

Isolement et caractérisation de bactéries capables de métaboliser l'équol

**Par
Pascal Tremblay-Dauphinais**

**Mémoire présenté
pour l'obtention
du grade Maître ès Sciences (M.Sc.)
en microbiologie appliquée**

Jury d'évaluation

**Président du jury
et examinateur interne**

**François Lépine
INRS-Institut Armand-Frappier**

Examineur externe

**Martin Lanthier
Agriculture et Agroalimentaire Canada**

Directeur de recherche

**Réjean Beaudet
INRS-Institut Armand-Frappier**

Codirecteur de recherche

**Pierre Juteau
Cégep Saint-Laurent /
INRS-Institut Armand-Frappier**

Résumé

Le lisier de porc contient des estrogènes et des phytoestrogènes qui peuvent agir comme perturbateurs endocriniens dans l'environnement. Ce type de molécule perturbe le système endocrinien des animaux en interférant dans le mécanisme de reconnaissance des hormones. L'objectif principal de ce projet était d'isoler et de caractériser des bactéries capables de dégrader l'équol. L'équol est le phytoestrogène ayant la plus grande activité estrogénique et provient de la dégradation bactérienne de la daidzéine, un isoflavone, par la flore intestinale du porc. Trois enrichissements différents ont été effectués, soit un enrichissement à faible concentration d'équol (10 ppm), un enrichissement à haute concentration d'équol (100 ppm) et un enrichissement à haute concentration d'équol (100 ppm) et contenant du lisier de porc. Un isolement sur gélose a ensuite été effectué pour chaque enrichissement. Les isolats obtenus ont été testés quant à leur capacité à dégrader l'équol. Pour l'enrichissement à faible concentration d'équol, les isolats 9.1, 11.1, 11.2, 13.2 et 13.3 (tous de l'espèce *Arthrobacter protophormiae*) dégradaient l'équol. Pour l'enrichissement à haute concentration d'équol, les isolats 6.1 (*Serratia marcescens*), 9.1.2 et 15 dégradaient faiblement l'équol en milieu riche mais non en milieu minimal. Pour l'enrichissement à haute concentration d'équol contenant du lisier, les isolats 6.1.1 (*Pseudomonas*), 9.2.1.1 (*Klebsiella oxytoca*) et 10.1.1.1 (*Citrobacter farmeri*) dégradaient rapidement l'équol. Pour les 3 isolats de l'enrichissement à haute concentration d'équol contenant du lisier, la dégradation de l'équol était accompagnée d'une baisse d'estrogénicité. Aucun intermédiaire de dégradation n'a pu être observé pour les isolats du troisième enrichissement dégradant l'équol. À notre connaissance, c'est la première fois que des isolats capables de dégrader l'équol ont été obtenus en culture pure.

Pascal T. D.



ii

Remerciements

Je tiens à remercier mes directeurs de recherche Pierre Juteau et Réjean Beaudet qui ont rendu possible la réalisation de ce projet. Un grand merci à Roger Dubuc qui m'a donné de nombreux conseils pratiques au cours de mon projet. J'aimerais aussi remercier les chimistes du groupe, François Lépine et Sylvain Milot, pour leur aide en spectrométrie de masse et leurs nombreux conseils en chimie ainsi que leur capacité à aider un étudiant ayant toujours une question de plus à poser. Je voudrais remercier aussi les autres professeurs du groupe, Richard Villemur et Éric Déziel, pour tous leurs conseils techniques, microbiologiques et de biologie moléculaire. Je voudrais aussi remercier Ariane Bisaillon pour ses conseils sur le HPLC et sa patience infinie lorsque des problèmes apparaissaient. Finalement, je souhaite remercier tous les étudiants du groupe pour leur aide et leurs conseils mais surtout pour tous les rires et moments de folie partagés.

Je tiens aussi à remercier la fondation Armand-Frappier pour le support financier qu'elle m'a apporté.

Mes derniers remerciements vont à mes parents qui m'ont supporté financièrement et moralement durant ce long projet.

Table des matières

Résumé	ii
Remerciements	iii
Table des matières	iv
Liste des figures	vii
Liste des tableaux	viii
Liste des abréviations	x
Liste des abréviations	x
Introduction	xi
1 Revue de littérature	1
1.1 Estrogènes	1
1.1.1 Synthèse, circulation et métabolisme des estrogènes dans le corps	1
1.1.2 Caractéristiques physico-chimiques des estrogènes	2
1.1.3 Mécanisme d'action intracellulaire des estrogènes	5
1.1.4 Effets physiologiques des estrogènes	6
1.1.5 Le lisier de porc comme source d'estrogènes	7
1.1.6 Dégradation bactérienne des estrogènes	8
1.2 Perturbation endocrinienne	9
1.2.1 Types de perturbateurs endocriniens estrogéniques	9
1.2.2 Modes d'action des perturbateurs endocriniens	10
1.3 Phytoestrogènes	11
1.3.1 Sources alimentaires et structures chimiques des phytoestrogènes	12
1.3.2 Effets physiologiques des phytoestrogènes	15
1.3.3 Mécanismes d'action des phytoestrogènes	18
1.3.4 Excrétion des phytoestrogènes et présence dans l'environnement	18
1.3.5 Autres phytoestrogènes et composés fongiques	21
1.4 Équol	22
1.4.1 L'équol dans le lisier de porc	23
1.4.2 Biodégradation de l'équol	23
1.4.3 Fraction d'équol libre dans le sang	24
1.4.4 Différence d'effet des énantiomères d'équol	24
1.4.5 Découverte de l'effet estrogénique de l'équol	24
1.4.6 Effets physiologiques de l'équol	25
1.5 Transformation bactérienne des isoflavones	26
1.5.1 Dégradation par la microflore intestinale	26

1.5.2	Dégradation par autre type de microflore.....	27
2	Matériel et méthodes	29
2.1	Produits chimiques.....	29
2.2	Dosage des estrogènes et de l'estrogénécité.....	29
2.2.1	Dosage par SPE-LC-MS-MS.....	29
2.2.2	Test YES.....	35
2.3	Enrichissement de cultures en présence d'équol et isolement de souches dégradant l'équol	38
2.3.1	Enrichissement en culture liquide.....	38
2.3.2	Isolement des microorganismes sur géloses	40
2.4	Caractérisation des isolats dégradant l'équol.....	41
2.4.1	Suivi de la capacité à dégrader l'équol par HPLC-UV.....	41
2.4.2	Identification des souches isolées par séquençage de l'ADN codant pour l'ARNr 16S.....	42
2.5	Synthèse d'équol deutéré.....	45
3	Résultats	47
3.1	Quantification des estrogènes présents dans le lisier.....	47
3.1.1	Récupération des estrogènes par la méthode d'extraction en phase solide.....	47
3.1.2	Limite de dosage des estrogènes du spectromètre de masse dans le lisier	48
3.2	Isolement sur géloses et identification des isolats	49
3.2.1	Isolement sur géloses	49
3.2.2	Identification des isolats par séquençage de l'ADN codant pour l'ARNr 16S.....	53
3.3	Capacité à dégrader l'équol des isolats et diminution d'estrogénécité.....	56
3.3.1	Suivi de la concentration d'équol par HPLC lors de tests de dégradation des isolats.....	56
3.3.2	Suivi de l'estrogénécité par YES.....	67
3.4	Recherche d'intermédiaires de dégradation de l'équol par spectrométrie de masse.....	72
4	Discussion	75
4.1	Détection et dosage des estrogènes dans le lisier de porc par LC-MS	75
4.1.1	Récupération des estrogènes lors de l'extraction en phase solide	75
4.1.2	Limite de dosage des estrogènes.....	76
4.2	Nombre d'isolats retrouvés pour chaque enrichissement	76
4.3	Genres et espèces bactériens retrouvés	77
4.4	Dégradation de l'équol.....	78
4.5	Variation d'estrogénécité accompagnant la dégradation d'équol.....	80
4.6	Recherche d'intermédiaires de dégradation.....	81
	Conclusion et perspectives	82

5	Annexes.....	83
5.1	Milieux de cultures pour les levures BJ 3505.....	83
5.1.1	Gélose YES.....	83
5.1.2	Milieu Liquide YES.....	84
5.2	Solutions pour la réaction enzymatique du test YES.....	85
5.2.1	Solution ONPG/Lyticase	85
5.2.2	Tampon Z + SDS + mercaptoéthanol	85
5.2.3	Tampon Z.....	85
5.2.4	Solution stock lyticase 10X	86
5.2.5	Tampon phosphate de potassium 1M pH 7.5	86
5.3	MM et solution de vitamines.	87
5.3.1	MM (Milieu minéral).....	87
5.3.2	Solution éléments traces	87
5.3.3	Solution milieu minéral 10X.....	88
5.3.4	Solution de vitamines.....	88
5.4	Solutions et tampons pour la biologie moléculaire.....	89
5.4.1	Tampon TEN	89
5.4.2	rTaq polymérase d'ADN	89
5.4.3	10X Tampon PCR.....	89
5.4.4	Séquence des amorces PA et PH	89
5.1	Séquences du gène de l'ADNr 16S des isolats.....	90
5.1.1	Séquences de l'enrichissement à basse concentration d'équol.....	90
5.1.2	Séquences de l'enrichissement à haute concentration d'équol.....	91
5.1.3	Séquences de l'enrichissement à haute concentration d'équol contenant du lisier.....	93
	Références	94

Liste des figures

Figure 1. Structure chimique des estrogènes naturels libres (Hutchins <i>et al.</i> , 2007).....	3
Figure 2. Structure chimique des estrogènes conjugués étudiés lors de ce projet. Les molécules conjuguées à un groupement sulfate sont représentées sous forme de sel de sodium (Hutchins <i>et al.</i> , 2007).....	4
Figure 3. Structure de différents isoflavones (Kurzer et Xu, 1997).....	13
Figure 4. Structure de différents coumestans (Kurzer et Xu, 1997).	14
Figure 5. Structure de différents lignanes (Kurzer et Xu, 1997).....	15
Figure 6. Structure chimique du resvératrol.....	21
Figure 7. Structure chimique du zéaralénone.....	22
Figure 8. Voie métabolique menant à l'équol (tiré de Setchell <i>et al.</i> , 2002).	23
Figure 9. Voie de dégradation de la génistéine chez le rat (Coldham <i>et al.</i> , 1999).	28
Figure 10. Exemple de droite de calibration pour l'équol.....	35
Figure 11. Suivi de la concentration d'équol pour les isolats de l'enrichissement à basse concentration d'équol dans du TSB.....	58
Figure 12. Suivi de la biomasse des isolats de l'enrichissement à basse concentration d'équol dans du TSB.....	58
Figure 13 Suivi de la concentration d'équol pour les isolats de l'enrichissement à basse concentration d'équol dans du MM.	59
Figure 14. Suivi de la concentration d'équol pour les isolats de l'enrichissement à haute concentration d'équol dans du TSB.....	62
Figure 15. Suivi de la biomasse des isolats de l'enrichissement à haute concentration d'équol dans du TSB.....	63
Figure 16. Suivi de la concentration d'équol pour les isolats de l'enrichissement à haute concentration d'équol dans du MM.	63
Figure 17. Suivi de la concentration d'équol pour les isolats de l'enrichissement à haute concentration d'équol contenant du lisier dans du TSB.	65
Figure 18. Suivi de la biomasse des isolats de l'enrichissement à haute concentration d'équol contenant du lisier dans du TSB.....	66
Figure 19. Suivi de la concentration d'équol pour les isolats de l'enrichissement à haute concentration d'équol contenant du lisier dans du MM.	67
Figure 20. Résultats des tests YES après dégradation de l'équol en milieu TSB.	69
Figure 21. Résultats des tests YES après dégradation de l'équol en milieu MM.	70
Figure 22. Structure de l'équol. Les positions marquées au deutérium sont indiquées par un D (Chemblink).	72

Liste des tableaux

Tableau 1. Caractéristiques des différents estrogènes libres et conjugués (Sigma-Aldrich, ; Lee <i>et al.</i> , 2003).	5
Tableau 2. Concentration des estrogènes libres dans le lisier de porcs et dans les eaux usées municipales (avant traitement).	7
Tableau 3. Concentrations de différents phytoestrogènes dans l'effluent d'usines de traitement des eaux usées.....	19
Tableau 4. Concentrations de phytoestrogènes retrouvées dans différentes rivières.	20
Tableau 5. Concentrations de phytoestrogènes retrouvées dans l'eau de drainage d'un pâturage composé à 43% de trèfle violet.	21
Tableau 6. Liste des substances quantifiées et des standards internes correspondants utilisés.....	30
Tableau 7. Programme de HPLC utilisé pour séparer les estrogènes.	32
Tableau 8. Conditions d'opération du spectromètre de masse.....	33
Tableau 9. Liste des ions parents et des ions filles et de l'énergie de collision nécessaire pour générer ces ions à partir des différents composés observés.	34
Tableau 10. Gradient utilisé au HPLC pour quantifier l'équol.	42
Tableau 11. Cycles de PCR.....	44
Tableau 12. Pourcentage de récupération des 3 standards deutérés dans du lisier ayant été extrait par la méthode d'extraction en phase solide et dosé par spectrométrie de masse.	47
Tableau 13. Limite de dosage des standards deutérés d'estrogènes.	48
Tableau 14. Description visuelle des colonies sur milieu MM des isolats de l'enrichissement à basse concentration d'équol.	49
Tableau 15. Description visuelle des colonies sur milieu MM des isolats de l'enrichissement à haute concentration d'équol.	50
Tableau 16. Description visuelle des colonies sur milieu MM des isolats de l'enrichissement à haute concentration d'équol contenant du lisier.....	52
Tableau 17. Genres et espèces des isolats de l'enrichissement à basse concentration d'équol déterminés par séquençage de l'ADN codant pour l'ARNr 16S (1500 pb) ainsi que le score, le % de couverture et le % d'identité de la séquence.	53
Tableau 18. Présentation des genres et espèces des isolats de l'enrichissement à haute concentration d'équol déterminés par séquençage de l'ADN	

codant pour l'ARNr 16S (1500 pb) ainsi que le score, le % de couverture et le % d'identité de la séquence.	54
Tableau 19. Présentation des genres et espèces des isolats de l'enrichissement à haute concentration d'équol contenant du lisier déterminés par séquençage de l'ADN codant pour l'ARNr 16S (1500 pb) ainsi que le score, le % de couverture et le % d'identité de la séquence.	55
Tableau 20. Essais de dégradation de l'équol par tous les isolats de l'enrichissement à haute concentration d'équol en milieu TSB après 7 jours d'incubation.....	61
Tableau 21. Essais de dégradation de l'équol par tous les isolats de l'enrichissement à haute concentration d'équol contenant du lisier en milieu TSB après 7 jours d'incubation.	64
Tableau 22. Valeur d'EC50 des milieux après dégradation de l'équol par différents isolats de l'enrichissement à haute concentration d'équol contenant du lisier en milieu TSB.	71
Tableau 23. Valeur d'EC50 des milieux après dégradation de l'équol par différents isolats de l'enrichissement à haute concentration d'équol contenant du lisier en milieu MM.....	71
Tableau 24. Liste des intermédiaires potentiels de l'équol dégradé qui ont été recherchés par spectrométrie de masse.....	74

Liste des abréviations

HPLC	«High performance liquid chromatography»
SPE	«Solid phase extraction»
LC	«Liquid chromatography »
MS	«Mass spectrometry »
YES	«Yeast estrogen screen test»
ONPG	Ortho-nitrophényl- β -galactoside
SDS	«Sodium dodecyl sulfate»
MM	Milieu minéral
TSB	«Tryptic soy broth»
SHBG	«Sex hormone binding globulin»
ER	Récepteur d'estrogène
PE	Perturbateur endocrinien
LDL	«Low-density lipoprotein»
HDL	«High-density lipoprotein»
PTFE	Polytétrafluoroéthylène
MRM	«Multiple reaction monitoring»
D.O.	Densité optique
UASB	«Up-flow anaerobic sludge blanket»

Introduction

Le lisier de porc contient des quantités importantes d'estrogènes et de phytoestrogènes. Les concentrations d'estrogènes (17 β -estradiol, estrone) présents dans le lisier sont de l'ordre du $\mu\text{g/l}$ (Fine *et al.*, 2003; Furuichi *et al.*, 2006). L'équol est un phytoestrogène qui se retrouve dans le lisier à des concentrations de l'ordre du mg/l et provient de la dégradation bactérienne de la daidzéine, un phytoestrogène (Furuichi *et al.*, 2006). Lorsque ces substances se retrouvent dans l'environnement, elles peuvent causer de nombreux problèmes à la faune comme l'intersexualité ou des malformations du système génital des mâles (Flammarion *et al.*, 2000; van Aerle *et al.*, 2001). Ces effets peuvent être causés par des concentrations environnementales d'estrogène de l'ordre du ng/l (Routledge *et al.*, 1998).

Des traitements ont été développés afin de diminuer la charge en polluants du lisier. Le lisier contient plusieurs composés potentiellement polluants comme le phosphore, l'azote, la matière organique, les organismes pathogènes et les odeurs. Par contre, ce n'est que récemment que les chercheurs ont commencé à s'intéresser au sort des perturbateurs endocriniens dans le lisier. Les quelques études traitant de ce sujet rapportent que les estrogènes sont partiellement dégradés mais qu'ils restent présent à des concentrations pouvant affecter l'environnement (Furuichi *et al.*, 2006; Shappell *et al.*, 2007).

Les phytoestrogènes sont surtout étudiés par rapport à leur transformation et leur absorption au niveau du système digestif humain. Le sort de l'équol dans le lisier est un sujet peu étudié dans la littérature. L'équol a été dosé et sa contribution à l'estrogénécité totale du lisier a été évaluée (Furuichi *et al.*, 2006). Par contre, les bactéries responsables

de sa dégradation sont inconnues. Les intermédiaires de dégradation de l'équol sont aussi inconnus.

L'objectif initial de ce projet était de comparer l'efficacité de différents traitements pour le lisier par rapport à leur capacité à dégrader les estrogènes et l'équol. Un protocole d'extraction en phase solide suivi d'un dosage au LC-MS-MS ont été utilisés pour mesurer les concentrations d'estrogènes du lisier. Malheureusement, la sensibilité obtenue n'était pas assez grande pour permettre le dosage des estrogènes. À cause de contraintes de temps, cette partie du projet a été abandonnée. Le projet a donc été réorienté vers l'isolement et la caractérisation de bactéries capables de dégrader l'équol. Trois enrichissements en présence d'équol ont été effectués. L'équol était la seule source de carbone des enrichissements (sauf lorsque du lisier était ajouté au milieu). Les conditions des 3 enrichissements étaient 10 ppm d'équol, 100 ppm d'équol et 100 ppm d'équol dans un mélange de milieu minimal et de lisier. L'utilisation de 10 ppm d'équol a été faite pour se rapprocher des concentrations retrouvées dans le lisier. Les hautes concentrations d'équol étaient utilisées pour essayer d'isoler des bactéries utilisant l'équol comme seule source de carbone. Le lisier a été utilisé comme apport nutritionnel additionnel au cas où la croissance de certaines bactéries nécessiterait des nutriments absents du milieu minimal. La capacité à dégrader l'équol des isolats obtenus a été mesurée au HPLC-UV. La variation d'estrogénécité a été évaluée à l'aide du test YES. Finalement, des intermédiaires de dégradation ont été recherchés par spectrométrie de masse en tandem en utilisant de l'équol marqué au deutérium.

1 Revue de littérature

1.1 Estrogènes

Les estrogènes sont des hormones stéroïdiennes présentes chez les espèces de l'embranchement des vertébrés, ce qui inclut les mammifères, les oiseaux, les reptiles, les amphibiens, les téléostéens, les élasmobranches et les protochordés (Simpson, 2003).

1.1.1 Synthèse, circulation et métabolisme des estrogènes dans le corps

Les estrogènes sont synthétisés par une série d'enzymes qui forment la voie métabolique de la stéroïdogénèse (Lintelmann *et al.*, 2003). Cette voie métabolique commence par la transformation du cholestérol en progestagènes (molécules à 21 carbones). Les progestagènes sont ensuite utilisées dans la production d'androgènes (molécules à 19 carbones). Les androgènes peuvent finalement être transformés en estrogènes par le cytochrome P450 aromatase (Simpson, 2003). Cette étape peut se dérouler au niveau des tissus spécialisés comme la granulosa des follicules ovariens, le placenta et les testicules (Lange *et al.*, 2002). Cette réaction peut aussi se produire à l'intérieur de tissus non endocriniens comme le foie, le cerveau, les tissus adipeux et les fibroblastes (Savas *et al.*, 1993; Zhu et Conney, 1998).

Les estrogènes sont des molécules hydrophobes. Environ 98% des estrogènes circulant dans le sang sont liés à des molécules. La majeure partie est liée à des protéines servant à leur circulation (« sex hormone binding globuline » ou SHBG) et une petite quantité est liée à l'albumine du sérum. Seul le 2% restant est libre et a une activité biologique (Lintelmann *et al.*, 2003).

Les estrogènes sont métabolisés principalement par le foie. Les estrogènes sont d'abord inactivés (ajout d'un groupement hydroxyle, oxydation, *O*-méthylation, épimérisation) et ensuite un groupement glucuronide, sulfate ou un glucide leur sont ajoutés. Ces groupements chimiques augmentent leur solubilité dans l'eau et permettent leur excrétion par les reins dans l'urine. L'estradiol peut aussi être estérifié mais cette modification n'inactive pas la molécule et sert plutôt comme forme de stockage pouvant être libérée ultérieurement (Lange *et al.*, 2002; Lintelmann *et al.*, 2003).

1.1.2 Caractéristiques physico-chimiques des estrogènes

Les estrogènes naturels sont des molécules tétracycliques ayant un cycle aromatique dans leur structure. La structure chimique des différents estrogènes naturels se retrouve à la figure 1.

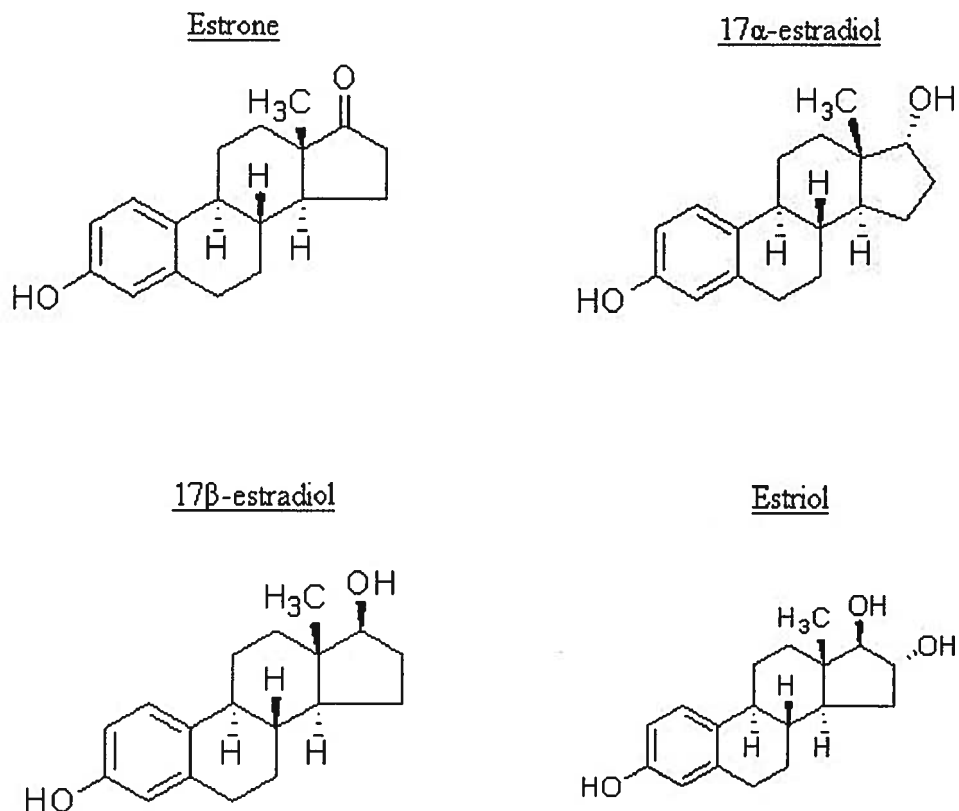
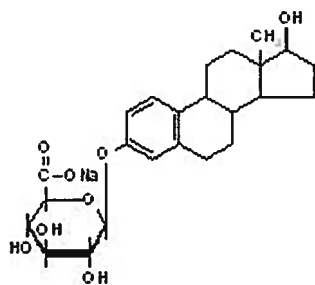


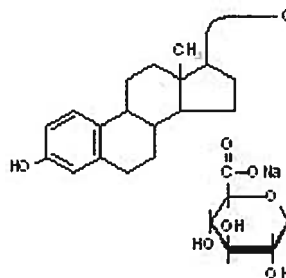
Figure 1. Structure chimique des estrogènes naturels libres (Hutchins *et al.*, 2007).

Les estrogènes conjugués ont un groupement sulfate ou glucuronide sur leur groupement hydroxyle ou phénoxy (Hutchins *et al.*, 2007). Il existe donc de nombreuses formes d'estrogènes conjugués. Les estrogènes conjugués qui ont été étudiés lors de ce projet se retrouvent à la figure 2.

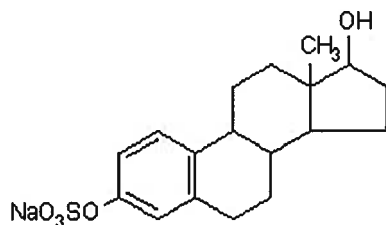
β -estradiol 3-(β -D-glucuronide)



β -estradiol 17-(β -D-glucuronide)



β -estradiol 3-sulfate



Estrone 3-sulfate

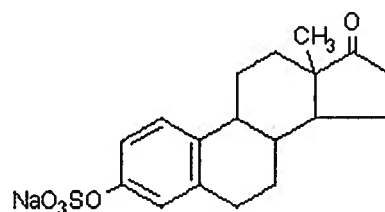


Figure 2. Structure chimique des estrogènes conjugués étudiés lors de ce projet. Les molécules conjuguées à un groupement sulfate sont représentées sous forme de sel de sodium (Hutchins *et al.*, 2007).

Certaines caractéristiques des estrogènes étudiés se retrouvent au tableau 1. La solubilité dans l'eau des estrogènes conjugués n'est pas rapportée dans la littérature. Par contre, ils seraient plus solubles dans l'eau que les estrogènes libres (Hutchins *et al.*, 2007).

Tableau 1. Caractéristiques des différents estrogènes libres et conjugués (Sigma-Aldrich, ; Lee *et al.*, 2003).

Estrogène	Poids moléculaire	Solubilité dans l'eau (mg/l)
Estrone	270,4	13
17 α -estradiol	272,4	ND
17 β -estradiol	272,4	13
Estriol	288,4	32
β -estradiol 3-(β -D-glucuronide)	447,5	ND
β -estradiol 17-(β -D-glucuronide)	447,5	ND
Estrone 3-sulfate	445,5	ND
β -estradiol 3-sulfate	351,4	ND

ND, non disponible.

1.1.3 Mécanisme d'action intracellulaire des estrogènes

Les estrogènes agissent sur certains tissus en induisant ou inhibant l'expression de certains gènes. Pour produire leur effet, ces hormones doivent interagir avec des récepteurs intracellulaires. Les estrogènes circulant librement dans le sang commencent par pénétrer dans la cellule par diffusion passive à travers la membrane cellulaire lipidique. Les hormones vont ensuite entrer en contact avec un récepteur d'estrogène (ER) situé dans le cytosol. Sous forme libre (sans estrogène), les ER sont liés à des protéines qui leur donnent une conformation inactive. La liaison du récepteur à un estrogène provoque la dissociation du récepteur et de ses protéines ce qui cause une modification de sa forme pour devenir actif. Le récepteur actif va migrer vers le noyau où il ira se lier à certaines séquences spécifiques d'ADN, les éléments de réponse aux

estrogènes (ERE, « estrogen response element ») . Cette liaison va amener des changements de conformation de l'ADN qui vont causer une activation ou une inhibition de la synthèse de certaines protéines (Lintelmann *et al.*, 2003). Ce mécanisme de réponse aux hormones est semblable pour toutes les hormones stéroïdiennes.

Il existe deux sous-types de ER nommés ER α et ER β (Kuiper *et al.*, 1996). Un autre sous-type, ER γ , a même été découvert chez *Micropogonias undulatus*, une espèce de poisson téléostéen (Hawkins *et al.*, 2000). Ces sous-types se retrouvent dans différents tissus en différentes proportions. De plus, ils présentent des affinités différentes à divers ligands. Par exemple, l'ER β lie plus facilement les phytoestrogènes que l'ER α (Kuiper *et al.*, 1997). Différentes molécules à effets estrogéniques auront donc des effets variables selon les tissus affectés.

1.1.4 Effets physiologiques des estrogènes

Les estrogènes sont responsables de l'apparition des caractéristiques sexuelles secondaires chez la femelle et de la régulation de la reproduction. Les estrogènes stimulent la prolifération cellulaire dans certains tissus tel les seins et l'utérus (Zhu et Conney, 1998). L'exposition prolongée de ces tissus à des doses excessives d'estrogène serait une des causes des cancers liés aux estrogènes (Lintelmann *et al.*, 2003).

Les estrogènes contrôlent divers processus physiologiques qui ne sont pas liés au sexe. La densité osseuse semble être contrôlée en partie par les estrogènes (Schiessl *et al.*, 1998). Les estrogènes ont un effet sur la concentration des lipides dans le sang, influencent les systèmes de coagulation et fibrinolytique et affectent la production d'oxyde nitreux et de prostaglandine qui sont des molécules ayant un effet vasomoteur

(Mendelsohn et Karas, 1999). Le système cardiovasculaire est donc aussi en partie influencé par les estrogènes.

1.1.5 Le lisier de porc comme source d'estrogènes

Les porcs produisent naturellement des estrogènes et les excrètent principalement par voie urinaire sous forme de 17 β -estradiol, d'estrone et d'estriol sous forme conjuguée (Hanselman *et al.*, 2003). Les éleveurs conservent les excréments et l'urine des porcs ensemble et ce mélange s'appelle «lisier». Le lisier est beaucoup plus concentré en estrogène que les eaux usées. Le tableau 2 compare la charge en différents estrogènes du lisier et des eaux usées.

Tableau 2. Concentration des estrogènes libres dans le lisier de porcs et dans les eaux usées municipales (avant traitement).

Estrogène	Lisier (ng/l)	Référence	Eaux usées	Référence
17 β -estradiol	2200-3000 ng/l	(Fine <i>et al.</i> , 2003)	15,6 ng/l	(Servos <i>et al.</i> , 2005)
	1000-1500 ng/l	(Furuichi <i>et al.</i> , 2006)	16 ng/l	(Baronti <i>et al.</i> , 2000)
			15,8 ng/l	(Andersen <i>et al.</i> , 2003)
Estrone	9600-24900 ng/l	(Fine <i>et al.</i> , 2003)	49 ng/l	(Servos <i>et al.</i> , 2005)
	5200-5400 ng/l	(Furuichi <i>et al.</i> , 2006)	71 ng/l	(Baronti <i>et al.</i> , 2000)
			65,7 ng/l	(Andersen <i>et al.</i> , 2003)

*Tableau tiré de Isabelle, 2007.

1.1.6 Dégradation bactérienne des estrogènes

Plusieurs espèces et genres bactériens ainsi que certains mycètes capables de dégrader les estrogènes ont été identifiés. Une revue détaillée du sujet peut être retrouvée dans le mémoire de Martine Isabelle (Isabelle, 2007). Une bactérie du genre *Novosphingobium* a été isolée de boues activées d'une station d'épuration des eaux de Tokyo et est capable de dégrader le 17 β -estradiol (Fujii *et al.*, 2002). Deux souches du genre *Rhodococcus* capables de dégrader le 17 β -estradiol ont été isolées à partir d'un enrichissement en présence de 17 β -estradiol ayant été inoculé avec un échantillon de boue activée et sont (Yoshimoto *et al.*, 2004). Un autre enrichissement fait en présence de 17 β -estradiol a permis d'isoler deux bactéries, *Achromobacter xylosoxidans* et *Ralstonia pickettii*, qui sont capables de dégrader le 17 β -estradiol et l'estrone (Weber *et al.*, 2005). La bactérie *Denitratisoma oestradiolicum* a été isolée de boues activées. En condition dénitrifiante, elle est capable de d'utiliser le 17 β -estradiol comme seule source de carbone et de le dégrader totalement en eau et en CO₂ (Fahrbach *et al.*, 2006). Trois isolats ont été isolés d'un microcosme contenant du sable marin dans lequel des estrogènes étaient la seule source carbone. Ces isolats appartenaient aux genres *Acinetobacter*, *Agromyces* et *Sphingomonas* peuvent dégrader le 17 β -estradiol. De plus, la bactérie du genre *Sphingomonas* pouvait aussi dégrader l'estrone (Ke *et al.*, 2007). Une autre étude a permis d'isoler 14 souches capables de dégrader le 17 β -estradiol. Ces souches appartiennent à 8 différents genres soit *Aminobacter*, *Brevundimonas*, *Escherichia*, *Flavobacterium*, *Microbacterium*, *Nocardioides* et *Sphingomonas* (Yu *et al.*, 2007). Les boues nitrifiantes ont aussi la capacité de dégrader les estrogènes. De ces boues, la bactérie *Nitrosomonas europaea* a été isolée. Cette bactérie a la capacité de dégrader le 17 β -estradiol, l'estrone, l'estriol et l'éthinylestradiol (Shi *et al.*, 2004).

1.2 Perturbation endocrinienne

Les perturbateurs endocriniens (PE) sont une classe de molécules ayant un effet sur le système endocrinien. Cette classe de composés a longtemps été ignorée car, traditionnellement, l'écotoxicologie ne considérait pas le fait que certaines substances présentes en infimes quantités puissent avoir des effets physiologiques. Ce domaine d'étude s'est développé très récemment et à une vitesse impressionnante (Matthiessen, 2003). Les PE estrogéniques sont les plus étudiés dans la littérature et ce mémoire se concentre uniquement sur ce type de molécules.

1.2.1 Types de perturbateurs endocriniens estrogéniques

Il existe différents types de PE estrogéniques. Les estrogènes naturels sont des hormones stéroïdiennes synthétisées et excrétées par les animaux. Ces estrogènes sont le 17β -estradiol, le 17α -estradiol, l'estrone et l'estriol. Il existe aussi des estrogènes de synthèse comme l'éthinylestradiol et le diéthylstilbestrol.

Les xénoestrogènes sont des substances qui ne se retrouvent pas dans la nature et qui ont un faible potentiel estrogénique. Ce groupe de PE inclut certains pesticides organochlorés (méthoxychlore, endosulfane), le pentachlorophénol (PCP), les biphényles polychlorés (BPC), le bisphénol A, les alkylphénols et certains produits pharmaceutiques (Ibarreta *et al.*, 2001).

Les phytoestrogènes sont des molécules naturellement produites par les plantes et qui possèdent une activité estrogénique faible. Les phytoestrogènes sont séparés en trois classes principales : les isoflavones (daidzéine, génistéine), les coumestans (coumestrol) et les lignanes (marairésinol, entérodiole). Il existe aussi des substances légèrement

estrogéniques présentant d'autres types de structure (β -sitostérol, resvératrol) (Ibarreta *et al.*, 2001).

1.2.2 Modes d'action des perturbateurs endocriniens

Les perturbateurs endocriniens présentent différents mécanismes d'action. La majeure partie des perturbateurs endocriniens connus fonctionne par interaction agoniste avec le récepteur ce qui active directement la voie signalétique (Lintelmann *et al.*, 2003). Les perturbateurs endocriniens n'ont pas tous la même affinité pour les récepteurs et la même capacité à activer les récepteurs. De plus, l'affinité du récepteur pour les estrogènes varie selon l'espèce, l'individu et même selon les cycles biologiques des individus (Stern et Vaughan, 1987). Il existe aussi des composés antagonistes qui empêchent les molécules agonistes de se fixer aux récepteurs. L'inhibition peut se faire de manière compétitive en se liant au site actif du récepteur ou de manière indirecte en se liant à un autre site ce qui diminue l'efficacité du récepteur (Lintelmann *et al.*, 2003). Les PE peuvent aussi faire varier la concentration d'hormone par différents mécanismes. Les PE peuvent affecter directement certaines réactions enzymatiques qui servent à la synthèse ou à la dégradation des hormones endogènes. Certains PE induisent la synthèse d'enzymes servant à la métabolisation des hormones. Certains PE peuvent aussi se lier aux molécules qui transportent les estrogènes endogènes ce qui fait augmenter la fraction d'estrogènes libres (Cheek *et al.*, 1998).

1.2.2.1 Effets des perturbateurs endocriniens sur l'environnement

La présence de perturbateurs endocriniens dans l'environnement engendre des modifications physiologiques chez divers animaux (Taylor et Harrison, 1999). Plusieurs invertébrés ont été touchés. Chez les mollusques, le tributylétain a causé de graves

dommages à des populations de gastéropodes et est à l'origine d'un phénomène appelé "imposex" (Oehlmann *et al.*, 1996). Le terme « imposex » est utilisé pour nommer un mollusque qui développe des organes ou tissus de l'autre sexe. Chez les crustacés, des cas d'intersexualité ont été rapportés chez des copépodes situés à proximité de rejets d'égouts (Moore et Stevenson, 1991; Moore et Stevenson, 1994). Un individu intersexuel présente des caractéristiques de l'autre sexe. Par exemple, un mâle peut présenter des oocytes (type cellulaire présent uniquement chez les femelles) au niveau des gonades. Les vertébrés sont aussi touchés.

Les effets des PE chez les poissons sont plus étudiés car certaines populations vivent directement dans des eaux à forte concentration de PE. Ces organismes présentent aussi des cas d'intersexualité (Jobling *et al.*, 1998; van Aerle *et al.*, 2001; Vigano *et al.*, 2001). Les poissons mâles présentent dans certains cas des malformations au niveau des testicules (Flammarion *et al.*, 2000). Un autre effet des perturbateurs endocriniens sur les poissons mâles est la synthèse de vitellogénine (Flammarion *et al.*, 2000). Cette protéine est normalement synthétisée chez la femelle dans la période précédant la ponte et est stockée dans le vitellus des œufs. Les mâles ne synthétisent cette protéine qu'en présence d'estrogènes exogènes.

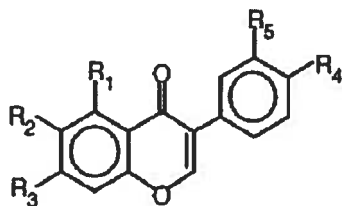
1.3 Phytoestrogènes

Les phytoestrogènes sont des composés produits par les plantes et ayant une activité estrogénique. Certains de ces composés sont des phytoalexines qui servent à la défense des plantes contre les virus, les bactéries, les champignons et les insectes. Chez les légumineuses, certains phytoestrogènes servent aussi d'agents chimiotactiques pour attirer des espèces spécifiques de *rhizobium* aux racines de la plante (Ibarreta *et al.*,

2001). Ces composés sont principalement divisés en 3 classes soit les isoflavones, les coumestans et les lignanes (Kurzer et Xu, 1997).

1.3.1 Sources alimentaires et structures chimiques des phytoestrogènes

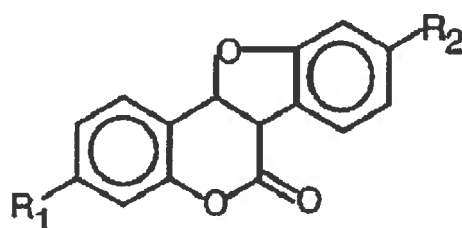
Le soya est une importante source d'isoflavones. Les légumineuses, le trèfle et le pâturin sont aussi des sources d'isoflavones. Les 3 principaux isoflavones du soya se retrouvent sous plusieurs formes. Les formes non conjuguées (ou aglycones) sont la daidzéine, la génistéine et la glycitéine. Ces 3 isoflavones se retrouvent aussi sous forme de glucoside (daidzine, génistine et glycitine), acétylglucoside et malonylglucoside. La structure des différents types d'isoflavones se retrouve à la figure 3.



Isoflavone	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅
Daidzein	H	H	OH	OH	H
Genistein	OH	H	OH	OH	H
Glycitein	H	OCH ₃	OH	OH	H
Daidzin	H	H	O-glucoside	OH	H
Genistin	OH	H	O-glucoside	OH	H
Glycitin	H	OCH ₃	O-glucoside	OH	H
Formononetin	H	H	OH	OCH ₃	H
Biochanin A	OH	H	OH	OCH ₃	H

Figure 3. Structure de différents isoflavones (Kurzer et Xu, 1997).

Les coumestans (coumestrol et 4'-méthoxycoumestrol) se retrouvent dans la luzerne, le trèfle et d'autres types de fourrage pour animaux. La structure des coumestans se retrouve à la figure 4.



Coumestan	R₁	R₂
Coumestrol	OH	OH
4'-methoxycoumestrol	OH	OCH ₃

Figure 4. Structure de différents coumestans (Kurzer et Xu, 1997).

Les graines oléagineuses sont la plus grande source de lignane végétal (Kurzer et Xu, 1997). Les produits céréaliers, les fruits et les légumes en sont aussi des sources importantes (Milder *et al.*, 2007). Il existe une grande variété de lignanes chez les plantes mais peu sont convertis en entérolignane (entérodinol et entérolactone) par la flore intestinale. Les lignanes précurseurs des entérolignanes sont le sécoisolaricirésinol, le matairesinol, le laricirésinol et le pinorésinol (Heinonen *et al.*, 2001). Seuls les entérolignanes sont absorbés par le corps. La structure des principaux lignanes se retrouve à la figure 5.

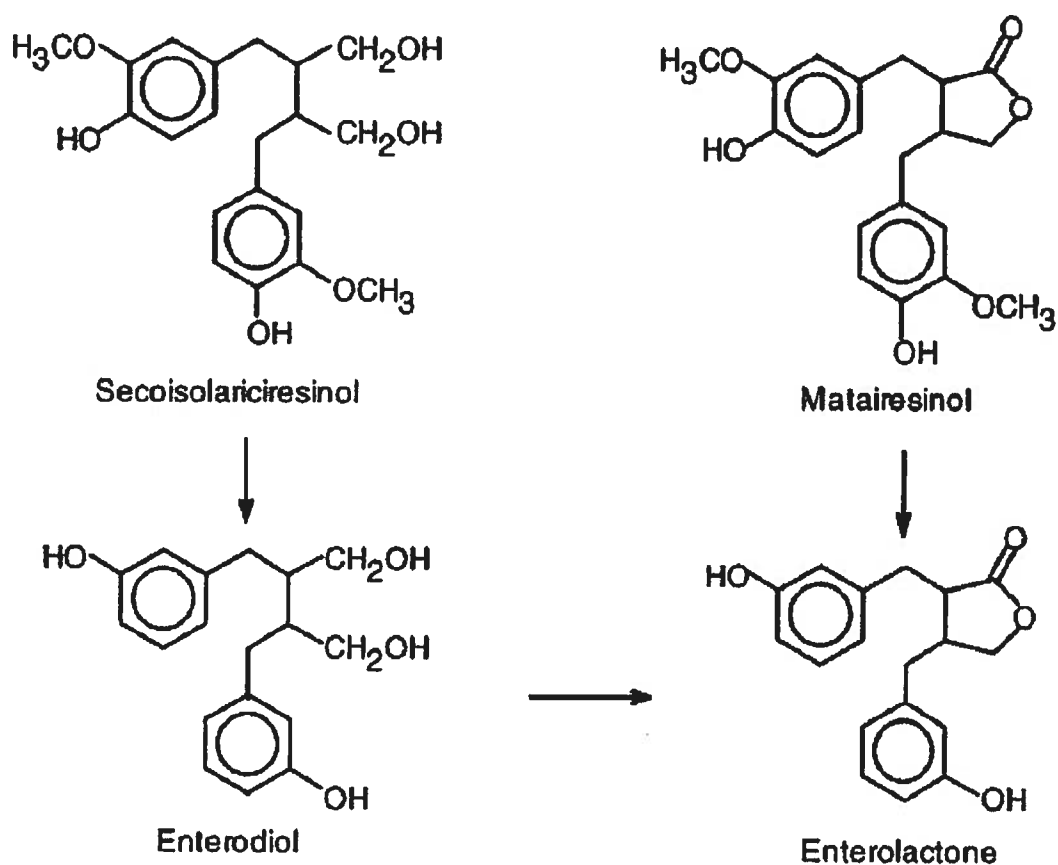


Figure 5. Structure de différents lignanes (Kurzer et Xu, 1997).

1.3.2 Effets physiologiques des phytoestrogènes

Les phytoestrogènes peuvent influencer la synthèse et la disponibilité des estrogènes à l'intérieur du corps. Certains phytoestrogènes ont un effet inhibiteur sur les aromatasés qui transforment les androgènes en estrogènes. De plus, les phytoestrogènes stimuleraient la sécrétion de SHBG («sex hormone-binding globulin» qui est la protéine qui lie les estrogènes dans le sang) ce qui diminuerait la disponibilité des estrogènes mais augmenterait le temps que ceux-ci prennent à être éliminés du corps (Brzezinski *et al.*, 1997).

Les phytoestrogènes ont un effet sur le cycle hormonal des femmes. L'ingestion de phytoestrogènes semble allonger le cycle menstruel chez les femmes pré-ménopausées

(Kurzer et Xu, 1997). Chez les femmes ménopausées, la consommation de phytoestrogènes diminue les effets de la ménopause (Brzezinski *et al.*, 1997; Kurzer et Xu, 1997). Cet effet pourrait être dû à l'activité estrogénique des phytoestrogènes qui remplacerait celle des estrogènes manquants chez les femmes ménopausées (Bingham *et al.*, 2007).

Les phytoestrogènes protégeraient contre certaines maladies. La prise de phytoestrogène préviendrait l'ostéoporose (Kurzer et Xu, 1997). Par contre, ce type de protection ne proviendrait pas de leur activité estrogénique (Bingham *et al.*, 2007). L'absorption de phytoestrogènes aurait aussi un effet protecteur contre les maladies cardiaques. Les phytoestrogènes amènent une baisse de concentration des LDL (« low density lipoprotein») et des triglycérides et une augmentation de la concentration des HDL (« high density lipoprotein»). Dans ce cas, cet effet pourrait être dû à l'activité estrogénique des phytoestrogènes (Kurzer et Xu, 1997; Arts et Hollman, 2005; Bingham *et al.*, 2007).

Les phytoestrogènes ont aussi des effets anticancéreux. Les tyrosines kinases sont des enzymes qui activent d'autres enzymes en phosphorylant certains résidus tyrosines. Certaines de ces protéines peuvent stimuler la prolifération cellulaire et sont considérées comme des oncogènes. La génistéine a montré des effets inhibiteurs sur ces enzymes oncogènes (Akiyama *et al.*, 1987). Un autre type d'enzyme inhibé par les phytoestrogènes sont les topoisomérases de type II (Markovits *et al.*, 1989). Ces enzymes servent à modifier la forme de l'ADN (enroulement, formation de nœuds, etc.). Les cellules cancéreuses possèdent beaucoup de ces topoisomérases, elles sont donc plus affectées que les autres types de cellules. L'inhibition de ces enzymes causent des cassures dans les brins d'ADN ce qui mène à l'apoptose des cellules. Les

phytoestrogènes peuvent aussi inhiber l'angiogenèse ce qui limite le développement de tumeurs (Fotsis *et al.*, 1993). Les phytoestrogènes ont aussi une activité antioxydante. Cet effet provient des molécules elles-mêmes ainsi que de l'activation d'enzymes antioxydantes du corps (Markovits *et al.*, 1989; Kurzer et Xu, 1997). Les phytoestrogènes ont une activité de suppression de croissance de cellules tumorales *in vitro* (Messina *et al.*, 1994). Par contre, l'effet épidémiologique est beaucoup moins clair (Messina *et al.*, 1994). Les phytoestrogènes protégeraient contre les cancers du sein, de la prostate, des intestins, du côlon, des poumons et de l'estomac (Bingham *et al.*, 2007).

Malgré leurs bienfaits, les phytoestrogènes présentent aussi des effets négatifs. La génistéine inhibe l'activité des topoisomérases de toutes les cellules du corps ce qui peut causer l'apoptose de cellules saines. Le coumestrol a aussi des effets néfastes *in vitro*. Il semble augmenter le nombre de mutations, être génotoxique et causer l'apoptose (Stopper *et al.*, 2005).

Divers effets des phytoestrogènes ont aussi été observés chez les animaux. Les méadakas (*Oryzias latipes*) qui ont été mis en présence de génistéine et d'équol sont devenus intersexuels (Kiparissis *et al.*, 2003). Chez l'anguille (*Anguilla anguilla*), la différenciation sexuelle est contrôlée par les taux d'androgène et d'estrogène durant certains stades de développement. L'usage de phytoestrogènes a permis d'augmenter la proportion de femelle dans une population d'anguilles en captivité (Tzchori *et al.*, 2004).

Les phytoestrogènes peuvent aussi modifier des comportements. Des combattants de Siam (*Betta splendens*) ont été mis en contact avec différents phytoestrogènes (génistéine, équol et β -sitosterol). Les phytoestrogènes diminuaient la fréquence des combats entre mâles et augmentaient la fréquence de construction des nids (Clotfelter et Rodriguez, 2006). Les phytoestrogènes ont un effet antiestrogénique au niveau du

cerveau des rats (Patisaul *et al.*, 2001). Ils influencent le comportement sexuel chez les rats femelles en diminuant la fréquence d'accouplement (Patisaul *et al.*, 2001). Les phytoestrogènes ont aussi des effets anxiolytiques sur les rats adultes mâles et femelles (Lephart *et al.*, 2002; Lephart *et al.*, 2004). Les phytoestrogènes affectent les capacités de mémoire spatiale chez les rats. Les rats mâles exposés aux phytoestrogènes ont une moins bonne mémoire spatiale alors que chez les femelles le phénomène inverse se produit. De plus, les femelles exposées aux phytoestrogènes ont des résultats similaires aux mâles exposés aux phytoestrogènes (Lephart *et al.*, 2002; Lephart *et al.*, 2004).

1.3.3 Mécanismes d'action des phytoestrogènes

Les phytoestrogènes ont des effets génétiques et non génétiques. À cause de leur stabilité et de leur faible poids moléculaire, les phytoestrogènes peuvent pénétrer dans les cellules par diffusion passive. Une fois à l'intérieur, ces molécules peuvent interagir avec les ER et activer ou inhiber l'expression de certains gènes. Ces molécules peuvent aussi interagir directement avec différentes enzymes, ce qui peut avoir un effet au niveau de la régulation génétique ou au niveau de la régulation de certaines cascades enzymatiques (Ososki et Kennelly, 2003).

1.3.4 Excrétion des phytoestrogènes et présence dans l'environnement

Les isoflavones sont excrétés par l'urine selon une relation linéaire dépendante de la dose absorbée (Karr *et al.*, 1997). De 7 à 30% des isoflavones ingérés se retrouvent dans l'urine (Bingham *et al.*, 2007). Une partie serait aussi excrétée par la bile (Bingham *et al.*, 2007).

Des phytoestrogènes ont été retrouvés dans différents milieux. Le Tableau 3 donne les concentrations de différents phytoestrogènes provenant de diverses usines de traitement des eaux usées.

Tableau 3. Concentrations de différents phytoestrogènes dans l'effluent d'usines de traitement des eaux usées.

Composé	Concentration dans l'effluent (ng/l)			
	Usine Genzano (Bacaloni <i>et al.</i> , 2005)	Usine Albano (Bacaloni <i>et al.</i> , 2005)	(Laganà <i>et al.</i> , 2004)	(Kang <i>et al.</i> , 2006)
Daidzine	10	n.d.	ND	ND
Génistine	12	n.d.	ND	ND
Daidzéine	54	7	13	290
Génistéine	5	2	58	80
Glycitéine	12	14	ND	ND
Formononétine	n.d.	n.d.	ND	2
Coumestrol	10	n.d.	ND	ND
Biochanine-A	7	1	4	2
Entérodiole	ND	ND	ND	70
Entérolactone	ND	ND	ND	600

n.d., non détectable.

ND, non déterminé

Des traces de phytoestrogènes ont été retrouvées dans des rivières (tableau 4). Les concentrations sont très basses à cause de l'effet de dilution. Par contre, des concentrations de 143,4 µg/l de génistéine et 42,9 µg/l de daidzéine ont été retrouvées dans une rivière située à proximité d'un quartier résidentiel où se retrouvait quelques usines dont une industrie de tofu (Kawanishi *et al.*, 2004). Aucun phytoestrogène n'a été

retrouvé dans un lac non connecté à une rivière ayant reçu des eaux domestiques usées (Bacaloni *et al.*, 2005).

Tableau 4. Concentrations de phytoestrogènes retrouvées dans différentes rivières.

Composé	Concentration dans l'eau de rivière (ng/l)		
	(Bacaloni <i>et al.</i> , 2005)	(Erbs <i>et al.</i> , 2007).	(Laganà <i>et al.</i> , 2004)
Daidzine	n.d.	ND	ND
Génistine	n.d.	ND	ND
Daidzéine	2	d.	2
Génistéine	4	n.d.	5
Glycitéine	4	ND	ND
Formononétine	n.d.	3	ND
Coumestrol	1	n.d.	ND
Biochanine-A	1	2	1
Équol	ND	3	ND

n.d., non détectable.

d., détecté mais non quantifié.

ND, non déterminé

Les eaux usées industrielles ou domestiques ne sont pas les seules sources de phytoestrogènes de l'environnement. L'effluent provenant d'une usine de pâtes et papiers contenait 10,1 µg/l de génistéine (Kiparissis *et al.*, 2001). Des champs de certains végétaux peuvent aussi être une source de phytoestrogènes. Par exemple, il a été démontré que l'eau de drainage provenant d'un champ composé à 43% de trèfle violet contient plusieurs phytoestrogènes (tableau 5).

Tableau 5. Concentrations de phytoestrogènes retrouvées dans l'eau de drainage d'un pâturage composé à 43% de trèfle violet.

Composé	Eau de drainage (ng/l)
Daidzéine	15
Génistéine	7
Coumestrol	d.
Équol	80
Formononétine	95
Biochanine-A	15

d., détecté mais non quantifié.

Tableau tiré de Erbs *et al.*, 2007.

1.3.5 Autres phytoestrogènes et composés fongiques

Le resvératrol est un composé qui se retrouve dans plusieurs plantes ainsi que dans la peau des raisins et dans le vin. Cette molécule, un stilbène, sert de phytoalexine aux plantes pour contrer les infections fongiques. La structure chimique du resvératrol est présentée à la figure 6. Le resvératrol se lie aux ER et peut stimuler la prolifération de cellules cancéreuses du sein. Ce composé amène une augmentation du poids des ovaires et une perturbation du cycle normal de la reproduction chez la femelle du rat (Ososki et Kennelly, 2003).

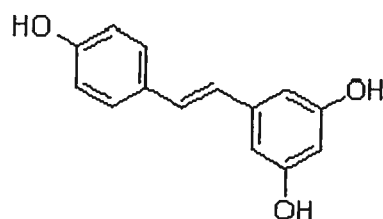


Figure 6. Structure chimique du resvératrol.

Le zéaralénone (figure 7) est un composé produit par certains champignons (*Fusarium graminearum*, *F. culmorum* et *F. crookwellense*). Ils se retrouvent principalement dans le maïs mais peuvent aussi se rencontrer dans du blé et de l'orge. Plusieurs problèmes du système reproducteur ont été observés chez des animaux ayant mangé de la nourriture contaminée. Chez les femelles, les symptômes observés étaient une vulvo-vaginite, une diminution de la libido, une prolongation du cycle reproducteur, l'infertilité et l'avortement. Chez des porcs mâles, l'atrophie des testicules et une hypertrophie des glandes mammaires ont été observées (Ososki et Kennelly, 2003).

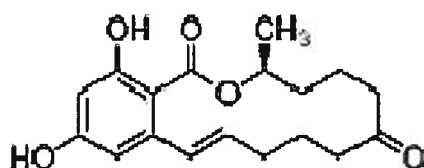


Figure 7. Structure chimique du zéaralénone.

1.4 Équol

L'équol n'est pas un isoflavone (qui sont des molécules provenant de plantes) mais bien un produit microbien car il provient de la dégradation bactérienne de la daidzéine (voir figure 8). Seulement 36% des gens ont une microflore qui peut transformer la daidzéine en équol (Rowland *et al.*, 2000). La capacité à synthétiser de l'équol de la microflore semble être liée à l'alimentation de la personne. Les gens consommant plus de fibres et de glucides sont plus souvent des producteurs d'équol que les gens consommant plus de gras animal (Lampe *et al.*, 1998; Rowland *et al.*, 2000). Il a été montré que *Streptococcus intermedius*, *Ruminococcus productus* et *Bacteroides ovatus* sont parmi les espèces bactériennes qui peuvent transformer la daidzéine en équol (Setchell *et al.*, 2002).

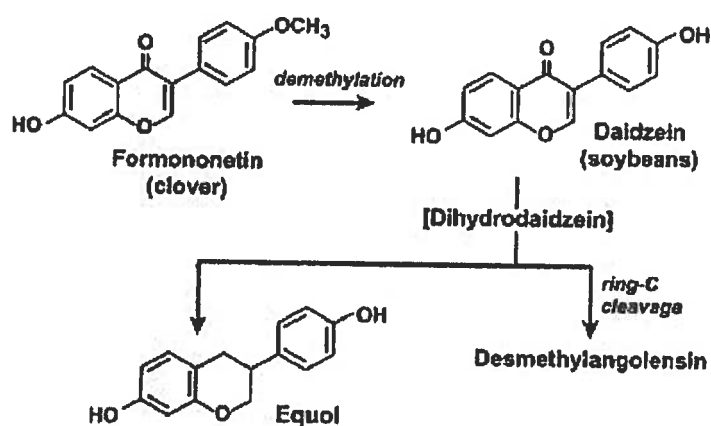


Figure 8. Voie métabolique menant à l'équol (tiré de Setchell *et al.*, 2002).

1.4.1 L'équol dans le lisier de porc

L'équol se retrouve dans le lisier de porc. La nourriture à base de soya est une source de daidzéine qui va ensuite être transformée en équol durant la digestion des porcs (Burnison *et al.*, 2003). La quantité d'équol présente dans le lisier varie selon l'alimentation. Burnison *et al.* (2003) ont trouvé des concentrations d'équol allant de 6,9 à 16,6 mg/l. Furuichi *et al.* (2006) ont mesuré des concentrations d'équol allant de 0,94 mg/l à 1,1 mg/l dans des eaux usées provenant de l'élevage de porcs (les mesures ont été effectuées à la même ferme en juillet 2003 et en octobre 2003). Dans la même étude, la proportion de l'activité estrogénique due à l'équol était de 2 à 3 % de l'activité estrogénique totale (Furuichi *et al.*, 2006).

1.4.2 Biodégradation de l'équol

Certaines études ont été faites sur l'efficacité de certains traitements à dégrader l'équol. Furuichi *et al.* (2006) rapportent que l'efficacité d'un traitement de type UASB (« up-flow anaerobic sludge blanket ») à dégrader l'équol était de plus de 96%. Isabelle

(2007) a obtenu un consortium enrichi capable de dégrader l'équol. Par contre, aucun des isolats obtenus ultérieurement n'était capable de dégrader l'équol (Isabelle, 2007).

1.4.3 Fraction d'équol libre dans le sang

Seule la fraction libre dans le sang d'un phytoestrogène a une activité biologique. L'équol est libre à 49,7% dans le sang comparativement à 3,5% pour l'estradiol (Nagel *et al.*, 1998).

1.4.4 Différence d'effet des énantiomères d'équol

L'équol peut se retrouver sous 2 formes (R ou S). L'énantiomère provenant de la transformation bactérienne de la daidzéine est le S (Setchell *et al.*, 2005). Ces deux énantiomères ont des affinités différentes pour les ER α et β . La forme S de l'équol se lie plus fortement aux ER que le R (Muthyala *et al.*, 2004). De plus, la forme S de l'équol se lie préférentiellement à l'ER β alors que la forme R montre une préférence pour l'ER α (Muthyala *et al.*, 2004).

1.4.5 Découverte de l'effet estrogénique de l'équol

L'équol a un impact sur la fertilité des animaux. Les premières observations de ses effets ont été effectuées sur des moutons ayant la "maladie du trèfle". En Australie, des brebis ayant brouté du trèfle violet (*Trifolium pratense*) sont devenues infertiles de manière permanente. Des chercheurs ont trouvé que la formononétine (un isoflavone) semblait être lié à la maladie. D'autres chercheurs ont trouvé que l'équol (un produit de la dégradation bactérienne de la daidzéine qui elle-même provient de la transformation de la formononétine) était l'isoflavone présentant la plus grande activité estrogénique et ont donc conclu que la maladie du trèfle était due à cette molécule. La susceptibilité des

espèces aux effets des phytoestrogènes est variable. À des doses d'équol similaires à celles observées pour la maladie du trèfle, les juments ne subissent aucun problème alors que les bovins deviennent infertiles de manière permanente. L'hypothèse en vigueur serait que ces différences proviendraient des différentes quantités d'ER propre à chaque espèce (Bennetts *et al.*, 1946; Kurzer et Xu, 1997).

1.4.6 Effets physiologiques de l'équol

Des tests *in vitro* ont montré que l'équol inhibe la prolifération de lignée cellulaire de prostate cancéreuse (Hedlund *et al.*, 2003). Des études sur l'alimentation d'hommes japonais ont montré qu'être un producteur d'équol est associé avec une chance réduite d'avoir le cancer de la prostate (Akaza *et al.*, 2004; Ozasa *et al.*, 2004). L'effet de l'équol sur les cellules cancéreuses de la prostate serait dû à sa capacité à se lier au 5 α -dihydrotestostérone ce qui empêche l'hormone d'aller se lier au récepteur intracellulaire (Lund *et al.*, 2004). L'équol a aussi une activité antioxydante plus importante que tous les autres isoflavones (Arora *et al.*, 1998). L'équol inhibe la liaison des estrogènes et des androgènes à la SHBG (Martin *et al.*, 1995). L'équol est l'isoflavone qui se lie le plus fortement au ER (Schmitt *et al.*, 2001). L'équol diminue la production d'oxyde nitrique en inhibant la synthèse d'oxyde nitreux inductible. La surproduction d'oxyde nitrique par la synthèse d'oxyde nitreux inductible est associée au développement de l'athérosclérose (Kang *et al.*, 2007). Des effets négatifs ont aussi été liés à la production d'équol. La présence d'équol dans l'urine (qui est corrélée fortement avec l'équol dans le sérum) est associée à un risque plus élevé de cancer du sein (Grace *et al.*, 2004).

1.5 Transformation bactérienne des isoflavones

1.5.1 Dégradation par la microflore intestinale

Les isoflavones sont principalement présents dans la nourriture sous une forme glycosylée. Une fois ingérés, les isoflavones glycosylés sont transformés en isoflavones aglycones. Cette transformation est effectuée par des β -glucosidases provenant principalement des bactéries *Lactobacillus*, *Bacteroides* et *Bifidobacterium* (Turner *et al.*, 2003). Une fois les isoflavones aglycones absorbés dans le sang, ces molécules vont être métabolisées par le foie qui va leur ajouter un groupement glucuronide ou sulfate. Les molécules glucuronisées vont suivre la circulation entéro-hépatique et retourner dans l'intestin où elles peuvent être déconjuguées par des β -glucuronidases provenant des entérobactéries comme *Clostridium* et *Bacteroides* (Turner *et al.*, 2003). Les isoflavones peuvent donc recirculer dans le corps même s'ils ont été métabolisés par le foie.

Les isoflavones subissent d'autres modifications par la flore bactérienne intestinale. La bactérie *Eubacterium limosum* est capable d'enlever les groupements méthyle aux molécules de formononétine, biochanine A et glycitéine (Hur et Rafii, 2000). Une espèce de *Clostridium* est capable de transformer la daidzéine en *O*-déméthylangolensin par clivage du cycle C en condition anaérobie (Hur *et al.*, 2002). Récemment, une nouvelle espèce bactérienne anaérobie, *Slackia isoflavoniconvertens* isolée de fèces humaines, s'est révélée capable de transformer la daidzéine et la génistéine en équol et 5-hydroxyéquol, respectivement (Matthies *et al.*, 2009). Chang et Nair ont également isolé une culture bactérienne fécale humaine pouvant convertir de la daidzéine en dihydrodaidzéine (20% de conversion), en benzopyran-4,7-diol, 3-(4-hydroxyphényl) (15,5% de conversion) et en équol (10,6% de conversion) (Chang et

Nair, 1995). Cette même culture transforme la génistéine en dihydrogénistéine (16% de conversion)(Chang et Nair, 1995). La figure 9 montre la voie de dégradation proposée par Coldham *et al.* (1999).

1.5.2 Dégradation par autre type de microflore

Des bactéries appartenant aux genres *Micrococcus* et *Arthrobacter* peuvent modifier certains isoflavones. Elles ont été isolées lors de la fermentation du tempeh, un met indonésien à base de graines de soja fermentées. Des isoflavones polyhydroxylés sont formés par des réactions d'*O*-déméthylation et d'hydroxylation. Les isoflavones testés pour ces réactions étaient la daidzéine, la génistéine, la glycitéine et la biochanine-A (Klus et Barz, 1998).

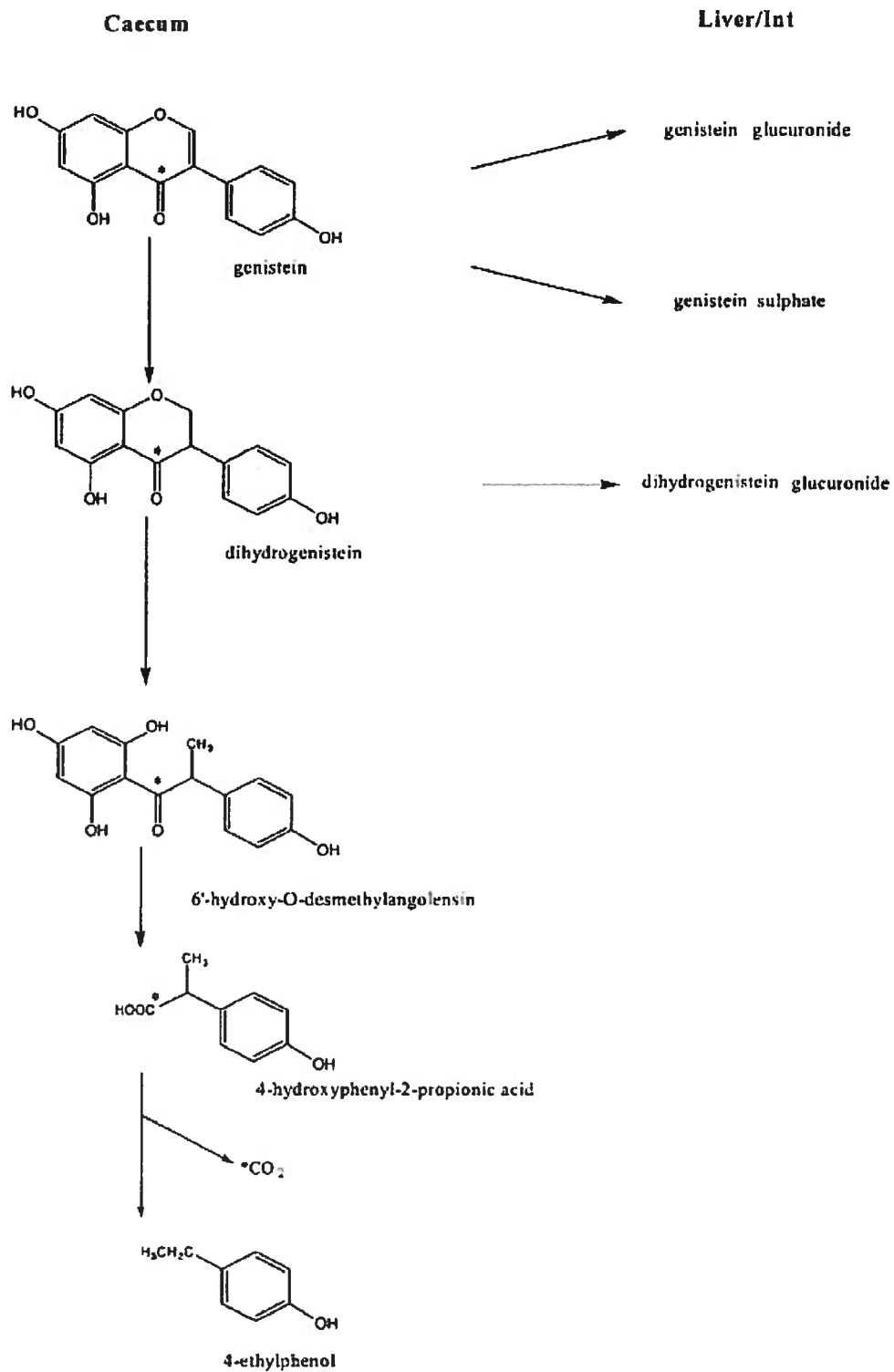


Figure 9. Voie de dégradation de la génistéine chez le rat (Coldham *et al.*, 1999).

2 Matériel et méthodes

2.1 Produits chimiques

L'estrone, le 17 β -estradiol, le 17 α -estradiol, l'estriol, le 17 β -estradiol-3-sulfate sodium et le triéthylamine ont été achetés de Sigma-Aldrich (Oakville, ON, Canada). L'équol et la daidzéine ont été achetés de LC Laboratories (Woburn, MA, Etats-Unis). L'estrone-D4 et le sodium estrone-2,4,16,16-D4 sulfate ont été achetés de C/D/N Isotopes Inc. (Pointe-Claire, QC, Canada). Le méthanol, l'acétonitrile et l'eau étaient de grade HPLC et ont été achetés de Fischer Scientific Company (Ottawa, ON, Canada).

2.2 Dosage des estrogènes et de l'estrogénécité

L'efficacité de différents traitements à dégrader les estrogènes a été comparée. Cette comparaison a été faite en deux parties soit la comparaison des concentrations de différents estrogènes et la comparaison de l'estrogénécité globale de différents échantillons. Le dosage de la concentration des estrogènes se faisait par SPE-LC-MS-MS et la mesure de l'estrogénécité se faisait à l'aide du test YES.

2.2.1 Dosage par SPE-LC-MS-MS

2.2.1.1 Extraction en phase solide (SPE)

Un standard interne des estrogènes visés était ajouté au tout début de l'extraction. La concentration finale du standard était de 5 ppm dans un volume final de 2 ml. Le Tableau 6 montre les standards internes utilisés ainsi que les composés qu'ils servaient à quantifier. Une fois les standards ajoutés, les échantillons étaient ensuite centrifugés à 40000 g pendant 30 minutes à 15°C. Le surnageant était mis de côté. Le culot restant était

resuspendu dans 5 ml de méthanol. La suspension était ensuite centrifugée à 20000 g pendant 15 min à 15°C et le surnageant récupéré. Cette étape de lavage du culot était répétée 4 fois en tout (pour 20 ml de méthanol au total). Le surnageant initial et les surnageants de lavage au méthanol étaient ensuite combinés, mélangés et centrifugés 30 minutes à 40000 g à 15°C. Le surnageant final était ensuite filtré sur 0,7 µm (GF/F, Whatman) et le filtre était rincé avec 3 ml de méthanol.

Tableau 6. Liste des substances quantifiées et des standards internes correspondants utilisés.

Standard interne	Molécule quantifiée
Estrone-2,4,16,16-D4	17β-estradiol
	17α-estradiol
	Estriol
	Estrone
Sodium estrone-2,4,16,16-D4 sulfate	17β-estradiol 17-(β-D-glucuronide sodium)
	17β-estradiol 3-(β-D-glucuronide sodium)
	17β-estradiol-3-sulfate sodium
Équol-D4	Équol

Les cartouches SPE (cartouches Oasis HLB, Waters) utilisées étaient régénérées en passant 10 ml d'acétonitrile et étaient laissées à sécher pendant 30 minutes sous vide (cette étape est nécessaire seulement lorsque les cartouches avaient déjà été utilisées). Les cartouches étaient ensuite conditionnées en passant 10 ml de méthanol suivi de 10 ml d'eau. Les surnageants finaux filtrés des échantillons étaient ensuite passés sur les cartouches qui étaient ensuite lavées avec 6 ml d'eau. L'élution se faisait en passant 4 fois 6 ml de méthanol contenant 5 mM de triéthylamine. Les 4 fractions étaient ensuite

combinées dans un ballon et évaporées à sec au Rotovap. L'échantillon était ensuite resuspendu dans environ 1,5 ml d'une solution d'eau (50%) et d'acétonitrile (50%) contenant 20 mM de triéthylamine. Le volume était ensuite complété à 2.0 ml dans un ballon jaugé. Si nécessaire, l'échantillon était filtré sur un filtre de PTFE de 13 mm de diamètre ayant une porosité de 0,2 μ m (Whatman).

2.2.1.2 LC-MS-MS

Le protocole de dosage des estrogènes au LC-MS-MS a déjà été décrit dans le mémoire de Martine Isabelle (Isabelle, 2007). L'échantillon passait d'abord par une étape de chromatographie liquide à haute performance (HPLC). L'appareil utilisé était un Agilent HP1100 HPLC avec une colonne C18, 150 X 2.1 mm Agilent Zorbax extend. Le programme utilisé durait 31 minutes. L'échantillon injecté était de 25 μ l. Les phases mobiles utilisées étaient de l'eau et de l'acétonitrile contenant tous les deux, 20 mM de triéthylamine (le programme utilisé est décrit au Tableau 7). Le débit de la phase mobile dans la colonne était de 400 μ l/min. A la sortie de celle-ci, le débit a été réduit à 40 μ l/min pour son entrée dans le spectre de masse.

Tableau 7. Programme de HPLC utilisé pour séparer les estrogènes.

Temps (minutes)	Eau, 20 mM triéthylamine (%)	Acétonitrile, 20 mM triéthylamine (%)
0	95	5
18	50	50
20	0	100
24	0	100
26	95	5
31	95	5

Le spectromètre de masse utilisé était un Micromass Quattro II. Les conditions d'opération du spectromètre de masse se retrouvent dans le Tableau 8. Le dosage a été fait en mode MRM afin de différencier les estrogènes des ions pouvant provenir de la matrice (lisier ou milieu de culture). La liste des ions parents et des ions filles qui ont été dosés est présentée au Tableau 9.

Tableau 8. Conditions d'opération du spectromètre de masse.

Gaz de séchage	100 ml/min
Gaz de nébulisation	20 ml/min
Capillaire	3.50 kVolts
Cône	40 Volts
Extracteur	5 Volts
Température de la source	80 °C
Température de désolvation	150 °C
Multiplicateur	650 Volts
Résolution LM	MS1 : 10 MS2 : 12
Résolution HM	MS1 : 10 MS2 : 12
Débit à l'entrée du MS	40 µl/min

Tableau 9. Lise des ions parents et des ions filles et de l'énergie de collision nécessaire pour générer ces ions à partir des différents composés observés.

Composés	Ion parent > ion fille	Énergie de collision (V)
17 β -estradiol	271 > 145	45
17 α -estradiol	271 > 145	45
Estrone	269 > 145	40
Estriol	287 > 171	40
Équol	241 > 119	30
17 β -estradiol 17-(β -D-glucuronide sodium)	447 > 271	35
17 β -estradiol 3-(β -D-glucuronide sodium)	447 > 271	35
17 β -estradiol-3-sulfate sodium	351 > 147	35
Estrone-2, 4, 16, 16-D4	273 > 147	40
Sodium estrone- 2, 4, 16, 16-D4 sulfate	352 > 183	55
Équol-D4	245 > 121	30

La concentration d'un échantillon était calculée en utilisant des courbes de calibration de différents estrogènes. Ces courbes étaient faites en utilisant des solutions contenant différentes concentrations d'estrogènes (de 0,01 ppm à 5 ppm) ainsi qu'une concentration constante de standard deutéré (5 ppm). Les estrogènes étaient dans une solution d'eau et d'acétonitrile (50 :50) contenant 20 mM de triéthylamine. Le Tableau 6 contient la liste des estrogènes et de leur standard deutéré. Un exemple de droite de calibration est présenté à la figure 10. Les calculs suivants étaient effectués pour trouver la concentration en estrogène d'un échantillon :

$$1) \text{ Quotient} = \frac{(\text{Aire sous la courbe de l'analyte}) * (\text{Concentration du standard interne})}{\text{Aire sous la courbe du standard interne}}$$

$$2) \text{ Concentration (ppm)} = \frac{\text{Quotient}}{(\text{Pente de la droite de calibration}) * (\text{Facteur de concentration finale})}$$

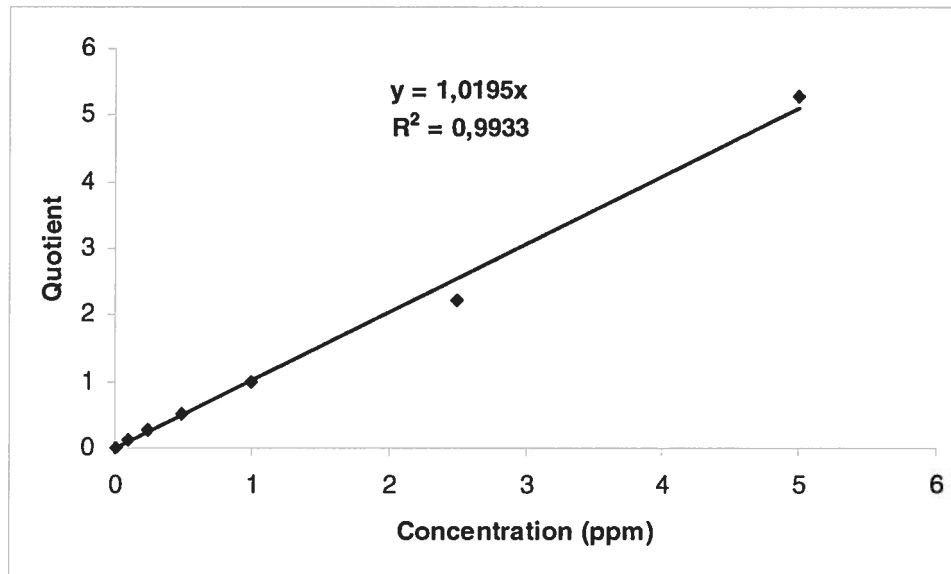


Figure 10. Exemple de droite de calibration pour l'équol

2.2.2 Test YES

La souche de *Saccharomyces cerevisiae* BJ3505 hER 2ERE a été utilisée pour détecter et quantifier l'activité estrogénique des échantillons. Cette souche possède le gène du récepteur d'estrogène humain ainsi que l'élément de réponse aux estrogènes qui est couplé au gène de la β -galactosidase. La souche va produire de la β -galactosidase lorsqu'elle se retrouve en présence d'un échantillon estrogénique. La β -galactosidase va transformer de l'ONPG en nitrophénol et la réaction pourra être dosée par spectrophotométrie. La transformation de la souche BJ3505 a été effectuée par le docteur

K.W. Gaido et le docteur D.P. McDonnel (Gaido *et al.*, 1997). Cette souche a été obtenue de Ed Topp d'Agriculture et Agroalimentaire Canada.

Le protocole utilisé a été décrit dans le mémoire de Martine Isabelle (Isabelle, 2007). La souche était d'abord cultivée sur gélose YES pendant 3 jours (voir section 5.1.1). Une colonie était ensuite utilisée pour inoculer 5 ml de milieu liquide YES (voir section 5.1.2). Après une incubation de 24 heures à 30°C avec agitation à 150 RPM, 5 ml de milieu liquide YES étaient ajoutés et la culture était incubée pour un autre 4-6 heures (jusqu'à l'obtention d'une DO₆₀₀ de 0,8-1,0).

À l'aide d'un mélange d'eau et d'acétonitrile (50 :50), des séries de dilutions ont été effectuées à partir des standards ou des échantillons utilisés. Dans une plaque stérile de 96 puits, 10 µl des différentes dilutions d'échantillons étaient distribués dans chaque puits (chaque dilution a été faite en triplicata). Les plaques étaient ensuite laissées sous une hotte à flux laminaire jusqu'à ce que le solvant soit évaporé. Une solution d'exposition au cuivre (mélange de 40 ml de milieu liquide YES avec 320 µl de CuSO₄ 1mg/ml et 880 µl de la culture de levure) était distribuée dans la plaque de 96 puits, 200 µl par puits (de l'eau milli-Q était ajoutée aux puits servant de blancs). Le liquide des puits était mélangé par agitation et la plaque ensuite incubée à 30°C pour 16 heures dans un incubateur humide.

Après l'incubation, des solutions fraîches étaient utilisées pour la réaction enzymatique. Les solutions d'ONPG/lyticase (section 5.2.1) et de tampon Z+SDS+mercaptoéthanol (section 5.2.2) étaient préparées et conservées séparément sur glace. Ensuite, un volume de 100 µl du contenu de chaque puits de la plaque incubée était transféré dans une nouvelle plaque de 96 puits. La D.O. était mesurée à 415 nm (T₀, temps 0) et à 595 nm. La D.O.₄₁₅ permettait de mesurer la coloration du milieu par le

nitropgénol et la D.O.₅₉₅ servait à évaluer la quantité de biomasse présente dans chaque puits. Les solutions d'ONPG/lyticase et de tampon Z+SDS+mercaptoéthanol étaient mélangées et 100 µl du mélange étaient ajoutés à chaque puits de la plaque de 96 puits. La plaque était laissée 40 minutes à température de la pièce et 50 µl de NaCO₃ 1M étaient ensuite ajoutés pour arrêter la réaction. La D.O. était mesurée à 415 nm (T40 ,temps 40).

2.2.2.1 Méthode de calcul du EC₅₀

Les valeurs de D. O. sont d'abord corrigées :

$$D.O._{415nm} = D.O._{415nm} T40 - (D.O._{415nm} T0 / 2,5 \text{ (facteur de dilution)})$$

$$D.O._{595nm} = D.O._{595nm} - \text{moyenne des } D.O._{595nm} \text{ des blancs (eau sans levures)}$$

$$D.O._{corrigée} = D.O._{415nm} / D.O._{595nm}$$

Les données étaient ensuite utilisées pour tracer une courbe dose-réponse. Une feuille Excel modèle comprenant une formule qui permet de modéliser la courbe dose-réponse permettait de déterminer l'EC₅₀ des échantillons analysés. Le modèle mathématique utilisé était une courbe logistique de formule :

$$réponse = a + \frac{(b - a)}{1 + 10^{((\log EC_{50} - \log c) \times m)}} .$$

Réponse = Réponse obtenue pour une concentration donnée

a = Valeur minimale de la courbe dose-réponse

b = Valeur maximale de la courbe dose-réponse

c = Concentration de la substance utilisée

EC₅₀ = Concentration à laquelle on obtient 50% de la réponse maximale

m = Pente de la courbe-dose réponse

La valeur de m a été gardée constante afin d'obtenir des courbes dose-réponse parallèles et facilement comparables. L' EC_{50} était calculé à l'aide du Solver d'Excel. Les paramètres a , b et $\log EC_{50}$ étaient définis comme variables. La somme du carré de la différence entre les valeurs calculées et les valeurs obtenues était à minimiser.

2.3 Enrichissement de cultures en présence d'équol et isolement de souches dégradant l'équol

Des microorganismes pouvant dégrader l'équol ont été recherchés. Dans un premier temps, des enrichissements en culture liquide ont été réalisés selon différentes conditions de culture. Par la suite, différents isolats ont été obtenus sur milieu solide contenant de l'équol comme source de carbone.

2.3.1 Enrichissement en culture liquide

Trois stratégies d'enrichissements utilisant différentes concentrations d'équol et différents milieux ont été choisies. Les enrichissements ont été réalisés à la température de la pièce dans des erlenmeyer de 125 ml contenant 50 ml de milieu, sous agitation à environ 150 RPM. La durée de tous les enrichissements était de un mois et 5 ml d'inoculum de culture étaient transférés dans 45 ml de milieu frais à chaque semaine. Pour tous les enrichissements, l'équol était dissous dans du méthanol (à une concentration de 10000 ppm) avant d'être ajouté au milieu pour ensuite être autoclavé afin qu'aucun méthanol ne se retrouve dans le milieu.

2.3.1.1 Enrichissement à basse concentration d'équol (10 ppm)

Cet enrichissement a été effectué dans du milieu MM (section 5.3.1) contenant 10 ppm d'équol. L'inoculum initial était 5 ml de la biomasse provenant d'un bioréacteur

effectuant de la déphosphatation biologique qui a été ajouté à 45 ml de milieu. Ce bioréacteur était optimisé pour le retrait biologique du phosphore d'un échantillon de lisier traité dans un autre bioréacteur aérobique thermophile (Potvin-Barakatt, 2008).

2.3.1.2 Enrichissement à haute concentration d'équol (100 ppm)

Cet enrichissement a été effectué dans du milieu MM auquel a été ajouté une solution de vitamines (section 5.3.4) et contenant 100 ppm d'équol. L'inoculum initial était 5 ml de la biomasse provenant d'un bioréacteur effectuant de la déphosphatation biologique tel que déjà mentionné à la section 2.1.1.1, rajouté à 45 ml de milieu (Potvin-Barakatt, 2008).

2.3.1.3 Enrichissement dans un milieu contenant du lisier et une haute concentration d'équol (100 ppm)

Cet enrichissement a été effectué dans un milieu MM auquel a été ajouté une solution de vitamine (voir section 5.3.4) et une part de lisier dilué (deux dilutions ont été utilisées : 1/20 et 1/50) et contenait 100 ppm d'équol. Le lisier a été prélevé au niveau de la préfosse et a été conservé à 4°C depuis environ un an. L'équol présent dans le lisier dilué à 1/20 et 1/50 a été dosé par spectrométrie de masse et se retrouve en quantité négligeable lorsque comparé à une concentration de 100 ppm. L'inoculum initial était composé de la biomasse provenant d'un bioréacteur effectuant de la déphosphatation biologique (Potvin-Barakatt, 2008) et de boue activée provenant de l'usine d'épuration des eaux de Vaudreuil (Québec, Canada). Les différentes biomasses ont été mélangées à part égale et 5 ml de ce mélange ont été transférés dans 45 ml de milieu. De plus, le lisier dilué n'a pas été stérilisé et a donc contribué à l'inoculum initial de l'enrichissement.

2.3.2 Isolement des microorganismes sur géloses

Les géloses pour l'isolement étaient composées de milieu MM auquel était ajouté 1,5% l'agar purifié (Oxoid, Basingstoke, Royaume Uni) et de l'équol. La concentration d'équol était la même que celle utilisée lors de l'enrichissement (10 ou 100 ppm). Comme pour l'enrichissement, l'équol était d'abord solubilisé dans du méthanol (à une concentration de 10000 ppm) et ensuite ajouté au milieu à la bonne concentration puis autoclavé. Le milieu était ensuite autoclavé et une solution de vitamines lui était ajoutée lorsqu'il redevenait tiède. Étrangement, les géloses prenaient une couleur brun foncé après l'autoclavage. Différents tests ont été effectués (utilisation d'autres types d'agar, ajout du fer après l'autoclavage plutôt qu'avant) mais rien n'a pu empêcher l'apparition de la coloration. La coloration apparaissait aussi dans des géloses ne contenant pas d'équol. Ces géloses permettaient la croissance de microorganismes et ont donc été utilisées lors de nos expériences subséquentes.

Avant l'étalement sur milieu solide, l'échantillon provenant de l'enrichissement final était d'abord dilué dans le rapport 1 :4 dans du MM. L'échantillon était lavé deux fois avec du MM pour éviter que de la matière organique soit transférée de l'enrichissement à la gélose d'isolement (le but étant de n'avoir que de l'équol comme source de carbone). L'étalement de 100 µl de la dilution ainsi obtenue se faisait à l'aide de billes de verre. Des étalements sur géloses sans équol ont aussi été effectués pour fin de comparaison afin de s'assurer que la croissance était bien due à la présence d'équol. Après sept jours d'incubation, les colonies visuellement différentes étaient repiquées sur une nouvelle gélose et aussi conservées dans une solution de glycérol 25%. Quelques fois, les colonies prenaient plus que sept jours à apparaître et la période entre deux

repiquages pouvait alors être prolongée jusqu'à deux semaines. Quatre repiquages ont été effectués pour chaque isolat.

2.4 Caractérisation des isolats dégradant l'équol

Les isolats obtenus ont été caractérisés en identifiant à quel genre ou espèce ceux-ci appartiennent, en mesurant leur capacité à dégrader l'équol et à modifier l'estrogénécité d'un échantillon. Des intermédiaires potentiellement produits lors la dégradation de l'équol ont été recherchés pour certains isolats.

2.4.1 Suivi de la capacité à dégrader l'équol par HPLC-UV

2.4.1.1 Conditions des tests de dégradation

Les tests de dégradation ont été réalisés à la température de la pièce dans des erlenmeyers de 125 ml contenant 50 ml de milieu, sous agitation à environ 150 RPM. Les milieux testés étaient le MM et le TSB. Une colonie de l'isolat à tester était transférée d'une préculture sur gélose dans le milieu. Les tests ont été faits sur une durée de 14 jours. Un échantillon de 1 ml était prélevé à chaque jour ou chaque 2 jours.

2.4.1.2 Préparation des échantillons

Les échantillons étaient dilués 1 :1 avec de l'acétonitrile contenant 0,2% d'acide acétique. Les solutions étaient ensuite centrifugées à vitesse maximale durant 5 minutes. Les surnageants étaient ensuite transférés dans des tubes pour HPLC et analysés au HPLC. Pour les échantillons contenant de la biomasse, une étape de filtration supplémentaire a été prévue (sur filtres de PTFE de 13 mm de diamètre ayant une porosité de 0,2 μ m).

2.4.1.3 Paramètres des analyses au HPLC

Le dosage de l'équol se faisait par HPLC (Waters 600E controller, Waters 486 tunable absorbance detector, Waters 600E pump et Waters 717 contrôlé par ordinateur à l'aide du logiciel Empower 2 build 2154) en mesurant l'absorbance à 225 nm. La colonne utilisée était une colonne C₁₈ Nova-pak 3.9 X 150 mm WAT086344 de la compagnie Waters. Les phases mobiles utilisées étaient de l'eau contenant 0,1% d'acide acétique et de l'acétonitrile contenant 0,1% d'acide acétique. En utilisant le gradient présenté au Tableau 10, le temps de rétention de l'équol était de 2,75 minutes.

Tableau 10. Gradient utilisé au HPLC pour quantifier l'équol.

Temps (minutes)	Débit (ml/min)	% Eau + 0,1 % acide acétique	%Acétonitrile + 0,1 % acide acétique
0	2	75	25
8	2	50	50
10	2	75	25

2.4.2 Identification des souches isolées par séquençage de l'ADN codant pour l'ARNr 16S

2.4.2.1 Extraction phénol-chloroforme de l'ADN génomique

Les souches à l'étude ont d'abord été cultivées sur le milieu solide approprié. Quelques colonies étaient ensuite transférées dans 1 ml de TEN (voir section 5.4.1) dans un tube de 1,5 ml contenant 200 mg de billes (0,10 à 0,25 mm). Les préparations étaient ensuite passées à l'homogénéisateur (Fastprep 24, MP biomedical) durant 30 secondes à 6 M/s suivi de deux passages de 20 secondes à 4 M/s. Les préparations ont été

centrifugées durant cinq minutes à 13000 RPM et les surnageants ont été récoltés. Un volume de phénol était ajouté aux surnageants qui étaient ensuite mélangés au vortex et centrifugés durant cinq minutes à 13000 RPM. Les surnageants étaient récoltés et une autre étape identique d'ajout de phénol était effectuée. L'ADN a été purifié par une extraction avec un volume de phénol : chloroforme : alcool isoamylique (25 :24 :1), suivi d'une centrifugation de deux minutes à 13000 RPM. Les surnageants étaient récupérés et deux volumes d'éthanol 100% leurs ont été ajoutés. Après les avoir délicatement mélangés, les préparations ont été mises à -20°C durant 30 minutes. Après les 30 minutes, elles ont été centrifugées 10 minutes à 13000 RPM. Les surnageants ont été retirés et les culots mis à sécher au « speed vac » (Speed Vac DNA 110, Savant) durant 15 minutes ou plus à température maximale jusqu'à l'évaporation totale de l'éthanol. Chacun des culots a ensuite été resuspendus dans 50 µl d'eau milli-Q. Ensuite, la qualité de l'extraction a été vérifiée en faisant migrer l'ADN sur gel d'agarose 0,5% (90 V, 30 minutes). Le gel était ensuite coloré au bromure d'éthidium et une photo a été prise au AlphaImager (AlphaImager 3400, Innotech). La quantité d'ADN et sa pureté ont été quantifiées au spectrophotomètre (Nanodrop ND-1000 contrôlé par le logiciel nanodrop version 3.1.2, Nanodrop). Le quotient 260/280 représente la quantité de protéines présentes dans l'extrait, une valeur se rapprochant de 2 est souhaitable. Le quotient 260/230 représente la contamination au phénol de l'échantillon, une valeur se rapprochant de 2 est souhaitable. Si le quotient 260/230 était trop éloigné de 2, les préparations d'ADN étaient placées dans la hotte chimique durant 30 minutes afin de permettre l'évaporation du phénol.

2.4.2.2 Amplification de l'ADN codant pour l'ARNr 16S

L'amplification de l'ADN codant pour l'ARNr 16S a été faite par PCR en utilisant les amorces PA et PH (Frank *et al.*, 2008). L'amplification a été effectuée à l'aide de l'appareil à PCR (Robocycler gradient 96, Stratagene). Une solution de réaction de 96 µl était d'abord préparée à l'aide du kit Illusta de GE Healthcare (section 5.4.2). Cette solution contenait 10 µl de tampon 10X (section 5.4.3), 2 µl d'une solution contenant les 4 désoxyribonucléotides triphosphates à une concentration de 10 mM (Kit contenant les 4 désoxyribonucléotides triphosphates à 100mM, Invitrogen), 2 µl de chaque solution d'amorce à 10 pmol/µl, 2 µl de BSA à 20 µg/µl, 1 µl de rTAQ ADN polymérase (section 5.4.2) et 76 µl d'eau milli-Q stérile. L'échantillon d'ADN à amplifier était ensuite ajouté. Le volume ajouté était de 4 µl pour une quantité totale d'ADN d'environ 50 ng. Les cycles utilisés lors de l'amplification du gène au PCR sont résumés dans le Tableau 11. Ensuite, le succès de la réaction était vérifié en faisant migrer les produits de PCR sur gel d'agarose 1,5% (90 V, 30 minutes). Le gel était ensuite coloré au bromure d'éthidium et une photo était prise avec l'AlphaImager (AlphaImager 3400, Innotech).

Tableau 11. Cycles de PCR.

Fenêtre	Temps à 94°C	Temps à 54°C	Temps à 72°C	Nombre de cycles
1	5 minutes	5 minutes	45 secondes	1
2	45 secondes	45 secondes	45 secondes	30
3	0	0	10 minutes	1

2.4.2.3 Séquençage

L'identification des souches isolées a été réalisée par séquençage de l'ADN codant pour l'ARNr 16S. L'amplification a été effectuée à l'aide des amorces PA et PH (Frank *et al.*, 2008). Les amplicons ont ensuite été expédiés au centre d'innovation de l'Université McGill et de Génome Québec où ils ont été séquencés. L'analyse des chromatogrammes a été effectuée à l'aide du logiciel Chromas Lite 2.01. L'alignement des séquences et la création de la séquence consensus ont été faits à l'aide du logiciel BioEdit version 7.0.9.0. La séquence a ensuite été comparée aux séquences du NCBI à l'aide du programme BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Les séquences ont été sélectionnées en excluant les séquences de clones non cultivés et en retenant les plus apparentées. Les séquences incluant l'espèce étaient préférées à celles ne rapportant qu'un genre.

2.5 Synthèse d'équol deutéré

L'équol deutéré a été utilisé comme standard interne de l'équol pour la spectrométrie de masse et a été aussi utilisé comme substrat lors de l'expérience de recherche d'intermédiaires de dégradation. L'équol deutéré n'est pas disponible commercialement et il a fallu en synthétiser.

Cette synthèse avait déjà été effectuée par Martine Isabelle, une étudiante du laboratoire et le protocole que nous avons utilisé est une modification de celui présenté dans son mémoire (Isabelle, 2007). Le protocole initial prévoyait de mettre 20 mg de daidzéine dans 10 ml d'isopropanol et d'ajouter 50 mg de palladium : charbon activé (5%) et de laisser cette préparation en présence de deutérium à 175 PSI durant une dizaine de jours en vérifiant la synthèse en spectrométrie de masse aux 2 jours. Pour la

vérification au spectromètre de masse, 0,5 ml de la solution de synthèse était centrifugée et filtrée sur 0,2 micron.

Après 11 jours, la daidzéine avait disparu mais l'on obtenait plusieurs molécules de masses allant de 239 à 245 (le 245 n'étant pas majoritaire). La panoplie de molécules obtenues semblait être due au solvant non deutéré utilisé. Étant donné que l'isopropanol deutéré est très dispendieux, des essais ont été effectués avec du méthanol. Ce solvant réussissait à dissoudre la daidzéine avec une efficacité semblable à l'isopropanol et donnait un résultat identique après synthèse (disparition de daidzéine et apparition de plusieurs molécules de masse allant de 239 à 245). Du méthanol deutéré a donc été commandé et la synthèse a été effectuée dans les mêmes conditions. Après 10 jours de réaction, la daidzéine avait disparu et l'on obtenait 2 pics, un à 241 (probablement un intermédiaire de la synthèse d'équol) et le 245. Après vérification au spectromètre de masse, le 245 était bien de l'équol deutéré.

Il a fallu synthétiser de grandes quantités d'équol deutéré pour son utilisation comme substrat. Certaines modifications ont été apportées au protocole pour augmenter la quantité d'équol synthétisée. Les mêmes proportions de produits ont été utilisées sauf pour la daidzéine qui ont été utilisées à une concentration de 2000 ppm (ce qui équivaut à environ 2 fois la solubilité de la daidzéine dans le méthanol). La réaction se déroulait dans un appareil à hydrogénation qui avait une plus grande capacité que la bonbonne. La pression de deutérium était de 90 PSI au lieu de 175. Après une dizaine de jours, le produit de la synthèse était vérifié au MS. La totalité de la solution de réaction était ensuite évaporée et resuspendue dans 5 ml de méthanol. Cette dernière solution était ensuite aliquotée, centrifugée (13000 RPM, 5 minutes), filtrée (0,2 micron) pour ensuite être dosée au MS.

3 Résultats

3.1 Quantification des estrogènes présents dans le lisier

3.1.1 Récupération des estrogènes par la méthode d'extraction en phase solide

Le pourcentage de récupération des estrogènes présents dans le lisier par la méthode d'extraction en phase solide a été évalué. Cette expérience a été effectuée en ajoutant les 3 standards deutérés (estrone-d4, équol-d4 et sodium estrone-2, 4, 16, 16-d4 sulfate) dans du lisier. Deux séries d'extractions ont été faites. Une première où les estrogènes ont été ajoutés avant l'extraction et une autre après l'extraction. Les estrogènes ont ensuite été dosés au spectromètre de masse. Le pourcentage de récupération a été calculé en comparant les concentrations d'estrogènes des deux séries d'extraction. Les résultats se retrouvent au tableau 12. On observe que les pourcentages de récupération ont varié de 62 % à 105 % selon les standards utilisés.

Tableau 12. Pourcentage de récupération des 3 standards deutérés dans du lisier ayant été extrait par la méthode d'extraction en phase solide et dosé par spectrométrie de masse.

Standard deutéré	% de récupération
Estrone-d4	71 ± 14
Sodium estrone-2, 4, 16, 16-d4 sulfate	62 ± 7
Équol-d4	105 ± 14

3.1.2 Limite de dosage des estrogènes du spectromètre de masse dans le lisier

La concentration minimale à laquelle le spectromètre de masse peut doser les estrogènes a été déterminée. Une extraction a d'abord été effectuée sur du lisier auquel 5 ppm de chaque standard d'estrogène deutéré ont été ajoutés. Le bruit de fond a été calculé en intégrant l'aire sous la courbe de la ligne de base sur une largeur équivalente au pic d'estrogène deutéré visé. La limite de dosage a été calculée comme étant égale à 3 fois le bruit de fond. Les résultats se retrouvent au tableau 13.

Au cours des essais d'optimisation des protocoles d'extraction et de spectrométrie de masse, seuls l'estrone et l'équol se retrouvaient en assez grande quantité dans le lisier pour être dosés. Les autres estrogènes visés étaient à la limite de la détection ou absent.

Tableau 13. Limite de dosage des standards deutérés d'estrogènes.

Estrogène	Limite de dosage (µg/l)
Estrone-d4	38,1
Sodium estrone-2, 4, 16, 16-d4 sulfate	30,5
Équol-d4	6,8

3.2 Isolement sur géloses et identification des isolats

3.2.1 Isolement sur géloses

3.2.1.1 Résultats de l'isolement pour l'enrichissement à basse concentration d'équol (10 ppm d'équol)

Le dernier repiquage de colonies de l'enrichissement à basse concentration d'équol a donné 6 isolats. La description des colonies données par chacun des isolats se retrouve au tableau 14.

Tableau 14. Description visuelle des colonies sur milieu MM des isolats de l'enrichissement à basse concentration d'équol.

Isolat	Description des colonies
9.1	Petites (1 mm), rondes, transparentes
11.1	Moyennes (2 mm), rondes, transparentes
11.2	Moyennes (2 mm), rondes, transparents, centre de couleur brunâtre
13.1	Flaques, laiteuses, blanchâtres, centres plus foncés
13.2	Moyennes (2 mm), rondes, laiteuses
13.3	Petites-moyennes (1-2 mm), laiteuses, blanchâtres

3.2.1.2 Résultats de l'isolement pour l'enrichissement à haute concentration d'équol (100 ppm d'équol)

Pour l'enrichissement à haute concentration d'équol, le dernier repiquage de colonies a donné 37 isolats différents. La description des colonies de chacun des isolats se retrouve au tableau 15.

Tableau 15. Description visuelle des colonies sur milieu MM des isolats de l'enrichissement à haute concentration d'équol.

Isolat	Description des colonies
1	Moyennes (2 mm), rondes, transparentes
2	Minuscules (<1 mm), rondes, transparentes
3.1	Minuscules (<1 mm), rondes, transparentes
3.2.1	Moyennes (2 mm), beiges, opaques
3.2.2	Minuscules (<1 mm), rondes, transparentes
4	Minuscules (<1 mm), rondes, transparentes
5.1	Minuscules (<1 mm), rondes, transparentes
5.2	Flaques, transparentes, zone d'inhibition sans 5.1 *
6.1	Minuscules (<1 mm), rondes, roses
6.2.1	Minuscules (<1 mm), rondes, transparentes
6.2.2	Flaques, transparentes, zone d'inhibition sans 6.2.1 *
7.1	Minuscules (<1 mm), rondes, transparentes
7.2	Minuscules (<1 mm), rondes, transparentes
9.1.1	Minuscules (<1 mm), rondes, transparentes
9.1.2	Flaques, transparentes, zone d'inhibition sans 9.1.1 *
9.2.1	Flaques, transparentes, zone d'inhibition sans 9.2.2 *
9.2.2	Minuscules (<1 mm), rondes, transparentes
10.1	Flaques, laiteuses
10.2	Minuscules (<1 mm), rondes, transparentes
11.1	Minuscules (<1 mm), rondes, transparentes
11.2	Flaques, transparentes, zone d'inhibition sans 11.1 *
12	Minuscules (<1 mm), rondes, transparentes

13.1	Minuscules (<1 mm), rondes, transparentes
13.2	Flaques, transparentes
14.1	Minuscules (<1 mm), rondes, transparentes
14.2	Moyennes (2 mm), rondes, beiges, opaques
15	Minuscules (<1 mm), rondes, roses
16.1	Minuscules (<1 mm), rondes, transparentes
16.2	Minuscules (<1 mm), rondes, transparentes
18	Minuscules (<1 mm), rondes, transparentes
19	Minuscules (<1 mm), rondes, transparentes
20.1	Minuscules (<1 mm), rondes, transparentes
20.2	Minuscules (<1 mm), rondes, transparentes
21	Minuscules (<1 mm), rondes, roses
22	Flaques, transparentes
23.1	Flaques, transparentes, texture irrégulière
23.2	Flaques, transparentes, texture irrégulière, centre brun

*Deux différents isolats se retrouvaient sur les géloses du dernier repiquage.

3.2.1.3 Résultats de l'isolement pour l'enrichissement à haute concentration d'équol contenant du lisier (100 ppm d'équol)

Le dernier repiquage des colonies de l'enrichissement à haute concentration d'équol contenant du lisier a donné 22 isolats différents. La description visuelle des colonies de chacun des isolats se retrouve au tableau 16.

Tableau 16. Description visuelle des colonies sur milieu MM des isolats de l'enrichissement à haute concentration d'équol contenant du lisier.

Isolat	Description des colonies
1.1	Petites (1 mm), rondes, rosées
2.1	Petites (1 mm), rondes, laiteuses
2.2	Petites (1 mm), rondes, rosées
3.1.1.1	Petites (1 mm), rondes, laiteuses
3.1.1.2	Flaques, rosées
3.1.2	Petites (1 mm), rondes, laiteuses
3.2.1	Petites (1 mm), rondes, laiteuses
4.1	Petites (1 mm), rondes, blanches
4.2	Petites (1 mm), rondes, rosées
6.1.1	Petites (1 mm), rondes, laiteuses
6.1.2	Petites (1 mm), rondes, rosées
6.2	Petites (1 mm), rondes, laiteuses
7	Petites (1 mm), rondes, transparentes
8	Petites (1 mm), rondes, transparentes
9.1	Petites (1 mm), rondes, laiteuses
9.2.1.1	Grosses (3 mm), rondes, brunes
9.2.1.2	Petites (1 mm), rondes, transparentes
9.2.2	Petites (1 mm), rondes, transparentes
10.1.1.1	Grosses (3 mm), rondes, blanches
10.1.1.2	Petites (1 mm), rondes, transparentes
10.1.2	Petites (1 mm), rondes, transparentes
9.1.110.2	Petites (1 mm), rondes, laiteuses

3.2.2 Identification des isolats par séquençage de l'ADN codant pour l'ARNr 16S

3.2.2.1 Identification des isolats de l'enrichissement à basse concentration d'équol (10 ppm d'équol) par séquençage

Les genres et espèces des isolats séquencés se retrouvent au tableau 17. Les isolats 9.1, 11.1, 11.2, 13.2 et 13.3 semblent être de la même espèce (*Arthrobacter protophormiae*) alors que seul l'isolat 13.1 est d'une espèce différente (*Pseudomonas stutzeri*). Les séquences des différents isolats ont été déposées dans GenBank (voir section 5.1.1).

Tableau 17. Genres et espèces des isolats de l'enrichissement à basse concentration d'équol déterminés par séquençage de l'ADN codant pour l'ARNr 16S (1500 pb) ainsi que le score, le % de couverture et le % d'identité de la séquence.

Isolat	Genre/espèce	Score	Couverture (%)	Identité (%)	Numéro
9.1	<i>Arthrobacter protophormiae</i>	2547	100	99	EU086815.1
11.1	<i>Arthrobacter protophormiae</i>	2586	99	99	EU086815.1
11.2	<i>Arthrobacter protophormiae</i>	2252	100	95	EU086815.1
13.1	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	2597	100	95	EU741092.1
13.2	<i>Arthrobacter protophormiae</i>	2311	100	95	EU086815.1
13.3	<i>Arthrobacter protophormiae</i>	1596	77	91	EU086815.1

3.2.2.2 Identification des isolats de l'enrichissement à haute concentration d'équol (100 ppm d'équol) par séquençage

Les genres et espèces des isolats séquencés se retrouvent au tableau 18. Il y a 3 genres retrouvés dans les isolats provenant de cet enrichissement : *Stenotrophomonas*, *Pseudomonas* et *Serratia*. Les séquences des différents isolats ont été déposées dans GenBank (voir section 5.1.2).

Tableau 18. Présentation des genres et espèces des isolats de l'enrichissement à haute concentration d'équol déterminés par séquençage de l'ADN codant pour l'ARNr 16S (1500 pb) ainsi que le score, le % de couverture et le % d'identité de la séquence.

Isolat	Genre/espèce	Score	Couverture (%)	Identité (%)	Numéro
2	<i>Stenotrophomonas</i>	2250	100	99	AF181569.1
3.2.1	<i>Pseudomonas</i>	935	50	89	AB461607.1
5.2	<i>Pseudomonas</i>	1371	100	99	EU781733.1
6.1	<i>Serratia marcescens</i>	2560	99	99	FJ495145.1
10.1	<i>Serratia</i>	1447	100	100	FJ360761.3
23.1	<i>Pseudomonas</i>	1367	70	91	FJ594441.1
23.2	<i>Pseudomonas</i>	1321	100	99	DQ127533.1

3.2.2.3 Identification des isolats de l'enrichissement à haute concentration d'équol contenant du lisier (100 ppm d'équol) par séquençage

Les genres et espèces des isolats séquencés se retrouvent au Tableau 19. Cinq genres différents ont été retrouvés dans les isolats provenant de cet enrichissement :

Klebsiella, *Serratia*, *Pseudomonas*, *Citrobacter* et *Pseudochrobactrum*. Les séquences des différents isolats ont été déposées dans GenBank (voir section 5.1.3).

Tableau 19. Présentation des genres et espèces des isolats de l'enrichissement à haute concentration d'équol contenant du lisier déterminés par séquençage de l'ADN codant pour l'ARNr 16S (1500 pb) ainsi que le score, le % de couverture et le % d'identité de la séquence.

Isolat	Genre/espèce	Score	Couverture (%)	Identité (%)	Numéro
3.1.1.1	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1458	99	99	CP000964.1
3.1.1.2	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1447	100	99	CP000964.1
3.1.2	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1443	100	99	CP000964.1
4.2	<i>Serratia marcescens</i>	1460	100	100	FJ360759.1
6.1.1	<i>Pseudomonas</i>	1353	100	92	AM421982.1
6.1.2	<i>Citrobacter farmeri</i>	1431	100	99	EU030438.1
8	<i>Pseudochrobactrum</i>	1434	100	100	AM180485.1 AM180484.1
9.1	<i>Klebsiella</i>	2593	99	99	DQ358738.1
9.2.1.1	<i>Klebsiella oxytoca</i>	1449	100	99	AB244452.1
9.2.1.2	<i>Citrobacter farmeri</i>	2512	99	99	EU030438.1
10.1.1.1	<i>Citrobacter farmeri</i>	1485	100	99	AF025371.1
10.1.1.2	<i>Citrobacter farmeri</i>	1328	100	97	AF025371.1
21.1	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2597	100	99	AP006725.1

3.3 Capacité à dégrader l'équol des isolats et diminution d'estrogénécité

3.3.1 Suivi de la concentration d'équol par HPLC lors de tests de dégradation des isolats

3.3.1.1 Optimisation et validation du protocole de HPLC pour la quantification de l'équol

Différents paramètres du protocole de dosage de l'équol par HPLC effectué lors des essais de dégradation ont été optimisés. Deux plages de concentrations d'équol ont été testées : de 1 à 10 ppm et de 10 à 100 ppm. Les résultats étaient plus précis et exacts dans la plage de 10 à 100 ppm. Celle-ci a été retenue et aucune dilution des échantillons n'a été effectuée. L'équol présente deux pics d'absorbance aux rayons ultraviolets : 282 et 225 nm. L'aire du pic à 225 nm était environ 3 fois plus importante que celle du pic à 282 nm pour une même concentration. Les lectures ont donc été faites à 225 nm. Des vérifications ont été faites sur les milieux utilisés, soit le milieu MM et le milieu TSB, quant à leur effet sur la chromatographie. Les deux milieux n'ont causé aucun changement au niveau du temps de rétention de l'équol, ni au niveau des concentrations mesurées.

Les échantillons étaient quelques fois entreposés quelques jours au réfrigérateur après leur traitement mais avant leur passage au HPLC. L'effet possible de ce séjour au réfrigérateur a été vérifié. Aucune variation au niveau des valeurs d'équol mesurées et aucune précipitation des milieux (qui aurait pu occasionner des problèmes au niveau de la colonne) n'ont été observées.

L'effet de l'approche adoptée pour ajouter l'équol au milieu a aussi été vérifié. La poudre d'équol se dissout très mal si elle est ajoutée directement dans l'eau. La solution stock d'équol a donc été préparée dans du méthanol. Le méthanol ne peut être ajouté et laissé dans le milieu si l'on veut que l'équol soit la seule source de carbone. La première approche a été d'ajouter la solution stock dans le contenant à utiliser et d'évaporer le méthanol en le chauffant. Malheureusement, l'équol se dissolvait mal dans l'eau et la solubilisation n'était pas instantanée, ce qui posait problème pour un suivi précis de la dégradation de l'équol. L'autre approche était d'ajouter la solution stock de méthanol dans le milieu avant de l'autoclaver. Le méthanol s'évaporait durant l'autoclavage et l'équol restait en solution dans l'eau (l'absence de pertes a été vérifiée au HPLC).

3.3.1.2 Test de dégradation sur les isolats de l'enrichissement à basse concentration d'équol (10 ppm)

Étant donné que le nombre d'isolats de l'enrichissement à basse concentration d'équol n'était que de 6, ils ont tous été testés pour leur capacité à dégrader l'équol. Le suivi de la concentration d'équol se retrouve aux figures 11 (pour le milieu TSB) et 13 (pour le milieu MM) et celui de la biomasse est présenté à la figure 12.

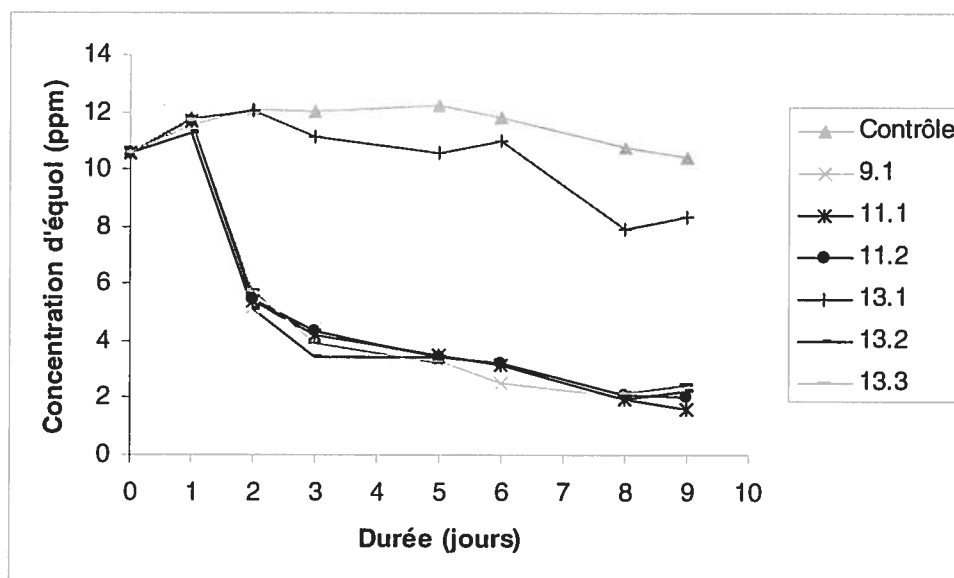


Figure 11. Suivi de la concentration d'équol pour les isolats de l'enrichissement à basse concentration d'équol dans du TSB.

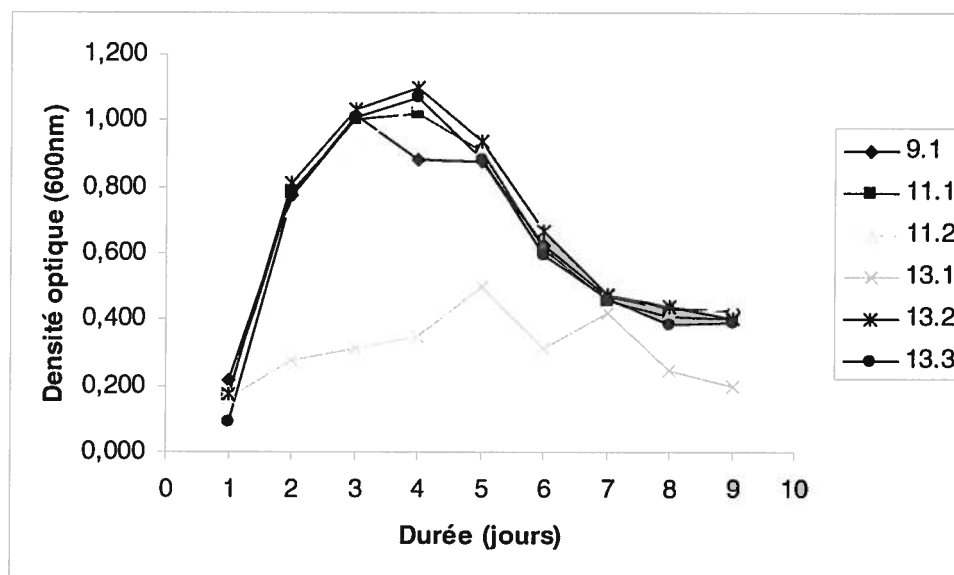


Figure 12. Suivi de la biomasse des isolats de l'enrichissement à basse concentration d'équol dans du TSB.

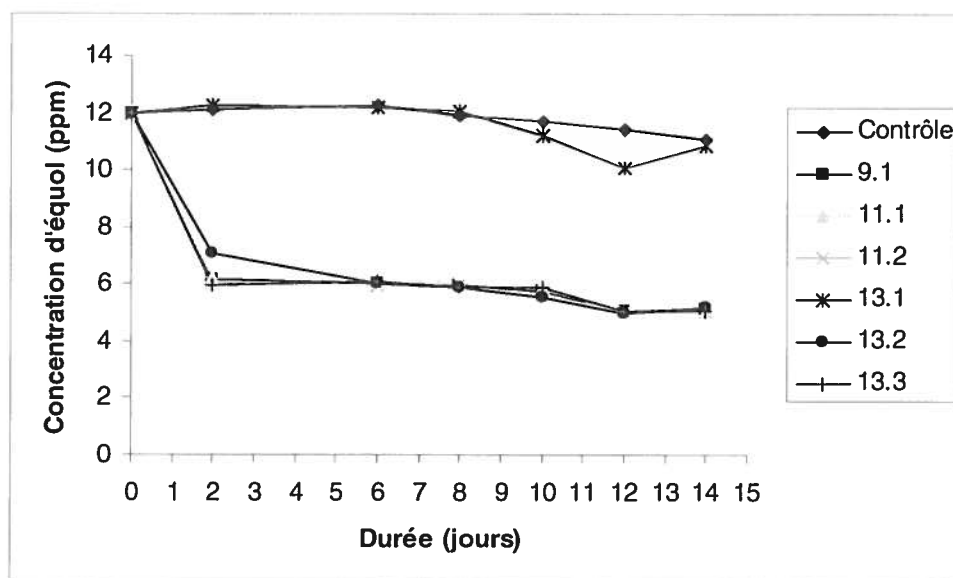


Figure 13 Suivi de la concentration d'équil pour les isolats de l'enrichissement à basse concentration d'équil dans du MM.

La figure 11 montre que tous les isolats sauf le 13,1 dégradent l'équil en milieu TSB. Pour tous les isolats qui dégradent l'équil en milieu TSB, la plus grande partie de la dégradation se produit rapidement en deux jours pour ensuite se continuer plus lentement jusqu'à une dégradation finale d'environ 80% de l'équil initial. Bien que le test ait été fait sur une durée de 14 jours, seuls les neuf premiers jours sont présentés car il y a eu contamination et dégradation de l'équil dans les contrôles lors des cinq derniers jours du test. La figure 12 montre que tous les isolats, sauf le 13.1, ont eu une phase de croissance exponentielle des jours 0 à 3, une phase stationnaire des jours 3 à 5 et une phase de déclin des jours 5 à 7. La dégradation de l'équil correspond à la phase de croissance exponentielle des cultures. L'isolat 13.1 présente une croissance beaucoup moins importante que les autres isolats et semble conserver une biomasse stable tout au long du test.

La figure 13 montre que tous les isolats sauf le 13,1 dégradent l'équil en milieu MM. La totalité de la dégradation semble se produire dans les deux premiers jours dans le

milieu MM. À la fin du test, la moitié de l'équol initial était dégradé. Les isolats en milieu MM ne présentaient aucune croissance mesurable à 600 nm et aucune biomasse de visible à l'œil nu.

3.3.1.3 Test de dégradation de l'équol par les isolats de l'enrichissement à haute concentration d'équol (100 ppm)

Des essais pour évaluer la capacité des isolats du de l'enrichissement à haute concentration d'équol à dégrader l'équol ont été réalisés. Les résultats de ces essais sont présentés dans le tableau 20. L'erreur sur les valeurs de concentration d'équol due au HPLC était d'environ 10%. Seul l'isolat 3.2.1 (36% de dégradation) présentait une dégradation claire de l'équol. Les isolats 6.1, 9.2.1, 15 et 20.1 ont aussi été sélectionnés pour le test de dégradation car ils présentaient 4 types différents de colonies et étaient probablement de genres ou d'espèces différents. Les résultats du séquençage n'étaient pas disponibles au moment de l'expérience; le choix des isolats à tester a été basé sur les résultats des essais de dégradation et le type de colonie de chaque isolat. Des essais montrant la cinétique de dégradation en fonction du temps ont donc été effectués sur les isolats 3.2.1, 6.1, 9.1.2, 15 et 20.1.

Tableau 20. Essais de dégradation de l'équol par tous les isolats de l'enrichissement à haute concentration d'équol en milieu TSB après 7 jours d'incubation.

Isolat	% de l'équol initial restant	Isolat	% de l'équol initial restant
1	96%	9.2.2	102%
2.1	89%	10.1	92%
3.1	100%	12	99%
3.2.1	64%	13.1	96%
3.2.2	94%	13.2	92%
4	101%	14.1	99%
5.2	100%	14.2	94%
6.1	87%	15	95%
6.2.1	89%	16.2	97%
6.2.2	94%	19	90%
7.1	97%	20.1	85%
7.2	96%	20.3	92%
9.1.1	86%	21	97%
9.1.2	90%	22	95%
9.2.1	91%	23.2	101%

La figure 14 montre le suivi de la concentration d'équol du test de dégradation en milieu TSB et la figure 15 le suivi de la biomasse. Les isolats 6.1, 9.1.2 et 15 semblent dégrader légèrement l'équol. La concentration d'équol diminue durant les 5 à 6 premiers jours pour ensuite se stabiliser à environ 70% de la concentration initiale. La période de dégradation correspond à la phase de croissance exponentielle et la phase stationnaire de croissance de la culture (figure 15). Les isolats 3.2.1 et 20.1 semblent présenter une très

légère dégradation d'environ 15% de l'équol. Par contre, étant donné l'erreur de 10% sur les valeurs de concentrations données par le HPLC il est possible que cette dégradation ne soit pas significative.

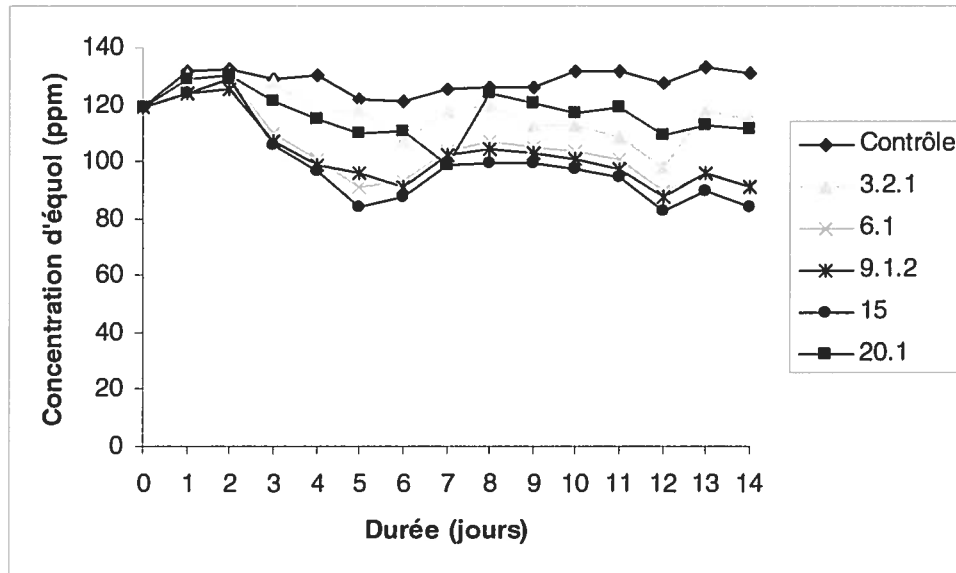


Figure 14. Suivi de la concentration d'équol pour les isolats de l'enrichissement à haute concentration d'équol dans du TSB.

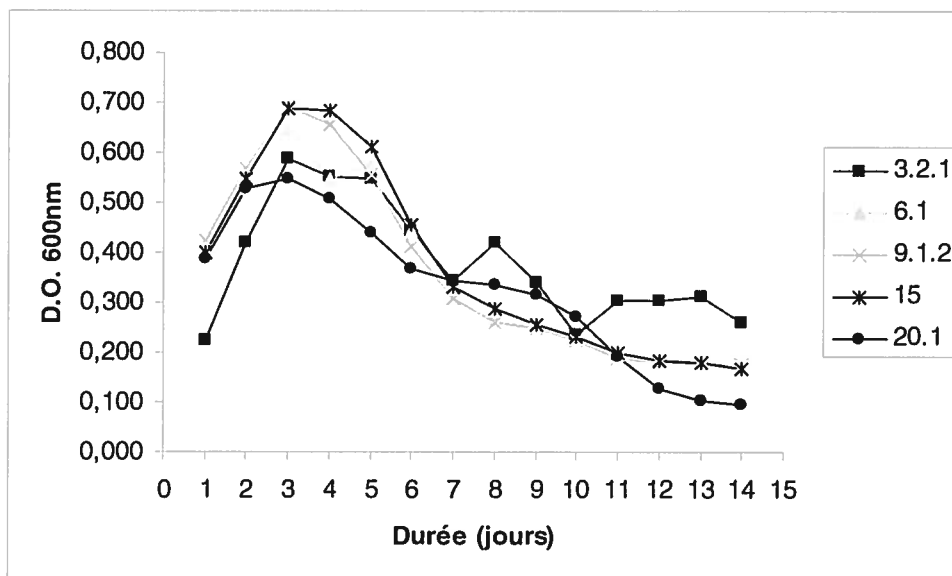


Figure 15. Suivi de la biomasse des isolats de l'enrichissement à haute concentration d'équol dans du TSB.

La figure 16 montre qu'il n'y a eu aucune dégradation de l'équol dans le milieu MM. Les cultures en milieu MM ne présentaient aucune croissance mesurable à 600 nm.

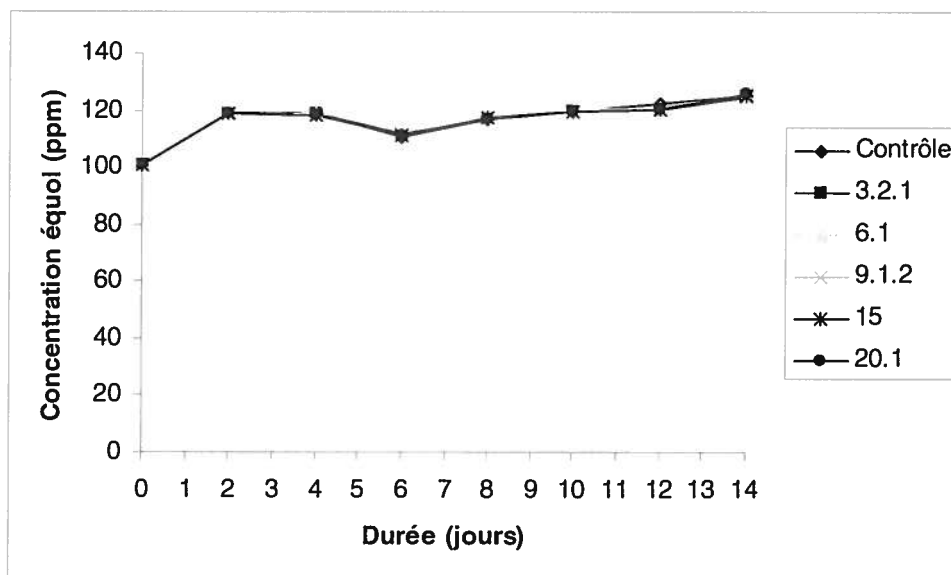


Figure 16. Suivi de la concentration d'équol pour les isolats de l'enrichissement à haute concentration d'équol dans du MM.

3.3.1.4 Test de dégradation de l'équol par les isolats de l'enrichissement à haute concentration d'équol contenant du lisier (100 ppm et présence de lisier)

Des essais pour évaluer la capacité des isolats de l'enrichissement à haute concentration d'équol contenant du lisier à dégrader l'équol ont été réalisés. Les résultats de ces essais sont présentés dans le tableau 21. L'erreur sur les valeurs de concentration d'équol due au HPLC était d'environ 10%. Les isolats sélectionnés pour le test de dégradation étaient le 6.1.1 (100% de dégradation), 9.2.1.1 (37%), 9.2.1.2 (63%) et le 10.1.1.1 (66%). Ces isolats présentaient les taux de dégradation de l'équol les plus élevés.

Tableau 21. Essais de dégradation de l'équol par tous les isolats de l'enrichissement à haute concentration d'équol contenant du lisier en milieu TSB après 7 jours d'incubation.

Isolat	% de l'équol initial restant	Isolat	% de l'équol initial restant
1.1	86%	6.1.1	0%
1.2	90%	6.2	92%
2.1	95%	7	94%
2.2	100%	8	88%
3.1.1.1	85%	9.1	91%
3.1.1.2	91%	9.2.1.1	63%
3.1.2	93%	9.2.1.2	37%
3.2.1	93%	10.1	86%
3.2.2	92%	10.1.1.1	34%
4.1	84%	10.1.1.2	80%
4.2	86%	10.1.2	88%

Les figures 17 et 18 présentent le suivi de la dégradation de l'équol ainsi que le suivi de la biomasse en milieu TSB pour les 4 isolats. L'isolat 6.1.1 est le seul qui dégrade totalement l'équol. Cette dégradation se fait en 4 jours et correspond à la phase de croissance exponentielle de la culture. L'isolat 9.2.1.1 dégrade environ 90% de l'équol en 10 jours. La dégradation se déroule au cours des phases succédant la phase exponentielle (les 4 premiers jours présentent très peu de dégradation). L'isolat 10.1.1.1 dégrade environ 50% de l'équol en 14 jours. La dégradation semble continuer après les 14 jours du test étant donné qu'aucun plateau n'a été atteint. La dégradation semble démarrer avec la phase de déclin de la culture. L'isolat 9.2.1.2 présente une légère dégradation de 20%. Par contre, étant donnée l'erreur de 10% sur les valeurs de concentration il est difficile de dire si cette dégradation est significative en comparant avec le contrôle. Comme pour l'isolat 10.1.1.1, la dégradation se déroule lors de la phase de déclin et semble se poursuivre après 14 jours.

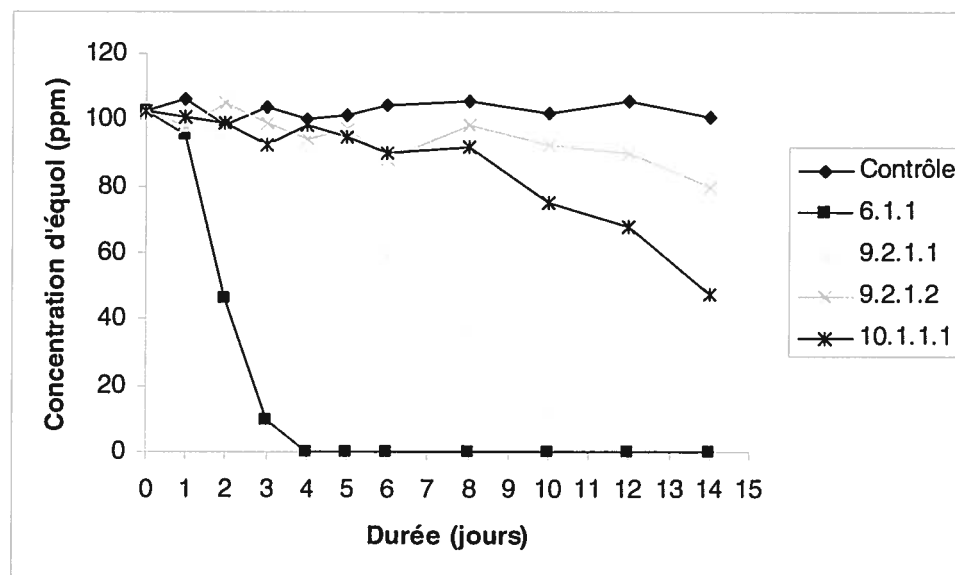


Figure 17. Suivi de la concentration d'équol pour les isolats de l'enrichissement à haute concentration d'équol contenant du lisier dans du TSB.

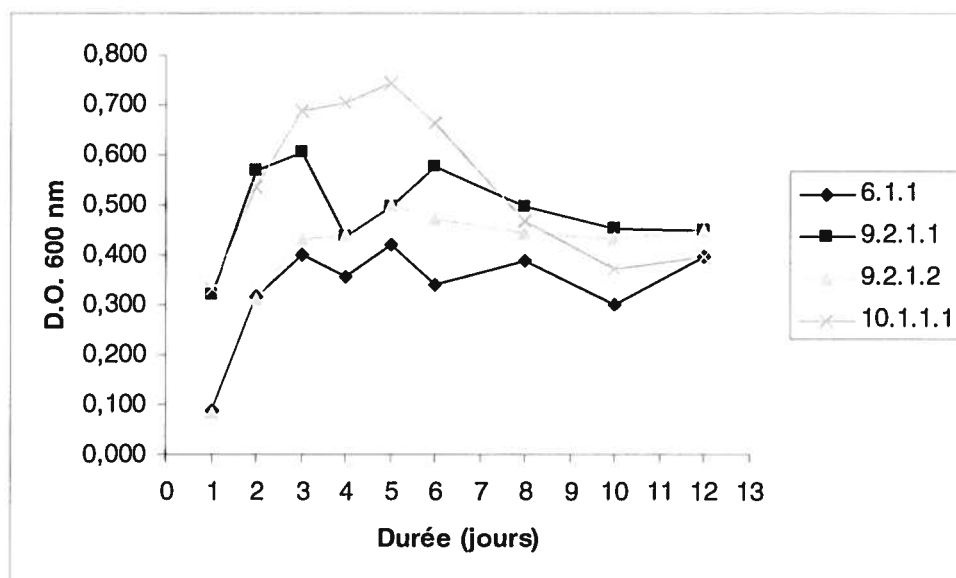


Figure 18. Suivi de la biomasse des isolats de l'enrichissement à haute concentration d'équol contenant du lisier dans du TSB.

La figure 19 montre les résultats du suivi de la dégradation de l'équol en milieu MM. Les isolats 6.1.1 et 10.1.1.1 dégradent entièrement l'équol en 2 jours et l'isolat 9.2.1.1 le fait en 4 jours. L'isolat 9.2.1.2 ne semble pas présenter de dégradation d'équol. Les cultures en MM ne présentaient pas de croissance mesurable à 600 nm ni de biomasse visible à l'œil nu.

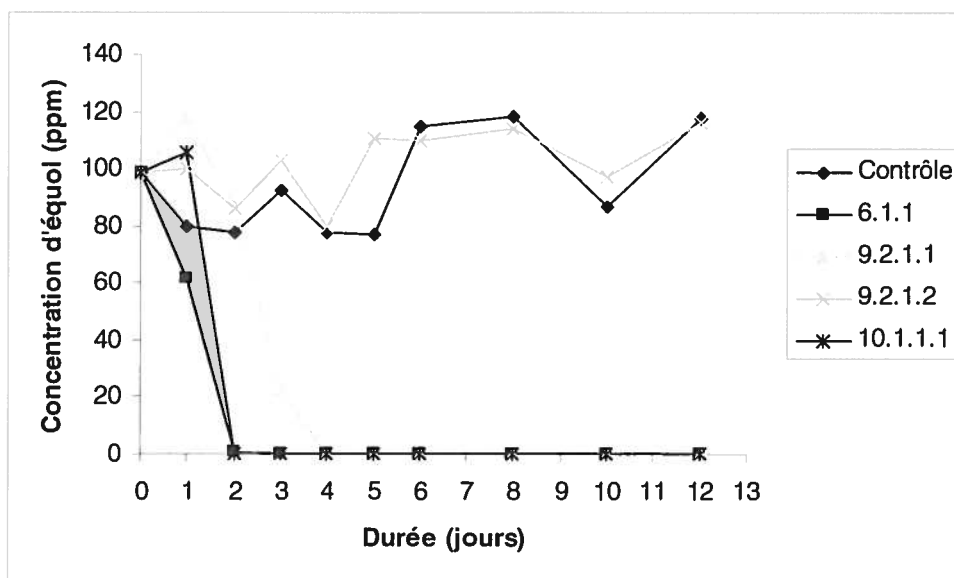


Figure 19. Suivi de la concentration d'équil pour les isolats de l'enrichissement à haute concentration d'équil contenant du lisier dans du MM.

3.3.2 Suivi de l'estrogénécité par YES

Les isolats 6.1.1, 9.2.1.1 et 10.1.1.1 de l'enrichissement à haute concentration d'équil contenant du lisier ont été sélectionnés pour le suivi de l'estrogénécité par YES car ils ont dégradé très fortement l'équil. Les isolats de l'enrichissement à basse concentration d'équil n'ont pas été testés car une concentration de 10 ppm d'équil ne rend pas le milieu assez estrogénique pour le YES. Les isolats de l'enrichissement à haute concentration d'équil n'ont pas été testés car ils ne dégradaient pas assez efficacement l'équil.

Deux échantillons ont été testés par isolat et par milieu (MM et TSB). Les échantillons provenaient du test de dégradation de l'équil après 12 jours d'incubation. Un échantillon était pris à la fin de la dégradation totale de l'équil et un autre à la fin du test de dégradation (jour 12). Pour les isolats présentant une dégradation partielle de l'équil, seul un échantillon prélevé au jour 12 a été testé. Pour le milieu TSB, les échantillons étaient 6.1.1 aux jours 4 et 12, 9.2.1.1 au jour 12 et 10.1.1.1 au jour 12. Pour le milieu

MM, les échantillons étaient 6.1.1 aux jours 2 et 12, 9.2.1.1 aux jours 4 et 12 et 10.1.1.1 aux jours 2 et 12. La valeur de référence sans dégradation était le contrôle avec écol et sans bactérie de chaque milieu.

Les résultats des tests YES sont présentés à la figure 20 pour les échantillons dans le milieu TSB et dans la

figure 21 pour les échantillons en milieu MM. À l'aide des données obtenues les EC_{50} ont

été calculés. Ils peuvent être retrouvés dans le tableau 22 (TSB) et le tableau 23 (MM). Dans tous les cas, une diminution de la quantité d'équol était liée à une diminution de l'estrogénécité. Pour certains échantillons, il semblait rester une estrogénécité résiduelle même si tout l'équol était dégradé. Cette estrogénécité ne peut être due au milieu car des contrôles contenant ne contenant pas d'équol ont été faits pour chacun des milieux lors des tests de YES et ils ne présentaient aucune activité estrogénique. Il est aussi possible d'observer que dans les cas où la dégradation se fait rapidement en deux quatre jours, une attente de 2 semaines ne change rien à l'activité estrogénique une fois la dégradation initiale terminée. Il est à noter que pour tous les échantillons pour lesquels une grande proportion d'équol a été dégradée, les EC_{50} calculés ne sont pas valides. Le calcul de l' EC_{50} nécessite l'utilisation de la réponse maximale. Ce niveau de réponse n'a pas été atteint lorsque l'équol se retrouvait en trop petite quantité dans le milieu. Il est toutefois possible de dire que même si l' EC_{50} calculé n'est pas valide il correspond à une valeur supérieure à -0,76 (le EC_{50} valide le plus élevé).

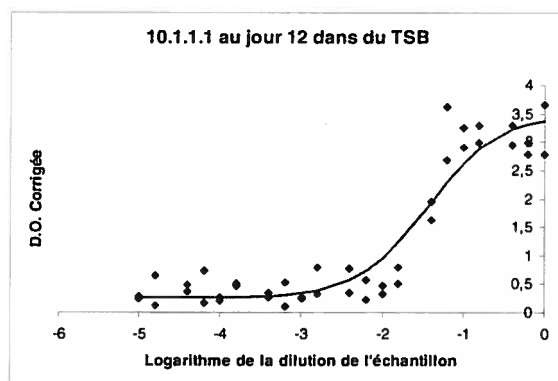
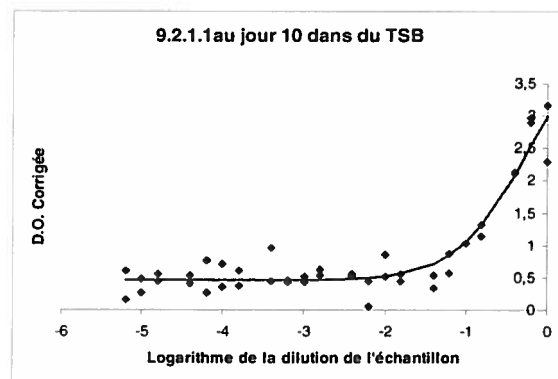
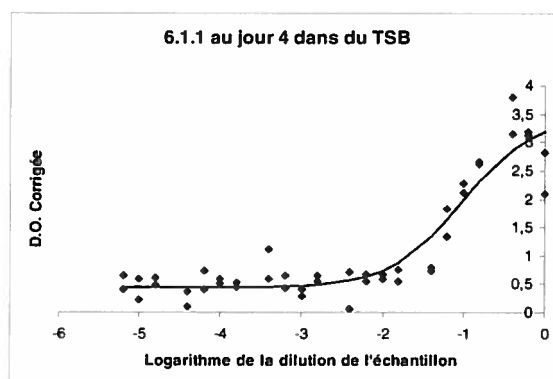
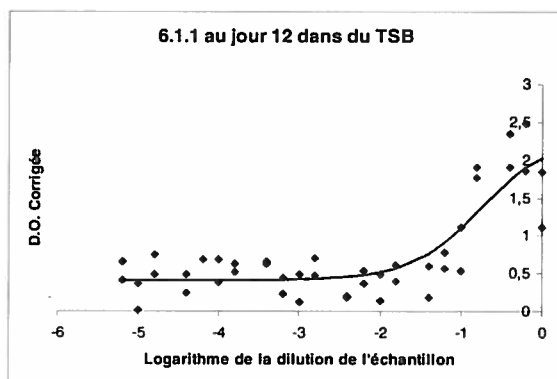
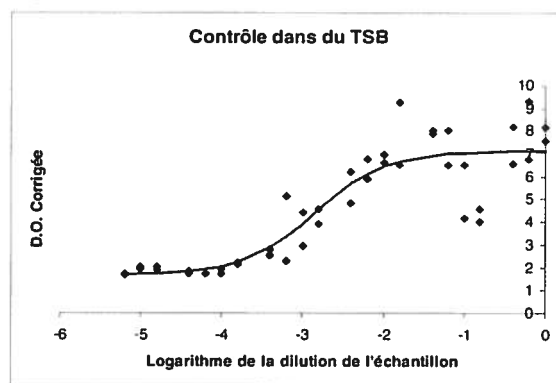


Figure 20. Résultats des tests YES après dégradation de l'équol en milieu TSB.

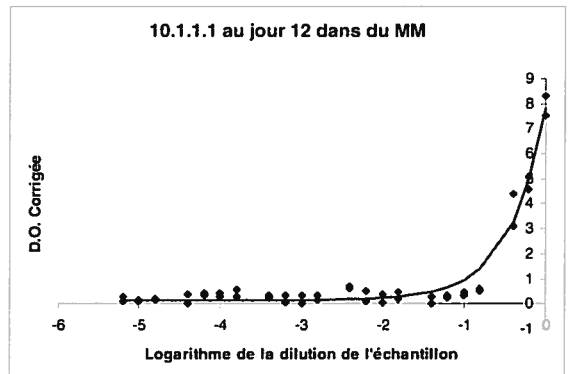
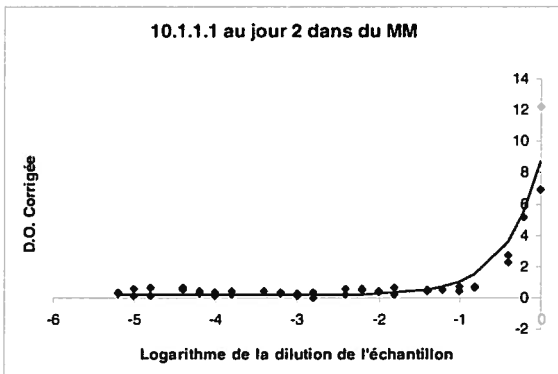
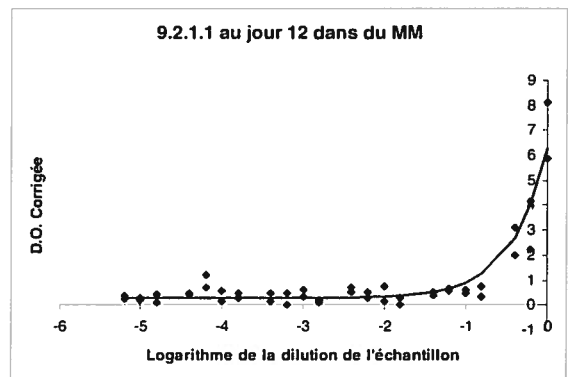
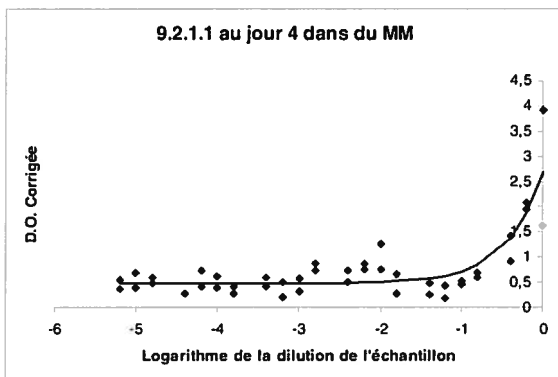
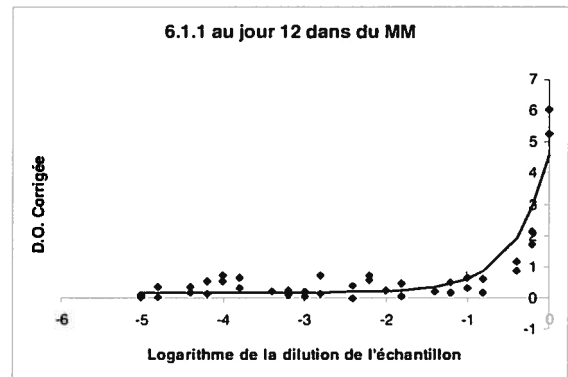
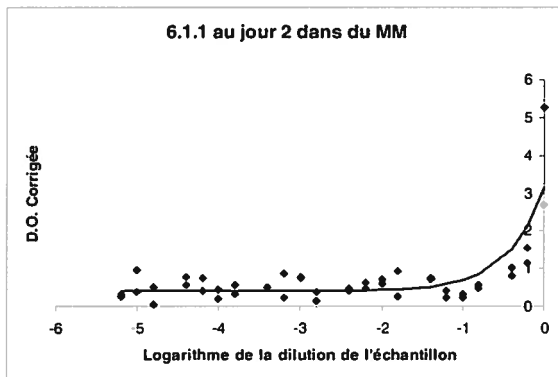
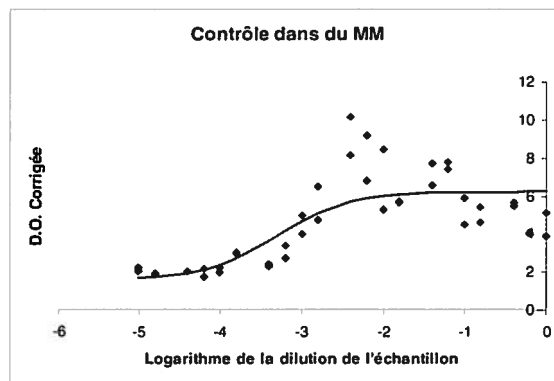


Figure 21. Résultats des tests YES après dégradation de l'équol en milieu MM.

Tableau 22. Valeur d'EC50 des milieux après dégradation de l'équol par différents isolats de l'enrichissement à haute concentration d'équol contenant du lisier en milieu TSB.

Échantillon	Jour de la prise de l'échantillon	EC ₅₀ (logarithme de la concentration en M)
Contrôle		-2,85
6.1.1	4	-1,03
	12	-0,76
9.2.1.1	12	-0,24*
10.1.1.1	12	-1,43

*Valeurs non valides car la courbe logistique n'est pas complète étant donné la faible activité estrogénique.

Tableau 23. Valeur d'EC50 des milieux après dégradation de l'équol par différents isolats de l'enrichissement à haute concentration d'équol contenant du lisier en milieu MM.

Échantillon	Jour de la prise de l'échantillon	EC ₅₀ (logarithme de la concentration en M)
Contrôle		-3,30
6.1.1	2	3,48*
	12	2,64*
9.2.1.1	4	1,70*
	12	4,03*
10.1.1.1	2	2,54*
	12	1,75*

*Valeurs non valides car la courbe logistique n'est pas complète étant donné la faible activité estrogénique.

3.4 Recherche d'intermédiaires de dégradation de l'équol par spectrométrie de masse

La recherche d'intermédiaires de dégradation a été réalisée en analysant différents ions au spectromètre de masse dans différents échantillons dans lesquels de l'équol a été dégradé. Les isolats 6.1.1, 9.2.1.1 et 10.1.1.1 ont été mis en présence d'équol deutéré et non deutéré en quantité égale (50 ppm de chaque) dans du milieu TSB et incubés 1 semaine. Pour chaque isolat, trois échantillons ont été prélevés à 3 jours différents durant la semaine d'incubation.

Une approche utilisée était de rechercher des ions correspondant aux ions pseudomoléculaires des produits de dégradation de l'équol et de son équivalent deutéré. L'équol deutéré utilisé est plus lourd de 4 Da que l'équol naturel (figure 22). Les ions pseudomoléculaires des intermédiaires de dégradation de l'équol deutéré devraient donc posséder une différence de masse d'au plus 4 Da par rapport aux produits de dégradation issus de la dégradation de l'équol non deutéré. Une seconde approche a consisté à rechercher certains ions caractéristiques de certains types de dégradation, comme l'hydroxylation ou la méthylation, rencontrés dans la dégradation bactérienne de différents flavonoïdes.

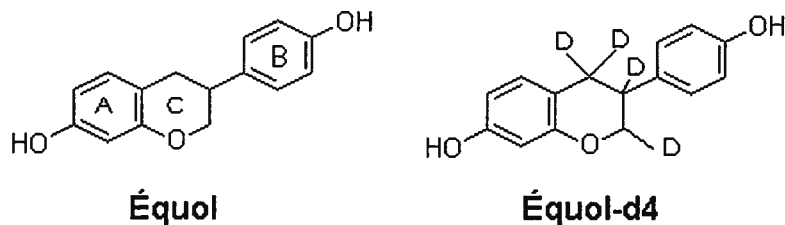


Figure 22. Structure de l'équol. Les positions marquées au deutérium sont indiquées par un D (Chemblink).

Les masses des différents ions pseudomoléculaires potentiels des intermédiaires de dégradation de l'équol se retrouvent au tableau 24. Le premier produit de dégradation recherché était l'équol hydroxylé. L'équol peut être hydroxylé une ou plusieurs fois et ces groupes hydroxyles pourraient remplacer des atomes de deutérium. Ce type de modification chimique a été observé sur d'autres isoflavones (Klus et Barz, 1998). Une autre modification chimique rapportée est la méthylation. L'ajout d'un ou plusieurs groupements méthyle est possible et ces groupements pourraient remplacer des atomes de deutérium. La méthylation est souvent la première étape de la dégradation de flavonoïdes (les isoflavones font parties de cette classe de molécules)(Klus et Barz, 1998). Le clivage du cycle C (voir figure 22) est une autre modification possible de l'équol. Cette modification chimique a été observée sur la daidzéine et la génistéine (Aura, 2008). Le clivage du cycle C peut donner 2 molécules différentes et une des molécules perd un ou deux deutérium. Finalement, l'acide 2-(4-hydroxyphényl)-propionique est un produit qui pourrait provenir du clivage complet du cycle C de l'équol. Ce produit n'a jamais été observé mais il a été proposé comme intermédiaire de dégradation (Bayer *et al.*, 2001). Aucun ion correspondant à l'ion pseudomoléculaire de ces molécules n'a été retrouvé dans les échantillons testés.

Tableau 24. Liste des intermédiaires potentiels de l'équol dégradé qui ont été recherchés par spectrométrie de masse.

Modification		Masse de l'intermédiaire	Masse de l'intermédiaire deutéré
Hydroxylation	simple	258	262 / 261
	double	274	278 / 277 / 276
	triple	290	294 / 293 / 292 / 291 / 290
	quadruple	306	310 / 309 / 308 / 307 / 306 / 305
Méthylation	simple	256	260 / 259
	double	270	274 / 273 / 272
	triple	284	288 / 287 / 286 / 285
	quadruple	298	302 / 301 / 300 / 299 / 298
Clivage de l'anneau C		244	248 / 247
		242	246 / 245 / 244
Acide 2-(4-hydroxyphenyl)- propionique		166	169 / 168 / 167 / 166

4 Discussion

4.1 *Détection et dosage des estrogènes dans le lisier de porc par LC-MS*

4.1.1 Récupération des estrogènes lors de l'extraction en phase solide

Le protocole d'extraction a été légèrement modifié par rapport à celui utilisé par Martine Isabelle lors de son projet de maîtrise (Isabelle, 2007). Une centrifugation de plus a été rajoutée lorsque les surnageants sont combinés avant de passer l'échantillon sur la colonne SPE. Une récupération de 53% des estrogènes libres a été rapportée pour son projet. Dans le présent travail, les pourcentages de récupération allaient de 57 à 61 % (Tableau 12).

La plupart des auteurs utilisant un protocole d'extraction en phase solide pour concentrer des estrogènes libres dans un échantillon ne rapportent pas leur efficacité de récupération. Certains donnent des chiffres pour un essai dans de l'eau, comme Furuichi *et al.* (2006) qui rapportent des taux de récupération de 83 à 106 %. D'autres ne précisent pas la nature de leur échantillon, comme Sarmah *et al.* (2006) qui rapportent un pourcentage de récupération allant de 85 à 125 %. Ces chiffres ne sont pas très utiles car les éléments contenus dans le lisier, le fumier ou toute autre forme de récupération des déchets d'animaux interfèrent très probablement au niveau de la liaison des estrogènes avec la colonne ce qui réduit la capacité d'extraction des estrogènes libres.

Pour ce qui est de l'équol, les auteurs ayant dosé cette molécule sont encore moins nombreux que pour les estrogènes libres. Aucune donnée d'efficacité de récupération des

estrogènes lors de l'extraction n'a pu être trouvée. Par contre, même sans base de comparaison, un pourcentage de récupération de 105% semble satisfaisant (tableau 12).

4.1.2 Limite de dosage des estrogènes

La limite de dosage correspond à la concentration la plus faible d'un composé pouvant être dosé en toute confiance. La limite de dosage pour les estrogènes naturels était d'environ 30 µg/l (Tableau 13). Cette limite est trop élevée pour être utilisable car les concentrations retrouvées dans le lisier sont situées entre 1 et 25 µg/l. Étudier la dégradation dans le temps des estrogènes est donc impossible à l'aide de cette technique d'extraction, tout au plus serait-il possible d'observer la disparition des estrogènes les plus concentrés.

Cette limite de dosage semble très élevée comparativement à Isabelle (2007) qui a mis au point ce protocole. La limite de détection de Isabelle (2007) était de 400 ng/l, ce qui donne une limite de dosage d'environ 1,2 µg/l puisque la limite de dosage correspond à 3 fois la limite de détection. Ces mesures obtenues par Isabelle (2007) sont donc environ 25 fois plus sensibles que celles obtenues lors de ce projet. Les raisons de ces différences ne nous sont pas connues toutefois le lisier utilisé par Isabelle (2007) était plus âgé et probablement très différent de celui utilisé lors de ce projet. La composition des lisiers peut varier beaucoup selon la ferme, les conditions d'élevage et d'entreposage du lisier utilisées.

4.2 Nombre d'isolats retrouvés pour chaque enrichissement

Le nombre d'isolats obtenus à la fin de chaque isolement est très variable pour les trois enrichissements (tableaux 14, 15 et 16). Plusieurs raisons expliquent ces variations. La première est la technique de l'expérimentateur. Après avoir obtenu seulement 6 isolats

pour le premier enrichissement, la sélection de colonies à repiquer a été faite de manière moins restrictive afin d'obtenir plus d'isolats. De plus, une solution de vitamines a été ajoutée aux enrichissements à haute concentration d'équol ce qui peut aussi expliquer la plus grande diversité obtenue pour ces enrichissements. L'enrichissement à haute concentration d'équol contenant du lisier avait aussi un inoculum initial plus diversifié car un échantillon de boue activée d'usine d'épuration des eaux ainsi que du lisier lui ont été ajoutés en plus de la biomasse du réacteur de déphosphatation. La différence de concentration d'équol et la présence de plusieurs sources de carbones dans un des enrichissements ont probablement aussi affectés le nombre d'isolats obtenus.

4.3 Genres et espèces bactériens retrouvés

Les espèces *Arthrobacter protophormiae* et *Pseudomonas stutzeri* ont été isolées de l'enrichissement à basse concentration d'équol (tableau 17). *Arthrobacter protophormiae* a été retrouvée dans des eaux usées provenant d'une ferme de bovins (Wenning *et al.*, 2006). Une espèce très apparentée, *Arthrobacter soli* a été retrouvée dans les sédiments d'un réservoir d'eaux usées (Roh *et al.*, 2008). D'une manière plus générale, le genre *Arthrobacter* se retrouve dans divers environnements comme le sol (Hagedorn et Holt, 1975), les étangs (Reddy *et al.*, 2000), certains fromages (Wenning *et al.*, 2006), les caves alpines (Margesin *et al.*, 2004) et l'Antarctique (Pindi *et al.*, 2009). *Pseudomonas stutzeri* a été isolé de sols, d'échantillons d'eau et de certains patients hospitalisés (Palleroni *et al.*, 1970).

Les genres *Stenotrophomonas*, *Pseudomonas* et *Serratia* ainsi que l'espèce *Serratia marcescens* ont été isolés de l'enrichissement à haute concentration d'équol (tableau 18). Le genre *Stenotrophomonas* est un genre ubiquitaire qui se retrouve chez

des patients hospitalisés, associé à la rhizosphère, dans l'eau et les sédiments mais aussi dans les égouts et dans des fermenteurs (Hauben *et al.*, 1999). Le genre *Serratia* a été isolé de certains patients, d'insectes et de certains tissus végétaux comme les feuilles de laitue, de l'herbe ou des noix de coco (Grimont *et al.*, 1981).

Les genres *Pseudomonas*, *Citrobacter* et *Pseudochrobactrum* ainsi que les espèces *Klebsiella pneumoniae*, *Serratia marcescens*, *Klebsiella oxytoca* et *Citrobacter farmeri* ont été isolés de l'enrichissement à haute concentration d'équol contenant du lisier (tableau 19). Le genre *Citrobacter* se retrouve dans les sols, dans l'eau, dans les égouts et dans le système digestif des humains (Doran, 1999). Le genre *Pseudochrobactrum* a été retrouvé dans de la colle industrielle et dans une blessure au genou d'un homme (Kampfer *et al.*, 2006). Le genre *Klebsiella* a été isolé de sols, de l'eau, sur des légumes, chez certains animaux et chez des patients immunodéprimés (Brown et Seidler, 1973; Podschun *et al.*, 2001).

D'une manière générale, les genres et espèces retrouvés dans les enrichissements sont ubiquitaires. Il n'est donc pas surprenant qu'ils se retrouvent dans les enrichissements qui ont été en contact avec un inoculum de réacteur, du lisier, des boues activées et la flore ambiante des laboratoires (les enrichissements n'ont pas été effectués de manière stérile). Seule la découverte du genre *Stenotrophomonas* n'est pas appuyée par la littérature. Par contre, ce genre a été isolé récemment, il est donc possible que les habitats rapportés de ce genre ne soient pas représentatifs.

4.4 Dégradation de l'équol

Des isolats de l'enrichissement à basse concentration d'équol (tableau 17 et figure 11), *Arthrobacter protophormiae* est la seule espèce qui dégrade l'équol et les cinq isolats

de cette espèce bactérienne (9.1, 11.1, 11.2, 13.2 et 13.3) le font. Kluz et Barz (1998) ont démontré qu'une souche appartenant aux genres *Arthrobacter* ou *Micrococcus* était capable de dégrader certains isoflavones, la génistéine et la biochanine A, par réaction d'hydroxylation. Il est donc possible que les bactéries du genre *Arthrobacter* aient la capacité de dégrader plusieurs types d'isoflavones. Il pourrait être intéressant de faire des tests de dégradations avec d'autres isoflavones.

De tous les isolats dégradant faiblement l'équol obtenus du de l'enrichissement à haute concentration d'équol (tableau 18 et figure 14), seul *Serratia marcescens* (13.1) a été identifié. Pour l'enrichissement à haute concentration d'équol contenant du lisier (tableau 19 et figure 17), les isolats dégradant l'équol appartenaient aux genres *Citrobacter* (10.1.1) et *Pseudomonas* (6.1.1) ainsi qu'à l'espèce *Klebsiella oxytoca* (9.2.1.1). Plusieurs isolats étaient des espèces *Serratia marcescens* et *Klebsiella oxytoca* bien que seul un isolat de chaque espèce, respectivement 6.1 et 9.2.1.1, semblait dégrader l'équol. Il est possible que les enzymes nécessaires à la dégradation de l'équol ne se retrouvent que dans certaines souches. Aucun cas de dégradation d'équol, de daidzéine ou d'isoflavones par les genres et espèces identifiés n'a été retrouvé dans la littérature. La plus forte activité de dégradation de l'équol pour les 3 isolats a été observée en milieu MM comparativement au milieu TSB bien qu'aucune croissance n'ait été observée dans le milieu MM. Des études ultérieures seraient nécessaires pour déterminer le milieu de culture optimal permettant à la fois la croissance bactérienne des isolats et une activité importante de dégradation.

La biodégradation de l'équol a déjà été observée dans un traitement de type UASB (Furuichi *et al.*, 2006) ainsi que par un consortium enrichi (Isabelle, 2007). A

notre connaissance, c'est la première fois, que des isolats capables de dégrader l'équol ont été obtenus en culture pure .

4.5 Variation d'estrogénécité accompagnant la dégradation d'équol

La dégradation de l'équol observée par les isolats de l'enrichissement à haute concentration d'équol contenant du lisier était toujours accompagnée d'une baisse d'estrogénécité (figure 17 et tableau 22) ce qui confirme qu'il y a bien eu transformation de celle-ci. Cette étude n'a pas permis de déterminer le niveau de transformation minimal pour obtenir une baisse d'estrogénécité de l'équol.

Le YES est une technique intéressante pour étudier l'estrogénécité totale d'un mélange de substances. Par contre, lorsque les substances étudiées sont faiblement estrogéniques comme l'équol, mesurer la variation d'activité devient difficile. Étudier la variation d'estrogénécité d'isoflavones encore moins estrogéniques que l'équol serait pratiquement impossible à l'aide de cette technique. La plupart des approches mathématiques utilisées pour comparer les résultats du YES utilisent la totalité de la courbe en « S ». Si des substances très faiblement estrogéniques étaient utilisées, il faudrait utiliser des concentrations qui ne se retrouvent jamais dans l'environnement pour obtenir une courbe entière. De plus, l'équol est très soluble dans l'eau comparativement à la plupart des isoflavones, ce qui rend impossible l'utilisation de concentrations élevées de ces isoflavones.

4.6 Recherche d'intermédiaires de dégradation

Le fait qu'aucun intermédiaire de dégradation n'ait été observé dans les tests de dégradation des cultures pures peut avoir plusieurs explications. Les modifications potentielles de l'équol ont été tirées de la littérature décrivant la dégradation de divers isoflavones. Par exemple, la polyhydroxylation a été observée sur des molécules de biochanine A et de génistéine (Klus et Barz, 1998). Il est possible que l'équol soit dégradé différemment des isoflavones les plus étudiés dans la littérature et que les intermédiaires n'aient pas été détectés lors des analyses au MS. L'équol aurait pu être rapidement dégradé en molécules plus simples et aucun intermédiaire ne se serait accumulé dans le milieu.

Il est aussi possible que les intermédiaires de dégradation de l'équol soient intégrés dans les bactéries. Ils auraient été retirés des échantillons lors des étapes de centrifugation et de filtration.

Conclusion et perspectives

Des essais de dosage d'estrogène ont été effectués dans du lisier de porcs mais la sensibilité des mesures obtenues n'était pas assez grande pour les doser. Trois enrichissements ont été effectués afin d'isoler des souches bactériennes qui peuvent dégrader l'équol. De ces trois enrichissements, 11 isolats capables de dégrader l'équol ont été obtenus. Dans tous les cas testés, la dégradation de l'équol était accompagnée d'une diminution de l'estrogénécité. Des intermédiaires de dégradation ont été recherchés à l'aide d'équol marqué au deutérium mais aucun n'a pu être retrouvé. À notre connaissance, c'est la première fois que des isolats capables de dégrader l'équol ont été obtenus en culture pure.

Plusieurs points seraient intéressants à approfondir. Même si l'équol est le plus estrogénique du lisier, il existe plusieurs autres isoflavones qui ne sont pas pris en compte dans la littérature. Des analyses afin de les identifier pourraient nous permettre de mieux connaître les sources d'activité estrogénique du lisier. Une grande partie de l'activité estrogénique du lisier provient encore de source inconnue (Furuichi *et al.*, 2006). De plus, cela pourrait fournir des indications sur les précurseurs de l'équol (daidzéine, daidzine) et donnerait une idée de la proportion transformée en équol et en *O*-déméthylangolensin durant la digestion des porcs. Il pourrait aussi être intéressant de suivre la variation de concentration de l'équol durant son entreposage. Cela permettrait de déterminer si de l'équol est globalement créé ou dégradé durant l'entreposage. L'effet de différents traitements sur ces divers isoflavones pourrait aussi être étudié.

5 Annexes

5.1 Milieux de cultures pour les levures BJ 3505.

5.1.1 Gélose YES

Dans un erlenmeyer de 100 mL;

10X Base azotée pour levures (YNB-w/o amino acids Difco # 0919-15, 33.5 g dans 500 mL d'eau Milli-Q)	10 mL
Bactoagar	2 g
Eau Milli-Q	40 mL

Dans un erlenmeyer de 100 mL;

Lysine (1.8 g L-lysine-HCl/ 500 mL d'eau Milli-Q)	1 mL
Histidine (1.2 g L-histidine-HCl/ 500 mL d'eau Milli-Q)	1 mL
Dextrose 20% (20 g/ 100 mL d'eau Milli-Q)	10 mL
Eau MilliQ	38 mL

- Autoclaver les solutions et laisser tiédir (45-50°C). Combiner les solutions et mélanger délicatement.
- Mettre 15-20 mL par pétri, attendre qu'ils figent et entreposer à 4°C à l'envers.

5.1.2 Milieu Liquide YES

10X Base azotée pour levures (YNB-w/o amino acids Difco # 0919-15, 33.5 g dans 500 mL d'eau Milli-Q)	50 mL
Dextrose 20% (20 g/ 100 mL d'eau Milli-Q)	50 mL
Lysine (1.8 g L-lysine-HCl/ 500 mL d'eau Milli-Q)	5 mL
Histidine (1.2 g L-histidine-HCl/ 500 mL d'eau Milli-Q)	5 mL

- Compléter à 500 mL avec de l'eau Milli-Q.
- Stériliser par filtration.
- Conserver à 4°C.

5.2 Solutions pour la réaction enzymatique du test YES.

5.2.1 Solution ONPG/Lyticase

Ortho-nitrophenyl- β -galactoside (ONPG)	20 mg
Solution stock lyticase 10X	500 μ L
Tampon Z	Compléter à 5 ml

- Vortexer jusqu'à dissolution de l'ONPG.
- Conserver sur glace.

5.2.2 Tampon Z + SDS + mercaptoéthanol

Tampon Z	18 mL
Solution SDS 0,1%	0,9 mL
Mercaptoéthanol	47 μ L

- Conserver sur glace.

5.2.3 Tampon Z

	Pour 1 l	Pour 500 ml
Na ₂ HPO ₄	8,52 g	4,26 g
NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O	5,52 g	2,76 g
KCl	0,746 g	0,373 g
MgSO ₄	0,129 g	0,065 g
Eau milliQ	Compléter à 1000 ml	Compléter à 500 ml

- Stériliser par filtration.

5.2.4 Solution stock lyticase 10X

	Pour 10 mL
Lyticase (Sigma)	10 mg
Tampon phosphate de potassium 1M pH 7.5	1 mL
NaCl 5M	0,2 mL
Glycérol	5 mL
Eau milliQ	Compléter à 10 mL

- Conserver à -20°C.

5.2.5 Tampon phosphate de potassium 1M pH 7.5

Solution KH_2PO_4 1M

KH_2PO_4	13,6 g
Eau MilliQ	Compléter à 100 mL

Solution K_2HPO_4 1M

K_2HPO_4	17,1 g
Eau MilliQ	Compléter à 100 mL

- Ajuster le pH de la solution K_2HPO_4 à 7,5 à l'aide de la solution KH_2PO_4 .
- Stériliser par filtration.

5.3 MM et solution de vitamines.

5.3.1 MM (Milieu minéral)

	1 l	250 ml
Na_2HPO_4	10,51 g	2,63 g
KH_2PO_4	1,5 g	0,375 g
Solution milieu minéral 10X	100 ml	25 ml
Solution éléments traces	3 ml	750 μl
Eau milliQ	Compléter à 1000 ml	Compléter à 250ml

- Autoclaver.
- Laisser tiédir (45-50°C) et ajouter du NaHCO_3 en solution (stérilisée par filtration, solution stock à 50 g/l) pour une concentration finale de 0,5 g par litre.

5.3.2 Solution éléments traces

$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	10 mg
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	3 mg
H_3BO_3	30 mg
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	20 mg
$\text{CuCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,79 mg
ou $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,55 mg
$\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	2 mg
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	3 mg
Eau milliQ	Compléter à 1000 ml

- Autoclaver.
- Conserver à -4°C.

5.3.3 Solution milieu minéral 10X

MgSO ₄ .7H ₂ O	2 g
NH ₄ Cl	10 g
Ferric ammonium citrate	0,05 g
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,1 g
Eau milliQ	Compléter à 1000ml

- Autoclaver. Conserver à -4°C.

5.3.4 Solution de vitamines

p-Aminobenzoic acid	5 mg
Folic acid	2 mg
Biotin	2 mg
Nicotinic acid	5 mg
Calcium pantothenate	5 mg
Riboflavin	5 mg
Thiamine HCl	5 mg
Pyridoxine HCl (vitamin B6)	10 mg
Cyanocobalamin (vitamin B12)	100 µg
Thioctic acid (lipoic acid)	5 mg
Eau milliQ	1 L

- Dissoudre les vitamines une à la fois dans l'eau milliQ. Si nécessaire, ajuster le pH à 7 avec du NaOH pour dissoudre la biotine et l'acide folique.
- Stériliser par filtration.
- Conserver dans le noir.
- Utiliser 10 ml de solution pour 1L de milieu.

5.4 Solutions et tampons pour la biologie moléculaire.

5.4.1 Tampon TEN

TRIS-HCl 1M pH 8.0	5 ml
EDTA.2Na 0.5M pH 8.0	2 ml
NaCl 5M	3 ml
Eau milliQ	Compléter à 100 ml

➤ Stériliser par filtration.

5.4.2 rTaq polymérase d'ADN

Provient du kit Illustra de GE Healthcare. Contient 5 unités/ μ l. En solution de 50 mM Tris-HCl, pH 7,5, 5 mM DTT, 0,1 mM EDTA, stabilisateurs et 50% glycérol.

5.4.3 10X Tampon PCR

Provient du kit Illustra de GE Healthcare. Contient 500 mM KCl, 15 mM $MgCl_2$ et 100 mM Tris-HCl (pH 9).

5.4.4 Séquence des amorces PA et PH

pA: 5' AGA GTT TGA TC(c-a) TGG CTC AG 3'

pH: 5' AAG GAG GTG ATC CAG CCG CA 3'

5.1 Séquences du gène de l'ADNr 16S des isolats

5.1.1 Séquences de l'enrichissement à basse concentration d'équol

Isolat	Numéro d'accès
9.1	GU826110
11.1	GU826111
11.2	GU826112
13.1	GU826113
13.2	GU826114

La séquence de l'isolat 13.3 n'a pas été acceptée par GenBank car elle ne présentait pas une assez bonne couverture. Cette séquence était :

13.3

ATAACACTGAGTAACCTGCCCTGACTCTGATAACCCGGTAACTGGGTAATAC
CGGAATGACCTAGCATGTCTTGTGGGAAATTTCAATTGGGGATGGACTCGCG
GCCTATCACTTGTGTTGGTGAGGTATGGCTCACCAAGGCGACGACGGGTAGCCG
GCCTGAGAGGGTGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAACTCCTAC
GGGAGGCAGCACTGGGGAATATTGCCAATGGGCGCAAGCCTGATGCACGAC
GCCGCGTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTCAGTAGGAAGA
AGCGAGAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCGCCGGCTAACTACGTGCCACA
GCCGCGGTAATACGTAGGGCGCAAGCGTTATCCGGATTTATTGGGCGTAAAG
AGCTCGTAGGCGGTTTGTGCGGTCTGCCGTGAAAGTCCGAGGCTCAACCTCG
GATCTGCGGTGGGTACGGGCAGACTAGAGTGATGTAGGGGAGACTGGAATTC
CTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAATATCAGAGGAACACCGATGGCGAAGGC
AGGTCTCTGGGCATTTACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCATGGGGAAGCGAAC
AGGATTAGATAACCCTGGTAGTCCATGCCGTAAACGTTTGGGCACTAGGTGTG
GGGGACATTCCACGTTTTCCGCGCCGTTAGCTAACGCATTAAGTGCCCCGCCT
GGGGAGTACGGCGCAAGGCAAATTCAAAGGATGACGGGGGCCCCGCACAAGC
GGCGGAGCATGGGATTAATTCGAGCACGCGAGAACCTTCAGGCTGACATGTC
CAGCCGCCTCAGAGAGGGGTTCTTGGGGCGGTTACAGTGGTGCATGGTGT
GTCAGCTCGGTGCGAGATGTGGGAAGTCCGCAGAGCACCTCGTTCAGGGCC
ACGGGTAGCCGGGGATTCATGGAGACTGCCGGGGTCACTCGGAGGATCGTGG
GAGGATATTTAAGGCAAATACACTATGTTATGTGAGAAGAACCATACAGTGT
GTCACAAGATTGCGTCCGTTTCAGTTTTAGTCTACAATTAGCATTGCATTAAAT
CGGGGTTTACACAGCTCAATCTGGTATAGTGAAGTGGTTCCTCCAAACGTGC

ACAGGTCCCATTTCAGGTCCGGCCTGTCGATGTGCTAAAATGCAACAAATA
GGGAGTATAGGTATACATTATAAAA

5.1.2 Séquences de l'enrichissement à haute concentration d'équol

Isolat	Numéro d'accès
2	GU826115
5.2	GU826116
6.1	GU826117
10.1	GU826118
23.2	GU826119

Les séquences des isolats 3.2.1 et 23.1 n'ont pas acceptées par GenBank car elle
sne présentaiten pas une assez bonne couverture. Cette séquence était :

3.2.1

ACGTCCGACGGAAGAAGAACTCGGGAGACCATTTCGGTTCCTCACTGACTAGCCTT
AGCTATTTTGTGATGTAATGCTCTCCCGTCGACACTTGGCTGGTTGACAGAGT
CACCTCTGGCGAATCCAAACCTACCAGGAAAAGGGGGGAAAATGACATG
GGCAATTGATCGCGCCTGGGAACAACGTTTCGATGCAAGCCTTCGTTGGAGGA
GGGTTGCAGACCAATCTGCTCTCTTTGCTCCTAAACCCGGATTAAGTCTGTGC
AACATCCCGTAAATGAGGGTGCAAGTTACTCCCAATTACTGGGAAAGCGCGC
GTAGTGGTTTGTTAATTGGATGTGAAATCCCCGGGCCACCTGGGAACTGCATC
CAAACTGGCAAGCTAGAGTATGGTAGAGGGTGGGGAATTCCTGTGTCGTG
AAATGCGTAGATATAGGAAGGAACACCGTGGCGAAGGCGACCACTGGACTG
ATACTGACACTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCT
GGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTCAACTACCGTTGGGAGCCTTGAGCTCTT
AGTGGCGCAGCTAACGCATTAAGTTGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGG
TTAAAACTCAAATGAATTGACGGGGGCCCCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTT
AATTGAAGCAGGAAGACCTTACAGGCTGACTGCAATGAATCCAGAGATGGAT
TGGGCCTTCGGGAGCATTAGACGGTTTCATGGCTGTCGTCACCTCGTGTGAGAT
GTGGTAAGTCCGTAAACGACGCCACCCTGTCCTATGTTACCAGCACGTAATGGT
GGCAGCTTAAGGAGACGCCGGTGCACGGGGAAGGGGAGGTAAGTCATCATC
ATAACCGTGGGTTCACGAAATTCAGGTAACTTCCACCCATCGTATATCCAGA
GGAACGTCTAAAACAGTCTGAAGGGGAAGCGGATTGATCCTTGTAGATAGGG
CTCAGTACGATTCTGAAGACACAAGTGCACAGCGCGAGGCACGGCATGGGA
CGGGTGACACTCAATGTAGGAGAATCACCATCGGAGTACGTGCTCAGAAA

23.1

TGGGGGACAACGTTTCTAAAGACCTTACCATACTCCTACGGAGAAACAGGAC
CTTCCGCTTGTTATCAGATGAGCCAGGTCGGATTGCTTGTTGGTGGGTAAAGG
CCTCCAAGGCGACGATCCGAACTGGCTGAGATGATCACATCTCTGACTGAGA
CACGTCCAACCTCCTACGGGAGGCAGATGGGGAATATTGAACAAGGGCATGCC
TGATCCACCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGTCTTCGGATTGTAAAGCACTTTA
ATTGGGAGGAAGGGCATAAGTTAATACCTTGCTGTTTTGACGTTACCAACAG
AATAAGCACCGGGTAACTTCGTGCCACAGCCGCGGTAAACGAAGGGTGCAA
GCGTTATCGGAATTACTGGCGTAAAGCGCGCGTAGTGGTTTGGTAAGATGAT
GTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCTCCATAACTGCCTGACTAGAG
TACGGAGAGGGTGGTGGAATTTCTGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATAG
GAAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACCACCTGGACTGATACTGACACTGAG
GTGCGAAAGCGTGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGT
AAACGATGTCGACTAGCCGTTGGAATCCTTGAGATTTAGTGGCGCAGCTAAC
GCGATAAGTCGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTAAAACCTCAAATGA
ATTGACGGGGGGCCCCACAAGCGTGTAGCATGTGGTTTAATTCGAACAACGCG
AAGAACCTTCCTTCCTTGCATTCCGGAACCTGCAGAGATCGCGGTGCCTTCGG
GATATTGTACCAGGTTCTCCATGTGTGTCTCGTCGTCTTTTATTATCCGTACCA
CGCATCCTGTCCTTAGTTCCACCTCCTATGGCAAAGAGATCCTCTTCCACCTT
AAATATCACCTTCCACATCTATCTTCCTACCGTTCCTTACACACCTTAACAGT
GGCATCAAAGCCACACCCCCACTTTTCCAGATCGCCCCATAGAATGCTGCTTA
CGTTGATCGCTCTCTCGTACTATAGAAGATTTCTTTTCGCCTGGCCATTCCGTC
GTTTTCTCCCCGGGCCTTTTAAGGGCCTCCTCACCGCAACTGGATTCC

5.1.3 Séquences de l'enrichissement à haute concentration d'équol contenant du lisier

Isolat	Numéro d'accès
3.1.1.1	GU826120
3.1.1.2	GU826121
3.1.2	GU826122
4.2	GU826123
6.1.1	GU826124
6.1.2	GU826125
8	GU826126
9.1	GU826127
9.2.1.1	GU826128
9.2.1.2	GU826129
10.1.1.1	GU826130
10.1.1.2	GU826131
21.1	GU826132

Références

- Akaza, H., N. Miyanaga, N. Takashima, S. Naito, Y. Hirao, T. Tsukamoto, T. Fujioka, M. Mori, W. J. Kim et J. M. Song. 2004. Comparisons of percent equol producers between prostate cancer patients and controls: case-controlled studies of isoflavones in Japanese, Korean and American residents. Japanese Journal of Clinical Oncology **34**(2): 86-89.
- Akiyama, T., J. Ishida, S. Nakagawa, H. Ogawara, S. Watanabe, N. Itoh, M. Shibuya et Y. Fukami. 1987. Genistein, a specific inhibitor of tyrosine-specific protein kinases. Journal of Biological Chemistry **262**(12): 5592-5595.
- Andersen, H., H. Siegrist, B. Halling-Sorensen et T. A. Ternes. 2003. Fate of estrogens in a municipal sewage treatment plant. Environmental Science & Technology **37**(18): 4021-6.
- Arora, A., M. G. Nair et G. M. Strasburg. 1998. Antioxidant activities of isoflavones and their biological metabolites in a liposomal system. Archives of Biochemistry and Biophysics **356**(2): 133-141.
- Arts, I. C. et P. C. Hollman. 2005. Polyphenols and disease risk in epidemiologic studies. The American journal of clinical nutrition **81**(1 Suppl): 317S.
- Aura, A. M. 2008. Microbial metabolism of dietary phenolic compounds in the colon. Phytochemistry Reviews **7**(3): 407-429.
- Bacaloni, A., C. Cavaliere, A. Faberi, P. Foglia, R. Samperi et A. Laganà. 2005. Determination of isoflavones and coumestrol in river water and domestic wastewater sewage treatment plants. Analytica Chimica Acta **531**(2): 229-237.
- Baronti, C., R. Curini, G. D'Ascenzo, A. Di Corcia, A. Gentili et R. Samperi. 2000. Monitoring natural and synthetic estrogens at activated sludge sewage treatment plants and in a receiving river water. Environmental Science & Technology **34**(24): 5059-5066.
- Bayer, T., T. Colnot et W. Dekant. 2001. Disposition and biotransformation of the estrogenic isoflavone daidzein in rats. Toxicological Sciences **62**(2): 205-211.
- Bennetts, H. W., E. J. Uunderwood et F. L. Shier. 1946. A specific breeding problem of sheep on subterranean clover pastures in Western Australia. Australian veterinary journal **22**(1): 2-12.
- Bingham, S. A., C. Atkinson, J. Liggins, L. Bluck et A. Coward. 2007. Phyto-oestrogens: where are we now? British Journal of Nutrition **79**(05): 393-406.

Brown, C. et R. J. Seidler. 1973. Potential Pathogens in the Environment: *Klebsiella pneumoniae*, a Taxonomic and Ecological Enigma. Applied and Environmental Microbiology **25**(6): 900-904.

Brzezinski, A., H. Adlercreutz, R. Shaoul, A. Rosier, A. Shmueli, V. Tanos et J. G. Schenker. 1997. Short-term Effects of Phytoestrogen-rich Diet on Postmenopausal Women. Menopause **4**(2): 89.

Burnison, B. K., A. Hartmann, A. Lister, M. R. Servos, T. Ternes et G. Van Der Kraak. 2003. A Toxicity Identification Evaluation Approach To Studying Estrogenic Substances In Hog Manure And Agricultural Runoff. Environmental Toxicology and Chemistry **22**(10): 2243-2250.

Chang, Y. C. et M. G. Nair. 1995. Metabolism of daidzein and genistein by intestinal bacteria. Journal of Natural Products **58**(12): 1892-1896.

Cheek, A. O., P. M. Vonier, E. Oberdorster, B. C. Burow et J. A. McLachlan. 1998. Environmental Signaling: A Biological Context for Endocrine Disruption. Environmental Health Perspectives **106**: 5-10.

Chemblink. www.chemblink.com.

Clotfelter, E. D. et A. C. Rodriguez. 2006. Behavioral changes in fish exposed to phytoestrogens. Environmental Pollution **144**(3): 833-839.

Coldham, N. G., L. C. Howells, A. Santi, C. Montesissa, C. Langlais, L. J. King, D. D. Macpherson et M. J. Sauer. 1999. Biotransformation of genistein in the rat: elucidation of metabolite structure by product ion mass fragmentologyn. Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology **70**(4-6): 169-184.

Doran, T. I. 1999. The role of *Citrobacter* in clinical disease of children: review. Clinical Infectious Diseases **28**(2): 384-394.

Erbs, M., C. C. Hoerger, N. Hartmann et T. D. Bucheli. 2007. Quantification of six phytoestrogens at the nanogram per liter level in aqueous environmental samples using ¹³C₃-labeled internal standards. Journal of Agricultural and Food Chemistry **55**(21): 8339-8345.

Fahrbach, M., J. Kuever, R. Meinke, P. Kampfer et J. Hollender. 2006. Denitratisoma oestradiolicum gen. nov., sp. nov., a 17 β -oestradiol-degrading, denitrifying betaproteobacterium. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology **56**(7): 1547.

Fine, D. D., G. P. Breidenbach, T. L. Price et S. R. Hutchins. 2003. Quantitation of estrogens in ground water and swine lagoon samples using solid-phase extraction, pentafluorobenzyl/trimethylsilyl derivatizations and gas chromatography-negative ion

chemical ionization tandem mass spectrometry. Journal of Chromatography A **1017**(1-2): 167-185.

Flammarion, P., F. Brion, M. Babut, J. Garric, B. Migeon, P. Noury, E. Thybaud, X. Palazzi et C. R. Tyler. 2000. Induction of Fish Vitellogenin and Alterations in Testicular Structure: Preliminary Results of Estrogenic Effects in Chub (*Leuciscus cephalus*). Ecotoxicology **9**(1): 127-135.

Fotsis, T., M. Pepper, H. Adlercreutz, G. Fleischmann, T. Hase, R. Montesano et L. Schweigerer. 1993. Genistein, a dietary-derived inhibitor of *in vitro* angiogenesis. Proceedings of the National Academy of Sciences **90**(7): 2690-2694.

Frank, J. A., C. I. Reich, S. Sharma, J. S. Weisbaum, B. A. Wilson et G. J. Olsen. 2008. Critical evaluation of two primers commonly used for amplification of bacterial 16S rRNA genes. Applied and Environmental Microbiology **74**(8): 2461.

Fujii, K., S. Kikuchi, M. Satomi, N. Ushio-Sata et N. Morita. 2002. Degradation of 17 β -Estradiol by a Gram-Negative Bacterium Isolated from Activated Sludge in a Sewage Treatment Plant in Tokyo, Japan. Applied and Environmental Microbiology **68**(4): 2057-2060.

Furuichi, T., K. Kannan, K. Suzuki, S. Tanaka, J. P. Giesy et S. Masunaga. 2006. Occurrence of estrogenic compounds in and removal by a swine farm waste treatment plant. Environmental Science & Technology **40**: 7896-7902.

Gaido, K. W., L. S. Leonard, S. Lovell, J. C. Gould, D. Babai, C. J. Portier et D. P. McDonnell. 1997. Evaluation of Chemicals with Endocrine Modulating Activity in a Yeast-Based Steroid Hormone Receptor Gene Transcription Assay. Toxicology and Applied Pharmacology **143**(1): 205-212.

Grace, P. B., J. I. Taylor, Y. L. Low, R. N. Luben, A. A. Mulligan, N. P. Botting, M. Dowsett, A. A. Welch, K. T. Khaw et N. J. Wareham. 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 **13**(5): 698-708.

Grimont, P. A. D., F. Grimont et M. P. Starr. 1981. Serratia species isolated from plants. Current Microbiology **5**(5): 317-322.

Hagedorn, C. et J. G. Holt. 1975. Differentiation of Arthrobacter soil isolates and named strains from other bacteria by reactions on dye-containing media. Canadian journal of microbiology **21**(5): 688.

Hanselman, T. A., D. A. Graetz et A. C. Wilkie. 2003. Manure-borne estrogens as potential environmental contaminants: a review. Environmental Science & Technology **37**(24): 5471-8.

- Hauben, L., L. Vauterin, E. R. B. Moore, B. Hoste et J. Swings. 1999. Genomic diversity of the genus *Stenotrophomonas*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology **49**(4): 1749-1760.
- Hawkins, M. B., J. W. Thornton, D. Crews, J. K. Skipper, A. Dotte et P. Thomas. 2000. Identification of a third distinct estrogen receptor and reclassification of estrogen receptors in teleosts. Proceedings of the National Academy of Sciences **97**(20): 10751-10756.
- Hedlund, T. E., W. U. Johannes et G. J. Miller. 2003. Soy isoflavonoid equol modulates the growth of benign and malignant prostatic epithelial cells in vitro. The Prostate **54**(1): 68 - 78.
- Heinonen, S., T. Nurmi, K. Liukkonen, K. Poutanen, K. Wahala, T. Deyama, S. Nishibe et H. Adlercreutz. 2001. *In vitro* metabolism of plant lignans: new precursors of mammalian lignans enterolactone and enterodiol. Journal of Agricultural and Food Chemistry **49**(7): 3178-3186.
- Hur, H. G., R. D. Beger, T. M. Heinze, J. O. Lay, J. P. Freeman, J. Dore et F. Rafii. 2002. Isolation of an anaerobic intestinal bacterium capable of cleaving the C-ring of the isoflavonoid daidzein. Archives of Microbiology **178**(1): 8-12.
- Hur, H. G. et F. Rafii. 2000. Biotransformation of the isoflavonoids biochanin A, formononetin, and glycitein by *Eubacterium limosum*. FEMS microbiology letters **192**(1): 21-25.
- Hutchins, S. R., M. V. White, F. M. Hudson et D. D. Fine. 2007. Analysis of lagoon samples from different concentrated animal feeding operations for estrogens and estrogen conjugates. Environmental Science & Technology **41**(3): 738-744.
- Ibarreta, D., A. Daxenberger et H. H. Meyer. 2001. Possible health impact of phytoestrogens and xenoestrogens in food. Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica **109**(3): 161-184.
- Isabelle, M. 2007. Isolement et caractérisation de bactéries capables de métaboliser les estrogènes dans le lisier de porcs. Mémoire, INRS-Institut Armand-Frappier.
- Jobling, S., M. Nolan, C. R. Tyler, G. Brighty et J. P. Sumpter. 1998. Widespread sexual disruption in wild fish. Environmental Science & Technology **32**(17): 2498-2506.
- Kampfer, P., R. Rossello-Mora, H. C. Scholz, C. Welinder-Olsson, E. Falsen et H. J. Busse. 2006. Description of *Pseudochrobactrum* gen. nov., with the two species *Pseudochrobactrum asaccharolyticum* sp. nov. and *Pseudochrobactrum saccharolyticum* sp. nov. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology **56**(8): 1823.
- Kang, J., W. E. Price et L. A. Hick. 2006. Simultaneous determination of isoflavones and lignans at trace levels in natural waters and wastewater samples using liquid

chromatography/electrospray ionization ion trap mass spectrometry. Rapid Communications in Mass Spectrometry **20**(16).

Kang, J. S., Y. D. Yoon, M. H. Han, S. B. Han, K. Lee, S. K. Park et H. M. Kim. 2007. Equol inhibits nitric oxide production and inducible nitric oxide synthase gene expression through down-regulating the activation of Akt. International immunopharmacology **7**(4): 491-499.

Karr, S. C., J. W. Lampe, A. M. Hutchins et J. L. Slavin. 1997. Urinary isoflavonoid excretion in humans is dose dependent at low to moderate levels of soy-protein consumption. American Journal of Clinical Nutrition **66**(1): 46-51.

Kawanishi, M., T. Takamura-Enya, R. Ermawati, C. Shimohara, M. Sakamoto, K. Matsukawa, T. Matsuda, T. Murahashi, S. Matsui et K. Wakabayashi. 2004. Detection of genistein as an estrogenic contaminant of river water in Osaka. Environmental Science & Technology **38**(23): 6424-6429.

Ke, J., W. Zhuang, K. Y. Gin, M. Reinhard, L. T. Hoon et J. H. Tay. 2007. Characterization of estrogen-degrading bacteria isolated from an artificial sandy aquifer with ultrafiltered secondary effluent as the medium. Applied Microbiology Biotechnology.

Kiparissis, Y., G. C. Balch, T. L. Metcalfe et C. D. Metcalfe. 2003. Effects of the Isoflavones Genistein and Equol on the Gonadal Development of Japanese Medaka (*Oryzias latipes*). Environmental Health Perspectives **111**(10): 1158-1163.

Kiparissis, Y., R. Hughes, C. Metcalfe et T. Ternes. 2001. Identification of the isoflavonoid genistein in bleached kraft mill effluent. Environmental Science & Technology **35**(12): 2423-2427.

Klus, K. et W. Barz. 1998. Formation of polyhydroxylated isoflavones from the isoflavones genistein and biochanin A by bacteria isolated from tempe. Phytochemistry **47**(6): 1045-1048.

Kuiper, G., B. O. Carlsson, K. A. J. Grandien, E. Enmark, J. Haggblad, S. Nilsson et J. A. Gustafsson. 1997. Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors α and β . Endocrinology **138**(3): 863-870.

Kuiper, G., E. Enmark, M. Peltö-Huikko, S. Nilsson et J. A. Gustafsson. 1996. Cloning of a novel estrogen receptor expressed in rat prostate and ovary. Proceedings of the National Academy of Sciences **93**(12): 5925-5930.

Kurzer, M. S. et X. Xu. 1997. Dietary phytoestrogens. Annual Review of Nutrition **17**(1): 353-381.

- Laganà, A., A. Bacaloni, I. De Leva, A. Faberi, G. Fago et A. Marino. 2004. Analytical methodologies for determining the occurrence of endocrine disrupting chemicals in sewage treatment plants and natural waters. Analytica Chimica Acta **501**(1): 79-88.
- Lampe, J. W., S. C. Karr, A. M. Hutchins et J. L. Slavin (1998). Urinary equol excretion with a soy challenge: influence of habitual diet.
- Lange, I. G., A. Hartel et H. H. D. Meyer. 2002. Evolution of oestrogen functions in vertebrates. Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology **83**(1-5): 219-226.
- Lee, L. S., T. J. Strock, A. K. Sarmah et P. S. C. Rao. 2003. Sorption and dissipation of testosterone, estrogens, and their primary transformation products in soils and sediment. Environmental Science & Technology **37**(18): 4098-4105.
- Lephart, E. D., K. D. R. Setchell, R. J. Handa et T. D. Lund. 2004. Behavioral effects of endocrine-disrupting substances: phytoestrogens. Institute for Laboratory Animal Research journal **45**(4): 443-454.
- Lephart, E. D., T. W. West, K. S. Weber, R. W. Rhees, K. D. R. Setchell, H. Adlercreutz et T. D. Lund. 2002. Neurobehavioral effects of dietary soy phytoestrogens. Neurotoxicology and teratology **24**(1): 5-16.
- Lintelmann, J., A. Katayama, N. Kurihara, L. Shore et A. Wenzel. 2003. Endocrine disruptors in the environment. Pure And Applied Chemistry **75**: 631-681.
- Lund, T. D., D. J. Munson, M. E. Haldy, K. D. R. Setchell, E. D. Lephart et R. J. Handa. 2004. Equol Is a Novel Anti-Androgen that Inhibits Prostate Growth and Hormone Feedback. Biology of Reproduction **70**(4): 1188-1195.
- Margesin, R., P. Schumann, C. Sproer et A. M. Gounot. 2004. *Arthrobacter psychrophenicus* sp. nov., isolated from an alpine ice cave. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology **54**(6): 2067.
- Markovits, J., C. Linassier, P. Fosse, J. Couprie, J. Pierre, A. Jacquemin-Sablon, J. M. Saucier, J. B. L. Pecq et A. K. Larsen. 1989. Inhibitory effects of the tyrosine kinase inhibitor genistein on mammalian DNA topoisomerase II. Cancer Research **49**(18): 5111-5117.
- Martin, M. E., M. Haourigui, C. Pelissero, C. Benassayag et E. A. Nunez. 1995. Interactions between phytoestrogens and human sex steroid binding protein. Life sciences **58**(5): 429-436.
- Matthies, A., M. Blaut et A. Braune. 2009. Isolation of a human intestinal bacterium capable of daidzein and genistein conversion. Applied and Environmental Microbiology **75**(6): 1740.

- Matthiessen, P. 2003. Historical perspective on endocrine disruption in wildlife. Pure And Applied Chemistry **75**(11-12): 2197-2206.
- Mendelsohn, M. E. et R. H. Karas. 1999. The protective effects of estrogen on the cardiovascular system. New England Journal of Medicine **340**(23): 1801-1811.
- Messina, M. J., V. Persky, K. D. R. Setchell et S. Barnes. 1994. Soy intake and cancer risk: a review of the *in vitro* and *in vivo* data. Nutrition and Cancer **21**(2): 113-131.
- Milder, I. E. J., I. C. W. Arts, B. Putte, D. P. Venema et P. C. H. Hollman. 2007. Lignan contents of Dutch plant foods: a database including lariciresinol, pinoresinol, secoisolariciresinol and matairesinol. British Journal of Nutrition **93**(03): 393-402.
- Moore, C. G. et J. M. Stevenson. 1991. The Occurrence of Intersexuality in Harpacticoid Copepods and its Relationship with Pollution. Marine Pollution Bulletin **22**(2).
- Moore, C. G. et J. M. Stevenson. 1994. Intersexuality in benthic harpacticoid copepods in the Firth of Forth, Scotland. Journal of Natural History **28**(6): 1213-1230.
- Muthyala, R. S., Y. H. Ju, S. Sheng, L. D. Williams, D. R. Doerge, B. S. Katzenellenbogen, W. G. Helferich et J. A. Katzenellenbogen. 2004. Equol, a natural estrogenic metabolite from soy isoflavones convenient preparation and resolution of R- and S-equols and their differing binding and biological activity through estrogen receptors alpha and beta. Bioorganic & medicinal chemistry **12**(6): 1559-1567.
- Nagel, S. C., F. S. Vom Saal et W. V. Welshons. 1998. The effective free fraction of estradiol and xenoestrogens in human serum measured by whole cell uptake assays: physiology of delivery modifies estrogenic activity. Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine **217**(3): 300-309.
- Oehlmann, J., P. Fioroni, E. Stroben et B. Markert. 1996. Tributyltin (TBT) effects on *Ocenebrina aciculata* (Gastropoda: Muricidae): imposex development, sterilization, sex change and population decline. The Science of the Total Environment **188**(2): 205-223.
- Ososki, A. L. et E. J. Kennelly. 2003. Phytoestrogens: a review of the present state of research. Phytotherapy Research **17**(8): 845-869.
- Ozasa, K., M. Nakao, Y. Watanabe, K. Hayashi, T. Miki, K. Mikami, M. Mori, F. Sakauchi, M. Washio et Y. Ito. 2004. Serum phytoestrogens and prostate cancer risk in a nested case-control study among Japanese men. Cancer science **95**(1): 65-71.
- Palleroni, N. J., M. Doudoroff, R. Y. Stanier, R. E. Solanes et M. Mandel. 1970. Taxonomy of the aerobic pseudomonads: the properties of the *Pseudomonas stutzeri* group. Microbiology **60**(2): 215.

- Patisaul, H. B., M. Dindo, P. L. Whitten et L. J. Young. 2001. Soy Isoflavone Supplements Antagonize Reproductive Behavior and Estrogen Receptor -and -Dependent Gene Expression in the Brain 1. Endocrinology **142**(7): 2946-2952.
- Pindi, P. K., R. Manorama, Z. Begum et S. Shivaji. 2009. *Arthrobacter antarcticus* sp. nov., isolated from a sediment from the Antarctic sea. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology.
- Podschun, R., S. Pietsch, C. Holler et U. Ullmann. 2001. Incidence of *Klebsiella* species in surface waters and their expression of virulence factors. Applied and Environmental Microbiology **67**(7): 3325-3327.
- Potvin-Barakatt, J. 2008. Étude de procédés complémentaires au traitement aérobie thermophile du lisier de porc. Mémoire, INRS-Institut Armand-Frappier.
- Reddy, G. S. N., R. K. Aggarwal, G. I. Matsumoto et S. Shivaji. 2000. *Arthrobacter flavus* sp. nov., a psychrophilic bacterium isolated from a pond in McMurdo Dry Valley, Antarctica. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology **50**(4): 1553.
- Roh, S. W., Y. Sung, Y. D. Nam, H. W. Chang, K. H. Kim, J. H. Yoon, C. O. Jeon, H. M. Oh et J. W. Bae. 2008. *Arthrobacter soli* sp. nov., a novel bacterium isolated from wastewater reservoir sediment. The Journal of Microbiology **46**(1): 40-44.
- Routledge, E. J., D. Sheahan, C. Desbrow, G. C. Brighty, M. Waldock et J. P. Sumpter. 1998. Identification of estrogenic chemicals in STW effluent. 2. In vivo responses in trout and roach. Environmental Science & Technology **32**(11): 1559-1565.
- Rowland, I. R., H. Wiseman, T. A. B. Sanders, H. Adlercreutz et E. A. Bowey. 2000. Interindividual Variation in Metabolism of Soy Isoflavones and Lignans: Influence of Habitual Diet on Equol Production by the Gut Microflora. Nutrition and Cancer **36**(1): 27-32.
- Savas, U., M. Christou et C. R. Jefcoate. 1993. Mouse endometrium stromal cells express a polycyclic aromatic hydrocarbon-inducible cytochrome P450 that closely resembles the novel P450 in mouse embryo fibroblasts (P450EF). Carcinogenesis **14**(10): 2013.
- Schiessl, H., H. M. Frost et W. S. S. Jee. 1998. Estrogen and bone-muscle strength and mass relationships. Bone **22**(1): 1-6.
- Schmitt, E., W. Dekant et H. Stopper. 2001. Assaying the estrogenicity of phytoestrogens in cells of different estrogen sensitive tissues. Toxicology in Vitro **15**(4-5): 433-439.
- Servos, M. R., D. T. Bennie, B. K. Burnison, A. Jurkovic, R. McInnis, T. Neheli, A. Schnell, P. Seto, S. A. Smyth et T. A. Ternes. 2005. Distribution of estrogens, 17beta-estradiol and estrone, in Canadian municipal wastewater treatment plants. Science of the Total Environment **336**(1-3): 155-70.

Setchell, K. D. R., N. M. Brown et E. Lydeking-Olsen. 2002. The Clinical Importance of the Metabolite Equol-A Clue to the Effectiveness of Soy and Its Isoflavones. Journal of Nutrition **132**(12): 3577-3584.

Setchell, K. D. R., C. Clerici, E. D. Lephart, S. J. Cole, C. Heenan, D. Castellani, B. E. Wolfe, L. Nechemias-Zimmer, N. M. Brown et T. D. Lund. 2005. S-equol, a potent ligand for estrogen receptor , is the exclusive enantiomeric form of the soy isoflavone metabolite produced by human intestinal bacterial flora. The American journal of clinical nutrition **81**(5): 1072-1079.

Shappell, N. W., L. O. Billey, D. Forbes, T. A. Matheny, M. E. Poach, G. B. Reddy et P. G. Hunt. 2007. Estrogenic activity and steroid hormones in swine wastewater through a lagoon constructed-wetland system. Environmental Science & Technology **41**: 444-450.

Shi, J., S. Fujisawa, S. Nakai et M. Hosomi. 2004. Biodegradation of natural and synthetic estrogens by nitrifying activated sludge and ammonia-oxidizing bacterium *Nitrosomonas europaea*. Water Research **38**(9): 2323-2330.

Sigma-Aldrich. "<http://www.sigmaaldrich.com/>."

Simpson, E. R. 2003. Sources of estrogen and their importance. Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology **86**(3-5): 225-230.

Stern, J. E. et G. L. Vaughan. 1987. Seasonal changes in oestrogen receptor affinity in the domestic rabbit, *Oryctolagus cuniculus*. Journal of reproduction and fertility **79**(1): 15-20.

Stopper, H., E. Schmitt et K. Kobras. 2005. Genotoxicity of phytoestrogens. Mutation Research-Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis **574**(1-2): 139-155.

Taylor, M. R. et P. T. Harrison. 1999. Ecological effects of endocrine disruption: current evidence and research priorities. Chemosphere **39**(8): 1237-48.

Turner, N. J., B. M. Thomson et I. C. Shaw. 2003. Bioactive isoflavones in functional foods: the importance of gut microflora on bioavailability. Nutrition reviews **61**(6): 204-213.

Tzchori, I., G. Degani, R. Elisha, R. Eliyahu, A. Hurvitz, J. Vaya et B. Moav. 2004. The influence of phytoestrogens and oestradiol-17 on growth and sex determination in the European eel (*Anguilla anguilla*). Aquaculture Research **35**(13): 1213-1219.

van Aerle, R., M. Nolan, S. Jobling, L. B. Christiansen, J. P. Sumpter et C. R. Tyler. 2001. Sexual disruption in a second species of wild cyprinid fish (the gudgeon, *gobio gobio*) in united kingdom freshwaters. Environmental Toxicology and Chemistry **20**(12): 2841-2847.

- Vigano, L., A. Arillo, S. Bottero, A. Massari et A. Mandich. 2001. First observation of intersex cyprinids in the Po River (Italy). Science of the Total Environment **269**(1-3): 189-94.
- Weber, S., P. Leuschner, P. Kaempfer, W. Dott et J. Hollender. 2005. Degradation of estradiol and ethinyl estradiol by activated sludge and by a defined mixed culture. Applied Microbiology and Biotechnology **67**(1): 106-112.
- Wenning, M., V. Theilmann et S. Scherer. 2006. Rapid analysis of two food-borne microbial communities at the species level by Fourier-transform infrared microspectroscopy. Environmental microbiology **8**(5): 848-857.
- Yoshimoto, T., F. Nagai, J. Fujimoto, K. Watanabe, H. Mizukoshi, T. Makino, K. Kimura, H. Saino, H. Sawada et H. Omura. 2004. Degradation of estrogens by *Rhodococcus zopfii* and *Rhodococcus equi* isolates from activated sludge in wastewater treatment plants. Applied and Environmental Microbiology **70**(9): 5283-5289.
- Yu, C. P., H. Roh et K. H. Chu. 2007. 17 β -estradiol-degrading bacteria isolated from activated sludge. Environmental Science & Technology **41**: 486-492.
- Zhu, B. T. et A. H. Conney. 1998. Functional role of estrogen metabolism in target cells: review and perspectives. Carcinogenesis **19**(1): 1.

