur à 100 mg.kg pc⁻¹.j⁻¹.

Culçu *et al.* ont exposé, par voie orale, pendant 90 jours, 28 rats femelles SD réparties en quatre groupes (n = 7/groupe) : le groupe 1 a été nourri avec des aliments standards pour rats (8 g.j⁻¹) ; le groupe 2 avec une préparation pour nourrissons sans soja (8 g.j⁻¹) ; le groupe 3 avec une formule à base de soja à 1,12 g/100 mL (8 g.j⁻¹ ; Similac®) et le groupe 4 avec une formule contenant du soja à 2,64 g/100 mL (8 g.j⁻¹ ; Modilac®). Les auteurs ont conclu que les préparations infantiles à teneur élevée en soja induisaient une hyperthyroïdie avec des concentrations sériques de T3, T4 et TSH³ élevées (Culçu *et al.*, 2021).

3.1.4.Effets sur la reproduction et le développement

Plusieurs rapports de synthèse et revues, dont certains déjà anciens, rapportent un impact négatif des isoflavones sur la fertilité masculine, mais aussi des effets sur l'appareil reproducteur féminin (ménopause) (Afssa, 2005 ; VKM 2017).

Les données issues de ces rapports de synthèse ne sont pas détaillées. Seules les études d'intérêt identifiées dans ces rapports ou dans les données les plus récentes sont décrites.

3.1.4.1. Données chez l'Homme

La plupart des études s'accordent pour conclure qu'une consommation régulière de produits dérivés de soja a peu ou pas d'effets néfastes sur la fertilité masculine (Messina *et al.*, 2022). Toutefois, ces études s'intéressaient pour la plupart à la consommation de soja seulement à l'âge adulte (40-70 mg.j⁻¹). La revue de Messina *et al.* souligne que la consommation dans les pays asiatiques est estimée à 30-50 mg.j⁻¹ d'isoflavones tandis que celle des pays occidentaux (USA - Europe) serait inférieure à 3 mg.j⁻¹ (Messina *et al.*, 2022).

Dans une étude transversale réalisée en Chine chez 161 hommes adultes âgés de 19 à 51 ans, sans antécédents médicaux, aucune association n'a été observée entre les concentrations urinaires d'isoflavones et les paramètres du sperme évalués (nombre, concentration et mobilité des spermatozoïdes) (Yang *et al.*, 2022). Par contre, l'élévation des concentrations urinaires de génistéine, glycitéine et dihydrodaïdzéine était associée à de plus faibles concentrations plasmatiques de testostérone.

Dans une étude récente américaine (Mitsumani *et al.*, 2023), la consommation en isoflavones de 660 femmes consultant un centre d'infertilité a été estimée par questionnaire alimentaire portant sur les 3 derniers mois (consommation journalière médiane estimée à 1,78 mg.j⁻¹). Aucune association n'a été observée entre la consommation d'isoflavones et la réserve ovarienne ou la concentration plasmatique en hormone antimüllérienne.

Dans une étude prospective de cohorte mères-enfants, Chin *et al.* ont étudié, chez des nourrissons mâles, l'association entre la pratique d'alimentation (lait à base de soja, lait de vache ou lait maternel) et les hormones de la reproduction mesurées longitudinalement et le développement des tissus hormono-sensibles mesurés par sonographie et examen clinique. Les auteurs n'ont pas observé d'impact sur l'anatomie des nourrissons mâles, mais ont noté

³ T3 (triiodothyronine), T4 (tétraiodothyronine ou thyroxine), TSH (thyroid-stimulating hormone soit, en français, hormone thyroïdienne ou encore thyroïdostimuline)

un développement du pénis plus rapide chez les enfants nourris au lait de soja que chez ceux nourris au lait maternel (observations jusqu'à la 28^{ème} semaine de vie) (Chin *et al.*, 2021).

Dans le rapport du NCM évoqué plus haut, une étude britannique sur 367 femmes enceintes n'a pas mis en évidence d'effets de la consommation d'isoflavones sur l'âge de la ménarche chez leurs filles (Marks *et al.*, 2017 cité dans NCM, 2020). Une méta-analyse réalisée en 2010, puis actualisée en 2021, évaluant l'effet des isoflavones *in utero* sur le profil d'hormones de la reproduction chez les garçons, n'a pas mis en évidence de différences significatives sur les concentrations de testostérone (libre ou totale), en sex hormone binding globulin⁴ (SHBG), œstrone et œstradiol (Reed *et al.*, 2021).

Dans les travaux de Upson *et al.* sur une cohorte de 1696 femmes afro-américaines, des associations négatives ont été identifiées entre une consommation élevée en soja et produits dérivés dès la petite enfance et une plus forte incidence de fibromes utérins lorsque les femmes entrent en pré-ménopause (Upson *et al.*, 2015 cités dans VKM, 2017), des fibromes utérins plus volumineux (Upson *et al.*, 2016a cité dans VKM, 2017), des saignements plus abondants lors des menstruations (Upson *et al.*, 2016b cité dans VKM, 2017), et la nécessité de faire appel à des contraceptifs oraux pour soulager les douleurs menstruelles (Upson *et al.*, 2019 cité dans VKM, 2017). Toutefois, les estimations des apports sont semi-quantitatives. De plus, il n'est pas possible d'écartier un biais alimentaire lié à l'origine ethnique des individus (Upson *et al.*, 2016a cité dans VKM, 2017).

Les conclusions relatives à un impact des phytoœstrogènes sur l'âge de la puberté chez la femme sont assez contradictoires. Plusieurs études relèvent une puberté précoce lors d'une forte consommation de produits à base de soja pendant la petite enfance, incluant les formulations infantiles (D'Aloisio *et al.*, 2013 ; Cheng *et al.*, 2010 & 2012 ; Kim *et al.*, 2010 & 2011 ; Valladares *et al.*, 2012) tandis que d'autres ne montrent pas un tel avancement d'âge de la puberté (Segovia-Siapco *et al.*, 2014 ; Oliveira *et al.*, 2021 ; Testa *et al.*, 2018).

Une étude rétrospective cas-témoin menée au Brésil sur 161 enfants (dont 84 avec un diagnostic de puberté précoce et 77 enfants témoins), a montré que les enfants qui présentaient une puberté précoce avaient pour la plupart été allaités avec des préparations à base de soja tandis que le groupe témoin comprenait majoritairement des enfants nourris uniquement au sein (Felicio *et al.*, 2021). A l'inverse, dans leur méta-analyse portant sur 6 études (3 études sur la fréquence de la puberté précoce et 3 études sur l'âge moyen à la ménarche), Oliveira *et al.* n'ont pas identifié de lien entre prise de soja pendant la petite enfance et avancement de la puberté (OR = 0,51 ; IC_{95%} = 0,09 - 2,94 ; p = 0,969) et âge moyen de la ménarche (OR = 0,14 ; IC_{95%} = -0,16 - 0,45 ; p = 0,186) (Oliveira *et al.*, 2021).

3.1.4.2. Données chez l'animal

Dans l'étude de Nagao *et al.*, des rats mâles et femelles SD (Crj:CD, IGS) ont été exposés par gavage à des doses de génistéine de 0 ; 12,5 ; 25 ; 50 et 100 mg.kg pc⁻¹.j⁻¹ du jour postnatal (PND) 1 à PND5. Les examens ont été effectués périodiquement à PND1, 6, 14, 21 et à la 5^{ème}, 7^{ème} et 9^{ème} semaine. Les résultats rapportés montrent des altérations histopathologiques sur les ovaires et l'utérus des femelles à la plus forte dose de 100 mg.kg pc⁻¹.j⁻¹, et une absence

⁴ Il s'agit de la protéine de transport de la testostérone et de l'oestradiol dans le sang.

d'effets reprotoxiques chez les mâles (Nagao *et al.*, 2001). Chez les mâles et les femelles, le poids corporel à la dose de 100 mg.kg pc⁻¹.j⁻¹ était significativement inférieur par rapport au contrôle, à tous les temps de mesure, ainsi qu'à l'âge de 5, 7 et 9 semaines pour la dose de 50 mg.kg pc⁻¹.j⁻¹. Chez les femelles, le poids corporel était diminué à toutes les doses à la 9^{ème} semaine. Il n'y a pas eu d'effet du traitement sur l'ouverture vaginale ou sur la séparation préputiale, et ce pour toutes les doses testées et à tous les temps de mesure. La fertilité mâle n'a pas été affectée par le traitement, les concentrations sériques en testostérone et la qualité spermatique n'ont pas été altérées. Il n'y a pas eu d'altération histologique des gonades chez les mâles. La fertilité des femelles a été affectée à toutes les doses. Une irrégularité du cycle œstral, des altérations histopathologiques des ovaires (atrophie, absence de corps jaune et follicules atrétiques) et de l'utérus (hypertrophie/hyperplasie) ont été observés à la dose de 100 mg.kg pc⁻¹.j⁻¹. Cette étude a permis d'identifier un LOAEL à 12,5 mg.kg pc⁻¹.j⁻¹ associé à un effet fonctionnel sur la fertilité (diminution de l'index de fertilité) chez les femelles.

Dans un rapport du national toxicology program (NTP) de 2008, une étude multigénérationnelle à plusieurs bras combinant une étude sur la reproduction et sur la toxicité long terme est décrite chez le rat NCTR CD (Sprague-Dawley). Des groupes de 35 couples d'animaux (pour les générations F0, F1, F3 et F4) ou 40 couples d'animaux (pour la génération F2) ont été exposés à de la génistéine administrée aux doses de 0, 5, 100 et 500 ppm dans la nourriture⁵, soit 0,3 ± 0,03 ; 5,9 ± 0,5 et 28,9 ± 2,5 mg.kg pc⁻¹.j⁻¹ chez les mâles (F0), 0,3 ± 0,02 ; 6,9 ± 0,3 et 34,6 ± 1,6 mg.kg pc⁻¹.j⁻¹ chez les mâles (F1 et F2) et 0,5 ± 0,02 ; 10,0 ± 0,5 et 50,6 ± 2,4 mg.kg pc⁻¹.j⁻¹ chez les femelles (hors période de lactation). Les doses administrées en période de lactation chez les femelles (génération F0-F2) étaient de 0,7 ± 0,04 ; 14,6 ± 0,9 et 78,0 ± 3,9 mg.kg pc⁻¹.j⁻¹.

Concernant l'étude multigénérationnelle de toxicologie sur la reproduction, les mâles et les femelles ont été exposés à la génistéine selon la durée indiquée dans le schéma expérimental ci-dessous :

- F0 de 42^{ème} jour postnatal au 140^{ème} jour postnatal (98 jours),
- F1 de la conception au 140^{ème} jour postnatal (161 jours),
- F2 de la conception au 140^{ème} jour postnatal (161 jours),
- F3 de la conception au 21^{ème} jour postnatal, puis alimentation sans la substance d'essai du 21^{ème} jour postnatal au 140^{ème} jour postnatal (161 jours au total, 42 jours d'alimentation avec la substance d'essai),
- F4 pas d'exposition ; alimentation sans la substance d'essai de la conception jusqu'au 140^{ème} jour postnatal (161 jours au total),
- F5 pas d'exposition ; alimentation sans la substance d'essai de la conception jusqu'au 21^{ème} jour postnatal (42 jours au total),

Vingt-cinq rats par sexe de chaque génération (F0 à F4) ont été sélectionnés au hasard pour des études vie-entière et programmés pour nécropsie à PND140. Les poids corporels des animaux F0 et les résultats cliniques ont été enregistrés chaque semaine jusqu'à l'euthanasie des animaux. Pour les générations F1 à F4, les poids corporels et les résultats cliniques ont été enregistrés chaque semaine, de PND21 jusqu'à la fin de l'étude. De plus, le poids corporel des petits a été mesuré à PND2, 4, 7 et 14. Des nécropsies ont été réalisées sur tous les

⁵ Régime à base d'aliments 5K96, sans soja, ni luzerne, Purina mills Inc.

animaux des générations F0 à F4 ainsi que sur les animaux morts ou moribonds avant la fin de l'étude.

Les résultats montrent une diminution significative du poids corporel chez les femelles exposées, plus importante à 500 ppm, dans les générations exposées continuellement à la génistéine (F0 à F2). Le poids corporel des mâles au cours de la période post-sevrage a diminué dans les groupes F1 recevant 100 et 500 ppm. Le poids à la naissance des ratons était réduit chez les mâles F1 exposés à 100 ppm et chez tous les groupes exposés de la génération F5 (mâles et femelles).

Aucun effet de la génistéine sur le nombre de follicules ou sur l'histologie ovarienne n'a été noté, bien que des perturbations du cycle œstral, y compris des cycles prolongés, aient été observées, chez les animaux F1 et F2 exposés en continu à 500 ppm, peu après l'ouverture vaginale, mais pas après que ces animaux eurent mis bas et aient allaité leurs portées.

Concernant la mesure de la distance anogénitale (DAG), les petits mâles (PND2) du groupe 500 ppm de la génération F1 ont présenté une diminution de la DAG moyenne par rapport aux témoins de cette génération, tandis que les femelles (PND2) ont présenté une diminution de la DAG par rapport aux témoins des générations F1 (500 ppm), F2 (500 ppm) et F3 (100 ppm).

L'exposition à 500 ppm de génistéine a avancé le moment de l'ouverture vaginale chez les ratons femelles des générations F1 à F2 et à 5 ppm, pour la génération F3. Le poids corporel à l'ouverture vaginale était diminué à 500 ppm chez les ratons femelles des générations F1 à F3, et à 5 ppm pour la génération F1. Cet effet n'a pas été observé sur la génération F4 non exposée.

Chez le mâle, un retard du temps de descente testiculaire a été observé uniquement chez la génération F3 exposée à la génistéine à 500 ppm de la conception jusqu'au sevrage.

Concernant les effets sur le poids des organes chez les générations F0 à F5, les effets sur le poids des organes chez les deux sexes étaient limités dans l'ensemble à une seule génération. Parmi ceux-ci, une augmentation significative du poids de l'hypophyse était observée chez les mâles F2 à 500 ppm sans lésion microscopique. Le seul changement induit par la génistéine sur le poids de l'appareil reproducteur chez les deux sexes concerne la génération F0 exposée à la fin de la puberté et à l'âge adulte (augmentation du poids des testicules à 500 ppm).

Aucune lésion histologique liée à l'exposition n'a été trouvée dans les évaluations microscopiques des tissus chez les rats femelles. Les lésions liées à l'exposition chez les rats mâles se limitaient à la glande mammaire et aux reins. Une incidence accrue de minéralisation des tubules rénaux, ou néphrocalcinose, a été observée chez les mâles exposés à 100 ou 500 ppm, l'augmentation étant limitée aux générations F1 et F2 exposées en continu.

La néphrocalcinose induite par la génistéine chez les mâles était de sévérité minime à légère et ne semble pas avoir eu d'impact sur la longévité des animaux ou la fertilité, ce paramètre, ainsi que l'hyperplasie de la glande mammaire chez le mâle sont observés lors d'une exposition à la génistéine de 100 ppm ou plus chez les mâles de la génération F1 et F2.

Cette étude a permis d'identifier un NOAEL à 5,9 mg.kg pc⁻¹.j⁻¹ (100 ppm) et un LOAEL à 35 mg.kg pc⁻¹.j⁻¹ (500 ppm) associé à une hyperplasie alvéolaire et canalaire de la glande mammaire chez les mâles de la génération F0, ainsi qu'un NOAEL à 0,35 mg.kg pc⁻¹.j⁻¹ (5 ppm) et un LOAEL à partir de 7 mg.kg pc⁻¹.j⁻¹ (100 ppm) associé à une hyperplasie alvéolaire et canalaire de la glande mammaire chez les mâles chez les générations F1 et F2.

Eustache *et al.* ont exposé des rattes gestantes Wistar Han (n = 10/dose) quotidiennement par gavage à des doses de génistéine de 0, 1 et 10 mg.kg pc⁻¹.j⁻¹ de du 1^{er} jour de gestation (GD) à PND21 (sevrage), les petits ont ensuite été exposés aux mêmes doses quotidiennement par gavage jusqu'à PND80 (Eustache *et al.*, 2009). A PND25, les résultats n'ont pas montré d'effet sur la DAG et le développement des organes génitaux, sauf à la plus forte dose. A PDN85, le poids des animaux était augmenté à 1 mg.kg pc⁻¹.j⁻¹. Il n'y avait pas d'effet sur le poids relatif des testicules, des vésicules séminales, de la prostate ventrale, aux deux doses. Le poids relatif des épидидymes était diminué à 1 et 10 mg.kg pc⁻¹.j⁻¹. Le poids relatif du foie était augmenté à 10 mg.kg pc⁻¹.j⁻¹. Les paramètres de motilité spermatique étaient altérés à 1 et 10 mg.kg pc⁻¹.j⁻¹, sauf pour la rectitude de trajectoire qui n'était diminuée qu'à 1 mg.kg pc⁻¹.j⁻¹. La concentration spermatique dans l'épididyme caudal était diminuée à 10 mg.kg pc⁻¹.j⁻¹. Le traitement n'a pas eu d'incidence sur l'index d'accouplement, l'index de fertilité, les pertes post-implantatoires, le poids moyen des petits et le sexe ratio à la naissance. Le nombre de portées était diminué à 1 et 10 mg.kg pc⁻¹.j⁻¹.

Cette étude a permis d'identifier un LOAEL de 1 mg.kg pc⁻¹.j⁻¹ associé à une diminution du poids relatif des épидидymes chez les mâles et une diminution de la taille de la portée chez les femelles.

Dans l'étude de Li *et al.*, des souris femelles C57BL/6J ont été exposées à PND21 à des concentrations de 0, 5, 100 et 500 ppm de génistéine (soit, selon les auteurs, 0, 0,5, 10, 50 mg.kg pc⁻¹.j⁻¹). Une analyse de l'impact de l'exposition à la génistéine sur le taux d'implantation embryonnaire a également été réalisée avec une observation des cycles sur des souris âgées de 5 à 8 semaines (i.e. période de maturation mammaire) avec un focus sur les 10 premiers jours qui suivent l'ouverture vaginale. Les résultats ont montré une diminution de l'âge de l'ouverture vaginale à 100 et 500 ppm, une augmentation de la durée de la phase d'œstrus à 500 ppm, une augmentation du nombre de jours passés en phase d'œstrus à toutes les doses, une diminution du nombre d'animaux avec un cycle œstral normal à 100 et 500 ppm, une augmentation significative des corps jaunes (indicateurs d'ovulation) à 5 ppm et une augmentation du développement des glandes mammaires à 100 et 500 ppm. Les auteurs concluent à un effet de puberté précoce lié à l'exposition à la génistéine, sans répercussion sur le taux d'implantation embryonnaire chez la souris (Li *et al.*, 2014). Cette étude a permis d'identifier un LOAEL à 10 mg.kg pc⁻¹.j⁻¹ (100 ppm) associé à une diminution de l'âge de l'ouverture vaginale, une augmentation de la durée des cycles œstraux et une augmentation du développement des glandes mammaires chez les souris femelles.

Dans l'étude de Abo-Elsoud *et al.*, des lapins mâles (souche non spécifiée, n = 7/dose) ont été exposés pendant 12 semaines à 0, 5 ou 20 mg.kg pc⁻¹.j⁻¹ d'isoflavones de soja (proportion de 1 génistéine pour 5,7 de daïdzéine) (Abo-Elsoud *et al.*, 2019). Les résultats montrent une baisse de la libido (augmentation du temps de réaction), une concentration spermatique diminuée, de manière dose-dépendante, une diminution de la testostérone sérique mais qui n'affectait pas les portées (nombre, poids, viabilité) et une augmentation de la T3 par rapport au témoin. Il n'y a pas eu d'effet du traitement sur la taille, la viabilité et le poids des portées à la naissance. Les résultats ne montrent pas de différence du pourcentage de spermatozoïdes anormaux. Cette étude a permis d'identifier un LOAEL de 5 mg.kg pc⁻¹.j⁻¹ associée à une diminution significative de la concentration en spermatozoïdes et de la testostéronémie, ainsi qu'une augmentation significative de la T3 pour un mélange d'isoflavones de soja.

Dans une seconde étude, Eustache *et al.* ont exposé des rats quotidiennement par gavage à une dose unique de 1 mg.kg pc⁻¹.j⁻¹ de génistéine, selon deux schémas d'exposition (Eustache *et al.*, 2020) :

- exposition des femelles (F1 issue de couples non exposés) à partir de GD1 à PND21 (sevrage). Une génération F2 a été produite et suivie jusqu'à PND100 ;
- exposition des rats mâles (F1 issue de couples non exposés) de PND21 à PND100. Ces rats mâles ont été accouplés avec des femelles non exposées pour donner une génération F2 qui a été suivie jusqu'à PND100.

La génistéine a diminué le contenu spermatique épидидymaire chez les animaux F1 exposés pendant la période pré-pubertaire jusqu'à l'âge adulte (valeurs numériques non disponibles dans l'article). Les expressions des gènes impliqués dans la stéroïdogénèse étaient altérées lors des deux fenêtres d'exposition, notamment l'exposition pendant la gestation/lactation.

Cette étude a permis d'identifier un LOAEL de 1 mg.kg pc⁻¹.j⁻¹ associé à une diminution du contenu spermatique des épидидymes chez les mâles (mâles F1 exposés de PND21 à PND100).

Maraudino *et al.* ont exposé par voie orale des souris CD-1 mâles et femelles de PND1 à 8 à une dose unique de génistéine à 50 mg.kg pc⁻¹.j⁻¹ diluée dans de l'huile de sésame (Maraudino *et al.*, 2021). Les animaux ont ensuite été observés à PND12, 22, 30 et 60. Les observations ont porté sur le délai de l'ouverture vaginale, le cycle œstral et l'analyse de la glande mammaire (*whole mount* à PND22, 30 et 60), sur les poids de l'utérus et des testicules, le poids corporel, la consommation de nourriture, les concentrations d'hormones circulantes (leptine, progestérone et testostérone) et un marquage immuno-histochimique de la kisspeptine, la pro-opiomélanocortine (POMC) et l'orexine sur des coupes cérébrales. L'exposition à la génistéine était associée à une ouverture vaginale plus précoce et à une altération du cycle œstral. Les femelles exposées à la génistéine ont passé plus de temps en œstrus et en diœstrus que les femelles non exposées, avec une réduction significative de la phase proœstrus. Une différence des poids absolus utérins a été observée à PND22, uniquement. Il n'y avait pas de différence statistiquement significative des poids des testicules à PND22 et 30 chez les mâles exposés et témoins. Une diminution du poids des testicules des individus exposés a été observée à PND60. L'exposition à la génistéine a augmenté, chez les femelles, les concentrations circulantes de progestérone et la concentration de leptine à PND60, mais pas à PND30. Une diminution de la concentration circulante de testostérone a été observée chez les mâles à PND60 mais pas à PND30. Concernant les effets sur le développement de la glande mammaire, l'exposition à la génistéine n'a pas eu d'effet sur les bourgeons terminaux, quelle que soit la période de développement considérée. De même, l'exposition n'avait pas modifié l'architecture globale de la glande mammaire à PND60.

Dans deux études réalisées par la même équipe, des rats mâles prépubères Wistar ont été exposés par gavage à des isoflavones de soja (Glycine max L., extrait de soja à 40% isoflavones, diluée dans l'huile de maïs ; composition non précisée) à des doses de 0 ; 0,5 ; 5 ou 50 mg.kg pc⁻¹.j⁻¹ de PND23 à PND60 (Oliveira *et al.*, 2022 ; Dal Forno *et al.*, 2023). Le groupe contrôle n'a reçu que de l'huile de maïs. Les résultats de l'étude d'Oliveira *et al.*, a montré que l'exposition aux isoflavones des rats mâles prépubères n'a pas eu d'effet sur la croissance des animaux. Il a été observé une augmentation de l'âge de la puberté chez les rats mâles à toutes les doses testées. D'après les auteurs, ces résultats suggèrent que la consommation d'isoflavones pendant la période prépubertaire perturbe l'axe hypothalamo-hypophyso-testiculaire chez le rat mâle, provoquant un hypogonadisme hypergonadotrope et

une altération des niveaux d'expression des gènes clés régulant l'axe hypothalamo-hypophysio-testiculaire.

L'étude de Oliviera *et al.* a permis d'identifier un LOAEL de 0,5 mg.kg pc⁻¹.j⁻¹ associé à un âge retardé de la séparation balano-préputiale (retard pubertaire) et une diminution significative de la testostéronémie (Oliviera *et al.*, 2022).

Les résultats obtenus dans l'étude de Dal Forno *et al.* montrent que la concentration sérique de TSH était augmenté dans les groupes traités avec 0,5 et 5 mg.kg pc⁻¹.j⁻¹, alors qu'aucune variation de T3 et de T4 n'a été observée. D'après les auteurs, ces résultats suggèrent que la consommation d'isoflavones de soja pendant la période prépubertaire pourrait induire chez le rat mâle une hypothyroïdie subclinique, avec des altérations de la régulation de l'axe hypothalamo-hypophysio-thyroïdien, une modulation de la synthèse des hormones thyroïdiennes et des altérations périphériques des organes cibles des hormones thyroïdiennes.

Dans une étude de Caceres *et al.*, des rats mâles ont été exposés par voie orale pendant 5 mois à des isoflavones. Les animaux ont été répartis en trois groupes, un groupe témoin, un groupe faiblement supplémenté en isoflavones (17 mg.kg pc⁻¹.j⁻¹ de génistéine et 12 mg.kg pc⁻¹.j⁻¹ de daïdzéine), et un groupe richement supplémenté en isoflavones (170 mg.kg pc⁻¹.j⁻¹ de génistéine et 120 mg.kg pc⁻¹.j⁻¹ de daïdzéine) (Caceres *et al.*, 2023). Après la 12^{ème} semaine, le groupe faiblement supplémenté en isoflavones a montré une perte significative de poids corporel par rapport au groupe témoin, tandis que le groupe recevant le régime richement supplémenté en isoflavones a montré un gain de poids corporel significatif.

Le poids relatif des testicules était significativement réduit à partir de la 12^{ème} semaine chez les rats recevant un régime faiblement ou richement supplémenté en isoflavones. En fin de traitement, l'administration d'un régime richement supplémenté en isoflavones a provoqué une réduction significative du diamètre des tubules séminifères par rapport au groupe témoin et au régime faiblement supplémenté en isoflavones.

Quarante pour cent des rats sous un régime faiblement supplémenté en isoflavones et 80 % des rats sous un régime richement supplémenté en isoflavones ont présenté des dégénérescences des tubules séminifères. A partir de la 16^{ème} semaine de traitement, la motilité des spermatozoïdes et le nombre de spermatozoïdes étaient significativement réduits dans les groupes sous régimes faiblement et richement supplémentés en isoflavones par rapport au groupe témoin. Les concentrations plasmatiques de progestérone étaient diminuées significativement dans les groupes sous régimes faiblement et richement supplémentés en isoflavones. La concentration testiculaire de testostérone était diminuée dans les deux groupes supplémentés comparés au groupe témoin. Les niveaux d'œstradiol dans les groupes isoflavones étaient significativement plus élevés à partir de la 4^{ème} semaine jusqu'à la 20^{ème} semaine par rapport au groupe témoin. Ces différences dans les concentrations testiculaires de testostérone et œstradiol entre le groupe témoin et les groupes traités se reflétaient également dans le rapport testostérone sur œstradiol (T/E2) avec une réduction du rapport T/E2 des groupes traités depuis la 8^{ème} semaine jusqu'à la fin de l'expérimentation, dénotant un déséquilibre hormonal. Les auteurs concluent que, chez le rat mâle adulte, un régime long terme, faiblement ou richement supplémenté en isoflavones, compromet la fonctionnalité testiculaire, en provoquant un déséquilibre de l'homéostasie hormonale qui entraîne une réduction de la qualité du sperme. Cette étude a permis d'identifier

un LOAEL de 0,56 mg.kg pc⁻¹.j⁻¹ associé à une diminution significative de la testostérone circulante dès la première semaine d'exposition et de dihydrotestostérone dès la 2^{ème} semaine, et une diminution semi-quantitative (histologie) des spermatozoïdes épидидymaires.

3.1.5. Génotoxicité

Les données identifiées dans la littérature sur la génotoxicité des isoflavones concernent principalement la génistéine et la daïdzéine (SCCS, 2022). Pour ces deux substances, le test de mutation génique sur cellules procaryotes (test d'Ames) est négatif. Cependant, d'autres test *in vitro*, considérant divers effets (cassures chromosomiques ou formation d'adduits) se sont révélés positifs pour ces deux composés. Enfin, les essais *in vivo* de mutagenèse ou de dommages à l'ADN (aberrations chromosomiques, micronoyaux) se sont révélés négatifs pour la génistéine, mais un test d'échange des chromatides sœurs est positif pour la daïdzéine et un test de dommage à l'ADN (test des comètes) est positif pour la génistéine dans un contexte sensibilisé (exposition au NaNO₂). Etant donné les éléments mécanistiques connus (interaction possible avec le complexe topoisomérase II/ADN), le potentiel génotoxique des isoflavones ne peut être exclu.

3.1.6. Cancérogénicité

3.1.6.1. Chez l'Homme

Les différents rapports de synthèse s'accordent sur l'existence de conclusions ambiguës s'agissant des études s'adressant aux liens entre l'exposition aux isoflavones et le risque de survenue de cancer (Afssa, 2005 ; Efsa, 2015 ; Anses, 2016 ; VKM, 2017 ; NCM, 2020 ; SCCS, 2022). Les études se sont intéressées principalement au risque de cancers hormono-dépendants, notamment du sein (chez la femme) du fait des propriétés œstrogéniques des isoflavones. Bien qu'un nombre conséquent d'études aient souligné des associations protectrices au regard de la survenue d'un cancer du sein, les résultats restent hétérogènes, notamment en fonction du statut ménopausique de la femme. Certaines études montrent des associations protectrices exclusivement chez la femme non-ménopausée ou exclusivement chez la femme ménopausée. D'autres études ne montrent aucune association quel que soit ce statut ou à l'inverse une augmentation de risque. Les travaux s'intéressant au cancer de la prostate, moins nombreux que ceux s'adressant au cancer du sein, aboutissent à des conclusions également divergentes. Pour d'autres localisations tumorales, endomètre, ovaire, testicule, thyroïde et colon, les données existantes sont insuffisantes et ne permettent pas de conclure sur la présence ou l'absence d'associations.

Plusieurs méta-analyses récentes (2021 à 2024) suggèrent une réduction de risque de survenue du cancer du sein (Shin *et al.*, 2023 ; Yang *et al.*, 2023 ; Liu *et al.*, 2022, Boutas *et al.*, 2022), du cancer du poumon chez les non-fumeurs (Chei *et al.*, 2022) et du cancer de l'estomac chez les consommateurs de produits à base de soja non fermenté (Wang *et al.*, 2021). D'autres méta-analyses concluent à une augmentation de risque de survenue du cancer de l'estomac (Kim *et al.*, 2023), notamment chez les consommateurs de produits à base de soja fermenté (Wang *et al.*, 2021), et du cancer de la prostate (Liu *et al.*, 2022).

S'agissant des études publiées ces dernières années (2021 à 2024), une étude de cohorte prospective montre que l'apport alimentaire en phytoœstrogènes est associé à une diminution de risque de survenue de cancer de l'ovaire (Song *et al.*, 2024). Une autre étude de cohorte prospective a montré une absence d'association avec le risque de survenue de cancer du

sein, qu'il s'agisse de consommation de produits à base de soja fermenté ou pas (Shirabe *et al.*, 2021). Toutefois, cette même étude souligne un risque diminué de survenue d'un cancer du sein non localisé (métastasé) dans le cas d'une consommation élevée en produits fermentés (Shirabe *et al.*, 2021). A noter qu'une étude de cohorte prospective n'a pas montré d'association avec le risque de survenue de cancer du foie (Abe *et al.*, 2021). Des études cas-témoin en population générale ont montré une réduction du risque de survenue de cancer de l'œsophage (Sun *et al.*, 2021) et une réduction du cancer du sein mais seulement chez les femmes pré-ménopausées (Feng *et al.*, 2021). Une étude cas-témoin nichée au sein d'une cohorte prospective a montré une diminution de risque de survenue de cancer du poumon chez les non-fumeurs (Li *et al.*, 2022). Finalement, des études transversales ont montré des associations avec un excès de risque de cancers hormono-dépendants affectant le sein, l'endomètre et la prostate (Liu *et al.*, 2023 ; Lee *et al.*, 2022).

A Noter que la majorité des études sur la cancérogénicité des isoflavones se sont basées sur des évaluations indirectes des expositions estimées par des questionnaires alimentaires rétrospectifs. De ce fait, les estimations peuvent être soumises à de nombreux biais (de mesure, de confusion, de mémoire). Quelques études se sont basées sur des mesures ponctuels de l'exposition interne par dosage dans les urines d'une ou plusieurs isoflavones. Ces mesures ponctuelles (non répétées) peuvent également ne pas représenter un bon indicateur d'exposition compte tenu des courtes durées de demi-vie des isoflavones.

3.1.6.2. Chez l'animal

Dans l'étude du NTP de 2008 décrite précédemment où des rats SD mâles et femelles ont été exposés à la génistéine pendant 2 ans, ont été observées chez les rats femelles (génération F1C) des augmentations de l'incidence des adénomes et des adénocarcinomes de la glande mammaire (tumeurs combinées, $p = 0,037$) à la dose de 500 ppm (16/40 vs 9/44 chez les témoins), mais pas aux doses de 5 ppm et 100 ppm, de l'incidence des adénomes seuls de l'hypophyse (Pars Distalis) ($p = 0,004$) à 500 ppm (38/47,9 vs 46/47,2 chez les témoins) et de l'incidence de la combinaison adénomes et carcinomes de l'hypophyse (Pars Distalis) ($p = 0,004$) à 500 ppm (38/47,9 vs 46/47,2 chez les témoins), mais pas à 5 et 100 ppm. Il n'y a pas eu d'augmentation statistiquement significative de l'incidence de tumeurs chez le rat mâle aux doses testées dans l'étude pour la génération F1C. Les observations ne montrent pas non plus d'augmentation de l'incidence de tumeurs pour les autres sites analysés.

3.1.7. Populations sensibles

Les isoflavones ont des effets bénéfiques ou délétères suivant les personnes concernées. Cela dépend, entre autres, de l'âge, du sexe, du statut ménopausal, de la période d'exposition aux isoflavones et du statut tumoral (Hooper *et al.*, 2010 ; EFSA, 2015 ; Wei *et al.*, 2020 ; Lu *et al.*, 2022).

Compte tenu de la littérature, il est possible de définir les populations sensibles suivantes :

- les jeunes enfants, en particulier les petites filles, dont l'exposition précoce et prolongée aux isoflavones peut entraîner plus tard une puberté précoce (Testa *et al.*, 2018 ; Segovia-Siapco *et al.*, 2014),
- les femmes pré-ménopausées qui sont plus sensibles à l'effet proliférateur des isoflavones sur les cellules mammaires en raison de la densité des récepteurs aux œstrogènes. Celles-ci devraient limiter leur consommation de produits contenant des

isoflavones (Petrakis *et al.*, 1996 ; McMichael-Phillips *et al.*, 1998 ; Hargreaves *et al.*, 1999 ; Ollberding *et al.*, 2012),

- les femmes ayant des cellules prolifératives de la glande mammaire sensibles aux œstrogènes. Celles-ci ont un risque accru de développer un cancer du sein suite à la consommation d'isoflavones, et devraient donc limiter leur consommation (Grace *et al.*, 2004 ; Shike *et al.*, 2014 ; Khan *et al.*, 2012 ; Allred *et al.*, 2001 ; Ju *et al.*, 2001).
- les femmes enceintes ne constituent pas une population sensible en tant que telle, mais au regard de certaines études expérimentales indiquant un effet délétère possible sur la descendance, elles peuvent être considérée comme une population sensible pour protéger les enfants à naître.

3.2. Recensement des VTR et limites d'apport

• VTR

En 2015, l'Efsa a conduit une évaluation des risques sanitaires pour les femmes (péri)ménopausées, en se focalisant sur 3 organes cibles (glandes mammaires, utérus et thyroïde) (Efsa, 2015). L'Efsa n'a pris en compte que les études humaines conduites chez des femmes (péri)ménopausées ou les études animales sur des animaux ovariectomisés. En évaluant les effets des isoflavones sur ces trois organes cibles, l'Efsa a conclu qu'il n'était pas possible d'extrapoler directement les observations d'un organe aux autres, au regard des différences de fonctions, de la densité des récepteurs, des proportions de récepteurs aux œstrogènes α et β et des effets de l'activation des récepteurs. L'Efsa n'a pas pu dériver de VTR ou de limite maximale d'apport pour les compléments alimentaires contenant des isoflavones, en l'absence de preuve d'effet néfaste sur la glande mammaire, l'utérus et la thyroïde et de preuves limitées pour le cancer du sein. L'Efsa précise que les conclusions de son évaluation ne peuvent pas être extrapolées à d'autres groupes de population et d'autres situations dans la population générale.

En 2016, bien qu'aucune VTR n'ait été établie pour les isoflavones, l'Anses a calculé dans le cadre de l'EAT infantile, à titre indicatif et pour la génistéine uniquement, des marges d'exposition à partir d'un LOAEL de $35 \text{ mg.kg pc}^{-1}.\text{j}^{-1}$ issu d'une étude multigénérationnelle (NCTR, 2005 ; Rozman *et al.*, 2006). Cette étude a montré que la génistéine exerçait des effets reprotoxiques de type œstrogénique ou anti-androgénique chez le rat SD. Cette étude, évaluée par le NTP-CERHR (national toxicological program- center for the evaluation of risks to human reproduction) a permis d'identifier un LOAEL de $35 \text{ mg.kg pc}^{-1}.\text{j}^{-1}$ chez les nouveaux nés mâles (descente testiculaire plus tardive, diminution de la DAG). A titre provisoire, une marge d'exposition critique de 300 (10 pour prendre en compte la variabilité inter-espèces et 10 pour la variabilité interindividuelle et 3 car le point de départ est un LOAEL) a été retenue conduisant à une limite maximale d'apport recommandée de $0,117 \text{ mg.kg pc}^{-1}.\text{j}^{-1}$ pour les enfants de moins de 3 ans (Anses, 2016).

En 2020, le NCM a élaboré deux VTR basées sur des études animales, nommées HBGV (health-based guidance value) pour la génistéine de $0,09 \text{ mg.kg pc}^{-1}.\text{j}^{-1}$ pour les femmes enceintes et de $0,07 \text{ mg.kg pc}^{-1}.\text{j}^{-1}$ pour les enfants de plus de 3 ans (NCM, 2020) (Tableau 1).

Tableau 1 : HBGV pour la génistéine élaborées par le NCM

VR	Organisme	Nordic Council of Ministers	
	Année	2020	
	Nom	HBGV	
	Valeur	0,09 mg.kg pc⁻¹.j⁻¹	0,07 mg.kg pc⁻¹.j⁻¹
Population cible	Femmes enceintes	Enfants de plus de 3 ans	
Effet critique	Effets sur le développement		Avancement de l'âge pubertaire
Étude clé	Référence	NTP, 2008	Li <i>et al.</i> , 2014
	Espèce	Rats Sprague-Dawley	Souris C57BL/6J
	Exposition (durée, voie)	Multigénération (3 générations) Voie orale	de PND21 à l'âge de 5, 6, 7 ou 10 semaines Voie orale (alimentation)
Point de départ (PoD)	NOAEL = 100 ppm = 8,9 mg.kg pc ⁻¹ .j ⁻¹ *		LOAEL = 100 ppm = 20 mg.kg pc ⁻¹ .j ⁻¹ *
Ajustement temporel	/		/
Ajustement allométrique	/		/
Facteurs d'incertitude (FI)	100 (FI _A : 10 ; FI _H : 10)		300 (FI _A : 10 ; FI _H : 10 ; FI _{LB} : 3)

* utilisation d'un facteur de conversion recommandé par l'Efsa de 0,2 pour les expositions subaiguës chez les souris. Ainsi, 1 mg.kg⁻¹ dans l'alimentation correspond à 0,2 mg.kg pc⁻¹.j⁻¹.

• Limites d'apport en phytoœstrogènes

Plusieurs pays ont proposé des limites maximales d'apport de phytoœstrogènes dont certaines fondées sur des données sur la génistéine, incluant les autorités italiennes en 2002, l'Afssa⁶ en 2005, la Japanese Food Safety Commission en 2006 et le comité scientifique norvégien pour la sécurité alimentaire en 2017 (VKM, 2017).

En 2002, les autorités sanitaires italiennes ont conseillé au grand public de maintenir l'apport quotidien en phytoœstrogènes sous forme de compléments alimentaires à moins de 80 mg.j⁻¹, exprimé comme la quantité totale d'isomères d'isoflavones⁷ (Morandi *et al.*, 2005). Cela représente un apport quotidien maximal en phytoœstrogènes d'environ 1 mg.kg pc⁻¹.j⁻¹ chez un adulte de 70 kg.

En 2005, l'Afssa a proposé une limite maximale d'apport de 1 mg.kg pc⁻¹.j⁻¹ d'isoflavones équivalent aglycones (Afssa, 2005). Cette limite maximale se base sur des effets majoritairement observés chez les rongeurs avec une perte de poids suite à une exposition à 50 mg.kg pc⁻¹.j⁻¹ de génistéine (Slikker *et al.*, 2001 cité dans Afssa 2005), parfois liée à une baisse de la consommation alimentaire après exposition à des protéines de soja sous forme de farine, concentré ou d'isolat (11-39 mg.kg pc⁻¹.j⁻¹) (Rackis, 1979 cité dans Afssa 2005). L'étude d'Okazaki *et al.* ne confirme cependant pas ces résultats même à la dose la plus forte de génistéine testée (1000 mg.kg pc⁻¹.j⁻¹) pendant 28 jours (NOAEL = 120 mg.kg pc⁻¹.j⁻¹) (Okazaki *et al.*, 2002). Le NOAEL de 120 mg.kg pc⁻¹.j⁻¹ observé chez le rat correspond à une concentration plasmatique supérieure à 5 µM⁸. Cette concentration plasmatique peut être atteinte chez l'Homme avec des doses en génistéine de l'ordre de 1,5 à 2 mg.kg pc⁻¹.j⁻¹.

⁶ Agence française de sécurité sanitaire des aliments, devenu Anses en 2010.

⁷ daidzine, glycitine, génistine, 6"-O-acétyldaidzine, 6"-O-acétylglycitine, 6"-O-acétylgénistine, 6"-O-malonyldaidzine, 6"-O-malonylglycitine, 6"-O-malonylgénistine, daïdzéine, et génistéine

⁸ « En l'absence de données de cinétique propres à cette étude, une estimation fondée sur l'extrapolation des données « ingéré-circulant » conduirait à des taux circulants plasmatiques de génistéine supérieurs à 5 µM chez le rat » (Afssa, 2005).

En 2006, la Japanese Food Safety Commission a fixé des limites d'apport alimentaire pour les denrées alimentaires destinées à un usage médical spécifique et contenant des isoflavones de soja en tant qu'ingrédient ayant des effets bénéfiques supposés sur la santé pour les adultes (femmes pré et ménopausées et hommes) avec un apport alimentaire de 70-75 mg.j⁻¹ d'isoflavones de soja. Pour les foetus (femmes enceintes et susceptibles de l'être), les nourrissons et les enfants en bas âge, il n'a pas été possible de recommander de limite d'apport alimentaire (Japanese Food Safety Commission, 2006).

En 2017, le VKM a évalué les risques de la consommation de 40 ou 80 mg.j⁻¹ d'isoflavones de soja ajoutées à des compléments alimentaires et à d'autres aliments. Pour les enfants de 10 à 13 ans inclus, les données étaient insuffisantes pour tirer des conclusions sur les effets indésirables potentiels des isoflavones. Une consommation de 40 ou 80 mg.j⁻¹ d'isoflavones chez les adolescents des deux sexes (14 à 17 ans inclus), chez les femmes et chez les hommes pendant un à trois mois peut entraîner un risque d'effets indésirables sur les niveaux d'hormones, y compris sur la fonction menstruelle chez les filles et les femmes. Chez les femmes (péri)ménopausées, ces doses d'isoflavones pendant plusieurs mois et jusqu'à plusieurs années ne semblent pas entraîner d'effet néfaste (VKM, 2017).

3.3. Proposition de VTR long terme par voie orale pour la population générale

3.3.1. Choix de l'effet critique

L'étude du NTP a montré que les effets transposables à l'Homme suite à une exposition long terme et apparaissant à la plus faible dose chez les rats mâles se limitaient à la glande mammaire avec une augmentation de l'incidence de l'hyperplasie alvéolaire et canalaire de la glande mammaire (NTP, 2008). Le schéma (cf. rapport) d'induction de l'hyperplasie d'une génération à l'autre, avec des effets les plus forts observés dans les groupes de 100 et 500 ppm des générations F1 et F2 exposées en continu, indique que les expositions au cours du développement et après le sevrage contribuent à cet effet. L'exposition tardive à la puberté et à l'âge adulte, comme dans la génération F0, a produit des effets moindres.

Ainsi, le CES retient l'augmentation de l'incidence de l'hyperplasie alvéolaire et canalaire de la glande mammaire chez le rat mâle comme effet critique.

3.3.2. Analyse des VTR long terme existantes

En l'absence de VTR pour la population générale, les experts du CES proposent de construire une VTR pour cette population cible.

3.3.3. Construction de la VTR pour la population générale

3.3.3.1. Choix de l'étude clé

Parmi les études disponibles chez l'animal, l'étude de reproduction et de développement sur plusieurs générations du NTP est une étude approfondie en termes de durée, de nombre d'animaux et d'observations pathologiques, suite à une exposition long terme à la génistéine. **Ainsi, l'étude du NTP (NTP, 2008) est retenue comme étude clé.**

3.3.3.2. Choix du point de départ

Dans l'étude clé retenue, des rats NCTR CD (Sprague-Dawley) mâles et femelles (pour les générations F0, F1, F2, F3 et F4) ont été exposés à la génistéine administrée aux doses de 0, 5, 100 et 500 ppm dans la nourriture sans soja (soit $0,3 \pm 0,03$; $5,9 \pm 0,5$; $28,9 \pm 2,5$ mg.kg pc⁻¹.j⁻¹). L'exposition chez les mâles de la génération F0 *via* l'alimentation était de 98 jours. Dans cette étude, l'exposition des rats mâles de la génération F0 a montré une augmentation de l'incidence d'hyperplasie alvéolaire et canalaire de la glande mammaire à la dose de 500 ppm (28,9 mg.kg pc⁻¹.j⁻¹). Ceci a permis d'identifier la dose de 100 ppm (5,9 mg.kg pc⁻¹.j⁻¹) comme étant un NOAEL.

Le NOAEL de 5,9 mg.kg pc⁻¹.j⁻¹ est retenu comme point de départ.

3.3.3.3. Ajustement allométrique

Pour réduire l'incertitude sur la variabilité inter-espèces, un ajustement allométrique a été réalisé. Une dose équivalente humaine (HED = Human equivalent dose) est calculée à l'aide de l'équation suivante⁹ :

$$\text{Dose équivalente Homme} = \text{Dose animal} \times \left(\frac{\text{Poids animal}}{\text{Poids homme}} \right)^{1/4}$$

Le poids moyen des rats est de 0,426 kg. Celui utilisé pour l'Homme pour le calcul est de 70 kg.

Soit $\text{NOAEL}_{\text{HED}} = 5,9 \times (0,426/70)^{0,25} = 1,65$ mg.kg pc⁻¹.j⁻¹

Le NOAEL_{HED} de 1,65 mg.kg pc⁻¹.j⁻¹ est retenu comme PoD.

3.3.3.4. Choix des facteurs d'incertitude

Le calcul de la VTR à partir de l'étude du NTP de 2008 a été effectué à l'aide des facteurs d'incertitude (FI) suivants (Anses, à paraître) :

- Variabilité inter-espèces (FI_A) : 2,5 pour tenir compte de la composante toxicodynamique, un ajustement dosimétrique ayant été réalisé ;
- variabilité interindividuelle (FI_H) : 10 par défaut ;
- transposition subchronique à chronique (FI_S) : $\sqrt{10}$, la période d'exposition de 98 jours correspondant à une durée subchronique (exposition des animaux mâles de la génération F0 de PND42 à 140) ;
- utilisation d'un point de départ (FI_{B/L}) : 1, le PoD étant un NOAEL ;
- insuffisance des données (FI_D) : 1, de multiples études de la toxicité de la génistéine étant disponibles.

Un facteur d'incertitude global de 79 est donc utilisé pour la construction de la VTR.

3.3.3.5. Proposition de VTR long terme par voie orale pour la population générale et niveau de confiance

$$\text{VTR} = \text{NOAEL}_{\text{HED}} / \text{FI} = 1,65 / 79 = \mathbf{0,02 \text{ mg.kg pc}^{-1}.j^{-1}}$$

⁹ Cette équation est issue des recommandations de l'US EPA (US EPA, 2006).

Le niveau de confiance global pour cette VTR est estimé à 3/5, correspondant à un **niveau de confiance moyen**.

3.4. Proposition de VTR long terme par voie orale pour la femme enceinte (enfants à naître), la femme en âge de procréer et les enfants pré-pubères

3.4.1. Choix de l'effet critique

Plusieurs études réalisées chez les rongeurs montrent des effets sur la reproduction (Nagao *et al.*, 2001 ; NTP, 2008 ; Caceres *et al.*, 2020 ; Oliviera *et al.*, 2022, DelForno *et al.*, 2022 ; Abo Elsoud *et al.*, 2019 ; Eustache *et al.*, 2020 et 2009 ; Maraudino *et al.*, 2020).

Parmi les effets, sont identifiés un retard pubertaire chez le rat mâle, une diminution de l'âge de l'ouverture vaginale, une augmentation de la durée des cycles œstraux et une augmentation du développement des glandes mammaires chez la souris femelle, une hyperplasie alvéolaire et canalaire de la glande mammaire chez les mâles, des effets fonctionnels sur la fertilité (diminution de l'index de fertilité) chez les femelles, une diminution des poids relatifs des épидидymes chez les rats mâles exposés *in utero* et après la naissance et une diminution statistiquement significative de la taille des portées (résultats de l'accouplement des rats mâles de la génération F1 accouplés avec des femelles non exposées). Parmi ceux-ci, une diminution du poids relatif des épидидymes chez les rats mâles et une diminution statistiquement significative de la taille des portées ont été observés aux doses les plus faibles identifiées dans les études jugées de bonne qualité pour tous effets confondus.

Ainsi, le CES retient l'ensemble des effets sur la reproduction (diminution du poids relatif des épидидymes chez les rats mâles et une diminution statistiquement significative de la taille des portées) comme effets critiques.

3.4.2. Analyse des VTR long terme existantes

Dans le rapport du NCM en 2020, deux VTR de 0,09 et de 0,07 mg.kg pc⁻¹.j⁻¹ ont été élaborées et sont fondées, respectivement, sur des effets développementaux observés chez le rat femelle (NTP, 2008) et des effets de puberté précoce chez la souris femelle (Li *et al.*, 2014). Ces deux VTR ne sont pas retenues par le CES, qui considère que les données issues d'autres études permettent d'identifier d'autres effets critiques avec des PoD plus faibles. Concernant l'étude de Li *et al.*, bien qu'elle soit de bonne qualité méthodologique, aucun élément dans l'étude ne permet de recalculer et de confirmer les doses d'exposition des animaux exprimées en mg.kg pc⁻¹.j⁻¹. Cette incertitude ne permet pas de retenir cette VTR.

Ainsi, compte tenu de ces limites, le CES ne retient pas les VTR existantes et propose de construire une VTR long terme par voie orale.

3.4.3. Construction de la VTR long terme par voie orale pour la femme enceinte (enfants à naître), la femme en âge de procréer et les enfants pré-pubères

3.4.3.1. Choix de l'étude clé

Eustache *et al.* ont exposé quotidiennement par gavage à des doses de génistéine de 1 et 10 mg.kg pc⁻¹.j⁻¹ des rates gestantes Wistar han, de GD1 à PND21 (sevrage). Les rats étaient ensuite exposés quotidiennement, par gavage, jusqu'à PND80. Cette étude rapporte une

diminution des poids relatifs des épидидymes chez les rats mâles exposés *in utero* et après la naissance et une diminution, statistiquement significative, de la taille des portées (résultats de l'accouplement des rats mâles de la génération F1 accouplés avec des femelles non exposées). Ces effets sont considérés comme néfastes et transposables à l'Homme. Ceux-ci ont été observés aux doses les plus faibles identifiées dans les études jugées de bonne qualité tous effets confondus.

Ainsi, l'étude de Eustache *et al.* de 2009, jugée de bonne qualité, est retenue comme étude clé.

3.4.3.2. Choix du point de départ

Dans l'étude clé retenue (Eustache *et al.*, 2009), les effets développementaux sur la descendance exposée *in utero* et en postnatal sont ceux qui apparaissent à la dose la plus faible. **Ainsi, le CES retient comme point de départ un LOAEL de 1 mg.kg pc⁻¹.j⁻¹ associé à une diminution du poids relatif des épидидymes chez les rats mâles exposés *in utero* et après la naissance, et une diminution, statistiquement significative, de la taille des portées issues de l'accouplement des mâles de la génération F1 et des femelles non exposées.**

3.4.3.3. Ajustement allométrique

Pour réduire l'incertitude sur la variabilité inter-espèces, un ajustement allométrique est réalisé. Une dose équivalente humaine (HED) est calculée à l'aide de l'équation citée en chapitre 3.3.3.3 en utilisant un poids moyen des rats de 0,25 kg et de 70 kg pour l'Homme.

Soit $LOAEL_{HED} = 1 \times (0,25/70)^{0,25} = 0,24 \text{ mg.kg pc}^{-1}.j^{-1}$

Le LOAEL_{HED} de 0,24 mg.kg pc⁻¹.j⁻¹ est retenu comme PoD.

3.4.3.4. Choix des facteurs d'incertitude

Le calcul de la VTR à partir de l'étude de Eustache *et al.* de 2009 a été effectué à l'aide des facteurs d'incertitude (FI) suivants (Anses, à paraître) :

- variabilité inter-espèces (FI_A) : 2,5 pour tenir compte de la composante toxicodynamique, un ajustement dosimétrique ayant été réalisé ;
- variabilité interindividuelle (FI_H) : $\sqrt{10}$, la VTR étant déjà élaborée pour une population sensible ;
- transposition subchronique à chronique (FI_S) : 1, les effets critiques résultant d'une exposition *in utero* ;
- utilisation d'un point de départ (FI_{B/L}) : $\sqrt{10}$, le PoD utilisé étant un LOAEL ;
- insuffisance des données (FI_D) : 1, de multiples études de la toxicité de la génistéine étant disponibles.

Un facteur d'incertitude global de 25 est donc utilisé pour la construction de la VTR.

3.4.3.5. Proposition de VTR long terme par voie orale pour la femme enceinte (enfants à naître), la femme en âge de procréer et les enfants pré-pubères et niveau de confiance

$$VTR = LOAEL_{HED}/FI = 0,24 / 25 = 0,01 \text{ mg.kg pc}^{-1}.j^{-1}$$

Le niveau de confiance global pour cette VTR est estimé à 2,8/, correspondant à un **niveau de confiance moyen**.

3.5. Conclusion et recommandations du CES

Deux VTR long terme par voie orale ont été élaborées pour la génistéine :

- une pour la population générale,
- une pour la femme enceinte (enfant à naître), la femme en âge de procréer et les enfants pré-pubères.

Bien que le calcul de ces VTR soit fondé sur les données propres aux effets de la génistéine, elles peuvent être étendues à la somme des isoflavones exprimée en $\text{mg.kg pc}^{-1}.\text{j}^{-1}$ d'équivalent aglycone (libres ou conjuguées).

La VTR long terme par voie orale est fondée sur l'augmentation de l'incidence de l'hyperplasie alvéolaire et canalaire de la glande mammaire chez le rat mâle. Un niveau de confiance moyen a été attribué à cette VTR.

Une VTR long terme par voie orale pour la femme enceinte (enfant à naître), la femme en âge de procréer et les enfants pré-pubères est proposée pour la génistéine basée sur une diminution du poids relatif des épидидymes chez les rats mâles exposés *in utero* et après la naissance, et une diminution statistiquement significative de la taille des portées issues de l'accouplement des mâles de la génération F1 et de femelles non exposées. Un niveau de confiance moyen a été attribué à cette VTR.

Tableau 2 : VTR long terme par voie orale pour la génistéine pour la population générale et la femme enceinte (enfant à naître), la femme en âge de procréer et les enfants pré-pubères

VR	Organisme	Anses	
	Année	2024	
	Nom	VTR long terme par voie orale	
	Valeur	0,02 mg.kg pc ⁻¹ .j ⁻¹	0,01 mg.kg pc ⁻¹ .j ⁻¹
Population cible		Population générale	Femme enceinte (enfant à naître), femme en âge de procréer et les enfants pré-pubères
Effet critique		Augmentation de l'incidence de l'hyperplasie alvéolaire et canalaire de la glande mammaire chez les rats mâles de la génération F0	Diminution du poids relatif des épидидymes chez les rats mâles et diminution de la taille des portées
Étude clé	Référence	NTP, 2008	Eustache <i>et al.</i> , 2009
	Espèce	Rats NCTR CD (Sprague-Dawley)	Rats Wistar han
	Exposition (durée, voie)	Du jour postnatal 42 jusqu'au jour postnatal 140 (F0)	De la gestation jusqu'au jour postnatal 80.
Point de départ (PoD)		NOAEL = 5,9 mg.kg pc ⁻¹ .j ⁻¹	LOAEL = 1 mg.kg pc ⁻¹ .j ⁻¹
Ajustement temporel		Aucun	Aucun
Ajustement allométrique		NOAEL _{HED} = 1,65 mg.kg pc ⁻¹ .j ⁻¹	LOAEL _{HED} = 0,24 mg.kg pc ⁻¹ .j ⁻¹
Facteurs d'incertitude (FI)		79 (FI _A : 2,5 ; FI _H : 10 ; FI _L : 1 ; FI _S : √10 ; FI _D : 1)	25 (FI _A : 2,5 ; FI _H : √10 ; FI _L : √10 ; FI _S : 1 ; FI _D : 1)
Niveau de confiance		Moyen	Moyen

PND : jour post-natal, NOAEL : No Observed Adverse Effect Level (= dose maximale n'entraînant pas d'effet néfaste observé), LOAEL : Lowest Observed Adverse Effect Level (= dose minimale entraînant un effet néfaste observé), HED : Human Equivalent Dose, FI_{A-TD} : Composante toxicodynamique du facteur d'incertitude inter-espèces, FI_H : Facteur d'incertitude intra-espèce ou interindividuel, FI_{B/L} : Facteur d'incertitude lié au point de départ, FI_S : Facteur d'incertitude lié à la durée de l'étude clé, FI_D : Facteur d'incertitude lié à l'insuffisance de données.

Selon les études expérimentales, tant *in vitro* qu'*in vivo*, le potentiel œstrogénique de la génistéine est supérieur à celui de la daïdzéine. Cependant, la daïdzéine est transformée en équol par le microbiote intestinal, et le potentiel œstrogénique de ce dernier est voisin de celui de la génistéine (Shor *et al.*, 2002 ; Setchell *et al.*, 2002). Ainsi, pour les personnes productrices d'équol, la génistéine et la daïdzéine exercent finalement un effet œstrogénique d'intensité comparable. Compte tenu de ces équivalences et du fait que les données toxicologiques *in vivo* en lien avec une perturbation endocrinienne sont quasi exclusivement fournies sur des effets de la génistéine, le calcul des VTR s'est fondé sur les données propres aux effets de la génistéine, ces VTR pouvant être étendues à la somme des isoflavones (aglycones et glucuronides) exprimée en mg.kg pc⁻¹.j⁻¹ d'équivalent aglycone (libres ou conjuguées).

Il est important de garder à l'esprit que ces deux VTR proposées ont été déterminées en suivant la méthodologie validée pour des agents chimiques dont l'exposition est indésirable (pesticides, produits dangereux, intermédiaires de synthèse, ...). Cependant, cette saisine s'adresse à une famille de composés naturellement présents dans l'alimentation, et pour lesquels il existe une grande quantité de données humaines testant leurs éventuels effets bénéfiques et non pas indésirables.

4. CONCLUSIONS ET RECOMMANDATIONS DE L'AGENCE

L'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail endosse les deux propositions de valeurs toxicologiques de référence (VTR) construites pour la génistéine pour une exposition sur le long terme par voie orale, l'une pour la population générale, l'autre pour la femme en âge de procréer, les enfants pré-pubères et la femme enceinte. Bien que fondées sur des données propres à la génistéine, l'Agence considère que ces deux VTR peuvent être étendues à la somme des isoflavones exprimée en $\text{mg.kg.pc}^{-1}.\text{j}^{-1}$ d'équivalent aglycone. En l'absence de données, il n'a pas été possible de proposer de VTR pour les femmes ménopausées.

L'Agence rappelle qu'une VTR est un indice toxicologique qui permet de qualifier ou de quantifier un risque pour la santé humaine.

A cette fin, la démarche générale mise en œuvre pour définir les VTR repose sur le choix d'un effet critique correspondant à l'effet néfaste le plus sensible dûment documenté, c'est-à-dire apparaissant à la plus faible dose, indépendamment des mécanismes biologiques sous-jacents. Les effets critiques retenus pour les deux VTR du présent avis, identifiés à partir des études scientifiques actuellement disponibles, correspondent à des effets reprotoxiques pouvant résulter d'un mode d'action endocrinien. L'Agence souligne à ce titre que la génistéine et la daïdzéine ont été examinées dans le cadre du règlement cosmétique, notamment du fait de préoccupations sur leurs propriétés de perturbation endocrinienne (SCCS, 2022). Ces préoccupations demeurent à l'issue de cette évaluation.

Les résultats obtenus soutiennent le besoin d'engager une réflexion méthodologique plus large concernant la construction de VTR pour les substances présentant une activité endocrinienne et l'utilisation de tels repères toxicologiques dans des approches quantitatives de risques sanitaires. Pour ce faire, l'Anses lancera une consultation auprès de ses homologues européens afin de partager les pratiques de détermination de VTR et de conduite d'évaluations de risques pour des perturbateurs endocriniens ou de substances présentant une activité endocrine.

Dans l'attente, l'Anses considère que ces VTR peuvent d'ores et déjà être utilisées pour évaluer les risques liés à des situations d'exposition contrainte aux isoflavones, comme dans le cas par exemple d'une proposition de menu unique en restauration collective. Ces VTR ont ainsi été utilisées dans le cadre de l'expertise relative à l'évaluation du risque sanitaire de la consommation d'aliments contenant des isoflavones (saisine 2022-SA-0221).

Enfin, l'Agence souligne que le choix de mesures de gestion des risques dans un contexte d'exposition donné peut par ailleurs intégrer, en complément d'une évaluation des risques sur la base d'une VTR, d'autres paramètres tels que d'éventuels besoins identifiés pour des populations ciblées, qu'il s'agisse des substances ou de leurs vecteurs, dans le cas où leur intérêt nutritionnel ou physiologique ne peut être substitué.

Pr Benoit VALLET

MOTS-CLÉS

Valeur toxicologique de référence, VTR, voie orale, long terme, isoflavones, daïdzéine, génistéine, équol, toxicité chronique.

Key words

Toxicological reference value, TRV, oral route, long term, isoflavones, daidzein, genistein, equol, chronic toxicity.

CITATION SUGGÉRÉE

Anses. (2025). Avis relatif à l'élaboration de VTR long terme par voie orale pour les isoflavones. Saisine 2022-SA-0221. Maisons-Alfort : Anses, 25 p.

Valeurs toxicologiques de référence (VTR)

Elaboration de VTR long terme par voie orale pour les isoflavones

**Mission permanente « Valeurs toxicologiques de référence »
Saisine « n°2022-SA-0221 »
Saisines liées « n° 2019-SA-0010, 2019-SA0205 ; 2019-SA-0118 »**

RAPPORT¹ d'expertise collective Comité d'experts spécialisé

« Valeurs sanitaires de référence »

Juin 2024

¹ Annule et remplace la version mise en ligne le 24 mars 2025 (voir annexe 6 pour la modification effectuée le 26 mars 2025)

Citation suggérée

Anses. (2024). Élaboration de VTR long terme par voie orale pour les isoflavones. (saisine 2022-SA-0221). Maisons-Alfort : Anses, 2024 100 p.

Mots clés

Valeur toxicologique de référence, VTR, voie orale, long terme, isoflavones, daïdzéine, génistéine, équol, toxicité chronique.

Key words

Toxicological reference value, TRV, oral route, long term, isoflavones, daidzein, genistein, equol, chronic toxicity.

Présentation des intervenants

PRÉAMBULE : Les experts membres de comités d'experts spécialisés, de groupes de travail ou désignés rapporteurs sont tous nommés à titre personnel, *intuitu personae*, et ne représentent pas leur organisme d'appartenance.

RAPPORTEURS

Mme Marie-Chantal CANIVENC-LAVIER – INRAE – Dijon – Compétences : toxicologie nutritionnelle, phytoœstrogènes, perturbateurs endocriniens.

M. Ludovic WROBEL – Biologiste de Recherche – Hôpital Universitaire de Genève – Compétences : oncologie, neurobiologie, neurotoxicité, immunotoxicité, statistiques

M. Luc MULTIGNER – Directeur de recherche, INSERM U1085 - IRSET – Compétences : épidémiologie, perturbateurs endocriniens, pathologies des fonctions et des organes de la reproduction.

M. Olivier SORG – Chef de groupe de recherche à l'Université de Genève - Compétences : Docteur es science en biochimie, toxicologie expérimentale, dermatotoxicologie.

Mme Catherine VIGUIE – INRAE – Toulouse – Compétences : endocrinologie, perturbateurs endocriniens, toxicologie, pharmacologie.

COMITÉ D'EXPERTS SPÉCIALISÉ

Les travaux, objets du présent rapport ont été suivis et adoptés par le CES suivant :

CES « Valeurs sanitaires de référence » (CES VSR) (2021-2023) – 21 octobre 2022, 14 septembre et 14 décembre 2023, 25 janvier, 15 mars, 16 mai et 28 juin 2024.

Président

M. Fabrice MICHIELS – Médecin du travail / toxicologue au Service de prévention et santé au travail de Corrèze et de Dordogne (SPST 19-24) – Compétences : Médecine du travail, toxicologie

Vice-président

Mme Anne MAITRE – Professeur des Universités – Praticien Hospitalier (PU-PH) au Laboratoire de Toxicologie Professionnelle et Environnementale, CHU de Grenoble ; Responsable de l'équipe « Environnement et prédiction de la santé des populations », Laboratoire TIMC, Université Grenoble Alpes – Compétences : médecine ; toxicologie ; IBE ; métrologie des polluants ; hygiène industrielle – Démission en mars 2023

M. Jérôme THIREAU – PhD, Chargé de recherche au CNRS - Compétences : physiologie animale ; électrophysiologie ; biologie cellulaire ; cardiotoxicité – A compter d'avril 2023

Membres

M. Benoît ATGE – Médecin du Travail, Médecin Toxicologue, AHI33. – Compétences : Toxicologie, Médecine, Santé au Travail, biosurveillance, agents cytotoxiques, évaluation des expositions, contaminations surfaciques - A compter de novembre 2023

M. Luc BELZUNCES – Directeur de Recherche et Directeur du Laboratoire de Toxicologie Environnementale à l'INRAE – Compétences : toxicologie générale ; neurotoxicologie, écotoxicologie ; chimie analytique ; évaluation des risques

Mme Michèle BISSON – Toxicologue Responsable d'étude à l'Ineris – Compétences : pharmacien toxicologue ; VTR ; évaluation des risques sanitaires

Mme Céline BOTINEAU – Ingénieur de prévention du risque chimique au CEA – Compétences : hygiène industrielle ; chimie ; évaluation des risques - Démission en novembre 2022

Mme Anne CHEVALIER – Retraitée de l'Institut de Veille Sanitaire – Compétences : épidémiologie

M. François CLINARD – Épidémiologiste à l'Agence Santé Publique France – Compétences : pharmacien toxicologue ; épidémiologie ; évaluation des risques sanitaires – Démission en mars 2023

Mme Fatiha EL-GHISSASSI – Scientifique, Programme des Monographies. Evidence Synthesis and Classification Branch. Centre International de Recherche sur le Cancer – Compétences : biochimie spécialiste en cancérogénèse et génotoxicité

M. Claude EMOND – Professeur associé – École de santé publique, Université de Montréal, Département de santé environnementale et santé au travail – Compétences : toxicologie ; modèle PBPK ; toxicocinétique ; nanotoxicologie ; perturbateurs endocriniens

M. Robert GARNIER – Médecin toxicologue, Paris – Compétences : toxicologie médicale ; santé au travail ; santé environnementale

Mme Perrine HOET – Professeur à l'Université Catholique de Louvain, IREC – Compétences : médecine du travail ; toxicologie professionnelle et environnementale – Démission en mars 2023

M. Kevin HOGVEEN – Toxicologue, Anses – Fougères, Toxicologie des Contaminants – Compétences : toxicologie ; génotoxicité ; hépatotoxicité ; toxicologie *in vitro*

Mme Yuriko IWATSUBO – Médecin épidémiologiste à Santé publique France – Compétences : Épidémiologie des risques professionnels

M. Jérôme LANGRAND – Praticien hospitalier, Chef de Service du centre antipoison de Paris, AP-HP Hôpital Fernand-Widal, Centre antipoison de Paris – Compétences : Toxicologie, médecine, toxicologie professionnelle, pathologies environnementales et professionnelles, toxines - A compter de novembre 2023

M. Frédéric LIRUSSI – Professeur des Universités– Praticien Hospitalier (PU-PH) à l'UFR des Sciences de Santé & CHRU de Besançon - Compétences : toxicologie clinique ; toxicologie analytique ; immunité innée ; reprotoxicité – Démission en mars 2023

Mme Gladys MIREY – Directrice de recherche en toxicologie, Responsable de l'équipe Génotoxicité & Signalisation, INRAE UMR TOXALIM – Compétences : Toxicologie cellulaire, génotoxicité, mécanismes d'action, contaminants, modèles d'étude / méthodes alternatives, effets des mélanges - A compter de novembre 2023

M. Luc MULTIGNER – Directeur de recherche, INSERM U1085 - Irset – Compétences : épidémiologie ; perturbateurs endocriniens ; pathologies des fonctions et des organes de la reproduction

Mme Nadia NIKOLOVA-PAVAGEAU – Conseiller médical à l'INRS – Compétences : médecine du travail ; toxicologie médicale ; IBE

Mme Magalie OLIVA-LABADIE – Praticien hospitalier, Chef de Service, CHU de Bordeaux, Hôpital Pellegrin, Centre hospitalier universitaire, Centre Antipoison de Nouvelle Aquitaine – Compétences : Toxicologie, médecine, toxicologie environnementale, toxines - A compter de novembre 2023

M. Benoît OURY – Retraité de l'INRS – Compétences : métrologie atmosphérique ; air des lieux de travail ; évaluation expositions professionnelles

M. Henri SCHROEDER – Maître de Conférence à la Faculté des Sciences et Technologies de l'Université de Lorraine – Département Neurosciences et Biologie Animale et unité INSERM U1256 Nutrition, Génétique et Exposition aux Risques environnementaux - Pharmacien neurobiologiste – Compétences : neurotoxicité ; polluants environnementaux ; comportement animal ; développement cérébral ; exposition périnatale

M. Olivier SORG – Chef de groupe de recherche à l'Université de Genève - Compétences : Docteur es science en biochimie ; toxicologie expérimentale ; dermatotoxicologie

M. Jérôme THIREAU – PhD, Chargé de recherche au CNRS - Compétences : physiologie animale ; électrophysiologie ; biologie cellulaire ; cardiotoxicité – Jusqu'en mars 2023

M. Antoine VILLA – Praticien hospitalier, médecin du travail, Hôpital de la Timone, Marseille – Compétences : Pathologies professionnelles, toxicologie, médecine, expologie-biosurveillance, fibres d'amiante, agents cytotoxiques - A compter de novembre 2023

Mme Maeva WENDREMAIRE – Maître de conférences à l'Université de Bourgogne – Compétences : toxicologie

PARTICIPATION ANSES

Coordination scientifique

M. François POUZAUD – coordinateur d'expertise scientifique – Anses

Contribution scientifique

Mme. Aurélie MATHIEU-HUART- Adjointe d'unité – Anses

M. François POUZAUD – coordinateur d'expertise scientifique – Anses

Secrétariat administratif

Mme Agnès BRION – Anses

AUDITIONS

Pr Catherine BENNETAU-PELISSERO - Bordeaux Sciences Agro.

SOMMAIRE

Présentation des intervenants	3
Sigles et abréviations	8
Liste des tableaux	10
Liste des figures	11
1 Contexte, objet et modalités de réalisation de l'expertise	12
1.1 Contexte	12
1.2 Objet de la saisine	13
1.2.1 Modalités de traitement : moyens mis en œuvre et organisation.....	13
1.2.2 Méthode de travail	13
1.3 Prévention des risques de conflits d'intérêts	17
2 Informations générales	18
2.1 Identification des isoflavones	18
2.2 Propriétés physico-chimiques	20
2.3 Classification	20
2.4 Sources	20
3 Synthèse des données toxicologiques	23
3.1 Toxicocinétique.....	23
3.1.1 Absorption et biodisponibilité	23
3.1.2 Distribution.....	24
3.1.3 Métabolisme	25
3.1.4 Élimination	27
3.1.5 Modèle PBPK	27
3.2 Toxicité aiguë	28
3.2.1 Données chez l'Homme.....	28
3.2.2 Données chez l'animal.....	28
3.3 Toxicité répétée et chronique.....	29
3.3.1 Données chez l'Homme.....	29
3.3.2 Données chez l'animal.....	30
3.4 Effets sur la reproduction et le développement	31
3.4.1 Données sur la reproduction et le développement chez l'Homme.....	31
3.4.2 Données sur la reproduction et le développement chez l'animal.....	32
3.5 Génotoxicité.....	45
3.5.1 Génistéine	45
3.5.2 Daïdzéine	47
3.5.3 Conclusion.....	48

3.6	Cancérogénicité.....	48
3.6.1	Chez l'Homme	48
3.6.2	Chez l'animal	49
3.7	Populations sensibles	50
4	Recueil des valeurs toxicologiques de référence existantes pour le long terme par voie orale et limite d'apport	51
5	Proposition de VTR long terme par voie orale pour la population générale	55
5.1	Choix de l'effet critique.....	55
5.2	Analyse des VTR long terme existantes	55
5.3	Construction de la VTR pour la population générale	55
5.3.1	Choix de l'étude clé	55
5.3.2	Choix du point de départ.....	55
5.3.3	Ajustement allométrique	56
5.3.4	Choix des facteurs d'incertitude	56
5.3.5	Proposition de VTR long terme par voie orale et niveau de confiance	56
6	Proposition de VTR long terme par voie orale pour la femme enceinte (enfants à naître), la femme en âge de procréer et les enfants pré-pubères.	58
6.1	Choix de l'effet critique	58
6.2	Analyse des VTR long terme existantes	58
6.3	Construction de la VTR	59
6.3.1	Choix de l'étude clé	59
6.3.2	Choix du point de départ.....	59
6.3.3	Ajustement allométrique	59
6.3.4	Choix des facteurs d'incertitude	59
6.3.5	Proposition de VTR long terme par voie orale et niveau de confiance.....	60
7	Conclusion et recommandations du CES	61
8	Bibliographie.....	64
Annexe 1 : Lettre de saisine		75
Annexe 2 : Recherche bibliographique.....		78
Annexe 3 : Données de génotoxicité pour la génistéine et la daïdzéine (issues du rapport SCCS, 2022)		81
Annexe 4 : Grille d'évaluation du niveau de confiance de la VTR orale long terme pour la population générale		98
Annexe 5 : Grille d'évaluation du niveau de confiance de la VTR orale long terme pour la femme enceinte (enfants à naître), la femme en âge de procréer et les enfants pré-pubères		99
Annexe 6 : Suivi des actualisations du rapport		100

Sigles et abréviations

Afssa	: Agence française de sécurité sanitaire des aliments
Anses	: Agence nationale de sécurité sanitaire alimentation environnement travail
BMD	: Benchmark dose
CES	: Comité d'experts spécialisé
DGS	: Direction générale de la santé.
Efsa	: European food safety authority (= autorité européenne de sécurité des aliments)
ERS	: Evaluation de risques sanitaires
FI	: Facteur d'incertitude
FI _A	: Facteur d'incertitude inter-espèces
FI _D	: Facteur d'incertitude au manque de données
FI _H	: Facteur d'incertitude interindividuel
FI _{L/B}	: Facteur d'incertitude lié à l'utilisation d'un LOAEL ou d'une BMD
GD	: Jour gestationnel (= gestational day)
GT	: Groupe de travail
HED	: Dose équivalente humaine (= Human équivalente dose)
LOAEL	: Lowest observed adverse effect level (= dose minimale entraînant un effet néfaste observé)
NCM	: Nordic council of ministers (= conseil nordique des ministres)
NOAEL	: No observed adverse effect level (= dose maximale n'entraînant pas d'effet néfaste observé)
NTP	: National toxicology program
PND	: Jour post-natal (= post natal day)
SD	: Sprague Dawley
SCCS	: Comité scientifique pour la sécurité sanitaire des consommateurs
SHBG	: Sex hormone binding globulin
t _{1/2}	: Temps de demi-vie
T3	: Triiodothyronine
T4	: Thyroxine
TG	: Thyroglobuline
TPO	: Thyroïde peroxydase

TSH	:	Thyroid-stimulating hormone
UDPGT	:	UDP-glucuronosyltransférase
US EPA	:	United States environmental protection agency (États-Unis)
VTR	:	Valeur toxicologique de référence
VKM	:	Vitenskapskomiteen for mat og miljø (= comité scientifique norvégien pour la sécurité alimentaire)

Liste des tableaux

Tableau 1 : Principales isoflavones	19
Tableau 2 : Propriétés physico-chimiques des principales isoflavones (SCCS, 2002 ; Pubchem).....	20
Tableau 3 : Catégorisations d'isoflavones en tant que PE potentiels	20
Tableau 4 : Teneurs en isoflavones aglycones ($\mu\text{g}/100\text{ g}$ d'aliment) d'après les études de l'alimentation totale françaises EAT2 (Anses, 2011) et EAT infantile (Anses, 2016).....	21
Tableau 5 : Résultats de l'étude multigénérationnelle sur la reproduction (NTP, 2008)	36
Tableau 6 : Résultats de l'étude multigénérationnelle sur la reproduction (NTP, 2008)	37
Tableau 7 : HBGV pour la génistéine élaborées par le Nordic Council of Ministers	53
Tableau 8 : VTR long terme par voie orale pour la génistéine pour la population générale et pour la femme enceinte (enfant à naître), la femme en âge de procréer et les enfants pré-pubère.....	62

Liste des figures

Figure 1 : Schéma des différentes étapes de proposition d'une VTR (Anses, à paraître)	16
Figure 2 : Niveau de confiance des VTR (Anses, à paraître)	16
Figure 3 : Logigramme explicitant l'attribution des niveaux de confiance (Anses, à paraître)	17
Figure 4 : Métabolisme de la génistéine (Boonpawa <i>et al.</i> , 2017).....	26
Figure 5 : Métabolisme de la daïdzéine (Efsa, 2015).....	26
Figure 6 : Schéma expérimental de l'étude multigénérationnelle sur reproduction (NTP, 2008)	34
Figure 7 : Niveau de confiance de la VTR long terme par voie orale pour la population générale	57
Figure 8 : Niveau de confiance pour la VTR long terme par voie orale pour la femme enceinte (enfants à naître), la femme en âge de procréer et les enfants pré-pubères.....	60

1 Contexte, objet et modalités de réalisation de l'expertise

1.1 Contexte

Les phytoœstrogènes sont naturellement présents dans certaines plantes. Leur appellation provient de leurs activités œstrogéniques. Celle-ci découlent de leur similitude structurale avec le 17 β -estradiol et/ou de leur capacité à se fixer sur les récepteurs aux œstrogènes. Les phytoœstrogènes se répartissent en 2 grandes familles :

- les flavonoïdes dont les coumestanes et les isoflavones, qui sont retrouvés principalement dans les légumineuses (haricots, pois, fèves), parfois à des taux physiologiquement actifs, notamment dans le soja et les produits dérivés,
- les non-flavonoïdes dont les entérolignanes et leurs précurseurs (lignanes), qui sont présents dans la plupart des produits végétaux à usage alimentaire riches en fibres (fruits, légumes, céréales et graines oléagineuses) et qui ont une activité œstrogénique plus modérée suite à une bioactivation par le microbiote intestinal.

L'Anses a été saisie par la Direction générale de la santé (DGS) et la Direction générale de l'alimentation (DGAL) le 29 octobre 2022 afin d'évaluer le risque sanitaire lié à la consommation d'aliments contenant des isoflavones.

D'autre part, l'Anses évalue les teneurs en isoflavones dans les aliments tels que consommés, notamment dans le cadre des Etudes Alimentation Totale (EAT) (Anses, 2011 ; Anses, 2016). Ces études, conduites par l'Anses à l'échelle nationale selon une méthode standardisée et recommandée par l'organisation mondiale de la santé (OMS), visent à surveiller l'exposition des populations à des agents chimiques présentes dans les aliments. Des évaluations quantitatives de risques sanitaires ont été réalisées quand cela a été possible. En l'absence de VTR, les apports estimés en isoflavones, équol et coumestrol pour la population générale dans l'EAT2 ont été comparés à la limite maximale d'apport de 1 mg.kg pc⁻¹.j⁻¹ pour ces substances proposées en 2005 par l'Agence (Afssa, 2005). Ils y étaient inférieurs pour 99,9% des adultes et 99,5% des enfants. Cependant, parmi les consommateurs de produits à base de soja (boissons au soja, desserts au soja, tofu, etc.), ces apports dépassaient parfois cette limite maximale. De fait, si un risque sanitaire semblait pouvoir être écarté pour la population générale, il ne pouvait l'être pour cette catégorie de consommateurs (Anses, 2011).

En 2016, dans le cadre de l'EAT infantile (EATi), les plus fortes concentrations en isoflavones étaient retrouvées dans les produits contenant du soja. Cependant, l'absence de valeur toxicologique de référence pour les enfants de moins de 3 ans n'avait pas permis de conclure sur le risque sanitaire lié à l'exposition à ces substances, à l'exception de la génistéine. Pour celle-ci, les données ne permettaient pas d'écarter le risque pour les enfants consommateurs de produits à base de soja, sur la base d'une dose minimale entraînant un effet néfaste observé (LOAEL) de 35 mg.kg pc⁻¹.j⁻¹ (NCTR, 2005 ; Rozman *et al.*, 2006), sans pour autant permettre l'établissement d'une VTR (Anses, 2016). A titre provisoire, une marge d'exposition critique de 300 avait été retenue (10 et 10 pour les variabilités inter et intra-individuelles et 3 car le point de départ était un LOAEL). Or l'exposition moyenne à la génistéine chez 14 enfants de 1 à 36 mois consommateurs de soja était de 0,88 mg.kg pc⁻¹.j⁻¹, correspondant à une marge

de sécurité de 40². Les isoflavones sont également recherchées dans l'étude EAT3 actuellement en cours.

Ainsi, évaluer les risques d'une exposition aux isoflavones, demande de disposer de VTR long terme par voie orale pour les isoflavones, en prenant en compte les différentes catégories de population, notamment la population adulte, les femmes ménopausées, les femmes enceintes et allaitantes, et les enfants.

1.2 Objet de la saisine

L'objet de la saisine 2022-SA-0221 déposée par la DGS et de la DGAL du 29 octobre 2022 porte sur l'évaluation du risque sanitaire de la consommation d'aliments contenant des isoflavones, en lien avec le risque de perturbation endocrinienne (Annexe 1). Cette saisine comporte plusieurs questions dont une relative à l'élaboration de valeurs toxicologiques de référence (VTR) long terme par voie orale pour les isoflavones, en tenant compte des différentes catégories de population. Le présent rapport ne concerne que cette dernière.

Cette expertise pourra également servir à d'autres travaux de l'Agence dont l'EAT3.

1.2.1 Modalités de traitement : moyens mis en œuvre et organisation

L'Anses a confié au comité d'experts spécialisé (CES) « valeurs sanitaires de référence » l'instruction de cette expertise.

Les travaux d'expertise des rapporteurs ont été soumis régulièrement au CES VSR pour avis et discussion, sur les aspects tant méthodologiques que scientifiques. Ceux-ci ont également été présentés au groupe de travail sur les perturbateurs endocriniens (GT PE). Le présent rapport tient compte des observations et éléments complémentaires transmis par les membres du CES VSR et/ou du GT PE.

Ces travaux sont ainsi issus d'un collectif d'experts aux compétences complémentaires.

L'expertise a été réalisée dans le respect de la norme NF X 50-110 « Qualité en expertise – prescriptions générales de compétence pour une expertise (mai 2003) ».

1.2.2 Méthode de travail

L'Anses définit une VTR comme une appellation générique regroupant tous les types d'indice toxicologique permettant d'établir une relation entre une quantité ou concentration d'un agent chimique et un effet néfaste (effet à seuil) ou entre une quantité ou concentration d'un agent chimique et une probabilité d'effet (effet sans seuil), à l'échelle d'une population. Par définition, elles sont construites pour protéger la population dans son ensemble, y compris les populations sensibles (ex. enfants, personnes âgées, etc.), des effets néfastes induits par l'agent chimique (Anses, à paraître).

² La marge de sécurité est calculée en divisant le LOAEL (ici 35 mg.kg pc⁻¹.j⁻¹ par l'exposition de la population considérée (ici 0,88 mg.kg pc⁻¹.j⁻¹).

Les VTR sont spécifiques d'un agent chimique, d'une voie (respiratoire, orale, cutanée) et d'une durée d'exposition (court, moyen ou long terme³).

Les VTR peuvent être utilisées dans le cadre des évaluations quantitatives de risques sanitaires (EQRS) réalisées à l'échelle populationnelle uniquement dans un contexte d'exposition donné et aider ainsi au choix de mesures de gestion des risques. Elles peuvent être également utilisées pour l'élaboration de valeurs guides (ex. : VGAI, VGS EDCH) ou de teneurs maximales réglementaires dans les aliments. Enfin, elles peuvent également servir à hiérarchiser des agents chimiques en fonction du danger qu'ils représentent, ces valeurs permettant souvent d'évaluer leur toxicité (Anses, à paraître).

En fonction du corpus des données et des connaissances disponibles sur le ou les mécanismes d'action biologique supposés de l'agent chimique d'intérêt, deux grands types de VTR long terme peuvent être élaborés :

- les VTR « à seuil de dose » qui correspondent à une estimation de la quantité ou de la concentration maximale de l'agent chimique à laquelle un individu ou une population peut théoriquement être exposé, sans risque d'effet néfaste sur la santé au cours d'une durée déterminée et sur la base de toutes les informations disponibles au moment de son élaboration. Elles sont construites dans le cas d'agents chimiques provoquant, au-delà d'une certaine dose, des effets dont la sévérité augmente avec la dose absorbée ;
- les VTR « sans seuil de dose » qui sont construites dans le cas d'agents chimiques pour lesquels l'effet néfaste peut apparaître quelle que soit la dose reçue, la probabilité de survenue d'effets néfastes augmentant avec la dose. Il s'agit, pour l'essentiel, des effets cancérogènes résultant d'un mécanisme génotoxique direct. Les VTR « sans seuil de dose » correspondent soit à la probabilité supplémentaire par unité de dose d'exposition à l'agent chimique (excès de risque unitaire : ERU), de développer l'effet critique pour un individu ou une population exposé(e) durant sa vie entière, soit à des concentrations/doses correspondant à un niveau de risque déterminé (habituellement 10^{-4} , 10^{-5} et 10^{-6}).

Afin de construire des VTR, l'Anses s'appuie sur son guide d'élaboration des VTR (Anses, à paraître).

En préalable à l'élaboration des VTR, les données relatives à la caractérisation de l'agent chimique (identification, propriétés physicochimiques, classifications), ainsi que des informations générales sur les usages, les sources et les expositions sont recueillies (cf. chapitre 2).

Un profil toxicologique est également réalisé de manière systématique, afin de définir les effets observés chez l'Homme et l'animal, en prenant en compte différents types d'exposition à l'agent chimique d'intérêt, caractérisés par leur durée et la voie d'exposition (orale, respiratoire, cutanée), ainsi que les mécanismes d'action et les populations sensibles. Les éventuels effets bénéfiques de l'agent chimique ne sont pas décrits dans le profil toxicologique.

Afin de recenser les données de toxicité par voie orale disponibles sur les isoflavones, une revue bibliographique a été réalisée à partir des bases de données Pubmed et Scopus entre le 1^{er} janvier 2021 et le 31 mai 2024 (Annexe 2). Cette période de recherche a été fixée en

³ Durée d'application des VTR :

- « court terme » pour les expositions d'une journée à deux semaines,
- « moyen terme » pour les expositions supérieures à deux semaines mais inférieures à un an,
- « long terme » pour les expositions de plus d'un an.

Néanmoins, si cela est jugé pertinent, ces durées d'application pourront être différentes pour certains agents chimiques spécifiques et dans ce cas, les durées retenues devront être justifiées.

tenant compte de la date de fin de la revue de littérature réalisée dans le rapport de synthèse le plus récent identifié (SCCS, 2022). Les données antérieures sont issues des rapports de synthèses rédigées par l'Afssa en 2005, l'Anses en 2016, et par des organismes européens et internationaux tels que l'autorité européenne de sécurité des aliments (Efsa) en 2015, le comité scientifique norvégien pour la sécurité alimentaire (VKM) en 2017 et le Conseil nordique des ministres (NCM) en 2020. Ces dernières ne seront pas détaillées dans le présent rapport et ne seront décrites que succinctement. Seuls les articles antérieurs jugés d'intérêt pour construire une VTR et les publications récentes identifiées sur la période 2021-2024 seront décrits de manière détaillée dans le chapitre 3.

Cette recherche bibliographique a permis d'identifier 4254 références. 4229 études n'ont pas été retenues. Aucune étude récente n'a été retenue pour la construction des VTR et 6 références complémentaires présentes dans les articles sélectionnés ou fournis par les experts ont été ajoutées. Le détail de la recherche bibliographique est présenté en Annexe 2.

Un recensement des VTR existantes pour la voie orale publiées jusqu'en 2024 par les principaux organismes de sécurité sanitaire reconnus au niveau supranational (OMS), européen (Efsa) ou national/régional (US EPA, ATSDR, OEHHA, Santé Canada, RIVM, etc.) a été réalisé. Seules les VTR publiées par une agence sanitaire et accompagnées d'un argumentaire scientifique robuste rédigé en anglais ou en français ont été incluses dans ce recensement. Les positions provisoires ou soumises pour consultation publique (draft) ont été également décrites. Lorsque plusieurs VTR ont été produites au fil du temps par un organisme, seule la VTR la plus récente publiée a été prise en compte.

L'élaboration des VTR suit une approche structurée et exigeante qui implique des évaluations collectives par des groupes de spécialistes. Pour ce faire, l'Anses s'appuie sur son guide d'élaboration des VTR (Anses, à paraître). La construction des VTR diffère en fonction des connaissances ou des hypothèses formulées sur les mécanismes d'action des substances. Toutefois, l'hypothèse par défaut est de considérer une relation monotone entre l'exposition, ou la dose, et l'effet, ou la réponse. En l'état actuel des connaissances et par défaut, on considère généralement que, pour les effets non cancérigènes, la toxicité ne s'exprime qu'au-delà d'un seuil de dose (Anses, à paraître).

En pratique, la construction d'une VTR externe comprend les étapes suivantes (Figure 1) :

- identifier le ou les organes cibles et le ou les effets critiques, sur la base du profil toxicologique ;
- identifier l'hypothèse de construction, à seuil ou sans seuil de dose, en fonction du mode d'action de la substance ;
- réaliser une analyse critique de chacune des VTR recensées afin d'identifier si l'une d'elles peut être retenue (choix). Cette analyse a été réalisée en prenant en compte différents critères d'analyse décrits dans le guide méthodologique de l'Anses (Anses, à paraître), tels que la transparence et l'argumentation, les différents choix de construction (choix de l'effet critique, de l'étude clé et du PoD ; utilisation d'ajustements temporel et allométrique ; choix des facteurs d'incertitude pour les effets à seuil de dose ou la méthode d'extrapolation aux faibles doses pour les VR sans seuil de dose) et l'année d'élaboration ou de révision de la VTR. Quand aucune VTR n'est jugée pertinente, la construction d'une nouvelle VTR est entreprise ;
- choisir une (ou plusieurs) étude(s) clé(s) de bonne qualité scientifique la (ou les) plus pertinente(s) parmi les études épidémiologiques ou toxicologiques permettant d'établir une relation dose-réponse ;

- définir un point de départ (PoD) chez l'Homme ou l'animal à partir de cette(ces) étude(s) ;
- réaliser des ajustements temporels et allométriques si nécessaire ;
- pour une VTR à seuil, appliquer des facteurs d'incertitude (FI) à ce PoD de manière à dériver une VTR applicable à l'ensemble de la population ;
- pour une VTR sans seuil, déterminer une pente et/ou des concentrations/doses associées à plusieurs niveaux de risque ;
- fixer un niveau de confiance.

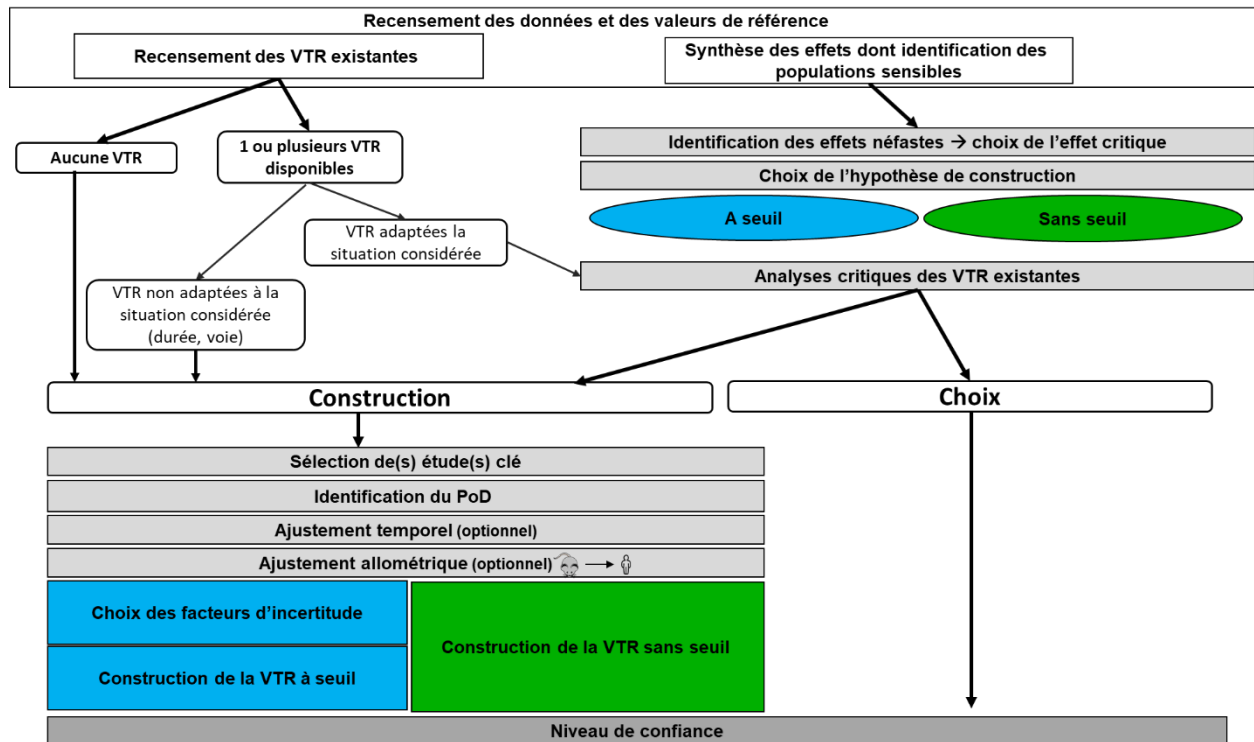


Figure 1 : Schéma des différentes étapes de proposition d'une VTR (Anses, à paraître)

Un niveau de confiance global est attribué à chaque VTR externe, qu'elle soit élaborée ou choisie. Cinq niveaux de confiance correspondant à cinq couleurs sont possibles : fort, moyen-fort, moyen, moyen-faible ou faible (Figure 2).



Figure 2 : Niveau de confiance des VTR (Anses, à paraître)

Le niveau de confiance global des VTR externes est estimé grâce à un outil établi par l'Anses en se fondant sur différents critères (Figure 3), tels que mentionnés dans le guide méthodologique de l'Anses (Anses, à paraître). Cet outil doit être utilisé systématiquement par au moins trois évaluateurs indépendants et ayant participé à la construction ou à la sélection de la VTR. Le niveau de confiance global est fixé collégialement sur la base des niveaux de confiance attribués par ces 3 évaluateurs et des arguments associés.

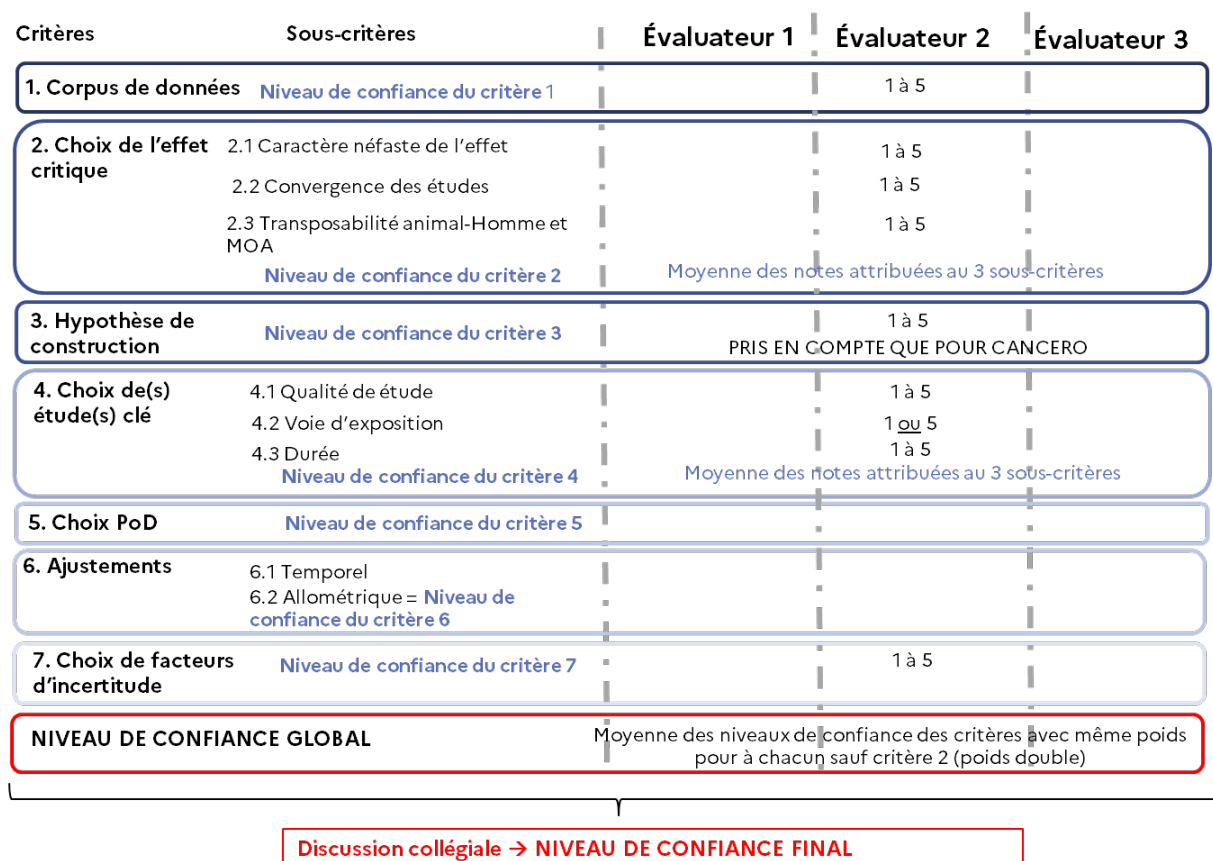


Figure 3 : Logigramme explicitant l'attribution des niveaux de confiance (Anses, à paraître)

1.3 Prévention des risques de conflits d'intérêts

L'Anses analyse les liens d'intérêts déclarés par les experts avant leur nomination et tout au long des travaux, afin d'éviter les risques de conflits d'intérêts au regard des points traités dans le cadre de l'expertise.

Les déclarations d'intérêts des experts sont publiées sur le site internet <https://dpi.sante.gouv.fr/>.

2 Informations générales

2.1 Identification des isoflavones

Les isoflavones, comme tous les phytoœstrogènes, sont issues du métabolisme secondaire des plantes : ils contribuent à leur système immunitaire, en ce sens que leur synthèse est induite par des agressions et des blessures (infections, attaques d'insectes, variation de température et intempéries). Ce sont des composés non-stéroïdiens polyphénoliques ayant des activités biologiques variées, mais qui ont en commun d'exercer des activités œstrogéniques. Celles-ci découlent de leur similitude structurale plus ou moins grande avec le 17 β -œstradiol et de leur capacité à activer les récepteurs aux œstrogènes, notamment les récepteurs nucléaires α et β , et le récepteur membranaire. Des effets œstrogéniques ont été notés *in vitro* à des concentrations d'isoflavones 10 à 1000 fois supérieures à celles de l'œstradiol et également *in vivo*.

Les isoflavones possèdent un ou plusieurs cycles aromatiques, porteurs d'au moins un groupe hydroxyle libre ou engagé dans une autre fonction éther, ester, hétéroside. Cependant, elles ne contiennent jamais d'atomes d'azote.

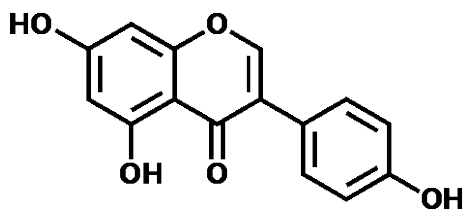
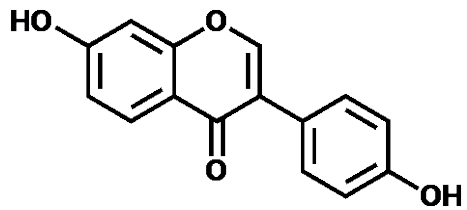
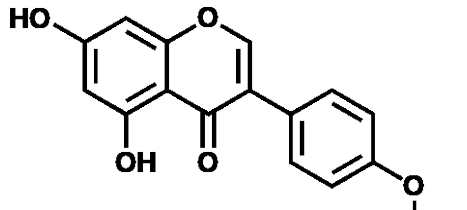
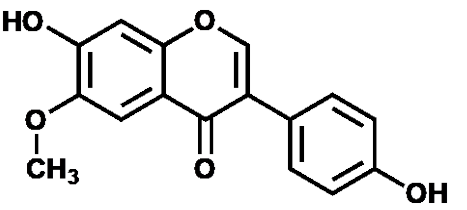
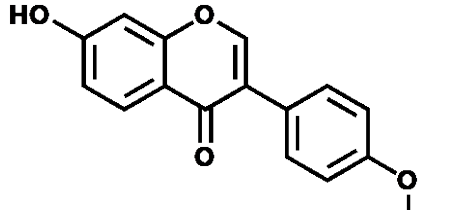
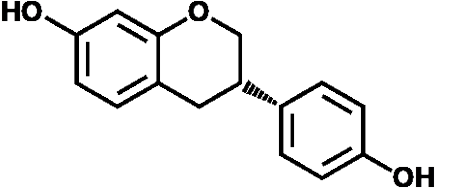
Les isoflavones peuvent exister sous forme :

- libres (i.e. les aglycones), à l'origine des effets biologiques : l'activité biologique dépend du nombre d'OH et de la nature de leurs substituants,
- liées (i.e. les formes conjuguées glycosidées), dépourvues d'activité biologique, ainsi que leurs dérivés acétylés (acétyl génistine, acétyl daïdzine, etc.) ou malonylés (malonyl génistine, malonyl daïdzine, etc.). C'est sous ces formes liées qu'elles sont présentes dans les plantes, et donc consommées *via* l'alimentation.

Parmi les isoflavones, la génistéine et la daïdzéine sont les aglycones les plus étudiées (Tableau 1). Elles ont pour précurseurs des formes méthoxylées, dont la biochanine A pour la génistéine, et la glycitéine ou la formononétine pour la daïdzéine ; cette dernière peut être bioactivée en équol, un métabolite obtenu par digestion microbienne au niveau intestinal.

Ainsi, seuls la génistéine et la daïdzéine sont traités dans cette expertise.

Tableau 1 : Principales isoflavones

	N°CAS	Formule chimique	Formule développée
Génistéine	446-72-0	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	
Daïdzéine	486-66-8	C ₁₅ H ₁₀ O ₄	
Biochanine A	491-80-5	C ₁₆ H ₁₂ O ₅	
Glycitéine	40957-83-3	C ₁₆ H ₁₂ O ₅	
Formononétine	485-72-3	C ₁₆ H ₁₂ O ₄	
(S)-Equol	531-95-3	C ₁₅ H ₁₄ O ₃	

Les données issues de la littérature rapportent le plus souvent des doses administrées, chez l'Homme ou l'animal, exprimées en « isoflavones totales ». Il est à noter que ce vocable exprime selon les études, soit une dose en isoflavones (sans que l'on sache précisément de quelles isoflavones, il s'agit), soit en génistéine. Cette définition variant selon les études, elle sera précisée pour chaque étude décrite.

2.2 Propriétés physico-chimiques

Le Tableau 2 détaille les principales propriétés physico-chimiques de la génistéine et de la daïdzéine, ainsi que de leurs congénères.

Tableau 2 : Propriétés physico-chimiques des principales isoflavones (SCCS, 2002 ; Pubchem)

	Génistéine	Daïdzéine	Glycitéine	Biochanine A	Formononétine
N°CAS	446-72-0	486-66-8	40957-83-3	491-80-5	485-72-3
Forme physique	Solide	Solide	Solide	Solide	Solide
Poids moléculaire (g.mol ⁻¹)	270,24	254,24	284,27	284,27	268,27
Solubilité dans l'eau à 32°C (mg.mL ⁻¹)	0,015 ± 0,005	0,013 ± 0,01	0,54	0,071	0,15
Log Kow	2,84	2,55	2,57	3,34	2,96

2.3 Classification

Au titre du règlement (CE) n°1272/2008 (CLP), la génistéine, la daïdzéine, la glycitéine, la biochanine A et la formononétine ne possèdent pas de classification harmonisée.

La génistéine et la daïdzéine ont été dans le cadre du règlement cosmétique, notamment du fait de préoccupations sur leurs propriétés de perturbation endocrinienne (SCCS, 2022). Ces préoccupations demeurent à l'issue de cette évaluation.

Tableau 3 : Catégorisations d'isoflavones en tant que PE potentiels

	Génistéine	Daïdzéine	Glycitéine	Biochanine A	Formononétine
ED List	-*	-*	-	-	-
SVHC	-	-	-	-	-
DHI (2007)	-	-	-	-	-
Sin list	-	-	-	-	-
TEDX	oui	oui	oui	oui	/

-* La génistéine et la daïdzéine ne sont plus sur l'ED list II.

ED List: endocrine disrupter List, SVHC: Substance of very high concern, Deduct: Database of Endocrine Disrupting Chemicals and their Toxicity profiles, DHI: DHI List - Study on enhancing the Endocrine Disrupter priority list, SIN List: Substitute it now, TDEX: The endocrine disruption exchange.

2.4 Sources

Les isoflavones sont naturellement présentes dans les denrées alimentaires issues des légumineuses. La génistéine, la daïdzéine et la glycitéine sont très présentes dans les graines de soja et en moindre proportion, dans d'autres légumineuses et certains légumes (Tableau 4).

Tableau 4 : Teneurs en isoflavones aglycones (µg/100 g d'aliment) d'après les études de l'alimentation totale françaises EAT2 (Anses, 2011) et EAT infantile (Anses, 2016)

Groupe d'aliments	Aliment	Biochanine A	Daidzéine	Formononétine	Génistéine	Glycitéine	Isoflavones	Source
Produits laitiers	beurre	NA	ND	NA	ND	ND	ND	EATi
	fromage fondu	ND	ND	ND	ND	ND	ND	EATi
	lait demi-écrémé	ND	0,112	0,201	0,068	0,729	1,11	EAT2
	lait demi-écrémé	ND	ND	ND	ND	ND	ND	EATi
	lait écrémé	ND	0,108	0,182	0,021	0,964	1,28	EAT2
	lait écrémé	ND	ND	ND	ND	ND	ND	EATi
	lait entier	0,058	0,062	0,358	0,043	0,718	1,24	EAT2
	lait entier	ND	1,56	ND	ND	ND	1,56	EATi
	yaourt aromatisé	ND	0,34	ND	0,37	ND	0,71	EATi
	yaourt aux fruits	ND	ND	ND	1,05	ND	1,05	EATi
yaourt nature	ND	ND	ND	ND	ND	ND	EATi	
Œufs et dérivés	œuf brouillé, omelette	ND	7,30	ND	2,89	0,899	11,1	EAT2
	œuf dur	ND	7,36	ND	2,56	1,01	10,9	EAT2
	œuf dur	NA	5,74	NA	4,06	0,84	10,6	EATi
Huile	huile de soja	ND	153	ND	546	52,3	751	EAT2
Légumes (hors pomme de terre) et légumineuses	artichaut	ND	ND	ND	ND	ND	ND	EAT2
	carotte	ND	ND	ND	ND	ND	ND	EAT2
	céleri	ND	0,070	ND	ND	ND	0,07	EAT2
	céleri rave	ND	0,180	ND	ND	ND	0,18	EAT2
	chou-fleur	ND	ND	ND	ND	ND	ND	EAT2
	concombre	ND	0,041	ND	ND	ND	0,041	EAT2
	courgette	ND	ND	ND	ND	ND	ND	EAT2
	endive	ND	ND	ND	ND	ND	ND	EAT2
	épinard	ND	0,031	ND	ND	ND	0,031	EAT2
	germe de soja	ND	150	ND	137	ND	286	EAT2
	haricot	ND	34,0	ND	34,1	2,83	70,9	EAT2
	haricot	NA	7,27	NA	20,0	ND	27,3	EATi
	lentille	ND	ND	ND	ND	ND	ND	EAT2
	maïs	ND	ND	ND	ND	ND	ND	EAT2
	navet	ND	ND	ND	ND	ND	ND	EAT2
	oignon	ND	ND	ND	ND	ND	ND	EAT2
	petit pois	ND	0,316	ND	0,016	1,027	1,36	EAT2
poireau	ND	ND	ND	ND	ND	ND	EAT2	
poivron	ND	ND	ND	ND	ND	ND	EAT2	
radis	ND	ND	ND	ND	ND	ND	EAT2	
salade	ND	ND	ND	ND	ND	ND	EAT2	
tomate	ND	ND	ND	0,154	ND	0,154	EAT2	
Pommes de terre	purée de pommes de terre	NA	ND	NA	ND	ND	ND	EATi
Produits carnés et plats composés	cassoulet	NA	0,75	NA	1,06	ND	1,81	EATi
	chipolata	NA	ND	NA	ND	ND	ND	EATi
	cordon bleu de volaille	NA	4,67	NA	4,49	0,58	9,74	EATi
	nugget de volaille	NA	8,99	NA	7,64	0,98	17,6	EATi
	poisson pané	NA	ND	NA	ND	ND	ND	EATi
	ravioli	NA	ND	NA	ND	ND	ND	EATi
	saucisse de Strasbourg ou knack	NA	15,1	NA	19,3	1,84	36,2	EATi
Desserts frais	compote de pommes	NA	ND	NA	ND	ND	ND	EATi
	crème dessert (classique)	ND	ND	ND	ND	ND	ND	EATi
	mousse au chocolat	ND	0,50	ND	0,93	0,10	1,53	EATi
Condiments et sauces	ketchup	ND	ND	ND	ND	ND	ND	EAT2
	mayonnaise	ND	1,76	ND	ND	0,25	2,01	EAT2
	sauce de soja	ND	629	ND	177	141	947	EAT2
	sauce tomate sans viande	ND	ND	ND	ND	ND	ND	EAT2
Analogues de produits animaux	boisson au soja ou tonyu	5	5610	30,2	7909	1397	14951	EAT2
	boisson au soja ou tonyu	1,37	3782	3,62	6999	241	11027	EATi
	dessert au soja aromatisé (chocolat/café/vanille)	1,41	1337	1,61	3098	17,2	4455	EATi

Groupe d'aliments	Aliment	Biochanine A	Daidzéine	Formononétine	Génistéine	Glycitéine	Isoflavones	Source
	dessert au soja aromatisé au chocolat	ND	2490	17,2	3296	122	5924	EAT2
	dessert au soja aux fruits	23	2843	57,3	3695	149	6767	EAT2
	dessert au soja nature	ND	1920	4,34	2559	70	4553	EAT2
	escalopes végétales à base de soja	ND	5650	23,4	6348	791	12811	EAT2
	tofu	100	21295	76,8	28229	3615	53316	EAT2

ND = non détecté ; NA = non analysé

Dans les produits à base de soja, la proportion des formes présentes, aglycones ou conjugués (glucosides et dérivés), varie selon le procédé de fabrication. Ainsi dans les produits non fermentés, par exemple boissons au soja, tofu et protéines de soja, ce sont principalement les formes glycosylées et leurs dérivés malonylés qui sont prépondérants, alors que les aglycones sont majoritaires dans les produits fermentés type miso et tempeh (Bustamante *et al.*, 2018).

Pour un même type d'aliment, la teneur en isoflavones peut varier d'un facteur 2 à 3 selon les variétés, les pratiques culturelles, le terroir, le degré de maturité, les conditions climatiques, etc. (Kuhnle *et al.*, 2009 ; Szymczak *et al.*, 2017).

3 Synthèse des données toxicologiques

Les données décrites dans ce chapitre sont issues de rapport de synthèse identifiés dans les littératures (Afssa 2005, Efsa, 2015, Anses 2016, VKM, 2017, NCM, 2020, SCCS, 2022) complétées par une recherche bibliographique réalisée sur la période 2021-2024. Les études citées et résumées dans ces synthèses sont souvent peu détaillées et issues elles-mêmes de la synthèse de l'Efsa en 2015. Ainsi, ces études ne seront détaillées que succinctement, sauf si elles sont retenues comme études clés pour élaborer une VTR. Les données récentes identifiées sur la période 2021-2024 seront détaillées dans ce chapitre.

Les données faisant références aux effets potentiellement bénéfiques des isoflavones ne font pas l'objet de la saisine et ne seront pas abordées dans ce rapport.

Seuls les résultats statistiquement significatifs sont décrits dans cette synthèse.

3.1 Toxicocinétique

3.1.1 Absorption et biodisponibilité

- **Chez l'Homme**

Chez l'Homme, l'absorption des isoflavones dépend de la capacité du microbiote intestinal à hydrolyser les composés glycosylés. L'absorption des aglycones varie considérablement selon les individus (de 30 à 96 %) (Efsa, 2015). De ce fait, la dose externe d'isoflavones est donc un indicateur peu fiable de l'exposition interne (Efsa, 2015 ; van der Velpen *et al.*, 2014). Setchell *et al.* ont montré que les glycosides daïdzine et génistine ne sont pas retrouvés dans le sang périphérique d'adultes et que l'hydrolyse par les β -glucosidases des bactéries intestinales est nécessaire pour leur absorption (Setchell *et al.*, 2002 cité dans Efsa, 2015). De même, selon le VKM (VKM, 2017), les données disponibles montrent que la biodisponibilité des isoflavones est plus élevée chez les enfants que chez les adultes. Les isoflavones semblent avoir une meilleure biodisponibilité chez les jeunes enfants, en particulier, les jeunes enfants nourris au lait de soja (6-9 mg.kg⁻¹.j⁻¹ d'isoflavones) ont des concentrations plasmatiques moyenne d'isoflavones totales bien plus élevées avec 3,7 μ M comparé aux adultes consommant régulièrement des produits du soja (0,1-1,2 μ M) (Setchell *et al.*, 1997 ; Adlercreutz *et al.*, 1994 cités par Efsa, 2015).

Citant l'étude de Setchell *et al.* de 2003, l'Efsa souligne que chez la femme adulte, lors d'une ingestion unique de 10, 20 ou 40 g de graines de soja, la daïdzéine et la génistéine sont absorbées relativement rapidement, les concentrations sériques maximales étant atteintes en 4 et 8 h après l'ingestion, avec des temps de demi-vie d'élimination compris entre 8 et 10 heures pour ces composés (Setchell *et al.*, 2003 cité dans Efsa, 2015).

- **Chez l'animal**

Plusieurs études chez le rat et la souris ont été décrites dans le rapport de synthèse de l'Efsa de 2015, lui-même repris dans des rapports de synthèse ultérieurs (NCM, 2020 ; SCCS, 2022). L'Efsa note que ces études sont le plus souvent réalisées soit avec des extraits de soja, de trèfle rouge ou de racines de kudzu (« vigne japonaise »), soit avec des isoflavones isolées ou

en mélanges. L'Efsa note que l'absorption des isoflavones est relativement moins élevée chez l'animal que chez l'Homme et avec une biodisponibilité plus faible chez les animaux mâles que chez les animaux femelles. La biodisponibilité varie de 9 à 14 % pour la génistéine et de 29 à 34 % pour la daïdzéine chez le rat. Chez la souris, la biodisponibilité est de 7 % chez les mâles et de 15 % chez les femelles (Codham et al., 2002 cité dans Efsa, 2015).

3.1.2 Distribution

- **Chez l'Homme**

Pour la génistéine et la daïdzéine, les informations disponibles sont assez limitées.

Dans son rapport de 2015, l'Efsa notait que la génistéine et la daïdzéine administrées chez des patients admis en chirurgie pour une réduction mammaire ou une résection prostatique, sous forme de lait de soja ou de complément alimentaire à base de soja, ont été retrouvées dans les tissus des seins et de la prostate (Efsa, 2015).

- **Chez l'animal**

Dans son rapport de 2015, l'Efsa identifie uniquement trois études qui étudient la distribution de la génistéine chez le rat. Coldham et Sauer ont étudié la pharmacocinétique de la génistéine chez des rats mâles et femelles (n = 5) après administration orale de [¹⁴C]génistéine (1,83 MBq, 4 mg.kg⁻¹) (Coldham et Sauer, 2000). L'Efsa note qu'aux temps de prélèvement de 2 et 7 heures après administration, les niveaux de radioactivité les plus élevés (> 1 000 ng d'équivalent génistéine/g de tissu) se trouvaient dans le tractus gastro-intestinal et dans les organes excréteurs, tels que le foie et les reins. Des concentrations intermédiaires (<1 000 à 250 ng d'équivalent génistéine/g de tissu) ont également été mesurées dans les organes reproducteurs (testicules, ovaires), l'utérus, la prostate et le vagin et des concentrations plus faibles de radioactivité (<100 ng d'équivalent génistéine/g de tissu) dans le cerveau, les tissus graisseux, le thymus, la rate, les muscles squelettiques et l'os.

L'Efsa mentionne également l'étude de Chang *et al.* de 2000 qui montre la présence de génistéine à des taux allant jusqu'à 90 % dans plusieurs tissus (foie, cerveau, ovaires, utérus, glandes mammaires, thyroïde, testicules et prostate) après administration orale chez le rat d'un régime supplémenté en génistéine à 5, 100 ou 500 µg.g⁻¹ d'aliment pendant la période *in utero*, *via* la lactation et jusqu'au jour post-natal 140 (PND140) (Chang *et al.*, 2000 cité dans Efsa, 2015). L'Efsa souligne que ceci est également confirmé par l'étude de Zhou *et al.* de 2008 qui ont observé des concentrations de génistéine les plus élevées dans le tractus gastro-intestinal, et dans les organes excréteurs, le foie et les reins. Les concentrations dans les organes reproducteurs étaient du même niveau que les concentrations dans les muscles squelettiques et dans la graisse (ovaires : 0,099 ± 0,056 µg.g⁻¹ de tissus ; testicules : 0,124 ± 0,043 µg.g⁻¹ de tissus ; muscles : 0,068 ± 0,027 µg.g⁻¹ de tissus ; graisses : 0,217 ± 0,040 µg.g⁻¹ de tissus) (Zhou *et al.*, 2008 cité dans Efsa, 2015).

3.1.3 Métabolisme

- **Chez l'Homme**

Le métabolisme des isoflavones aglycones issues du soja (daïdzéine, génistéine et glycitéine) et isoflavones de trèfle (biochanine A, formononétine) est résumé dans plusieurs rapports de synthèse.

Dans son rapport de 2015, l'Efsa note que les isoflavones sont métabolisées par la flore bactérienne intestinale et par le foie après absorption. Les réactions de conjugaison (glucuronidation et sulfatation) sont les voies d'élimination majeures. Les métabolites mineurs sont des dérivés hydroxylés formés par l'action des mono-oxygénases à cytochromes P450. Après son absorption au niveau du tractus intestinal, la génistéine est métabolisée par les enzymes hépatiques de phase I en dihydrogénistéine, puis en 6'-hydroxy-O-déméthylangolensine, pour donner le *p*-éthylphénol et le trihydroxy-benzène (Anses, 2016). Chez l'Homme, la biochanine A est principalement déméthylée en génistéine et la formononétine est déméthylée en daïdzéine par les enzymes hépatiques de phase I (Setchell *et al.*, 2001 ; Howes *et al.*, 2002 cités dans Efsa, 2015).

Dans le tractus gastro-intestinal, la daïdzéine peut également subir une métabolisation en dihydrodaïdzéine puis en équol, métabolite hautement œstrogénique, par le microbiote intestinal dont la spécificité est très variable d'un individu à l'autre. La prévalence des producteurs d'équol varie de 20 à 30 % dans la population des pays occidentaux à 50 à 60 % dans les populations asiatiques consommant des régimes contenant du soja. L'O-desméthylangolensine (ODMA) est un autre métabolite intestinal de la daïdzéine produit par le microbiote intestinal (Anses, 2016). Le métabolisme microbien de la daïdzéine chez l'Homme est caractérisé par une grande variabilité interindividuelle et seule une partie de la population est capable de produire du S-équol. En raison de cette hétérogénéité, des métabolites microbiens autres que l'équol, par exemple la dihydrodaïdzéine ou l'O-déméthylangolensine, peuvent être présents dans le plasma humain à des concentrations plus élevées que le S-équol (SCCS, 2022).

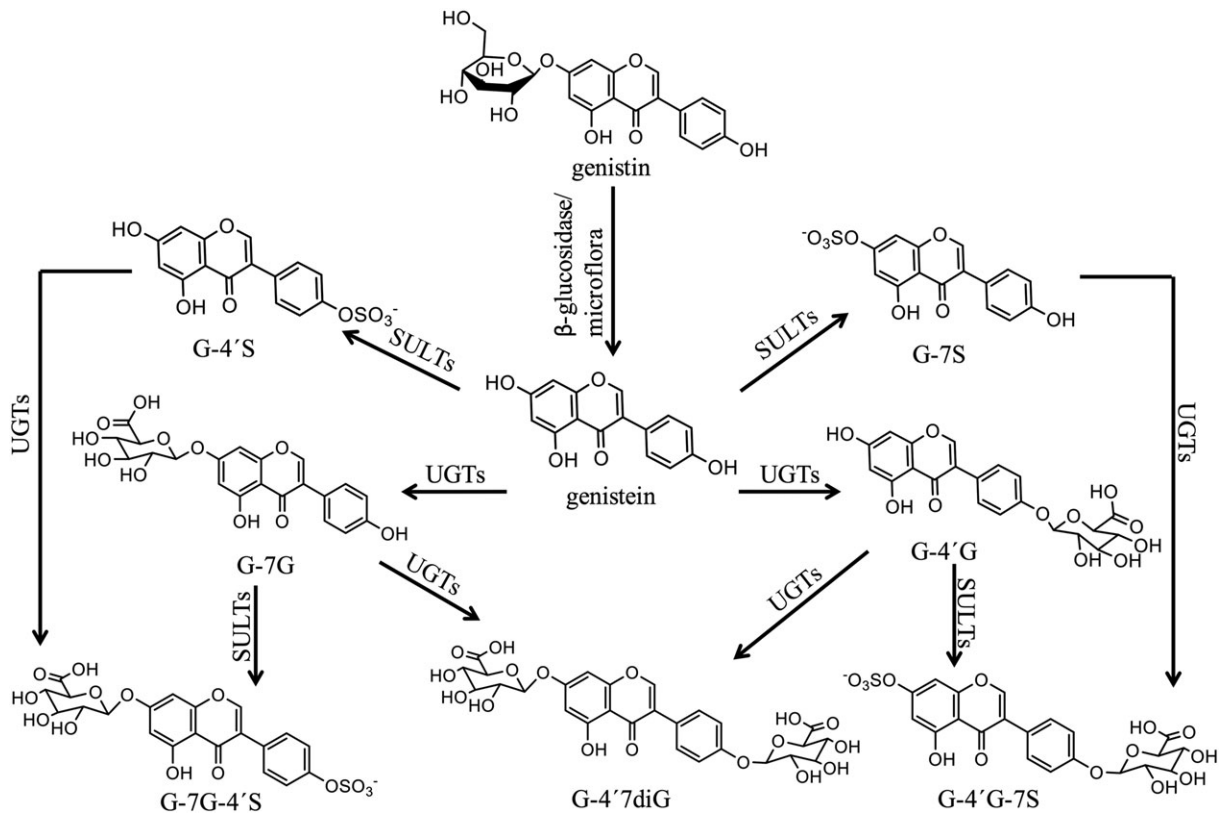
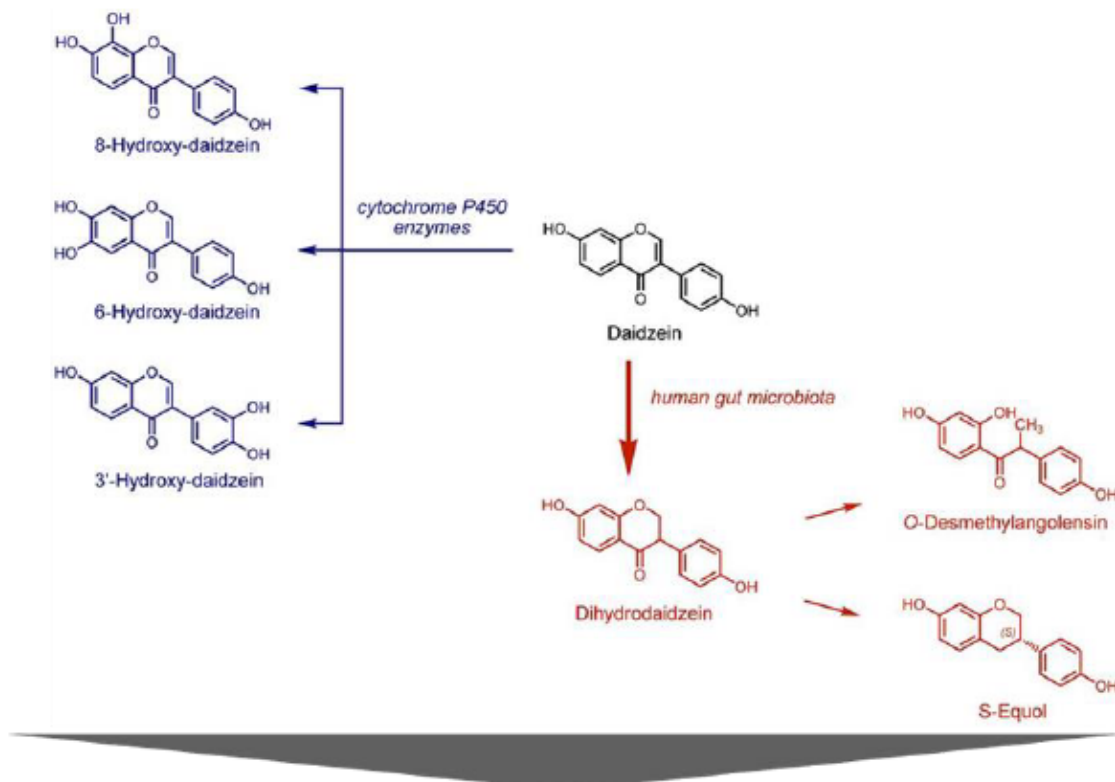


Figure 4 : Métabolisme de la génistéine (Boonpawa et al., 2017)



Conjugation to phase-II-metabolites
(glucuronides, sulfoglucuronides, sulfates)

Figure 5 : Métabolisme de la daïdzéine (Efsa, 2015)

- **Chez l'animal**

Dans son rapport de 2022, le SCCS souligne que contrairement à l'Homme, les animaux étudiés (singes, rats, souris) sont décrits comme des producteurs d'équol à 100 %, ce qui signifie que les microbiotes de ces animaux transforment la daïdzéine exclusivement en S-équol (Gu *et al.*, 2006 cité dans SCCS, 2022).

3.1.4 Elimination

- **Chez l'Homme**

Dans son rapport de 2015, l'Efsa rapportait que chez 11 femmes ménopausées ayant ingéré un bolus d'un extrait de soja commercial, les sulfoglucuronides dans le plasma et les 7-O-glucuronides dans l'urine étaient les métabolites prédominants de la daïdzéine et de la génistéine (Soukup *et al.*, 2014 cité dans Efsa, 2015).

La majeure partie de la génistéine et de la daïdzéine ingérées est excrétée dans les urines sous forme de conjugués de phase II issu du métabolisme hépatique et de conjugués de phase II de métabolites produits par le microbiote intestinal. L'élimination fécale s'est avérée être une voie minoritaire.

Dans son rapport de 2015, l'Efsa rapportait que les demi-vies ($t_{1/2}$) d'élimination pour la génistéine totale étaient comprises entre 5,7 et 10,8 heures et ont été déterminées dans des études d'intervention utilisant différents aliments à base de soja (farine de soja, boisson de soja, noix de soja, poudre de soja) comme analogue d'isoflavones.

- **Chez l'animal**

Dans son rapport de 2015, l'Efsa décrit l'étude de King *et al.* qui compare la biodisponibilité de la génistéine et de la daïdzéine, chez des rats ayant reçu une dose orale unique d'un extrait de soja fournissant $74 \mu\text{mol.kg pc}^{-1}$ de génistéine et $77 \mu\text{mol.kg pc}^{-1}$ de daïdzéine (King *et al.*, 1998 cité dans Efsa, 2015). Selon l'Efsa, l'excrétion urinaire de la daïdzéine était de 17 % de la dose ingérée et de 11,9 % dans le cas de la génistéine sur une période de 48 heures après l'administration. L'excrétion urinaire de S-équol représentait 5 % de la dose de daïdzéine ; 41,9 % de la dose de génistéine étaient excrétés dans l'urine sous forme de 4-éthylphénol. La daïdzéine fécale représentait $2,3 \pm 0,5$ % et la génistéine fécale, $3,4 \pm 0,4$ % des doses administrées.

3.1.5 Modèle PBPK

Pour la génistéine, trois études décrivent des modèles pharmacocinétiques chez le rat pour la génistéine (Hakami *et al.*, 2021 ; Zager *et al.*, 2007 ; Schlosser *et al.*, 2006), mais aucun n'a été identifié chez l'Homme dans la littérature. Pour la daïdzéine, seule un modèle pharmacocinétique à base physiologique humain a été identifié (Wang *et al.*, 2022), dont l'intérêt de ce modèle réside dans la possibilité d'estimer le taux de conversion de la daïdzéine en équol par le microbiote intestinal.

3.2 Toxicité aiguë

3.2.1 Données chez l'Homme

Aucune donnée de toxicité aiguë chez l'Homme n'a été retrouvée dans la littérature.

3.2.2 Données chez l'animal

- **Génistéine**

Dans son rapport de 2015, l'Efsa cite deux études de toxicité aiguë menée respectivement sur deux souches de rats Wistar (Mc Clain *et al.*, 2006b cité dans Efsa, 2015) et sur des chiens de race beagle (Mc Clain *et al.*, 2005 cité dans Efsa, 2015). Ces études sont brièvement décrites ci-dessous.

Dans la première expérience, des rats Wistar Hanlbm mâles et des femelles ont été nourris avec un régime sans génistéine. Dans une seconde expérience, des rats Wistar Crl : (WI)BR mâles et femelles ont été nourris avec un régime animal standard (Mc Clain *et al.*, 2006b cité dans Efsa, 2015). Les animaux ont été exposés à de la génistéine (pureté de 99,5 %) en une seule dose de 2000 mg.kg pc⁻¹ par gavage et ont été observés pendant 2 semaines (mortalité et signes cliniques). Les rats ont ensuite été euthanasiés et autopsiés.

Tous les rats de la première expérience ont survécu au traitement. Après euthanasie, la nécropsie n'a révélé aucun effet, ni aucune modification du poids corporel ou de celui des organes dont le poids a été mesuré (foie et reins). A noter qu'aucune étude histopathologique n'a été menée.

Dans la seconde expérience, l'ensemble des chiens ont survécu (Mc Clain *et al.*, 2005 cité dans Efsa, 2015). Une léthargie a été observée chez tous les mâles et chez une femelle, un jour après l'exposition. Une alopecie, 14 et 15 jours après l'exposition est rapportée à la dose de 2000 mg.kg pc⁻¹ chez les femelles. Les auteurs de l'étude ont conclu que la génistéine présente une faible toxicité aiguë avec une DL₅₀ supérieure à 2000 mg.kg pc⁻¹ (McClain *et al.*, 2006b cité dans Efsa, 2015).

Dans la seconde étude, les chiens beagle ont été exposés par voie orale à de la génistéine pendant 4 semaines à des doses de 0, 50, 150 et 500 mg.kg pc⁻¹.j⁻¹ (Mc Clain *et al.*, 2005 cité dans Efsa, 2015). Le poids des organes, les paramètres hématologiques⁴ et biochimiques⁵ ont été mesurés. Tous les organes ont été prélevés pour une analyse histopathologique. L'administration de génistéine à des chiens pendant une période de 4 semaines n'a pas entraîné d'effet néfaste. Les auteurs concluent que la dose sans effet néfaste observé (NOAEL) pour la génistéine est supérieure à 500 mg.kg pc⁻¹.j⁻¹.

⁴ Numération érythrocytaire, hémoglobine, hématocrite, volume corpusculaire moyen, concentration corpusculaire moyenne en hémoglobine, numération plaquettaire, nombre total de leucocytes, nombre de réticulocytes, rapports de fluorescence des réticulocytes, érythrocytes nucléés, numération différentielle des leucocytes, et la morphologie des globules rouges, temps de thromboplastine, temps de thromboplastine partiel activé, et le fibrinogène.

⁵ dans le sang : glucose, urée, créatinine, bilirubine totale, lipides totaux, cholestérol total, triglycérides, phospholipides, aspartate amino-transférase, alanine amino-transférase, lactate déshydrogénase, glutamate déshydrogénase, créatine kinase, phosphatase alcaline, gamma-glutamyl transférase, fer, calcium, phosphore, magnésium, sodium, potassium, protéines totales et électrophorèse des protéines ; dans l'urine : la densité spécifique, osmolalité, couleur, aspect, pH, protéines, glucose, cétone, bilirubine, sang, nitrite et urobilinogène.

- **Daïdzéine**

Dans une étude de toxicité aiguë par voie orale (version modifiée de la ligne directrice TG 423 de l'OCDE), des rats SD (n = 3/groupe) ont reçu de la daïdzéine par gavage à 0, 300, 2000 et 5000 mg.kg pc⁻¹, respectivement. Les animaux du groupe témoin ont reçu 0,5 % de carboxyméthylcellulose (CMC : véhicule de la daïdzéine dans les autres groupes). Les animaux ont été observés après l'administration pour détecter tout signe de changement de comportement (hypersalivation, diarrhée, tremblements, convulsions, léthargie, coma) et clinique (poids corporel, consommation de nourritures, paramètres hématologiques et biochimiques, fonction rénale) pendant les 30 premières minutes, puis périodiquement pendant les 24 premières heures, avec une attention particulière pendant les 4 premières heures. Des analyses histopathologiques ont également été menées. Les animaux ont toléré la dose la plus élevée sans changement significatif sur le plan toxicologique. Sur la base de cette étude et des observations, les auteurs ont estimé que la dose maximale tolérée était supérieure à 5000 mg.kg pc⁻¹ et que la daïdzéine avait une toxicité aiguë faible chez le rat (Laddha *et al.*, 2020).

3.3 Toxicité répétée et chronique

3.3.1 Données chez l'Homme

Plusieurs rapports de synthèse ont décrit les données épidémiologiques étudiant l'association entre une exposition aux isoflavones administrées sous différentes formes (extraits de soja, protéines de soja, mélange d'isoflavones, génistéine, daïdzéine, extrait de trèfle rouge) et les effets néfastes éventuellement observés chez les hommes adultes, les femmes péri- et post-ménopausées, les femmes pré-ménopausées, les enfants et les adolescents (Efsa, 2015 ; VKM, 2017 ; NCM, 2020). Seules les conclusions de ces rapports de synthèse seront rapportées dans le présent rapport.

Dans son rapport de 2015, l'Efsa a réalisé une évaluation des risques ciblée sur la population des femmes péri- et post-ménopausées en considérant les organes cibles d'intérêt suivants : seins, utérus et thyroïde. L'Efsa a conclu qu'il n'était pas possible de proposer une valeur de référence unique ou un niveau d'apport sans effet néfaste pour les suppléments alimentaires contenant des isoflavones.

Dans son rapport de 2017, le VKM concluait qu'une supplémentation en isoflavones de 40 ou 80 mg.j⁻¹ pris sur un ou 3 mois, ne représentait pas un risque d'effet néfaste sur les concentrations hormonales chez les femmes pré-ménopausées, les hommes, les adolescents de sexe masculins et féminin, et sur le cycle menstruel chez les adolescentes. Le VKM souligne que les données sont insuffisantes pour conclure sur un potentiel effet néfaste chez les enfants âgés de 10 à 14 ans.

Dans son rapport de 2020, le NCM concluait qu'il n'y avait pas de risque identifié pour les femmes enceintes (enfants à naître) sur la base de la VTR établie à partir d'expérimentations animales. Pour les filles et les garçons (âgés de 4 à 10 ans), en revanche, les résultats indiquaient un risque potentiel pour les enfants sur la base de la VTR établie à partir d'expérimentations animales.

Il n'a pas été identifié de données récentes permettant de retenir une ou plusieurs études basées sur des données humaines présentant une relation dose-réponse pour construire de VTR.

3.3.2 Données chez l'animal

Dans une étude de toxicité répétée (OCDE 407), des rats Sprague-Dawley (SD) ($n = 10/\text{dose}$) ont reçu par voie orale de la daïdzéine à 0, 25, 50 et 100 mg.kg pc⁻¹.j⁻¹ pendant 28 jours (Laddah *et al.*, 2020). Les rats ont été observés régulièrement pour détecter les signes de toxicité et de mortalité. Le poids corporel, la consommation de nourriture et d'eau de tous les animaux ont été enregistrés chaque semaine. A 28 jours, des prélèvements d'urine ont été réalisés à l'aide de cages métaboliques. Le sang a été prélevé au niveau du plexus rétro-orbitaire. Tous les animaux ont été sacrifiés après 28 jours de traitement et ont fait l'objet d'une nécropsie comprenant un examen détaillé de la surface extérieure du corps, de tous les orifices, des cavités thoracique et abdominale et de leur contenu. Le cerveau, le cœur, les poumons, le foie, la rate, les reins, les glandes surrénales, l'estomac, les testicules et les ovaires ont été prélevés et pesés immédiatement. Le poids des organes et leur poids relatif ont été rapportés. Le poids corporel, la consommation de nourriture et d'eau des animaux traités à la daïdzéine n'étaient pas différents de ceux du témoin. Aucune différence statistiquement significative n'a été observée dans les paramètres hématologiques⁶ et biochimiques⁷ des animaux traités à la daïdzéine par rapport aux animaux témoins. Les électrolytes (sodium, potassium, phosphates) se sont également révélés être du même niveau dans les groupes traités à la daïdzéine et les témoins. Aucune altération significative du volume d'urine sur 24h n'a été observée chez les rats traités à la daïdzéine par rapport aux témoins. La fonction rénale n'était pas non plus été altérée. Aucune différence significative n'a été observée dans les poids absolus et relatifs des organes dont l'examen histologique était normal après le traitement à la daïdzéine. Selon les auteurs, la dose la plus élevée de 100 mg.kg pc⁻¹.j⁻¹ peut être considérée comme un NOAEL.

Culçu *et al.* ont exposé par voie orale, pendant 90 jours, 28 rats femelles Sprague-Dawley (âgées d'un mois, poids moyen : 55 g) réparties en quatre groupes ($n = 7$ rats/groupe) : le groupe 1 a été nourri avec des aliments standards pour rats (8 g.j⁻¹) ; le groupe 2 avec une préparation pour nourrissons sans soja (8 g.j⁻¹) ; le groupe 3 avec une formule à base de soja à 1,12 g/100 mL (8 g.j⁻¹ ; Similac®) et le groupe 4 avec une formule contenant du soja à 2,64 g/100 mL (8 g.j⁻¹ ; Modilac®). Des échantillons de sang ont été prélevés aux jours 0, 30, 60 et 90, pour évaluer la fonction thyroïdienne. Tous les animaux ont été sacrifiés au jour 90. Les glandes thyroïdes ont été excisées et examinées histologiquement. Les concentrations sériques de T3 libre, de T4 libre, de TSH, d'anti-TPO et d'anti-TG étaient significativement plus élevées dans le groupe 4 par rapport aux autres groupes. Aucune différence n'a été trouvée dans les analyses histopathologiques. Les auteurs concluent que les préparations infantiles à forte teneur en soja induisaient une hyperthyroïdie avec des concentrations sériques de T3, T4 et TSH élevées (Culçu *et al.*, 2022).

⁶ Comptage des hématies, lymphocytes, hémoglobine, hématocrite, moyenne du volume corpusculaire, moyenne en hémoglobine corpusculaire, concentration moyenne en hémoglobine corpusculaire, largeur de distribution des hématies, plaquettes, procalcitonine, volume moyen plaquettaire, distribution plaquettaire.

⁷ Glucose, protéine totale, albumine, créatinine, urée, triglycérides, cholestérol total, cholestérol HDL, cholestérol LDL, bilirubine, acide urique, alanine aminotransférase, aspartate aminotransférase, phosphatase alcaline.

3.4 Effets sur la reproduction et le développement

3.4.1 Données sur la reproduction et le développement chez l'Homme

Plusieurs rapports de synthèse et revues, dont certains déjà anciens, rapportent un impact négatif des isoflavones sur la fertilité masculine, mais aussi des effets sur l'appareil reproducteur féminin (ménopause) (Afssa, 2005 ; VKM, 2017 ; Messina *et al.*, 2022).

Les données issues de ces rapports de synthèse et revues ne seront pas détaillées. Seules les études d'intérêt identifiées dans ces rapports/revues ou les données les plus récentes, seront décrites.

La plupart des études s'accordent pour conclure qu'une consommation régulière de produits dérivés de soja a peu ou pas d'effets néfastes sur la fertilité masculine. Toutefois, ces études s'intéressaient pour la plupart à la consommation de soja seulement à l'âge adulte (40-70 mg.j⁻¹). La revue de Messina *et al.* souligne que la consommation dans les pays asiatiques est estimée à 30-50 mg.j⁻¹d'isoflavones tandis que celle des pays occidentaux (USA - Europe) serait inférieure à 3 mg.j⁻¹ (Messina *et al.*, 2022).

Dans une étude transversale (Yang *et al.*, 2022) réalisée en Chine chez 161 hommes adultes âgés de 19 à 51 ans, sans antécédents médicaux, aucune association n'a été observée entre les concentrations urinaires d'isoflavones et les paramètres du sperme évalués (nombre, concentration et mobilité des spermatozoïdes). Par contre, l'élévation des concentrations urinaires de génistéine, glycitéine et dihydrodaïdzéine était associée à de plus faibles concentrations plasmatiques de testostérone.

Dans une étude américaine récente (Mitsumani *et al.*, 2023), la consommation en isoflavones de 660 femmes consultant un centre d'infertilité a été estimée par questionnaire alimentaire portant sur les 3 derniers mois (consommation journalière médiane estimée à 1,78 mg.j⁻¹). Aucune association n'a été observée entre la consommation d'isoflavones et la réserve ovarienne ou à la concentration plasmatique en hormone antimüllérienne (AMH).

Une étude prospective de cohorte mères-enfants ont étudié chez les nourrissons mâles l'association entre la pratique d'alimentation (lait à base de soja, lait de vache ou lait maternel) et les hormones de la reproduction mesurées longitudinalement, ainsi que le développement des tissus hormono-sensibles mesurés par sonographie et examen clinique (Chin *et al.*, 2021). Les auteurs n'ont pas observé d'impact sur l'anatomie des nourrissons mâles, mais ont noté un développement du pénis plus rapide chez les enfants nourris au lait de soja que chez les enfants nourris au lait maternel (observations jusqu'à la 28^{ème} semaine de vie).

Une étude britannique sur 367 femmes enceintes n'a pas mis en évidence d'effet de la consommation d'isoflavones sur l'âge de la ménarche chez leurs filles (Marks *et al.*, 2017 cité dans NCM, 2020). Une étude japonaise sur plus de 40 000 femmes enceintes a évalué l'incidence d'hypospadias chez les fils, l'hypothèse étant que cette malformation serait favorisée par la consommation d'isoflavones au cours de la grossesse. Il en ressort que chez les femmes ayant la plus forte consommation d'isoflavones durant leur grossesse, l'incidence d'hypospadias était la plus faible (Michikawa *et al.*, 2019). Une méta-analyse réalisée en 2010, puis actualisée en 2021, évaluant l'exposition aux isoflavones pendant la grossesse et le profil d'hormones de la reproduction chez les hommes (18-81 ans), n'a pas mis en évidence de différences significatives sur les concentrations de testostérone (libre ou totale), sex hormone binding globuline (SHBG), œstrone et œstradiol (Reed *et al.*, 2021).

Dans les travaux de Upson *et al.* sur une cohorte de 1696 femmes afro-américaines, des associations négatives ont été identifiées entre une consommation élevée en soja et produits dérivés dès la petite enfance et une plus forte incidence de fibromes utérins lorsque les femmes entrent en pré-ménopause (Upson *et al.*, 2015 cité dans VKM, 2017), des fibromes utérins plus volumineux (Upson *et al.*, 2016a ; Quin *et al.*, 2019 cités dans VKM, 2017), des saignements plus abondants lors des menstruations (Upson *et al.*, 2016b cité dans VKM 2017), et la nécessité de faire appel à des contraceptifs oraux pour soulager les douleurs menstruelles (Upson *et al.*, 2019 cité dans VKM 2017). Toutefois, les estimations des apports sont semi-quantitatives. De plus, il n'est pas possible d'écartier un biais alimentaire lié à l'origine ethnique des individus (Upson *et al.*, 2016a cité dans VKM 2017).

Les conclusions relatives à un impact des phytoœstrogènes sur l'âge de la puberté chez la femme sont assez contradictoires. Plusieurs études relèvent une puberté précoce lors d'une forte consommation de produits à base de soja pendant la petite enfance, incluant les formulations infantiles (D'Aloisio *et al.*, 2013 ; Cheng *et al.*, 2010 & 2012 ; Kim *et al.*, 2010 & 2011 ; Valladares *et al.*, 2012) tandis que d'autres ne montrent pas un tel avancement d'âge à la puberté (Segovia-Siapco *et al.*, 2014 ; Oliveira *et al.*, 2021 ; Testa *et al.*, 2018).

Une étude rétrospective cas-témoin menée au Brésil sur 161 enfants (dont 84 avec un diagnostic de puberté précoce et 77 enfants témoins), a montré que les enfants qui présentaient une puberté précoce avaient pour la plupart été allaités avec des préparations à base de soja tandis que le groupe témoin comprenait majoritairement des enfants nourris uniquement au sein (Felicio *et al.*, 2021). A l'inverse, dans leur méta-analyse portant sur 6 études (3 études sur la fréquence de la puberté précoce et 3 études sur l'âge moyen à la ménarche), Oliveira *et al.* n'ont pas identifié de lien entre prise de soja pendant la petite enfance et avancement de la puberté (OR = 0,51 ; IC_{95%} = 0,09 - 2,94 ; p = 0,969) et l'âge moyen de la ménarche (OR = 0,14 ; IC_{95%} = -0,16 - 0,45 ; p = 0,186) (Oliveira *et al.*, 2021).

3.4.2 Données sur la reproduction et le développement chez l'animal

Dans l'étude Nagao *et al.*, des rats mâles et femelles Sprague-Dawley (Crj:CD, IGS) ont été exposés par gavage à des doses orales de génistéine de 12,5, 25, 50 et 100 mg.kg pc⁻¹.j⁻¹ du jour postnatal (PND) 1 à PND5 (Nagao *et al.*, 2001). Les nombres de petits à PND1 étaient 31 mâles et 29 femelles issus de sept portées dans le groupe témoin, 25 mâles et 25 femelles issus de cinq portées à la dose de 12,5 mg.kg pc⁻¹.j⁻¹, 25 mâles et 21 femelles issus de cinq portées à 25 mg.kg pc⁻¹.j⁻¹, 28 mâles et 21 femelles issus de cinq portées à 50 mg.kg pc⁻¹.j⁻¹, 23 mâles et 25 femelles issus de six portées à 100 mg.kg pc⁻¹.j⁻¹. Les examens ont été effectués périodiquement à PND1, 6, 14, 21 et à la 5^{ème}, 7^{ème} et 9^{ème} semaine. Les paramètres observés étaient la maturité sexuelle (délai de l'ouverture vaginale chez les femelles et séparation préputiale chez les mâles), les performances de la reproduction, la mesure des concentrations spermatiques, les poids et l'histologie des organes reproducteurs et le dosage de la testostérone sérique. Les résultats rapportés montrent des altérations histopathologiques sur les ovaires et l'utérus des femelles à la plus forte dose de 100 mg.kg pc⁻¹.j⁻¹, et une absence d'effets reprotoxiques chez les mâles (Nagao *et al.*, 2001).

Chez les mâles et les femelles, le poids corporel à la dose de 100 mg.kg pc⁻¹.j⁻¹ était significativement inférieur par rapport au contrôle, à tous les temps de mesure. De plus, les poids corporels à l'âge de 5, 7 et 9 semaines à la dose de 50 mg.kg pc⁻¹.j⁻¹ étaient significativement inférieurs à ceux du contrôle. Chez les femelles, le poids corporel était diminué à toutes les doses à la 9^{ème} semaine. Il n'y avait pas d'effet du traitement sur l'ouverture vaginale ou sur la séparation préputiale, et cela, pour toutes les doses testées et à

tous les temps de mesure. La fertilité mâle n'était pas affectée par le traitement, les concentrations sériques de testostérone et la qualité spermatique n'étaient pas altérées. Il n'y avait pas d'altération histologique des gonades chez les mâles. La fertilité des femelles était affectée à toutes les doses. Une irrégularité du cycle œstral, des altérations histopathologiques des ovaires (atrophie, absence de corps jaune et follicules atrétiques) et de l'utérus (hypertrophie/hyperplasie) ont été observés à la dose de $100 \text{ mg.kg pc}^{-1}.\text{j}^{-1}$. Cette étude a permis d'identifier un LOAEL à $12,5 \text{ mg.kg pc}^{-1}.\text{j}^{-1}$ associé à un effet fonctionnel sur la fertilité (diminution de l'index de fertilité) chez les femelles.

En 2008, le NTP a réalisé, chez le rat NCTR CD (SD), une étude multigénérationnelle à plusieurs bras, combinant une étude sur la reproduction et une autre sur la toxicité à long terme visant les effets cancérogènes. Cette étude suit les bonnes pratiques de laboratoire selon les standards de la Food and Drug Administration (21 CFR, Part 58). Des groupes de 35 couples d'animaux (pour les générations F0, F1, F3 et F4) ou 40 couples d'animaux (pour la génération F2) ont été exposés à de la génistéine administrée aux doses de 0, 5, 100 et 500 ppm dans la nourriture (régime à base d'aliments 5K96, sans soja, ni luzerne, Purina mills Inc.), soit $0,3 \pm 0,03$; $5,9 \pm 0,5$ et $28,9 \pm 2,5 \text{ mg.kg pc}^{-1}.\text{j}^{-1}$ chez les mâles (F0), $0,3 \pm 0,02 \text{ mg.kg pc}^{-1}.\text{j}^{-1}$, $6,9 \pm 0,3 \text{ mg.kg pc}^{-1}.\text{j}^{-1}$ et $34,6 \pm 1,6 \text{ mg.kg pc}^{-1}.\text{j}^{-1}$ chez les mâles (F1-F2) et $0,5 \pm 0,02 \text{ mg.kg pc}^{-1}.\text{j}^{-1}$, $10,0 \pm 0,5 \text{ mg.kg pc}^{-1}.\text{j}^{-1}$, $50,6 \pm 2,4 \text{ mg.kg pc}^{-1}.\text{j}^{-1}$ chez les femelles (hors période de lactation). Les doses administrées en période de lactation chez les femelles (génération F0-F2) étaient de $0,7 \pm 0,04 \text{ mg.kg pc}^{-1}.\text{j}^{-1}$, $14,6 \pm 0,9 \text{ mg.kg pc}^{-1}.\text{j}^{-1}$, $78,0 \pm 3,9 \text{ mg.kg pc}^{-1}.\text{j}^{-1}$.

La durée de l'exposition *via* l'alimentation variait selon la génération (Figure 6) : 98 jours (génération F0), 161 jours (générations F1 et F2) ou 42 jours (génération F3 et F5). Vingt-cinq rats par sexe de chaque génération (F0 à F4) ont été sélectionnés au hasard pour des études vie-entière et programmés pour nécropsie PND140.

Concernant l'étude multigénérationnelle de toxicologie sur la reproduction, les mâles et les femelles ont été exposés à la génistéine selon la durée indiquée dans le schéma expérimental ci-dessous :

- F0 : de PND42 à PND140 (98 jours),
- F1 : de la conception à PND140 (161 jours),
- F2 : de la conception à PND140 (161 jours),
- F3 : de la conception à PND21, puis alimentation sans la génistéine de PND21 à PND140 (161 jours au total, 42 jours d'alimentation avec la substance d'essai),
- F4 : pas d'exposition ; alimentation sans la génistéine de la conception jusqu'à PND140 (161 jours au total),
- F5 : pas d'exposition ; alimentation sans la génistéine de la conception jusqu'à PND (42 jours au total).

Concernant l'étude de toxicité long terme (étude de cancérogénicité), les mâles et les femelles ont été exposés à la génistéine, selon la durée indiquée dans le schéma expérimental ci-dessous, consistant en trois bras d'exposition et dont les résultats ont été publiés séparément (NTP, 2008) :

- 1) exposition continue depuis la conception jusqu'à 2 ans (désignée F1 continu, ou F1C) pour évaluer les effets d'une exposition vie entière,
- 2) exposition depuis la conception jusqu'à PND140 suivi d'un régime alimentaire sans la substance d'intérêt jusqu'à 2 ans (désignée F1 tronquée à PND140, ou F1T140) pour

déterminer si les effets observés dans l'étude multigénérationnelle ont conduit à des effets néfastes à long terme,

- 3) exposition depuis la conception jusqu'au sevrage suivie d'un régime témoin jusqu'à 2 ans (désignée F3 tronquée à PND21, ou F3T21) pour évaluer les effets à long terme de l'exposition développementale. La désignation F3 pour le groupe d'exposition F3T21 indique que ces animaux étaient issus des mêmes portées que les animaux F3 de la présente étude.

En raison du nombre d'animaux requis pour l'étude long terme de génistéine, des groupes d'animaux distincts ont été utilisés pour l'étude sur la reproduction et l'étude long terme sur la génération F1. L'évaluation de la toxicité long terme résultant d'une exposition alimentaire sur une période allant de la conception jusqu'au sevrage (F3T21) a été réalisée auprès d'animaux de la génération F3 issus de l'étude sur la reproduction.

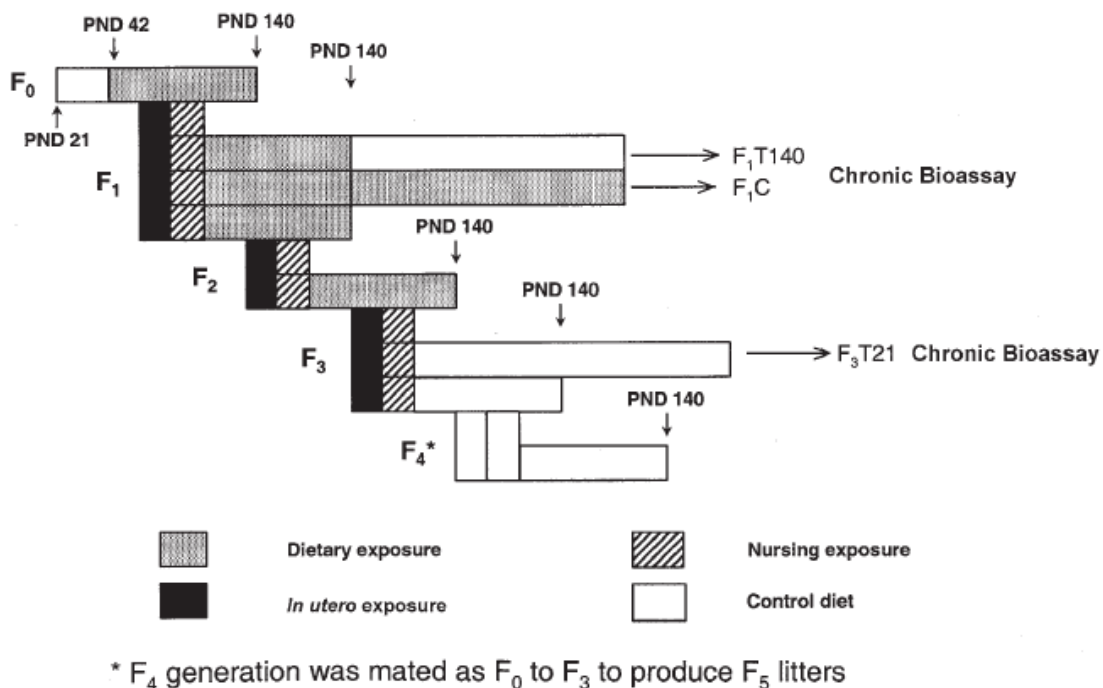


Figure 6 : Schéma expérimental de l'étude multigénérationnelle sur reproduction (NTP, 2008)

Les données collectées au cours l'étude et lors de la nécropsie sont détaillées ci-après. Des contrôles de morbidité et de mortalité ont été effectués deux fois par jour et tous les animaux trouvés moribonds ou morts ont été soumis à une nécropsie complète. Les poids corporels des animaux F₀ répartis dans les groupes d'exposition à PND42 ont été mesurés. Par la suite, les poids corporels et les observations cliniques ont été mesurés chaque semaine jusqu'à l'euthanasie des animaux. Pour les générations F₁ à F₄, les poids corporels et les observations cliniques ont été mesurés chaque semaine à PND21 jusqu'à la fin de l'étude. De plus, le poids corporel des petits a été mesuré à PND2, 4, 7 et 14.

Les utérus présentant un bouchon vaginal ont été examinés à la recherche de sites de résorption. Les organes pesés avant la fixation étaient : les glandes surrénales, le cerveau, les épидидymes, les reins, le foie, les ovaires gauche et droit, la vésicule séminale avec glande coagulante, la rate, les testicules gauche et droit, le thymus et l'utérus. Les organes pesés

après fixation étaient : l'hypophyse, la prostate dorsolatérale et ventrale (les lobes ont été séparés après fixation) et la glande thyroïde. Le fémur droit a été retiré et fixé.

Pour les animaux survivants de chacune des générations de F0 à F4 et les animaux morts ou moribonds avant la fin de l'étude, une histopathologie complète a été réalisée sur toutes les lésions macroscopiques, les organes reproducteurs, les glandes mammaires et les reins (à l'exception des reins de F0, et des mâles des générations F3 et F4). De plus, les tissus suivants ont été examinés dans les groupes témoins et à la dose de 500 ppm pour ces générations : glandes surrénales, os (fémur), moelle osseuse, foie, glande pituitaire, peau, rate, thymus et glande thyroïde.

A PND140, des échantillons de sperme ont été collectés sur des animaux mâles survivants des générations F0 à F4 pour l'évaluation de la motilité des spermatozoïdes, du nombre de spermatozoïdes épидидymaires, du nombre de spermatides testiculaires et de la morphologie des spermatozoïdes. Des échantillons ont été prélevés 3 jours après l'ouverture vaginale (générations F1 à F4) sur des femelles pendant 14 jours consécutifs et pendant 10 jours consécutifs avant PND140 (générations F0 à F4) pour les évaluations cytologiques vaginales (pourcentage de temps passé dans les différentes étapes du cycle œstral ; nombre et pourcentages de cycles anormaux d'œstrus, de diœstrus et la somme des cycles anormaux d'œstrus et de diœstrus ; durée du cycle œstral).

Pour les générations F0 à F4 à la nécropsie à PND140, un comptage des follicules de petites tailles, en croissance et antraux, a été réalisé sur cinq sections des ovaires gauche et droit de huit animaux par groupe d'exposition et par génération.

Les résultats de l'étude multigénérationnelle sur la reproduction sont donnés dans les tableaux 5 et 6.

Tableau 5 : Résultats de l'étude multigénérationnelle sur la reproduction (NTP, 2008)

Effets	Génération					
	F0 exposée de PND42 à PND140	F1 exposée de la conception à PND140	F2 exposée de la conception à PND140	F3 exposée de la conception à PND21 (jusqu'à PND140)	F4 non exposée (jusqu'à PND140)	F5 non exposée (jusqu'à PND21)
Poids corporels						
Pré-sevrage (femelle)	NA	↓ (500)	↓ (500)	↓ (500)	↓ (500)	NA
Post-sevrage (femelle)	↓ (500)	↓ (100, 500)	↓ (500)	-	↓ (500)	NA
Pré-sevrage (mâle)	NA	↓ (5, 100, 500)	↓ (500)	↓ (500)	↓ (500)	NA
Post-sevrage (mâle)	-	↓ (100, 500)	-	-	-	NA
Consommation d'aliments						
Femelle	↓ (500)	↓ (500)	↓ (500)	-	↓ (500)	NA
Taille des portées						
Femelle	NA	-	↓ (500)	-	-	-
Poids des petits à la naissance						
Mâle	NA	↓ (100)	-	-	-	↓ (5, 100, 500)
Femelle	NA	-	-	-	-	↓ (5, 100, 500)
Distance ano-génitale						
Mâle PND2	NA	↓ (500)	-	-	-	-
Femelle PND2	NA	↓ (500)	↓ (500)	↓ (100)	NA	↓ (500)
Ratio	NA	↓ (500)	-	-	-	-
Ouverture vaginale						
Age	NA	↓ (500)	↓ (500)	↓ (5)	-	NA
Poids corporel	NA	↓ (5, 500)	↓ (500)	↓ (500)	-	NA
Descente testiculaire						
Age	NA	-	-	↑ (500)	-	NA
Cytologie vaginale après ouverture vaginale						
% temps en dioestrus	NA	-	-	-	↓ (100)	NA
% Temps en proestrus	NA	↓ (500)	-	-	-	NA
% Cycles Anormaux	NA	↑ (500)	-	-	-	NA
Nombre de cycles anormaux	NA	↑ (500)	-	-	-	NA
Durée du cycle	NA	↑ (500)	↑ (500)	-	-	NA
Cytologie vaginale à la fin de l'exposition						
% Temps en œstrus	-	-	↓ (5)	-	-	NA
% Temps en dioestrus	-	-	↑ (5)	-	-	NA
Nombre de cycles anormaux	-	-	-	↑ (500)	-	NA
Poids corporel en fin d'étude						
Mâle	-	↓ (500)	-	-	-	NA
Femelle	↓ (500)	↓ (500)	↓ (500)	-	-	NA

↑ ou ↓ : augmentation ou diminution par rapport aux témoins à la dose d'exposition indiquée entre parenthèses ou, le cas échéant, une tendance globale significative de la concentration d'exposition ; « - » : aucun groupe exposé ne diffère significativement du groupe témoin pour la génération considérée par comparaisons appariées ; NA : Non applicable.

Tableau 6 : Résultats de l'étude multigénérationnelle sur la reproduction (NTP, 2008)

Effets	Génération					
	F0 exposée de PND42 à PND140	F1 exposée de la conception à PND140	F2 exposée de la conception à PND140	F3 exposée de la conception à PND21 (jusqu'à PND140)	F4 non exposée (jusqu'à PND140)	F5 non exposée (jusqu'à PND21)
Poids des organes (Mâle)						
Glandes surrénales						
Absolu	↑ (5)	-	-	-	-	NA
Relatif	↑ (5)	-	-	-	-	NA
ANCOVA	↑ (5)	-	-	-	-	NA
Cerveau						
Absolu	-	-	↓ (500)	-	↓ (500)	NA
Relatif	-	-	↓ (5)	-	-	NA
ANCOVA	-	-	↓ (500)	-	-	NA
Reins						
Relatif	-	↑ (500)	-	-	-	NA
ANCOVA	-	↑ (500)	-	-	-	NA
Foie						
Absolu	-	-	-	-	↓ (500)	NA
Relatif	-	↑ (500)	-	-	↓ (500)	NA
ANCOVA	-	↑ (500)	-	-	↓ (500)	NA
Hypophyse						
Absolu	-	-	↑ (500)	-	-	NA
Relatif	-	-	↑ (500)	-	-	NA
ANCOVA	-	-	↑ (500)	-	-	NA
Rate						
Absolu	↑ (5)	-	↑ (5)	-	-	NA
Relatif	↑ (5)	-	-	-	-	NA
ANCOVA	↑ (5)	-	-	-	-	NA
Testicules						
Absolu	↑ (500)	-	-	-	-	NA
Relatif	↑ (500)	-	-	-	-	NA
ANCOVA	↑ (500)	-	-	-	-	NA
Thymus						
Absolu	-	-	↓ (100)	-	↓ (100)	NA
Relatif	-	-	↓ (100)	-	-	NA
ANCOVA	-	-	↓ (100)	-	-	NA
Poids des organes (Femelle)						
Glandes surrénales						
Absolu	-	-	↓ (5)	-	-	NA
Cerveau						
Relatif	↑ (500)	↑ (500)	-	-	-	NA
Reins						
Absolu	-	↓ (500)	-	-	-	NA
Foie						
Relatif	-	↑ (5, 500)	↑ (100)	-	-	NA
ANCOVA	-	↑ (5, 100, 500)	-	-	-	NA
Hypophyse						
Absolu	↑ (100)	-	-	-	-	NA
Relatif	↑ (100)	↑ (500)	-	-	-	NA
ANCOVA	↑ (100)	-	-	-	-	NA
Rate						
Absolu	-	↑ (5)	-	-	-	NA
Relatif	-	↑ (5)	-	-	-	NA
ANCOVA	-	↑ (5)	-	-	-	NA
Thymus						
Absolu	-	-	-	↓ (100)	-	NA
Relatif	-	-	-	↓ (100)	-	NA
ANCOVA	-	-	-	↓ (100)	-	NA
Glande thyroïde						
Absolu	-	-	↓ (500)	-	-	NA
Relatif	-	↑ (500)	-	-	-	NA
ANCOVA	-	-	↓ (500)	-	-	NA
Histopathologie (Mâle)						
Glandes mammaires, hyperplasie alvéolaire / ductale	↑ (500)	↑ (100, 500)	↑ (100, 500)	↑ (Tendance)	-	NA
Tubules rénaux, minéralisation	-	↑ (100, 500)	↑ (100, 500)	-	-	NA
Reins, inflammation	-	↑ (500)	-	-	-	NA

Tubules rénaux, inflammation	-	↑ (500)	-	-	-	NA
------------------------------	---	---------	---	---	---	----

↑ ou ↓ : augmentation ou diminution par rapport aux témoins à la dose d'exposition indiquée entre parenthèses ou, le cas échéant, une tendance globale significative de la concentration d'exposition ; « - » : aucun groupe exposé ne diffère significativement du groupe témoin pour la génération considérée par comparaisons appariées ; NA : Non applicable.

Cette étude montre une diminution du poids corporel chez les femelles exposées, plus importante à 500 ppm, dans les générations exposées continuellement à la génistéine (F0 à F2), bien que le poids corporel diminue également chez les femelles de la génération F4 non exposée. Dans toutes les générations (F0, F1, F2) où le poids corporel chez les femelles a diminué, la consommation alimentaire était également diminuée, à l'exception du groupe 100 ppm de la génération F1. Le poids corporel des mâles au cours de la période post-sevrage a diminué dans les groupes F1 recevant 100 et 500 ppm.

Chez les rats, même si le poids à la naissance n'était en général pas plus petit dans les groupes exposés, les gains de poids corporel au cours de la période précédant le sevrage ont diminué chez les mâles et les femelles exposés à 500 ppm dans toutes les générations, ainsi que chez les mâles de la génération F1 exposés à 5 et à 100 ppm. Le poids à la naissance des rats était réduit chez les mâles F1 exposés à 100 ppm et chez tous les groupes exposés m de la génération F5 (mâles et de femelles).

Aucun effet de la génistéine sur le nombre de follicules ou sur l'histologie ovarienne n'a été noté, bien que des perturbations du cycle œstral, y compris des cycles prolongés, aient été observées chez les animaux F1 et F2 exposés en continu à 500 ppm peu après l'ouverture vaginale, mais pas après que ces animaux eurent mis bas et allaité leurs portées.

Concernant la mesure de la distance anogénitale (DAG), les petits mâles (PND2) du groupe 500 ppm de la génération F1 ont présenté une diminution de la DAG moyenne, par rapport aux témoins de cette génération, tandis que les femelles (PND2) ont présenté une diminution de la DAG par rapport aux témoins des générations F1 (500 ppm), F2 (500 ppm) et F3 (100 ppm).

L'exposition à 500 ppm de génistéine a avancé le moment de l'ouverture vaginale chez les rats femelles des générations F1 à F2, et à 5 ppm pour la génération F3. Le poids corporel à l'ouverture vaginale était diminué à 500 ppm chez les rats femelles des générations F1 à F3, et à 5 ppm pour la génération F1. Cet effet n'a pas été observé sur la génération F4 non exposée.

Chez le mâle, un retard dans le temps de descente testiculaire a été observé uniquement chez la génération F3 exposée à 500 ppm de la conception jusqu'au sevrage. Concernant les effets sur le poids des organes des générations F0 à F5, les effets de l'exposition à la génistéine sur le poids des organes chez les deux sexes sont limités dans l'ensemble à une seule génération. Parmi ceux-ci, une augmentation du poids de l'hypophyse chez les mâles F2 exposés à 500 ppm, sans une lésion microscopique (Tableau 6).

Le seul changement statistiquement significatif induit par la génistéine sur le poids de l'appareil reproducteur chez les deux sexes concerne la génération F0 exposée à la fin de la puberté et à l'âge adulte (augmentation du poids des testicules à 500 ppm) (Tableau 6).

Aucune lésion histologique liée à l'exposition n'a été trouvée dans les évaluations histopathologiques des tissus chez les rats femelles. Les lésions liées à l'exposition chez les rats mâles se limitaient à la glande mammaire et aux reins. Le schéma d'induction de l'hyperplasie d'une génération à l'autre, avec les effets les plus forts observés dans les groupes de 100 et 500 ppm des générations F1 et F2 exposées en continu, indique que les expositions

au cours du développement et après le sevrage contribuent à cet effet. L'exposition tardive à la puberté et à l'âge adulte, comme dans la génération F0, où l'exposition est développementale, comme dans la génération F3, a produit des effets moindres. L'incidence de l'hyperplasie alvéolaire/canalaire des glandes mammaires était légèrement augmentée à 500 ppm chez les mâles de la génération F4, mais il ne s'agissait pas d'une augmentation. Dans cette étude, seule une atteinte des glandes mammaires des mâles a été observée.

Une incidence accrue de minéralisation des tubules rénaux, ou néphrocalcinose, a été observée chez les mâles exposés à 100 ou 500 ppm, l'augmentation étant limitée aux générations F1 et F2 exposées en continu. La néphrocalcinose induite par la génistéine chez les mâles était de sévérité minimale à légère et ne semble pas avoir eu d'impact sur la longévité des animaux ou la fertilité, ce paramètre, ainsi que l'hyperplasie de la glande mammaire chez le mâle, semblait être systématiquement lié à une exposition à la génistéine de 100 ppm ou plus.

Cette étude a permis d'identifier un NOAEL à 5,9 mg.kg pc⁻¹.j⁻¹ (100 ppm) et un LOAEL à 35 mg.kg pc⁻¹.j⁻¹ (500 ppm) associé à une hyperplasie alvéolaire et canalaire de la glande mammaire chez les mâles de la génération F0, ainsi qu'un NOAEL à 0,35 mg.kg pc⁻¹.j⁻¹ (5 ppm) et un LOAEL à partir de 7 mg.kg pc⁻¹.j⁻¹ (100 ppm) associé à une hyperplasie alvéolaire et canalaire de la glande mammaire chez les mâles chez les générations F1 et F2.

Eustache *et al.* ont exposé des rattes gestantes Wistar han (n = 10 femelles/dose) quotidiennement par gavage à des doses de génistéine de 0, 1 et 10 mg.kg pc⁻¹.j⁻¹ du premier jour de gestation (GD) jusqu'à PND21 (sevrage), les petits ont ensuite été exposés quotidiennement par gavage jusqu'à PND80 (Eustache *et al.*, 2009). La distance anogénitale a été mesurée à PND25. A PND80, plusieurs paramètres de fertilité de la génération F1 ont été mesurés (index d'accouplement, index de fertilité, taille des portées, poids moyens, ratio mâles/femelles, pourcentage de pertes post-implantatoires). Un dosage plasmatique de la FSH, LH, œstradiol et testostérone a été également réalisé.

A PND85 (jour de fin d'étude), les poids des testicules, des épидидymes, des vésicules séminales, de la prostate ventrale et du foie ont été mesurés. Un dénombrement des spermatozoïdes épидидymaires a également été réalisé. Les paramètres de la motilité spermatique ont été mesurés (pourcentage de spermatozoïdes progressivement motiles, vitesse moyenne de trajectoire, vélocité en ligne droite et curviligne, rectilignité et l'index linéaire).

A PND25, cette étude n'a pas montré d'effet sur la DAG et sur les organes génitaux, sauf à la plus forte dose ou 5 animaux sur 5 ont un développement de pénis immature.

A PND85, le poids des animaux était augmenté à 1 mg.kg pc⁻¹.j⁻¹ (350 ± 7 vs 309 ± 7 ; p < 0,01) et à 10 mg.kg pc⁻¹.j⁻¹ (333 ± 6 vs 309 ± 7 ; p < 0,05). Il n'y avait pas d'effet sur les poids relatifs des testicules, des vésicules séminales, ou de la prostate ventrale, aux deux doses. Le poids relatif des épидидymes était diminué à 1 mg.kg pc⁻¹.j⁻¹ (1,30 ± 0,03 vs 1,56 ± 0,07 ; p < 0,01) et à 10 mg.kg pc⁻¹.j⁻¹ (1,36 ± 0,07 vs 1,56 ± 0,07 ; p < 0,01). Le poids relatif du foie était augmenté à 10 mg.kg pc⁻¹.j⁻¹ (33,1 ± 0,5 vs 30,9 ± 0,7 ; p < 0,05).

Les paramètres de motilité spermatique montraient une diminution de :

- la vitesse en ligne droite (VSL exprimée en µm.s⁻¹) à 1 mg.kg pc⁻¹.j⁻¹ (69 ± 2 vs 83 ± 4 ; p < 0,01) et à 10 mg.kg pc⁻¹.j⁻¹ (71 ± 2 vs ; 83 ± 4 ; p < 0,01) ;
- la vitesse moyenne sur trajectoire (VAP exprimée en µm.s⁻¹) à 1 mg.kg pc⁻¹.j⁻¹ (120 ± 2 vs 132 ± 4 ; p < 0,01) et à 10 mg.kg pc⁻¹.j⁻¹ (114 ± 2 vs 132 ± 4 ; p < 0,001) ;

- la vitesse curviligne (VCL exprimée en $\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$) à 1 mg.kg pc⁻¹.j⁻¹ (254 ± 5 vs 308 ± 12 ; $p < 0,001$) et à 10 mg.kg pc⁻¹.j⁻¹ (254 ± 5 vs 308 ± 12 ; $p < 0,001$) ;
- la fréquence croisée des battements (BCF exprimée en Hz) à 1 mg.kg pc⁻¹.j⁻¹ ($23,7 \pm 0,4$ vs $26,7 \pm 0,9$; $p < 0,01$) et à 10 mg.kg pc⁻¹.j⁻¹ ($24,5 \pm 0,5$ vs $26,7 \pm 0,9$; $p < 0,05$) ;
- la rectitude de trajectoire (STR exprimée en %) uniquement à 1 mg.kg pc⁻¹.j⁻¹ ($58,0 \pm 1,4$ vs $63,8 \pm 1,8$; $p < 0,01$) ;
- la concentration spermatique dans l'épididyme caudal (exprimée en millions par mL) à 10 mg.kg pc⁻¹.j⁻¹ (79 ± 10 vs 104 ± 14 ; $p < 0,05$).

Les résultats sur l'accouplement et la fertilité montraient que le traitement n'a pas eu d'incidence sur l'index d'accouplement, l'index de fertilité, les pertes post-implantatoires, le poids moyen des petits et le sexe ratio à la naissance. La taille de la portée était diminuée à 1 mg.kg pc⁻¹.j⁻¹ ($7,3 \pm 4$ vs $13 \pm 1,6$; $p < 0,05$) et 10 mg.kg pc⁻¹.j⁻¹ ($7,8 \pm 2,9$ vs $13 \pm 1,6$; $p < 0,01$).

Cette étude a permis d'identifier un LOAEL de 1 mg.kg pc⁻¹.j⁻¹ associé à une diminution du poids relatif des épидидymes chez les mâles et une diminution de la taille de la portée chez les femelles.

Dans l'étude de Li *et al.*, des souris femelles C57BL/6J ont été exposées par voie orale (dans la nourriture) à partir de PND21 jusqu'à 10 semaines (des mesures à 5, 6, 7 et 10 semaines) à 0, 5, 100 et ou 500 ppm de génistéine (soit, selon les auteurs, 0, 0,5, 10, ou 50 mg.kg pc⁻¹.j⁻¹) (Li *et al.*, 2014). L'ouverture vaginale a été évaluée quotidiennement du sevrage jusqu'à la détection de l'ouverture vaginale ($n = 35/\text{groupe}$). Le cycle œstral a été suivi quotidiennement sur deux périodes : à partir du jour ouverture vaginale pendant 10 jours et de 5 à 8 semaines ($n = 6/\text{groupe}$). Toutes les souris ont été disséquées au stade de l'œstrus à la 5^{ème}, 6^{ème}, 7^{ème} ou 10^{ème} semaine. Les animaux ont été nourris avec une alimentation sans phytoœstrogène. Les observations ont porté sur le délai de l'ouverture vaginale, l'analyse du temps d'ovulation (par frottis vaginaux), le développement des corps jaunes et de la glande mammaire. Le développement de la glande mammaire a été analysé par morphométrie en histologie de la structure entière (dimensions, structures et surfaces acinaires), associée à une analyse de l'expression des récepteurs hormonaux (immunohistologie) et de l'expression de gènes impliqués (PCR) dans le développement de la glande mammaire (CK5, CK8, CK14, et CK18, PR, Areg, et Wnt4, sur des souris de 5 semaines à 500 ppm uniquement). Le développement des ovaires a été évalué par examen histologique chez les souris âgées de 5, 6 et 7 semaines. Une analyse de l'impact sur le taux d'implantation embryonnaire a également été réalisée, avec une observation des cycles sur des souris âgées de 5 à 8 semaines (i.e. période de maturation mammaire) et un focus sur les 10 premiers jours qui suivent l'ouverture vaginale. Les résultats montrent un impact sur l'ouverture vaginale et sur la durée des cycles œstraux avec une diminution de l'âge de l'ouverture vaginale à 10 et 50 mg.kg pc⁻¹.j⁻¹, une augmentation de la durée de la phase d'œstrus à 50 mg.kg pc⁻¹.j⁻¹, une augmentation du nombre de jours passés en phase d'œstrus à toutes les doses, une diminution du nombre d'animaux avec un cycle œstral normal à 10 et 50 mg.kg pc⁻¹.j⁻¹, une augmentation significative de corps jaune (indicateurs d'ovulation) à 0,5 mg.kg pc⁻¹.j⁻¹ et une augmentation du développement des glandes mammaires à 10 et 50 mg.kg pc⁻¹.j⁻¹. Les auteurs concluent à un effet de puberté précoce, lié à l'exposition à la génistéine, sans répercussion sur le taux d'implantation embryonnaire chez la souris (Li *et al.*, 2014).

Cette étude a permis d'identifier un LOAEL à 10 mg.kg pc⁻¹.j⁻¹ (100 ppm) associé à une diminution de l'âge de l'ouverture vaginale, une augmentation de la durée des cycles œstraux et une augmentation du développement des glandes mammaires chez les souris femelles.

Dans l'étude d'Abo-Elsoud *et al.*, des lapins mâles (souche non spécifiée, n = 7/dose, n = 21 ; âgés de 8,5 mois, poids moyen = $3 \pm 0,06$ kg) ont été exposés pendant 12 semaines à 0, 5 ou 20 mg.kg pc⁻¹.j⁻¹ d'isoflavones de soja (proportion de 1 génistéine pour 5,7 de daïdzéine) (Abo-Elsoud *et al.*, 2019). Les paramètres estimant la libido ainsi que les concentrations spermatiques et la fertilité (index de fertilité, taille des portées, poids des portées, et viabilité des portées), ainsi que les concentrations spermatiques et les concentrations sériques de l'hormone thyroïdienne T3 et de la testostérone.

Les résultats montrent une baisse de la libido (augmentation du temps de réaction ; 15,42 sec à 5 mg.kg pc⁻¹.j⁻¹, 16,77 sec à 20 mg.kg pc⁻¹.j⁻¹ vs 10,84 sec chez les témoins ; p < 0,05), une diminution de la testostérone sérique (3,95 ng.mL⁻¹ à 5 mg.kg pc⁻¹.j⁻¹, 4,37 ng.mL⁻¹ à 20 mg.kg pc⁻¹.j⁻¹ vs 5,17 ng.mL⁻¹ chez les témoins ; p = 0,017), mais qui n'affectait pas les portées (nombre, poids, viabilité) et une augmentation de la triiodothyronine (T3) (1,81 ng.mL⁻¹ à 5 mg.kg pc⁻¹.j⁻¹ vs 1,22 ng.mL⁻¹ chez les témoins) et 1,68 ng.mL⁻¹ à 20 mg.kg pc⁻¹.j⁻¹ vs 1,22 ng.mL⁻¹ chez les témoins ; p < 0,05). Il n'y avait pas d'effet du traitement sur la taille, la viabilité et le poids des portées à la naissance. Il a également été observé une diminution de la concentration spermatique ($\times 10^6$ /mL) à 5 (260,6 vs 327,1 ; p < 0,05) et 20 mg.kg pc⁻¹.j⁻¹ (249,2 vs 327,1 ; p < 0,05), des spermatozoïde totaux (exprimé en millions par éjaculat) à 5 (177,2 vs 196,3 ; p < 0,05) et 20 mg.kg pc⁻¹.j⁻¹ (137,1 vs 196,3 ; p < 0,05), des spermatozoïde mobile totaux (exprimé en millions par éjaculat) à 5 (141,8 vs 139,4 ; p < 0,05) et 20 mg.kg pc⁻¹.j⁻¹ (97,3 vs 139,4 ; p < 0,05), de la fraction totale des spermatozoïdes fonctionnels (exprimée en millions par éjaculat) à 5 (119,3 vs 122,3 ; p < 0,05) et 20 mg.kg pc⁻¹.j⁻¹ (84,4 vs 122,3 ; p < 0,05). Les résultats ne montrent pas de différence du pourcentage de spermatozoïdes anormaux (exprimé en %) à 5 et 20 mg.kg pc⁻¹.j⁻¹.

Cette étude a permis d'identifier un LOAEL de 5 mg.kg pc⁻¹.j⁻¹ associée à une diminution significative de la concentration en spermatozoïdes et de la testostéronémie, ainsi qu'une augmentation significative de la T3 pour un mélange d'isoflavones de soja (Abo-Elsoud *et al.*, 2019).

Dans une seconde étude d'Eustache *et al.* de 2020, des rats Wistar Han ont été exposés, quotidiennement, par gavage, à 0 et 1 mg.kg pc⁻¹.j⁻¹ de génistéine, selon deux schémas d'exposition :

- exposition des femelles (F1 issue de couples non exposés) à partir de GD1 jusqu'à PND21 (sevrage). La génération F2 était suivie jusqu'à PND100,
- exposition des mâles (F1 issue de couples non exposés) de PND21 jusqu'à PND100. Ces rats mâles étaient accouplés avec des femelles non exposées pour donner une génération F2 qui était suivie jusqu'à PND100 (Eustache *et al.*, 2020).

Plusieurs paramètres liés à la fonction de reproduction ont été évalués, ainsi que les profils d'expression de gènes impliqués dans la méiose, l'apoptose, la stéroïdogenèse, chez les rats exposés et leur progéniture. Les effets observés portent sur la DAG, le délai de début de la puberté (jour postnatal de séparation préputiale complète), performance de reproduction et de fertilité (uniquement chez le mâle de la génération F1). A PND100, les poids relatifs des épидидymes, testicules, vésicules séminales, prostate et foie ont été mesurés chez les animaux de la génération F1 et F2. Un comptage spermatique des épидидymes a également été réalisé.

Dans les conditions de cette étude, la génistéine n'a pas eu d'effet sur la DAG, sur le délai d'apparition de la puberté, et sur les paramètres de performance de fertilité et de reproduction.

La génistéine a diminué le contenu spermatique épидидymaire chez les animaux F1 exposés pendant la période pré-pubertaire jusqu'à l'âge adulte (valeurs numériques non disponibles dans l'article).

Les expressions des gènes impliqués dans la stéroïdogénèse étaient altérées lors des deux fenêtres d'exposition, notamment l'exposition pendant la gestation/lactation. Pour cette fenêtre d'exposition, les expressions de Star ($p < 0,01$), Cyp11a1 ($p < 0,001$), Cyp17a1 ($p < 0,001$) étaient diminuées par l'exposition à la génistéine (valeurs numériques non disponibles dans l'article).

Cette étude a permis d'identifier un LOAE de $1 \text{ mg.kg pc}^{-1}.\text{j}^{-1}$ associé à une diminution du contenu spermatique des épидидymes chez les mâles (mâles F1 exposés de PND21 à PND100).

Marraudino *et al.* ont exposé, par voie orale, des souris CD-1 mâles et femelles de PND1 ou PND8 à une dose unique de génistéine de $50 \text{ mg.kg pc}^{-1}.\text{j}^{-1}$ diluée dans de l'huile de sésame (Marraudino *et al.*, 2021). Les animaux ont ensuite été observés à PND12, 22, 30 et 60. Les observations ont porté sur le délai de l'ouverture vaginale, le cycle œstral et l'analyse de la glande mammaire (*whole mount* à PND22, 30 et 60), sur les poids de l'utérus et des testicules, le poids corporel, la consommation de nourriture, les concentrations d'hormones circulantes (leptine, progestérone et testostérone) et un marquage immunohistochimique de la kisspeptine, POMC (pro-opiomélanocortine) et de l'orexine sur des coupes cérébrales.

L'exposition à la génistéine était associée à une ouverture vaginale plus précoce (femelles non exposées : $27,8 \pm 0,29$; femelles exposées : $26,5 \pm 0,30$, $p = 0,005$) et à une altération du cycle œstral. Les femelles exposées à la génistéine ont passé plus de temps en œstrus et en diœstrus que les femelles non exposées (35 % en œstrus et 51 % en diœstrus vs 30% en œstrus et 43% en diœstrus, respectivement), avec une réduction significative de la phase proœstrus ($p = 0,03$; femelles non exposées : 16,67 vs femelles exposées : 6,67).

Une différence du poids absolu de l'utérus a été observée à PND22, uniquement. Il n'y avait pas de différence des poids des testicules à PND22 et 30 chez les mâles exposés et les témoins. Une diminution du poids des testicules des individus exposés a été observée à PND60.

L'exposition à la génistéine a augmenté chez les femelles les concentrations circulantes de progestérone à PND60 ($p = 0,007$), mais pas à PND30. Une diminution de la concentration circulante de testostérone a été observée chez les mâles à PND60 mais pas à PND30. Chez les animaux témoins des deux sexes, la concentration plasmatique de leptine était faible et sans différence entre les sexes jusqu'à PND22. Chez les femelles traitées, la concentration de leptine était augmentée à PND60 vs PND30 ($p < 0,001$). Au contraire, chez les mâles du groupe témoin, la concentration de leptine était augmentée à PND30 vs PND22 ($p = 0,001$), puis diminuée à PND60 vs PND30 ($p < 0,001$).

Concernant les effets sur le développement de la glande mammaire, l'exposition à la génistéine n'a pas eu d'effet sur les bourgeons terminaux, quelle que soit la période de développement considérée. De même, l'exposition n'avait pas modifié l'architecture globale de la glande mammaire au PND60, le nombre de branches étant similaire chez les femelles non exposées ($6,67 \pm 0,22$) et exposées ($7,17 \pm 0,51$; $p = 0,408$).

Oliveira *et al.* ont administré par gavage des rats mâles Wistar ($n = 54$) à des doses de 0 ; 0,5 ; 5 ou 50 $\text{mg.kg pc}^{-1}.\text{j}^{-1}$ d'isoflavones de soja (Glycine max L., extrait de soja à 40% isoflavones, dilué dans l'huile de maïs ; composition non précisée) de PND23 jusqu'à PND60 (Oliveira *et*

al., 2022). Les auteurs ont étudié la croissance des animaux, l'âge à la puberté, les concentrations sériques de LH, FSH, testostérone et œstradiol, et l'expression des transcrits d'ARNm de gènes codant pour des gènes clés de contrôle de l'axe hypothalamo-hypophyso-testiculaire. L'exposition aux isoflavones des rats mâles prépubères n'a pas eu d'effet sur la croissance des animaux. Il a été observé une augmentation de l'âge de la puberté chez les rats mâles prépubères à toutes les doses testées. La médiane et l'écart interquartile de l'âge à la puberté était de 35 (IC_{95%} = 34 ; 38,75), 41 (IC_{95%} = 38,5 ; 42), 39,5 (IC_{95%} = 38 ; 43), 39 (IC_{95%} = 37,75 ; 40) jours à 0 ; 0,5 ; 5 et 50 mg.kg pc⁻¹.j⁻¹, respectivement. Dans l'hypothalamus, une augmentation de l'expression de *Esr1* a été observée à 0,5 et 5 mg.kg pc⁻¹.j⁻¹ ($p < 0,01$ et $p < 0,05$). Dans l'hypophyse, une augmentation de l'expression de *Gnrhr* (50 mg.kg pc⁻¹.j⁻¹ ; $p < 0,05$), une réduction de l'expression de *Lhb* (0,5 mg.kg pc⁻¹.j⁻¹ ; $p < 0,05$) et une réduction de l'expression de *Ar* ont été notées (50 mg.kg pc⁻¹.j⁻¹ ; $p < 0,05$). Dans les testicules, une augmentation de l'expression *Lhcgr* (50 mg.kg pc⁻¹.j⁻¹ ; $p < 0,05$) et une réduction de l'expression de *Star* (0,5 et 5 mg.kg pc⁻¹.j⁻¹ ; $p < 0,05$) a été observée. Les concentrations sériques de LH (5 et 50 mg.kg pc⁻¹.j⁻¹ ; $p < 0,01$ et $p < 0,05$) et de FSH (0,5 mg.kg pc⁻¹.j⁻¹ ; $p < 0,05$) étaient augmentées, tandis que celles de la testostérone et de l'œstradiol étaient réduites. Ces résultats suggèrent que la consommation d'isoflavones pendant la période prépubertaire perturbe l'axe hypothalamo-hypophyso-testiculaire chez le rat mâle, provoquant un hypogonadisme hypergonadotrope et une altération des niveaux d'expression des gènes clés régulant l'axe hypothalamo-hypophyso-testiculaire.

L'étude de *Oliviera et al.* a permis d'identifier un LOAEL de 0,5 mg.kg pc⁻¹.j⁻¹ associé à un âge retardé de la séparation balano-préputiale (retard pubertaire) et une diminution significative de la testostéronémie (*Oliviera et al.*, 2022).

La même équipe a exposé par gavage des rats Wistar mâles ($n = 32$, 8/groupe) à des doses de 0 ; 0,5 ; 5 ou 50 mg.kg pc⁻¹.j⁻¹ d'isoflavones de soja (*Glycine max* L., extrait de soja à 40% isoflavones, dilué dans l'huile de maïs ; composition non précisée) de PND23 jusqu'à PND60 (*Dal Forno et al.*, 2023). Le groupe contrôle n'a reçu que de l'huile de maïs. A la fin du traitement, du sang a été prélevé pour réaliser des dosages d'hormones thyroïdiennes (TSH, T3, T4), les organes tel que l'hypothalamus, l'hypophyse, la thyroïde, le foie et le cœur ont été prélevés afin d'évaluer l'expression des ARNm des gènes impliqués dans la régulation de l'axe hypothalamo-hypophyso-thyroïdien. La concentration sérique de TSH a augmenté dans les groupes traités avec 0,5 ($p < 0,05$) et 5 mg.kg pc⁻¹.j⁻¹ ($p < 0,01$) d'isoflavones, alors qu'aucune variation de T3 et de T4 n'a été observée. En ce qui concerne l'expression génique des ARNm, *Mct-8* était augmenté dans l'hypothalamus, *Mct-8*, *Thra1* et *Thrb2* ont diminué dans l'hypophyse, *Nis* et *Pds* étaient réduits dans la thyroïde. Dans le cœur, *Mct8* et *Thrb2* étaient augmentés, *Thra1* était diminué. Dans le foie, *Mct8*, *Thra1* et *Thrb2* étaient diminués. D'après les auteurs, ces résultats suggèrent que la consommation d'isoflavones de soja pendant la période prépubertaire pourrait induire chez le rat mâle une hypothyroïdie subclinique, avec des altérations de la régulation de l'axe hypothalamo-hypophyso-thyroïdien, une modulation de la synthèse des hormones thyroïdiennes et des altérations périphériques des organes cibles des hormones thyroïdiennes.

Dans une étude de *Caceres et al.* sur la fonction de reproduction, des rats Wistar mâles ($n = 65$; âgés de 60 jours) ont été exposés, par voie orale, pendant 5 mois, à des isoflavones. Les animaux ont été répartis en trois groupes ($n = 25$ /dose), un groupe témoin, un groupe faiblement supplémenté en isoflavones (17 mg.kg pc⁻¹.j⁻¹ de génistéine et 12 mg.kg pc⁻¹.j⁻¹ de

daïdzéine), et un groupe richement supplémenté en isoflavones (170 mg.kg pc⁻¹.j⁻¹ de génistéine et 120 mg.kg pc⁻¹.j⁻¹ de daïdzéine) (Caceres *et al.*, 2023). Les mélanges d'isoflavones ont été directement dilués dans l'eau de boisson aux concentrations étudiées. La progestérone, l'androstènedione, la déhydroépiandrostérone, la testostérone, la dihydrotestostérone, le 17β-œstradiol et le sulfate d'œstrone ont été mesurés dans le sérum et les tissus testiculaires. Le nombre et la viabilité des spermatozoïdes, ainsi que l'histologie des testicules (poids, longueur, volume, diamètre des tubules séminifères, numération des spermatozoïdes dans les testicules et les épидидymes) ont été investigués. Durant les premières semaines d'expérimentation, la consommation d'un régime faiblement ou richement supplémenté en isoflavones n'avait pas d'effet significatif sur le poids corporel. Après la 12^{ème} semaine, le groupe faiblement supplémenté en isoflavones a montré une perte significative de poids corporel ($p < 0,05$) par rapport au groupe témoin, tandis que le groupe recevant le régime richement supplémenté en isoflavones a montré un gain de poids corporel significatif ($p < 0,05$). Aucune différence dans la consommation de nourriture et d'eau n'a été observée entre les trois groupes. Le poids relatif des testicules était significativement réduit ($p < 0,05$) à partir de la 12^{ème} semaine chez les rats recevant un régime faiblement ou richement supplémenté en isoflavones. En fin de traitement, l'administration d'un régime richement supplémenté en isoflavones avait provoqué une réduction significative ($p < 0,05$) du diamètre des tubules séminifères par rapport au groupe témoin et au régime faiblement supplémenté en isoflavones.

Quarante pour cent des rats sous un régime faiblement supplémenté en isoflavones et 80 % des rats sous un régime richement supplémenté en isoflavones ont présenté des dégénérescences des tubes séminifères en comparaison avec le témoin. Au début du traitement et jusqu'à la 16^{ème} semaine, il n'y avait aucune différence dans la qualité du sperme. A partir de la 16^{ème} semaine, les différences étaient statistiquement significatives ($p < 0,05$) jusqu'à la fin de l'étude. La motilité des spermatozoïdes et le nombre de spermatozoïdes étaient significativement réduits ($p < 0,05$) dans les groupes sous régimes faiblement et richement supplémentés en isoflavones. Les concentrations plasmatiques de progestérone ont diminué significativement ($p < 0,05$) dans les groupes sous régimes faiblement et richement supplémentés en isoflavones. Aucune différence significative n'a été observée dans les concentrations plasmatiques de DHEA, les concentrations plasmatiques d'androstènedione ont révélé des différences significatives pour les groupes sous régime faiblement et richement supplémenté en isoflavones et le contrôle. Les concentrations plasmatiques de testostérone et de dihydrotestostérone étaient réduites ($p < 0,05$) dans les groupes sous régimes faiblement et richement supplémentés en isoflavones. Des concentrations plasmatiques significativement plus élevées de sulfate d'œstrone et d'œstradiol ont été mesurées dans les groupes expérimentaux comparés au groupe témoin. La concentration testiculaire de testostérone était diminuée dans les deux groupes supplémentés comparés au groupe témoin. Aucune différence significative n'a été retrouvée pour la progestérone, la déhydroépiandrostérone (DHEA) et l'androstènedione dans les testicules. A la 4^{ème} semaine de traitement, une augmentation significative ($p < 0,05$) a été observée pour les concentrations d'œstrone sulfate chez les rats soumis à un régime faiblement et richement supplémentés en isoflavones, bien qu'à partir de la 8^{ème} semaine, ces concentrations aient diminué significativement ($p < 0,05$) jusqu'à la fin du traitement. Cependant, les niveaux d'œstradiol dans les groupes isoflavones étaient significativement plus élevés ($p < 0,05$) à partir de la 4^{ème} semaine jusqu'à la 20^{ème} semaine par rapport au témoin. Ces différences de concentrations testiculaires de testostérone et œstradiol entre le groupe contrôle et les groupes traités se reflètent également dans le rapport testostérone/œstradiol (T/E2) avec une réduction du rapport T/E2 des groupes traités depuis la 8^{ème} semaine jusqu'à

la fin de l'expérimentation, dénotant un déséquilibre hormonal. Les auteurs concluent que, chez le rat mâle adultes, un régime long terme faiblement et richement supplémentés en isoflavones compromet la fonctionnalité testiculaire en provoquant un déséquilibre de l'homéostasie hormonale qui entraîne une réduction de la qualité du sperme.

Cette étude a permis d'identifier un LOAEL de 0,56 mg.kg pc⁻¹.j⁻¹ associé à une diminution significative de la testostérone circulante dès la première semaine d'exposition et de dihydrotestostérone dès la 2^{ème} semaine, et une diminution semi-quantitative (histologie) des spermatozoïdes épидидymaires.

3.5 Génotoxicité

Les données identifiées dans la littérature sur la génotoxicité des isoflavones concernent principalement la génistéine et la daïdzéine. Les rapports de synthèse les plus récents citent le rapport de l'Efsa de 2015 et du SCCS de 2022. Les études citées ci-dessous sont détaillées dans l'annexe 4.

3.5.1 Génistéine

- Test de mutation génique sur bactéries (4 études)

Le rapport du SCCS de 2022 décrit quatre études négatives pour la génotoxicité de la génistéine évaluée par le test de Ames sur plusieurs souches de bactéries (TA1535, TA153, TA98 TA100 et Escherichia coli WP2 uvrA).

- Tests *in vitro*
 - Test d'aberrations chromosomiques et de micronoyau *in vitro* sur cellules de mammifères (10 études)

Le rapport du SCCS de 2022 rapporte un effet clastogène de la génistéine dans de nombreuses études menées *in vitro*, mais cet effet n'a pas été confirmé dans des études *in vivo*. Les résultats de 7 tests d'aberrations chromosomiques/micronoyaux étaient positifs, tandis qu'une étude était négative et une autre étude non conclusive. Ces études sont très hétérogènes en qualité et certaines n'ont pas été réalisées conformément aux BPL (bonnes pratiques de laboratoire).

- Test de mutation génique *in vitro* sur cellules de mammifères (10 études)

Plusieurs tests de mutation génique sur différents types de cellules de mammifères (cellules de lymphome de souris L5178Y, cellules V79, cellules d'embryon de hamster syrien (SHE) primaires ou cellules lymphoblastoïdes humaines AHH-1) traitées à la génistéine sont disponibles. Les sites de mutations recherchées sont localisés dans les loci Tk, Hprt, ainsi que dans le locus Na⁺/K⁺-ATPase. Toutes les études étaient positives. Deux études, jugées de bonne qualité par le SCCS, ont montré un effet positif avec et sans activation métabolique.

- Test de dommages à l'ADN *in vitro* (10 études)

Plusieurs tests de dommages à l'ADN (tests des comètes *in vitro*) sur cellules animales, lymphocytes et leucocytes humains en cultures primaires, cellule humaine en culture primaire de cancer papillaire de la thyroïde, spermatozoïdes, cellules du côlon et différentes lignées cellulaires de mammifères (cellules V79, HT 29 et CHO) ont été menés (cité dans Efsa, 2015 ; VKM, 2017 ; SCCS, 2022). Selon le SCCS (SCCS, 2022), cinq études ressortent positives,

tandis que quatre ont été jugées négatives. Aucune des études n'a été réalisée conformément aux BPL.

- Autres tests *in vitro* de génotoxicité (4 études)

Deux essais de transformation cellulaire ont été réalisés sur des cellules SHE (Tsutsui *et al.*, 2003 ; Harvey *et al.*, 2005 cités dans SCCS 2022). L'étude de Tsutsui *et al.* montre que la génistéine est capable d'induire une transformation morphologique des cellules SHE. Dans la même étude, la génistéine a également été testée pour la formation d'adduits à l'ADN par post-marquage au ³²P, avec des résultats positifs. Cependant, la version pH 6,7 de l'essai SHE décrite par Harvey *et al.* s'est révélée négative.

- Tests *in vivo*

- Test d'aberrations chromosomiques/micronoyau *in vivo* (OCDE 474) (3 études)

Les tests du micronoyau *in vivo*, chez les souris et les rats après administration orale de génistéine, se sont révélés négatifs (McClain *et al.*, 2006b cité dans SCCS 2022). Deux tests du micronoyau *in vivo*, n'ont pas montré d'augmentation de l'incidence des micronoyaux pour une dose unique en génistéine chez la souris (Record *et al.*, 1995 ; Masuda *et al.*, 2012 cités dans SCCS 2022).

- Test *in vivo* de dommages à l'ADN (test des comètes) (1 étude)

Un test des comètes *in vivo* après administration orale de génistéine seule s'est révélé négatif, mais la co-administration de génistéine et de NaNO₂ a augmenté les dommages à l'ADN avec et sans formamidopyrimidine glycosylase (FPG) (Toyoizumi *et al.*, 2010 cité dans SCCS, 2022).

- Test *in vivo* de mutations géniques et autres test *in vivo* (8 études)

Plusieurs études de mutation génique *in vivo* chez les mammifères exposés à la génistéine sont disponibles sur des rats transgéniques Big Blue pour le gène cII du foie (Chen *et al.*, 2005 cité dans SCCS 2022), le gène lacI dans les cellules utérines chez la femelle (Aidoo *et al.*, 2005 cité dans SCCS 2022), le gène lacI dans les cellules de la glande mammaire chez la femelle (Manjanatha *et al.*, 2006 cité dans SCCS 2022), le gène Hprt dans les lymphocytes isolés de la rate de la femelle (Manjanatha *et al.*, 2006 cité dans SCCS 2022) et le gène lacI du tissu cardiaque (Manjanatha *et al.*, 2005 cité dans SCCS 2022). Toutes ces études *in vivo* sur des rats transgéniques Big Blue ont donné des résultats négatifs.

Une dose de génistéine de 10 mg.kg pc⁻¹ administrée par voie sous-cutanée chez des rats Wistar mâles juvéniles a augmenté la quantité de complexes covalents topoisomérase IIa et b-ADN dans l'intestin (Baechler *et al.*, 2016 cité dans SCCS 2022). Cependant, aucun effet sur la topoisomérase IIa et le complexe b-ADN n'a été constaté après une exposition à un régime riche en isoflavones (*via* l'alimentation majoritairement sous forme de glycosides à 25 et 50 mg.kg pc⁻¹) chez des rats mâles *via* la mère pendant la durée de la gestation, la lactation, et ensuite de PND21 à PND30.

La génistéine possède la propriété d'inhiber la topoisomérase *in vivo*, cette propriété est plus marquée lors d'une exposition sous-cutanée que par la voie alimentaire avec un régime riche en isoflavones.

Les mécanismes de génotoxicité de la génistéine semblent être associés à une inhibition de l'ADN topoisomérase II (Efsa, 2015 ; SCCS, 2022), une enzyme qui catalyse la rupture et la jonction des deux brins d'ADN en présence d'ATP, relâchant ainsi la torsion de la super hélice ou en décaténant les molécules d'ADN double brins. L'ADN topoisomérase II est nécessaire à la séparation des molécules d'ADN filles après la réplication, mais aussi à la transcription, à la réplication, à la condensation/décondensation des chromosomes, à la ségrégation mitotique

et à la recombinaison de l'ADN. La génistéine se lie à l'ADN topoisomérase II en stabilisant le « complexe clivable » avec l'ADN, générant ainsi des cassures double brin (CDB) de l'ADN « dissimulées par les protéines » (Mizushima *et al.*, 2013 cité dans Efsa, 2015). Ce processus est connu pour conduire à l'induction d'aberrations chromosomiques par le biais d'un mécanisme à seuil.

3.5.2 Daïdzéine

Selon les données citées dans les rapports de l'Efsa de 2015 et du SCCS de 2022, la daïdzéine ne s'est pas révélée mutagène dans le test de mutation génique sur bactéries et aucun effet génotoxique n'a été observé sur des cellules de mammifères *in vitro*. Les références et les tests sont synthétisés en annexe 4.

- Test de mutation génique sur bactéries (2 études)

La daïdzéine a été testée dans plusieurs études par le test d'Ames sur des souches de *S. typhimurium* TA98, TA100 et TA1538, avec des résultats non concluants ou négatifs. Ces études ont été considérées négatives par le SCCS (Sugimura *et al.*, 1981 ; Bartholomew 1980 cités dans le SCCS 2022). Aucune de ces études n'a été réalisée conformément aux BPL.

- Tests *in vitro*

- Test d'aberrations chromosomiques et de micronoyau *in vitro* sur cellules de mammifères (6 études)

Plusieurs tests MN/CA *in vitro* sur la daïdzéine sont disponibles (Kulling *et al.*, 1997 ; Schmidtt *et al.*, 2003 ; Tsutsui *et al.*, 2003 ; Di Virgilio *et al.*, 2004 ; Lepri *et al.*, 2013). La daïdzéine a été testée sur des fibroblastes V79 de hamster chinois, avec un résultat positif. Dans une étude recherchant l'induction d'aberrations chromosomiques sur des cultures de cellules SHE, les résultats ont été négatifs. Dans une étude sur des cellules de lymphome de souris L5178Y tk^{+/-}, la daïdzéine a été testée, avec un résultat non concluant.

Deux études sur des fibroblastes V79 et sur des cellules d'hépatome de rat HTC ont montré des résultats non concluants (Lepri *et al.*, 2013, cité par SCCS, 2022).

Aucune de ces études n'était pleinement compatible avec la norme TG de l'OCDE en vigueur et n'a été réalisée conformément aux BPL.

- Test de mutation génique *in vitro* sur cellules de mammifères (10 études)

Plusieurs tests de mutation génique ont été réalisés sur des cellules de mammifères dans le locus Hprt sur des cellules V79, avec un résultat non concluant, et dans le locus Na⁺/K⁺-ATPase sur des cellules V79 et SHE primaires, avec un résultat positif.

- Test de dommages à l'ADN *in vitro* (6 études non BPL)

Plusieurs tests des comètes ou tests d'élution de l'ADN sur différents types de cellules ont été menés. Dans une étude sur cellules HT29 ± formamido-pyrimidine DNA glycosylase (FPG), la daïdzéine a été testée avec un résultat négatif. Trois études sur les lymphocytes et les spermatozoïdes ont donné des résultats positifs. La daïdzéine a été testée avec un résultat équivoque dans une étude sur les cellules MIA PaCa-2 et HT-29. Une étude sur l'élution alcaline de l'ADN dans les cellules V79 a donné un résultat négatif.

Aucune de ces études n'a été réalisée conformément aux BPL.

- Autres tests *in vitro* de génotoxicité (2 études)

La daïdzéine a été évaluée dans un test de transformation cellulaire (CTA) dans une étude donnant avec un résultat positif (cellules SHE). La formation d'adduits à l'ADN a également été testée par l'essai de post-marquage au ³²P dans une étude avec un résultat positif (cellules SHE).

Aucune des études n'a été menée conformément au statut BPL.

- Test *in vivo* de mutations géniques et autres test *in vivo* (8 études)

La daïdzéine a été testée dans un test des comètes chez la souris après administration orale, avec un résultat non concluant. Elle a également été testée dans un test d'échange de chromatides sœurs chez la souris après administration intrapéritonéale, avec un résultat positif.

3.5.3 Conclusion

En ce qui concerne la génistéine et la daïdzéine, le test de mutation génique sur cellules procaryotes (test d'Ames) est négatif. Cependant, d'autres test *in vitro*, considérant divers effets (cassures chromosomiques ou formation d'adduits) se sont révélés positifs pour ces deux composés. Enfin, les essais *in vivo* de mutagenèse ou de dommages à l'ADN (aberrations chromosomiques, micronoyaux) se sont révélés négatifs pour la génistéine, mais un test d'échange des chromatides sœurs est positif pour la daïdzéine et un test de dommage à l'ADN (test des comètes) est positif pour la génistéine dans un contexte sensibilisé (exposition au NaNO₂). Etant donné les éléments mécanistiques connus (interaction possible avec le complexe topoisomérase II/ADN), le potentiel génotoxique des isoflavones ne peut être exclu.

3.6 Cancérogénicité

3.6.1 Chez l'Homme

Les différents rapports de synthèse s'accordent sur l'existence de conclusions ambiguës s'agissant des études s'adressant aux liens entre l'exposition aux isoflavones et le risque de survenue de cancer (Afssa, 2005 ; Efsa, 2015 ; Anses, 2016 ; VKM, 2017 ; NCM, 2020 ; SCCS, 2022). Les études se sont intéressées principalement au risque de cancers hormono-dépendants, notamment du sein (chez la femme) du fait des propriétés œstrogéniques des isoflavones. Bien qu'un nombre conséquent d'études ont souligné des associations protectrices au regard de la survenue d'un cancer du sein, les résultats restent hétérogènes, notamment en fonction du statut ménopausique de la femme. Certaines études montrent des associations protectrices exclusivement chez la femme non-ménopausée ou exclusivement chez la femme ménopausée. D'autres études ne montrent aucune association quel que soit ce statut ou à l'inverse une augmentation de risque. Les travaux s'intéressant au cancer de la prostate, moins nombreux que ceux s'adressant au cancer du sein, aboutissent à des conclusions également divergentes. Pour d'autres localisations tumorales, endomètre, ovaire, testicule, thyroïde et colon, les données existantes sont insuffisantes et ne permettent pas de conclure sur la présence ou l'absence d'associations.

Plusieurs méta-analyses récentes (2021 à 2024) suggèrent une réduction de risque de survenue du cancer du sein (Shin *et al.*, 2023 ; Yang *et al.*, 2023 ; Liu *et al.*, 2022 ; Boutas *et al.*, 2022), du cancer du poumon chez les non-fumeurs (Chei *et al.*, 2022) et du cancer de

l'estomac chez les consommateurs de produits à base de soja non fermenté (Wang *et al.*, 2021). D'autres méta-analyses concluent à une augmentation de risque de survenue du cancer de l'estomac (Kim *et al.*, 2023) notamment chez les consommateurs de produits à base de soja fermenté (Wang *et al.*, 2021) et du cancer de la prostate (Liu *et al.*, 2022).

S'agissant des études publiées ces dernières années (2021 à 2024), une étude de cohorte prospective montre que l'apport alimentaire en phytoœstrogènes est associé à une diminution de risque de survenue de cancer de l'ovaire (Song *et al.*, 2024). Une autre étude de cohorte prospective a montré une absence d'association avec le risque de survenue de cancer du sein, qu'il s'agisse d'individu consommant des produits à base de soja fermenté ou pas (Shirabe *et al.*, 2021). Toutefois, cette même étude souligne un risque diminué de survenue d'un cancer du sein non localisé (métastasé) dans le cas d'une consommation élevée en produits fermentés (Shirabe *et al.*, 2021). A noter qu'une étude de cohorte prospective n'a pas montré d'association avec le risque de survenue de cancer du foie (Abe *et al.*, 2021). Des études cas-témoin en population générale ont montré une réduction de risque de survenue de cancer de l'œsophage (Sun *et al.*, 2021) et une réduction du cancer du sein mais seulement chez les femmes pré-ménopausées (Feng *et al.*, 2021). Une étude cas-témoin nichée au sein d'une cohorte prospective a montré une diminution de risque de survenue de cancer du poumon chez les non-fumeurs (Li *et al.*, 2022). Finalement, des études transversales ont montré des associations avec un excès de risque de cancers hormono-dépendants affectant le sein, l'endomètre et la prostate (Liu *et al.*, 2023 ; Lee *et al.*, 2022).

A noter que la majorité des études sur la cancérogénicité des isoflavones se sont basées sur des évaluations indirectes des expositions estimées par des questionnaires alimentaires rétrospectif. De ce fait les estimations peuvent être soumises à de nombreux biais (de mesure, de confusion, de mémoire). Quelques études se sont basées sur des mesurages ponctuels de l'exposition interne par dosage dans les urines d'une ou plusieurs isoflavones. Ces mesures ponctuelles (non répétées) peuvent également ne pas représenter un bon indicateur d'exposition tenant compte des courtes durées de demi-vie des isoflavones.

3.6.2 Chez l'animal

Dans une étude du NTP de 2008 décrite précédemment, des rats SD mâles et femelles ont été exposés à la génistéine pendant 2 ans, ont été observées une augmentation de l'incidence des adénomes et des adénocarcinomes (tumeurs combinées, $p = 0,037$) de la glande mammaire chez les rats femelles (génération F1C) à la dose de 500 ppm (16/40 vs 9/44 chez les témoins), mais pas aux doses de 5 ppm et 100 ppm. Les auteurs ont noté également des augmentations de l'incidence des adénomes seuls ($p = 0,004$) de l'hypophyse (Pars Distalis) à la dose de 500 ppm (38/47,9 vs 46/47,2 chez les témoins) et de celle de la combinaisons (adénomes et carcinomes, $p = 0,004$) de l'hypophyse (Pars Distalis) chez les rats femelles (génération F1C) à la dose de 500 ppm (38/47,9 vs 46/47,2 chez les témoins), mais pas à 5 ppm et 100 ppm. Il n'y a pas eu d'augmentation de l'incidence de tumeurs chez le rat mâle aux doses testées dans l'étude pour la génération F1C. Les observations ne montrent pas non plus d'augmentation de l'incidence de tumeurs pour les autres sites analysés.

3.7 Populations sensibles

Les isoflavones ont des effets bénéfiques ou délétères suivant les personnes concernées. Cela dépend, entre autres, de l'âge, du sexe, du statut ménopausal, de la période d'exposition et du statut tumoral (Hooper *et al.*, 2010 ; Efsa, 2015 ; Wei *et al.*, 2020 ; Lu *et al.*, 2022).

Compte tenu de la littérature, il est possible de définir les populations sensibles suivantes :

- les jeunes enfants, en particulier les petites filles, dont l'exposition précoce et prolongée aux isoflavones peut entraîner plus tard une puberté précoce (Testa *et al.*, 2018 ; Segovia-Siapco *et al.*, 2014),
- les femmes pré-ménopausées qui sont plus sensibles à l'effet proliférateur des isoflavones sur les cellules mammaires en raison de la densité des récepteurs aux œstrogènes. Celles-ci devraient limiter leur consommation de produits contenant des isoflavones (Petrakis *et al.*, 1996 ; McMichael-Phillips *et al.*, 1998 ; Hargreaves *et al.*, 1999 ; Ollberding *et al.*, 2012),
- les femmes ayant des cellules prolifératives de la glande mammaire sensibles aux œstrogènes. Celles-ci ont un risque accru de développer un cancer du sein suite à la consommation d'isoflavones, et devraient donc limiter leur consommation (Grace *et al.*, 2004 ; Shike *et al.*, 2014 ; Khan *et al.*, 2012 ; Allred *et al.*, 2001 ; Ju *et al.*, 2001).
- les femmes enceintes ne constituent pas une population sensible en tant que telle, mais au regard de certaines études expérimentales indiquant un effet délétère possible sur la descendance, elles peuvent être considérée comme une population sensible pour protéger les enfants à naître.

4 Recueil des valeurs toxicologiques de référence existantes pour le long terme par voie orale et limite d'apport

- VTR

En 2015, l'Efsa a conduit une évaluation des risques sanitaires pour les femmes (péri)ménopausées en se focalisant sur 3 organes cibles (glandes mammaires, utérus et thyroïde) (Efsa, 2015). L'Efsa n'a pris en compte que les études humaines conduites chez des femmes (péri)ménopausées ou les études animales sur des animaux ovariectomisés. En évaluant les effets des isoflavones sur ces trois organes cibles, l'Efsa a conclu qu'il n'était pas possible d'extrapoler directement les observations d'un organe aux autres, au regard des différences de fonctions, de la densité des récepteurs, des proportions de récepteurs aux œstrogènes α et β et des effets de l'activation des récepteurs. L'Efsa n'a pas pu dériver de VTR ou de limite maximale d'apport pour les compléments alimentaires contenant des isoflavones, en l'absence de preuve d'effet néfaste sur la glande mammaire, l'utérus et la thyroïde et de preuves limitées pour le cancer du sein. L'Efsa précise que les conclusions de son évaluation ne peuvent pas être extrapolées à d'autres groupes de population et d'autres situations dans la population générale.

En 2016, bien qu'aucune VTR n'ait été établie pour les isoflavones, l'Anses a calculé dans le cadre de l'EAT infantile, à titre indicatif et pour la génistéine uniquement, des marges d'exposition au regard d'un LOAEL de $35 \text{ mg.kg pc}^{-1}.\text{j}^{-1}$, issu d'une étude multigénérationnelle réalisée par le national center for toxicological research (NCTR) en 2005 sur des rats SD. Cette étude a montré que la génistéine exerçait des effets reprotoxiques de type œstrogénique ou anti-androgénique chez le rat. Cette étude (NCTR 2005 citée dans Rozman *et al.*, 2006), évaluée par le NTP-CERHR (national toxicological program- center for the evaluation of risks to human reproduction), a permis d'identifier un LOAEL de $35 \text{ mg.kg pc}^{-1}.\text{j}^{-1}$ chez les nouveau-nés mâles (descente testiculaire plus tardive, diminution de la distance anogénitale) et $44 \text{ mg.kg pc}^{-1}.\text{j}^{-1}$ chez les nouveau-nés femelles (diminution de la DAG, de cycles anormaux, d'une précocité dans la maturation sexuelle). Ce LOAEL ne prend en compte que les effets reprotoxiques et développementaux observés au cours de l'étude multi-génération et devrait être revu à la lumière des données plus précises si celles-ci sont disponibles et validées. A titre provisoire, une marge d'exposition critique de 300 a été retenue : 10 pour prendre en compte la variabilité inter-espèces, 10 pour la variabilité interindividuelle et 3 car le point de départ est un LOAEL, conduisant à une limite maximale d'apport recommandée de $0,117 \text{ mg.kg pc}^{-1}.\text{j}^{-1}$ pour les enfants de moins de 3 ans (Anses, 2016).

En 2020, le Nordic Council of Ministers (NCM) a élaboré deux VTR, nommées HBGV (health-based guidance value), pour la génistéine de $0,09 \text{ mg.kg pc}^{-1}.\text{j}^{-1}$ pour les femmes enceintes à partir de l'étude du NTP de 2008 et de $0,07 \text{ mg.kg pc}^{-1}.\text{j}^{-1}$ pour les enfants de plus de 3 ans en s'appuyant sur l'étude de Li *et al.* de 2014 (cf. chapitre 3.3).

Le Nordic Council of Ministers n'a pas identifié d'effet critique pour les isoflavones chez les enfants ou les femmes enceintes à partir d'études épidémiologiques parmi les effets considérés : âge au début de la puberté, cancer du sein, hypospadias et fonction thyroïdienne.

Le NCM a considéré possible de dériver une HBGV pour la génistéine sur la base de doses internes de génistéine associées à des effets néfastes chez les rats adultes et les petits. Pour ce faire, il serait nécessaire de disposer des niveaux sanguins chez l'adulte et l'enfant suivant un régime alimentaire contenant du soja et de comparer la toxicocinétique entre l'Homme et les rats, ce qui n'entraîne pas dans le périmètre de l'expertise du NCM.

Ainsi, ces HBGV ont été établies sur la base de données expérimentales. Deux études ont été considérées pertinentes pour la dérivation d'HBGV :

- pour les enfants et les fœtus : L'étude multigénération du NTP de 2008 qui met en évidence des effets sur le développement chez des rats exposés jusqu'à 500 ppm de génistéine (LOAEL) et un NOAEL de 100 ppm ($8,9 \text{ mg.kg pc}^{-1}.\text{j}^{-1}$) ;
- pour les enfants : l'étude de Li *et al.* de 2014 dans laquelle un avancement de l'âge pubertaire a été observée chez des souris ($n = 35$) exposées dès le sevrage à 100 et 500 ppm de génistéine et des modifications du développement mammaire et ovarien chez un plus faible nombre de souris ($n = 6-10/\text{groupe}/\text{âge}$). Un LOAEL de 100 ppm ($10 \text{ mg.kg pc}^{-1}.\text{j}^{-1}$) et un NOAEL de 5 ppm ($0,5 \text{ mg.kg pc}^{-1}.\text{j}^{-1}$) ont ainsi été identifiés.

Sur la base de ces 2 études, le Nordic Council of Ministers a retenu un LOAEL de 100 ppm ($10 \text{ mg.kg pc}^{-1}.\text{j}^{-1}$) pour dériver une HBGV pour les enfants plutôt que le NOAEL de 5 ppm ($0,5 \text{ mg.kg pc}^{-1}.\text{j}^{-1}$) issu de l'étude de Li *et al.* 2014, considérant que cette étude présente un intervalle important entre les doses et qu'en conséquence le NOAEL serait trop conservateur. Après application d'un facteur de conversion de 0,2 recommandé par l'Efsa pour les expositions subaiguës des souris⁸ (Efsa, 2012), le LOAEL est estimé à $20 \text{ mg.kg pc}^{-1}.\text{j}^{-1}$. Des facteurs d'incertitude de 10 pour la variabilité inter-espèces (FI_A), 10 pour la variabilité interindividuelle (FI_H) et de 3 pour l'utilisation d'un LOAEL ($FI_{L/B}$) ont été appliqués pour aboutir à une HBGV de $0,07 \text{ mg.kg pc}^{-1}.\text{j}^{-1}$ pour les enfants (correspondant à $2,1 \text{ mg.j}^{-1}$ de génistéine chez un enfant de 30 kg).

Pour les femmes enceintes, le Nordic Council of Ministers a retenu un NOAEL de 100 ppm issue de l'étude multigénérationnelle du NTP 2008, correspondant à une dose de $8,9 \text{ mg.kg pc}^{-1}.\text{j}^{-1}$ chez les femelles non allaitantes. Un facteur d'incertitude de 100 par défaut (FI_A et FI_H) aboutissant à une valeur de $0,09 \text{ mg.kg pc}^{-1}.\text{j}^{-1}$ ($6,3 \text{ mg.j}^{-1}$ de génistéine pour une personne de 70 kg).

A noter qu'il n'a pas été possible de proposer une HBGV sur la base des données expérimentales pour un mélange des composants du soja.

⁸ Pour les études chez la souris, l'Efsa a déterminé un facteur 0,2 pour convertir les concentrations de agents chimiques dans les aliments (mg.kg^{-1}) en doses journalières ($\text{mg.kg pc}^{-1}.\text{j}^{-1}$). Celui-ci a été calculé à partir d'études à long terme chez des souris exposées *via* l'alimentation, en utilisant les données de consommation hebdomadaire moyenne d'aliments du groupe témoin et celles sur le poids corporel moyen du groupe témoin provenant de 38 études chroniques chez la souris.

Tableau 7 : HBGV pour la génistéine élaborées par le Nordic Council of Ministers

VR	Organisme	Nordic Council of Ministers	
	Année	2020	
	Nom	HBGV	
	Valeur	0,09 mg.kg pc⁻¹.j⁻¹	0,07 mg.kg pc⁻¹.j⁻¹
Population cible	femmes enceintes	enfants de plus de 3 ans	
Effet critique	Effets sur le développement		Avancement de l'âge pubertaire
Étude clé	Référence	NTP (2008)	Li <i>et al.</i> , 2014
	Espèce	Rats Sprague-Dawley	Souris C57BL/6J
	Exposition (durée, voie)	Multigénération (3 générations) Voie orale	de PND21 à l'âge de 5, 6, 7 ou 10 semaines Voie orale (alimentation)
Point de départ (PoD)	NOAEL = 100 ppm = 8,9 mg.kg pc ⁻¹ .j ⁻¹ *	LOAEL = 100 ppm = 20 mg.kg pc ⁻¹ .j ⁻¹ *	
Ajustement temporel	/	/	
Ajustement allométrique	/	/	
Facteurs d'incertitude (FI)	100 (FI _A : 10 ; FI _H : 10)	300 (FI _A : 10 ; FI _H : 10 ; FI _{LB} : 3)	

* utilisation d'un facteur de conversion recommandé par l'Efsa de 0,2 pour les expositions subaiguës chez les souris. Ainsi, 1 mg.kg⁻¹ dans l'alimentation correspond à 0,2 mg.kg pc⁻¹.j⁻¹.

• Limites d'apport en phytoœstrogènes

Plusieurs pays ont proposé des limites maximales d'apport de phytoœstrogènes dont certaines fondées sur des données sur la génistéine incluant les autorités italiennes en 2002, l'Afssa⁹ en 2005, la Japanese Food Safety Commission en 2006 et le comité scientifique norvégien pour la sécurité alimentaire (VKM) en 2017.

En 2002, les autorités sanitaires italiennes ont conseillé au grand public (sans limitation spécifique d'âge ou de stade de vie) de maintenir l'apport quotidien en phytoœstrogènes sous forme de compléments alimentaires à moins de 80 mg.j⁻¹, exprimés comme la quantité totale d'isoflavones (daidzine, glycitine, genistine, 6"-O-acetyldaidzine, 6"-O-acetylglcytine, 6"-O-acetylgenistine, 6"-O-malonyldaidzine, 6"-O-malonylglcytine, 6"-O-malonylgenistine, daidzeine, et genisteine) (Gazzetta Ufficiale Italiana 18/7/(2002), number 188, annex 2 citée dans Morandi *et al.*, 2005). Cela représente un apport quotidien maximal en phytoœstrogènes d'environ 1 mg.kg pc⁻¹.j⁻¹ chez un adulte de 70 kg. Ce choix a été motivé par l'utilisation croissante de compléments alimentaires par les femmes pour leurs effets bénéfiques supposés pendant la ménopause (Morandi *et al.*, 2005).

En 2005, l'Afssa a proposé qu'une limite maximale d'apport de 1 mg.kg pc⁻¹.j⁻¹ d'isoflavones en équivalent aglycones (Afssa 2005).

En 2006, la Japanese Food Safety Commission a fixé des limites d'apports alimentaires pour les denrées alimentaires destinées à un usage médical spécifique et contenant des isoflavones de soja en tant qu'ingrédient ayant des effets bénéfiques supposés sur la santé pour différentes populations :

- pour les adultes (femmes et hommes), un apport alimentaire de 70-75 mg.j⁻¹ d'isoflavones de soja a été déterminé comme la limite supérieure d'un apport quotidien sur la base du 95^{ème} percentile de l'apport alimentaire en isoflavones issues de produits alimentaires à base de soja au Japon (64-76 mg.j⁻¹ équivalent aglycone, femmes pré-ménopausées : 64 mg.j⁻¹, femmes ménopausées : 74 mg.j⁻¹, hommes : 76 mg.j⁻¹) et

⁹ Agence française de sécurité sanitaire des aliments, devenu l'Anses en 2010.

considérant que la moitié de la dose d'isoflavones administrée pendant 5 ans (75 mg.j^{-1}) dans une étude randomisée en double aveugle à des femmes ménopausées était une limite sûre (LOAEL = 150 mg.j^{-1} - hyperplasie de l'endomètre) (Unfer *et al.*, 2004 cité dans Japanese Food Safety Commission, 2006) ;

- pour les femmes enceintes ou susceptibles de l'être, au regard de la protection du fœtus, il n'a pas été possible de recommander de limite d'apport alimentaire en tant qu'aliment destiné à un usage médical spécifique, en plus de l'apport par les aliments standard. Cela repose sur le fait qu'il n'existe aucun avantage connu lié à la consommation d'isoflavones de soja par les femmes enceintes et que les isoflavones de soja peuvent inhiber la topoisomérase II et potentiellement provoquer une anomalie du gène MLL (favorisant le développement de leucémie myéloïde-lymphoïde) chez les fœtus exposés *in utero* ;
- pour les nourrissons et les enfants en bas âge, il n'a pas été possible de recommander de limite d'apport sur la base de données suggérant des effets sur la reproduction chez des animaux nouveau-nés et immatures exposés à des concentrations élevées d'isoflavones de soja et des effets médiés par les œstrogènes (Japanese Food Safety Commission, 2006).

En 2017, dans le cadre d'une évaluation de risques sur les isoflavones de soja, le VKM a évalué les risques de la consommation de 40 ou 80 mg.j^{-1} d'isoflavones de soja ajoutées à des compléments alimentaires et à d'autres aliments pour différentes populations. Pour les enfants de 10 à 13 ans inclus, les données étaient insuffisantes pour tirer des conclusions sur les effets indésirables potentiels des isoflavones dans les compléments alimentaires. Une consommation de 40 ou 80 mg.j^{-1} d'isoflavones sous forme de compléments alimentaires pendant un à trois mois, chez les adolescents des deux sexes (14 à 17 ans inclus), peut entraîner un risque d'effets indésirables sur les niveaux d'hormones, y compris sur la fonction menstruelle chez les filles. Ces doses d'isoflavones ne semblent pas entraîner d'autres effets indésirables significatifs chez les adolescents (VKM, 2017). Chez les hommes, le VKM conclut que les isoflavones en tant que compléments alimentaires à des doses de 40 ou 80 mg.j^{-1} prises pendant un à trois mois peuvent présenter un risque d'effets néfastes sur les niveaux d'hormones. Ces doses ne semblent pas avoir d'autres effets négatifs significatifs pour cette population (VKM, 2017). Chez les femmes en âge de procréer, la consommation de 40 ou 80 mg.j^{-1} d'isoflavones en tant que compléments alimentaires pendant un à trois mois peut entraîner des effets néfastes sur les niveaux d'hormones et/ou la fonction menstruelle. Ces doses ne semblent pas entraîner d'autres effets néfastes significatifs chez les femmes pré-ménopausées (VKM, 2017). Chez les femmes (péri)ménopausées, ces doses d'isoflavones en tant que compléments alimentaires pendant plusieurs mois et jusqu'à plusieurs années ne semblent pas entraîner d'effet néfaste (VKM, 2017).

5 Proposition de VTR long terme par voie orale pour la population générale

5.1 Choix de l'effet critique

L'étude du NTP de 2008 a montré que les effets transposables à l'Homme suite à une exposition long terme et apparaissant à la plus faible dose chez les rats mâles se limitaient à la glande mammaire avec une augmentation de l'incidence de l'hyperplasie alvéolaire et canalaire de la glande mammaire (NTP, 2008). Le schéma d'induction de l'hyperplasie d'une génération à l'autre, avec des effets les plus forts observés dans les groupes de 100 et 500 ppm des générations F1 et F2 exposées en continu, indique que les expositions au cours du développement et après le sevrage contribuent à cet effet. L'exposition tardive à la puberté et à l'âge adulte, comme dans la génération F0, a produit des effets moindres.

Ainsi, le CES retient l'augmentation de l'incidence de l'hyperplasie alvéolaire et canalaire de la glande mammaire chez le rat mâle comme effet critique.

5.2 Analyse des VTR long terme existantes

En l'absence de VTR pour la population générale, les experts du CES proposent de construire une VTR pour cette population cible.

5.3 Construction de la VTR pour la population générale

5.3.1 Choix de l'étude clé

Parmi les études disponibles chez l'animal, l'étude de reproduction et de développement sur plusieurs générations du NTP est une étude approfondie en termes de durée, de nombre d'animaux et d'observations pathologiques, suite à une exposition long terme à la génistéine.

Ainsi, l'étude du NTP, 2008 (NTP, 2008) est retenue comme étude clé.

5.3.2 Choix du point de départ

Dans l'étude clé retenue des rats NCTR CD mâles et femelles (pour les générations F0, F1, F2, F3 et F4) ont été exposés à de la génistéine *via* l'alimentation administré aux doses de 0, 5, 100 et 500ppm pendant 98 jours (génération F0), 161 jours (générations F1 à F4) ou 42 jours (génération F5). Vingt-cinq rats par sexe de chaque génération (F0 à F4) ont été sélectionnés au hasard pour des études vie-entière et programmés pour nécropsie le jour postnatal 140 (PND140).

Dans cette étude, l'exposition des rats mâles de la génération F0 a montré une augmentation de l'incidence d'hyperplasie alvéolaire et canalaire de la glande mammaire à la dose de 500 ppm (28,9 mg.kg pc⁻¹.j⁻¹). Ceci a permis d'identifier la dose de 100 ppm (5,9 mg.kg pc⁻¹.j⁻¹) comme étant un NOAEL qui a été retenu comme point de départ.

5.3.3 Ajustement allométrique

Pour réduire l'incertitude sur la variabilité inter-espèces, un ajustement allométrique a été réalisé. Une dose équivalente humaine (HED = Human Equivalent Dose) est calculée à l'aide de l'équation suivante¹⁰ :

$$\text{Dose équivalente Homme} = \text{Dose animal} \times \left(\frac{\text{Poids animal}}{\text{Poids homme}} \right)^{1/4}$$

Le poids moyen des rats est de 0,426 kg. Celui utilisé pour l'Homme pour le calcul est de 70 kg.

Soit une dose critique $\text{NOAEL}_{\text{HED}} = 5,9 * (0,426/70)^{0,25} = 1,65 \text{ mg.kg pc}^{-1}.\text{j}^{-1}$

Le $\text{NOAEL}_{\text{HED}}$ de 1,65 mg.kg pc⁻¹.j⁻¹ est retenue comme point de départ.

5.3.4 Choix des facteurs d'incertitude

Le calcul de la VTR à partir de l'étude du NTP de 2008 a été effectué à l'aide des facteurs d'incertitude (FI) suivants (Anses, à paraître) :

- Variabilité inter-espèces (FI_A) : 2,5

L'ajustement dosimétrique réalisé a permis de calculer une dose équivalente humaine (HED), à l'aide de l'équation précédente. Pour tenir compte de la composante toxicodynamique, un facteur d'incertitude supplémentaire a été fixé à 2,5 selon les recommandations de l'Anses.

- Variabilité interindividuelle (FI_H) : 10

Aucune donnée scientifique permettant de réduire la valeur par défaut n'étant disponible, la valeur de 10 est utilisée.

- Transposition subchronique à chronique (FI_S) : $\sqrt{10}$

Dans cette étude, les animaux mâles de la génération F0 sont exposés de PND42 jusqu'à PND140. Cette période d'exposition de 98 jours correspondant à une durée subchronique, le FI_S est de $\sqrt{10}$.

- Utilisation d'un point de départ (FI_{B/L}) : 1

Le PoD étant un NOAEL, le FI_{B/L} est de 1.

- Insuffisance des données (FI_D) : 1

De multiples études de la toxicité de la génistéine étant disponibles, la valeur retenue pour ce facteur est de 1.

Un facteur d'incertitude global de 79 est donc utilisé pour la construction de la VTR.

5.3.5 Proposition de VTR long terme par voie orale et niveau de confiance

$$\text{VTR} = \text{NOAL}_{\text{HED}}/\text{FI} = 1,65 \text{ mg.kg pc}^{-1}.\text{j}^{-1} / 79 = 0,02 \text{ mg.kg pc}^{-1}.\text{j}^{-1}$$

¹⁰ Cette équation est issue des recommandations de l'US EPA (US EPA, 2006).

Un **niveau de confiance global moyen** (note de 3/5) a été attribué grâce à un outil établi par l'Anses en se fondant sur (Annexe 4) :

- la nature et la qualité dans le corpus de données (note de 5/5) : nombreuses études disponibles tant animales que humaines sur les isoflavones, et la génistéine en particulier,
- le choix de l'effet critique et le mode d'action (note de 3,3/5) : les jeunes garçons semblent moins sensibles que les jeunes filles aux effets œstrogéniques des isoflavones, bien que les études ne soient pas toutes convergentes. Il y a peu de cas publiés de gynécomastie liée à une consommation élevée en soja chez l'homme adulte ou chez les garçons. On note également des différences de métabolisation des isoflavones entre le rongeur et l'Homme,
- le choix de l'étude clé (note de 5/5) : l'étude du NTP de 2008 est de bonne qualité avec plusieurs doses testées sur plusieurs générations et couvre une durée d'exposition suffisante,
- le choix du point de départ (note de 3/5) : cette étude a permis d'identifier un couple NOAEL/LOAEL,
- le niveau de confiance dans le choix des facteurs d'incertitude (note de 1/5) : aucune donnée humaine ne permet de réduire la valeur du FI_H.

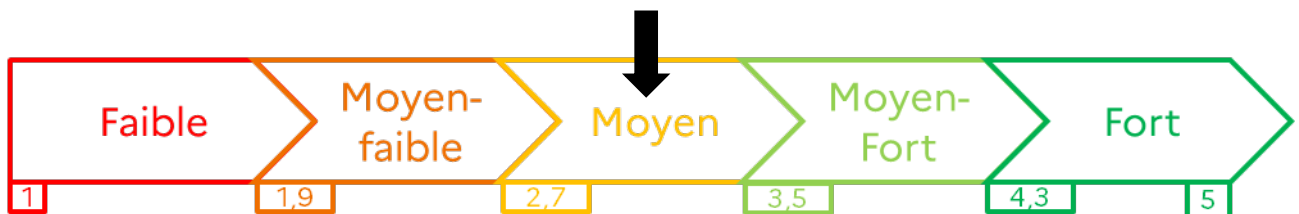


Figure 7 : Niveau de confiance de la VTR long terme par voie orale pour la population générale

6 Proposition de VTR long terme par voie orale pour la femme enceinte (enfants à naître), la femme en âge de procréer et les enfants pré-pubères.

6.1 Choix de l'effet critique

Plusieurs études réalisées chez les rongeurs montrent des effets sur la reproduction (Nagao *et al.*, 2001 ; NTP, 2008 ; Caceres *et al.*, 2020 ; Oliviera *et al.*, 2022, DelForno *et al.*, 2022 ; Abo Elsoud *et al.*, 2019 ; Eustache *et al.*, 2020 et 2009 ; Marraudino *et al.*, 2020).

Parmi les effets identifiés, sont identifiés un retard pubertaire chez le rat mâle, une diminution de l'âge de l'ouverture vaginale, une augmentation de la durée des cycles œstraux et une augmentation du développement des glandes mammaires chez la souris femelle, une hyperplasie alvéolaire et canalaire de la glande mammaire chez les mâles, des effets fonctionnels sur la fertilité (diminution de l'index de fertilité) chez les femelles, une diminution des poids relatifs des épидидymes chez les rats mâles exposés *in utero* et après la naissance et une diminution statistiquement significative de la taille des portées (résultats de l'accouplement des rats mâles de la génération F1 accouplés avec des femelles non exposées). Parmi ceux-ci, une diminution du poids relatif des épидидymes chez les rats mâles et une diminution statistiquement significative de la taille des portées ont été observés aux doses les plus faibles identifiées dans les études jugées de bonne qualité pour tous effets confondus.

Ainsi, le CES retient l'ensemble des effets sur la reproduction (diminution du poids relatif des épидидymes chez les rats mâles et une diminution statistiquement significative de la taille des portées) comme effets critiques.

6.2 Analyse des VTR long terme existantes

Dans le rapport du NCM en 2020, deux VTR de 0,09 et de 0,07 mg.kg pc⁻¹.j⁻¹ ont été élaborées et sont fondées, respectivement, sur des effets développementaux observés chez le rat femelle (NTP, 2008) et des effets de puberté précoce chez la souris femelle (Li *et al.*, 2014). Ces deux VTR ne sont pas retenues par le CES, qui considère que les données issues d'autres études permettent d'identifier d'autres effets critiques avec des PoD plus faibles. Concernant l'étude de Li *et al.*, bien qu'elle soit de bonne qualité méthodologique, aucun élément dans l'étude ne permet de recalculer et de confirmer les doses d'exposition des animaux exprimées en mg.kg pc⁻¹.j⁻¹. Cette incertitude ne permet pas de retenir cette VTR.

Ainsi, compte tenu de ces limites, le CES ne retient pas les VTR existantes et propose de construire une VTR long terme par voie orale.

6.3 Construction de la VTR

6.3.1 Choix de l'étude clé

Eustache *et al.* ont exposé quotidiennement par gavage à des doses de génistéine de 1 et 10 mg.kg pc⁻¹.j⁻¹ des rates gestantes de souche Wistar han, de GD1 jusqu'à PND21 (sevrage). Les rats étaient ensuite exposés quotidiennement par gavage jusqu'à PND80. Les mâles de cette génération F1, ont ensuite été accouplés avec des femelles non exposées. Cette étude rapporte une diminution du poids relatif des épидидymes chez les rats mâles exposés *in utero* et après la naissance et une diminution statistiquement significative de la taille des portées (résultats de l'accouplement des rats mâles de la génération F1 accouplés avec des femelles non exposées). Ces effets sont considérés comme néfastes et transposables à l'Homme. Ceux-ci ont été observés aux doses les plus faibles identifiées dans les études jugées de bonne qualité tous effets confondus.

Ainsi, l'étude de Eustache *et al.* de 2009, jugée de bonne qualité, est retenue comme étude clé.

6.3.2 Choix du point de départ

Dans l'étude clé retenue (Eustache *et al.*, 2009), les effets développementaux sur la descendance exposée *in utero* et en postnatal sont ceux qui apparaissent à la dose la plus faible. **Ainsi, le CES retient comme point de départ un LOAEL de 1 mg.kg pc⁻¹.j⁻¹ associé à une diminution du poids relatif des épидидymes chez les rats mâles exposés *in utero* et après la naissance et une diminution statistiquement significative de la taille des portées issues de l'accouplement des mâles de la génération F1 et des femelles non exposées.**

6.3.3 Ajustement allométrique

Pour réduire l'incertitude sur la variabilité inter-espèces, un ajustement allométrique est réalisé. Une dose équivalente humaine (HED) est calculée à l'aide de l'équation suivante¹¹ :

$$\text{Dose équivalente Homme} = \text{Dose animal} \times \left(\frac{\text{Poids animal}}{\text{Poids homme}} \right)^{1/4}$$

en utilisant le poids moyen des rats est de 0,25 kg et de 70 kg pour l'Homme.

Soit $\text{LOAEL}_{\text{HED}} = 1 \times (0,25/70)^{0,25} = 0,24 \text{ mg.kg pc}^{-1}.\text{j}^{-1}$

Le LOAEL_{HED} de 0,24 mg.kg pc⁻¹.j⁻¹ est retenu comme PoD.

6.3.4 Choix des facteurs d'incertitude

Le calcul de la VTR à partir de l'étude de Eustache *et al.* de 2009 a été effectué à l'aide des facteurs d'incertitude (FI) suivants (Anses, à paraître) :

- Variabilité inter-espèces (FI_A) : 2,5

¹¹ Cette équation est issue des recommandations de l'US EPA (US EPA, 2006).

L'ajustement dosimétrique a permis de calculer une dose équivalente humaine, à l'aide de l'équation précédente. Pour tenir compte de la composante toxicodynamique, un facteur d'incertitude supplémentaire a été fixé à 2,5 selon les recommandations de l'Anses.

- Variabilité interindividuelle (FI_H) : $\sqrt{10}$

La valeur de $\sqrt{10}$ est utilisée la VTR étant déjà élaborée pour une population sensible.

- Transposition subchronique à chronique (FI_S) : 1

Les effets critiques résultant d'une exposition *in utero*, la valeur de 1 est retenue.

- Utilisation d'un point de départ ($FI_{B/L}$) : $\sqrt{10}$

Le PoD utilisé étant un LOAEL, la valeur de $\sqrt{10}$ est retenue.

- Insuffisance des données (FI_D) : 1

De multiples études de la toxicité de la génistéine étant disponibles, la valeur retenue pour ce facteur est de 1.

Un facteur d'incertitude global de 25 est donc utilisé pour la construction de la VTR.

6.3.5 Proposition de VTR long terme par voie orale et niveau de confiance

$$VTR = LOAEL_{HED}/FI = 0,24 \text{ mg.kg pc}^{-1}.\text{j}^{-1} / 25 = \mathbf{0,01 \text{ mg.kg pc}^{-1}.\text{j}^{-1}}$$

Le **niveau de confiance global moyen** (2,8/5) a été attribué grâce à un outil établi par l'Anses en se fondant sur (Annexe 5) :

- la nature et la qualité dans le corpus de données (note de 4/5) : nombreuses études disponibles tant animales que humaines sur les isoflavones, et la génistéine en particulier,
- le choix de l'effet critique et le mode d'action (note de 4/5) : les effets des isoflavones sur l'appareil reproducteur masculin sont décrits dans de nombreuses publications. Néanmoins, il manque des données humaines,
- le choix de l'étude clé (note de 4,7/5) : L'étude de Eustache *et al.* de 2009, jugée de bonne qualité, couvre une durée d'exposition suffisante et une voie d'exposition adéquate mais ne comporte que deux doses,
- le choix du point de départ (note de 1/5) : cette étude permet d'identifier un LOAEL,
- le choix des facteurs d'incertitude (note de 3/5) : la littérature est suffisamment abondante sur ces populations sensibles pour réduire le FI_H .

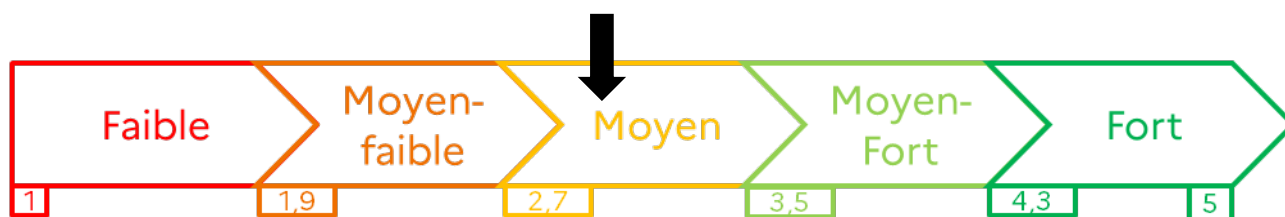


Figure 8 : Niveau de confiance pour la VTR long terme par voie orale pour la femme enceinte (enfants à naître), la femme en âge de procréer et les enfants pré-pubères

7 Conclusion et recommandations du CES

Deux VTR long terme par voie orale ont été élaborées pour la génistéine :

- une pour la population générale,
- une pour la femme enceinte (enfant à naître), la femme en âge de procréer et les enfants pré-pubères.

Bien que le calcul de ces VTR soit fondé sur les données propres aux effets de la génistéine, elles peuvent être étendues à la somme des isoflavones exprimée en $\text{mg.kg pc}^{-1}.\text{j}^{-1}$ d'équivalent aglycone (libres ou conjugués).

La VTR long terme par la voie orale pour la population générale est fondée sur l'augmentation de l'incidence de l'hyperplasie alvéolaire et canalaire de la glande mammaire chez le rat mâle. Un niveau de confiance moyen a été attribué à cette VTR.

La VTR long terme par voie orale pour la femme enceinte (enfant à naître), la femme en âge de procréer et les enfants pré-pubères est fondée sur une diminution du poids relatif des épидидymes chez les rats mâles exposés *in utero* et après la naissance et une diminution statistiquement significative de la taille des portées issues de l'accouplement des mâles de la génération F1 et de femelles non exposées. Un niveau de confiance moyen a été attribué à cette VTR.

Tableau 8 : VTR long terme par voie orale pour la génistéine pour la population générale et pour la femme enceinte (enfant à naître), la femme en âge de procréer et les enfants pré-pubère

VR	Organisme	Anses	
	Année	2024	
	Nom	VTR long terme par voie orale	
	Valeur	0,02 mg.kg pc ⁻¹ .j ⁻¹	0,01 mg.kg pc ⁻¹ .j ⁻¹
Population cible		Population générale	Femme enceinte (enfant à naître), femme en âge de procréer et les enfants pré-pubères
Effet critique		Augmentation de l'incidence de l'hyperplasie alvéolaire et canalaire de la glande mammaire chez les rats mâles de la génération F0	Diminution du poids relatif des épидидymes chez les rats mâles et diminution de la taille des portées
Étude clé	Référence	NTP, 2008	Eustache <i>et al.</i> , 2009
	Espèce	Rat NCTR CD (Sprague-Dawley)	Rats wistar han
	Exposition (durée, voie)	De PND42 à PND140 (F0)	De la gestation jusqu'au jour postnatal 80.
Point de départ (PoD)		NOAEL = 5,9 mg.kg pc ⁻¹ .j ⁻¹	LOAEL = 1 mg.kg pc ⁻¹ .j ⁻¹
Ajustement temporel		Aucun	Aucun
Ajustement allométrique		NOAEL _{HED} = 1,65 mg.kg pc ⁻¹ .j ⁻¹	LOAEL _{HED} = 0,24 mg.kg pc ⁻¹ .j ⁻¹
Facteurs d'incertitude (FI)		79 FI _{A-TD} : 2,5 FI _H : 10 FI _L : 1 FI _S : $\sqrt{10}$ FI _D : 1	25 FI _{A-TD} : 2,5 FI _H : $\sqrt{10}$ FI _L : $\sqrt{10}$ FI _S : 1 FI _D : 1
Niveau de confiance		Moyen	Moyen

PND : jour post-natal, NOAEL : No Observed Adverse Effect Level (= dose maximale n'entraînant pas d'effet néfaste observé), LOAEL : Lowest Observed Adverse Effect Level (= dose minimale entraînant un effet néfaste observé), HED : Human Equivalent Dose, FI_{A-TD} : Composante toxicodynamique du facteur d'incertitude inter-espèces, FI_H : Facteur d'incertitude intra-espèce ou interindividuel, FI_{B/L} : Facteur d'incertitude lié au point de départ, FI_S : Facteur d'incertitude lié à la durée de l'étude clé, FI_D : Facteur d'incertitude lié à l'insuffisance de données.

Recommandations

Selon les études expérimentales, tant *in vitro* qu'*in vivo*, le potentiel œstrogénique de la génistéine est supérieur à celui de la daïdzéine. Cependant, la daïdzéine est transformée en équol par le microbiote intestinal, et le potentiel œstrogénique de ce dernier est voisin de celui de la génistéine (Shor et al., 2012). Ainsi, pour les personnes productrices d'équol, la génistéine et la daïdzéine exercent finalement un effet œstrogénique d'intensité comparable. Compte tenu de ces équivalences et du fait que les données toxicologiques *in vivo* en lien avec une perturbation endocrinienne sont quasi exclusivement fournies sur des effets de la génistéine, le calcul de ces VTR soit fondé sur les données propres aux effets de la génistéine, elles peuvent être étendues à la somme des isoflavones exprimée en mg.kg pc⁻¹.j⁻¹ d'équivalent aglycone (libres ou conjuguées).

Il est important de garder à l'esprit que ces deux VTR proposées ont été déterminées en suivant la méthodologie validée pour des agents chimiques dont l'exposition entraîne des effets indésirables. Cependant, cette saisine s'adresse à une famille de composés naturellement présents dans l'alimentation, et pour lesquels il existe une grande quantité de données humaines testant leurs éventuels effets bénéfiques et non pas indésirables.

Date de validation du rapport d'expertise collective par le comité d'experts spécialisé : le 28/06/2024.

Maisons-Alfort, le

Au nom des experts du CES
« Valeurs sanitaires de
référence »,

M. Fabrice Michiels
Le président du CES

8 Bibliographie

- Abe, S. K., Sawada, N., Ishihara, J., Takachi, R., Mori, N., Yamaji, T., Shimazu, T., Goto, A., Iwasaki, M., Inoue, M., Tsugane, S., & JPHC Study Group. (2021). Comparison between the impact of fermented and unfermented soy intake on the risk of liver cancer: the JPHC Study. *European journal of nutrition*, 60(3), 1389–1401. <https://doi.org/10.1007/s00394-020-02335-9>.
- Adlercreutz, H., Gorbach, S. L., Goldin, B. R., Woods, M. N., Dwyer, J. T., & Hämäläinen, E. (1994). Estrogen metabolism and excretion in Oriental and Caucasian women. *Journal of the National Cancer Institute*, 86(14), 1076–1082. <https://doi.org/10.1093/jnci/86.14.1076>.
- Abo-Elsoud, M. A., Hashem, N. M., Nour El-Din, A. N. M., Kamel, K. I., & Hassan, G. A. (2019). Soybean isoflavone affects in rabbits: Effects on metabolism, antioxidant capacity, hormonal balance and reproductive performance. *Animal reproduction science*, 203, 52–60. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2019.02.007>.
- Afssa. (2005) . « Sécurité et bénéfices des phyto-estrogènes apportés par l'alimentation – Recommendations ». Maisons-Alfort : Anses.
- Aidoo, A., Bishop, M. E., Shelton, S. D., Lyn-Cook, L. E., Chen, T., & Manjanatha, M. G. (2005). Effects of daidzein, genistein, and 17beta-estradiol on 7,12-dimethylbenz[a]anthracene-induced mutagenicity and uterine dysplasia in ovariectomized rats. *Nutrition and cancer*, 53(1), 82–90. https://doi.org/10.1207/s15327914nc5301_10.
- Allred, C. D., Ju, Y. H., Allred, K. F., Chang, J., & Helferich, W. G. (2001). Dietary genistin stimulates growth of estrogen-dependent breast cancer tumors similar to that observed with genistein. *Carcinogenesis*, 22(10), 1667–1673. <https://doi.org/10.1093/carcin/22.10.1667>
- Anses. (2011). « Etude de l'Alimentation Française 2 (EAT2) - Tome 1 : Contaminants inorganiques, minéraux, polluants organiques persistants, mycotoxines, phytoestrogènes ». Saisine n°2006-SA-0361. Maisons-Alfort : Anses.
- Anses. (2016). « Étude de l'alimentation totale infantile (EATi) - Tome 2 – Partie 3 : Composés organiques ». Saisine n°2010-SA-0317. Maisons-Alfort : Anses.
- Anses. (A paraître). Guide d'élaboration et de choix des valeurs de référence. Saisine n°2020-SA-0019. Maisons-Alfort : Anses.
- Baechler, S. A., Soukup, S. T., Molzberger, A. F., Kulling, S. E., Diel, P., & Marko, D. (2016). Topoisomerase poisoning by genistein in the intestine of rats. *Toxicology letters*, 243, 88–97. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2015.12.009>.
- Boonpawa, R., Spenkeliink, A., Punt, A., & Rietjens, I. M. C. M. (2017). In vitro-in silico-based analysis of the dose-dependent in vivo oestrogenicity of the soy phytoestrogen genistein in humans. *British journal of pharmacology*, 174(16), 2739–2757. <https://doi.org/10.1111/bph.13900>.
- Bustamante-Rangel, M., Delgado-Zamarreño, M. M., Pérez-Martín, L., Rodríguez-Gonzalo, E., & Domínguez-Álvarez, J. (2018). Analysis of Isoflavones in Foods. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, 17(2), 391–411. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12325>.
- Caceres, S., Silvan, G., Martínez-Fernandez, L., Illera, M. J., Millan, P., Monsalve, B., Peña, L., & Illera, J. C. (2014). The effects of isoflavones on androgens and glucocorticoids during

puberty on male Wistar rats. *Reproduction in domestic animals = Zuchthygiene*, 49(4), 611–617. <https://doi.org/10.1111/rda.12335>.

Caceres, S., Crespo, B., Alonso-Diez, A., de Andrés, P. J., Millan, P., Silván, G., Illera, M. J., & Illera, J. C. (2023). Long-Term Exposure to Isoflavones Alters the Hormonal Steroid Homeostasis-Impairing Reproductive Function in Adult Male Wistar Rats. *Nutrients*, 15(5), 1261. <https://doi.org/10.3390/nu15051261>.

Chang, H. C., Churchwell, M. I., Delclos, K. B., Newbold, R. R., & Doerge, D. R. (2000). Mass spectrometric determination of Genistein tissue distribution in diet-exposed Sprague-Dawley rats. *The Journal of nutrition*, 130(8), 1963–1970. <https://doi.org/10.1093/jn/130.8.1963>.

Chei, C. L., Sawada, N., Khankari, N. K., Iwasaki, M., Yamaji, T., Cai, H., Shimazu, T., Inoue, M., Shu, X. O., Zheng, W., & Tsugane, S. (2023). Isoflavone and soy food intake and risk of lung cancer in never smokers: report from prospective studies in Japan and China. *European journal of nutrition*, 62(1), 125–137. <https://doi.org/10.1007/s00394-022-02968-y>.

Chen, A. C., Berhow, M. A., Tappenden, K. A., & Donovan, S. M. (2005). Genistein inhibits intestinal cell proliferation in piglets. *Pediatric research*, 57(2), 192–200. <https://doi.org/10.1203/01.PDR.0000150723.87976.32>.

Cheng, G., Remer, T., Prinz-Langenohl, R., Blaszkewicz, M., Degen, G. H., & Buyken, A. E. (2010). Relation of isoflavones and fiber intake in childhood to the timing of puberty. *The American journal of clinical nutrition*, 92(3), 556–564. <https://doi.org/10.3945/ajcn.2010.29394>.

Chin, H. B., Kelly, A., Adgent, M. A., Patchel, S. A., James, K., Vesper, H. W., Botelho, J. C., Chandler, D. W., Zemel, B. S., Schall, J. I., Ford, E. G., Darge, K., Stallings, V. A., Baird, D. D., Rogan, W. J., & Umbach, D. M. (2021). Reproductive Hormone Concentrations and Associated Anatomical Responses: Does Soy Formula Affect Minipuberty in Boys? *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 106(9), 2635–2645. <https://doi.org/10.1210/clinem/dgab354>.

Coldham, N. G., & Sauer, M. J. (2000). Pharmacokinetics of [(14)C]Genistein in the rat: gender-related differences, potential mechanisms of biological action, and implications for human health. *Toxicology and applied pharmacology*, 164(2), 206–215. <https://doi.org/10.1006/taap.2000.8902>.

Coldham, N. G., Zhang, A. Q., Key, P., & Sauer, M. J. (2002). Absolute bioavailability of [14C] genistein in the rat; plasma pharmacokinetics of parent compound, genistein glucuronide and total radioactivity. *European journal of drug metabolism and pharmacokinetics*, 27(4), 249–258. <https://doi.org/10.1007/BF03192335>.

Çulcu, S., Akkaya, E., Aysan, E., Javadov, M., & Cumbul, A. (2022). Effects of soy-containing infant formulas on thyroid gland in rats. *Minerva pediatrica*, 74(5), 519–524. <https://doi.org/10.23736/S2724-5276.21.06221-6>.

D'Aloisio, A. A., DeRoo, L. A., Baird, D. D., Weinberg, C. R., & Sandler, D. P. (2013). Prenatal and infant exposures and age at menarche. *Epidemiology (Cambridge, Mass.)*, 24(2), 277–284. <https://doi.org/10.1097/EDE.0b013e31828062b7>.

Dal Forno, G. O., Oliveira, I. M., Cavallin, M. D., Santos, T. I. A., Sleiman, H. K., Falbo, M. K., Romano, M. A., & Romano, R. M. (2023). Peripubertal soy isoflavone consumption leads to subclinical hypothyroidism in male Wistar rats. *Journal of developmental origins of health and disease*, 14(2), 209–222. <https://doi.org/10.1017/S2040174422000496>.

Di Virgilio, A. L., Iwami, K., Wätjen, W., Kahl, R., & Degen, G. H. (2004). Genotoxicity of the isoflavones genistein, daidzein and equol in V79 cells. *Toxicology letters*, 151(1), 151–162. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2004.04.005>.

Efsa. 2012. Guidance on selected default values to be used by the EFSA Scientific Committee, Scientific Panels and Units in the absence of actual measured data. *EFSA Journal* 2012;10(3):2579. [doi:10.2903/j.efsa.2012.2579](https://doi.org/10.2903/j.efsa.2012.2579).

Efsa. 2015. Risk assessment for peri- and post-menopausal women taking food supplements containing isoflavones. *EFSA Journal* 2015;13(10):4246. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2015.4246>.

Eustache, F., Bennani Smires, B., Moison, D., Bergès, R., Canivenc-Lavier, M. C., Vaiman, D., & Auger, J. (2020). Different exposure windows to low doses of genistein and/or vinclozolin result in contrasted disorders of testis function and gene expression of exposed rats and their unexposed progeny. *Environmental research*, 190, 109975. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2020.109975>.

Eustache, F., Mondon, F., Canivenc-Lavier, M. C., Lesaffre, C., Fulla, Y., Berges, R., Cravedi, J. P., Vaiman, D., & Auger, J. (2009). Chronic dietary exposure to a low-dose mixture of genistein and vinclozolin modifies the reproductive axis, testis transcriptome, and fertility. *Environmental health perspectives*, 117(8), 1272–1279. <https://doi.org/10.1289/ehp.0800158>.

Felício, J. S., de Alcântara, A. L., Janaú, L. C., de Moraes, L. V., de Oliveira, M. C. N. I., de Lemos, M. N., de Souza Neto, N. J. K., Neto, J. F. A., da Silva, W. M., de Souza, Í. J. A., Said, N. M., de Lemos, G. N., Vieira, G. M., Khayat, A. S., Dos Santos, Â. K. C. R., de Queiroz, N. N. M., de Sousa, A. C. C. B., Dos Santos, M. C., de Melo, F. T. C., Piani, P. P. F., Felício, K. M. (2021). Association of Soy and Exclusive Breastfeeding With Central Precocious Puberty: A Case-Control Study. *Frontiers in endocrinology*, 12, 667029. <https://doi.org/10.3389/fendo.2021.667029>.

Feng, X. L., Ho, S. C., Zhan, X. X., Zuo, L. S., Mo, X. F., Zhang, X., Abulimiti, A., Huang, C. Y., & Zhang, C. X. (2021). Serum isoflavones and lignans and odds of breast cancer in pre- and postmenopausal Chinese women. *Menopause (New York, N.Y.)*, 28(4), 413–422. <https://doi.org/10.1097/GME.0000000000001715>.

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., Day, N. E., & Bingham, S. A. 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 epidemiology, biomarkers & prevention: a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*, 13(5), 698–708.

Hakami, T., Mahmoud, M. I., de Juan, E., & Cooney, M. 2021. Pharmacokinetics of genistein distribution in blood and retinas of diabetic and non-diabetic rats. *Drug metabolism and pharmacokinetics*, 39, 100404. <https://doi.org/10.1016/j.dmpk.2021.100404>.

Hargreaves, D. F., Potten, C. S., Harding, C., Shaw, L. E., Morton, M. S., Roberts, S. A., Howell, A., & Bundred, N. J. (1999). Two-week dietary soy supplementation has an estrogenic effect on normal premenopausal breast. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 84(11), 4017–4024. <https://doi.org/10.1210/jcem.84.11.6152>.

Harvey, J. S., Howe, J. R., Lynch, A. M., & Rees, R. W. (2005). The results of five coded compounds: genistein, metaproterenol, rotenone, p-anisidine and resorcinol tested in the pH

6.7 Syrian hamster embryo cell morphological transformation assay. *Mutagenesis*, 20(1), 51–56. <https://doi.org/10.1093/mutage/gei009>.

Hooper, L., Madhavan, G., Tice, J. A., Leinster, S. J., & Cassidy, A. (2010). Effects of isoflavones on breast density in pre- and post-menopausal women: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Human reproduction update*, 16(6), 745–760. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmq011>.

Howes, J., Waring, M., Huang, L., & Howes, L. G. (2002). Long-term pharmacokinetics of an extract of isoflavones from red clover (*Trifolium pratense*). *Journal of alternative and complementary medicine (New York, N.Y.)*, 8(2), 135–142. <https://doi.org/10.1089/107555302317371424>.

Japanese Food Safety Commission. (2006). Fundamental concepts in the safety assessment of foods containing soy isoflavones for the purpose of specified health use, https://www.fsc.go.jp/english/evaluationreports/newfoods_shealth/soy_isoflavones.pdf.

Ju, Y. H., Allred, C. D., Allred, K. F., Karko, K. L., Doerge, D. R., & Helferich, W. G. (2001). Physiological concentrations of dietary genistein dose-dependently stimulate growth of estrogen-dependent human breast cancer (MCF-7) tumors implanted in athymic nude mice. *The Journal of nutrition*, 131(11), 2957–2962. <https://doi.org/10.1093/jn/131.11.2957>.

Khan, S. A., Chatterton, R. T., Michel, N., Bryk, M., Lee, O., Ivancic, D., Heinz, R., Zalles, C. M., Helenowski, I. B., Jovanovic, B. D., Franke, A. A., Bosland, M. C., Wang, J., Hansen, N. M., Bethke, K. P., Dew, A., Coomes, M., & Bergan, R. C. (2012). Soy isoflavone supplementation for breast cancer risk reduction: a randomized phase II trial. *Cancer prevention research (Philadelphia, Pa.)*, 5(2), 309–319. <https://doi.org/10.1158/1940-6207.CAPR-11-0251>.

Kim, J. H., Jun, S., & Kim, J. (2023). Dietary intake and cancer incidence in Korean adults: a systematic review and meta-analysis of observational studies. *Epidemiology and health*, 45, e2023102. <https://doi.org/10.4178/epih.e2023102>.

Kim, J., Kim, H. J., Joung, H., Park, M. K., Li, S., Song, Y., Franke, A. A., & Paik, H. Y. (2010). Overnight urinary excretion of isoflavones as an indicator for dietary isoflavone intake in Korean girls of pubertal age. *The British journal of nutrition*, 104(5), 709–715. <https://doi.org/10.1017/S0007114510000978>.

Kim, J., Kim, S., Huh, K., Kim, Y., Joung, H., & Park, M. (2011). High serum isoflavone concentrations are associated with the risk of precocious puberty in Korean girls. *Clinical endocrinology*, 75(6), 831–835. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2265.2011.04127.x>.

Kulling, S. E., Honig, D. M., & Metzler, M. (2001). Oxidative metabolism of the soy isoflavones daidzein and genistein in humans in vitro and in vivo. *Journal of agricultural and food chemistry*, 49(6), 3024–3033. <https://doi.org/10.1021/jf0012695>.

Kulling, S. E., & Metzler, M. (1997). Induction of micronuclei, DNA strand breaks and HPRT mutations in cultured Chinese hamster V79 cells by the phytoestrogen coumestrol. *Food and chemical toxicology: an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*, 35(6), 605–613. [https://doi.org/10.1016/s0278-6915\(97\)00022-7](https://doi.org/10.1016/s0278-6915(97)00022-7).

Kulling, S. E., Rosenberg, B., Jacobs, E., & Metzler, M. (1999). The phytoestrogens coumestrol and genistein induce structural chromosomal aberrations in cultured human peripheral blood lymphocytes. *Archives of toxicology*, 73(1), 50–54. <https://doi.org/10.1007/s002040050585>.

- Kuhnle, G. G., Dell'aquila, C., Aspinall, S. M., Runswick, S. A., Mulligan, A. A., & Bingham, S. A. (2009). Phytoestrogen content of cereals and cereal-based foods consumed in the UK. *Nutrition and cancer*, 61(3), 302–309. <https://doi.org/10.1080/01635580802567141>.
- Laddha, A. P., Murugesan, S., & Kulkarni, Y. A. (2020). In-vivo and in-silico toxicity studies of daidzein: an isoflavone from soy. *Drug and chemical toxicology*, 45(3), 1408–1416. <https://doi.org/10.1080/01480545.2020.1833906>.
- Lee, A. W., Poynor, V., & McEligot, A. J. (2022). Urinary Phytoestrogen Levels Are Associated with Female Hormonal Cancers: An Analysis of NHANES Data From 1999 to 2010. *Nutrition and cancer*, 74(8), 2748–2756. <https://doi.org/10.1080/01635581.2021.2020304>.
- Lepri, S. R., Luiz, R. C., Zanelatto, L. C., da Silva, P. B., Sartori, D., Ribeiro, L. R., & Mantovani, M. S. (2013). Chemoprotective activity of the isoflavones, genistein and daidzein on mutagenicity induced by direct and indirect mutagens in cultured HTC cells. *Cytotechnology*, 65(2), 213–222. <https://doi.org/10.1007/s10616-012-9476-8>.
- Li, R., Zhao, F., Diao, H., Xiao, S., & Ye, X. (2014). Postweaning dietary genistein exposure advances puberty without significantly affecting early pregnancy in C57BL/6J female mice. *Reproductive toxicology* (Elmsford, N.Y.), 44, 85–92. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2013.12.003>.
- Li, M., Cai, Q., Gao, Y. T., Franke, A. A., Zhang, X., Zhao, Y., Wen, W., Lan, Q., Rothman, N., Shyr, Y., Shu, X. O., Zheng, W., & Yang, G. (2022). Phytoestrogens and lung cancer risk: a nested case-control study in never-smoking Chinese women. *The American journal of clinical nutrition*, 115(3), 643–651. <https://doi.org/10.1093/ajcn/nqab358>.
- Liu, F., Peng, Y., Qiao, Y., Wang, P., Si, C., Wang, X., Zhang, M., & Song, F. (2023). Association of urinary phytoestrogens with hormone-related cancers and cancer biomarkers: NHANES 1999-2010. *The British journal of nutrition*, 130(5), 750–764. <https://doi.org/10.1017/S0007114522003877>.
- Lu, L. W., Chen, N. W., Brunder, D. G., Nayeem, F., Nagamani, M., Nishino, T. K., Anderson, K. E., & Khamapirad, T. (2022). Soy isoflavones decrease fibroglandular breast tissue measured by magnetic resonance imaging in premenopausal women: A 2-year randomized double-blind placebo controlled clinical trial. *Clinical nutrition ESPEN*, 52, 158–168. <https://doi.org/10.1016/j.clnesp.2022.10.007>.
- Manjanatha, M. G., Shelton, S. D., Rhodes, B. S., Bishop, M. E., Lyn-Cook, L. E., & Aidoo, A. (2005). 17 Beta-estradiol and not genistein modulates lacI mutant frequency and types of mutation induced in the heart of ovariectomized big blue rats treated with 7, 12-dimethylbenz[a]anthracene. *Environmental and molecular mutagenesis*, 45(1), 70–79. <https://doi.org/10.1002/em.20080>.
- Manjanatha, M. G., Shelton, S., Bishop, M. E., Lyn-Cook, L. E., & Aidoo, A. (2006). Dietary effects of soy isoflavones daidzein and genistein on 7,12-dimethylbenz[a]anthracene-induced mammary mutagenesis and carcinogenesis in ovariectomized Big Blue transgenic rats. *Carcinogenesis*, 27(12), 2555–2564. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgl195>.
- Marks, K. J., Hartman, T. J., Taylor, E. V., Rybak, M. E., Northstone, K., & Marcus, M. (2017). Exposure to phytoestrogens in utero and age at menarche in a contemporary British cohort. *Environmental research*, 155, 287–293. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2017.02.030>.
- Marraudino, M., Ponti, G., Moussu, C., Farinetti, A., Macchi, E., Accornero, P., Gotti, S., Collado, P., Keller, M., & Panzica, G. (2021). Early Postnatal Genistein Administration Affects

Mice Metabolism and Reproduction in a Sexually Dimorphic Way. *Metabolites*, 11(7), 449. <https://doi.org/10.3390/metabo11070449>.

Masuda, S., Shimamura, Y., Kato, T., Yu-Feng, T., Iwamoto, K., & Kinae, N. (2012). Change in mutagenic activity of genistein after a nitrite treatment. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 76(5), 938–941. <https://doi.org/10.1271/bbb.110957>.

McClain, M.R., Wolz, E., Davidovich, A., Pfannkuch, F., Edwards, J. A., & Bausch, J. (2006). Acute, subchronic and chronic safety studies with genistein in rats. *Food and chemical toxicology: an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*, 44(1), 56–80. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2005.05.021>.

McClain, M. R., Wolz, E., Davidovich, A., & Bausch, J. (2006). Genetic toxicity studies with genistein. *Food and chemical toxicology: an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*, 44(1), 42–55. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2005.06.004>.

McMichael-Phillips, D. F., Harding, C., Morton, M., Roberts, S. A., Howell, A., Potten, C. S., & Bundred, N. J. (1998). Effects of soy-protein supplementation on epithelial proliferation in the histologically normal human breast. *The American journal of clinical nutrition*, 68(6 Suppl), 1431S–1435S. <https://doi.org/10.1093/ajcn/68.6.1431S>.

Messina, M., Mejia, S. B., Cassidy, A., Duncan, A., Kurzer, M., Nagato, C., Ronis, M., Rowland, I., Sievenpiper, J., & Barnes, S. (2022). Neither soyfoods nor isoflavones warrant classification as endocrine disruptors: a technical review of the observational and clinical data. *Critical reviews in food science and nutrition*, 62(21), 5824–5885. <https://doi.org/10.1080/10408398.2021.1895054>.

Michikawa, T., Yamazaki, S., Ono, M., Kuroda, T., Nakayama, S. F., Suda, E., Isobe, T., Iwai-Shimada, M., Kobayashi, Y., Yonemoto, J., Tamura, K., Kawamoto, T., Nitta, H., & Japan Environment and Children's Study Group (2019). Isoflavone Intake in Early Pregnancy and Hypospadias in the Japan Environment and Children's Study. *Urology*, 124, 229–236. <https://doi.org/10.1016/j.urology.2018.11.008>.

Mitsunami, M., Mínguez-Alarcón, L., Florio, A. A., Wang, S., Attaman, J. A., Souter, I., Hauser, R., Chavarro, J. E., & EARTH Study Team (2023). Intake of soy products and soy isoflavones in relation to ovarian reserve. *Fertility and sterility*, 119(6), 1017–1029. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2023.02.039>.

Mizushima, Y., Shiomi, K., Kuriyama, I., Takahashi, Y., & Yoshida, H. (2013). Inhibitory effects of a major soy isoflavone, genistein, on human DNA topoisomerase II activity and cancer cell proliferation. *International journal of oncology*, 43(4), 1117–1124. <https://doi.org/10.3892/ijo.2013.2032>.

Morandi, S., D'Agostina, A., Ferrario, F., Arnoldi, A. (2005). Isoflavone content of Italian soy food products and daily intakes of some specific classes of consumers. *Eur Food Res Technol* 221:84-91. [DOI: 10.1007/s00217-004-1116-x](https://doi.org/10.1007/s00217-004-1116-x).

Nagao, T., Yoshimura, S., Saito, Y., Nakagomi, M., Usumi, K., & Ono, H. (2001). Reproductive effects in male and female rats of neonatal exposure to genistein. *Reproductive toxicology* (Elmsford, N.Y.), 15(4), 399–411. [https://doi.org/10.1016/s0890-6238\(01\)00141-1](https://doi.org/10.1016/s0890-6238(01)00141-1).

NCM. (2020). Soy intake and possible adverse health effects in Nordic children and pregnant women (unborn children). Publication number 2020: 532.

- NTP. (2008). Multigenerational reproductive study of genistein (Cas No. 446-72-0) in Sprague-Dawley rats (feed study). National Toxicology Program technical report series, (539), 1–266.
- NTP-CERHR. (2010) expert panel report on the reproductive and developmental toxicity of genistein. Birth defects research. Part B, Developmental and reproductive toxicology, 77(6), 485–638. <https://doi.org/10.1002/bdrb.20087>.
- Oliveira, F. R. K., Gustavo, A. F. S. E., Gonçalves, R. B., Bolfi, F., Mendes, A. L., & Nunes-Nogueira, V. D. S. (2021). Association between a soy-based infant diet and the onset of puberty: A systematic review and meta-analysis. *PloS one*, 16(5), e0251241. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0251241>.
- Oliveira, J. M., Oliveira, I. M., Sleiman, H. K., Dal Forno, G. O., Romano, M. A., & Romano, R. M. (2022). Consumption of soy isoflavones during the prepubertal phase delays puberty and causes hypergonadotropic hypogonadism with disruption of hypothalamic-pituitary gonadotropins regulation in male rats. *Toxicology letters*, 369, 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2022.08.004>.
- Ollberding, N. J., Lim, U., Wilkens, L. R., Setiawan, V. W., Shvetsov, Y. B., Henderson, B. E., Kolonel, L. N., & Goodman, M. T. (2012). Legume, soy, tofu, and isoflavone intake and endometrial cancer risk in postmenopausal women in the multiethnic cohort study. *Journal of the National Cancer Institute*, 104(1), 67–76. <https://doi.org/10.1093/jnci/djr475>.
- Petrakis, N. L., Barnes, S., King, E. B., Lowenstein, J., Wiencke, J., Lee, M. M., Miike, R., Kirk, M., & Coward, L. (1996). Stimulatory influence of soy protein isolate on breast secretion in pre- and postmenopausal women. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*, 5(10), 785–794.
- Qin, H., Lin, Z., Vásquez, E., Luan, X., Guo, F., & Xu, L. (2019). High soy isoflavone or soy-based food intake during infancy and in adulthood is associated with an increased risk of uterine fibroids in premenopausal women: a meta-analysis. *Nutrition research (New York, N.Y.)*, 71, 30–42. <https://doi.org/10.1016/j.nutres.2019.06.002>.
- Rozman, K. K., Bhatia, J., Calafat, A. M., Chambers, C., Culty, M., Etzel, R. A., Flaws, J. A., Hansen, D. K., Hoyer, P. B., Jeffery, E. H., Kesner, J. S., Marty, S., Thomas, J. A., & Umbach, D. (2006).
- Record, I. R., Jannes, M., Dreosti, I. E., & King, R. A. (1995). Induction of micronucleus formation in mouse splenocytes by the soy isoflavone genistein in vitro but not in vivo. *Food and chemical toxicology: an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*, 33(11), 919–922. [https://doi.org/10.1016/0278-6915\(95\)00062-7](https://doi.org/10.1016/0278-6915(95)00062-7).
- Reed, K. E., Camargo, J., Hamilton-Reeves, J., Kurzer, M., & Messina, M. (2021). Neither soy nor isoflavone intake affects male reproductive hormones: An expanded and updated meta-analysis of clinical studies. *Reproductive toxicology (Elmsford, N.Y.)*, 100, 60–67. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2020.12.019>.
- SCCS. (2022). Scientific opinion on genistein and daidzein. Final version of 16 September 2022, SCCS/1641/22.
- Schlosser, P. M., Borghoff, S. J., Coldham, N. G., David, J. A., & Ghosh, S. K. (2006). Physiologically-based pharmacokinetic modeling of genistein in rats, Part I: Model development. *Risk analysis : an official publication of the Society for Risk Analysis*, 26(2), 483–500. <https://doi.org/10.1111/j.1539-6924.2006.00743.x>.

- Segovia-Siapco, G., Pribis, P., Messina, M., Oda, K., & Sabaté, J. (2014). Is soy intake related to age at onset of menarche? A cross-sectional study among adolescents with a wide range of soy food consumption. *Nutrition journal*, 13, 54. <https://doi.org/10.1186/1475-2891-13-54>.
- Setchell, K. D., Zimmer-Nechemias, L., Cai, J., & Heubi, J. E. (1997). Exposure of infants to phyto-oestrogens from soy-based infant formula. *Lancet (London, England)*, 350(9070), 23–27. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(96\)09480-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(96)09480-9).
- Setchell, K. D., Brown, N. M., Desai, P., Zimmer-Nechemias, L., Wolfe, B. E., Brashear, W. T., Kirschner, A. S., Cassidy, A., & Heubi, J. E. (2001). Bioavailability of pure isoflavones in healthy humans and analysis of commercial soy isoflavone supplements. *The Journal of nutrition*, 131(4 Suppl), 1362S–75S. <https://doi.org/10.1093/jn/131.4.1362S>.
- Setchell, K. D., Brown, N. M., Zimmer-Nechemias, L., Brashear, W. T., Wolfe, B. E., Kirschner, A. S., & Heubi, J. E. (2002). Evidence for lack of absorption of soy isoflavone glycosides in humans, supporting the crucial role of intestinal metabolism for bioavailability. *The American journal of clinical nutrition*, 76(2), 447–453. <https://doi.org/10.1093/ajcn/76.2.447>.
- Setchell, K. D., Brown, N. M., Desai, P. B., Zimmer-Nechemias, L., Wolfe, B., Jakate, A. S., Creutzinger, V., & Heubi, J. E. (2003). Bioavailability, disposition, and dose-response effects of soy isoflavones when consumed by healthy women at physiologically typical dietary intakes. *The Journal of nutrition*, 133(4), 1027–1035. <https://doi.org/10.1093/jn/133.4.1027>.
- Shike, M., Doane, A. S., Russo, L., Cabal, R., Reis-Filho, J. S., Gerald, W., Cody, H., Khanin, R., Bromberg, J., & Norton, L. (2014). The effects of soy supplementation on gene expression in breast cancer: a randomized placebo-controlled study. *Journal of the National Cancer Institute*, 106(9), dju189. <https://doi.org/10.1093/jnci/dju189>.
- Shin, S., Fu, J., Shin, W. K., Huang, D., Min, S., & Kang, D. (2023). Association of food groups and dietary pattern with breast cancer risk: A systematic review and meta-analysis. *Clinical nutrition (Edinburgh, Scotland)*, 42(3), 282–297. <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2023.01.003>.
- Shor, D., Sathyapalan, T., Atkin, S.L. et al. Does equol production determine soy endocrine effects?. *Eur J Nutr* 51, 389–398 (2012). doi.org/10.1007/s00394-012-0331-7.
- Sun, L., Zhao, W., Li, J., Tse, L. A., Xing, X., Lin, S., Zhao, J., Ren, Z., Zhang, C. X., & Liu, X. (2021). Dietary flavonoid intake and risk of esophageal squamous cell carcinoma: A population-based case-control study. *Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif.)*, 89, 111235. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2021.111235>.
- Sun, L., Szymczak, G., Wójciak-Kosior, M., Sowa, I., Zapła, K., Strzemski, M., Kocjan, R. (2017). Evaluation of isoflavone content and antioxidant activity of selected soy taxa. *Journal of Food Composition and Analysis*. 57 (2017) 40–48.
- Szymczak, G., Wójciak-Kosior, M., Sowa, I., Zapła, K., Strzemski, M., Kocjan, R. Evaluation of isoflavone content and antioxidant activity of selected soy taxa. *Journal of Food Composition and Analysis*, 57 (2017), pp. 408, 10.1016/j.jfca.2016.12.015.
- Testa, I., Salvatori, C., Di Cara, G., Latini, A., Frati, F., Troiani, S., Principi, N., & Esposito, S. (2018). Soy-Based Infant Formula: Are Phyto-Oestrogens Still in Doubt? *Frontiers in nutrition*, 5, 110. <https://doi.org/10.3389/fnut.2018.00110>.
- Tsutsui, T., Tamura, Y., Yagi, E., Someya, H., Hori, I., Metzler, M., & Barrett, J. C. (2003). Cell-transforming activity and mutagenicity of 5 phytoestrogens in cultured mammalian cells. *International journal of cancer*, 105(3), 312–320. <https://doi.org/10.1002/ijc.11046>.

Unfer, V., Casini, M. L., Costabile, L., Mignosa, M., Gerli, S., & Di Renzo, G. C. (2004). Endometrial effects of long-term treatment with phytoestrogens: a randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Fertility and sterility*, 82(1), 145–265. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2003.11.041>

Upson, K., Sathyanarayana, S., Scholes, D., & Holt, V. L. (2015). Early-life factors and endometriosis risk. *Fertility and sterility*, 104(4), 964–971.e5. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2015.06.040>.

Upson, K., Harmon, Q. E., & Baird, D. D. (2016a). Soy-Based Infant Formula Feeding and Ultrasound-Detected Uterine Fibroids among Young African-American Women with No Prior Clinical Diagnosis of Fibroids. *Environmental health perspectives*, 124(6), 769–775. <https://doi.org/10.1289/ehp.1510082>.

Upson, K., Harmon, Q. E., Laughlin-Tommaso, S. K., Umbach, D. M., & Baird, D. D. (2016b). Soy-based Infant Formula Feeding and Heavy Menstrual Bleeding Among Young African American Women. *Epidemiology (Cambridge, Mass.)*, 27(5), 716–725. <https://doi.org/10.1097/EDE.0000000000000508>.

Upson, K., Adgent, M. A., Wegienka, G., & Baird, D. D. (2019). Soy-based infant formula feeding and menstrual pain in a cohort of women aged 23-35 years. *Human reproduction (Oxford, England)*, 34(1), 148–154. <https://doi.org/10.1093/humrep/dey303US>

US EPA. (2006). Approaches For the Application of Physiologically Based Pharmacokinetic (PBPK) Models and Supporting Data In Risk Assessment, U.S. Environmental Protection Agency, Washington, D.C.

van der Velpen, V., Hollman, P. C., van Nielen, M., Schouten, E. G., Mensink, M., Van't Veer, P., & Geelen, A. (2014). Large inter-individual variation in isoflavone plasma concentration limits use of isoflavone intake data for risk assessment. *European journal of clinical nutrition*, 68(10), 1141–1147. <https://doi.org/10.1038/ejcn.2014.108>.

Valladares, L., Garrido, A., Sierralta, W. (2012). [Soy isoflavones and human health: breast cancer and puberty timing] (pub en espagnol). *Rev Med Chil.* 140(4):512-6. doi: 10.4067/S0034-8872012000400014.

VKM. (2017). Risk assessment of "other substances" – Isoflavones from soy. Opinion of the Panel on Food Additives, Flavourings, Processing Aids, Materials in Contact with Food and Cosmetics of the Norwegian Scientific Committee for Food Safety, ISBN: 978-82-8259-271-0, Oslo, Norway.

Wang, X., Ha, D., Yoshitake, R., Chan, Y. S., Sadava, D., & Chen, S. (2021). Exploring the Biological Activity and Mechanism of Xenoestrogens and Phytoestrogens in Cancers: Emerging Methods and Concepts. *International journal of molecular sciences*, 22(16), 8798. <https://doi.org/10.3390/ijms22168798>.

Wang, Q., Spenkelink, B., Boonpawa, R., & Rietjens, I. M. C. M. (2022). Use of Physiologically Based Pharmacokinetic Modeling to Predict Human Gut Microbial Conversion of Daidzein to S-Equol. *Journal of agricultural and food chemistry*, 70(1), 343–352. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.1c03950>.

Wei, Y., Lv, J., Guo, Y., Bian, Z., Gao, M., Du, H., Yang, L., Chen, Y., Zhang, X., Wang, T., Chen, J., Chen, Z., Yu, C., Huo, D., Li, L., & China Kadoorie Biobank Collaborative Group (2020). Soy intake and breast cancer risk: a prospective study of 300,000 Chinese women and a dose-response meta-analysis. *European journal of epidemiology*, 35(6), 567–578. <https://doi.org/10.1007/s10654-019-00585-4>.

Yang, W., Deng, J., Gao, J., Yang, H., Chen, Q., Niya, Z., Ling, X., Zhang, G., Zou, P., Sun, L., Huang, L., Liu, J., Cao, J., & Ao, L. (2022). Associations between isoflavone exposure and reproductive damage in adult males: evidence from human and model system studies†. *Biology of reproduction*, 107(5), 1360–1373. <https://doi.org/10.1093/biolre/ioac157>.

Yang, J., Shen, H., Mi, M., & Qin, Y. (2023). Isoflavone Consumption and Risk of Breast Cancer: An Updated Systematic Review with Meta-Analysis of Observational Studies. *Nutrients*, 15(10), 2402. <https://doi.org/10.3390/nu15102402>.


Zager, M. G., Schlosser, P. M., & Tran, H. T. (2007). A delayed nonlinear PBPK model for genistein dosimetry in rats. *Bulletin of mathematical biology*, 69(1), 93–117. <https://doi.org/10.1007/s11538-006-9068-x>

Zhou, S., Hu, Y., Zhang, B., Teng, Z., Gan, H., Yang, Z., Wang, Q., Huan, M., & Mei, Q. (2008). Dose-dependent absorption, metabolism, and excretion of genistein in rats. *Journal of agricultural and food chemistry*, 56(18), 8354–8359. <https://doi.org/10.1021/jf801051d>

ANNEXES

Annexe 1 : Lettre de saisine

2 0 2 2 -SA- 0 2 2 1


GOUVERNEMENT
Liberté
Égalité
Fraternité

Courrier arrivé
2 1 NOV. 2022
DIRECTION GENERALE

Paris, le 23 octobre 2022

Dossier suivi par : Erwan de Gavelle
DGAL/SPPSI/SDATAA/BPAL
Réf. : SDATAA-BPAL
Tél. : 01 49 55 50 24
Mèl. : erwan.degavelle@agriculture.gouv.fr

La Directrice générale de l'alimentation
Le Directeur général de la santé

à

Dossier suivi par : Isabelle de Guido-Vincent-Genod
DGS/EA/EA3
Réf. :
Tél. : 01 40 56 68 47
Mèl. : Isabelle.de-guido@sante.gouv.fr

Monsieur le Directeur général de l'ANSES
14, rue Pierre et Marie Curie
94701 MAISONS ALFORT CEDEX

Objet : Demande d'avis de l'Anses relatif à l'évaluation du risque sanitaire de la consommation d'aliments contenant des isoflavones, en lien avec le risque de perturbation endocrinienne

Contexte

D'après l'étude INCA3, 1,8 % des adultes déclarent suivre un régime végétarien excluant au minimum la viande. Le Programme national de l'alimentation et la nutrition 2019-2023 (PNAN) prévoit des actions pour promouvoir les apports en protéines végétales. Les recommandations alimentaires du Programme national nutrition santé (PNNS) sont d'augmenter la consommation de légumes secs, et d'aller vers des féculents complets, en raison de leur richesse en fibres. Par ailleurs, la loi dite Climat et Résilience, dans son article 252, introduit l'obligation, dans l'ensemble de la restauration collective scolaire, de proposer au moins un menu végétarien par semaine, et, à titre expérimental, les collectivités territoriales volontaires peuvent proposer quotidiennement le choix d'un menu végétarien depuis le 22 août 2021. Le menu végétarien doit s'insérer dans un plan alimentaire respectueux des exigences fixées par l'arrêté du 30 septembre 2011 relatif à la qualité nutritionnelle des repas servis dans le cadre de la restauration scolaire, en cours de révision. Au plus tard le 1er janvier 2023, dès lors qu'ils proposent habituellement un choix multiple de menus, les gestionnaires, publics et privés, des services de restauration collective de l'Etat, de ses établissements publics et des entreprises publiques nationales seront tenus de proposer quotidiennement le choix d'un menu végétarien. Ces menus contiennent très souvent des produits à base de soja en raison de leur richesse en protéines et de la diversité de textures existantes (edamame, protéines texturées, tofu...).

A la suite de la saisine de la direction générale de la Santé du 16 mai 2019 afin d'élaborer les recommandations nutritionnelles pour les populations spécifiques, le Haut conseil de la santé publique a publié le 10 mars 2022 l'avis relatif à la révision des repères alimentaires du PNNS pour les femmes enceintes et allaitantes. Il recommande, par mesure de précaution, de s'abstenir de consommer des produits contenant des phytoestrogènes et donc d'éviter les aliments à base de soja en raison de leur richesse en phytoestrogènes et les compléments alimentaires contenant des phytoestrogènes. Le seuil

limite de sécurité des phytoestrogènes ayant été défini sur la base de données anciennes, le HCSP recommande la mise à jour par l'Anses du rapport de l'AFSSA (Agence française de sécurité sanitaire des aliments) de mars 2005 portant sur les risques associés à ces substances, en particulier pour les femmes enceintes et allaitantes.

Cadre général de la saisine

L'Anses a été saisie par la direction générale de la Santé le 20 décembre 2019 pour un appui scientifique et technique relatif aux recommandations nutritionnelles pour la mise en place du menu végétarien hebdomadaire en restauration collective scolaire (saisine 2019-SA-0205). Des premiers éléments scientifiques transmis par l'Anses le 17 janvier 2020 ont permis d'élaborer des recommandations de composition des menus végétariens hebdomadaires, avec une fréquence maximale d'un menu à base de soja sur 20 repas successifs, dans l'attente d'une analyse des risques détaillée par rapport à l'exposition aux phytoestrogènes. En effet, sur ce sujet, l'AST du 17 janvier 2020 indiquait que cette question nécessitait une expertise en évaluation des risques sanitaires incompatible avec le délai de la saisine.

En parallèle, l'Anses a mis en place un groupe de travail dans le cadre de la saisine portant sur l'établissement de repères alimentaires destinés aux personnes suivant un régime d'exclusion de tout ou partie des aliments d'origine animale (saisine 2019-SA-0118). La substitution des protéines animales par des protéines végétales souvent issues du soja soulève la question du risque lié à une augmentation de l'exposition aux phytoestrogènes.

Les phytoestrogènes comportent principalement des isoflavones, retrouvées en quantités élevées dans le soja et les produits dérivés. Ils comprennent également les entérolignanes, dont les précurseurs (lignanes) sont présents en plus faibles quantités dans de nombreux aliments : fruits, légumes, céréales et graines oléagineuses.

Il est demandé à l'Anses d'évaluer le risque sanitaire lié à la consommation d'aliments contenant des isoflavones.

Les questions posées à l'Anses sont les suivantes :

- au regard des données disponibles les plus récentes, quelle est la valeur toxicologique de référence (VTR) long terme par voie orale en isoflavones. Cette VTR devra prendre en compte les différentes catégories de population, notamment la population adulte, les femmes ménopausées, les femmes enceintes et allaitantes, et les enfants ;
- identifier les aliments de consommation courante riches en isoflavones et déterminer les quantités maximales de consommation de ces aliments, afin de ne pas dépasser la VTR établie. Ce travail sera effectué pour l'ensemble de la population adulte, ainsi que pour les populations spécifiques, notamment les femmes enceintes et allaitantes, et les enfants ;
- Existe-t-il des liens entre l'exposition des nourrissons aux isoflavones par la consommation de préparations à base de protéines de soja ou par l'allaitement par les mères consommant des produits riches en isoflavones et la santé aux différents âges de la vie ?
- Dans le cadre de la restauration collective :
 - Quelles sont les fréquences recommandées sur 20 repas successifs de composantes (entrée, plat, dessert) à base de soja (soja et produits dérivés de soja comme le tonyu, du tofu et des desserts à base de soja) étant donné la teneur en isoflavones, ainsi que les portions recommandées :
 - pour les enfants en restauration scolaire (de la maternelle au lycée) ;

- pour les enfants en crèche (de 0 à 3 ans) ;
- pour les adultes en restauration d'entreprise ;
- pour les personnes âgées en EHPAD ?

Délai de réponse


La remise d'un rapport intermédiaire concernant les 3 premières questions est attendue avant le 1^{er} janvier 2024. Le rapport final est attendu au 1^{er} juillet 2024.

Destinataires pour la réponse mail :

DGS : christel.courcelle@sante.gouv.fr, melanie.picherot@sante.gouv.fr, isabelle.de-guido@sante.gouv.fr
DGAL : carole.foulon@agriculture.gouv.fr, erwan.degavelle@agriculture.gouv.fr, saisines-anses.dgal@agriculture.gouv.fr

Nos services se tiennent à votre disposition pour vous apporter toute information complémentaire. Nous vous remercions de bien vouloir accuser réception de la présente demande.

La Directrice Générale de l'Alimentation

Maud FAIPOUX ID  Signature numérique
de Maud FAIPOUX ID

Maud FAIPOUX

Le Directeur Général de la Santé



Jérôme SALOMON

Annexe 2 : Recherche bibliographique

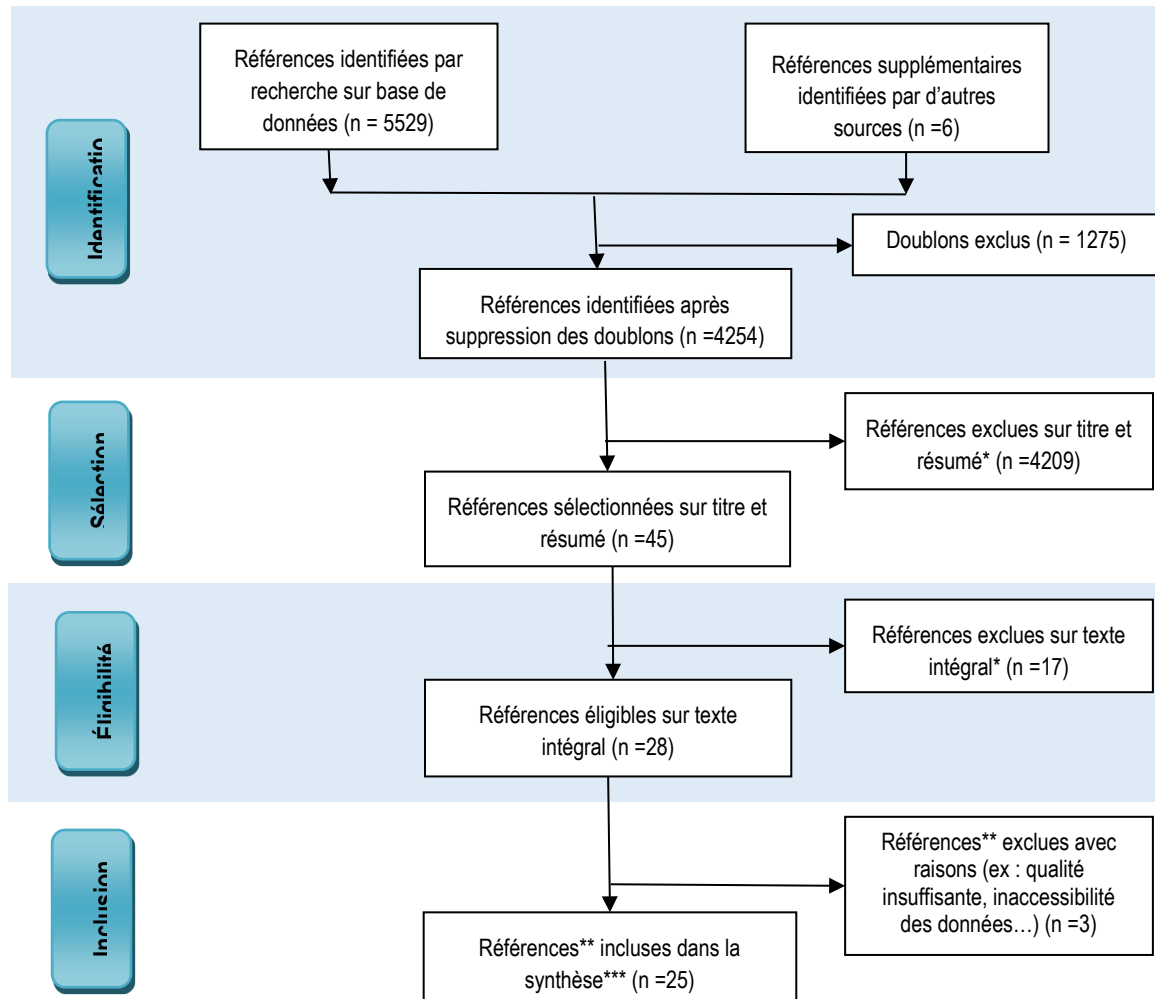
Date de la recherche Pubmed : 25 mai 2024.

Requête	Nombre de références	Commentaires
<p>((isoflavone*[Title/Abstract]) OR (soybean*[Title/Abstract]) OR (soy bean*[Title/Abstract]) OR (soyabean*[Title/Abstract]) OR (soya[Title/Abstract]) OR (genistein[Title/Abstract]) OR (glycitein[Title/Abstract]) OR (daidzin[Title/Abstract]) OR (genistin[Title/Abstract]) OR (glycitin[Title/Abstract]) OR (phytoestrogen*[Title/Abstract]))</p> <p>Scopus (Article tilte, Abstract, keywords):</p> <p>isoflavons OR soybean OR soy OR beans OR soyabeans OR soya OR genistein OR glycitein OR daidzin OR genistin OR glycitin OR phytoestrogens</p>	73122	304 397
<p>((animal*[Title/Abstract]) OR (rat[Title/Abstract]) OR (rats[Title/Abstract]) OR (mouse[Title/Abstract]) OR (mice[Title/Abstract]) OR (nonhuman[Title/Abstract]))</p> <p>Scopus (Article tilte, Abstract, keywords):</p> <p>animals OR rat OR rats OR mouse OR mice OR nonhuman</p>	3 728 966	11 156 005
<p>((human[Title/Abstract]) OR (humans[Title/Abstract]) OR (woman[Title/Abstract]) OR (women[Title/Abstract]) OR (man[Title/Abstract]) OR (men[Title/Abstract]) OR (child*[Title/Abstract]) OR (adolescent*[Title/Abstract]) OR (youth*[Title/Abstract]) OR (young*[Title/Abstract]) OR (teen*[Title/Abstract]) OR (adult*[Title/Abstract]) OR ("middle aged"[Title/Abstract]) OR (aged[Title/Abstract]) OR (elder*[Title/Abstract]) OR (senior citizen*[Title/Abstract]))</p> <p>Scopus (Article tilte, Abstract, keywords):</p> <p>human OR humans OR woman OR women OR man OR men OR child OR adolescent OR youth OR young OR teen OR adult OR middle aged OR aged OR elder OR senior citizen</p>	8 706 944	27337
<p>((risk*[Title/Abstract]) OR (safe*[Title/Abstract]) OR (adverse[Title/Abstract]) OR (side-effect*[Title/Abstract]) OR (hazard*[Title/Abstract]) OR (harm[Title/Abstract]) OR (harmful[Title/Abstract]) OR (negative[Title/Abstract]) OR (contraindicat*[Title/Abstract]) OR (contra-indicat*[Title/Abstract]) OR (toxic[Title/Abstract]) OR (toxicity[Title/Abstract]))</p> <p>Scopus (Article tilte, Abstract, keywords):</p> <p>risk OR safe OR adverse OR side-effect OR hazard OR harm OR harmful OR negative OR contraindicat OR contra-indicat OR toxic OR toxicity</p>	6 459 626	11 627 462
<p>((isoflavone*[Title/Abstract]) OR (soybean*[Title/Abstract]) OR (soy bean*[Title/Abstract]) OR (soyabean*[Title/Abstract]) OR (soya[Title/Abstract]) OR (genistein[Title/Abstract]) OR (glycitein[Title/Abstract]) OR (daidzin[Title/Abstract]) OR (genistin[Title/Abstract]) OR (glycitin[Title/Abstract]) OR (phytoestrogen*[Title/Abstract])) AND (((risk*[Title/Abstract]) OR (safe*[Title/Abstract]) OR (adverse[Title/Abstract]) OR (side-effect*[Title/Abstract]) OR (hazard*[Title/Abstract]) OR (harm[Title/Abstract]) OR (harmful[Title/Abstract]) OR (negative[Title/Abstract]) OR (contraindicat*[Title/Abstract]) OR (contra-indicat*[Title/Abstract]) OR (toxic[Title/Abstract]) OR (toxicity[Title/Abstract]))</p>	12815	47880
<p>((isoflavone*[Title/Abstract]) OR (soybean*[Title/Abstract]) OR (soy bean*[Title/Abstract]) OR (soyabean*[Title/Abstract]) OR (soya[Title/Abstract]) OR (genistein[Title/Abstract]) OR (glycitein[Title/Abstract]) OR (daidzin[Title/Abstract]) OR (genistin[Title/Abstract]) OR (glycitin[Title/Abstract]) OR (phytoestrogen*[Title/Abstract])) AND (((risk*[Title/Abstract]) OR (safe*[Title/Abstract]) OR (adverse[Title/Abstract]) OR (side-effect*[Title/Abstract]) OR (hazard*[Title/Abstract]) OR (harm[Title/Abstract]) OR (harmful[Title/Abstract]) OR (negative[Title/Abstract]) OR (contraindicat*[Title/Abstract]) OR (contra-indicat*[Title/Abstract]) OR (toxic[Title/Abstract]) OR (toxicity[Title/Abstract]))</p>	2970	18264

AND (((animal*[Title/Abstract]) OR (rat[Title/Abstract]) OR (rats[Title/Abstract]) OR (mouse[Title/Abstract]) OR (mice[Title/Abstract]) OR (nonhuman[Title/Abstract])))		
(((isoflavone*[Title/Abstract]) OR (soybean*[Title/Abstract]) OR (soybean*[Title/Abstract]) OR (soyabean*[Title/Abstract]) OR (soya[Title/Abstract]) OR (genistein[Title/Abstract]) OR (glycitein[Title/Abstract]) OR (daidzin[Title/Abstract]) OR (genistin[Title/Abstract]) OR (glycitin[Title/Abstract]) OR (phytoestrogen*[Title/Abstract]))) AND (((risk*[Title/Abstract]) OR (safe*[Title/Abstract]) OR (adverse[Title/Abstract]) OR (side-effect*[Title/Abstract]) OR (hazard*[Title/Abstract]) OR (harm[Title/Abstract]) OR (harmful[Title/Abstract]) OR (negative[Title/Abstract]) OR (contraindicat*[Title/Abstract]) OR (contra-indicat*[Title/Abstract]) OR (toxic[Title/Abstract]) OR (toxicity[Title/Abstract]))) AND (((human[Title/Abstract]) OR (humans[Title/Abstract]) OR (woman[Title/Abstract]) OR (women[Title/Abstract]) OR (man[Title/Abstract]) OR (men[Title/Abstract]) OR (child*[Title/Abstract]) OR (adolescent*[Title/Abstract]) OR (youth*[Title/Abstract]) OR (young*[Title/Abstract]) OR (teen*[Title/Abstract]) OR (adult*[Title/Abstract]) OR ("middle aged"[Title/Abstract]) OR (aged[Title/Abstract]) OR (elder*[Title/Abstract]) OR (senior citizen*[Title/Abstract])))	4772	16
(((isoflavone*[Title/Abstract]) OR (soybean*[Title/Abstract]) OR (soybean*[Title/Abstract]) OR (soyabean*[Title/Abstract]) OR (soya[Title/Abstract]) OR (genistein[Title/Abstract]) OR (glycitein[Title/Abstract]) OR (daidzin[Title/Abstract]) OR (genistin[Title/Abstract]) OR (glycitin[Title/Abstract]) OR (phytoestrogen*[Title/Abstract]))) AND (((risk*[Title/Abstract]) OR (safe*[Title/Abstract]) OR (adverse[Title/Abstract]) OR (side-effect*[Title/Abstract]) OR (hazard*[Title/Abstract]) OR (harm[Title/Abstract]) OR (harmful[Title/Abstract]) OR (negative[Title/Abstract]) OR (contraindicat*[Title/Abstract]) OR (contra-indicat*[Title/Abstract]) OR (toxic[Title/Abstract]) OR (toxicity[Title/Abstract]))) AND (((animal*[Title/Abstract]) OR (rat[Title/Abstract]) OR (rats[Title/Abstract]) OR (mouse[Title/Abstract]) OR (mice[Title/Abstract]) OR (nonhuman[Title/Abstract]))) Filters: from 2021 – 2024 Scopus : (TITLE-ABS-KEY (isoflavones OR soybean OR soy OR beans OR soybeans OR soya OR genistein OR glycitein OR daidzin OR genistin OR glycitin OR phytoestrogens) AND TITLE-ABS-KEY (animals OR rat OR rats OR mouse OR mice OR nonhuman) AND TITLE-ABS-KEY (risk OR safe OR adverse OR side-effect OR hazard OR harm OR harmful OR negative OR contra-indicate OR contra-indicat OR toxic OR toxicity)) AND PUBYEAR > 2020 AND PUBYEAR < 2025	503	4137
(((isoflavone*[Title/Abstract]) OR (soybean*[Title/Abstract]) OR (soybean*[Title/Abstract]) OR (soyabean*[Title/Abstract]) OR (soya[Title/Abstract]) OR (genistein[Title/Abstract]) OR (glycitein[Title/Abstract]) OR (daidzin[Title/Abstract]) OR (genistin[Title/Abstract]) OR (glycitin[Title/Abstract]) OR (phytoestrogen*[Title/Abstract]))) AND (((risk*[Title/Abstract]) OR (safe*[Title/Abstract]) OR (adverse[Title/Abstract]) OR (side-effect*[Title/Abstract]) OR (hazard*[Title/Abstract]) OR (harm[Title/Abstract]) OR (harmful[Title/Abstract]) OR (negative[Title/Abstract]) OR (contraindicat*[Title/Abstract]) OR (contra-indicat*[Title/Abstract]) OR (toxic[Title/Abstract]) OR (toxicity[Title/Abstract]))) AND (((human[Title/Abstract]) OR (humans[Title/Abstract]) OR (woman[Title/Abstract]) OR (women[Title/Abstract]) OR (man[Title/Abstract]) OR (men[Title/Abstract]) OR (child*[Title/Abstract]) OR (adolescent*[Title/Abstract]) OR (youth*[Title/Abstract]) OR (young*[Title/Abstract]) OR (teen*[Title/Abstract]) OR (adult*[Title/Abstract]) OR ("middle aged"[Title/Abstract]) OR (aged[Title/Abstract]) OR (elder*[Title/Abstract]) OR (senior citizen*[Title/Abstract]))) Filters: from 2021 – 2024 Scopus : (TITLE-ABS-KEY (isoflavones OR soybean OR soy OR beans OR soybeans OR soya OR genistein OR glycitein OR daidzin OR genistin OR glycitin OR phytoestrogens) AND TITLE-ABS-KEY (human OR humans OR woman OR women OR man OR men OR child OR adolescent OR youth OR young OR teen OR adult OR middle AND aged OR aged OR elder OR senior AND citizen) AND TITLE-ABS-KEY (risk OR safe OR adverse OR side-effect OR hazard OR harm OR harmful OR negative OR contra-indicate OR contra-indicat OR toxic OR toxicity)) AND PUBYEAR > 2020 AND PUBYEAR < 2025	873	6

Critères d'exclusion : Etudes sur les mécanismes d'action, les expositions court terme, les voies d'administration sous-cutanée, les études sur des mélanges d'isoflavones ou les mélanges de génistéine et daïdzéine, les administrations par dose unique, les études sur animaux pathologiques ou transgéniques, les méta-analyses.

Diagramme Prisma :



* si utile, préciser les raisons d'exclusions ou encore le nombre de références exclues par raison d'exclusion

** si pertinent selon les besoins de la méthode d'expertise, rapporter le nombre d'études à la place du nombre de références

*** expliciter s'il s'agit d'une synthèse qualitative ou quantitative ou éventuellement deux synthèses séparées.

Annexe 3 : Données de génotoxicité pour la génistéine et la daïdzéine (issues du rapport SCCS, 2022)

GENISTEINE

- Test de mutations géniques sur bactéries (test d'Ames)

Souches	Conditions d'exposition (concentration/durée/activation métabolique)	Résultats	Références
<i>Salmonella typhimurium</i> TA1538, TA98 et TA100	0, 1, 10, 50, 100, 500 pg/plaque S9 Aroclor 1254	-	Bartholomew et Ryan, 1980
<i>S. typhimurium</i> TA98 et TA100	Aucune donnée sur les concentrations utilisées	-	Sugimura <i>et al.</i> , 1977
Test de mutations géniques sur des souches de <i>S. typhimurium</i> et <i>E. coli</i> conformément à la ligne directrice 471 de l'OCDE	Test de mutation inverse dans les souches TA1535, TA153, TA98 TA1DD et <i>Escherichia coli</i> WP2 uvrA. Plaques en triple traitées avec une concentration allant jusqu'à 3 300 pg/plaque dans une première expérience et avec jusqu'à 1 000 pg/plaque dans une deuxième expérience en présence et en absence S9 de foie de rats.	- Avec et sans S9 mix.	McClain <i>et al.</i> , 2006a
Test de mutations géniques sur souches TA98 et TA100 de <i>S. typhimurium</i>	Exposition à la génistéine en milieu acide (après un traitement aux nitrites)	-	Masuda <i>et al.</i> , 2012

- Tests du micronoyaux et d'aberrations chromosomiques sur cellules de mammifères

Souches	Conditions d'exposition (concentration/durée/activation métabolique)	Résultats	Références
Test du micronoyau (MN) sans CytB, coloration CREST Fibroblastes pulmonaires du hamster chinois mâle V79	5, 10, 18, 25, 50, 75µM Contrôles positifs MMS à 50µg/mL et vincristine à 10 nM. Un solvant diméthylsulfoxyde (DMSO) et un milieu témoin ont été réalisés en parallèle pour chaque test. Les cellules étaient traitées pendant 18 h (1,5 cycle cellulaire).	+	Virgilio <i>et al.</i> , 2004
Test du micronoyau (MN) sans CytB et coloration CREST sur fibroblastes pulmonaires de hamster chinois mâle V79. Cytotoxicité avec la sulforhodamine B	5, 10, 18, 25 µM, exposition pendant 6 h puis conservées dans un milieu frais pendant 6 à 24 h. Les cellules ont été étalées sur lames (150 000 cellules par lame). 2 000 cellules par lame ont été examinées pour détecter les signaux MN (coloration DAPI et PI) et CREST. Trois expériences indépendantes.	+	Kulling et Metzler, 1997
Test de micronoyaux en culture de lymphocytes sanguins périphériques humains	25 µM, exposition pendant 6 h	+	Kulling <i>et al.</i> , 1999
Test du micronoyau avec Cyt B sur lymphoblastoïdes humain AHH-1 et L3	0, 1, 5, 10 et 20 pg/mL, exposition pendant 24h	+	Morris <i>et al.</i> , 1998
Aberrations chromosomiques <i>in vitro</i> sur splénocytes de souris en culture	25 µM de génistéine.	+	Record <i>et al.</i> , 1995
Aberrations chromosomiques <i>in vitro</i> sur cellules HeLa 53	100 µM de génistéine pendant 2 et 4 heures.	+	Nakayama <i>et al.</i> , 2014
Aberrations chromosomiques sur cultures primaires de cellules SHE (à partir de fœtus de 13 jours de gestation).	12,5 ; 25 ; 50 µM Traitement pendant 24 heures	+ Avec cytotoxicité	Tsutsui <i>et al.</i> , 2003
Étude du micronoyau sur cellules d'hépatome HTC	10 µM Cytotoxicité MTT 24 h	-	Lepri <i>et al.</i> , 2013
Test de blocage du micronoyau par cytokinèse <i>in vitro</i> pour les cellules MCF-7	Exposition de 24h sans S9 mix à 10 ⁻⁷ et 10 ⁻⁸ M en génistéine. Contrôle positif BaP	-	Nasri et Pohjanvirta, 2021

Test du micronoyau L5178Y tk +/- lymphome de souris cellules (clone 3.7.2c)	30 pM Exposition pendant 5h plus 20h d'incubation, sans S9.		-	Schmitt <i>et al.</i> , 2003
---	--	--	---	---------------------------------

- Tests de mutations géniques sur cellules de mammifères

Souches	Conditions d'exposition (concentration/durée/activation métabolique)		Résultats	Références
Test à l'hypoxanthine guanine phosphoribosyl transférase (HPRT) sur fibroblastes pulmonaires de hamster chinois mâle V79	3 heures d'incubation		-	Kulling et Metzler, 1997
Test de mutation génique sur cellules de mammifères Lymphome de la souris L517BY Tk+/ OCDE TG 476	Temps d'exposition de 3 et 24 heures. Présence de S9 (temps d'exposition 3 heures). En l'absence de S9-mix, les cellules ont été traitées avec jusqu'à 60 et 7,5 pg/mL En présence de S9-mix, les expériences ont été réalisées jusqu'à une concentration maximale de 6,5 et 7,5 pg/mL		+	McClain et al., 2006b
Mutations génétiques dans les cellules lymphoblastoïdes humaines AHH-1 tk +/- (p53+/-) et L3 (p53+/-)	0, 1, 5, 10 et 20 pg/mL Exposition pendant 24 h. La fraction mutante au locus tk déterminée par la résistance au TFT et au locus Hprt par la 6-TG.		+	Morris et al., 1998
Test du lymphome de souris, locus Tk.	Exposition à des concentrations de génistéine de 2,5 à 20 pg /ml pendant 3 ou 24 heures en l'absence d'activation métabolique.		+	Zou et al., 2012
Test de mutations génétiques au niveau du locus Na ⁺ /K ⁺ ATPase ou hprt sur cellules SHE (à partir de fœtus âgés de 13 jours de gestation)	Cellules traitées 48h avec la génistéine et d'autres phytoestrogènes ou B[a]P pour les mutations du gène au niveau des locus Na ⁺ /K ⁺ ATPase ou hprt (résistance à Qua ou TG). Temps d'expression : 4 jours ; plus 7 jours pour la formation des colonies		+	Tsutsui <i>et al.</i> , 2003.

- Tests de dommages à l'ADN *in vitro* (tests des comètes, élution alcaline,...)

Souches	Conditions d'exposition (concentration/durée/activation métabolique)	Substance	Résultats	Références
Test d'élution alcaline de l'ADN Cellules V79	Exposition à la génistéine pendant 6 h.	Génistéine.	+	Kulling et Metzler, 1997
Cassures de l'ADN par le test des comètes sur fibroblastes pulmonaires de hamster chinois mâle V79	Exposition 3h, 100, 250 et 500 µM, Contrôles positifs H2O2. Rouge neutre et MTT - Traitement 24h.	Génistéine	-	Di Virgilio <i>et al.</i> , 2004
Dommages à l'ADN par le test des comètes sur leucocytes.	Cinq patients atteints de mucopolysaccharidose (MPS) de type IV A d'un âge moyen de 20ans, Leucocytes ont été traités pendant 6 heures avec 10, 30 et 50 pM de génistéine.	Solution mère (280 pM de génistéine et 0,05 % de DMSO)	+	Negretto <i>et al.</i> , 2014
Test alcalin <i>in vitro</i> des comètes sur les lymphocytes humains	Lymphocytes humains traités entre 10 et 50 µM.	Génistéine purifiée.	+	Ullah <i>et al.</i> , 2009 Efsa, 2015 ; VKM, 2017
Action antinéoplasique sur tissus thyroïdiens.	Cellules humaines de cancer papillaire de la thyroïde (CTP) traitées avec de la génistéine (1-10-50-100 µM). La viabilité cellulaire, la prolifération, les dommages primaires de l'ADN et les dommages chromosomiques ont été évalués.	Génistéine purifiée	-	Ullah <i>et al.</i> , 2009

Test des comètes HT29 clone 19 et cellules primaires du côlon	Exposition de 30 minutes à la génistéine 12,5-100 µM (cellules HT29), 12,5-50 µM cellules primaires de la muqueuse du côlon.	Génistéine de synthèse	+ Augmentation des cassures de brins Réponse à la dose dans les cellules HT29 (12,5-100 µM), - Dans les cellules primaires de la muqueuse du côlon, pas de SBS, pas d'oxydation de l'ADN (12,5-50 µM).	Pool-Zobel <i>et al.</i> , 2000
Test des comètes sur des spermatozoïdes humains Leucocytes isolés du sang périphérique (1 donneur masculin et 1 donneur féminin)	Concentrations de génistéine : 0, 1, 10, 25, 50, 100, µM Lymphocytes traités pendant 0,5 h : 2 études distinctes Spermatozoïdes traités pendant 1h : 3 études distinctes.	Génistéine	+	Anderon <i>et al.</i> , 1997
Test des comètes Lymphocytes isolés d'un donneur sain. Échantillon de sperme d'un	Comète : lymphocytes traités pendant 30 minutes à 37°C, sperme traité pendant 1 heure à 37°C à la génistéine. Viabilité vérifiée par exclusion au bleu de Trypan. Les valeurs du moment de la queue pour les lymphocytes et le % d'ADN de la tête pour les spermatozoïdes ont été déterminés.	Génistéine	+	Cemeli <i>et al.</i> , 2004,

autre donneur sain.				
Test alcalin des comètes <i>in vitro</i> cellules HT-29	Cellules cancéreuses du côlon HT-29 traitées avec 2 à 200 µM pendant 1 ou 48 heures.	Génistéine	+	Salti <i>et al.</i> , 2000 ; Efsa, 2015 ; VKM, 2017.
Test alcalin des comètes <i>in vitro</i>	Les tissus thyroïdiens ont été traités avec de la génistéine (1-10-50-100 µM). Exposition 4 et 24h. La viabilité cellulaire [...] Prolifération, les dommages primaires de l'ADN et les dommages chromosomiques ont été évalués.		-	Ferrari <i>et al.</i> , 2019

- Autres tests *in vitro*

Souches	Conditions d'exposition (concentration/durée/activation métabolique)		Résultats	Références
Effet inhibiteur de la génistéine sur les topoisomérases I et II de l'ADN (topo I et II) isolées du carcinome du côlon humain HCT116	Activité inhibitrice potentielle de la génistéine sur les ADN topoisomérases I et II (topo I et II) purifiées du placenta humain.		+	Mizushina <i>et al.</i> , 2013
Essai de transformation cellulaire (CTA) Des cultures de cellules SHE ont été établies à partir de fœtus de 13 jours de gestation.	Cellules traitées avec de la génistéine et d'autres phytoœstrogènes ou avec du B[a]P pendant 48 heures.		+	Tsutsui <i>et al.</i> , 2003
Essai de transformation cellulaire (CTA) Essai standard d'exposition SHE sur 7 jours	Génistéine testée (avec l'hémisulfate de métoprotérénol, la p-anisidine, le résorcinol, la roténone et le benzo[a]pyrène) à 2-4 µg/ml (pH 6,7, la concentration maximale a été limitée par la cytotoxicité). Traitement continu pendant 7 jours		-	Harvey <i>et al.</i> , 2005
Adduits à l'ADN par post-marquage au 32P Des cultures de cellules SHE ont été établies à partir de fœtus de 13 jours de gestation	Génistéine 12,5, 25 et 50 µM pendant 24 h cochromatographie		+	Tsutsui <i>et al.</i> , 2003

- Etudes sur micronoyaux et d'aberrations chromosomiques *in vivo* (OCDE TG 474) :

Souches	Conditions d'exposition (concentration/durée/activation métabolique)	Résultats	Références
Test du micronoyau <i>in vivo</i> chez la souris et des rats	3 tests indépendants <i>in vivo</i> du micronoyau de la moelle osseuse effectués sur des souris Moro traitées par voie orale pendant 14 jours à des doses de 0,2, 2 et 20 mg.kg pc ⁻¹ .j ⁻¹ , chez des rats RAlf (500, 1000 et 2000 mg.kg ⁻¹ dans une solution aqueuse de carboxyméthylcellulose à 0,5 %) et des rats Wistar traités par voie orale une fois par jour. Rats Wistar traités par voie orale une fois à la dose unique de 2000 mg.kg ⁻¹ (avec des récoltes à 24 et 48 heures). Les concentrations sanguines de génistéine totale mesurées lors du test du micronoyau effectué chez les mâles et les femelles Wistar étaient respectivement de 40, 313 et 24 940 nmol/L.	-	McClain <i>et al.</i> , 2006a
Test du micronoyau <i>in vivo</i> chez la souris	Les effets de la génistéine ont été étudiés chez des souris femelles C57BL/6J (âgées d'environ 8 semaines) auxquelles on a administré par voie orale 20 mg.kg pc ⁻¹ .j ⁻¹ de génistéine pendant 5 jours.	-	Record <i>et al.</i> , 1995
Induction <i>in vivo</i> d'aberrations chromosomiques chez les	Administration de la génistéine seule ou après un traitement au nitrite dans des conditions acides lors d'un test <i>in vivo</i> du micronoyau dans les cellules du sang périphérique de souris mâles ICR.	-	Masuda <i>et al.</i> , 2012

- Tests des comètes et de dommages à l'ADN *in vivo*

Souches	Conditions d'exposition (concentration/durée/activation métabolique)	Résultats	Références
Test des comètes avec modification Fpg sur les cellules de la muqueuse gastrique Effets de l'administration conjointe de génistéine et de NaNO ₂	Génistéine dissoute dans une solution saline - administration orale à la dose de 1 mg.kg pc ⁻¹ (souris n = 5/ groupe) et 10 mg.kg ⁻¹ de NaNO ₂ Test des comètes modifié par le taux de glycémie à 3 heures avec la génistéine seule et 1, 3 et 6 heures après la co-administration avec le NaNO ₂ . Moment de la queue Mesure de la 8-oxodG nucléaire SOD, histopathologie	- Administration unique 3h d'exposition négative. + Administration conjointe de génistéine et de NaNO ₂ a augmenté de manière significative les dommages à l'ADN.	Toyoizumi <i>et al.</i> , 2010

- Etudes de mutations géniques *in vivo* et autres tests :

Souches	Conditions d'exposition (concentration/durée/activation métabolique)	Résultats	Références
Essai de tumorigénèse chez la souris p53-/-, souris mâles femelles	40 souris p53-/- mâles et 40 femelles (âgées de 4 à 6 semaines ; 20 souris avec un régime de contrôle et 20 souris avec régime contenant 0,04 % de génistéine (50 à 60 mg.kg pc ⁻¹ .j ⁻¹) pendant environ 100 jours. Tissus prélevés pour l'histopathologie (cerveau, glande salivaire, structures nasales, ganglions lymphatiques mandibulaires et mésentériques, pancréas, hypophyse, glande surrénale, thyroïde, parathyroïde, trachée/œsophage, thymus, foie, vésicule biliaire, rate, poumon, cœur, peau abdominale droite avec glandes mammaires, estomac, jéjunum, côlon, duodénum, iléon, cæcum, rectum, vessie urinaire, rein, fémur, testicule/épididyme, vésicule séminale, vessie/prostate ou ovaire, corne utérine)	-	Misra <i>et al.</i> , 2002
Mutation génétique <i>in vivo</i> chez le rat Rats femelles Big Blue	Rats Big Blue femelles traités avec 80 mg.kg pc ⁻¹ de DMBA. Certains rats ont également reçu un supplément de 1 000 ppm de génistéine (environ 20 mg.j ⁻¹). Seize semaines après le traitement, les rats ont été sacrifiés, leurs foies ont été prélevés et les fréquences de mutants (MF) et les types de mutations ont été déterminés dans le gène cII du foie.	-	Chen <i>et al.</i> , 2005
Essai de mutagénèse Lacl dans des cellules utérines chez des rats transgéniques Big Blue femelles (âgées de 3 semaines)	Différents groupes de traitement (n = 5 rats pour l'étude de mutagenèse et 10 rats pour l'étude de cancérogenèse par groupe) ont été nourris avec un régime contenant 250 ppm ou 1 000 ppm de génistéine, jusqu'à la fin des expériences. En même temps, 2 groupes de rats ont été gavés avec une dose unique (1 ml) de 80 mg.kg ⁻¹ de DMBA, et les 2 autres groupes ont été gavés avec un volume égal d'huile de sésame. À l'âge de 9 semaines, un groupe de rats traités au DMBA ou contrôlés par le véhicule a subi une ovariectomie bilatérale. Les utérus ont été récoltés et pesés pour l'essai de mutagenèse lacl à 23 semaines (16 semaines après le traitement au DMBA) et à 27 semaines (20 semaines après le traitement au DMBA) pour l'étude de la cancérogénèse. Une analyse de l'antigène nucléaire des cellules proliférantes/apoptose dans les tissus utérins et une analyse histopathologique ont été réalisées.	-	Aidoo <i>et al.</i> , 2005
Mutation de gènes chez des rats transgéniques Big Blue femelles (âgées de 3 semaines) Essai de mutagenèse lacl dans les cellules de la glande mammaire	Différents groupes de traitement (n = 5 rats pour l'étude de mutagenèse et 10 rats pour l'étude de cancérogenèse par groupe) ont été nourris avec un régime contenant 250 ppm ou 1 000 ppm de génistéine, jusqu'à la fin des expériences. Au 50e jour postnatal (PND50), 2 groupes de rats ont été gavés avec une dose unique (1 mL) de 80 mg.kg ⁻¹ de DMBA, et les 2 autres groupes ont été gavés avec un volume égal d'huile de sésame. Deux semaines après le traitement au DMBA, les rats ont été divisés en deux groupes et ont été soit ovariectomisés bilatéralement (OVX), soit laissés sans traitement (INT).	-	Manjanatha <i>et al.</i> , (2006).

	Les glandes mammaires ont été prélevées et pesées pour l'essai de mutagenèse lacl à 23 semaines d'âge (16 semaines après le traitement au DMBA) et à 27 semaines (20 semaines après le traitement au DMBA) pour l'étude de la cancérogénèse. L'analyse de l'antigène nucléaire des cellules proliférantes/apoptose dans les tissus des glandes mammaires et l'analyse histopathologique ont été réalisées.			
Mutations génétiques chez des rats transgéniques Big Blue femelles (âgées de 3 semaines) Essai de mutagenèse du gène Hprt dans des lymphocytes isolés de la rate et cultivés pendant 2 jours	Différents groupes de traitement (n = 5 rats pour l'étude de mutagenèse et 10 rats pour l'étude de cancérogénèse par groupe) ont été nourris avec un régime contenant 250 ppm ou 1 000 ppm de génistéine, jusqu'à la fin des expériences. A PND50, 2 groupes de rats ont été gavés avec une dose unique (1 ml) de 80 mg.kg ⁻¹ de DMBA, et les 2 autres groupes ont été gavés avec un volume égal d'huile de sésame. Deux semaines après le traitement au DMBA, les rats ont été divisés en deux groupes et ont été soit ovariectomisés bilatéralement (OVX), soit laissés sans traitement (INT). Les glandes mammaires ont été prélevées et pesées pour l'essai de mutagenèse lacl à 23 semaines d'âge (16 semaines après le traitement au DMBA) et à 27 semaines (20 semaines après le traitement au DMBA) pour l'étude de la cancérogénèse. Analyse de l'antigène nucléaire des cellules proliférantes/apoptose dans les lymphocytes de la rate et analyse histopathologique		-	Manjanatha <i>et al.</i> , 2006
Mutation génétique <i>in vivo</i> chez le rat sur des rats Big Blue	Des rats femelles ont reçu 80 mg.kg ⁻¹ de DMBA ou de véhicule par gavage et ont été nourris de façon chronique avec des régimes contenant 0, 250 ou 1000 µg.g ⁻¹ de génistéine ou 5 µg.g ⁻¹ d'E2. Seize semaines après le traitement carcinogène, les animaux ont été sacrifiés et les cœurs ont été prélevés et traités pour déterminer la fréquence et les types de mutations dans le tissu cardiaque.		-	Manjanatha <i>et al.</i> (2005).
Test d'échange de chromatides sœurs dans la moelle osseuse Souris ICR femelles Adduits à l'ADN Post-marquage au 32P Dans le foie et les glandes mammaires	Deux groupes de 5 souris ont été prétraités par voie i.p. avec : (i) DMSO (solvant de contrôle) ; (ii) génistéine ; (iii) daïdzéine ; ou (iv) une combinaison de daïdzéine et de génistéine. L'un des deux groupes prétraités de manière identique a ensuite reçu un traitement au DMBA (50 mg.kg ⁻¹) et l'autre n'a reçu que le solvant, le DMSO. Génistéine : 10 ou 20 mg.kg ⁻¹ .j ⁻¹ pendant 6 jours, la dernière dose étant administrée juste avant le traitement au 5-bromodésoxyuridine (BrdU), ou 50 mg.kg ⁻¹ à 12 heures d'intervalle pendant 3 jours, la cinquième dose étant administrée juste avant le traitement au BrdU.		+	Giri <i>et al.</i> , 1995
Action sur les topoisomérase II <i>in vivo</i> . Des rats mâles juvéniles wistar mâles juvéniles	Les rats Wistar ont reçu soit une dose unique de génistéine par voie sous-cutanée (s.c. ; 10 mg.kg ⁻¹ BW), soit un régime riche en isoflavones tout au long de leur vie, comprenant la phase <i>in utero</i> , la phase de lactation et 10 jours de consommation orale, alors que la génistéine était principalement absorbée sous forme de glycosides (25-50 mg.kg pc ⁻¹). Les effets des complexes covalents topoisomérase II-ADN dans le duodénum et le côlon ont été mesurés à l'aide du test biologique « <i>Isolation of in vivo complexes of enzyme to DNA</i> » (ICE).		+	Baechlar <i>et al.</i> , 2016

DAIDZEINE

- Test de mutations génique sur bactéries (test d'Ames)

Souches	Conditions d'exposition (concentration/durée/activation métabolique)	Résultats	Références
<i>S. typhimurium</i> TA98 et TA100	Pas de donnée sur les concentrations utilisée. La daïdzéine a probablement été testée à des concentrations allant jusqu'à 200 µg/plaque	-	Sugimura <i>et al.</i> , 1981
<i>S. typhimurium</i> TA98, TA100 TA1538	0, 1, 10, 50, 100 µg/plaque	-	Bartholomew <i>et al.</i> , 1980

- Tests du micronoyaux et d'aberrations chromosomiques sur cellules de mammifères :

Souches	Conditions d'exposition (concentration/durée/activation métabolique)	Résultats	Références
Test du micronoyau (MN) sans CytB et avec coloration CREST Fibroblastes pulmonaires V79 de hamster chinois Cytotoxicité évaluée avec la sulforhodamine B	Cytotoxicité : jusqu'à 100 µM Test MN : 100 µM Les cellules ont été exposées pendant 6 heures, puis conservées dans un milieu frais pendant 6 à 24 heures supplémentaires. Les cellules ont été placées sur des lames de verre de microscope stériles dans un flacon quadriperme (30 000 cellules/mL de DMEM, 5 mL correspondant à 150 000 cellules par lame). 2000 cellules par lame ont été examinées pour les signaux MN (coloration DAPI et PI) et CREST. Trois expériences indépendantes.	Non concluant	Kulling, 1997
Test du micronoyau Cellules de lymphome de souris L5178Y tk+/- (clone 3.7.2c)	0, 25, 50, 100 µM (la limite de solubilité) Exposition pendant 5h plus incubation de 20h, sans mélange S9. Coloration à l'acridine orange. n = 3 La MMC a été utilisée et la génistéine (30 µM) a été utilisée comme contrôle positif dans les expériences testant les métabolites.	Non concluant	Schmitt, 2003
Aberrations chromosomiques Les cultures de cellules SHE ont été établies à	Des cellules dans des flacons de 75 cm ² ont été traitées avec de la daïdzéine (50, 100, 200 µM) pendant 24 heures. Trois heures avant la récolte, du colcemid a été administré et des chromosomes en métaphase ont été préparés. Pour la détermination des aberrations chromosomiques, 100 métaphases ont été notées par groupe expérimental.	-	Tsutsui <i>et al.</i> , 2003

partir de fœtus de 13 jours de gestation.				
Test du micronoyaux sur cellules v79	Daidzéine à 0,1, 1 ou 10 µM avec la doxorubicine à 0,2 µM ou le 2-aminoanthrace à 13 µM. 1000 cellules binucléées ont été notées sur des lames codées lors de trois répétitions expérimentales (1000 cellules par traitement). Cytotoxicité avec réduction du MTT : 0,1, 1, 10, 50 et 100 µM pendant 24 h.		Non concluant	Lepri <i>et al.</i> , 2013
Test du micronoyaux sur lymphocytes humains en culture	Test des micronoyaux en présence et en l'absence d'activation métabolique Foie de rat induit par l'Aroclor 1254, Traitement 4h avec et sans S9 mix 4 h, concentrations 125, 62,5, 31,25, 15,63 µg/mL ; 24 traitements sans S9-mix 125 - 62,5, 31,25, 15,63, 7,81 µg/mL. Contrôle positif avec S9-mix cyclophosphamide 10 µg/mL ; sans S9-mix mitomicyn C 0,15 (4h de traitement), et pour 24h de traitement mitomicyn C 0,075 µg/mL et griséofulvine 10 µg/mL. 2000 cellules par échantillon ont été évaluées.		-	Study report Number FSR-IPL 220304, INSTITUT PASTEUR DE LILLE, Genetic Toxicology Laboratory, 2022

- Tests de mutations géniques sur cellules de mammifères

Souches	Conditions d'exposition (concentration/durée/activation métabolique)		Résultats	Références
Test de l'hypoxanthine guanine phosphoribosyltransférase (HPRT) Fibroblastes pulmonaires V79 de hamster chinois	Les cellules ont étéensemencées dans un flacon de culture cellulaire de 250 mL et incubées pendant 24 h. Le milieu a ensuite été retiré et les cellules ont été incubées avec de la daïdzéine à 100 µM pendant 3 h dans du DMEM sans FCS. Période d'expression de 6 jours Fréquence de mutation représentée par le nombre de mutants résistants à la 6-TG pour 106 cellules viables.		Non concluant	Kulling <i>et al.</i> , 1997
Mutations génétiques au niveau des loci Na ⁺ /K ⁺ ATPase ou Hprt SHE cultures cellulaires établies à partir de fœtus de 13 jours de gestation	Durée d'expression : 4 jours ; plus 7 jours pour la formation de colonies		Equivoque	Tsutsui <i>et al.</i> , 2003

- Tests de dommages à l'ADN *in vitro* (tests des comètes, élution alcaline,...)

Souches	Conditions d'exposition (concentration/durée/activation métabolique)	Résultats	Références
Les cassures d'ADN ont été analysées par la technique d'élution sur filtre alcalin (Kohn <i>et al.</i> , 1981). Cellules V79	3 x 10 ⁶ cellules V79 par flacon placées dans des flacons de culture cellulaire de 650 ml ont été cultivées pendant 48 h, puis exposées à la daïdzéine pendant 6 h. Les fractions éluées des filtres ont été analysées pour l'ADN par la méthode fluorométrique Hoechst 33258	-	Kulling <i>et al.</i> , 1997
Test des comètes sur des spermatozoïdes humains et des leucocytes isolés du sang périphérique (1 donneur masculin et 1 donneur féminin)	Paramètres de mesure de la comète	+	Anderson <i>et al.</i> , 1997
Test des comètes sur des spermatozoïdes humains Les échantillons provenaient de donneurs fertiles et infertiles : deux étaient des échantillons frais et les quatre autres ont été reçus congelés (au total 6 donneurs).	Concentrations de daïdzéine : 0, 10, 50, 100 µM La durée d'exposition des spermatozoïdes n'est pas claire.	+	Anderson <i>et al.</i> , 1997
Test des comètes Lymphocytes isolés d'un donneur sain. Échantillon de sperme d'un autre donneur sain.	Lymphocytes et le % d'ADN de la tête pour les spermatozoïdes ont été déterminés. En raison des niveaux élevés de dommages de fond dans les spermatozoïdes (environ 15-30%), le % d'ADN de tête a été utilisé pour l'analyse statistique comme indicateur des ruptures de brins induites.	+	Cemeli <i>et al.</i> , 2004.
Test des comètes ± formamido-pyrimidine ADN glycosylase (FPG) Lignée cellulaire de carcinome du côlon humain HT29	>80% tout au long de l'expérience des comètes. Cytotoxicité évaluée 24 h, par libération de LDH et réduction de la WST-1	-	Baechler <i>et al.</i> , 2014
Test des comètes MIA Cellules humaines de carcinome pancréatique PaCa-2 et cellules humaines de cancer du côlon HT-29	Test des comètes : cellules incubées avec la concentration IC50 (200 µM) de daïdzéine pendant 48 h. Au moins 50 comètes sélectionnées au hasard sur chaque lame en trois exemplaires ont été capturées, la longueur de la queue des comètes a été mesurée à l'aide de Comet Assay IV Version 4.3.2. Cytotoxicité : Test de réduction XTT : 25 µM - 1 mM après 24 h et 48 h d'exposition.	Équivoque	Gundogdu <i>et al.</i> , 2018

- Autres test *in vitro*

Souches	Conditions d'exposition (concentration/durée/activation métabolique)	Résultats	Références
Essai de transformation cellulaire (CTA) Des cultures de cellules SHE ont été établies à partir de fœtus de 13 jours de gestation.	Cellules traitées avec de la daïdzéine à 50, 100 ou 200 µM ou du B[a]P à 4 µM pendant 48 heures. Ensuite, les cellules ont été trypsinisées, une partie de la suspension cellulaire a été analysée pour la transformation morphologique, et les cellules restantes ont été sous-cultivées pour les expériences de mutation. Pour la transformation, 2 000 cellules ont été replacées sur des boîtes de 100 mm (20 boîtes pour chaque groupe) et incubées pendant 7 jours pour la formation de colonies.	+	Tsutsui <i>et al.</i> , 2003
Adduits à l'ADN par post-marquage au ³² P Des cultures de cellules SHE ont été établies à partir de fœtus de 13 jours de gestation	Des cellules dans des flacons de 75 cm ² ont été traitées avec de la daïdzéine (50, 100, 200 µM) pendant 24 heures.	+	Tsutsui <i>et al.</i> , 2003

- Etudes de mutations géniques *in vivo* sur mammifères

Souches	Conditions d'exposition (concentration/durée/activation métabolique)	Résultats	Références
Mutations génétiques chez les rats transgéniques Big Blue femelles (âgées de 3 semaines) Essai de mutagenèse lacI dans des cellules utérines	Groupe I (INT) : des séries de n = 5 rats/groupe pour l'étude de mutagenèse ont été nourris avec des régimes contenant 250 ppm ou 1 000 ppm de daïdzéine, jusqu'à la fin des expériences. Groupe II (OVX) : au même moment, des groupes de rats ont été gavés avec 250 ppm ou 1 000 ppm de daïdzéine et, à l'âge de 9 semaines, ont subi une ovariectomie bilatérale. Les utérus ont été prélevés pour l'essai de mutagenèse lacI à 23 semaines dans les deux groupes.	-	Aidoo <i>et al.</i> , 2005
Mutations génétiques chez les rats transgéniques Big Blue femelles (âgées de 3 semaines) Essai de mutagenèse lacI dans les cellules de la glande mammaire	Groupe I (INT) : n = 5 rats par groupe pour l'étude de mutagenèse ont été nourris avec des régimes contenant 250 ppm ou 1 000 ppm de daïdzéine, jusqu'à la fin des expériences. Groupe II (OVX) : au même moment, des groupes de rats ont été gavés avec 250 ppm ou 1 000 ppm de daïdzéine et, à l'âge de 9 semaines, ont subi une ovariectomie bilatérale. Les glandes mammaires ont été prélevées pour le test de mutagenèse lacI à l'âge de 23 semaines dans les deux groupes.	-	Manjanatha <i>et al.</i> , 2006
Mutations génétiques chez des rats transgéniques Big Blue femelles (âgées de 3 semaines) Essai de mutagenèse du gène Hprt dans des lymphocytes isolés de la rate et cultivés pendant 2 jours	Groupe I (INT) : n = 5 rats par groupe pour l'étude de mutagenèse ont été nourris avec des régimes contenant 250 ppm ou 1 000 ppm de daïdzéine, jusqu'à la fin des expériences. Groupe II (OVX) : en même temps, des groupes de rats ont été gavés avec 250 ppm ou 1 000 ppm de daïdzéine et, à l'âge de 9 semaines, ont subi une ovariectomie bilatérale. Les lymphocytes ont été récoltés pour le test de mutagenèse Hprt à l'âge de 23 semaines dans les deux groupes.	-	Manjanatha <i>et al.</i> , 2006

- Tests comètes *in vivo*

Souches	Conditions d'exposition (concentration/durée/activation métabolique)	Résultats	Références
Test des comètes avec modification des FpG sur des cellules de la muqueuse gastrique de souris Les effets de l'administration conjointe de daïdzéine et de NaNO ₂ ont également été étudiés.	La daïdzéine dissoute dans une solution saline a été administrée par voie orale à raison de 1 mg.kg pc ⁻¹ (souris n = 5/groupe). Test des comètes modifié par le FPG 3 heures après l'administration de la daïdzéine. Cinquante cellules ont été examinées par souris (250 cellules par groupe). Le moment de queue de l'ADN a été mesuré à l'aide du logiciel Comet Analyzer Youworks Bioluming. Mesure de la 8-oxodG nucléaire après administration conjointe de daïdzéine (1 mg.kg ⁻¹) et de NaNO ₂ (10 mg.kg ⁻¹).	Non concluant	Toyozumi <i>et al.</i> , 2010

- Autres tests *in vivo*

Souches	Conditions d'exposition (concentration/durée/activation métabolique)	Résultats	Références
Test d'échange de chromatides sœurs dans la moelle osseuse Souris ICR femelles	Des groupes de 5 souris ont été prétraités i.p. avec du DMSO (contrôle du solvant) ou de la daïdzéine à 3 doses : 10 ou 20 mg.kg ⁻¹ .j ⁻¹ pendant 6 jours, la dernière dose étant administrée juste avant le traitement au 5-bromodésoxyuridine (BrdU), ou 50 mg.kg ⁻¹ à 12 heures d'intervalle pendant 3 jours, la cinquième dose étant administrée juste avant le traitement au BrdU (6x50 mg.kg pc ⁻¹).	+/-	Giri and Lu, 1995

Annexe 4 : Grille d'évaluation du niveau de confiance de la VTR orale long terme pour la population générale

Substance		Génistéine	
N° CAS		446-72-0	
Type de VTR		long terme par voie orale	
VR	Organisme constructeur	ANSES	
	Année	2024	
	Nom	VTR pour la génistéine	
	Valeur	0.02 mg/kg pc par jour	
Effet critique		Augmentation de l'incidence de l'hyperplasie alvéolaire et canalaire de la glande mammaire chez les rats mâles de la génération F0	
Etude clé	Référence	NTP 2008	
	Population de l'étude, espèce	Rat NCTR CD (Sprague-Dawley)	
	Exposition (durée, voie)	De PND42 à PND140 (F0)	
PoD	NOAEL = 5,9 mg/kg par jour		
Ajustement temporel	non		
Ajustement allométrique	$(0,426/70)^{0.25}$		
Facteurs d'incertitude (FI)	Fla=	2.5	
	Fih=	10	
	FIL :	1	
	FIS :	√10	
	FID :	1	
	Fl global =	79	
Read-across	non		
		Experts	
		Niveau de confiance	Date d'évaluation : 28/06/2024
Corpus de données	Quantité et qualité pour la voie et la durée considérée	5	Nombreuses études disponibles tant animales que humaines sur les isoflavones, et la génistéine en particulier
Choix de l'effet critique	Caractère néfaste de l'effet	5	
	Convergence des études	1	les jeunes garçons semblent moins sensibles que les jeunes filles aux effets œstrogéniques des isoflavones, bien que les études ne soient pas toutes convergentes. Il y a peu de cas publiés de gynécomastie liée à une consommation élevée en soja chez l'homme adulte ou chez les garçons.
	Transposabilité Animal --> Homme et MoA (mode d'action)	4	On note également des différences de métabolisation des isoflavones entre le rongeur et l'Homme,
	Confiance pour le critère "choix de l'effet critique"	3.3	
Hypothèse de construction	À seuil par défaut		
Choix de l'étude (ou des études) clé	Qualité de l'étude	5	l'étude du NTP de 2008 est de bonne qualité avec plusieurs doses testées sur plusieurs générations
	Voie exposition	5	Adéquate
	Durée	5	l'étude couvre une durée d'exposition suffisante,
	Confiance pour le critère "choix de l'étude clé"	5.0	
Choix du PoD	BMD/BMDL, couple NOAEL/LOAEL, NOAEL seul ou LOAEL seul, fonction Exposition-Risque (E-R)	fonction E-R modérée ou LOAEL/NOAEL (forte confiance)	3
Ajustements	Temporel		
	Allométrique	Ajustement avec valeurs des coefficients par défaut	1
Choix FI	Fl _A		
	Fl _H	1	
	Fl _L		
	Fl _S		
	Fl _D		
LIGNES MASQUEES	si C11 = Homme	somme	20.7
		niveau	3.4
	si C11 = Animal	somme	21.7
		niveau	3.1
Niveaux de confiance	Niveau de confiance global	valeur	3.1
		Niveau	Moyen
	si read-across : possibilité de baisser éventuellement (jugement d'experts)	valeur	
		Niveau	

Annexe 5 : Grille d'évaluation du niveau de confiance de la VTR orale long terme pour la femme enceinte (enfants à naître), la femme en âge de procréer et les enfants pré-pubères

Génistéine 446-72-0		Outil de fixation des niveaux de confiance pour les VTR à seuil	
long terme par voie orale ANSES 2024 VTR pour la génistéine 0.01 mg/kg pc par jour diminution du poids relatif des épидидymes chez les mâles et diminution de la taille de la portée chez les femelles Eustache 2009 Rats wistar han De la gestation jusqu'au jour postnatal 80. LOAEL = 1 mg/kg par jour non (0,25/70)^0.25 FIA-TD : 2,5 FIH : v10 FIL : v10 FIS : 1 FID : 1 FI global =25 non			
		Experts	
		Date de l'évaluation : 28.6.24	
		Niveau de confiance	Argumentation de l'évaluateur
Quantité et qualité pour la voie et la durée considérée	4	Nombreuses études disponibles tant animales que humaines sur les isoflavones, et la génistéine en particulier,	
Caractère néfaste de l'effet	5		
Convergence des études	3	les effets des isoflavones sur l'appareil reproducteur masculin sont décrits dans de nombreuses publications. Néanmoins, il manque des données humaines,	
Transposabilité Animal --> Homme et MoA (mode d'action)	4	Il manque des données humaines	
Confiance pour le critère "choix de l'effet critique"	4.0		
À seuil par défaut			
Qualité de l'étude	4	L'étude de Eustache <i>et al.</i> de 2009, jugée de bonne qualité, couvre une durée d'exposition suffisante mais ne comporte que deux doses,	
Voie exposition	5	une voie d'exposition adéquate	
Durée	5	durée d'exposition suffisante	
Confiance pour le critère "choix de l'étude clé"	4.7		
BMD/BMDL, couple NOAEL/LOAEL, NOAEL seul ou LOAEL seul, fonction Exposition-Risque (E-R)	fonction E-R faible ou NOAEL ou LOAEL	1	cette étude permet d'identifier un LOAEL
Temporel			
Allométrique	Ajustement avec valeurs des coefficients par défaut	1	
FI _A			
FI _H	3	la littérature est suffisamment abondante sur ces populations sensibles pour réduire le FIH.	
FI _L			
FI _S			
FI _D			
si C11 = Homme	somme	20.7	
	niveau	3.4	
si C11 = Animal	somme	21.7	
	niveau	3.1	
Niveau de confiance global	valeur	3.1	
	Niveau	Moyen	
si read-across : possibilité de baisser éventuellement (jugement d'experts)	valeur		
	Niveau		



AGENCE NATIONALE DE SÉCURITÉ SANITAIRE
de l'alimentation, de l'environnement et du travail

14 rue Pierre et Marie Curie 94701 Maisons-Alfort Cedex
Tél : 01 42 76 40 40
www.anses.fr — @Anses_fr