

Management of phytoestrogens in laboratory animal diets

Varloud M.¹, Martel D.², Combrisson H.³, Couture A.F.⁴, Guyonvarch A¹.

¹IN VIVO NSA Research & Development, Saint-Nolff; ²SAFE, Augy; ³National Veterinary School, Maisons-Alfort, France, ⁴Immunology and Cancer Research Institute, University of Montreal, Canada.

Estrogens are steroid hormones which primarily promote the development of secondary sexual characteristics of females and the functioning of their reproductive system. These hormones also influence the growth, differentiation, and functioning of many other target tissues, such as those involved in reproductive organs of males, bone maintenance, central nervous and cardiovascular systems. They have various metabolic effects and can interfere with different hormonal pathways.

These hormones are retained with high affinity and specificity in target cells which contain intranuclear binding proteins: the estrogen receptors (ER α and ER β). Once bound to the estrogens, the ER conformation is modified, it interacts with chromatin and modulates the transcription of target genes. However, the ER specificity is not perfect: it acts like a lock that can be opened by several keys. Several molecules can have an estrogenic-like activity and bind to ER. ER α and ER β differ in term of specificity and action. Therefore, depending of the estrogen-like molecule and of its affinity with ER α or ER β , the final effect can differ (Kuiper et al., 1998). These molecules have to be taken into account by scientists as they can be present naturally - or not - in the environment of laboratory animals. Such contamination has been recognised as a major problem, and therefore well documented, especially because it can deeply influence the results of toxicological studies (Muhlhauser et al., 2009). Contamination by estrogen-like molecules is also recognised as a potential source of uncontrolled variation in a large

range of studies (cancer, cardiovascular, lipid and cholesterol investigations, diabetes and other endocrine studies, bone metabolism, immunology, gene expression and central nervous system studies), as stated by Mickelson (2009).

The molecules with potential of estrogenic-like activity can be classified according to their origin and chemical structure. We distinguish environmental chemicals, such as some pesticides or components of plastic, phytoestrogens produced by plants and mycoestrogens produced by fungi which can grow on organic raw materials and feeds. Estrogen-like active molecules and their precursors are therefore naturally present in several plant and plant containing products. From a structural point of view, they belong to six classes of polyphenols, more or less similar to estradiol (isoflavonoïds, coumestans, flavonoids, stilbens, lignans, and enterolignans) (Afssa, 2005). Isoflavonoïds are from far the best known and have been extensively studied.

For laboratory animals, contamination by estrogen-like molecules can occur in environmental pools: such as diets, polluted water (Kuster et al., 2009), cages (Howdeshell et al., 2003), and beddings (Schoental, 1974). Today, the prevention of experimental errors related to uncontrolled contamination of the environment of laboratory animals by estrogen-like molecules is mainly focused on diet contamination (Thigpen et al., 2004) and based on three strategies:

- exclusion from diet formulas of raw materials identified as main sources of estrogen-like molecules,

- exclusive use of purified diets,
- use of diets with pre-determined levels of some estrogen-like molecules.

Generally, the suspicion for contamination by estrogen-like active molecule focuses on some vegetal raw materials, mainly soybean meal and alfalfa, that have been recognised as sources of isoflavonoids and coumestans. This assumes that soybean meal and alfalfa are the only dietary sources of estrogen-like molecules. However, a large number of materials represent potential sources of such substances. For example, vegetable oils, linseed, wheat and barley are recognised sources of phytoestrogens. These plant materials are extensively used in laboratory animal diets. Some animal products, such as milk, can also contain estrogen-like substances (Kuhnle et al., 2008). Formulation of a chow diet free of phytoestrogen would therefore represent an unrealistic challenge. For this reason, some recommend the exclusive use of purified diet made with "refined ingredients". Nevertheless, purified ingredients replacing standard ingredients can also contain estrogen-like substances, as demonstrated in mouse bioassays (Thigpen et al., 1987).

Some diet manufacturers and scientists also worked in the aim of lowering the uncontrolled contamination by estrogenic compounds through classification of diets in determined ranges of chosen molecules. Today, chow diets with determined ranges of cumulative levels of some isoflavones (genistein, daidzein, glycitein) are available on the market. However, this supposes that each molecule has the same potency. Such an hypothesis is questionable since the estrogenic-like activities of genistein, daidzein and glycitein, strongly differ. Additional elements should be taken into account, like the estrogenic-like activity of other molecules than isoflavonoids, their biodisponibility, as well as potential interactions. Enlarging the list of molecules and providing a guaranty on the estrogenic-like activity levels in diets would represent a way to improve the experimental protocols. However, this supposes an exhaustive knowledge of the active molecules and their potential precursors, associated with important analytical investments.

As recommended by Ashby et al. in 2000, "the estrogenic activity of rodent diets cannot be determined solely by reference to their reported phytoestrogen/soy content".

The management of estrogenic activity of diets represents a much more complex question, which should be addressed by a close collaboration of scientists and laboratory animal diet manufacturers. When required, the whole biological estrogenicity of diets should be checked prior to their inclusion in experimental designs (Heindel and vom Saal, 2008).

Reference

- AFSAA, 2005. *Rapport. Sécurité et bénéfices des phyto-oestrogènes apportés par l'alimentation. Recommandations.*/
- Ashby et al., 2000. *Uterotrophic Activity of a "Phytoestrogen-Free" Rat Diet.* *Environmental Health Perspectives.* 108:A12-A13/
- Heindel & vom Saal, 2008. *Meeting report: batch to batch variability in estrogenic activity in commercial animal diets – Importance and approaches for laboratory animal research.* *Environmental Health Perspectives.* 116:389-393/
- Howdeshell et al., 2003. *Bisphenol A is released from used polycarbonate animal cages into water at room temperature.* *Environmental Health Perspectives.* 111:1180-1187/
- Kuhnle et al., 2008. *Phytoestrogen content of foods of animal origin : dairy products, eggs, meat, fish and seafood.* *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 56:10099-10104/
- Kuiper et al., 1998. *Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor α .* *Endocrinology.* 139:4252-4263/
- Kuster et al., 2009. *Analysis of phytoestrogens, progestogens and estrogens in environmental waters from Rio de Janeiro (Brazil).* *Environment International.* 35:997-1003/
- Muhlhauser et al., 2009. *Bisphenol A effects on the growing mouse oocyte are influenced by diet.* *Biology of reproduction.* 80:1066-1071/
- Mickelson, 2009. *Formula for success.* *ALN magazine.* Nov-Dec/
- Schoental, 1974. *Zearalenone in the diet, podophyllotoxin in the wood shavings bedding, are likely to affect the incidence of "spontaneous" tumours among laboratory animals.* *British Journal of Cancer.* 30:181/
- Thigpen et al., 1987. *The mouse bioassay for the detection of estrogenic activity in rodent diets: II. Comparative estrogenic activity of purified, certified and standard open and closed formula rodent diets.* *Laboratory Animal Science.* 37:602-605/
- Thigpen et al., 2004. *Selecting the appropriate rodent diet for endocrine disruptor research and testing studies.* *ILAR Journal.* 45:401-416.

Pour une maîtrise des phyto-oestrogènes dans les aliments des animaux de laboratoire

Varloud M.¹, Martel D.², Combrisson H.³, Couture A.F.⁴, Guyonvarch A¹.

¹IN VIVO NSA Recherche et Développement, Saint-Nolff; ²SAFE, Augy; ³ Ecole Nationale Vétérinaire, Maisons-Alfort, France. ⁴Institut de Recherche en Immunologie et Cancer, Université de Montréal, Canada

Les œstrogènes sont des hormones stéroïdes dont l'action essentielle porte sur le développement des organes sexuels secondaires de la femelle et le fonctionnement de l'appareil reproducteur. Ces hormones influencent également la croissance, la différenciation et le fonctionnement de nombreux autres tissus cibles tels que : appareil reproducteur des mâles, os, systèmes nerveux central et cardio-vasculaire. Elles ont des effets métaboliques variés et peuvent interférer avec différents signaux hormonaux. Ces hormones sont fixées avec des affinités fortes et hautement spécifiques par des cellules cibles qui contiennent des protéines de liaison intranucléaire, les récepteurs à œstrogène (ER α et ER β). Une fois lié à l'œstrogène, la conformation de l'ER est modifiée: il interagit avec la chromatine et module la transcription de gènes cibles. Cependant, la spécificité de l'ER n'est pas parfaite: il se comporte comme une serrure pouvant être ouverte par plusieurs clefs. Ainsi, plusieurs molécules peuvent exprimer une activité œstrogénique et se lier à l'ER. La spécificité et les actions des récepteurs ER α et ER β diffèrent ; ainsi, des molécules ayant une activité œstrogénique peuvent avoir des effets différents (Kuiper et al., 1998). Ces molécules, qui peuvent contaminer l'environnement des animaux de laboratoire, représentent une préoccupation majeure de la communauté scientifique. La problématique est bien documentée à ce jour, notamment en raison de son impact potentiel sur l'issue des études toxicologiques (Muhlhauser et al., 2009). La contamination par des molécules à activité œstrogénique est aussi reconnue comme une source potentielle de variation incontrôlée dans un large éventail de disciplines scientifiques (investigations dans les domaines du cancer, des affections cardio-vasculaire, du métabolisme des

lipides et du cholestérol, du diabète et d'autres troubles endocriniens, du métabolisme de l'os, de l'immunologie, de l'expression génique et des études portant sur le système nerveux central), comme le souligne Mickelson (2009).

Les molécules ayant un potentiel d'activité œstrogénique sont classées selon leur origine et leur structure chimique. Nous distinguons les substances chimiques environnementales, telles que les pesticides ou certains composés entrant dans la composition des plastiques, les phyto-œstrogènes produits par les plantes et les myco-œstrogènes produits par les moisissures pouvant se développer sur les matières premières organiques et les aliments. Les molécules à activité œstrogénique et leur précurseurs se retrouvent ainsi naturellement dans de nombreuses plantes ou produits à base de plantes. D'un point de vue structurel, elles appartiennent à six classes de polyphénols, plus ou moins similaires à l'estradiol (isoflavonoïdes, coumestanes, flavonoïdes, stilbènes, lignanes, and entérolignanes) (Afssa, 2005). Les isoflavonoïdes sont les plus connues et ont fait l'objet de nombreux travaux.

Chez les animaux de laboratoire, la contamination par les molécules à activité œstrogénique peut survenir dans différents pools environnementaux tels que l'aliment, l'eau de boisson si elle est polluée (Kuster et al., 2009), les cages (Howdeshell et al., 2003), et les litières (Schoental, 1974). Aujourd'hui, la prévention des biais expérimentaux liés à une contamination incontrôlée de l'environnement des animaux de laboratoire par des molécules à activité œstrogénique est principalement focalisée sur la contamination des aliments (Thigpen et al., 2004) et basée sur trois stratégies :

- l'exclusion de matières premières, identifiées

comme les principales sources de molécules à activité œstrogénique, de la formulation des aliments

- l'utilisation exclusive de régimes purifiés.
- l'utilisation d'aliments dont les teneurs en certaines molécules à activité œstrogénique ont été préalablement déterminées.

Le plus souvent, la suspicion d'une contamination par des molécules à activité œstrogénique est focalisée sur certaines sources végétales, principalement les tourteaux de soja et la luzerne, reconnues comme des sources d'isoflavones et de coumestanes. Ceci suppose que les tourteaux de soja et la luzerne soient les seules sources alimentaires possibles de substances à activité œstrogénique. Cependant, un grand nombre de matières premières représentent une source potentielle de ces molécules. Par exemple, des huiles végétales, le lin, le blé et l'orge sont des sources reconnues de phyto-œstrogènes. Ces matières végétales sont beaucoup utilisées en alimentation des animaux de laboratoire. Certains produits animaux, tels que le lait, peuvent aussi contenir des substances à activité œstrogénique (Kuhnle et al., 2008). La formulation d'aliments complets dénués de toute source potentielle de phyto-œstrogènes représente ainsi un défi irréaliste. Pour cette raison, certains recommandent l'utilisation exclusive d'aliments purifiés qui sont fabriqués avec des « ingrédients raffinés ». Pourtant, les ingrédients « purifiés » qui se substituent aux ingrédients « standards » peuvent aussi contenir des substances à activité œstrogénique, comme le démontrent des essais in vivo sur souris (Thigpen et al., 1987).

Certains fabricants d'aliments et scientifiques travaillent également dans l'objectif de diminuer la contamination incontrôlée par des composés œstrogéniques en classant les aliments selon leurs teneurs en certains phyto-œstrogènes. A l'heure actuelle, on trouve sur le marché des aliments dont les teneurs cumulées en certaines isoflavones (genistéine, daidzéine, glycitéine) sont garanties dans des intervalles donnés. Cependant, cette classification basée sur la somme des concentrations de molécules sélectionnées suppose que chacune des substances ait le même pouvoir œstrogénique. Cette hypothèse est contestable car les activités œstrogéniques de la génistéine, de la daidzéine et de la glycitéine diffèrent fortement. Des éléments additionnels devraient être pris en considération, tels que l'activité œstrogénique de substances autres que les isoflavonoïdes, leur biodisponibilité mais aussi les potentielles interactions. Elargir la liste des molécules et y associer des garanties de concentrations dans les aliments pourrait représenter une voie de contrôle de l'activité finalement exprimée dans les protocoles de recherche. Cela suppose

cependant une connaissance exhaustive des substances potentiellement actives et de leurs précurseurs, associée à des investissements analytiques considérables.

Tel que recommandé par Ashby et al. en 2000, « l'activité œstrogénique des aliments pour rongeurs ne doit pas être déterminée uniquement en référence à leur contenu en phyto-œstrogènes/soja ». Le pilotage de l'activité œstrogénique des aliments pour animaux de laboratoire représente une problématique bien plus complexe, qui nécessite une collaboration étroite entre les scientifiques et les fabricants d'aliments. Lorsque cela est nécessaire, l'activité œstrogénique globale des aliments devrait être évaluée in vivo avant leur utilisation dans des projets expérimentaux (Heindel and vom Saal, 2008).

Bibliographie

- AFSAA, 2005. *Rapport. Sécurité et bénéfices des phyto-œstrogènes apportés par l'alimentation. Recommandations.*/ Ashby et al., 2000. *Uterotrophic Activity of a "Phytoestrogen-Free" Rat Diet. Environmental Health Perspectives.* 108:A12-A13/
Heindel & vom Saal, 2008. *Meeting report: batch to batch variability in estrogenic activity in commercial animal diets – Importance and approaches for laboratory animal research. Environmental Health Perspectives.* 116:389-393/
Howdeshell et al., 2003. *Bisphenol A is released from used polycarbonate animal cages into water at room temperature. Environmental Health Perspectives.* 111:1180-1187/
Kuhnle et al., 2008. *Phytoestrogen content of foods of animal origin : dairy products, eggs, meat, fish and seafood. Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 56:10099-10104/
Kuiper et al., 1998. *Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor α . Endocrinology.* 139:4252-4263/
Kuster et al., 2009. *Analysis of phytoestrogens, progestogens and estrogens in environmental waters from Rio de Janeiro (Brazil). Environment International.* 35:997-1003/
Muhlhauser et al., 2009. *Bisphenol A effects on the growing mouse oocyte are influenced by diet. Biology of reproduction.* 80:1066-1071/
Mickelson, 2009. *Formula for success. ALN magazine.* Nov-Dec/
Schoental, 1974. *Zearalenone in the diet, podophyllotoxin in the wood shavings bedding, are likely to affect the incidence of "spontaneous" tumours among laboratory animals. British Journal of Cancer.* 30:181/
Thigpen et al., 1987. *The mouse bioassay for the detection of estrogenic activity in rodent diets: II. Comparative estrogenic activity of purified, certified and standard open and closed formula rodent diets. Laboratory Animal Science.* 37:602-605/
Thigpen et al., 2004. *Selecting the appropriate rodent diet for endocrine disruptor research and testing studies. ILAR Journal.* 45:401-416.