

ANNE-SOPHIE MORISSET

ENDOCRINOLOGIE DE L'OBÉSITÉ :
Relation avec l'alimentation

Mémoire présenté
à la Faculté des études supérieures de l'Université Laval
dans le cadre du programme de maîtrise en Nutrition
pour l'obtention du grade de Maître ès sciences (M.Sc.)

DÉPARTEMENT DE NUTRITION
FACULTÉ DES SCIENCES DE L'AGRICULTURE ET DE L'ALIMENTATION
UNIVERSITÉ LAVAL
QUÉBEC

2008

Résumé

L'obésité est devenue un problème d'envergure dans la société actuelle en raison de l'inactivité physique et de la mauvaise alimentation. Ainsi, un nombre croissant d'individus se retrouvent en balance énergétique positive, ce qui les conduit à accumuler un surplus de graisses. Cette accumulation de graisses, lorsqu'elle se fait de façon prédominante au niveau du tissu adipeux viscéral, semble particulièrement nocive pour la santé, notamment pour le risque de développer plusieurs complications métaboliques menant éventuellement aux maladies cardiovasculaires et au diabète de type 2. D'une part, l'endocrinologie du tissu adipeux semble être la clé d'une meilleure compréhension de l'obésité, de l'accumulation de graisse viscérale et du développement de ses conséquences alors que, d'autre part, l'alimentation semble être une partie de la solution au problème, puisqu'elle exerce un rôle de premier plan dans l'induction d'une balance énergétique négative conduisant à la perte de poids, celle-ci associée à la diminution de l'obésité et des risques pour la santé.

Abstract

Obesity emerged as a public health concern as it is reaching pandemic proportions in our society. It has been attributed to sedentariness and abundance of high energy density food. Positive energy imbalance seems inevitable for some individuals and leads them to excess fat accumulation. When this accumulation predominantly takes place in the visceral compartments, it is particularly deleterious and increases the risk to develop metabolic complications leading to cardiovascular diseases and type 2 diabetes. On the one hand, the endocrinology of adipose tissue seems to provide a better understanding of obesity, visceral adipose tissue accumulation and associated metabolic complications. On the other, nutrition seems to be a part of the solution with its primary role in the induction of a negative energy imbalance leading to weight loss and health risks reduction.

Avant-Propos

Ce mémoire synthétise l'essentiel des travaux qui ont été faits au cours de ma maîtrise sous la direction du Dr. d'André Tchernof et la co-direction du Dr. Simone Lemieux. Il convient tout d'abord de décrire brièvement ces travaux. Au tout début de ma maîtrise, j'ai participé à la rédaction d'un premier article, qui est présenté ci-joint comme premier chapitre : **CIRCULATING IL-6 CONCENTRATIONS AND ABDOMINAL ADIPOCYTE ISOPROTERENOL-STIMULATED LIPOLYSIS IN WOMEN**. Cet article a été publié dans la revue *Obesity*. Pour cet article que j'ai entièrement rédigé, j'ai dû procéder à des analyses statistiques et à l'élaboration de graphiques et de tableaux. Je remercie les co-auteurs de cet article, Céline Huot et Denis Légaré, deux gynécologues qui ont été impliqués du côté clinique tout au long de l'étude ainsi qu'André Tchernof, qui a supervisé le projet et contribué de façon importante à cet article. Le deuxième chapitre est consacré à un second article publié dans la revue *Nutrition Reviews* : **IMPACT OF DIET AND ADIPOSITY ON CIRCULATING LEVELS OF SEX HORMONE-BINDING GLOBULIN AND ANDROGENS**. Pour cette revue de littérature, j'ai fait la majeure partie de la recherche bibliographique, les lectures et le travail nécessaire à la synthèse des informations avant de rédiger l'article et d'élaborer les tableaux et les figures qu'il contient. Je remercie les co-auteurs de cet article, Karine Blouin, qui avait déjà effectué un premier travail de recherche ainsi qu'André Tchernof, qui a supervisé l'élaboration de l'article. Finalement, le dernier chapitre est consacré à l'article suivant, soumis récemment dans la revue *British Journal of Nutrition* : **IMPACT OF A LIGNAN-RICH DIET ON THE METABOLIC PROFILE IN POST-MENOPAUSAL WOMEN**. C'est à cet article que j'ai consacré la majeure partie de mon temps : j'ai analysé des journaux alimentaires pour leur contenu en phytoestrogènes et mesuré les concentrations plasmatiques du principal phytoestrogène dans des échantillons sanguins de plus d'une centaine de femmes post-ménopausées, en plus de procéder aux analyses statistiques et à la rédaction de l'article. Je remercie Alain Veilleux de m'avoir grandement aidé en laboratoire afin d'effectuer les mesures plasmatiques. Je remercie tout spécialement la Dr. Simone Lemieux, qui nous a permis de travailler au sein de cette cohorte et qui a codirigé ce projet ainsi que la rédaction de l'article, ce qui a été essentiel à la réalisation de mon projet de maîtrise. Je remercie également les Drs. S. John Weisnagel et Jean Bergeron, co-chercheurs

dans le projet depuis son tout début. Finalement, je remercie également le Dr. Tchernof qui a supervisé et codirigé ce projet ainsi que la rédaction de l'article.

Par la présente, je tiens à remercier tout spécialement le Dr. André Tchernof qui a supervisé l'ensemble de mes travaux de maîtrise. Je le remercie de m'avoir donné l'opportunité de travailler sur des sujets inspirants, de m'avoir impliquée dans plusieurs projets, de m'avoir permis d'assister à plusieurs congrès, de m'avoir encouragée, de m'avoir félicitée et surtout d'avoir fait de moi quelqu'un de meilleur de par son positivisme et ses critiques constructives. Mille fois merci !

Je tiens aussi à remercier toute l'équipe du Dr. Tchernof qui a fait partie de mon quotidien depuis le début de ma maîtrise : merci à vous tous pour vos conseils et votre écoute. Un merci tout particulier à Alain Veilleux pour sa disponibilité, son temps et sa précieuse amitié : merci d'avoir répondu à mes multiples interrogations et d'avoir contribué à la résolution de tous mes petits pépins quotidiens !

Je voudrais également remercier la Chaire de Nutrition du Canada en Santé Cardiovasculaire pour son support financier.

Finalement, je remercie mon meilleur ami, mon complice, mon amoureux et tout récemment mon mari, qui m'a toujours encouragée et soutenue tout au long de ma maîtrise et qui continuera de le faire durant mon doctorat. Merci Maxime d'avoir confiance en moi.

Un gros merci à ma petite famille, composée de ma mère, mon père et ma sœur, qui m'a toujours appuyée dans mes choix professionnels et personnels tout en étant toujours très fiers de moi.

Merci !

*À tous ceux qui m'ont soutenue
professionnellement et personnellement*

Table des matières

Résumé.....	ii
Abstract.....	iii
Avant-Propos	iv
Table des matières	vii
Liste des tableaux.....	ix
Liste des figures.....	x
Introduction.....	1
1. Problématique de l'obésité.....	1
1.1 Définition, causes et prévalence	1
1.2 Importance de la distribution des graisses	2
1.3 Complications associées à l'obésité.....	3
1.4 Solutions et traitements.....	4
2. Endocrinologie de l'obésité	6
2.1 Le tissu adipeux : organe endocrine	6
2.1.1 Tissu adipeux viscéral et sous-cutané, interleukine-6 et lipolyse.....	7
2.2 Androgènes et globuline de liaison des stéroïdes sexuels (SHBG).....	9
2.2.1 Définition, rôles et structures chimiques des androgènes et de la SHBG.....	9
2.2.2 Androgènes, distribution des graisses et profil métabolique chez l'homme et la femme	10
2.2.3 SHBG et profil métabolique chez l'homme et la femme.....	11
2.2.4 Androgènes, SHBG et alimentation chez l'homme et la femme.....	11
2.3 Œstrogènes et phytoestrogènes.....	12
2.3.1 Définition, rôles et structures chimiques des œstrogènes	12
2.3.2 Ménopause, changements hormonaux, symptômes associés, hormonothérapie et thérapies alternatives.....	13
2.3.2 Conséquences à long terme des changements hormonaux liés à la ménopause	15
2.3.5 Conséquences à court terme des changements hormonaux liés à la ménopause, hormonothérapie et thérapies alternatives	16
2.3.4 Définition, principales classes et structures chimiques des phytoestrogènes ..	18
2.3.5 Métabolisme des phytoestrogènes	19
2.3.6 Sources alimentaires de phytoestrogènes	20
2.3.7 Effets potentiels des phytoestrogènes	23
2.3.8 Lignanes, obésité et sensibilité à l'insuline.	26
3. Objectifs et hypothèses	28
Chapitre 1 : Niveaux circulants d'interleukine-6 en relation avec la lipolyse stimulée par l'isoproterenol dans les adipocytes intra-abdominaux chez la femme.	30
Résumé.....	31
Chapitre 2 : Impact de l'alimentation et de l'adiposité sur les niveaux circulants d'androgènes et de SHBG.....	54
Résumé.....	55
Chapitre 3 : Impact d'une alimentation riche en lignanes sur le profil métabolique de la femme ménopausée.....	80
Résumé.....	81

Conclusion109
Bibliographie114

Liste des tableaux

Introduction :

Tableau 1 - Principales sources de phytoestrogènes.....	21
Tableau 2 - Principales sources de lignanes	22
Tableau 3 - Principales sources d'isoflavones.....	22

Chapitre 1 :

Tableau 1 - Principales caractéristiques des 48 femmes de l'étude	49
Tableau 2 - Corrélations entre les niveaux plasmatiques d'IL-6 et les principales caractéristiques des femmes de l'étude.....	50
Tableau 3 - Corrélations entre le diamètre adipocytaire, l'activité de la LPL, les mesures de lipolyse et les niveaux plasmatiques d'IL-6	51
Tableau 4 - Caractéristiques des femmes ayant des niveaux plasmatiques d'IL-6 faibles ou élevés individuellement pairées pour la masse grasse totale	52

Chapitre 2 :

Tableau 1 - Changements au niveau des concentrations plasmatiques de SHBG, des mesures d'adiposité et des mesures d'insulinémie chez les femmes, suite à diverses interventions diététiques	75
Tableau 2 - Changements au niveau des concentrations plasmatiques de SHBG, des mesures d'adiposité et des mesures d'insulinémie chez les hommes, suite à diverses interventions diététiques	78

Chapitre 3 :

Tableau 1 - Caractéristiques métaboliques et physiques des 115 femmes de l'étude	102
Tableau 2 - Apports en phytoestrogènes et paramètres métaboliques selon la consommation de lignanes.....	103
Tableau 3 - Apports en phytoestrogènes, apports énergétiques, dépense énergétique et paramètres métabolique selon les quartiles de concentrations plasmatiques d'ENL	104

Liste des figures

Introduction :

Figure 1 - Patrons de distribution des graisses chez l'humain.....	3
Figure 2 - Infiltration du tissu adipeux par les macrophages.....	7
Figure 3 - Structure de la testostérone	9
Figure 4 - Structure de la DHEA-S.....	10
Figure 5 - Structure de l'oestradiol.....	12
Figure 6 - Définition de la ménopause.....	13
Figure 7 - Changements hormonaux associés à la ménopause	14
Figure 8 - Redistribution des graisses à la ménopause observée chez certaines femmes....	15
Figure 9 - Isoflavones et coumestanes : parenté avec l'oestradiol	18
Figure 10 - Lignanes : parenté avec le tamoxifène	19
Figure 11 - Métabolisme des lignanes	20

Chapitre 1 :

Figure 1 - Diamètre adipocytaire, activité de la LPL et mesures de la lipolyse dans les adipocytes intra-abdominaux et sous-cutanés des femmes individuellement pairées pour la masse grasse totale.....	52
---	----

Chapitre 2 :

Figure 1 - Mécanismes par lesquels les interventions diététiques ou la composition de l'alimentation peut influencer les concentrations plasmatiques de SHBG.....	79
--	----

Chapitre 3 :

Figure 1 - Mesures d'adiposité selon les quartiles de concentrations plasmatiques d'ENL	105
Figure 2 - Homéostasie glucidique selon les quartiles de concentrations plasmatiques d'ENL	106
Figure 3 - Distribution énergétique en macronutriments selon les quartiles de concentrations plasmatiques d'ENL	107
Figure 4 - Apports en fibres selon les quartiles de concentrations plasmatiques d'ENL ..	108

Introduction

Il est très pertinent de se pencher sur la problématique de l'obésité puisque celle-ci est omniprésente et amène plusieurs conséquences négatives autant au niveau individuel que collectif. Ainsi, la première partie de l'introduction sera consacrée à la problématique de l'obésité et les conséquences qu'elle entraîne à plusieurs niveaux. Il conviendra ensuite de comprendre l'importance de la distribution des graisses et la physiologie du tissu adipeux d'un point de vue hormonal de manière à mieux cerner la problématique. D'une part, le tissu adipeux sera décrit comme un organe endocrine capable de sécréter des hormones comme la leptine et plusieurs cytokines inflammatoires comme l'interleukine-6 ou la protéine C-réactive, rappelant ainsi son rôle primordial dans la pathologie de l'obésité et ses complications métaboliques. D'autre part, l'importance des hormones sexuelles (androgènes et œstrogènes) dans la distribution des graisses sera également détaillée. Dans cette même partie, la relation importante entre l'obésité, l'alimentation et les niveaux d'androgènes sera investiguée de façon à mieux comprendre l'implication de l'alimentation dans l'endocrinologie de l'obésité. La relation entre œstrogènes, ménopause, redistribution des graisses, hormonothérapie et risque cardiovasculaire sera également abordée. Finalement, la majeure partie de l'introduction sera consacrée aux phytoestrogènes, substances mimant l'action des œstrogènes que l'on retrouve dans certains aliments et qui, depuis quelques années, sont utilisés comme alternatives à l'hormonothérapie. De façon plus précise, le rôle d'une alimentation riche en phytoestrogènes sera discuté en relation avec son effet sur les symptômes de la ménopause, mais surtout sur l'obésité et les complications qui lui sont associées. Le tout dans l'optique de mieux comprendre et d'explorer certaines pistes de solutions au phénomène grandissant de l'obésité.

1. Problématique de l'obésité

1.1 Définition, causes et prévalence

L'obésité est une problématique qui ne passe plus sous silence dans notre société : au Canada, on estime à 225% l'augmentation de la prévalence d'obésité entre 1990 et 2003 (1). En 2004, près du quart de la population était obèse (23,1%), alors que plus d'un tiers

additionnel des Canadiens, soit 36,1%, avait un surplus de poids (2). L'obésité consiste en une augmentation ou un excès du tissu adipeux de l'organisme, accompagné d'un excès de poids (3) qui résulte de l'interaction de facteurs génétiques, métaboliques, comportementaux et environnementaux (4). Ces changements environnementaux, conduisant à l'abondance actuelle d'aliments à haute densité énergétique ainsi qu'à une activité physique moindre plutôt qu'au mode de vie actif basé sur la subsistance d'autrefois, se sont déroulés beaucoup plus rapidement que l'évolution de notre génome par des mécanismes de sélection naturelle (5). Ainsi, les variations génétiques actuellement connues comme étant reliées à l'obésité n'ont montré que des contributions modérées dans la variabilité de la masse adipeuse, alors que l'épidémie actuelle semble plutôt être le résultat de nos styles de vie, caractérisés par l'inactivité physique et par une mauvaise alimentation. Un nombre croissant d'individus se retrouve donc en balance énergétique positive, qui implique des apports énergétiques supérieurs à ses dépenses, conduisant à l'accumulation excessive de graisses.

1.2 Importance de la distribution des graisses

La réponse de chaque individu à l'abondance énergétique demeure très variable ; la proportion de masse grasse est conséquemment très hétérogène. De la même manière, la répartition des tissus adipeux dans les divers compartiments corporels est très hétérogène. Il existe chez l'humain une différence sexuelle importante en ce qui concerne la distribution des graisses : chez l'homme elle est généralement de type androïde, ce qui se caractérise par une accumulation de graisses au niveau du tronc, alors que la femme adopte une distribution des graisses de type gynoïde, avec une plus grande accumulation des graisses au niveau des hanches, c'est-à-dire dans la région glutéale fémorale (Figure 1) (6). Il existe en parallèle une autre composante substantielle à la distribution des graisses : l'accumulation préférentielle de graisse viscérale, le plus souvent observée dans l'obésité de type androïde. En effet, pour une même masse grasse, l'homme aurait significativement plus de tissu adipeux viscéral que la femme (7). Ainsi, la distribution des graisses reflète une importance cruciale des hormones sexuelles dans la pathologie de l'obésité et le développement de ses conséquences.

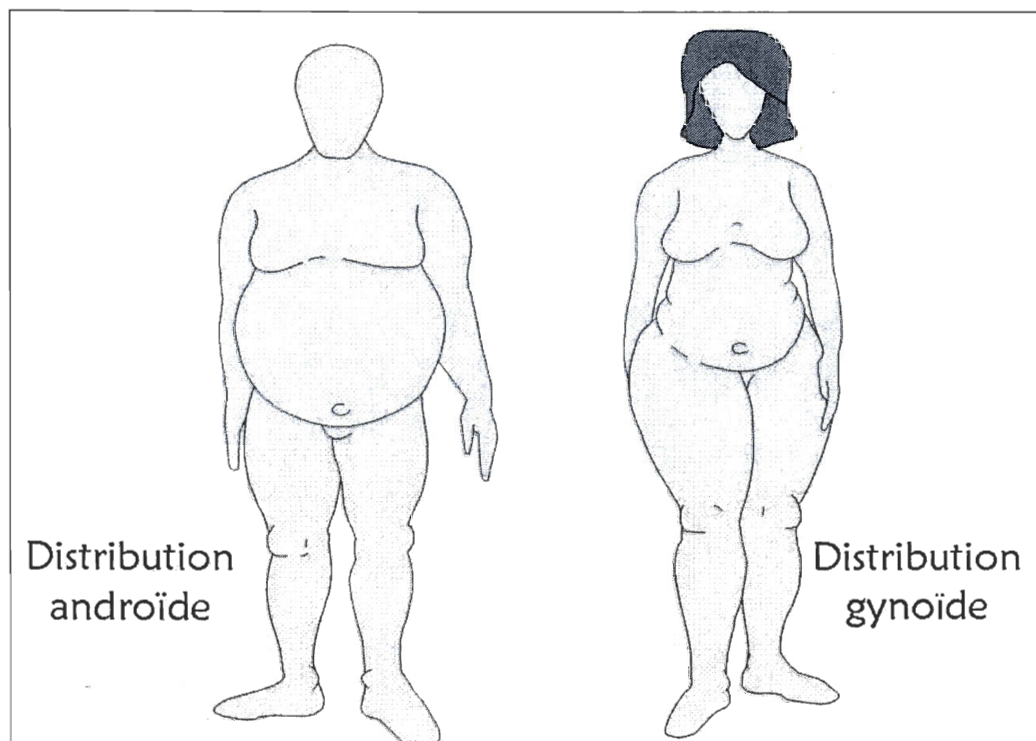


Figure 1 – Patrons de distribution des graisses chez l’humain

1.3 Complications associées à l’obésité

Il n’est donc pas surprenant d’apprendre que l’épidémie d’obésité est inévitablement associée à des conséquences sur les plans de la santé. Nombreuses sont les complications métaboliques associées à l’obésité : maladies cardiovasculaires de toutes sortes, hypertension, diabète de type 2, cancers, apnée du sommeil, etc. (4;8). De plus, il est clairement établi que la présence d’un excès d’adiposité viscérale est particulièrement critique dans le développement des complications métaboliques associées à l’obésité, notamment au niveau du risque cardiovasculaire et du risque de développer un diabète de type 2 (9-13).

L’obésité augmente le risque de maladies cardiovasculaires en modifiant négativement le profil lipidique, c’est-à-dire en diminuant les taux de cholestérol HDL et en augmentant les taux de triglycérides plasmatiques (14). L’accumulation de graisse viscérale est

particulièrement importante dans le développement des maladies cardiovasculaires. En effet, l'obésité viscérale est associée à une augmentation significative des taux de triglycérides, à des niveaux abaissés d'HDL ainsi qu'à une augmentation de l'apolipoprotéine B, ce qui se caractérise par un nombre plus élevés de particules LDL petites et denses, elles-mêmes associées au développement de la plaque athéromateuse et ultimement aux événements cardiovasculaires (9;12). L'obésité est aussi associée à une résistance à l'insuline conduisant au développement du diabète de type 2 (13;15). Encore une fois, l'accumulation préférentielle de tissu adipeux viscéral est étroitement liée au développement de la résistance à l'insuline et celui du diabète de type 2 (9;16). La relation entre l'obésité, l'accumulation de tissu adipeux et un état pro-inflammatoire global, caractérisé par une augmentation systémique de facteurs inflammatoires divers tels la protéine C-réactive (CRP), l'interleukine-6 (IL-6), et le facteur de nécrose tumorale (TNF- α) est aussi très bien documentée (9;17). Bref, il ne fait aucun doute que l'obésité et plus particulièrement l'accumulation de graisse viscérale, est associée à des complications métaboliques importantes et représente en fait l'élément central de l'ensemble d'altérations regroupées sous le terme de syndrome métabolique (18).

Il ne faut pas oublier que l'obésité et ses complications métaboliques ont aussi des conséquences négatives sur le plan psychologique et social. L'obésité a été associée à une baisse d'estime de soi, à la dépression, à de l'anxiété et à une qualité de vie générale diminuée (19). De plus, l'obésité est inévitablement associée à un fardeau économique important au Canada. En 2001, on estimait que les coûts de santé associés à l'obésité totalisaient 4,3 milliards de dollars dont 1,6 milliard en coûts directs et 2,7 milliards en coûts indirects (20). Aux Etats-Unis, la situation est encore pire, l'obésité entraîne chaque année 300 000 décès et 117 milliards en coûts de santé directs et indirects.

1.4 Solutions et traitements

Devant l'ampleur des conséquences individuelles et collectives associées à l'obésité et au surplus de poids, il importe de trouver des solutions. Cependant, la problématique de l'obésité reflète une situation très complexe, impliquant d'une part la société actuelle offrant un environnement « obésogène » caractérisé par la surabondance d'aliments à haute

densité énergétique et la diminution de l'activité physique et d'autre part, l'individu lui-même, plongé dans cette abondance de choix caractérisant notre société de consommation. Ainsi, la responsabilité quant à cette problématique appartient à tous et chacun. Les décideurs doivent continuer de s'impliquer au niveau des changements environnementaux et sociaux alors que chaque individu doit se sentir responsable d'adopter des habitudes de vie saines pour sa santé. En tant qu'individu, chacun d'entre nous doit être mieux outillé pour adopter un mode de vie sain dans un environnement où la mauvaise alimentation et la sédentarité semblent être les choix les plus disponibles et les plus faciles (21).

Sur une base individuelle, la perte de poids peut prévenir ou traiter en partie plusieurs des complications associées à l'obésité (8;22). La perte de poids est aussi associée à une amélioration du profil lipidique conduisant à une réduction du risque de maladies cardiovasculaires (23;24). La perte de poids a aussi un impact positif sur l'état pro-inflammatoire associé à l'obésité décrit précédemment, en diminuant les taux plasmatiques d'IL-6 et de CRP (25-27). La perte de poids améliore aussi la sensibilité à l'insuline en diminuant ainsi le risque de développer un diabète de type 2 (24;28).

Les thérapies couramment utilisées qui visent la perte de poids par l'induction d'une balance énergétique négative sont nombreuses : médicaments, chirurgies, changements alimentaires divers et inclusion de l'activité physique (24). De plus, il importe que la perte de poids soit maintenue à long terme afin que les changements positifs qu'elle entraîne soient durables. Ainsi, des changements permanents au niveau des habitudes de vie dont l'augmentation de l'activité physique et l'introduction d'habitudes alimentaires saines sont donc proposés afin de traiter l'obésité et ses complications (29), accompagnés ou non d'une médication ou d'une chirurgie. Une alimentation saine est conséquemment un élément clé parmi les traitements proposés pour traiter l'obésité : la substitution d'aliments à haute densité énergétique par une alimentation riche en fruits et légumes, faible en gras et riche en fibres, est actuellement recommandée (30).

2. Endocrinologie de l'obésité

2.1 Le tissu adipeux : organe endocrine

Dans la première partie, nous avons soulevé l'importance du tissu adipeux viscéral dans la problématique de l'obésité, puisque l'accumulation de ce dernier est clairement associée au développement de plusieurs complications. Le tissu adipeux s'accumule au sein de plusieurs compartiments qui peuvent être séparés en 2 catégories générales : le tissu sous-cutané, qui se retrouve directement sous la peau, et le tissu adipeux viscéral (ou intra-abdominal), qui recouvre les viscères et qui est reconnu comme étant le plus néfaste pour la santé (9). Le tissu adipeux dans son ensemble n'est pas simplement un organe de stockage des graisses, il est aussi reconnu comme un organe endocrine (31). En effet, la découverte au milieu des années 1990 de la leptine, qui est sécrétée par le tissu adipeux, a clairement démontré que le tissu adipeux pouvait agir comme un organe sécrétant une hormone empruntant la circulation pour atteindre un tissu cible distal (dans ce cas-ci, le cerveau) (32). Depuis ce temps, il ne fait aucun doute que le tissu adipeux sécrète une grande variété de facteurs hormonaux, comme de nombreuses cytokines, telles que le TNF- α , la CRP, l'IL-6, l'adiponectine et la résistine, qui sont toutes importantes dans la régulation locale et systémique du métabolisme (33;34).

Tel que mentionné précédemment, l'obésité est associée à un profil inflammatoire modifié, se caractérisant par une élévation plasmatique de la plupart de ces cytokines (9). L'origine principale de cette inflammation systémique caractérisant l'obésité est le tissu adipeux (35), ce phénomène s'expliquant en partie par une infiltration accrue des macrophages et autres cellules inflammatoires au sein du tissu (36;37) (Figure 2).

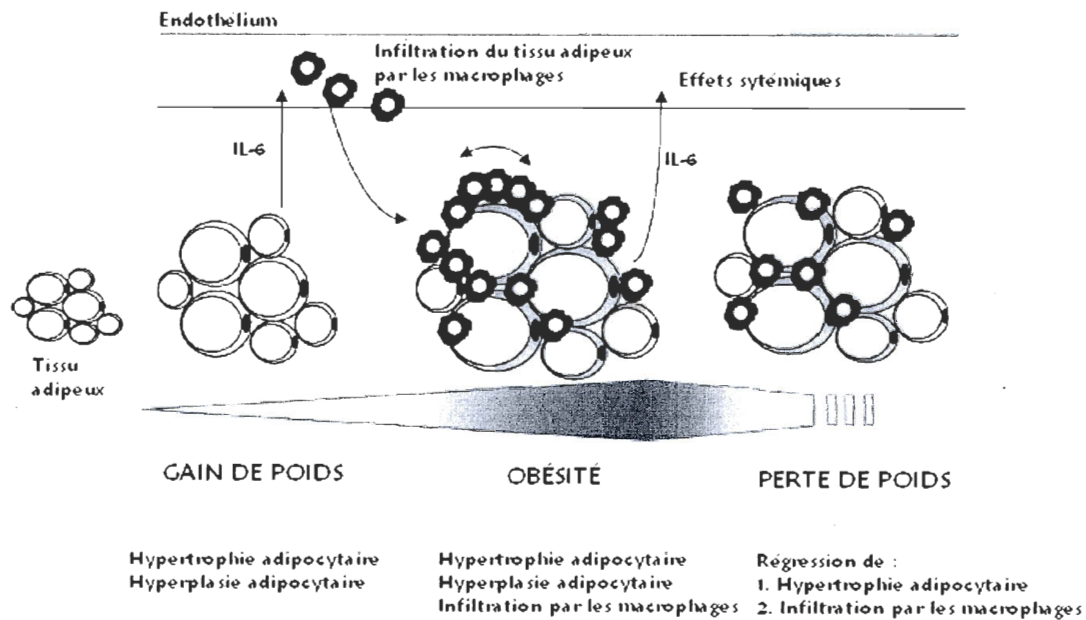


Figure 2 - Infiltration du tissu adipeux par les macrophages, tiré de Canello et al. 2006 (37)

La cellule principale du tissu adipeux, l'adipocyte, sécrète ces facteurs inflammatoires, mais ce sont les macrophages et autres cellules inflammatoires du tissu adipeux comme les fibroblastes, les leucocytes et les mastocytes qui sont majoritairement responsables de la libération de ces cytokines inflammatoires et de l'élévation plasmatique observée dans les cas d'obésité (35-37). Des niveaux plasmatiques plus élevés d'IL-6 ont donc été associés à un indice de masse corporelle (IMC) et de tour de taille plus élevés, à une accumulation accrue de graisse viscérale ainsi qu'à des niveaux plus élevés de triglycérides, d'acides gras libres et d'insuline plasmatiques (38-40), le tout se caractérisant par un profil métabolique clairement détérioré. L'obésité a aussi été associée à des niveaux plus élevés de CRP (41). Inversement, la perte de poids semble être associée à la réduction de l'infiltration des macrophages dans le tissu adipeux et à une diminution des taux circulants d'IL-6 et de CRP (42-44).

2.1.1 Tissu adipeux viscéral et sous-cutané, interleukine-6 et lipolyse

L'IL-6 est une cytokine inflammatoire qui joue d'importants rôles dans la régulation du système immunitaire, de l'inflammation et de l'hématopoïèse (45). L'IL-6 est sécrétée par plusieurs entités : les muscles, les cellules impliquées dans le système immunitaire et le

tissu adipeux (46). Cependant, des niveaux plasmatiques trop élevés d'IL-6 sont associés à un état pro-inflammatoire, souvent observé chez les individus obèses ou avec un surpoids, qui est lui-même associé à un profil métabolique détérioré. Le tissu adipeux libère le tiers de l'IL-6 que l'on retrouve en circulation (47;48). Il a aussi été démontré que plus la masse adipeuse augmente, plus les concentrations plasmatiques d'IL-6 sont élevées (49). Ainsi, le tissu adipeux détient un rôle important dans la libération de cette cytokine et le risque métabolique qui lui est associé. Dans le tissu adipeux, 90% de la sécrétion de l'IL-6 est attribuable à des cellules autres que l'adipocyte, tels les macrophages, les fibroblastes, les leucocytes et les mastocytes (50;51).

Il existe également une différence de libération entre les deux dépôts de tissu adipeux abdominal : le tissu adipeux viscéral libère plus d'IL-6 que son homologue sous-cutané (52). L'IL-6 pourrait également avoir un impact sur la lipolyse dans les adipocytes du tissu viscéral (adipocytes intra-abdominaux) et du tissu sous-cutané (adipocytes sous-cutanés). En effet, certaines études ont démontré que l'IL-6 pouvait stimuler la lipolyse (53-56). La lipolyse, qui s'effectue dans l'adipocyte, se décrit comme la réaction de dégradation des triglycérides en acides gras et en glycérol afin de fournir de l'énergie à l'organisme. La lipolyse est principalement activée par des agonistes des récepteurs beta-adrénergiques comme l'isoprotérénol (57) et peut être inhibée par d'autres agents tels que l'insuline et le palmitate par exemple (58). Il a été démontré que la lipolyse stimulée par l'isoprotérénol était plus élevée dans les adipocytes du tissu adipeux viscéral (57) et que ce même dépôt sécrète plus d'IL-6 (59). Ainsi, nous avons émis l'hypothèse que des niveaux plus élevés d'IL-6 seraient associés à une lipolyse plus élevée dans les adipocytes intra-abdominaux que dans les adipocytes sous-cutanés. En fait, l'IL-6 pourrait réguler la lipolyse en modulant l'action des agonistes des récepteurs beta-adrénergiques, possiblement via des mécanismes post-récepteurs. C'est ce que nous avons voulu explorer plus en profondeur en étudiant la relation entre les niveaux circulants d'IL-6 et la lipolyse dans les adipocytes du tissu adipeux sous-cutané et viscéral chez la femme. Ces travaux feront l'objet du premier chapitre du présent mémoire.

2.2 Androgènes et globuline de liaison des stéroïdes sexuels (SHBG)

2.2.1 Définition, rôles et structures chimiques des androgènes et de la SHBG

Dans la première partie du mémoire, l'importance des hormones sexuelles dans le patron de distribution des graisses a été soulevée. Voyons comment les androgènes sont impliqués. Ceux-ci représentent une catégorie d'hormones sexuelles très importante. Ils peuvent être divisés en deux groupes selon leur site de production : ceux produits par le cortex surrénalien (DHEA et DHEA-S) et ceux synthétisés par les gonades (testostérone et dihydrotestostérone). La testostérone (Figure 3), sécrétée par les testicules, est le principal androgène naturel et sa forme active est la dihydrotestostérone (DHT) (60). Cette hormone et ses dérivées stimulent le développement et le maintien du système reproducteur masculin, soutiennent l'apparition des caractères sexuels secondaires masculins (ex : poils, barbe, etc.) et déterminent si le fœtus deviendra un individu mâle ou femelle (61). Chez la femme, l'ovaire sécrète aussi ces stéroïdes, mais en très faible quantité (61). La DHEA-S, sécrétée par le cortex surrénalien, constitue donc la plus importante source d'androgène chez la femme (Figure 4). La DHEA-S est constituée d'un noyau androstane (60). Cette hormone et surtout ses dérivés androgéniques, c'est-à-dire la testostérone et la DHT, contribuent au maintien de la libido chez la femme (61).

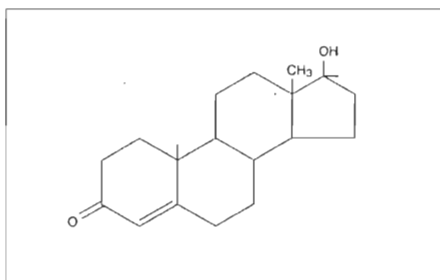


Figure 3 - Structure de la testostérone

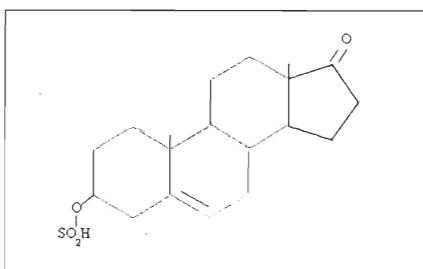


Figure 4 - Structure de la DHEA-S

Sécritée par le foie, la SHBG est une protéine très importante puisqu'elle agit en tant que transporteur pour les hormones sexuelles (62). C'est la testostérone qui possède le plus d'affinité pour la SHBG. Environ 65% de la testostérone plasmatique est liée à la SHBG (63). Une autre proportion de la testostérone est liée à l'albumine (environ 33%) alors que la testostérone libre, considérée comme la testostérone active, représente 2% de la testostérone totale (64). Ainsi la SHBG détermine en grande partie la biodisponibilité de la testostérone et par le fait même, son action. Le même phénomène s'observe pour les autres hormones sexuelles, comme pour l'oestradiol par exemple (65).

2.2.2 Androgènes, distribution des graisses et profil métabolique chez l'homme et la femme

En plus d'exercer des fonctions très importantes sur la reproduction masculine, les androgènes sont également reliés à la distribution des graisses, tel que mentionné précédemment. En effet, puisque la distribution des graisses est différente selon le sexe, cela suggère l'importance de l'influence des hormones sexuelles. De façon intéressante, la testostérone chez les transsexuelles (femmes devenues hommes) diminue l'accumulation de graisse sous-cutanée et augmente légèrement l'accumulation de graisse viscérale (66). Ainsi, le patron de distribution des graisses semble suivre celui du sexe vers lequel le transsexuel se dirige.

Chez l'homme, des concentrations plasmatiques d'androgènes plus faibles seraient associées à l'obésité viscérale (67;68). Une étude renforce cette affirmation en montrant que chez l'homme présentant des concentrations d'androgènes plus faibles, l'administration

de testostérone diminue l'accumulation de graisse abdominale (69). En bref, la majorité des études observationnelles démontrent clairement que l'obésité abdominale chez l'homme est associée à des niveaux d'androgènes plus faibles (70).

Chez la femme, on croit généralement que des niveaux plus élevés d'androgènes sont associés à une obésité abdominale. Cette croyance s'appuie sur une condition particulière, nommée syndrome des ovaires polykystiques. Ce syndrome qui peut causer l'infertilité chez la femme, se caractérise par une condition hyperandrogénique, hyperinsulinémique en concomitance avec une obésité abdominale (71). Cependant, des associations contradictoires entre les niveaux d'androgènes et l'obésité ont été observés dans les études, rendant la situation très complexe (72). Ainsi, il est difficile d'associer clairement des niveaux d'androgènes plus élevés à l'obésité viscérale chez la femme sans manifestation clinique ou hormonale du syndrome des ovaires polykystiques.

2.2.3 SHBG et profil métabolique chez l'homme et la femme

À la fois chez l'homme et la femme, les niveaux plasmatiques de SHBG sont clairement associés aux complications métaboliques associées à l'obésité et l'accumulation de tissu adipeux. Chez la femme, de faibles niveaux plasmatiques de SHBG ont été associés avec une accumulation de graisse abdominale, une hyperinsulinémie, une intolérance au glucose et un risque accru de développer des maladies cardiovasculaires et un diabète de type 2 (6). La même situation est observée chez les hommes : la majorité des études associe des niveaux plasmatiques réduits de SHBG à des complications métaboliques (73). Inversement, il est clairement démontré que la perte de poids est associée avec une augmentation des niveaux de SHBG chez l'homme et chez la femme (74).

2.2.4 Androgènes, SHBG et alimentation chez l'homme et la femme

Plusieurs études ont suggéré que l'alimentation avait un impact sur le statut métabolique et les niveaux circulants de SHBG et d'androgènes (75-77). Ces effets pourraient être modulés par certains nutriments ou par des changements au niveau du poids ou de la sensibilité à l'insuline. La littérature ne nous permettait pas à l'heure actuelle de mesurer si la diète avait un impact direct sur les niveaux circulants d'androgènes et de SHBG, c'est

pour cette raison que nous avons tenté d'approfondir la question en effectuant une revue de littérature sur le sujet. Celle-ci sera présentée au chapitre 2.

2.3 Œstrogènes et phytoestrogènes

2.3.1 Définition, rôles et structures chimiques des œstrogènes

Une autre catégorie importante d'hormones sexuelles regroupe les œstrogènes. Ces stéroïdes exercent plusieurs fonctions importantes. Tout d'abord, ils agissent sur la croissance en période de puberté, sur le développement de certains systèmes (surtout le système reproducteur) et sur la différenciation sexuelle (61). Dans l'utérus, ils stimulent la croissance des cellules (61). Les œstrogènes interviennent également dans le développement osseux, le développement des caractères sexuels secondaires et la maturation des follicules ovariens (61). Tout comme les androgènes, les œstrogènes sont synthétisés à partir du cholestérol se trouvant dans le plasma sanguin (60). L'œstradiol est le principal œstrogène, composé de trois cycles hexamériques et d'un cycle pentamérique regroupés pour former un noyau stérol, constitué de 18 carbones (60) (Figure 5).

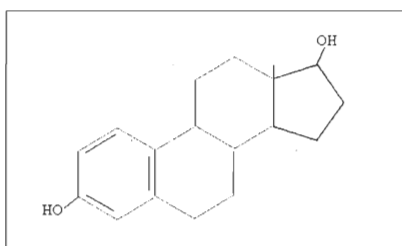


Figure 5 - Structure de l'œstradiol

Chez l'homme, les testicules, les glandes surrénales et les tissus périphériques contribuent tous trois à la production des œstrogènes alors que, chez la femme, ces hormones sont produites de façon prédominante par les ovaires tandis que de petites quantités sont synthétisées dans les tissus périphériques.

2.3.2 Ménopause, changements hormonaux, symptômes associés, hormonothérapie et thérapies alternatives

Tel que mentionné ci-haut, les œstrogènes sont très importants dans la reproduction féminine. Ils sont modifiés par la ménopause, ce qui met fin à la période reproductive de la femme. Selon l'Organisation Mondiale de la Santé (78), la ménopause se définit comme la cessation permanente des menstruations résultant d'une diminution de l'activité ovarienne. La péri-ménopause inclut la période qui précède immédiatement la ménopause et au moins la première année suivant la ménopause alors que la post-ménopause est décrite comme la période suivant la fin de la période menstruelle (Figure 6).

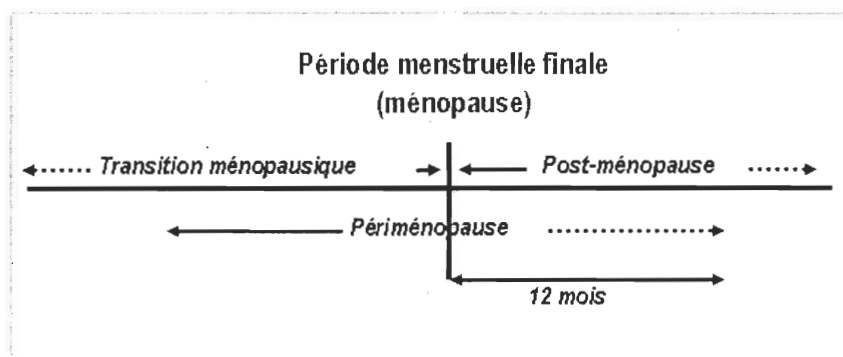


Figure 6 - Définition de la ménopause, tiré de l'Organisation Mondiale de la Santé (78)

Pendant plusieurs années, on croyait que la diminution de l'œstradiol était le premier signal de la transition aux cycles menstruels irréguliers. Cependant, les niveaux d'œstrogènes dans l'urine seraient maintenus durant tous les cycles menstruels de la péri-ménopause. Cela démontre clairement que les ovaires peuvent encore produire des œstrogènes (79). On observerait également un changement important dans la sécrétion des gonadotrophines bien avant le début de la péri-ménopause. Les gonadotrophines comprennent l'hormone folliculostimulante (FSH) ainsi que l'hormone lutéinisante (LH), des glycoprotéines exerçant un effet régulateur très important sur les gonades mâles et femelles, c'est-à-dire les ovaires et les testicules. En effet, la sécrétion pulsatile de LH augmenterait au jour 10 du cycle menstruel chez les femmes ayant encore des cycles menstruels réguliers et ce, avant même qu'on observe des changements au niveau de la sécrétion d'œstradiol et de FSH (79). Un autre changement observé à la ménopause serait l'augmentation de la sécrétion de FSH.

Ces augmentations chroniques dans la sécrétion de LH et de FSH seraient dues à la perte de rétroaction négative par ces hormones.

Il est difficile d'identifier un seul des phénomènes décrits précédemment comme étant responsable de la ménopause. Il s'agit possiblement d'une interaction entre ceux-ci : la baisse progressive d'œstradiol, la résistance folliculaire et les changements de pulsatilité de FSH et de LH (Figure 7). En fait, il n'y a aucun marqueur connu autre qu'une certaine irrégularité menstruelle apparaissant dans la quarantaine (ou avant) pour indiquer l'entrée en péri-ménopause (80).

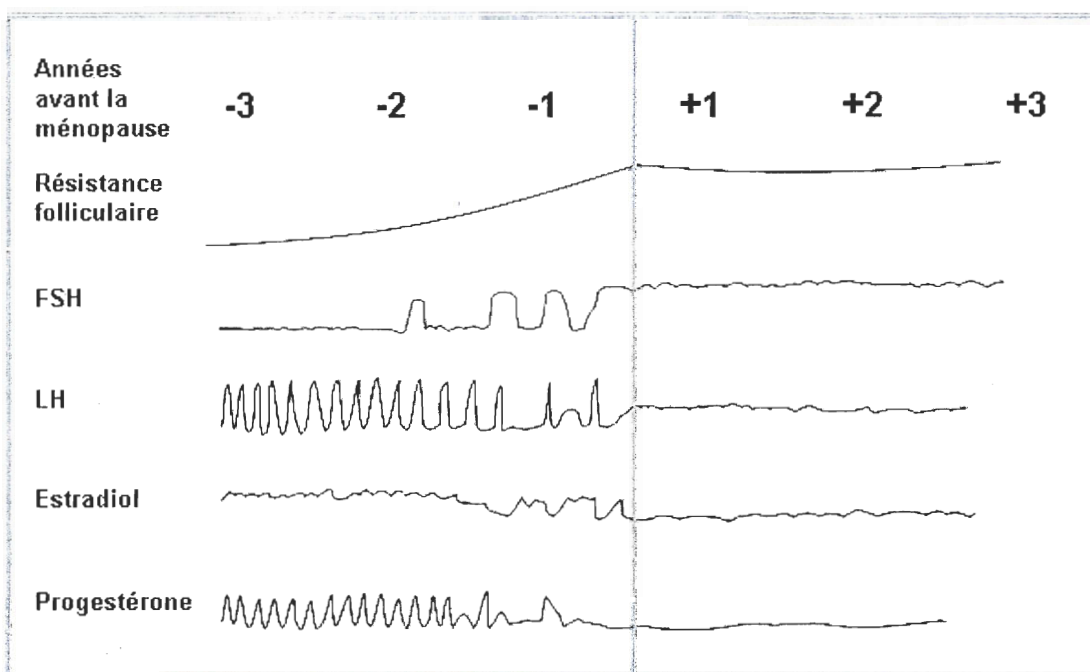


Figure 7 - Changements hormonaux associés à la ménopause, tiré de l'Organisation Mondiale de la Santé (78)

Dans la période de la post-ménopause, des changements se produisent au niveau de la source et de la nature des œstrogènes circulants. D'une part, les ovaires cessent de sécréter des œstrogènes. Cependant, de faibles niveaux d'œstradiol ne sont atteints que plusieurs mois après la ménopause. L'œstrogène le plus important circulant dans le sang après la ménopause est l'œstrone. Cet œstrogène provient de la transformation de précurseurs d'androgènes, comme l'androstènedione. D'autre part, les ovaires continuent de produire

les stéroïdes. En effet, les ovaires sont responsables de 50% de la sécrétion de la testostérone circulante. En fait, le taux de testostérone diminue peu après la ménopause. Globalement, on observe une baisse graduelle des androgènes quelques années après la ménopause (81).

2.3.2 Conséquences à long terme des changements hormonaux liés à la ménopause

Les changements hormonaux associés à la ménopause ont également un impact sur la distribution des graisses chez certaines femmes. La distribution gynoïde et androïde qui différencie la majorité des hommes et des femmes s'observe de façon plus prononcée avant la ménopause. Après la ménopause, le tissu adipeux serait accumulé plus rapidement autour de l'abdomen, principalement au niveau viscéral (82;83) (Figure 8). Ceci pourrait contribuer en partie au risque cardiovasculaire accru chez la femme ménopausée.

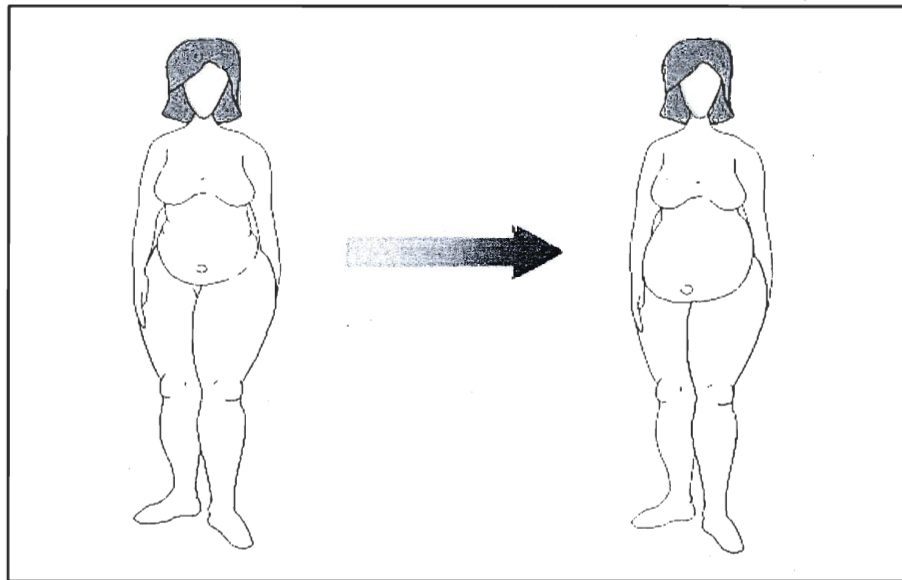


Figure 8 - Redistribition des graisses à la ménopause observée chez certaines femmes

En effet, la baisse des taux d'œstrogènes associée à la ménopause est liée au risque cardiovasculaire : les maladies cardiovasculaires demeurent la principale cause de mortalité

chez les femmes après la ménopause (84). En fait, il est clairement documenté qu'il existe une différence importante en ce qui concerne le risque cardiovasculaire entre les femmes et les hommes, particulièrement avant la ménopause, ce qui suggère un rôle protectif des œstrogènes (85-87). La diminution de la fonction ovarienne observée à la ménopause pourrait être associée à une augmentation du cholestérol LDL et à une diminution du cholestérol HDL; ces changements au niveau des lipoprotéines, directement reliés à une augmentation du risque cardiovasculaire, sont observables au moins deux ans avant la ménopause (78). Les habitudes de vie qui peuvent changer vers l'âge de 50 ans ainsi que la redistribution du tissu adipeux sont également des facteurs contribuant à l'augmentation du risque cardiovasculaire après la ménopause.

2.3.5 Conséquences à court terme des changements hormonaux liés à la ménopause, hormonothérapie et thérapies alternatives

En plus du risque métabolique accru qui est associé à la diminution des œstrogènes, certains autres symptômes, ceux-ci à court terme, sont aussi clairement liés à la transition ménopausique : l'instabilité vasomotrice, conduisant aux bouffées de chaleur et l'atrophie urogénitale, conduisant à la sécheresse vaginale (88). D'autres symptômes communément rapportés comme les changements d'humeur, les troubles du sommeil, l'incontinence urinaire, les changements cognitifs ainsi que la diminution de la libido seraient secondaires aux deux principaux symptômes présentés ci-haut ou dus à d'autres causes (88). Ainsi, un certain nombre de femmes cherchent une thérapie leur permettant de soulager leurs symptômes. L'hormonothérapie a été suggérée comme étant efficace dans le soulagement des bouffées de chaleurs, entre autres (78;88). L'atrophie urogénitale, autre symptôme spécifique de la ménopause, peut aussi être de beaucoup améliorée avec l'hormonothérapie. En effet, les œstrogènes sont efficaces pour réduire l'épaississement et les sécrétions de la muqueuse vaginale (78). Cependant, en raison de nombreuses controverses observées depuis 1960 et jusqu'à tout récemment au sujet de l'hormonothérapie, beaucoup de femmes hésitent à entreprendre un traitement. Avant les années 2000, la majorité des études observationnelles démontraient des effets cardio-protecteurs du remplacement hormonal. En effet, on affirmait plus précisément que les œstrogènes avaient des effets positifs sur le LDL cholestérol, la synthèse d'apolipoprotéine A, la synthèse des particules VLDL,

l'inhibition de la lipase hépatique, la balance énergétique, la distribution des graisses, la sensibilité à l'insuline, la vasodilatation et la vasoconstriction, la coagulation et la fibrinolyse et des effets antioxydants (89;90).

Par contre, après 2000, deux grandes études randomisées ne démontrant aucun effet protecteur ou pire encore, des effets néfastes de la thérapie hormonale sur les maladies cardiovasculaires ont été publiées. Premièrement, l'étude HERS II, effectuée auprès de 2321 femmes âgées en moyenne de 67 ans, avait pour objectif de déterminer quel était le risque d'accidents cardiovasculaires observé chez les femmes ménopausées déjà à risque élevé de maladies cardiovasculaires qui prenaient une thérapie combinée orale (œstrogènes conjugués et progestine) (91). Suite à un suivi sur une période de 6,8 ans, aucune diminution du taux d'accidents cardiovasculaires n'a été observée chez les femmes prenant une hormonothérapie comparativement à celles prenant le placebo. On conclut donc qu'une thérapie de remplacement hormonal ne réduisait pas les accidents cardiovasculaires chez les femmes à risque de maladies cardiovasculaires. Selon cette étude, qui était la plus grande effectuée à l'époque, on suggérait que les femmes à risques élevés de maladies cardiovasculaires ne devraient pas utiliser l'hormonothérapie combinée pour prévenir les événements cardiovasculaires. La deuxième étude, Women's Health Initiative (WHI), a été effectuée auprès de plus de 25 000 femmes, âgées entre 50 et 79 ans (92). Cette grande étude contrôlée et randomisée examinait, dans différents groupes de femmes, les bénéfices et les risques de la thérapie hormonale orale combinée (œstrogènes conjugués et progestine) chez les femmes ménopausées. L'étude fut arrêtée prématurément, puisqu'un risque plus élevé d'accidents cardiovasculaires a été observé chez ces femmes.

Il y a de cela seulement quelques années, on disait donc qu'une combinaison de bonnes habitudes de vie et d'hormonothérapie réduisait le risque de maladies cardiovasculaires. Cependant, les études WHI et HERS II ont démontré une augmentation du risque cardiovasculaire, ce qui a contribué à une sévère diminution des prescriptions d'hormonothérapie (93). Pourtant, ces résultats ne sont pas si négatifs quant à l'utilisation de l'hormonothérapie dans la population générale. En effet, plusieurs facteurs comme l'âge des femmes, le type d'hormonothérapie et la voie d'administration de l'hormonothérapie pourraient expliquer le risque augmenté d'accidents cardiovasculaires associés à la prise

d'hormonothérapie dans ces deux grandes études. Il en reste néanmoins que depuis quelques années, bon nombre de femmes se sont de plus en plus tournées vers des solutions alternatives pour le traitement des problèmes et symptômes associés à la ménopause, la récente controverse sur la thérapie hormonale amplifiant ce mouvement. Plusieurs alternatives à l'hormonothérapie ont donc été proposées, les phytoestrogènes représentant une option possiblement intéressante.

2.3.4 Définition, principales classes et structures chimiques des phytoestrogènes

Un intérêt particulier s'est donc manifesté envers les phytoestrogènes en raison de leurs effets possiblement positifs sur le soulagement des symptômes associés à la ménopause (94). De plus, les phytoestrogènes pourraient exercer plusieurs autres bénéfices intéressants sur la santé humaine. Ces composés non-stéroïdiens sont présents en quantités variables dans les végétaux et partagent des structures apparentées à celles des œstrogènes. Ils possèdent des propriétés qui peuvent être qualifiées d'œstrogéniques ou d'anti-œstrogéniques (95). Les phytoestrogènes peuvent être classés en deux groupes : d'une part les isoflavones et les coumestanes et d'autres part, les lignanes. Les isoflavones (et les coumestanes) ont des structures qui s'apparentent à celle de l'œstrogène naturel, l'œstradiol (95). Les deux molécules les plus importantes de ce groupe, en termes de concentration et de potentiel d'action après absorption sont la daidzéine et la génistéine (95) (Figure 9). La glycitéine et le coumestrol font aussi partie de cette classe. On retrouve ces substances dans les aliments sous forme de glycosides.

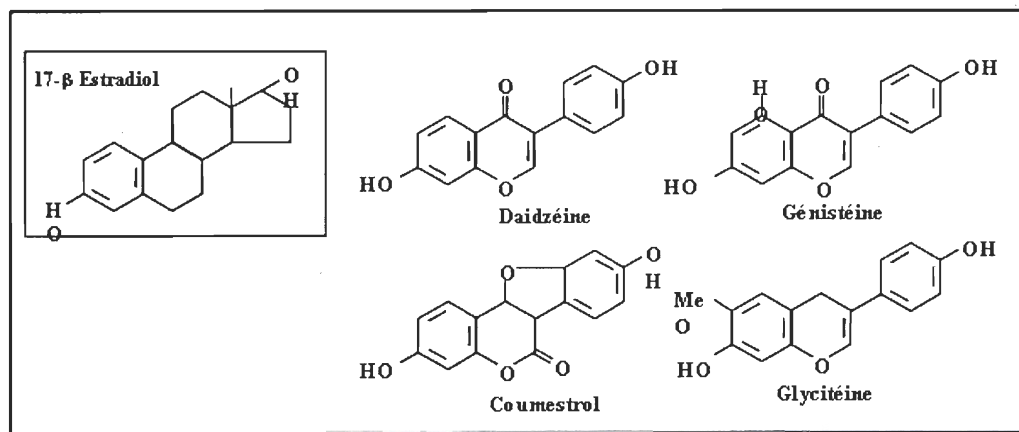


Figure 9 - Isoflavones et coumestanes : parenté avec l'œstradiol

Les lignanes, pour leur part, ont une structure qui s'apparente à la molécule de tamoxifène (Figure 10). Cette molécule est un modulateur sélectif des récepteurs d'oestrogènes (SERM), c'est-à-dire une molécule qui possède à la fois des propriétés oestrogéniques et anti-oestrogéniques en fonction des tissus dans lesquels elle se retrouve (96). Les lignanes regroupent entre autres quatre molécules importantes que l'on retrouve sous forme de glycosides dans les aliments : le matairésinol, le secoisolaricirésinol, le pinorésinol et le laricirésinol (97).

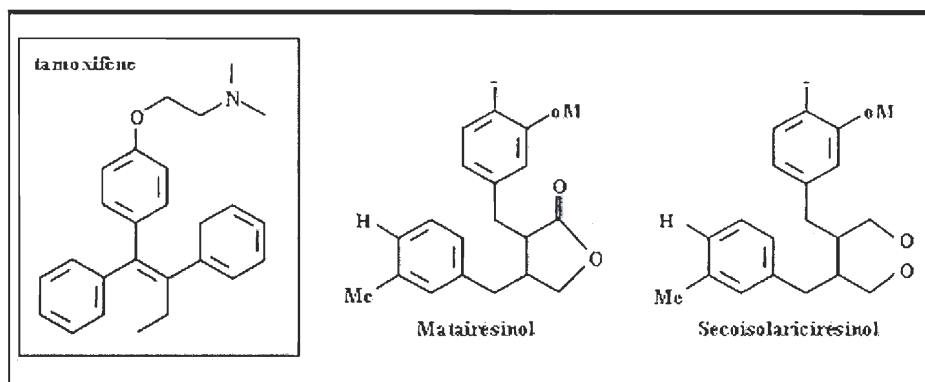


Figure 10 - Lignanes : parenté avec le tamoxifène

2.3.5 Métabolisme des phytoestrogènes

Tel que mentionné précédemment, les phytoestrogènes se retrouvent sous forme de glycosides dans les aliments consommés. Il est impossible pour l'individu d'absorber ces substances lorsqu'elles sont sous cette forme, en raison de leur nature hydrophobe et de leur poids moléculaire trop élevé (98). L'activité β -glycosidase des bactéries intestinales permet la conversion de ces molécules alimentaires de la forme glycoside à la forme aglycone (98). De cette manière, les phytoestrogènes alimentaires pourront être absorbés et ainsi gagner la circulation sanguine pour exercer leurs effets biologiques.

Dans le cas des lignanes, les substances alimentaires sous formes glycosides (ex : matairésinol, secoisolaricirésinol, pinorésinol et le laricirésinol) sont transformées en entérolactone (ENL) et en entérodiol (END), qui correspondent aux formes aglycones

biologiquement actives (99) (Figure 11). La mesure de la concentration sanguine en ENL semble indicative de la quantité de lignanes consommées (99).

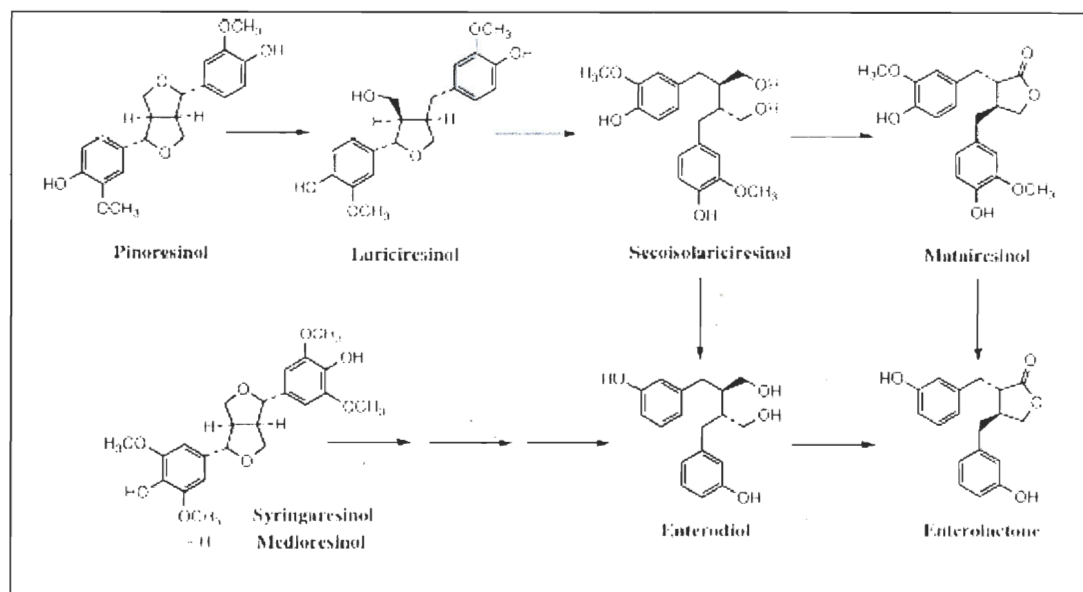


Figure 11 - Métabolisme des lignanes, tiré d'Adlercreutz, 2007 (81)

L'effet biologique des lignanes et des isoflavones dépend donc d'une conversion chimique, qui est, elle-même, soumise à plusieurs facteurs. En effet, une grande variabilité interindividuelle existe dans l'absorption de ces composés. L'utilisation d'antibiotiques, le tabagisme, l'obésité, le contenu en gras de la diète ainsi que la fréquence de défécation, peuvent notamment influencer l'effet biologique des phytoestrogènes alimentaires en modulant la conversion intestinale (99-101).

2.3.6 Sources alimentaires de phytoestrogènes

Les sources alimentaires d'isoflavones et de lignanes sont végétales, tel que présenté dans le **Tableau 1**. La meilleure source de phytoestrogènes, toutes catégories confondues, est la graine de lin (97;99).

Tableau 1 - Principales sources de phytoestrogènes

Aliments	Phytoestrogènes (µg) / 100g d'aliments
Graines de lin	379380,4
Fèves de soya	103920,0
Graines de soya	68730,8
Tofu	27150,1
Tempeh	18307,9
Protéine végétale texturisée	16233,9
Pâte de miso	11197,3
Yogourt de soya	10275
Poudre de protéine de soya	8840,7
Graines de sésame	8008,1
Pain aux graines de lin	7540,6
Substitut de bacon	6033,7
Sauce à base de fèves noires	5330,3
Pain multi grains	4798,7
Lait de soya	2957,2
Beignes	2903,8
Barre de protéines	2723,3
Burger végétarien	1671,5
Soupe au miso	1470,5
Hummus	993,0
Réglisse noire	862,7
Germes de soya	789,6
Ail	603,6
Fèves germées	495,1
Abricots séchés	444,5
Luzerne	441,4
Pistaches	382,5
Dattes séchées	329,5
Graines de tournesol	216,0
Châtaignes	210,2

Tiré de Thompson et al., 2006

La graine de lin contient une importante quantité de lignanes, principalement sous forme de secoisolaricirésinol (97). On retrouve également les lignanes dans les produits céréaliers, les fruits frais et séchés ainsi que dans les légumes, tel que présenté dans le **Tableau 2**. Les sources de lignanes sont également des sources de fibres alimentaires.

Tableau 2 - Principales sources de lignanes

Aliments	Lignanes (μg)/100g d'aliments
Graines de lin	379012,3
Graines de sésame	7997,2
Pain aux graines de lin	7239,3
Pain mutli grains	4785,6
Hummus	979,4
Ail	583,2
Réglisse noire	415,1
Abricots séchés	400,5
Dates séchées	323,6
Fèves de soya	269,2
Graines de tournesol	210,3
Pistaches	198,9
Châtaignes	186,6
Prunes séchées	177,5
Pain de seigle	142,9

Tiré de Thompson et al., 2006

Les meilleures sources d'isoflavones, présentées dans le **Tableau 3**, proviennent du soya et de ses aliments dérivés comme les graines de soya, le tofu et le tempeh (97).

Tableau 3 - Principales sources d'isoflavones

Aliments	Phytoestrogènes (μg)/100g d'aliments
Fèves de soya	103920,0
Graines de soya	68730,8
Tofu	27150,1
Tempeh	18307,9
Protéine végétale texturisée	16233,9
Pâte de miso	11197,3
Yogourt de soya	10275
Poudre de protéine de soya	8840,7
Substitut de bacon	6033,7
Sauce à base de fèves noires	5330,3
Lait de soya	2957,2
Beignes	2903,8
Barre de protéines	2723,3
Hamburger végétarien	1671,5
Soupe de miso	1470,5

Tiré de Thompson et al., 2006

2.3.7 Effets potentiels des phytoestrogènes

Les effets potentiels des phytoestrogènes sont nombreux. En effet, ils pourraient jouer un rôle possiblement bénéfique sur la santé dans les pathologies hormono dépendantes comme le cancer du sein, le cancer de la prostate et les symptômes ménopausiques. De par leurs effets possiblement oestrogéniques, ils pourraient également être bénéfiques pour prévenir les maladies cardiovasculaires et l'ostéoporose. Cependant, il n'est pas facile de tirer des conclusions en regard de la littérature actuelle sur le sujet. En effet, il existe beaucoup de variabilité en ce qui concerne la classe de phytoestrogènes étudiée, la population étudiée, le type d'étude, la durée des études, les doses administrées ainsi que la forme d'administration utilisée. Voici tout de même une brève revue de littérature sur les effets potentiels des phytoestrogènes.

En ce qui concerne le cancer du sein, l'effet des œstrogènes sur la progression de la tumeur mammaire est connu depuis très longtemps. Puisque les structures des phytoestrogènes sont comparables à celles des œstrogènes, on pourrait croire que les phytoestrogènes augmentent également le risque de cancer du sein en stimulant la croissance de la tumeur. Cependant, dans les populations où l'alimentation est riche en phytoestrogènes, on observe des taux plus faibles de cancer du sein (95). Beaucoup d'études *in vitro* montrent que les molécules de génistéine, et moins souvent de daidzéine, peuvent inhiber la croissance des cellules cancéreuses (102). Les phytoestrogènes pourraient dans ce cas agir comme des antioxydants et/ou inhiber la croissance des vaisseaux sanguins nécessaires à l'expansion de la tumeur (102). Les études *in vivo* chez les rats démontrent que l'exposition à la génistéine diminue l'incidence des tumeurs mammaires (95). Chez l'humain, les données cliniques ou épidémiologiques sur la consommation de phytoestrogènes en lien avec le cancer du sein sont peu nombreuses. Une revue de littérature exhaustive suggère qu'une diète riche en isoflavones et en produits céréaliers à grains entiers serait associée à des risques de cancer du sein plus faibles (103). De plus, cette même revue confirme qu'il n'y a aucune preuve claire qu'un apport en phytoestrogènes puisse augmenter le risque de développer un cancer du sein. Un autre article de revue publié en 2003 indique que 13 des 14 études cas-témoins menées auprès de populations asiatique, australienne, européenne et nord-américaine rapportent une réduction du risque du cancer du sein de 15% à 85%

associée à des niveaux élevés de phytoestrogènes (94). Dans une récente analyse publiée en 2006, on compilait 13 études ayant examiné l'association possible entre la consommation de produits de soja et le risque de cancer du sein (102). Globalement, ces études ne semblaient pas montrer de protection significative contre le cancer du sein. En effet, seulement 4 études indiquaient un effet protecteur, et aucune des études n'a montré une réduction statistiquement significative des taux de cancer. En général, les données sur les lignanes nous indiquent que les sources de fibres alimentaires, qui sont aussi des sources de lignanes, pourraient être protectrices quant au risque de cancer du sein (99). En conclusion, l'effet des lignanes et des isoflavones sur le risque du cancer du sein n'est pas clairement démontré. Par contre, les phytoestrogènes ne semblent pas augmenter le risque de ce cancer. La même situation est observée dans le cas du cancer de la prostate : les phytoestrogènes, sous forme de lignanes ou d'isoflavones, pourraient avoir un effet bénéfique dans la prévention et le traitement de ce cancer (99;104). Cependant, d'autres études sont nécessaires afin de mieux identifier les molécules responsables et de traiter le cancer de la prostate avec ces substances (104;105).

Les phytoestrogènes pourraient être également intéressants pour traiter les symptômes associés à la ménopause qui sont attribuables à la chute d'œstrogènes. Plusieurs études se sont intéressées à l'effet des phytoestrogènes sur les bouffées de chaleur et l'atrophie urogénitale. Deux importantes revues de littérature ont étudié la question. Dans la première revue de littérature regroupant 18 études, six suggèrent une réduction dans la fréquence ou dans l'intensité des bouffées de chaleur (94). Dans la majorité des études, l'effet placebo est très important puisqu'une amélioration de l'ordre de 30% est habituellement observée dans ces groupes. Les différences au niveau de la nature des phytoestrogènes utilisés, la dose, la variété individuelle, la population étudiée, la durée de l'étude, et finalement, les instruments de mesures utilisés, rendent la comparaison difficile. En effet, certaines études ont étudié l'impact de la graine de lin, d'autres d'une diète riche en soja par exemple. Une étude récente sur la graine de lin montre clairement que la consommation de 40 grammes de graines de lin par jour réduit les bouffées de chaleur autant que l'hormonothérapie combinée (106). Cependant, si certaines études suggèrent des effets bénéfiques des phytoestrogènes sur les symptômes de la ménopause globalement, ceux-ci ne sont jamais autant réduits qu'avec l'hormonothérapie (94;102). Les résultats sont donc actuellement

partagés et les preuves sont encore insuffisantes pour conclure à une efficacité incontestée des phytoestrogènes (isolat de protéines de soja, alimentation riche en protéine de soja ou en graines de lin) sur les bouffées de chaleur (107).

En ce qui concerne les maladies cardiovasculaires, les effets des phytoestrogènes sont controversés. Dans une récente revue littérature examinant l'effet de la graine de lin sur les maladies cardiovasculaires, les auteurs concluent que la consommation de 15-50 g (de 20 mL à 75 mL) de graines de lin réduit les taux de cholestérol total et de LDL-cholestérol, sans avoir d'effet sur les concentrations plasmatiques de triglycérides et de HDL-cholestérol (108). Cette même revue affirme que l'huile de lin n'a pas le même effet sur le bilan lipidique. Ainsi, selon les auteurs, l'effet positif de la graine de lin sur le bilan lipidique serait attribuable aux lignanes et/ou aux fibres alimentaires, plutôt qu'à son contenu en acides gras polyinsaturés omega-3 (108). En ce qui concerne les isoflavones, *in vitro*, la génistéine inhibe la prolifération de cellules vasculaires, processus indicateur de l'athérosclérose (102). Chez l'humain, une récente méta-analyse confirme un effet potentiellement positif des isoflavones de soja sur le risque cardiovasculaire (109). Cependant, il semble impossible d'attribuer ces résultats uniquement aux isoflavones, puisque la protéine de soja elle-même pourrait jouer un rôle. De plus, les niveaux de lipides sanguins au départ, les différentes formes d'administration des isoflavones de soja et les différentes populations étudiées peuvent aussi entrer en ligne de compte dans l'analyse de ces résultats. Finalement, chez la femme, une étude prospective publiée en 2006 démontre que ni les isoflavones, ni les lignanes ne sont associés à une diminution du risque cardiovasculaire (110). Cette même étude montre par contre qu'un apport élevé en lignanes chez les fumeurs est associé à une diminution du risque cardiovasculaire. Globalement, les études démontrent des effets neutres ou positifs sur le risque cardiovasculaire.

En général, les résultats actuels de la littérature sont globalement neutres ou positifs. Sans être un remède à tous les maux, les phytoestrogènes provenant de l'alimentation ne semblent pas dangereux. Au contraire, leurs effets semblent plutôt favorables à une meilleure santé. Ainsi, l'inclusion de ces substances dans l'alimentation quotidienne semble

potentiellement intéressante. Par opposition, l'innocuité de suppléments de phytoestrogènes semble demeurer incertaine.

2.3.8 Lignanes, obésité et sensibilité à l'insuline.

Peu d'études ont examiné l'effet des lignanes sur le degré d'obésité et la sensibilité à l'insuline. Tel que mentionné précédemment, c'est plutôt l'impact des phytoestrogènes, et particulièrement celui de la graine de lin sur le risque cardiovasculaire qui a été examiné. Quelques études se sont tout de même intéressées à la relation entre une alimentation riche en lignanes et l'obésité. Une étude effectuée auprès de 4660 hommes et femmes a rapporté que les individus ayant des apports plus élevés en lignanes avaient un IMC plus faible (111). Une autre étude a observé la même relation : les concentrations plasmatiques d'ENL, métabolite actif des lignanes, diminuaient de 6,2% à chaque unité d'augmentation d'IMC (112). Finalement, une autre étude confirme ces résultats en démontrant que les femmes avec un IMC normal (entre 20 et 25) avaient des concentrations plasmatiques plus élevées d'ENL comparativement aux femmes obèses (113). Ces études ne montrent peut-être pas nécessairement un effet direct de l'ENL sur la balance énergétique mais possiblement l'impact d'une alimentation riche en fruits, légumes, produits céréaliers à grains entiers et faible en aliments de haute densité énergétique.

Quelques autres études se sont intéressées à la consommation de graines de lin en relation avec la sensibilité à l'insuline, le plus souvent de manière non-spécifique. Une étude d'intervention visant à mesurer l'effet d'une diète riche en lignanes chez les diabétiques de type 2 pendant une période de 12 semaines montre que les lignanes améliorent le contrôle glycémique. Cependant, cette étude ne montre pas d'effet significatif de la consommation de graines de lin sur la glycémie à jeun, les concentrations d'insuline et la résistance à l'insuline (114). Une autre étude montre que chez des femmes en santé, la consommation de 50 grammes (75 mL) de graines de lin par jour (sous forme de graines ou de farine) sur une période de 4 semaines diminue de 27% les niveaux de glucose postprandial (115). Une autre étude du même type associe la prise de 40 grammes de graines de lin (60 mL) (sous forme de graines moulues et de pain) sur une période de deux mois à des taux abaissés d'insuline et de glucose à jeun chez 25 femmes atteintes d'une dyslipidémie (106).

Inversement, une autre étude du même groupe nous montre que la même quantité de graines de lin prise quotidiennement sur une période de 12 mois n'a aucun effet sur l'homéostasie glucidique (106). Finalement, une étude épidémiologique associe des niveaux plus faibles d'insuline à jeun à une alimentation plus riche en lignanes (116).

D'autres facteurs alimentaires pourraient avoir un impact positif sur la sensibilité à l'insuline. En effet, la protéine de poisson, plus particulièrement la protéine de morue, aurait un effet positif sur la sensibilité à l'insuline (117). Les fibres alimentaires pourraient également faire baisser la glycémie postprandiale et avoir un effet sur la sensibilité à l'insuline (118). Puisque les aliments riches en lignanes sont également riches en fibres alimentaires, il devient très pertinent d'étudier l'impact d'une diète riche en lignanes sur la sensibilité à l'insuline.

En bref, il semble qu'une diète riche en lignanes (principalement sous forme de graines de lin), qui est tout aussi riche en fibres, en produits céréaliers à grains entiers, en légumes et en fruits, serait associée à une diminution du risque de certaines complications liées à l'obésité (99). Puisque l'effet des lignanes sur le profil métabolique semble généralement positif, nous nous y sommes intéressé davantage. Nous avons donc voulu comparer le profil métabolique de femmes post-ménopausées consommant des quantités variables de lignanes. Pour la première fois jusqu'ici, nous avons investigué la relation entre l'apport alimentaire en lignanes mesuré via des journaux alimentaires de 3 jours, les concentrations plasmatiques d'ENL mesurées par immunofluorométrie et les mesures détaillées du profil métabolique incluant un clamp hyperinsulinémique-glycémique, des mesures de DEXA et de tomographie axiale. C'est ce qui sera décrit plus en profondeur au chapitre 3 de ce présent mémoire.

En résumé, l'obésité entraîne son lot de conséquences sur la santé des individus touchés par ses complications métaboliques. Ainsi, il est important de comprendre l'endocrinologie de l'obésité dans son ensemble en étudiant d'une part l'implication des hormones sexuelles dans la répartition des graisses et d'autre part, l'implication hormonale des cytokines inflammatoires augmentées ou diminuées chez les individus obèses. Par la suite, il devient

intéressant d'étudier parallèlement le rôle de la nutrition. Comment l'alimentation peut-elle influencer les niveaux d'androgènes et de globuline de liaison des stéroïdes sexuels? Comment une diète riche en lignanes peut-elle influencer le profil métabolique? C'est ce qui sera discuté dans les prochains chapitres du présent mémoire.

3. Objectifs et hypothèses

Il convient tout d'abord de présenter ci-dessous les objectifs et les hypothèses de ce présent mémoire selon les différents chapitres qui suivront.

Chapitre 1 : Nous avons tout d'abord voulu examiner la relation entre les niveaux plasmatiques d'IL-6 et la lipolyse dans les adipocytes de femmes en santé. Pour cette étude, nous avons comme objectif d'examiner l'association entre les niveaux plasmatiques d'IL-6, les mesures d'adiposité et le métabolisme de la cellule adipeuse incluant particulièrement la lipolyse stimulée par les agonistes des récepteurs bêta-adrénergiques. Nous avons posé l'hypothèse que des niveaux plus élevés d'IL-6 en circulation seraient associés avec une élévation de la lipolyse stimulée par l'isoprotérénol et ce, particulièrement dans les adipocytes intra-abdominaux.

Chapitre 2 : Nous avons également voulu examiner plus en profondeur l'impact de l'alimentation sur le métabolisme des hormones sexuelles en réalisant une revue de littérature sur le sujet. Après avoir résumé les études ayant examiné l'impact de l'alimentation sur les niveaux circulants d'androgènes et de SHBG, nous avons pour objectif de clarifier si l'effet de la composition de la diète sur les niveaux d'androgènes et de SHBG était direct ou s'il était modulé par des changements aux niveaux des mesures d'adiposité et/ou d'insulinémie. Nous voulions vérifier l'hypothèse que des changements au niveau de la masse adipeuse (et/ou de la sensibilité à l'insuline) induits par l'alimentation auraient des effets plus importants sur les concentrations plasmatiques d'androgènes et de SHBG que la composition de l'alimentation elle-même.

Chapitre 3 : Nous avons finalement voulu examiner l'impact d'une alimentation riche en phytoestrogènes sur le profil métabolique de femmes post-ménopausées en santé. Pour ce

faire, nous avons comme objectif de caractériser le profil métabolique de femmes consommant des quantités variables de lignanes. Nous avons formulé l'hypothèse que les femmes ayant les apports les plus élevés en lignanes auraient des concentrations plasmatiques élevées d'ENL, ce qui se caractériseraient par des mesures d'adiposité plus faibles ainsi qu'une meilleure sensibilité à l'insuline.

Chapitre 1 : Niveaux circulants d'interleukine-6 en relation avec la lipolyse stimulée par l'isoprotérénol dans les adipocytes intra-abdominaux chez la femme.

*Article publié dans la revue **Obesity**.*

Circulating IL-6 concentrations and abdominal adipocyte isoproterenol-stimulated lipolysis in women. *Obesity* (Silver Spring). 2008 Jul;16(7):1487-92.

Résumé

L'objectif de cette étude est de présenter l'association entre les niveaux circulants d'IL-6 et le métabolisme de l'adipocyte chez la femme. Pour ce faire, des biopsies de tissu adipeux viscéral et sous-cutané ont été obtenues lors de chirurgies gynécologiques chez 48 femmes en santé (âge : 47 ± 5 ans, IMC : $26,9 \pm 5,3$ kg/m²). Le pourcentage de masse grasse (DEXA), les surfaces de tissu adipeux (tomographie axiale), la lipolyse, l'activité de lipoprotéine lipase et les niveaux circulants d'IL-6 ont été mesurés. Les concentrations plasmatiques d'IL-6 étaient positivement corrélées avec la masse grasse totale ($r=0.32$, $p<0,05$), les surfaces de tissu adipeux sous-cutané ($r=0.35$, $p<0.05$) et viscéral ($r=0.20$, $p<0.07$) ainsi qu'avec le diamètre adipocytaire sous-cutané ($r=0.30$, $p<0.05$). Les concentrations plasmatiques d'IL-6 étaient positivement corrélées avec la lipolyse stimulée par l'isoprotérénol (10^{-5} to 10^{-8} M) dans les adipocytes sous-cutanés ($0.31 \leq r \leq 0.65$, $p<0.05$) et intra-abdominaux ($0.36 \leq r \leq 0.40$, $p<0.02$). Pour une même masse grasse, un sous-groupe de femmes avec des concentrations plasmatiques élevées d'IL-6 ($n=10$) a été comparé avec un sous-groupe de femmes avec de faibles concentrations plasmatiques d'IL-6 ($n=10$). La lipolyse stimulée par l'isoprotérénol dans les adipocytes intra-abdominaux (10^{-5} to 10^{-8} M) était plus élevée dans le sous-groupe de femmes ayant les concentrations plasmatiques d'IL-6 les plus élevées ($p<0.07$). Ces résultats suggèrent que chez la femme, des niveaux plus élevés d'IL-6 sont associés avec une lipolyse (stimulée par l'isoprotérénol) plus élevée, particulièrement dans les adipocytes intra-abdominaux.

Circulating IL-6 concentrations and abdominal adipocyte isoproterenol-stimulated lipolysis in women

Anne-Sophie Morisset^{1,2}, Céline Huot³, Denis Légaré³, André Tchernof^{1,2}.

¹Molecular Endocrinology and Oncology Research Center, ²Department of Nutrition, ³Gynaecology Unit, Laval University Medical Research Center and Laval University, Québec, Canada.

Running title: Circulating IL-6 and lipolysis in women

Address for correspondence: André Tchernof, Ph.D.
Molecular Endocrinology and Oncology Research Center
Department of Nutrition
Laval University Medical Research Center
2705 Laurier Blvd. (T3-67)
Québec, (Québec)
CANADA G1V 4G2

Tel: (418) 654-2296

Fax: (418) 654-2761

E-mail: andre.tchernof@crchul.ulaval.ca

ABSTRACT

Objective: To examine the association of plasma IL-6 concentrations with adiposity and fat cell metabolism in women. **Research methods and procedures:** Omental (OM) and subcutaneous (SC) adipose tissue samples were obtained from 48 healthy women (age: 47 ± 5 years, BMI: 26.9 ± 5.3 kg/m²) undergoing gynaecological surgeries. Total and visceral adiposity were assessed by dual-energy x-ray absorptiometry and computed tomography respectively. Measures of adipocyte lipolysis (basal, isoproterenol-, forskolin- and dibutyryl- AMP-stimulated) and adipose tissue LPL activity were obtained. Plasma IL-6 was measured by radioimmunoassay. **Results:** Plasma IL-6 was positively correlated with total body fat mass ($r=0.32$, $p<0.05$), SC adipose tissue area ($r=0.35$, $p<0.05$), SC adipocyte diameter ($r=0.30$, $p<0.05$) and a trend was observed with visceral adipose tissue area ($r=0.20$, $p<0.07$). Plasma IL-6 was positively correlated with glycerol released in response to isoproterenol (10^{-5} to 10^{-8} M) by isolated SC ($0.31\leq r\leq 0.65$, $p<0.05$) and OM ($0.36\leq r\leq 0.40$, $p<0.02$) adipocytes, independent of menopausal status. No correlation was found with LPL activity. A subsample of women with high plasma IL-6 ($n=10$) was matched with women with low plasma IL-6 ($n=10$) for total body fat mass. OM adipocyte glycerol release in response to isoproterenol (10^{-5} to 10^{-8} M) was higher in the subsample of women with elevated plasma IL-6 ($p\leq 0.07$). **Discussion:** We observed that OM lipolysis was significantly higher in women with elevated plasma IL-6 for a similar body fat mass and menopausal status. These results suggest that higher circulating IL-6 concentrations are associated with increased isoproterenol-stimulated lipolysis especially in OM abdominal adipocytes in women.

Keywords: Omental, subcutaneous, adipose tissue, adipokines, computed tomography, lipolysis

INTRODUCTION

Adipose tissue is known to release a number of cytokines including tumor-necrosis factor- α , interleukine-6 (IL-6), adiponectin and resistin, which have been shown to modulate local or systemic metabolism (1;2). Higher circulating concentrations of IL-6 have been positively associated with BMI, waist circumference, visceral fat accumulation as well as elevated triglycerides, plasma free fatty acid levels, and systemic insulin (1;3;4). Obesity is also associated with increased plasma C-reactive protein (CRP) (5) possibly through modulation by IL-6 (4-6). Interestingly, weight loss is associated with a reduction in the macrophage infiltration of adipose tissue and an improvement of the inflammatory profile including reduced in plasma IL-6 and CRP concentrations (5;7;8).

IL-6 has been postulated to have a local impact on adipocyte metabolism. Lipoprotein lipase (LPL) activity was reduced by half in adipose tissue of mice *in vivo* after IL-6 injection (9). This effect was also observed *in vitro* in human adipocytes cultured with dexamethasone and insulin, in which IL-6 decreased LPL activity by 56% in omental adipose tissue and by 68% in the subcutaneous depot (1). Furthermore, when human recombinant IL-6 was added to adipose tissue organ cultures under basal conditions, lipolysis was stimulated (1). Low or high IL-6 infusions in femoral arteries also stimulated fatty acid release in 18 healthy men, even 8 hours after the infusion (10). Another study showed that IL-6 infusion increased fatty acid turnover in type 2 diabetic and healthy patients (11). In isolated adipocytes from mammary adipose tissue incubated with 10 mmol/L of IL-6 for 6h, Path *et al.* (12) observed no effect on lipolysis, whereas 24 hour exposure increased basal and isoproterenol-induced glycerol release.

The objective of the present study was to examine the association of plasma IL-6 concentrations with adiposity and fat cell metabolism in women. Furthermore, we wanted to study the association of systemic IL-6 concentrations with lipolysis stimulated downstream of the beta-adrenergic receptor by using post-receptor acting agents forskolin- and dibutyryl cyclic AMP. We tested the hypothesis that higher circulating IL-6 concentrations are associated with increase isoproterenol-stimulated lipolysis in omental and subcutaneous abdominal adipocytes. Based on the fact that isoproterenol-stimulated lipolysis responsiveness is higher in the visceral fat depot (13) and that visceral adipose tissue secretes higher levels of IL-6 (2), we hypothesised that

higher circulating IL-6 concentrations are associated with an enhanced isoproterenol-stimulated lipolysis in omental abdominal adipocytes compared to isoproterenol-stimulated lipolysis in subcutaneous adipocytes.

RESEARCH METHODS AND PROCEDURES

Subjects

Women of this study were recruited through the elective surgery schedule of the Gynecology Unit of the Laval University Medical Center. This study included 48 healthy women undergoing abdominal gynecological surgery. Women of the study elected for total (n=22) or subtotal (n=2) abdominal hysterectomies, some with salpingo-oophorectomy of one (n=8) or two (n=16) ovaries. Reasons for surgery included one or more of the following: menorrhagia/menometrorrhagia (n=24), myoma/fibroids (n=18), incapacitating dysmenorrhea (n=7), pelvic pain (n=2), benign cyst (n=9), endometriosis (n=6), adenomyosis (n=2), pelvic adhesions (n=4), benign cystadenoma (n=1), endometrial hyperplasia (n=3) or polyp (n=1) and ovarian thecoma (n=1). Menstrual status was obtained for 47 women based on plasma follicle-stimulating hormone measures, a menstrual history questionnaire and from medical files (menopausal status could not be determined with the information obtained for one participant). Thirty-six women were pre- or perimenopausal, 5 of whom were using hormone therapy. Eleven women were menopausal, 3 of whom used a gonadotrophin-releasing hormone agonist and 1 of whom used hormone therapy. Before their inclusion in the study, all subjects provided written informed consent. This study was approved by the medical ethics committees of Laval University and Laval University Medical Center.

Body fatness and body fat distribution measurements

Measurements of body fatness and body fat distribution were performed on the morning of or within a few days before or after the surgery. Measures of total body fat mass, fat percentage, and fat-free mass were determined by dual energy x-ray absorptiometry (DEXA) using a Hologic QDR-2000 densitometer and the enhanced array whole-body software V5.73A (Hologic Inc., Bedford, MA). Abdominal subcutaneous and visceral adipose tissue cross-sectional area measurements were analyzed by computed tomography using a GE Light Speed 1.1 CT scanner (General Electric Medical Systems, Milwaukee, WI). Subjects were examined in the supine position, with arms stretched above the head. The scan was performed at the L4-L5 vertebrae level. Quantification of visceral adipose tissue area was done by delineating the intra-abdominal cavity at the internal-most aspect of the abdominal and oblique muscle walls surrounding the cavity and the posterior aspect of the vertebral body using the ImageJ 1.33u software (National

Institutes of Health, USA). Adipose tissue was highlighted and computed using an attenuation range of -190 to -30 Hounsfield units. The coefficient of variation between two measures from the same observer (n=10) were 0.0%, 0.2%, and 0.5 %, for total, subcutaneous and visceral adipose tissue areas, respectively.

Adipose tissue sampling

Subcutaneous adipose tissue was collected at the site of surgical incision (lower abdomen) and omental adipose tissue was collected from the greater omentum (epiploon). Samples collected during the surgical procedure were immediately carried to the laboratory in 0.9% saline preheated at 37°C. Adipocyte isolation was performed with a portion of the fresh biopsy. The remaining tissue was immediately frozen and stored at -80°C in liquid nitrogen for other analyses.

Adipocyte isolation, lipolysis, and LPL activity

Tissue samples were digested for 45 min at 37°C with collagenase type I in Krebs-Ringer-Henseleit buffer supplemented with 5 mM glucose, 0.1 μ M adenosine, 0.1 mg/mL ascorbic acid and 4% electrophoresis grade, delipidated bovine serum albumin according to a modified version of the Rodbell method (14). Adipocyte suspensions were filtered through nylon mesh and washed three times with the buffer. For cell size measurements, mature adipocyte suspensions were visualized using a contrast microscope attached to a camera and computer interface. Pictures of cell suspensions were taken and the Scion Image software was used to measure the size (diameter) of 250 adipocytes for each tissue sample.

Lipolysis experiments were performed by incubating isolated cell suspensions for 2h at 37°C in Krebs-Ringer Henseleit buffer, with or without β -adrenergic receptor agonist isoproterenol in concentrations ranging from 10^{-10} to 10^{-5} M, or post-receptor-acting agents dibutyryl cyclic AMP (10^{-3} M) and forskolin (10^{-5} M). Glycerol release in the medium was measured by bioluminescence using the nicotinamide adenine dinucleotide-linked bacterial luciferase assay (15), a Berthold Microlumet plus bioluminometer (LB 96 V) and the WinGlow software (EG&G, Bad Wildbad, Germany). Intra- and interassay coefficients of variation for glycerol release measurements were 5.9% and 13.9% respectively. Lipid weight used was measured by performing Dole's extraction. Average adipocyte weight and cell number in the suspensions were calculated using lipid weight,

average cell volume and the density of triolein. Lipolysis results were expressed in $\mu\text{moles}/10^6$ cells/2h.

Heparin releasable lipoprotein lipase activity was determined in 30 to 50 mg adipose tissue samples by the method of Taskinen *et al.* (16). Tissue eluates were obtained by incubating the sample in Krebs Ringer phosphate buffer and heparin at 37°C for 90 min. The eluates were then incubated with excess concentrations of unlabeled and ^{14}C -labeled triolein in a Tris-albumin buffer emulsified with ultrasound. The reaction was carried out at 37°C for 60 min with agitation. Free fatty acids were isolated by the Belfrage extraction procedure. Porcine plasma was used as a source of Apo-CII to stimulate LPL activity, and unpasteurized cow's milk as an internal LPL activity standard for interassay variations. Activity results were expressed in nmol oleate/ 10^6 cells/h.

Plasma cytokine levels

Blood samples were drawn after a 12-hour fast on the morning of the surgery. Plasma adiponectin, resistin and interleukin-6 levels were measured by ELISA (B-Bridge International, Inc., Sunnyvale, CA, USA, Linco Research, St-Charles, MO, USA and R&d Systems, Mineapolis, MN, USA, respectively). Intra-assay CVs for IL-6 measurements ranged from 6.9 to 7.4% and inter-assay CVs ranged from 6.5 to 9.6%.

Statistical analyses

Spearman rank correlation coefficients were computed to quantify associations between circulating IL-6 concentrations and characteristics of the 48 women, adiposity variables and adipocyte measurements. A subsample of women with high plasma IL-6 (n=10) was matched with women with low plasma IL-6 (n=10) for similar total body fat mass values. Characteristics of the women and lipolysis measures were compared in these two groups using paired t-tests. Covariance analyses were performed to assess the effects of menopausal status, fat mass and adipocyte size on the association between plasma IL-6 and lipolysis measures. All statistical analyses were performed using the JMP statistical software (SAS Institute, Cary, NC).

RESULTS

Characteristics of the sample of 48 women are shown in Table 1. Women were 47.5 years old and were slightly overweight with an average BMI of 26.9 kg/m². Adiposity values covered a wide spectrum, with body fat percentages ranging from 19.6 to 47.5%.

Table 2 shows Spearman rank correlation coefficients between physical characteristics of the 48 women and circulating IL-6 concentrations. Body fat-free mass, subcutaneous abdominal adipose tissue area and resistin levels ($p \leq 0,01$) were positively associated with plasma IL-6; so were body weight, BMI, total body fat mass and total abdominal adipose tissue areas ($p \leq 0,05$). We also observed a trend for a positive correlation between circulating IL-6 concentrations and visceral abdominal adipose tissue area.

Table 3 shows Spearman rank correlation coefficients between circulating IL-6 concentrations and adipocyte size, LPL activity as well as lipolysis measures in subcutaneous and visceral adipose tissue or adipocytes. Subcutaneous adipocyte size was positively and significantly correlated ($p \leq 0,05$) with circulating IL-6 concentrations while omental adipocyte size and LPL activity were not. Isoproterenol-stimulated (10^{-5} M to 10^{-8} M) lipolysis measures in omental adipocytes were significantly correlated with plasma IL-6 concentrations ($p \leq 0,05$), and so were subcutaneous adipocyte isoproterenol-stimulated (10^{-5} M to 10^{-8} M) lipolysis measures ($p \leq 0,01$). When adjusting for adipocyte size, isoproterenol-stimulated lipolysis was still positively associated with circulating IL-6 in both fat depots with minor differences. Statistical adjustment for total body fat mass slightly decreased the correlation coefficients, but trends for correlations between plasma IL-6 concentrations and isoproterenol-stimulated lipolysis were still observed in both fat depots, especially in omental adipocytes (not shown).

Dibutyryl cyclic AMP- and forskolin- stimulated lipolysis in omental adipocytes were positively correlated with plasma IL-6 ($p \leq 0,05$). Forskolin-stimulated lipolysis was positively correlated with circulating IL-6 concentrations in subcutaneous adipocytes ($p \leq 0,05$).

Characteristics of women with high or low circulating IL-6 concentrations individually matched for total body fat mass are shown in Table 4. All variables including age, BMI, weight, total body

fat mass and menopausal status were similar among the two groups, except for plasma IL-6 concentrations, which were significantly different in the group with low plasma IL-6 concentrations (0.89 ± 0.21 pg/mL) when compared to the group with high plasma IL-6 concentrations (3.58 ± 1.02 pg/mL) ($p \leq 0.01$). Plasma resistin concentrations also tended to be higher in the high IL-6 subgroup ($p = 0.07$). Subcutaneous and omental adipocyte size and LPL activity were not significantly different between the two groups (Figure 1). However, isoproterenol-stimulated (10^{-5} M to 10^{-8} M) lipolysis in omental adipocytes was significantly higher in the group with high circulating IL-6 concentrations ($0.05 \leq p \leq 0.07$). A similar trend was found for some isoproterenol doses in subcutaneous fat cells, although it did not reach significance (p values of 0.12, 0.11, 0.13, 0.09, 0.17, 0.52 for isoproterenol, 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} , 10^{-10} M respectively). In omental adipocytes of women with low vs. high plasma IL-6, we observed non-significant trends for differences in responsiveness to dibutyryl cyclic AMP (0.84 ± 0.09 vs. 1.54 ± 0.28 respectively, $p = 0.14$) and forskolin (0.34 ± 0.05 vs. 0.96 ± 0.24 respectively, $p = 0.09$). In subcutaneous adipocytes of women with low vs. high plasma IL-6 concentrations, we observed no difference in responsiveness to dibutyryl cyclic AMP (1.55 ± 0.22 vs. 2.18 ± 0.41 respectively, $p = 0.21$) and forskolin (1.78 ± 0.24 vs. 2.46 ± 0.32 respectively, $p = 0.78$).

Plasma IL-6 concentrations were higher in postmenopausal than in pre- or perimenopausal women not taking hormone therapy (2.78 ± 1.35 vs. 1.78 ± 0.95 pg/mL, $p = 0.02$). When these two groups were compared, we also observed that postmenopausal women were significantly older ($p \leq 0.001$), had higher total body fat mass and percent body fat ($p \leq 0.05$ for both) and higher abdominal adipose tissue areas ($p \leq 0.05$). When excluding postmenopausal women and women on HRT (pre-, peri- or postmenopausal), correlations between IL-6 and adiposity measures, adiponectin and resistin levels were unchanged. Furthermore, when menopausal status was considered as a covariate in our analyses, we observed that, except for percent body fat, associations between circulating IL-6 concentrations and weight, total body fat mass, body fat-free mass and abdominal adipose tissue areas were not affected (not shown).

A trend for a higher isoproterenol stimulated-lipolysis was observed in post-menopausal women (10^{-5} M and 10^{-6} M, $p \leq 0.08$) in fat cells from the subcutaneous depot. However, when excluding postmenopausal women and women on HRT (pre-, peri- or postmenopausal), correlations

between plasma IL-6 concentrations and subcutaneous isoproterenol-stimulated lipolysis remained unaltered. Furthermore, when menopausal status was considered as a covariate in our analyses, similar results were observed: plasma IL-6 concentrations were significantly correlated with isoproterenol-stimulated lipolysis independent of menopausal status in both depots.

DISCUSSION

The aim of this study was to examine the association between circulating IL-6 concentrations and abdominal subcutaneous and omental adipocyte metabolism in women. Some studies had already shown a lipolytic effect of IL-6, either directly or on isoproterenol-induced lipolysis (1;10-12). We aimed to test the hypothesis that higher circulating IL-6 concentrations would be associated with increased isoproterenol-stimulated lipolysis, especially in omental fat cells. As expected, our results show that most measures of adiposity such as BMI, weight and fat mass were positively correlated with circulating IL-6 concentrations. Isoproterenol-stimulated lipolysis was also positively correlated with plasma IL-6. Moreover, in women with elevated plasma IL-6 concentrations, omental adipocytes were more responsive to isoproterenol compared to women with low plasma IL-6 concentrations, despite the fact they were matched for adiposity. Covariance analyses confirmed this finding. These results show for the first time that circulating IL-6 concentrations are related to high omental fat cell isoproterenol-stimulated lipolysis independent of adiposity.

Regarding the correlations between adiposity measures and circulating IL-6 concentrations, several studies are concordant with our results. In a study by Fencki *et al.* in overweight or obese postmenopausal women, plasma IL-6 concentrations were positively correlated with BMI, waist circumference and visceral fat (3). Furthermore, Khaodhiar *et al.* found that across a broad range of obesity values, circulating IL-6 concentrations always correlated with BMI (17). Park *et al.* studied non-obese and obese subjects from both sexes and found that plasma IL-6 concentrations were positively correlated with weight, BMI, waist circumference, hip circumference, and waist-hip ratio in all subjects (18). In the same study, especially in obese subjects, circulating IL-6 concentrations were positively associated with BMI, waist circumference and visceral adipose tissue area (18). All these results are concordant with our findings and confirm that in several populations, adiposity is positively associated with plasma IL-6.

As previously discussed, adipose tissue is an important source of proinflammatory cytokines (19). It is now clear that adipocyte metabolism is influenced by these cytokines, and especially by IL-6. Lipolysis responsiveness to IL-6 has already been studied by many authors. IL-6 stimulates lipolysis in human adipocyte or preadipocyte cultures (1;12). Path *et al.* observed that a 24 hour

exposure to IL-6 increased basal and isoproterenol-induced glycerol release in isolated adipocytes (12). Moreover, infusion of IL-6 to healthy humans also increased lipolysis (10). In the present study, consistent with previous observations, we found positive correlations between high circulating IL-6 concentrations and isoproterenol-stimulated lipolysis. A novel aspect of the present study was the use of post-receptor acting agents. Trujillo et al. suggested that high levels of IL-6 within adipose tissue may contribute to alterations in gene or protein expression that influence basal lipolysis (1). In addition, Path et al. postulated that IL-6 augments catecholamine-induced stimulation of lipolysis through a direct effect via β -adrenergic receptors (12). Our results indirectly suggest that this effect may include other components of the lipolytic cascade. Indeed, we found that forskolin and dibutyryl cAMP responsiveness were positively correlated with IL-6, similar to isoproterenol responsiveness, especially in the omental fat component.

This study allowed us to examine both omental and subcutaneous adipocyte lipolysis. Consistent with our hypothesis, we observed that the difference in isoproterenol-stimulated lipolysis between women with high circulating IL-6 concentrations compared with women with low plasma IL-6 was most pronounced in omental adipose tissue. Omental adipose tissue secretes 3 times more IL-6 than subcutaneous adipose tissue (2). In contrast, in response to direct IL-6 treatment, Trujillo *et al.* found that there was no significant depot difference in lipolysis in adipose tissue organ cultures under basal conditions from six obese subjects (1). The fact that we examined isoproterenol-stimulated lipolysis and circulating levels of the cytokine could possibly explain this discrepancy. Second, our study was conducted in a group of lean to moderately obese subjects. Examination of fat cells from morbidly obese individual may have minimized depot differences in glycerol release in response to IL-6.

Since obesity is positively associated with both adipocyte size and plasma IL-6 (17;20), one could hypothesize that elevated circulating IL-6 concentrations are found in subjects with large adipocytes, and consequently consider cell size to explain our association between circulating IL-6 concentrations and lipolysis. Accordingly, plasma IL-6 concentrations were previously found to be positively associated with adipocyte size (21). Cell size also correlated with IL-6 mRNA and IL-6 secretion by subcutaneous tissue in healthy men (22). The same positive correlation between IL-6 secretion and subcutaneous cell size was also observed in healthy men and women (24). In

our study, circulating IL-6 concentrations were positively correlated with adipocyte size but only in subcutaneous cells, which is consistent with other studies. However, when women were matched for the same level of fat mass, we did not observe any difference in adipocyte size between women with high circulating IL-6 concentrations and women with low circulating IL-6 concentrations. Yet, isoproterenol-stimulated lipolysis was still elevated in high IL-6 women, suggesting an association that is independent of fat cell size. Covariance analyses with adipocyte size also confirmed that circulating IL-6 level was an independent predictor of isoproterenol-stimulated lipolysis. Based on these results, adipocyte size cannot be considered to explain the elevated lipolysis in women with high circulating IL-6 concentrations. Because 90% of adipose tissue IL-6 release originates from cells other than adipocytes (2;24;25), we suggest that adipocyte size is not a strong determinant of the potential stimulatory effect of IL-6 on isoproterenol-induced lipolysis.

It is important to note that there are some limitations to the use of a cross-sectional design, particularly with respect to cause and effect relationships. Also, we used plasma IL-6 concentrations instead of measuring tissue IL-6 levels or stimulating lipolysis with IL-6 directly like other groups (1),(10). However, we know that adipose tissue IL-6 secretion may account for a third of circulating level of the cytokine (5;26). The finding of significant correlation at the systemic level indirectly suggest that stronger associations would have been found with tissue measures.

In conclusion, despite similar adiposity levels, we can speculate that elevated plasma IL-6 concentrations may reflect a more dysfunctional adipose tissue including increased macrophage infiltration and production of inflammatory cytokines. Such profile would be associated with increased isoproterenol-stimulated lipolysis, especially in omental fat cells, independent of adiposity and fat cell size.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by operating funds from the Canadian Institutes of Health Research - Institute of Gender and Health to André Tchernof (MOP-64182). The contribution of Drs. Marleen Daris, Suzanne Noël, Jacques Morency, Céline Bouchard, Michel Fortier, Johanne Hurtubise and Caroline Rhéaume to the recruitment process of the study is gratefully acknowledged. The authors wish to thank all women who participated in the study for their excellent collaboration.

REFERENCES

1. Trujillo ME, Sullivan S, Harten I, Schneider SH, Greenberg AS, Fried SK. Interleukin-6 regulates human adipose tissue lipid metabolism and leptin production in vitro. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89(11):5577-5582.
2. Fried SK, Bunkin DA, Greenberg AS. Omental and subcutaneous adipose tissues of obese subjects release interleukin-6: depot difference and regulation by glucocorticoid. *J Clin Endocrinol Metab* 1998; 83(3):847-850.
3. Fenkci S, Rota S, Sabir N, Sermez Y, Guclu A, Akdag B. Relationship of serum interleukin-6 and tumor necrosis factor alpha levels with abdominal fat distribution evaluated by ultrasonography in overweight or obese postmenopausal women. *J Investig Med* 2006; 54(8):455-460.
4. Bastard JP, Jardel C, Bruckert E et al. Elevated levels of interleukin 6 are reduced in serum and subcutaneous adipose tissue of obese women after weight loss. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; 85(9):3338-3342.
5. Wisse BE. The inflammatory syndrome: the role of adipose tissue cytokines in metabolic disorders linked to obesity. *J Am Soc Nephrol* 2004; 15(11):2792-2800.
6. Bastard JP, Maachi M, Lagathu C et al. Recent advances in the relationship between obesity, inflammation, and insulin resistance. *Eur Cytokine Netw* 2006; 17(1):4-12.
7. Manco M, Fernandez-Real JM, Equitani F et al. Effect of massive weight loss on inflammatory adipocytokines and the innate immune system in morbidly obese women. *J Clin Endocrinol Metab* 2007; 92(2):483-490.
8. Tchernof A, Nolan A, Sites CK, Ades PA, Poehlman ET. Weight loss reduces C-reactive protein levels in obese postmenopausal women. *Circulation* 2002; 105(5):564-569.
9. Greenberg AS, Nordan RP, McIntosh J, Calvo JC, Scow RO, Jablons D. Interleukin 6 reduces lipoprotein lipase activity in adipose tissue of mice in vivo and in 3T3-L1 adipocytes: a possible role for interleukin 6 in cancer cachexia. *Cancer Res* 1992; 52(15):4113-4116.
10. van Hall G, Steensberg A, Sacchetti M et al. Interleukin-6 stimulates lipolysis and fat oxidation in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88(7):3005-3010.
11. Petersen EW, Carey AL, Sacchetti M et al. Acute IL-6 treatment increases fatty acid turnover in elderly humans in vivo and in tissue culture in vitro. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2005; 288(1):E155-E162.
12. Path G, Bornstein SR, Gurniak M, Chrousos GP, Scherbaum WA, Hauner H. Human breast adipocytes express interleukin-6 (IL-6) and its receptor system: increased IL-6 production by beta-adrenergic activation and effects of IL-6 on adipocyte function. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86(5):2281-2288.

13. Tchernof A, Belanger C, Morisset AS et al. Regional differences in adipose tissue metabolism in women: minor effect of obesity and body fat distribution. *Diabetes* 2006; 55(5):1353-1360.
14. Rodbell N. Metabolism of isolated fat cells. *J Biol Chem* 1964; 239:375-380.
15. Kather H, Schroder F, Simon B. Microdetermination of glycerol using bacterial NADH-linked luciferase. *Clin Chim Acta* 1982; 120(3):295-300.
16. Taskinen MR, Nikkila M, Huttunen JK, Hilden H. A micromethod for assay of lipoprotein lipase activity in needle biopsy samples of human adipose tissue and skeletal muscle. *Clin Chim Acta* 1980; 104:107-117.
17. Khaodhlar L, Ling PR, Blackburn GL, Bistran BR. Serum levels of interleukin-6 and C-reactive protein correlate with body mass index across the broad range of obesity. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 2004; 28(6):410-415.
18. Park HS, Park JY, Yu R. Relationship of obesity and visceral adiposity with serum concentrations of CRP, TNF-alpha and IL-6. *Diabetes Res Clin Pract* 2005; 69(1):29-35.
19. Coppack SW. Pro-inflammatory cytokines and adipose tissue. *Proc Nutr Soc* 2001; 60(3):349-356.
20. van H, V, Skurk T, Rohrig K et al. Effect of BMI and age on adipose tissue cellularity and differentiation capacity in women. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2003; 27(8):889-895.
21. Bahceci M, Gokalp D, Bahceci S, Tuzcu A, Atmaca S, Arikan S. The correlation between adiposity and adiponectin, tumor necrosis factor alpha, interleukin-6 and high sensitivity C-reactive protein levels. Is adipocyte size associated with inflammation in adults? *J Endocrinol Invest* 2007; 30(3):210-214.
22. Sopasakis VR, Sandqvist M, Gustafson B et al. High local concentrations and effects on differentiation implicate interleukin-6 as a paracrine regulator. *Obes Res* 2004; 12(3):454-460.
23. Skurk T, Alberti-Huber C, Herder C, Hauner H. Relationship between adipocyte size and adipokine expression and secretion. *J Clin Endocrinol Metab* 2007; 92(3):1023-1033.
24. Fain JN. Release of interleukins and other inflammatory cytokines by human adipose tissue is enhanced in obesity and primarily due to the nonfat cells. *Vitam Horm* 2006; 74:443-477.
25. Fain JN, Madan AK, Hiler ML, Cheema P, Bahouth SW. Comparison of the release of adipokines by adipose tissue, adipose tissue matrix, and adipocytes from visceral and subcutaneous abdominal adipose tissues of obese humans. *Endocrinology* 2004; 145(5):2273-2282.

26. Mohamed-Ali V, Goodrick S, Rawesh A et al. Subcutaneous adipose tissue releases interleukin-6, but not tumor necrosis factor-alpha, in vivo. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82(12):4196-4200.

TABLES

Table 1 - Characteristics of the study sample of 48 women

Variable	Mean \pm SD	Range
Age (years)	47.5 \pm 5.0	39.6 - 61.7
Weight (kg)	70.5 \pm 15.8	48.5 - 110.5
Height (cm)	161 \pm 6	151 - 174
BMI (kg/m ²)	26.9 \pm 5.3	17.2 - 41.3
Total body fat mass (kg)	25.1 \pm 9.7	10.0 - 50.8
Body fat-free mass (kg)	43.1 \pm 6.9	32.5 - 63.0
Percent body fat (%)	34.6 \pm 6.6	19.6 - 47.5
<i>Abdominal adipose tissue areas (cm²)</i>		
Total	417 \pm 184	128 - 991
Visceral	95 \pm 47	34 - 233
Subcutaneous (cm ²)	322 \pm 143	94 - 759
<i>Cytokines</i>		
Adiponectin (ng/mL)*	47.2 \pm 21.2	1.6 - 103.4
Resistin (ng/mL)**	23.2 \pm 6.4	13.0 - 48.3
IL-6 (pg/mL)	2.0 \pm 1.2	0.6 - 5.5

*n=46 for variables of the lipid profile and adiponectin, ** n=47 for resistin

Menopausal status: 31 pre- or perimenopausal women, 5 pre-or perimnopausal women using hormone therapy, 8 post-menopausal women, 3 post-menopausal women using GnRH agonist and 1 post-menopausal woman using HRT.

Table 2 - Spearman rank correlation coefficients between principal characteristics of the 48 women and circulating IL-6

Variables	Circulating IL-6	P value
Age	0.04	NS
Weight	0.35	≤0.05
Height	0.17	NS
BMI	0.31	≤0.05
Total body fat mass	0.32	≤0.05
Body fat-free mass	0.37	≤0.01
Percent body fat	0.27	≤0.07
<i>Abdominal adipose tissue areas (cm²)</i>		
Total	0.35	≤0.05
Visceral	0.2	≤0.07
Subcutaneous	0.35	≤0.01
<i>Cytokines</i>		
Adiponectin (ng/mL) ^a	-0.29	NS
Resistin (ng/mL) ^b	0.39	≤0.01

^an=46 for variables of the lipid profile and adiponectin ^bn=47 for variable of resistin

Table 3 - Spearman rank correlation coefficients between adipocyte size, LPL activity, lipolysis measures and circulating IL-6 in subcutaneous and visceral adipose tissue

Variables	Circulating IL-6	
	<i>Subcutaneous adipocytes</i>	<i>Omental adipocytes</i>
Adipocyte size	0.30*	0.20
LPL activity	0.03	0.03
<i>Lipolysis</i>		
basal	0.14	0.19‡
Isoproterenol (10 ⁻⁵ M)	0.35*	0.36‡
Isoproterenol (10 ⁻⁶ M)	0.33*	0.40‡
Isoproterenol (10 ⁻⁷ M)	0.35*	0.38‡
Isoproterenol (10 ⁻⁸ M)	0.31*	0.38‡
Isoproterenol (10 ⁻⁹ M)	0.17	0.19
Isoproterenol (10 ⁻¹⁰ M)	-0.02	0.26
Dibutyryl cyclic AMP (10 ⁻³ M)	0.10	0.28*
Forskolin (10 ⁻⁵ M)	0.29*	0.35*

* p≤0.05, ‡p≤0.01

LPL activity expressed in nmol oleate/10⁶cells/h; Lipolysis expressed in μmol/10⁶cell/2h.

Table 4 - Characteristics of women with high or low plasma IL-6, but individually matched for total body fat mass

Variables	Low IL-6 (n=10)	High IL-6 (n=10)	P value
Age (years)	46.5 ± 3.7	46.0 ± 5.9	NS
Weight (kg)	64.0 ± 10.0	66.0 ± 13.0	NS
BMI (kg/m ²)	25.5 ± 4.4	25.7 ± 4.9	NS
Total body fat mass (kg)	21.5 ± 7.5	21.7 ± 8.2	NS
Body fat-free mass (kg)	40.4 ± 3.5	42.6 ± 6.2	NS
<i>Abdominal adipose tissue areas (cm²)</i>			
Total	356 ± 143	339 ± 135	NS
Visceral	82 ± 31	76 ± 30	NS
Subcutaneous	277 ± 114	263 ± 111	NS
<i>Cytokines</i>			
IL-6 (pg/mL)	0.89 ± 0.21	3.58 ± 1.02	< 0.01
Adiponectin (ng/mL)	54.1 ± 15.6	46.1 ± 28.6	NS
Resistin (ng/mL)	19.5 ± 2.6	23.3 ± 4.9	0.07

Data are means ± SD

Menopausal status: 12 pre- or perimenopausal women, 3 pre- or perimenopausal women using HRT, 2 postmenopausal women, 2 postmenopausal using GnRH agonist, 1 postmenopausal woman using HRT and 1 woman with undefined status are included and equally distributed in each group.

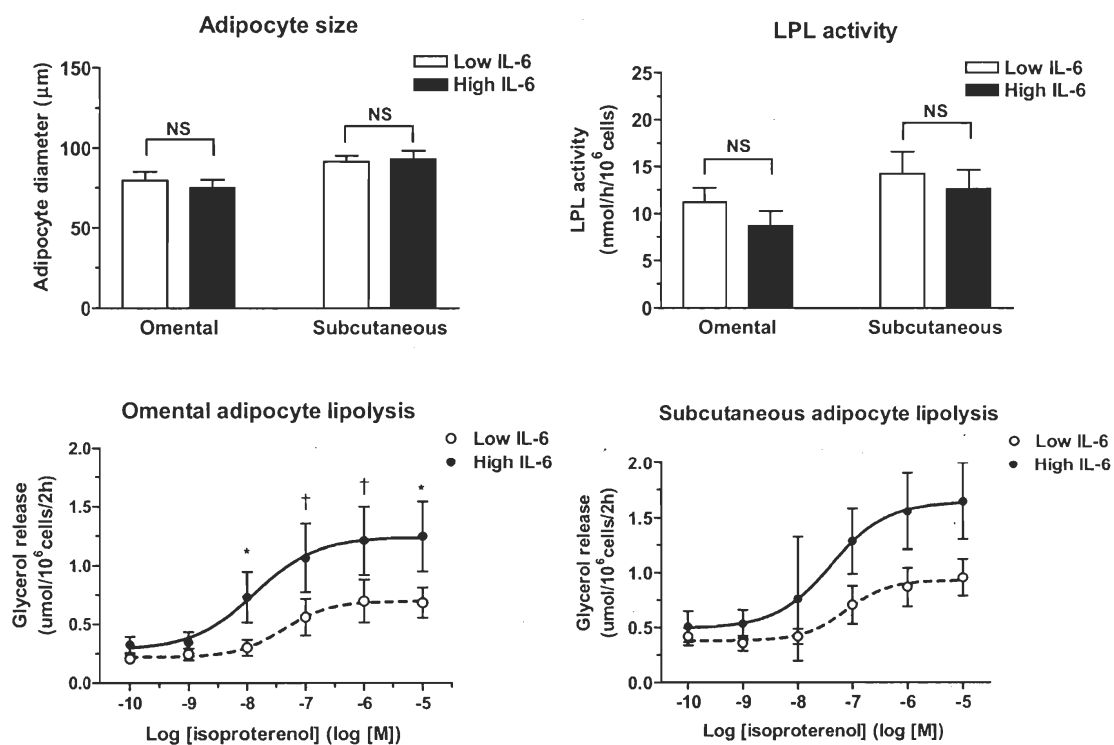


Figure 1 - Adipocyte size, LPL activity and lipolysis in omental and subcutaneous adipose tissue/cells in women with high or low plasma IL-6 matched for total body fat mass.

† $p \leq 0.07$ * $p \leq 0.05$

Chapitre 2 : Impact de l'alimentation et de l'adiposité sur les niveaux circulants d'androgènes et de SHBG

Article publié dans la revue Nutrition Reviews.

Impact of diet and adiposity on circulating levels of sex hormone-binding globulin and androgens. Nutr Rev. 2008 Sep;66(9):506-16.

Résumé

Ce deuxième chapitre présente une revue de littérature qui vise à étudier l'impact de différents types de diètes sur les niveaux circulants d'androgènes et de globuline de liaison aux stéroïdes sexuels (SHBG). La majorité des études d'intervention démontrent qu'une diète restrictive conduisant à une perte de poids significative est associée à des niveaux plus élevés de SHBG peu importe la composition de la diète et ce, particulièrement chez les femmes. Les études épidémiologiques, quant à elles, nous montrent que le type d'alimentation (végétarisme, végétalisme vs. non-végétarisme) n'est pas associé avec les niveaux de SHBG, indépendamment de l'obésité. Aucune conclusion claire ne peut être tirée en ce qui concerne l'effet de l'alimentation sur les niveaux circulants d'androgènes. En bref, l'alimentation peut avoir un effet sur les niveaux de SHBG et possiblement sur les niveaux circulants d'androgènes via des changements au niveau du poids corporel, de la masse grasse totale et/ou de la sensibilité à l'insuline.

Impact of diet and adiposity on circulating levels of sex hormone-binding globulin and androgens

Anne-Sophie Morisset, Karine Blouin and André Tchernof

Anne-Sophie Morisset, Karine Blouin and André Tchernof
Molecular endocrinology and oncology, Laval University Medical Research Center, Quebec
City, Canada

Anne-Sophie Morisset, Karine Blouin and André Tchernof
Department of Nutrition, Laval University, Quebec City, Canada

Running Title: Diet, SHBG and androgens

Keywords: Sex hormone-binding globulin, androgen, weight loss, dietary fiber

Address for correspondence:

Andre Tchernof, PhD
Molecular Endocrinology and Oncology
Laval University Medical Research Center
Department of Nutrition, Laval University
2705 Laurier blvd. T3-67
Quebec City, PQ
CANADA G1V 4G2
Tel: 418-654-2296
Fax: 418-654-2761
Email: andre.tchernof@crchul.ulaval.ca

ABSTRACT

This review summarizes studies on the effect of various diets on circulating androgen levels and sex hormone-binding globulin (SHBG). Reduced caloric intake leading to significant weight loss increases SHBG levels regardless of diet composition, particularly in women. Cross-sectional studies show that dietary composition is generally not associated with SHBG levels independent of obesity level. No clear conclusion can be reached regarding the effect of various eating habits or dietary composition on circulating androgens. We conclude that dietary effects can be expected on circulating SHBG and possibly androgens if body weight or fatness and/or insulin homeostasis are modulated.

INTRODUCTION

Sex hormones have many important biological roles in growth, sexual maturation and reproduction. They also play a role in hormone-dependent cancers such as breast and prostate cancer.¹ Circulating sex hormone levels are also associated with metabolic parameters such as obesity and body fat distribution.² In men, low circulating androgens including testosterone, dehydroepiandrosterone (DHEA), androstenedione (4-dione), androstenediol, and dihydrotestosterone (DHT) have been associated with obesity and increased accumulation of fat within the abdominal cavity, termed visceral fat.^{2,3} In women, high levels of free and total androgens have been reported in women with polycystic ovaries (PCOS), who are frequently characterized by abdominal obesity.⁴ However, the association between circulating androgens and obesity in women without PCOS remains equivocal.⁵

Sex hormone-binding globulin (SHBG) is a circulating sex steroid transporter secreted by the liver.⁶ Approximately 65% of serum testosterone is bound to SHBG.⁷ Another portion is bound to albumin (~33%). The free moiety of testosterone (Free-T, FT) has been considered as the active fraction and represents approximately 2% of total testosterone.⁷ Consequently, bioavailable testosterone or free testosterone have been inversely related to the levels of SHBG.⁸

Several studies have now suggested an impact of diet and metabolic status on circulating levels of androgens and SHBG.^{9,10} Such an impact could be mediated by specific effects of given nutrients or by other metabolic pathways such as diet-induced changes in the level of obesity or insulin resistance.¹¹ To date, however, the literature remains inconclusive as to whether diet plays a direct role in the regulation of androgens and SHBG or whether its effects are mediated by dietary-induced metabolic fluctuations.

This article summarizes studies that have examined the impact of diet on circulating androgens and SHBG in men and women to clarify whether dietary effects on androgenicity are mediated by their impact on adiposity or insulinemia. We tested the hypothesis that changes in body fat mass will have the most important impact on circulating concentrations of androgens and SHBG, independent of diet composition *per se*.

METHODOLOGICAL CONSIDERATIONS

Studies that have examined the effect of different diets on circulating androgen levels and SHBG were considered. We performed searches on the *Pubmed* database using the following keywords: SHBG, androgen, diet, nutrition, nutritional intervention and sex hormones. Relevant references obtained were further reviewed to identify additional studies on this topic. We included all types of dietary patterns such as diets that were low in fat, low in carbohydrates, high in fiber, high in monounsaturated fat, etc. All research designs were examined and separated in two broad categories: intervention studies and cross-sectional studies. For these two types of study designs, we considered whether diet induced a significant weight loss or whether a given diet was associated with body composition or body weight differences respectively. Insulinemia was also considered when data was available. Finally, men and women of all ages and metabolic conditions were included in the analysis, but were examined separately where relevant.

INTERVENTION STUDIES

Sex hormone-binding globulin

Several studies investigated the effect of various dietary interventions on circulating SHBG. Overall, according to most reports, a reduction in total energy intake leading to significant weight loss seems to be linked to an increase in SHBG levels in women (summarized in Table 1). For example, Berrino et al.¹² examined the impact of an *ad libitum* Mediterranean vegetarian diet on testosterone and SHBG levels in postmenopausal women by studying two groups of 52 women. The intervention group received dietary counselling, common meals and cooking classes to maintain the prescribed diet for 4.5 months. Subjects from the control group did not receive any information about diet and were advised to increase their fruit and vegetable consumption. At the end of the trial, women of the intervention group showed a significant weight loss and a reduced BMI compared with the control group. This reduction in BMI was associated with a concomitant increase in SHBG levels. Interestingly, when adjusting for weight loss, no significant change was observed in SHBG levels between the two groups. Kaaks et al.¹³, studied the same cohort to measure the impact of the *ad libitum* Mediterranean diet on insulin sensitivity. Women in the intervention group (n=50), who had an increase in

SHBG level, also had a significant decrease in insulin area and in fasting glucose compared to women in the control group (n=49). A decrease was also observed in fasting insulin, but did not reach significance. In another study by Tymchuk et al.¹⁰, similar results were obtained: 22 postmenopausal women (11 on hormone replacement therapy, HRT and 11 not on HRT), followed a low fat (10% fat calories) and high fiber diet (35-40 g/1000 kcal each day) with exercise for a period of 3 weeks. After the intervention, BMI was significantly reduced and SHBG levels were also significantly higher in the two groups, independent of HRT use. These changes were associated with a significant decrease in serum insulin. In postmenopausal women with type 2 diabetes, Walker et al.¹⁴ examined the effect of a 12-week high-carbohydrate diet versus a 12-week high-monounsaturated fat diet in a cross-over design with a 4-week washout. Body weight was not affected by the diets, but fat mass was significantly reduced by both diets and this reduction was most important with the high-carbohydrate diet. A slight increase was observed in SHBG levels but remained non-significant. Insulin measures were not included in that analysis. Blouin et al.⁶ also observed an increase in SHBG levels, after a 6-week NCEP Step 1 diet (<30% of total energy from fat, < 10% of energy from saturated fat) leading to significant weight loss. The SHBG increase was independent of insulinemia.

Conversely, in a cross-over trial of 8 weeks in postmenopausal women, no change in body weight was observed, but SHBG levels were still increased when women consumed an isocaloric lean white fish diet compared to a regular or isocaloric diet essentially composed of beef, pork, egg and milk.¹⁵ Thus, independent of weight loss, the lean white fish diet had an impact on SHBG levels which was also linked to improvements in lipid profile.¹⁵ Fish protein has been shown to have a positive effect on glucose and insulin homeostasis.¹⁶ In that particular case, we can suppose that the increase in SHBG levels observed could be associated with a possible improvement of insulin sensitivity caused by the consumption of fish protein. However, this hypothesis cannot be confirmed as no insulin measures were performed. Changes in SHBG levels independent of weight loss were also observed in a different cohort composed of premenopausal women.¹⁷ A 4-week baseline high-fat and low-fiber diet was followed by an isocaloric low-fat and high-fiber diet for 8-10 weeks and no change in body weight was observed, but surprisingly, the low-fat and high-fiber diet produced a decrease in SHBG levels.

These results contradict some cross-sectional studies that found higher SHBG levels in long-term vegetarians (see below).^{7,18} The authors suggest that there is an initial decline in SHBG in the first few months after increasing fiber intake, a trend that would be reversed after an extended time on a high-fiber diet.¹⁷ Insulin measures were not included in the analysis.

Bennett et al.¹⁹ also obtained divergent results in a cohort of premenopausal women who followed their usual diet or a vegetarian diet or a fish-diet at least 3 times per week. After 3 months, body weight was maintained and no change in circulating levels of SHBG was observed. Similarly, a study by Woods et al.²⁰ including 21 healthy African-Asian premenopausal women who followed an isocaloric, low-fat (20%) and high-fiber diet for 7-10 weeks found no significant change in SHBG levels and this was associated with maintained body weight. Gann et al.²¹ also found that an isocaloric low-fat (20%) and high-fiber diet did not induce any change in both body weight and SHBG levels. Another interesting study including 291 women, this time with a history of breast cancer, examined the impact of a high-fiber, low-fat diet and did not observe any change in body weight and SHBG levels.²² In these studies, diet composition seemed to have no impact on SHBG levels.

In women with PCOS, the situation is confounded by a marked hyperandrogenic status. However, studies that have been conducted have generated similar results: weight loss induced by a caloric-restrictive diet is directly linked to an increase in SHBG levels. For example, a randomized control trial including 28 overweight women with PCOS demonstrated that an energy-restricted diet (~1400 kcal) of 12 weeks followed by a 4-week period of weight maintenance increased SHBG levels, irrespective of whether women were on a low- or high-protein diet.²³ In both groups, a significant weight loss and a significant decrease in fat mass was observed associated with a 20% decrease in fasting insulin and a 9% decrease in HOMA index. Similar results were observed in a study by Kiddy et al.²⁴, in which 5 obese women with PCOS were compared to 6 normal-weight, healthy women. After 2-4 weeks of a very-low calorie diet (330 kcal), in both groups, weight loss was observed and was associated with a two-fold increase in SHBG levels which was mirrored by a concomitant fall in serum insulin. Another study testing the impact of a very low calorie diet (350 kcal) for 2 weeks in 263 women with PCOS observed weight loss with a decrease in fasting insulin, leading to a

concomitant two-fold increase in SHBG levels. Similar results were observed during a long term (6-7 months) 1000 kcal calorie diet.¹¹ Finally, in 24 hirsute women, a low calorie diet of 1500 kcal also induced a decrease in BMI and a significant increase in SHBG levels as well as a significant decrease in serum insulin.²⁵ Androgenic and insulin statuses of these women were both improved at the end of the protocol and some of the subjects had an improvement of menstrual function and fertility.^{11,23}

In summary, in both premenopausal and postmenopausal women, the majority of studies showed that changes in body weight are an important predictor of increased SHBG levels in response to dietary intervention. When body weight is maintained, the situation is less clear, but most studies observed no change in circulating SHBG levels, which is also consistent with weight loss being a determinant factor. Insulin measures are not available in all studies, but an improvement in insulinemia seems to be an important predictor of improved SHBG levels, especially in women with PCOS. Taken together, available data show that diets leading to weight loss in women are associated with an increase in SHBG levels in a majority of studies. This finding appears to be independent of hormonal status, metabolic status and diet composition *per se*.

Weight loss studies are less abundant in men than in women (summarized in Table 2). One study including 39 healthy middle-aged men first examined the subjects' usual diet (high-fat and low-fiber) before they switched to an 8-week isocaloric, high-fiber and low-fat diet. After a small weight loss of 1 kg, a small, but significant decrease in SHBG levels was detected at the end of the trial. No information on insulin was provided in that study.²⁶ Conversely, another study including 20 healthy men examined the effect of a 6-week carbohydrate-restricted diet. Even after an average reduction of 3.4 kg of body weight associated with a decrease in circulating concentrations of insulin, no significant change was observed in SHBG levels.²⁷ In a 3-phase study, 30 healthy men first consumed their usual diet for 2 weeks, followed by a low-fat diet for 6 weeks and finally returned to their usual diet for another 6 weeks. A trend for a reduced sex hormone-binding capacity of SHBG was observed in association with a small weight loss after the intervention period. No insulin data was provided.²⁸ When obese men were examined (BMI >35 kg/m²) after a very low calorie diet, weight loss was clearly associated

with an increase in SHBG levels in two similar studies.^{29,30} One of these studies observed an improvement in insulin sensitivity (QUIKI)²⁹ and the other observed a significant decrease in plasma insulin levels.³⁰ The reverse situation was also studied: 12 pairs of young, sedentary, male monozygotic twins were overfed for a period of 100 days (1000 kcal energy excess/day).³¹ Significant weight gain was associated with a fall in SHBG levels in that study, consistent with the opposite trend observed in the majority of weight loss studies.

In the absence of significant weight loss, only one study observed changes in SHBG levels. This cross-over trial compared an isocaloric 10-day high-protein diet (44% protein) versus an isocaloric 10-day high-carbohydrate diet (70% carbohydrate). SHBG levels were significantly higher with the high-carbohydrate diet compared to the high-protein diet in the absence of weight loss.³² This change is possibly due to increased fiber intake in the high-carbohydrate diet, or is perhaps associated with an improvement in glucose-insulin homeostasis. However, insulin measures were not included in the analysis.

In general, even with significant weight loss in men, the increase in SHBG levels was less pronounced than in women. A trend for increased SHBG levels was observed more specifically in obese men, concomitant with a lower body weight and a better insulin profile in response to the intervention.

Circulating androgens

Available literature on diet and circulating androgens is generally difficult to interpret and equivocal. Various hormones have been examined using various methodologies. Furthermore, the results are far less consistent than for SHBG.

In both men and women, in some studies reporting both weight loss and increased SHBG levels, an increase in total testosterone levels was noticed.^{29,30,33} In two other studies in which SHBG was unaltered, no change in testosterone was observed even with a reduction in body fat mass or weight.^{14,27} Conversely, even when weight loss was significant and increased SHBG levels were reported, some studies observed a decrease in total testosterone levels.^{12,23} Another study observed such reduction, but only in free testosterone levels.²⁴ Two studies reported

different results, that is, a decrease in SHBG and a reduction in body weight associated with a reduction in total testosterone, free-T and 4-dione levels.^{26,28} When weight gain was induced, DHEA-S, total testosterone and DHT were unaltered even with a decrease in SHBG levels.³¹ In conclusion, according to available dietary intervention results, even when weight reduction is significant, we could not reach any firm conclusion due to several discrepancies among available reports. Differences across these trials possibly include type and length of the diets tested, hormone measurements performed and sex of the subjects.

In both men and women, in the absence of weight loss, results are also inconclusive. In a randomized controlled trial in which 13 South African healthy black men were compared to 21 South African men with prostate cancer after following a western diet (40% fat), testosterone, 4-dione and DHEA levels were decreased in both groups.³⁴ Another study that had observed an increase in SHBG levels in 7 healthy men showed higher testosterone levels after a high-carbohydrate diet without changes in plasma DHEA and 4-dione.³² In a cross-over study where 43 healthy men consumed a 10-week low-fat and high-fiber diet followed by a 10-week high-fat and low-fiber diet, mean plasma concentrations of total and SHBG-bound testosterone were higher on the high-fat and low-fiber diet,³⁵ a finding which is different from most studies. In women, two studies that did not observe any change in SHBG levels found no change in either testosterone¹⁹ and 4-dione or DHEA levels.²² Of these two randomized trials, one was conducted in women with breast cancer following a diet reduced in fat,²² and the other was in premenopausal women following a vegetarian diet.¹⁹ In contrast, a study performed in postmenopausal women found increased testosterone levels in association with increased levels of SHBG after 4 weeks of consuming a reduced fat diet (lean meat, poultry and fish compared to beef, pork, egg and milk).¹⁵ The opposite was observed in 48 premenopausal women consuming a high-fiber and low-fat diet.¹⁷ In conclusion, no clear effect on androgens can be attributed to diet according to available results.

In summary, after a diet intervention leading to weight loss, increased SHBG levels are generally observed independent of diet composition while no clear conclusion can be drawn regarding androgen levels.

CROSS-SECTIONAL STUDIES

Sex hormone-binding globulin

Numerous cross-sectional studies have been published to examine the impact of different eating habits on plasma concentrations of sex hormones. In several of these studies,^{7,36,37} vegetarians were compared to non-vegetarians, which causes a difficulty to identify the effect of a precise, isolated nutritional compound on SHBG and sex hormone levels. Important differences in adiposity between these two types of eating habits are also generally observed, which could contribute to concomitant differences in plasma concentrations of sex hormones.

As opposed to intervention studies, more reports focusing on men have been published using cross-sectional designs. For example, in 696 healthy men (226 meat-eaters, 237 vegetarians and 233 vegans), SHBG levels were 16% higher, concomitant with a lower BMI in vegans than in meat-eaters (22.7 vs. 26.1 kg/m² respectively).³⁷ Statistical adjustment for BMI attenuated differences in SHBG levels, but the difference between meat-eaters and vegans remained significant. More precise adiposity measures such as percent body fat or visceral adipose tissue areas were not performed in that study, which could explain the latter finding. However, an effect of diet that may be independent of adiposity differences can not be excluded in that study. Another analysis of this population was published two years later.⁷ In the same sample, men who had a BMI above 30 kg/m² had 45% lower SHBG values; and saturated fat intake was inversely correlated with plasma SHBG levels. Another study including 51 vegans and 57 omnivores also found a significantly lower BMI in vegans than in omnivores. In the latter study, vegans had 23% higher plasma SHBG concentrations than omnivores before and after statistical control for BMI.³⁸ In a subset of 18 vegetarians and 22 omnivores, a significant positive correlation was found between total fat, saturated fatty acids, polyunsaturated fat and SHBG. In the same order of idea, Longcope et al.¹⁸, also found a negative correlation between BMI and SHBG in 1563 healthy men. The latter study observed a positive correlation between plasma SHBG levels and fiber intake. Field et al.⁹ studied 1241 middle-aged men and found that SHBG was lower in men with increasing relative BMI. More specifically, this study showed an inverse significant correlation between consumption of animal fat and SHBG levels, while a positive significant association between dietary fiber and SHBG was observed. Wu et al.³⁹ also found lower SHBG levels with higher BMI and higher weight. In general, cross-

sectional studies in men found negative correlations between BMI and SHBG levels, regardless of the differences in diet composition. Although precise adiposity measures were not used in statistical adjustments, it appears that BMI differences can not explain all the differences observed in SHBG levels. It remains difficult to identify a specific nutrient that is clearly linked to SHBG levels according to available data. Moreover, little information on insulin levels was available in the studies cited.

In cross-sectional studies performed in women, the results are even less conclusive. Gates et al.⁴⁰ found that BMI was inversely correlated with plasma SHBG concentrations in 25 healthy Chinese women. In that study, SHBG was also negatively correlated with insulin. Using a 3-day dietary record, specific nutrients predicting SHBG levels could be identified after statistical adjustment for BMI. The strongest predictors of SHBG concentrations were the intake of rice, millet and wheat.⁴⁰ A study including 640 premenopausal (153 meat-eaters, 332 vegetarians and 38 vegans) and 457 postmenopausal women (223 meat-eaters, 196 vegetarians, 38 vegans) found that BMI was significantly lower in vegetarians and vegans compared to meat-eaters. However, no difference was found in SHBG levels after statistical adjustment for BMI.⁴¹ Conversely, Armstrong et al.³⁶, found that for a similar BMI, vegetarian postmenopausal women had higher levels of SHBG compared to non-vegetarian postmenopausal women. Another study including 27 postmenopausal women (9 vegetarians, 10 omnivores and 8 women with breast cancer) found that SHBG levels were lower in vegetarians than in omnivores but this difference was not significant. Interestingly, in the latter study, BMI and body weight were significantly higher in the vegetarian group.⁴² In that particular sample, differences in weight and BMI were quite surprising and diverged from results usually obtained when vegetarians and omnivores are compared. Nevertheless, lower BMI values were associated with higher SHBG levels. These findings are of interest because the effect of adiposity seems more important than the effect of diet composition *per se*. This study also found a negative correlation between protein intake and SHBG levels.⁴² Finally, a study examined the impact of dietary fiber intake on SHBG levels in 205 premenopausal women. The authors found that SHBG was significantly lower in women that consumed between 1.7 to 7 fruit portions compared to those consuming less than 0.6 portions a day,⁴³ but no association was found between intakes of vegetables or whole grains, total dietary fiber and SHBG levels. In short, cross-sectional studies

in women found divergent results and no clear conclusions can be drawn regarding the independent effect of diet on circulating SHBG levels.

Circulating androgens

Regarding androgen levels and their association with eating habits or specific nutrients, results are also relatively divergent in men. A study including 696 healthy men observed that men eating a vegan diet had higher testosterone levels³⁷. However, in the same sample, despite the type of diet, men who had a BMI above 30 kg/m² had 30% lower testosterone levels and 5% lower free-T levels in association with a reduced SHBG level, which suggests an impact of BMI itself.⁷ Another study found that in men consuming a vegan diet, free-T levels were 3% lower and total testosterone levels were 7% higher in vegans, but these differences were not significant. These results were found in association with higher levels of SHBG in vegans after statistical adjustment for BMI, age and alcohol intake.³⁸ In contrast, Field et al.⁹ found a proportionally lower 4-dione, total testosterone and DHT with increasing relative weight. In another study by Wu et al.³⁹, BMI and body weight were negatively associated with testosterone, free testosterone and DHT levels. Tamimi et al.⁴⁴ found that testosterone levels were inversely correlated with total lipids, proteins, and positively correlated with carbohydrate intake, without any impact of adiposity measures. According to these studies in men, divergent results were found and no clear conclusions can be drawn regarding diet and androgen levels.

Associations between diet and androgenic status in women are also equivocal. In Chinese women, BMI was inversely correlated with SHBG levels whereas testosterone was significantly and positively associated BMI. When looking at specific nutrients, testosterone levels were also positively associated with wheat intake, but inversely correlated with rice and green vegetable intakes.⁴⁰ In a study where postmenopausal and premenopausal women were examined, American Caucasian and new immigrant Oriental women were compared. Oriental women had lower testosterone and 4-dione levels independent of menopausal status and BMI.⁴⁵ Adlercreutz et al.⁴² studied sex hormone levels in omnivores (n=10) versus vegetarians (n=9) and concluded that vegetarians had significant higher levels of 4-dione compared to omnivores. The same study found that fat intake was positively correlated with 4-dione, testosterone and free-T, whereas carbohydrate, grain, total fiber, and grain fiber intake showed opposite correlations

with these hormones. These authors also found that protein intake was positively correlated with free-T.⁴² When no difference in BMI was observed between omnivore (n=10) and vegetarian premenopausal women (n=10), Goldin et al.⁴⁶, found that vegetarians had 11% higher levels of 4-dione but similar levels of testosterone. Armstrong et al.³⁶, also compared vegetarians (n=46) and non-vegetarians (n=47) and found no difference in plasma testosterone concentrations, despite the fact that vegetarians had higher levels of SHBG (though not significantly). Finally, in 205 premenopausal women, higher dietary fiber intake and consumption of fruits were significantly associated with lower 4-dione levels. In that study, testosterone levels were not measured.⁴³ In summary, no general consensus emerges from studies which have examined diet and androgen levels in both men and women.

PLAUSIBLE MECHANISMS

In summary, our review of the literature indicates that the levels of obesity and insulin may be critical determinants of the link between diet and androgen or SHBG levels (Figure 1). Several mechanisms could explain these effects. First of all, diet could modulate SHBG levels by acting on insulin levels. As mentioned, studies showed that diet leading to weight loss and an improvement in insulinemia is associated with increased SHBG levels, especially in women with PCOS.^{11,23-25} A study by Plymate et al.⁴⁷, showed a direct effect of insulin on hepatocyte SHBG secretion. Furthermore, Nestler et al.⁴⁸ showed that suppression of insulin release by diazoxide treatment for 10 days induced significant increases in SHBG levels in women with PCOS. These results suggest that the relationship between diet, weight loss and low SHBG could be explained by an improvement in insulin sensitivity and/or reduced insulinemia. Second, the effect of diet on SHBG could also be explained by cortisol production. Cortisol inhibits SHBG production⁴⁹ and patients with abdominal obesity and insulin resistance are characterized by an increased local cortisol production in abdominal adipose tissue.^{50,51} Elevated cortisol production could possibly explain the lower levels of SHBG associated with an elevated BMI. In addition, weight loss leading to improved cortisol homeostasis could mediate an important portion of dietary effects on SHBG. Third, plasma levels of SHBG are also regulated by androgens and estrogens.⁴⁹ An increased local conversion of androgens to estrogens or inactive androgen metabolites in an enlarged adipose tissue mass⁵² could also contribute to modulate the androgen/estrogen balance and modulate SHBG levels. With weight

loss, this balance could be slightly altered leading to an increase in SHBG levels. However, it must be kept in mind that we did not reach firm conclusions regarding the effects of diet on androgen levels. Finally, dietary fiber could contribute to explain the effect of diet on SHBG. Soluble dietary fibers have been shown to reduce postprandial glucose levels and improve insulin sensitivity.^{53,54} This improvement in glucose-insulin homeostasis could be associated with an increase in SHBG levels.

CONCLUSION

Because of the disparities between studies such as inclusion and exclusion criteria, sex and age, metabolic status and hormonal status, sample size, length of the study, type of diet, etc., firm conclusions cannot be reached regarding the effects of diet on androgens. Generally, consistent results were found regarding SHBG levels. Reduced caloric intake leading to significant weight loss increases SHBG levels in women, regardless of diet composition. The same trend is observed in men, more particularly in obese. When looking at cross-sectional studies, elevated weight, BMI or adiposity are generally associated with lower SHBG levels. However, no clear association can be ascertained regarding the effect of different eating habits independent of adiposity. We could not clearly identify any nutrient consistently having a direct, independent impact on circulating androgen concentrations or plasma SHBG levels when body fatness was taken into account. In conclusion, the possibility of modulating sex hormone levels has been examined in the studies reviewed here. Consistent with epidemiological data showing that obesity has been associated with increased rates of cancers,⁵⁵ including hormone-dependent cancers such as breast⁵⁶ and prostate cancers,⁵⁷ we suggest that dietary effects can be expected if body weight, fatness and/or insulin homeostasis are modulated.

REFERENCES

1. Berrino F, Bellati C, Ooldani S, Mastroianni A, Allegro G, Berselli E et al. DIANA trials on diet and endogenous hormones. *IARC Sci Publ* 2002; 156:439-444.
2. Tchernof A, Després JP. Sex steroid hormones, sex hormone-binding globulin, and obesity in men and women. *Horm Metab Res* 2000; 32:526-536.
3. Tchernof A, Labrie F. Dehydroepiandrosterone, obesity and cardiovascular disease risk: a review of human studies. *Eur J Endocrinol* 2004; 151(1):1-14.
4. Legro RS. The genetics of obesity. Lessons for polycystic ovary syndrome. *Ann N Y Acad Sci* 2000; 900:193-202.
5. Blouin K, Boivin A, Tchernof A. Androgens and body fat distribution. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2008; 108(3-5):272-280.
6. Blouin K, Robitaille J, Bélanger C, Fontaine-Bisson B, Couture P, Vohl M-C et al. Effect of a six-week National Cholesterol Education Program step 1 diet on plasma sex hormone-binding globulin levels in overweight premenopausal women. *Metabolic Syndrome and related disorders* 2007; 5(1):34-45.
7. Allen NE, Appleby PN, Davey GK, Key TJ. Lifestyle and nutritional determinants of bioavailable androgens and related hormones in British men. *Cancer Causes Control* 2002; 13(4):353-363.
8. Vermeulen A. Physiology of the testosterone-binding globulin in man. *Ann N Y Acad Sci* 1988; 538:103-111.
9. Field AE, Colditz GA, Willett WC, Longcope C, McKinlay JB. The relation of smoking, age, relative weight, and dietary intake to serum adrenal steroids, sex hormones, and sex hormone-binding globulin in middle-aged men. *J Clin Endocrinol Metab* 1994; 79(5):1310-1316.
10. Tymchuk CN, Tessler SB, Barnard RJ. Changes in sex hormone-binding globulin, insulin, and serum lipids in postmenopausal women on a low-fat, high-fiber diet combined with exercise. *Nutr Cancer* 2000; 38(2):158-162.
11. Franks S, Kiddy DS, Hamilton-Fairley D, Bush A, Sharp PS, Reed MJ. The role of nutrition and insulin in the regulation of sex hormone binding globulin. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1991; 39(5B):835-838.
12. Berrino F, Bellati C, Secreto G, Camerini E, Pala V, Panico S et al. Reducing bioavailable sex hormones through a comprehensive change in diet: the diet and androgens (DIANA) randomized trial. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2001; 10(1):25-33.

13. Kaaks R, Bellati C, Venturelli E, Rinaldi S, Secreto G, Biessy C et al. Effects of dietary intervention on IGF-I and IGF-binding proteins, and related alterations in sex steroid metabolism: the Diet and Androgens (DIANA) Randomised Trial. *Eur J Clin Nutr* 2003; 57(9):1079-1088.
14. Walker KZ, O'Dea K, Nicholson GC. Dietary composition affects regional body fat distribution and levels of dehydroepiandrosterone sulphate (DHEAS) in post-menopausal women with Type 2 diabetes. *Eur J Clin Nutr* 1999; 53(9):700-5.
15. Jacques H, Noreau L, Moorjani S. Effects on plasma lipoproteins and endogenous sex hormones of substituting lean white fish for other animal-protein sources in diets of postmenopausal women. *Am J Clin Nutr* 1992; 55(4):896-901.
16. Tremblay F, Lavigne C, Jacques H, Marette A. Role of dietary proteins and amino acids in the pathogenesis of insulin resistance. *Annu Rev Nutr* 2007; 27:293-310.
17. Goldin BR, Woods MN, Spiegelman DL, Longcope C, Morrill-LaBrode A, Dwyer JT et al. The effect of dietary fat and fiber on serum estrogen concentrations in premenopausal women under controlled dietary conditions. *Cancer* 1994; 74(3 Suppl):1125-1131.
18. Longcope C, Feldman HA, McKinlay JB, Araujo AB. Diet and sex hormone-binding globulin. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; 85(1):293-296.
19. Bennett FC, Ingram DM. Diet and female sex hormone concentrations: an intervention study for the type of fat consumed. *Am J Clin Nutr* 1990; 52(5):808-812.
20. Woods MN, Barnett JB, Spiegelman D, Trail N, Hertzmark E, Longcope C et al. Hormone levels during dietary changes in premenopausal African-American women. *J Natl Cancer Inst* 1996; 88(19):1369-1374.
21. Gann PH, Chatterton RT, Gapstur SM, Liu K, Garside D, Giovanazzi S et al. The effects of a low-fat/high-fiber diet on sex hormone levels and menstrual cycling in premenopausal women: a 12-month randomized trial (the diet and hormone study). *Cancer* 2003; 98(9):1870-1879.
22. Rock CL, Flatt SW, Thomson CA, Stefanick ML, Newman VA, Jones LA et al. Effects of a high-fiber, low-fat diet intervention on serum concentrations of reproductive steroid hormones in women with a history of breast cancer. *J Clin Oncol* 2004; 22(12):2379-2387.
23. Moran LJ, Noakes M, Clifton PM, Tomlinson L, Norman RJ. Dietary composition in restoring reproductive and metabolic physiology in overweight women with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88(2):812-9.
24. Kiddy DS, Hamilton-Fairley D, Seppala M, Koistinen R, James VH, Reed MJ et al. Diet-induced changes in sex hormone binding globulin and free testosterone in women with normal or polycystic ovaries: correlation with serum insulin and insulin-like growth factor-I. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1989; 31(6):757-763.

25. Crave JC, Fimbel S, Lejeune H, Cugnardey N, Dechaud H, Pugeat M. Effects of diet and metformin administration on sex hormone-binding globulin, androgens, and insulin in hirsute and obese women. *J Clin Endocrinol Metab* 1995; 80(7):2057-2062.
26. Wang C, Catlin DH, Starcevic B, Heber D, Ambler C, Berman N et al. Low-fat high-fiber diet decreased serum and urine androgens in men. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; 90(6):3550-3559.
27. Volek JS, Sharman MJ, Love DM, Avery NG, Gomez AL, Scheett TP et al. Body composition and hormonal responses to a carbohydrate-restricted diet. *Metabolism* 2002; 51(7):864-70.
28. Hamalainen E, Adlercreutz H, Puska P, Pietinen P. Diet and serum sex hormones in healthy men. *J Steroid Biochem* 1984; 20(1):459-464.
29. Niskanen L, Laaksonen DE, Punnonen K, Mustajoki P, Kaukua J, Rissanen A. Changes in sex hormone-binding globulin and testosterone during weight loss and weight maintenance in abdominally obese men with the metabolic syndrome. *Diabetes Obes Metab* 2004; 6(3):208-215.
30. Kaukua J, Pekkarinen T, Sane T, Mustajoki P. Sex hormones and sexual function in obese men losing weight. *Obes Res* 2003; 11(6):689-694.
31. Pritchard J, Despres JP, Gagnon J, Tchernof A, Nadeau A, Tremblay A et al. Plasma adrenal, gonadal, and conjugated steroids before and after long-term overfeeding in identical twins. *J Clin Endocrinol Metab* 1998; 83(9):3277-3284.
32. Anderson KE, Rosner W, Khan MS, New MI, Pang SY, Wissel PS et al. Diet-hormone interactions: protein/carbohydrate ratio alters reciprocally the plasma levels of testosterone and cortisol and their respective binding globulins in man. *Life Sci* 1987; 40(18):1761-1768.
33. Hainer V, Kunesova M, Stunkard AJ, Parizkova J, Stich V, Mikulova R et al. The within-pair resemblance in serum levels of androgens, sex-hormone binding globulin and cortisol in female obese identical twins - effect of negative energy balance induced by very low-calorie diet. *Horm Metab Res* 2001; 33(7):417-422.
34. Hill P, Wynder EL, Garbaczewski L, Walker AR. Effect of diet on plasma and urinary hormones in South African black men with prostatic cancer. *Cancer Res* 1982; 42(9):3864-9.
35. Dorgan JF, Judd JT, Longcope C, Brown C, Schatzkin A, Clevidence BA et al. Effects of dietary fat and fiber on plasma and urine androgens and estrogens in men: a controlled feeding study. *Am J Clin Nutr* 1996; 64(6):850-855.
36. Armstrong BK, Brown JB, Clarke HT, Crooke DK, Hahnel R, Masarei JR et al. Diet and reproductive hormones: a study of vegetarian and nonvegetarian postmenopausal women. *J Natl Cancer Inst* 1981; 67(4):761-767.

37. Allen NE, Appleby PN, Davey GK, Key TJ. Hormones and diet: low insulin-like growth factor-I but normal bioavailable androgens in vegan men. *Br J Cancer* 2000; 83(1):95-7.
38. Key TJ, Roe L, Thorogood M, Moore JW, Clark GM, Wang DY. Testosterone, sex hormone-binding globulin, calculated free testosterone, and oestradiol in male vegans and omnivores. *Br J Nutr* 1990; 64(1):111-119.
39. Wu AH, Whittemore AS, Kolonel LN, John EM, Gallagher RP, West DW et al. Serum androgens and sex hormone-binding globulins in relation to lifestyle factors in older African-American, white, and Asian men in the United States and Canada. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1995; 4(7):735-741.
40. Gates JR, Parpia B, Campbell TC, Junshi C. Association of dietary factors and selected plasma variables with sex hormone-binding globulin in rural Chinese women. *Am J Clin Nutr* 1996; 63(1):22-31.
41. Thomas HV, Davey GK, Key TJ. Oestradiol and sex hormone-binding globulin in premenopausal and post-menopausal meat-eaters, vegetarians and vegans. *Br J Cancer* 1999; 80(9):1470-1475.
42. Adlercreutz H, Hamalainen E, Gorbach SL, Goldin BR, Woods MN, Dwyer JT. Diet and plasma androgens in postmenopausal vegetarian and omnivorous women and postmenopausal women with breast cancer. *Am J Clin Nutr* 1989; 49(3):433-442.
43. Maskarinec G, Morimoto Y, Takata Y, Murphy SP, Stanczyk FZ. Alcohol and dietary fibre intakes affect circulating sex hormones among premenopausal women. *Public Health Nutr* 2006; 9(7):875-881.
44. Tamimi R, Mucci LA, Spanos E, Lagiou A, Benetou V, Trichopoulos D. Testosterone and oestradiol in relation to tobacco smoking, body mass index, energy consumption and nutrient intake among adult men. *Eur J Cancer Prev* 2001; 10(3):275-280.
45. Goldin BR, Adlercreutz H, Gorbach SL, Woods MN, Dwyer JT, Conlon T et al. The relationship between estrogen levels and diets of Caucasian American and Oriental immigrant women. *Am J Clin Nutr* 1986; 44(6):945-953.
46. Goldin BR, Adlercreutz H, Gorbach SL, Warram JH, Dwyer JT, Swenson L et al. Estrogen excretion patterns and plasma levels in vegetarian and omnivorous women. *N Engl J Med* 1982; 307(25):1542-1547.
47. Plymate SR, Matej LA, Jones RE, Friedl KE. Inhibition of sex hormone-binding globulin production in the human hepatoma (Hep G2) cell line by insulin and prolactin. *J Clin Endocrinol Metab* 1988; 67(3):460-464.
48. Nestler JE, Powers LP, Matt DW, Steingold KA, Plymate SR, Rittmaster RS et al. A direct effect of hyperinsulinemia on serum sex hormone-binding globulin levels in obese women with the polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 1991; 72(1):83-89.

49. Rosner W. Plasma steroid-binding proteins. *Endocrinol Metab Clin North Am* 1991; 20(4):697-720.
50. Yang K, Khalil MW, Strutt BJ, Killinger DW. 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase 1 activity and gene expression in human adipose stromal cells: effects on aromatase activity. *J Steroid Biochem Molec Biol* 1997; 60:247-253.
51. Bujalska IJ, Kumar S, Stewart PM. Does central obesity reflect "Cushing's disease of the omentum"? *Lancet* 1997; 349:1210-1213.
52. Deslypere JP, Verdonck L, Vermeulen A. Fat tissue: a steroid reservoir and site of steroid metabolism. *J Clin Endocrinol Metab* 1985; 61:564-570.
53. Galisteo M, Duarte J, Zarzuelo A. Effects of dietary fibers on disturbances clustered in the metabolic syndrome. *J Nutr Biochem* 2007.
54. Hanai H, Ikuma M, Sato Y, Iida T, Hosoda Y, Matsushita I et al. Long-term effects of water-soluble corn bran hemicellulose on glucose tolerance in obese and non-obese patients: improved insulin sensitivity and glucose metabolism in obese subjects. *Biosci Biotechnol Biochem* 1997; 61(8):1358-1361.
55. McTiernan A. Obesity and cancer: the risks, science, and potential management strategies. *Oncology (Williston Park)* 2005; 19(7):871-881.
56. Harvie M, Hooper L, Howell AH. Central obesity and breast cancer risk: a systematic review. *Obes Rev* 2003; 4(3):157-173.
57. Presti JC, Jr. Obesity and prostate cancer. *Curr Opin Urol* 2005; 15(1):13-16.

Table 1 - Changes in SHBG levels, adiposity measures and insulinemia in women undergoing dietary intervention studies

<i>Study</i>	<i>Population</i>	<i>Design</i>	<i>Intervention</i>	<i>Results</i>
Berrino et al., (2001) ^{12*}	104 postmenopausal women (50-65 years)	Randomized controlled trial	Dietary counselling and cooking classes to maintain 4.5-month <i>ad libitum</i> Mediterranean vegetarian diet (n=52) or usual standard diet (control diet) (n=52)	↓ body weight (p≤0.0001), ↓ BMI (p≤0.0001) and ↑ SHBG (p≤0.0001) in the intervention group No insulin measurements
Kaaks et al., (2003) ^{13*}	99 postmenopausal women (50-65 years)	Randomized controlled trial	Dietary counselling and cooking classes to maintain 4.5-month <i>ad libitum</i> Mediterranean vegetarian diet (n=50) or usual standard diet (control diet) (n=49)	↓ body weight (p≤0.0001), ↓ BMI (p≤0.0001), ↑ SHBG (p≤0.0001), ↓ insulin area (p=0.04) and ↓ fasting glucose (p=0.03) in the intervention group
Tymchuck et al., (2000) ^{10*}	22 postmenopausal women (64.1 ± 1.7 years)	Diet change	3-week low-fat (10% fat calories) high-fiber diet (35-40g/1000kcal/day) in all women (11 women on HRT and 11 women not on HRT)	↓ body weight (p≤0.01), ↓ BMI (p≤0.01), ↓ serum insulin (p≤0.01) and ↑ SHBG (p≤0.01) in all women
Walker et al., (1999) ^{14*}	34 women with type 2 diabetes (58.0 ± 7.0 years)	Randomized cross-over trial	12-week high-CHO diet (60% CHO calories) and 12-week high-MUFA diet (20% MUFA fat calories) in random order (4-week washout) in all women	↓ total body fat mass (p=0.02), no significant change in body weight and no significant change in SHBG No insulin measurements
Blouin et al., (2007) ^{6*}	35 premenopausal overweight women (38.6 ± 7.4 years)	Randomized controlled trial	6-week NCEP Step 1 diet (<30% of total energy from fat, <10% of energy from saturated fat) with (intervention diet) (n=18) or without an oat bran supplementation (control diet) (n=17)	↓ body weight (p=0.005), ↓ BMI (p=0.005), ↑ SHBG (p=0.0005) and no significant change in fasting insulin in both groups
Jacques et al., (1992) ¹⁵	15 postmenopausal women (62.5 ± 0.3 years)	Randomized cross-over trial	4-week lean-white-fish (LWF) diet and 4-week beef, pork, egg and milk (BPEM) diet in random order (no washout)	No significant change in body weight and ↑ SHBG (p≤0.01) with LWF diet No insulin measurements

<i>Study</i>	<i>Population</i>	<i>Design</i>	<i>Intervention</i>	<i>Results</i>
Goldin et al., (1994) ¹⁷	48 premenopausal women (27.1 ± 4.3 years)	Diet change	4-week high-fat (40% fat calories) low-fiber (12g/day) diet (control diet) followed by 8-10 week isocaloric low-fat (20-25% fat calories) high-fiber (40g/day) diet in all women	No significant change in body weight and ↓ SHBG (p≤0.001) with low-fat high-fiber diet No insulin measurements
Bennett et al., (1990) ^{19*}	39 premenopausal women (21-52 years)	Randomized controlled trial	3-month vegetarian diet (n=13) or 3-month fish diet (n=13) or 3-month usual standard diet (control diet) (n=13)	No significant change in body weight and no significant change in SHBG for all diets No insulin measurements
Woods et al., (1996) ^{20*}	21 premenopausal women (26.7 ± 5.1 years)	Diet change	3-week high-fat (40% fat calories) low-fiber (12g/day) diet (control diet) followed by 7-10-week isocaloric low-fat (20% fat calories) high-fiber (40g/day) diet in all women	No significant change in body weight and no significant change in SHBG with low-fat high-fiber diet No insulin measurements
Gann et al., (2003) ^{21*}	213 premenopausal women (20-40 years)	Randomized controlled trial	18 group classes and 2 individual meetings to maintain 1-year isocaloric low-fat (20% fat calories) high-fiber (25g/day) diet (with at least 8 servings of fruits/day) (n=106) or usual standard diet (control diet) (n=106)	No significant change in body weight, no significant change in BMI and no significant change in SHBG in the intervention group No insulin measurements
Rock et al., (2004) ^{22*}	291 women with history of breast cancer (57.0 ± 8.0 years)	Randomized controlled trial	1-year low-fat (21% fat calories) high-fiber (29g/day) diet (n=153) or usual standard diet (control diet) (n=138)	No significant change in body weight and no significant change in SHBG in the intervention group No insulin measurements
Moran et al., (2003) ^{23*}	28 overweight women with PCOS (33.0 ± 0.8 years)	Randomized controlled trial	12-week energy-restricted diet low in protein (15% protein calories) (n=14) or high in protein (30% protein calories) (n=14) followed by a 4-week period of weight maintenance	↓ total body fat mass (p≤0.001), ↓ fasting insulin (p≤0.001), ↓ HOMA index (p≤0.001) and ↑ SHBG (p=0.03) in both groups
Kiddy et al., (1989) ^{24*}	5 overweight women with PCOS and 6 normal weight women (age NR)	Diet change	2-4-week VLCD (330 kcal) in all women	↓ body weight (p=NR) and ↑ SHBG (p≤0.02) after 2 weeks in both groups ↓ fasting insulin (p≤0.05) in women with PCOS after 2 and 4 weeks

<i>Study</i>	<i>Population</i>	<i>Design</i>	<i>Intervention</i>	<i>Results</i>
Franks et al., (1991) ^{11*}	263 women with PCOS (age NR)	Diet change	2-week VLCD (350 kcal) in all women and 6-7 month LCD (1000 kcal) in a subgroup of 24 women	↓ body weight (p=NR), ↓ fasting insulin (p=NR) and ↑ SHBG (p=NR) for both protocols
Crave et al., (1995) ^{25*}	24 obese hirsute women (age NR)	Randomized controlled trial	4-month LCD (1500 kcal) with or without metformin administration	↓ BMI (p≤0.00001), ↓ fasting insulin (p≤0.01) and ↑ SHBG (p≤0.001) with low calorie diet without metformin administration

NR: not-reported in the original article; HRT: hormone replacement therapy; CHO: carbohydrate; MUFA: monounsaturated fatty acid; NCEP: National Cholesterol Education Program; LCD: low-calorie diet; VLCD: very-low-calorie diet

* These studies observed an inverse association between SHBG levels and adiposity measures (87% of all studies listed).

Table 2 - Changes in SHBG levels, adiposity measures and insulinemia in men undergoing dietary intervention studies

<i>Study</i>	<i>Population</i>	<i>Design</i>	<i>Intervention</i>	<i>Results</i>
Wang et al., (2005) ²⁶	39 healthy men (54.2 ± 0.5 years)	Diet change	Usual standard diet (baseline diet) followed by 8-week isocaloric low-fat high-fiber diet	↓ body weight (p=0.002), ↓ BMI (p=0.003) and ↓ SHBG (p=0.01) after the intervention period No insulin measurements
Volek et al., (2002) ²⁷	20 healthy men (36.7 ± 11.6 years)	Randomized controlled trial	6-week CHO-restricted diet (8% CHO) (n=12) or usual standard diet (control diet) (48% carbohydrate) (n=8)	↓ body weight (p≤0.05), ↓ total body fat mass (p≤0.05), ↓ serum insulin (p≤0.01) and no significant change in SHBG in the intervention group
Hamalainen et al., (1984) ²⁸	30 healthy men (40-49 years)	Diet change	2-week usual standard diet followed by 6-week low-fat diet transferred back to 6-week usual standard diet.	↓ body weight (p=NR) and ↓ SHBG (p≤0.07) after the intervention period No insulin measurements
Niskanen et al., (2004) ^{29*}	58 obese men (46.3 ± 7.5)	Diet change	Usual standard diet (baseline diet) followed by 9-week very low-calorie diet (800 kcal), followed by 12-week weight maintenance	↓ body weight (p≤0.001), ↑ insulin sensitivity (QUICKI) and ↑ SHBG (p≤0.001) after the intervention period
Kaukua et al., (2003) ^{30*}	38 obese men (46.6 ± 9.9 years)	Randomized controlled trial	4-month weight loss program including 10-week on a very-low-calorie diet and 17 behaviour visits (n=19) or no intervention in the control group (n=19), 8-month follow-up	↓ body weight (p≤0.001), ↓ BMI (p≤0.001), ↓ serum insulin (p≤0.001) and ↑ SHBG (p≤0.001) after the intervention and the follow-up period
Pritchard et al., (1998) ^{31*}	12 pairs of male twins (21.0 ± 2.0 years)	Diet change	100 days of overfeeding (1000 kcal energy excess/day) for all pairs of twins	↑ body fat mass (p≤0.0001), ↑ BMI (p≤0.0001) and ↓ SHBG (p≤0.0001) for all pairs of twins after the intervention No insulin measurements
Anderson et al., (1987) ³²	7 healthy men (22-43 years)	Diet change	10-day high-protein diet (44% proteins calories) followed by 10-day isocaloric high-CHO diet (70% carbohydrate calories) for all men	No significant change in body weight and ↑ SHBG (p≤0.01) with the high-carbohydrate diet No insulin measurements

NR: not-reported in the original article; CHO: carbohydrate;

* These studies observed an inverse association between SHBG levels and adiposity measures (43% of all studies listed).

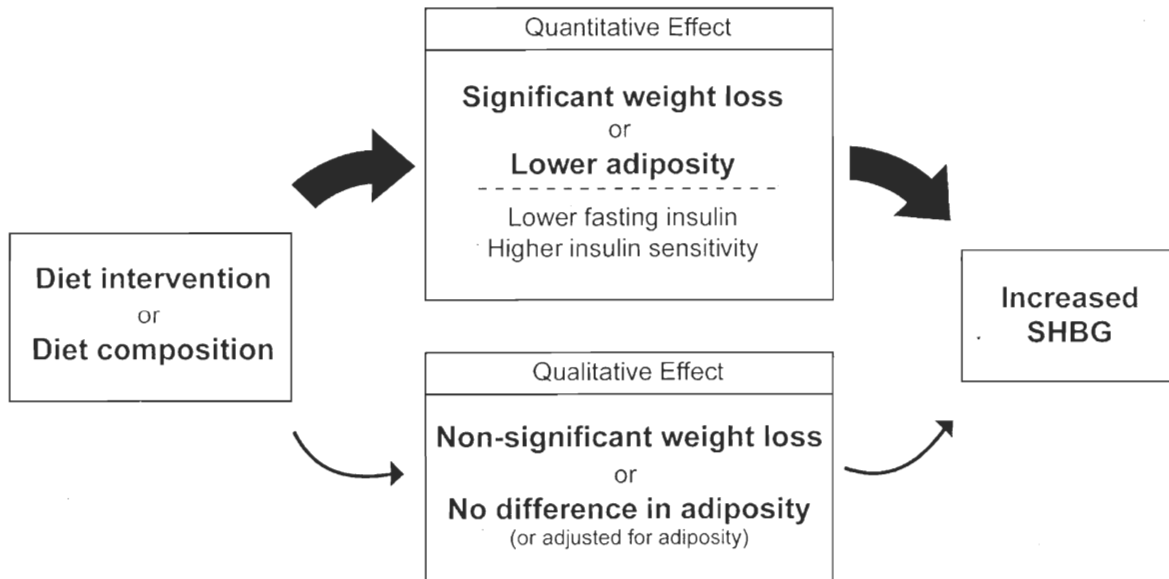


Figure 1 - Pathways by which diet intervention or diet composition could impact circulating SHBG levels. The majority of studies seem to indicate that diet interventions reducing caloric intake leading to significant weight loss increase SHBG levels, regardless of diet composition.

Chapitre 3 : Impact d'une alimentation riche en lignanes sur le profil métabolique de la femme ménopausée.

*Article soumis dans la revue **British Journal of Nutrition***

Résumé

L'objectif de ce dernier chapitre consiste à comparer le profil métabolique de 115 femmes ménopausées (âge: 56.8 ± 4.4 ans, IMC: 28.5 ± 5.9 kg/m²) consommant des quantités variables de lignanes. Pour ce faire, l'apport en phytoestrogènes a été déterminé à l'aide d'un journal alimentaire de 3 jours analysé avec une base de données canadienne. Les concentrations plasmatiques d'entérolactone (ENL) ont été déterminées par immunofluorométrie. Le profil métabolique a été établi à l'aide de mesures anthropométriques, d'une tomographie axiale, de clamps hypersulinémique-euglycémique et d'un test de tolérance au glucose (OGTT). Les femmes du quartile supérieur de consommation de lignanes (n=29) avaient un IMC et une masse grasse significativement plus faibles ainsi qu'une meilleure sensibilité à l'insuline ($p < 0.05$), comparativement aux femmes du quartile inférieur de consommation de lignanes. La majorité des femmes ayant l'alimentation la plus riche en lignanes s'est également retrouvée dans le quartile supérieur de concentrations plasmatiques d'ENL (59%). Les femmes du quartile supérieur de concentrations plasmatiques d'ENL (n=28) avaient un IMC (26.1 ± 4.4 vs. 30.4 ± 6.9 kg/m², $p < 0.05$), une masse grasse totale (24.8 ± 9.8 vs. 33.3 ± 13.3 kg, $p < 0.05$), une glycémie 2h post OGTT (5.50 ± 0.88 vs. 5.65 ± 0.82 nmol/L, $p < 0.05$) significativement plus faibles ainsi qu'une meilleure sensibilité à l'insuline (8.31 ± 2.65 vs. 5.52 ± 2.75 , $p < 0.01$) que les femmes du quartile inférieur des concentrations plasmatiques d'ENL (n=29). En bref, les concentrations plasmatiques d'ENL reflètent les apports alimentaires en lignanes déterminés à l'aide des journaux alimentaires et ce, particulièrement chez les femmes ayant des apports élevés. Ces dernières avaient un meilleur profil métabolique, caractérisé par une plus grande sensibilité à l'insuline et par de plus faibles mesures d'adiposité.

Impact of a lignan-rich diet on the metabolic profile in post-menopausal women

Anne-Sophie Morisset^{1,2}, Simone Lemieux^{2,3}, Alain Veilleux^{1,2}, Jean Bergeron⁴, S. John Weisnagel^{4,5}, André Tchernof^{1,2}

1 Molecular Endocrinology and Oncology Research Center 2 Department of Food Science and Nutrition 3 Institute of Nutraceuticals and Functional Foods 4 Lipid Research Center 5 Diabetes Research Unit, Laval University Medical Research Center, 2705 Laurier Blvd. (T3-67), Qc, Canada, and Laval University, Qc, Canada, G1V 0A6

Address for correspondence: André Tchernof, Ph.D.
Molecular Endocrinology and Oncology Research Center
Department of Nutrition
Laval University Medical Research Center
2705 Laurier Blvd. (T3-67)
Québec, (Québec)
CANADA G1V 4G2
Tel: (418) 654-2296
Fax: (418) 654-2761
E-mail: andre.tchernof@crchul.ulaval.ca

Running title: Lignan-rich diet and the metabolic profile

Key words: Phytoestrogens, lignans, adiposity, insulin sensitivity

ABSTRACT

Background: There has been a growing interest in lignans, a class of phytoestrogens, because of their potentially favorable effects on human health. **Objective:** To compare the metabolic profile of women consuming various amounts of dietary lignans. **Design:** Phytoestrogen intake was assessed using a 3-day dietary record analyzed with a Canadian food phytoestrogen content data table in 115 postmenopausal women (age: 56.8 ± 4.4 years, BMI: 28.5 ± 5.9 kg/m²). Plasma enterolactone (ENL), the major biologically active metabolite of dietary lignans, was determined by time-resolved fluoroimmunoassay. Anthropometrics, abdominal adipose tissue areas (computed tomography), body composition (hydrostatic weighing) and insulin sensitivity (hyperinsulinemic-euglycemic clamp) were measured in all women. **Results:** Women in the high dietary lignan intake subgroup (n=29) had a significantly lower BMI and total body fat mass as well as a better glucose disposal rate ($p < 0.05$) compared to women in the low lignan intake (n=28). The majority of women with the highest dietary lignan intake were also in the highest quartile of plasma ENL (59%). Women in the highest ENL quartile had significantly lower BMI (26.1 ± 4.4 vs. 30.4 ± 6.9 kg/m², $p < 0.05$), total body fat mass (24.8 ± 9.8 vs. 33.3 ± 13.3 kg, $p < 0.05$), 2h postload glycemia (5.5 ± 0.9 vs. 5.7 ± 0.8 nmol/L, $p < 0.05$) and a higher glucose disposal rate (8.3 ± 2.7 vs. 5.5 ± 2.8 , $p < 0.01$) compared to women in the lowest ENL quartile. **Conclusion:** Dietary record-assessed lignan consumption was relatively concordant with plasma ENL concentrations. Women with the highest ENL concentrations had a better metabolic profile including higher insulin sensitivity and lower adiposity measures.

INTRODUCTION

Changes in lifestyle, eating habits and introduction of healthier behaviors have been proposed as valid approaches to prevent or treat obesity and the metabolic complications generally associated with this condition ¹. Diets rich in vegetables, fruits and whole grain products, which are generally characterized by high fiber and low fat content are currently recommended ². Evidence suggests that the consumption of lignan-rich diets, which contain vegetables, fruits and whole grains products, may protect against chronic diseases including cardiovascular diseases, colon cancer, breast cancer, endometrial cancer and menopausal symptoms ³⁻⁶.

The main dietary lignans are secoisolariciresinol (SEC), matairesinol (MAT), pinoresinol (PINO) and lariciresinol (LAR), found as glycosides in food ⁷. The major source of dietary lignans is flaxseed ^{7,8}. Sesame seeds, whole grain products, such as rye bread, fruits and vegetables, nuts and legumes also are important sources ⁷. Once in the colon, dietary lignans are transformed to mammalian lignans enterodiol (END) and enterolactone (ENL) by intestinal bacteria before reaching the circulation ^{3,9}. Consequently, the biological effects of lignans depend on bacterial production ⁹ which is in turn influenced by several factors such as antibiotic use, obesity, smoking and fat intake ^{3,10,11} as well as frequency of defecation ¹¹.

Only a few studies in humans have been published on the effects of a lignan-rich diet on adiposity measures or insulin sensitivity ¹²⁻¹⁵. Kilkinen and colleagues reported an inverse association between plasma ENL concentrations and body weight in women ¹³. A study in mice reported that the flaxseed lignan secoisolariciresinol diglucoside (SDG) reduced high fat-diet-induced visceral and liver lipid accumulation, dyslipidemia, hypercholesterolemia, hyperinsulinemia and hyperleptinemia ¹⁶. The potentially protective effect of mammalian lignans ENL and END on the metabolic profile may be due to their ability to interact with estrogen receptors ER α and ER β or other binding sites ^{3,9}.

The present study is the first specific examination of the association between lignan intake and the metabolic profile (adiposity measures and insulin sensitivity) using two lignan-related measures, that is, dietary lignan intake and plasma ENL concentrations. Our objective was to compare the metabolic profile of postmenopausal women consuming various amounts of lignans. We tested the

hypothesis that the majority of women consuming high amounts of dietary lignans would have higher plasma ENL concentrations and a better metabolic profile including lower adiposity measures and higher insulin sensitivity.

SUBJECTS AND METHODS

Subjects

Subjects of the study were recruited through the local newspapers of Quebec City (Qc, Canada). Each woman was individually interviewed to assess eligibility. Inclusion criteria were: age ≤ 70 yrs, postmenopausal status (absence of menses for at least 1 yr and levels of follicle-stimulating hormone ≥ 22 IU/L), weight stability (± 2.0 kg during the 3 months before testing). Women using HRT or treatment for coronary heart disease, diabetes, dyslipidemias, or endocrine disorders (except a stable dose of thyroxine for well-controlled hypothyroidism) were excluded. Data from women who did not complete the dietary record or for whom plasma enterolactone (ENL) measures could not be performed were not included in the study. A total of 115 women were included in our analysis. All women signed a consent form approved by the Medical Ethics Committee of Laval University.

Body fatness and body fat distribution measurements

Body composition was measured by the hydrostatic weighing technique¹⁷. The mean of six valid measurements was used to calculate body fat percentage with the equation of Siri¹⁸. Total, visceral and subcutaneous adipose tissue areas were assessed by computed tomography (GE High Speed Advantage CT scanner). Subjects were examined in the supine position, with arms stretched above the head. The scan was performed at the L4-L5 vertebrae level. Quantification of visceral adipose tissue area was performed by drawing a line within the muscle wall surrounding the abdominal cavity. Adipose tissue was highlighted and computed using an attenuation range of -190 to -30 Hounsfield units.

Glucose homeostasis measurements

A 75-g oral glucose tolerance test (OGTT) was performed in the morning after a 12-h overnight fast. Blood samples were collected in EDTA-containing tubes through a venous catheter from an antecubital vein at -15, 0, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 150, and 180 min for the determination of plasma glucose¹⁹. Blood glucose concentration was determined using a Glucometer-Elite (number 3903-E; Bayer Corporation Inc., Tarrytown, NY)²⁰. The interassay coefficient of variation was 1.0% for a basal glucose value set at 5.0 mmol/L. Insulin sensitivity was measured

using the hyperinsulinemic-euglycemic clamp technique as described by DeFronzo et al.²¹. After a 12-h overnight fast, insulin was administered intravenously (Humulin 40 mU/m² per minute) as a primed continuous infusion over 2-h. Blood glucose was monitored every 5 min during the insulin infusion and euglycemia was maintained during the clamp by infusing 20% dextrose at a variable rate. The glucose disposal rate (GDR) corresponds to the glucose infusion rate necessary to maintain euglycemia during the last 30 min of the clamp per kilogram of body weight. Insulin was measured using radioimmunoassay with polyethylene glycol separation²².

Plasma lipid-lipoprotein measurements

Blood samples were drawn after a 12-hour fast on the morning of the hyperinsulinemic-euglycemic clamp. Cholesterol and triglyceride level measurements in plasma were performed enzymatically with a Technicon RA-500 analyzer (Bayer Corp, Inc, Etobicoke, Ont.), and enzymatic reagents were obtained from Randox Laboratories (Crumlin, UK). Plasma lipoprotein fractions were isolated by ultracentrifugation²³. The HDL-cholesterol fraction was obtained after precipitation of LDL-cholesterol in the infranatant ($d > 1.006$ g/mL) with heparin and MnCl₂²⁴. The cholesterol and triglyceride content of the infranatant was measured before and after the precipitation step.

Food records and phytoestrogen intake

Dietary intake was evaluated through a 3-d food record including two weekdays and one weekend day. Guidelines for completing the food record were explained to participants by the registered dietician. Food items were weighed by each participant with a scale provided by the registered dietician. Nutrient intake was evaluated using the Nutrition Analysis Software Food Processor version 7.2. (ESHA Research, Salem, OR). Phytoestrogen intake was calculated for each woman using the 3-day dietary record analyzed with a Canadian food phytoestrogen content data table including lignans (secoisolariciresinol, matairesinol, pinoresinol and lariciresinol), isoflavones (genistein, daidzein, glycitein, formononetin) and coumestans (coumestrol)⁷. This database included 121 food items commonly consumed in Canada.

Plasma enterolactone measurements

Plasma enterolactone concentrations were determined by time-resolved fluoroimmunoassay (TR-FIA) using the method developed and validated by Aldlercreutz et al.²⁵. Briefly, 200 uL of plasma were incubated overnight at 37°C with 200 uL acetate buffer 0.1 M, pH 5.0 containing 2 U/ml sulfatase (Sigma, S9626) and 0.2 U/ml β -glucuronidase (Roche, 03707580001). Hydrolyzed enterolactone was extracted using ethyl-ether and concentrations were measured in a competitive immunoassay using a commercial kit (Labmaster, Turku, Finland). Fluorescence was quantified using a DELFIA Victor 3 multilabel counter (Wallac). To assess the extraction recovery, 20,000 CPM of tritium-labelled estradiol 17 β -glucoronide (American Radiolabeled Chemicals Inc., ART 1320) was added to each plasma sample. All measurements were adjusted using their individual recovery percentage. Average recovery percentage was 98.6%. Intra- and inter assay coefficients of 3.1-6.1 and 6.1-8.6, respectively, were reported by Stumpf et al.²⁶.

Physical activity record

Women filled a validated 3-day activity diary^{27,28} including two weekdays and one weekend day. A list of categorized activities was used to fill out their diary for each 15 min period. Activities were graded according to mean energy expenditure on a 1-9 scale: category 1 indicated activities of very low energy expenditure (ex: sleeping, resting in bed), category 6 indicated activities of moderate energy expenditure (ex: light manual work, light exercise such as playing golf or riding a bike) and category 9 indicated activities of very high energy expenditure (ex: running, intense manual work). We considered mean daily energy expenditure and frequency of participation for categories 6, 7, 8 or 9 (moderate to intense exercise), which have an energy cost ≥ 1.2 kcal/kg/15 min (≥ 4.8 MET's), using the following formula : moderate to intense exercise = (number of 15-min periods of category 6 X 1.2) + (number of 15-min periods of category 7 X 1.4) + (number of 15-min periods of category 8 X 1.5) + (number of 15-min periods of category 9 X 2). The average of moderate to intense exercise values over 3 days was used.

Statistical analyses

Since the consumption of lignans and ENL plasma concentrations were not normally distributed and did not normalize with mathematical transformations, analyses were performed using quartiles of lignan consumption or ENL plasma concentrations. For lignan consumption, quartile 1 was considered as the low dietary lignan intake subgroup and was compared to quartile 4,

considered as the high dietary lignan intake subgroup. ANOVA, Student's t tests, Tukey HSD and Wilcoxon tests were performed to compare means among these quartiles where appropriate. Adjustments for confounders were performed using least-square means compared with *a posteriori* mean contrasts. Spearman rank correlation coefficients were computed to quantify associations between lignan intakes and plasma ENL concentrations. The Kappa value was used to evaluate the concordance between ENL quartiles and lignan consumption quartiles. All statistical analyses were performed using the JMP statistical analysis software (SAS Institute, Cary, NC).

RESULTS

Characteristics of the sample of 115 post-menopausal women are shown in **Table I**. Women were 56.8 years old and were overweight with an average BMI of 28.5 kg/m². Adiposity values covered a wide spectrum, with total body mass ranging from 7.6 to 83.7 kg. The medians of total daily lignan intake and plasma ENL were 403 µg (interquartile range +3832/-243) and 22.5 mmol/L (interquartile range +18.1/-12.9), respectively.

Table II shows metabolic parameters in the high vs. low dietary lignan intake subgroups. Total daily lignan intake was 36084 ± 26917 µg for women in the high dietary lignan intake subgroup (n=29) compared to 115 ± 29 µg, for women in the low intake subgroup (n=28) (p≤0.0001). Plasma ENL concentrations were significantly higher in women of the high dietary lignan intake subgroup compared to women in the lowest intake subgroup. Women in the highest dietary lignan intake subgroup had a significantly lower BMI and total body fat mass as well as a higher glucose disposal rate compared to women in the low lignan intake subgroup. A trend for a lower waist circumference and total abdominal adipose tissue area as well as a trend for higher HDL-cholesterol was also observed in women of the high lignan intake subgroup compared to women with low lignan intake.

Women in the high lignan intake subgroup also had significantly higher intake in total, soluble and insoluble fiber (p<0.001), and a higher number of whole grain product, fruit and vegetable daily portions compared to women in the low lignan intake subgroup (3.8 ± 1.6 vs. 1.5 ± 1.3, p<0.0001 and 6.9 ± 2.2 vs. 5.0 ± 2.0, p<0.01, respectively). However, energy intake, energy macronutrient distribution, omega-3 fatty acid intake and physical activity were similar in these two subgroups (data not shown).

Women were further subdivided in quartiles of plasma ENL concentrations. Seventeen women (59 %) that were in the high dietary lignan intake subgroup quartile were also in the highest ENL quartile. Concordance between lignan consumption and plasma ENL concentrations (when comparing quartile 1, 2, 3, vs. 4) resulted in a Kappa value of 0.45, which represents a moderate agreement²⁹ (data not shown). However, a significant positive correlation was observed between lignan intakes and plasma ENL concentrations (r=0.30, p=0,001).

Table III shows metabolic parameters of women according to plasma ENL quartiles. Plasma ENL was 111.0 ± 78.2 nmol/L in the highest quartile compared to 29.4 ± 5.3 nmol/L in quartile 3, 14.7 ± 3.5 nmol/L in quartile 2 and 3.5 ± 3.1 in quartile 1. Women in the highest ENL quartile had significantly higher dietary lignan intake compared to women in quartiles 3, 2 and 1. This was reflected by a significantly higher dietary flaxseed intake in women in the highest ENL quartile compared to women in quartiles 1, 2 and 3. A trend for a lower waist circumference and body weight was observed in women in the highest ENL quartile compared to women in quartile 1. **Figure I** shows a trend for a lower total (452 ± 161 vs. 566 ± 222 cm², $p < 0.10$) and visceral (116 ± 47 vs. 150 ± 68 cm², $p < 0.10$) abdominal adipose tissue areas in women in the highest ENL quartile compared to women in the lowest ENL quartile. No significant difference was observed for subcutaneous adipose tissue area. **Figure II** shows that women in the highest ENL quartile had a lower 2h postload glycemia (6.9 ± 2.8 vs. 9.0 ± 2.9 mmol/L, $p < 0.05$), a lower fasting insulinemia (61.8 ± 29.2 vs. 99.4 ± 28.9 , $p < 0.01$) as well as a significantly higher glucose disposal rate (8.3 ± 2.7 vs. 5.5 ± 2.8 , $p < 0.01$) than women in the lowest ENL quartile. No significant difference was observed for fasting glycaemia.

Energy and omega-3 fatty acid intakes were similar among all women in ENL quartiles (Table 4). **Figure III** shows that energy macronutrient partition was similar among quartiles except for energy from monounsaturated and polyunsaturated fat, which were higher in the highest ENL quartile compared to the third quartile (11.6 ± 2.6 vs. 10.3 ± 3.3 and 6.0 ± 1.9 vs. 4.7 ± 1.8 % respectively, $p < 0.05$). **Figure IV** shows that women in the highest ENL quartile had a significantly higher daily number of whole grain product portions (3.5 ± 1.6 vs. 2.4 ± 1.7 , 2.2 ± 1.7 and 2.3 ± 1.4 respectively, $p < 0.05$) compared to women in quartiles 1, 2 and 3. A trend was observed for a higher consumption of soluble fiber in women in the highest ENL quartile compared to women in the second quartile (5.1 ± 1.4 vs. 4.3 ± 1.9 g/day, $p < 0.10$) (Figure IV). Finally, no difference was observed in physical activity for women in the highest ENL quartile compared to women in the lowest ENL quartile (Table III). However, a significant difference in physical activity was observed in women in the third ENL quartile compared to women in the lowest ENL quartile.

Differences in GDR and 2 h postload glycemia between women in the highest compared with women in the lowest ENL quartile remained significant after statistical adjustment for either BMI, total body fat mass or waist circumference (data not shown). No difference was observed in years since menopause among women in lignan intake quartiles or ENL quartiles (data not shown). No difference was observed in alcohol consumption in women across ENL quartiles. Only seven women were smokers and when these women were excluded from the analyses, results remained unchanged.

DISCUSSION

The aim of the study was to compare the metabolic profile of postmenopausal women consuming various amounts of lignans. We tested the hypothesis that the majority of women consuming higher amounts of dietary lignans would have higher plasma ENL concentrations and a better metabolic profile including lower adiposity measures and higher insulin sensitivity. As expected, a majority of women consuming high amounts of lignans were in the highest ENL quartile. For a similar energy intake, macronutrient energy distribution and physical activity, women in the highest ENL quartile had a better metabolic profile including lower BMI, body fat mass, 2 h postload glycaemia as well as a higher glucose disposal rate. The higher insulin sensitivity observed in women in the highest ENL quartile was unaffected by statistical adjustments for BMI, fat mass and waist circumference.

Our main finding is that women in the highest ENL quartile had a better metabolic profile compared to women in the lower ENL quartile, for a similar physical activity and energy macronutrient distribution. This indirectly suggests a potential effect of mammalian lignans on metabolic profile. Literature on the effect of lignan consumption on obesity and fat distribution is not abundant³⁰. Milder et al.³¹, observed that lignan intake was higher in individuals with lower BMI values. Another study showed that plasma enterolactone decreased by 6.2% for each 1 unit increase of BMI in healthy men and women.³² Kilkkinen et al.¹³ reinforced this finding by observing that women with a normal BMI had significantly higher plasma ENL concentrations than obese women. These studies do not demonstrate a direct impact of ENL on energy balance, but likely reflect the impact of a diet rich in fruits, vegetables and whole grain products with low energy density. However, these studies are concordant with our results and suggest that a high lignan intake is associated with a favourable metabolic profile.

Evidence for an effect of lignan intake on glucose metabolism is scarce³⁰. One trial tested the effect of a 12-week flaxseed lignan supplementation in type 2 diabetic subjects and found that glycemic control measured by HbA1c was significantly improved. However, no significant change was found in fasting glucose, insulin concentrations and insulin resistance¹⁴. In healthy women, daily intake of 50 g flaxseed lowered postprandial glucose by 27%³³. A study by Lemay et al.⁵, found that 40 g flaxseed /day from bread and crushed seeds consumed for two months

was also effective to reduce fasting glucose and insulin in 25 hypercholesterolemic women. Conversely, another study from the same group did not observe any effect of a 12-month, 40g daily flaxseed intake on glucose homeostasis in healthy menopausal women ⁶. A cross-sectional study found that fasting insulin tended to decrease with increasing total dietary lignan intake ³⁴, which is concordant with our results.

Several mechanisms could possibly explain the effects of lignans on insulin and adiposity measures. ENL may exert estrogenic effects by binding to ER β or ER α ⁹, or to nuclear type II estrogen binding sites ³. However, the metabolic effects of estrogens are extremely complex and mechanisms by which estrogens can have favorable effects on adiposity measures and insulin sensitivity are not clearly understood. A study by Munoz et al. showed that HRT users had lower visceral adipose tissue, fasting serum glucose and fasting insulin ³⁵, which suggests an effect of estrogens on these metabolic variables. Estrogens could have an effect on appetite, by increasing satiety and consequently decreasing food intake ³⁶. In our sample, however, no difference was detected in energy intake by dietary record or energy expenditure as determined by physical activity record. We cannot exclude that a small, long-term difference in energy balance that could not be detected with dietary and physical activity records could have been present and significantly impact on adiposity and metabolic profile. It is well known that there are limitations to dietary records on energy intake because self-reported intake has been shown to vary greatly ³⁷. Estrogens may also have an effect independent of food intake by reducing adipose tissue mass, adipocyte size and down-regulating lipogenic genes, as observed in mice ³⁸. These “estrogen-like” differences may also be observed because of isoflavones, which are also known to have oestrogenic effects ³⁹. Isoflavones were also elevated in women with a better metabolic profile. However, we did not measure plasma levels of these compounds and lignan consumption appeared as the most pronounced difference among women of the present study.

Other factors could explain metabolic differences in our sample. Lignans are mainly produced from SEC found in flaxseed. The main contributor to lignan intake and in large part to elevated ENL concentrations is the intake of dietary flaxseed, as lignan production from flaxseed is 804-fold higher than that from fruits ⁹. In our sample, the majority of women in the highest ENL subgroup were flaxseed consumers. Therefore, this can suggest that metabolic differences among

ENL quartiles can be explained by flaxseed intake. This remains to be proven through intervention studies. However, flaxseed is also a source of alpha-linolenic acid (ALA) as well as a good source of soluble fiber ⁴⁰. It could therefore be hypothesized that omega-3 fatty acid and/or soluble fiber could partially explain the more favourable metabolic profile in women with elevated ENL. However we found that omega-3 fatty acid intake was also similar among ENL quartiles, suggesting that consumption of this nutrient in conjunction with flaxseed was not a determining factor of the metabolic profile. On the other hand, fiber intake could have contributed to group insulin sensitivity and adiposity measure differences in our sample. Several studies have shown that serum ENL concentrations may play a role as a biomarker of a diet rich in fiber and vegetables ⁴¹. Moreover, consumption of fiber-rich, whole-grain cereal products stimulates the production of ENL ^{42,43}. Even if differences in total, soluble and insoluble fiber intake between the highest and the lowest ENL quartile were not significant in our sample, women in the highest quartile consumed an average of 5g more fiber daily, which is considerable. Furthermore, such fiber consumption is reflected by a significantly increased number of portions of whole grain products. Several studies have shown that dietary fibers reduce postprandial glucose levels and improve insulin sensitivity ⁴⁴⁻⁴⁷. Both high-fiber rye and wheat foods significantly reduced postprandial plasma insulin and plasma glucose in obese men ⁴⁸, which may suggest a combined effect of lignans and fibers on glucose homeostasis. Fiber intake could also impact on adiposity measures by promoting satiation, decreasing absorption of macronutrients, and altering secretion of gut hormones ⁴⁷. Even if metabolic differences remain significant after statistical adjustment for fiber intake, we still suggest that fiber intake may be an important contributor to the association between total lignan intake and the metabolic profile in post-menopausal women.

The TR-FIA method that we used to measure plasma ENL has been validated in previous studies ^{25,26}. This method is sensitive, convenient and well-established ⁹. Furthermore, the use of recovery percentages after the first step of extraction and hydrolysis for each subject leads to more precise measurements. A limitation of the present study is that a single measurement for ENL may have overlooked large within-day and day-to-day intra-individual variations in enterolactone concentrations ^{49,50}. However, both dietary and plasma lignan-related measures were relatively concordant in their link with the metabolic profile.

Several factors may influence mammalian lignan production such as antibiotic use, obesity, smoking and fat intake ^{3,10,11} as well as frequency of defecation ¹¹. Smoking was not a confounding factor in this study. Moreover, subjects were not on antibiotics at the time of the testing. These other factors listed above could explain some of the discordance between dietary lignan intake and ENL concentrations. Although dietary lignan intakes may moderately reflected plasma ENL concentrations, we suggest that this measure is still relevant in the interpretation of the link between lignan consumption and the metabolic profile.

In conclusion, dietary record-assessed lignan consumption was relatively concordant with plasma ENL concentrations, which suggests that ENL is a significant marker of a lignan rich-diet. Higher ENL concentrations were associated with a better metabolic profile including higher insulin sensitivity and lower adiposity measures. Consequently, we suggest that a lignan-rich and fiber-rich diet, provided by flaxseed, whole grain products, fruits and vegetables is associated with a better metabolic profile.

ACKNOWLEDGMENTS

We would like to express our gratitude to the subjects for their excellent collaboration and to the staff of the Lipid Research Center, the Physical Activity Sciences Laboratory, and the Diabetes Research unit for their contribution to this study. This study was supported by operating funds from the Heart and Stroke Foundation of Canada and Canadian Institutes of Health Research (MOP-37957). Anne-Sophie Morisset is the recipient of a studentship from the Canada Research Chair in Nutrition, Functional Foods and Cardiovascular Health. André Tchernof is the recipient of a scholarship from the Canadian Institutes of Health Research. All authors contributed significantly to the study regarding data collection and analysis (ASM, AV), patient recruitment (JB, SJW), study design (SL, AT), study supervision (SL, JSW, JB), manuscript preparation (ASM, SL, AT), and scientific revision (ASM, AV, JB, SJW, SL, AT). No author declared a conflict of interest.

REFERENCES

1. Lau DC. Synopsis of the 2006 Canadian clinical practice guidelines on the management and prevention of obesity in adults and children. *CMAJ*. 2007;176:1103-6.
2. Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III) final report. *Circulation* 2002;106:3143-421.
3. Adlercreutz H. Lignans and human health. *Crit Rev.Clin.Lab Sci*. 2007;44:483-525.
4. Webb AL, McCullough ML. Dietary lignans: potential role in cancer prevention. *Nutr.Cancer* 2005;51:117-31.
5. Lemay A, Dodin S, Kadri N, Jacques H, Forest JC. Flaxseed dietary supplement versus hormone replacement therapy in hypercholesterolemic menopausal women. *Obstet.Gynecol*. 2002;100:495-504.
6. Dodin S, Cunnane SC, Masse B et al. Flaxseed on cardiovascular disease markers in healthy menopausal women: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Nutrition* 2008;24:23-30.
7. Thompson LU, Boucher BA, Liu Z, Cotterchio M, Kreiger N. Phytoestrogen content of foods consumed in Canada, including isoflavones, lignans, and coumestan. *Nutr.Cancer* 2006;54:184-201.
8. Thompson LU, Robb P, Serraino M, Cheung F. Mammalian lignan production from various foods. *Nutr.Cancer* 1991;16:43-52.
9. Wang LQ. Mammalian phytoestrogens: enterodiol and enterolactone. *J Chromatogr.B Analyt.Technol.Biomed.Life Sci*. 2002;777:289-309.
10. Lampe JW. Isoflavonoid and lignan phytoestrogens as dietary biomarkers. *J Nutr*. 2003;133 Suppl 3:956S-64S.
11. Milder IE, Kuijsten A, Arts IC et al. Relation between plasma enterodiol and enterolactone and dietary intake of lignans in a Dutch endoscopy-based population. *J Nutr*. 2007;137:1266-71.
12. de Kleijn MJ, van der Schouw YT, Wilson PW, Grobbee DE, Jacques PF. Dietary intake of phytoestrogens is associated with a favorable metabolic cardiovascular risk profile in postmenopausal U.S.women: the Framingham study. *J.Nutr*. 2002;132:276-82.
13. Kilkkinen A, Stumpf K, Pietinen P, Valsta LM, Tapanainen H, Adlercreutz H. Determinants of serum enterolactone concentration. *Am.J Clin.Nutr*. 2001;73:1094-100.
14. Pan A, Sun J, Chen Y et al. Effects of a flaxseed-derived lignan supplement in type 2 diabetic patients: a randomized, double-blind, cross-over trial. *PLoS.ONE*. 2007;2:e1148.

15. Zhang W, Wang X, Liu Y et al. Dietary flaxseed lignan extract lowers plasma cholesterol and glucose concentrations in hypercholesterolaemic subjects. *Br.J Nutr.* 2007;1-9.
16. Fukumitsu S, Aida K, Ueno N, Ozawa S, Takahashi Y, Kobori M. Flaxseed lignan attenuates high-fat diet-induced fat accumulation and induces adiponectin expression in mice. *Br.J Nutr.* 2008;1-8.
17. Behnke AR, Wilmore JH. Evaluation and regulation of body build and composition. Englewood cliffs, Prentice-Hall 1974;20-37.
18. Siri WE. The gross composition of the body. *Adv Biol Med Phys* 1956;4:239-80.
19. Richterich R, Dauwalder H. Zur bestimmung der plasmaglukosekonzentration mit der hexokinase- glucose-6-phosphat-dehydrogenase-methode. *Schweiz Med Wochenschr* 1971;101:615-8.
20. Richterich R, Dauwalder H. [Determination of plasma glucose by hexokinase-glucose-6-phosphate dehydrogenase method]. *Schweiz.Med.Wochenschr.* 1971;101:615-8.
21. DeFronzo RA, Tobin JD, Andres R. Glucose clamp technique: a method for quantifying insulin secretion and resistance. *Am J Physiol* 1979;237:E214-E223.
22. Desbuquois B, Aurbach GD. Use of polyethylene glycol to separate free and antibody-bound peptide hormones in radioimmunoassays. *J Clin Endocrinol Metab* 1971;37:732-8.
23. Havel RJ, Eder H, Bragdon HF. The distribution and chemical composition of ultracentrifugally separated lipoproteins in human serum. *J Clin Invest* 1955;34:1345-53.
24. Burstein M, Samaille J. Sur un dosage rapide du cholestérol lié aux beta-lipoprotéines du sérum. *Clin Chim Acta* 1960;5:609.
25. Adlercreutz H, Wang GJ, Lapcik O et al. Time-resolved fluoroimmunoassay for plasma enterolactone. *Anal.Biochem.* 1998;265:208-15.
26. Stumpf K, Uehara M, Nurmi T, Adlercreutz H. Changes in the time-resolved fluoroimmunoassay of plasma enterolactone. *Anal.Biochem.* 2000;284:153-7.
27. Bouchard C, Tremblay A, Leblanc C, Lortie G, Savard R, Theriault G. A method to assess energy expenditure in children and adults. *Am.J Clin.Nutr.* 1983;37:461-7.
28. Major GC, Piche ME, Bergeron J, Weisnagel SJ, Nadeau A, Lemieux S. Energy expenditure from physical activity and the metabolic risk profile at menopause. *Med.Sci.Sports Exerc.* 2005;37:204-12.
29. Altman P. Practical statistics for medical research. 1991.
30. Bhatena SJ, Velasquez MT. Beneficial role of dietary phytoestrogens in obesity and diabetes. *Am.J.Clin.Nutr.* 2002;76:1191-201.

31. Milder IE, Feskens EJ, Arts IC, Bueno de Mesquita HB, Hollman PC, Kromhout D. Intake of the plant lignans secoisolariciresinol, matairesinol, lariciresinol, and pinoresinol in Dutch men and women. *J Nutr.* 2005;135:1202-7.
32. Horner NK, Kristal AR, Prunty J, Skor HE, Potter JD, Lampe JW. Dietary determinants of plasma enterolactone. *Cancer Epidemiol.Biomarkers Prev.* 2002;11:121-6.
33. Cunnane SC, Ganguli S, Menard C et al. High alpha-linolenic acid flaxseed (*Linum usitatissimum*): some nutritional properties in humans. *Br.J Nutr.* 1993;69:443-53.
34. van der Schouw YT, Sampson L, Willett WC, Rimm EB. The usual intake of lignans but not that of isoflavones may be related to cardiovascular risk factors in U.S. men. *J Nutr.* 2005;135:260-6.
35. Munoz J, Derstine A, Gower BA. Fat distribution and insulin sensitivity in postmenopausal women: influence of hormone replacement. *Obes.Res.* 2002;10:424-31.
36. Asarian L, Geary N. Modulation of appetite by gonadal steroid hormones. *Philos.Trans.R.Soc.Lond B Biol.Sci.* 2006;361:1251-63.
37. Abbot JM, Thomson CA, Ranger-Moore J et al. Psychosocial and behavioral profile and predictors of self-reported energy underreporting in obese middle-aged women. *J Am.Diet.Assoc.* 2008;108:114-9.
38. D'Eon TM, Souza SC, Aronovitz M, Obin MS, Fried SK, Greenberg AS. Estrogen regulation of adiposity and fuel partitioning. Evidence of genomic and non-genomic regulation of lipogenic and oxidative pathways. *J Biol.Chem.* 2005;280:35983-91.
39. Adlercreutz H, Mazur W. Phyto-oestrogens and Western diseases. *Ann.Med.* 1997;29:95-120.
40. Bloedon LT, Szapary PO. Flaxseed and cardiovascular risk. *Nutr.Rev.* 2004;62:18-27.
41. Vanharanta M, Voutilainen S, Rissanen TH, Adlercreutz H, Salonen JT. Risk of cardiovascular disease-related and all-cause death according to serum concentrations of enterolactone: Kuopio Ischaemic Heart Disease Risk Factor Study. *Arch.Intern.Med.* 2003;163:1099-104.
42. Juntunen KS, Mazur WM, Liukkonen KH et al. Consumption of wholemeal rye bread increases serum concentrations and urinary excretion of enterolactone compared with consumption of white wheat bread in healthy Finnish men and women. *Br.J Nutr.* 2000;84:839-46.
43. Jacobs DR, Jr., Pereira MA, Stumpf K, Pins JJ, Adlercreutz H. Whole grain food intake elevates serum enterolactone. *Br.J Nutr.* 2002;88:111-6.
44. Galisteo M, Duarte J, Zarzuelo A. Effects of dietary fibers on disturbances clustered in the metabolic syndrome. *J Nutr.Biochem.* 2007.

45. Hanai H, Ikuma M, Sato Y et al. Long-term effects of water-soluble corn bran hemicellulose on glucose tolerance in obese and non-obese patients: improved insulin sensitivity and glucose metabolism in obese subjects. *Biosci.Biotechnol.Biochem.* 1997;61:1358-61.
46. McKeown NM. Whole grain intake and insulin sensitivity: evidence from observational studies. *Nutr.Rev.* 2004;62:286-91.
47. Slavin JL. Dietary fiber and body weight. *Nutrition* 2005;21:411-8.
48. McIntosh GH, Noakes M, Royle PJ, Foster PR. Whole-grain rye and wheat foods and markers of bowel health in overweight middle-aged men. *Am.J Clin.Nutr.* 2003;77:967-74.
49. Hausner H, Johnsen NF, Hallund J, Tetens I. A single measurement is inadequate to estimate enterolactone levels in danish postmenopausal women due to large intraindividual variation. *J Nutr.* 2004;134:1197-200.
50. Stumpf K, Adlercreutz H. Short-term variations in enterolactone in serum, 24-hour urine, and spot urine and relationship with enterolactone concentrations. *Clin.Chem.* 2003;49:178-81.

TABLES

Table I. Physical and metabolic characteristics of the study sample of 115 women.

Variable	Mean \pm SD	Range
Age (years)	56.8 \pm 4.4	46.4 - 68.0
<i>Anthropometrics</i>		
Weight (kg)	72.8 \pm 16.0	47.9 - 154.10
BMI (kg/m ²)	28.5 \pm 5.9	19.0 - 59.7
Total body fat mass (kg) ^a	29.4 \pm 11.6	7.6 - 83.7
Waist circumference (cm)	91.0 \pm 13.4	65.9 - 134.7
<i>Abdominal adipose tissue areas (cm²)^b</i>		
Total	508 \pm 172	166 - 943
Visceral	140 \pm 57	40 - 288
Subcutaneous	368 \pm 131	104 - 736
<i>Lipid profile (mmol/L)</i>		
Cholesterol	5.4 \pm 0.9	3.1 - 7.5
LDL-Cholesterol	3.6 \pm 0.8	1.1 - 5.6
HDL-Cholesterol	1.4 \pm 0.3	0.7 - 2.7
Triglycerides	1.2 \pm 0.6	0.5 - 3.5
<i>Glucose homeostasis</i>		
Fasting glycaemia (mmol/L)	5.6 \pm 0.8	4.0 - 9.5
2 h postload glycaemia (mmol/L)	8.0 \pm 2.9	3.2 - 17.0
Fasting insulinemia (pmol/L) ^c	76.3 \pm 44.0	3.0 - 374.0
Glucose disposal rate (mg/kg/min) ^d	7.0 \pm 3.0	1.5 - 14.0
<i>Energy expenditure (kcal/kg/day)</i>		
Moderate to intense exercise	3.1 \pm 4.0	0 - 19.25
<i>Energy intake (kcal/day)</i>		
	1962 \pm 455	983 - 3420
<i>Phytoestrogen intake*</i>		
Total phytoestrogens (μ g/day)	1623 (+6599/-1390)	50 - 93588
Total lignans (μ g/day)	403 (+3832/-243)	45 - 92083
Total isoflavones (μ g/day)	63 (+1002/-30)	5 - 29533
Flaxseed intake (mL/day)	0 (+0/-0)	0 - 31.9
<i>Plasma ENL (nmol/L)*</i>		
	22.5 (+18.1/-12.9)	0 - 374.2

^a n=111, ^b n=109, ^c n=114, ^d n=110

* Data as median +/- interquartile range

Table II. Phytoestrogen intake and metabolic parameters in the high vs. low dietary lignan intake subgroups

Variable	Low lignan intake	High lignan intake	<i>P</i> value
	n=28 Mean ± SD	n=29 Mean ± SD	
<i>Phytoestrogen intake</i>			
Total lignans (µg/day)	115 ± 29	36084 ± 26917	<0.0001
Total phytoestrogens (µg/day)	368 ± 543	40158 ± 28299	<0.0001
Total isoflavones (µg/day)	253 ± 540	4065 ± 6293	<0.0001
Flaxseed intake (mL/day)	0.0 ± 0.0	12.7 ± 10.5	<0.0001
<i>Plasma ENL (nmol/L)</i>			
	19.2 ± 15.8	85.4 ± 91.6	<0.001
<i>Anthropometrics</i>			
Age (years)	55.8 ± 4.7	57.8 ± 4.6	NS
Weight (kg)	76.2 ± 14.1	68.9 ± 11.9	0.04
BMI (kg/m ²)	30.0 ± 5.2	26.6 ± 4.0	0.01
Total body fat mass (kg) ^a	31.5 ± 10.1	26.3 ± 9.3	0.05
Waist circumference (cm)	94.6 ± 14.5	87.7 ± 11.4	0.06
<i>Abdominal adipose tissue areas (cm²)^b</i>			
Total	561 ± 543	480 ± 139	0.09
Visceral	155 ± 66	129 ± 43	NS
Subcutaneous	406 ± 141	352 ± 120	NS
<i>Lipid profile (mmol/L)</i>			
Cholesterol	5.4 ± 1.0	5.6 ± 0.9	NS
LDL-Cholesterol	3.5 ± 0.9	3.7 ± 0.9	NS
HDL-Cholesterol	1.4 ± 0.3	1.5 ± 0.3	0.09
Triglycerides	1.3 ± 0.7	1.1 ± 0.4	NS
<i>Glucose homeostasis</i>			
Fasting glycaemia (mmol/L)	5.6 ± 0.8	5.4 ± 0.5	NS
2 h postload glycaemia (mmol/L)	8.1 ± 2.8	7.7 ± 2.5	NS
Fasting insulinemia (pmol/L) ^a	78.3 ± 34.6	76.0 ± 34.5	NS
Glucose disposal rate (mg/kg/min) ^c	6.2 ± 3.2	7.8 ± 2.4	0.03

^an=27,29, ^bn=26,27, ^cn=28,28

Table III - Phytoestrogen intake, energy intake, energy expenditure and metabolic parameters of women according to plasma enterolactone quartiles

Variable	Quartile 1	Quartile 2	Quartile 3	Quartile 4	<i>P</i> value
	n= 28 Mean ± SD	n= 29 Mean ± SD	n= 29 Mean ± SD	n= 29 Mean ± SD	
<i>Plasma ENL (nmol/L)</i>	3.5 ± 3.1	14.7 ± 3.5	29.4 ± 5.3	111.0 ± 78.2	<0.01*
<i>Phytoestrogen intake (µg/day)</i>					
Total phytoestrogens	1625 ± 1942	5654 ± 11733	5721 ± 11101	33210 ± 32521	<0.01*
Total lignans	1240 ± 1593	4292 ± 11176	4484 ± 10696	28094 ± 31241	<0.01*
Total isoflavones	384 ± 1071	1360 ± 2956	1236 ± 2461	5109 ± 7926	<0.01*
Flaxseed intake (mL/day)	0.0 ± 0.2	1.2 ± 3.8	1.2 ± 3.9	10.3 ± 11.6	<0.0001*
<i>Energy intake (kcal/day)</i> ^a	2026 ± 567	1929 ± 403	1811 ± 313	2083 ± 481	NS
Omega-3 fatty acid intake (g/day) ^b	1.1 ± 0.5	1.1 ± 0.6	1.0 ± 0.5	1.5 ± 0.9	NS
<i>Energy expenditure (kcal/kg/day)</i>					
Moderate to intense exercise	1.5 ± 2.8	2.6 ± 3.1	5.0 ± 5.1	3.2 ± 3.8	<0.05***
Age (years)	57.3 ± 5.0	57.3 ± 4.5	55.5 ± 3.6	57.0 ± 4.4	NS
<i>Anthropometrics</i>					
Weight (kg)	77.4 ± 19.1	72.4 ± 11.1	74.0 ± 19.1	67.5 ± 12.0	<0.09**
BMI (kg/m ²)	30.4 ± 6.9	28.8 ± 4.0	28.7 ± 7.0	26.1 ± 4.4	<0.05**
Waist circumference	94.9 ± 15.5	92.3 ± 10.2	90.9 ± 14.8	86.0 ± 11.7	<0.07**
<i>Lipid profile (mmol/L)</i>					
Cholesterol	5.4 ± 1.1	5.7 ± 1.0	5.3 ± 0.6	5.3 ± 0.9	NS
LDL-Cholesterol	3.5 ± 0.9	3.8 ± 1.0	3.5 ± 0.5	3.4 ± 0.8	NS
HDL-Cholesterol	1.4 ± 0.4	1.4 ± 0.4	1.4 ± 0.4	1.5 ± 0.3	NS
Triglycerides	1.3 ± 0.7	1.3 ± 0.7	1.2 ± 0.4	1.1 ± 0.6	NS

^an=27,28,28,29 ^bn=26,27,28,28

* Differences between quartile 4 versus quartiles 1, 2 and 3

** Differences between quartile 4 versus quartile 1

*** Differences between quartile 3 versus quartile 1.

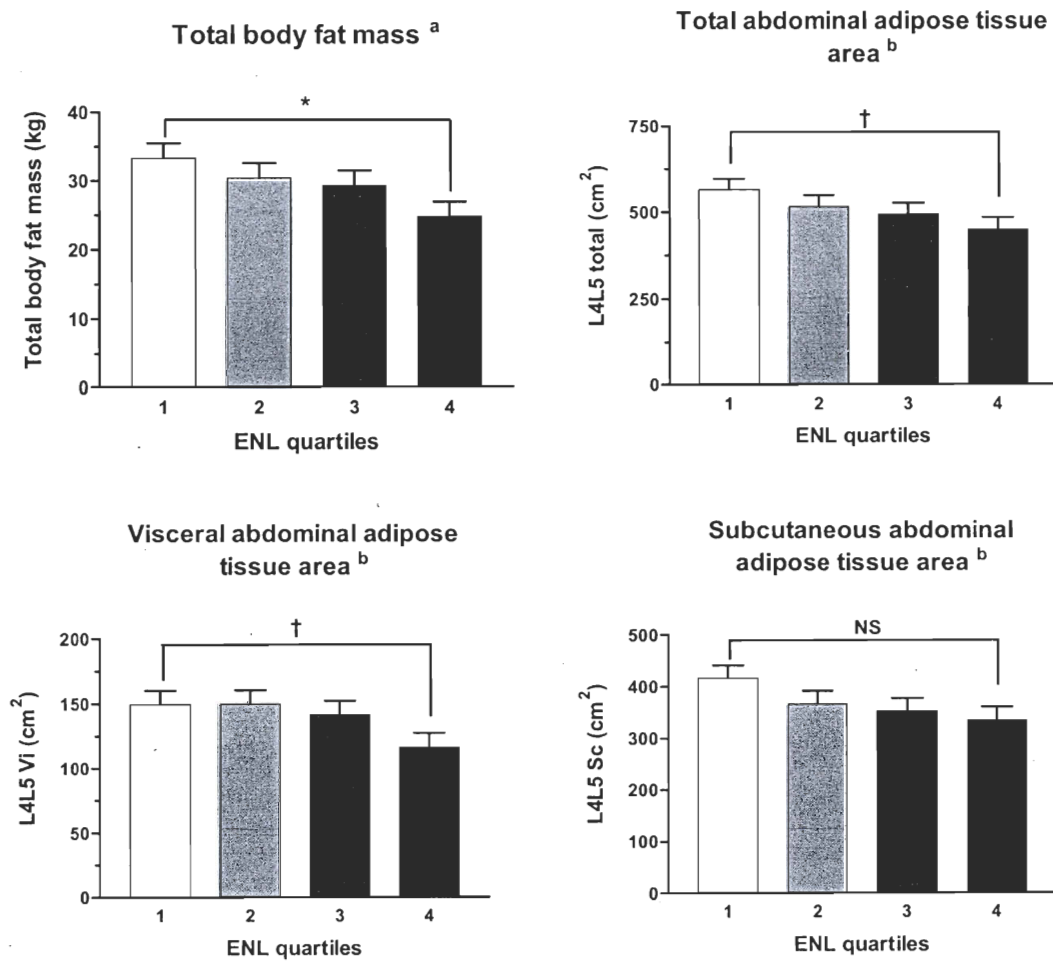


Figure I - Adiposity measures in women according to ENL quartiles

† $p \leq 0.10$, * $p \leq 0.05$

^a $n = (1)27, (2)28, (3)27, (4)29$, ^b $n = (1)28, (2)28, (3)28, (4)26$

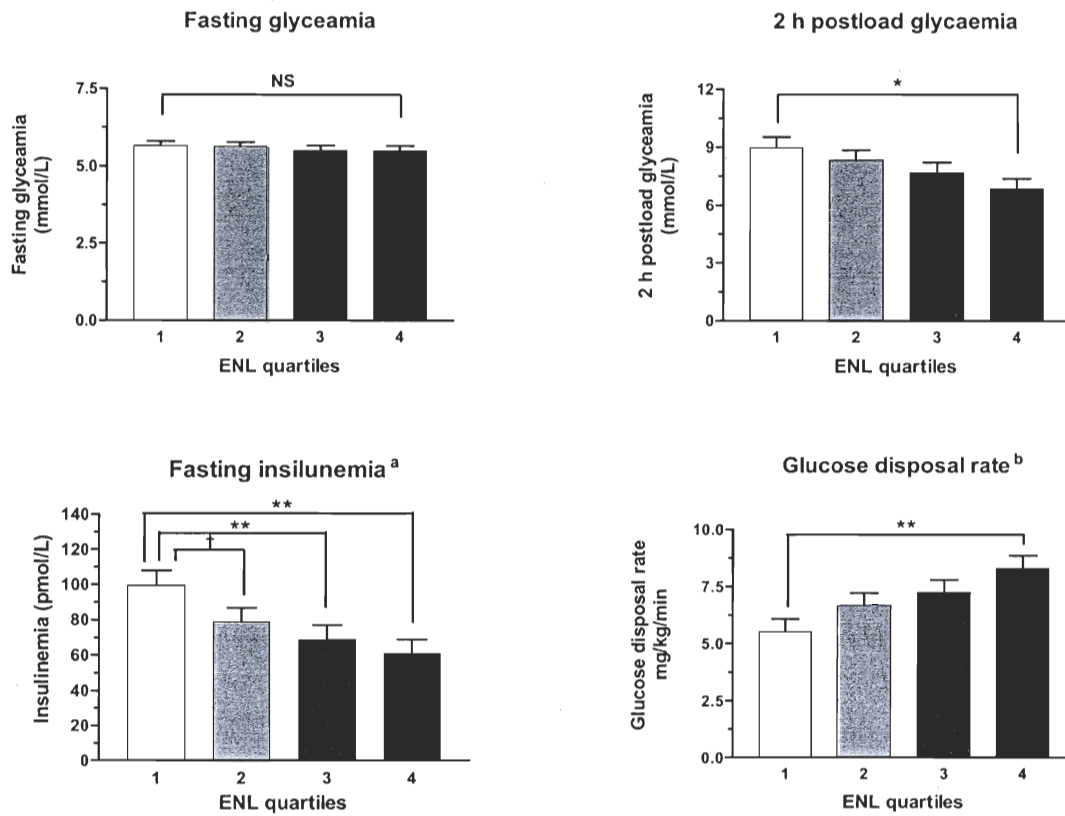


Figure II. Glucose homeostasis in women according to ENL quartiles

† $p \leq 0.10$, * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$

^a $n = (1)25, (2)29, (3)29, (4)28$ ^b $n = (1)26, (2)28, (3)29, (4)27$

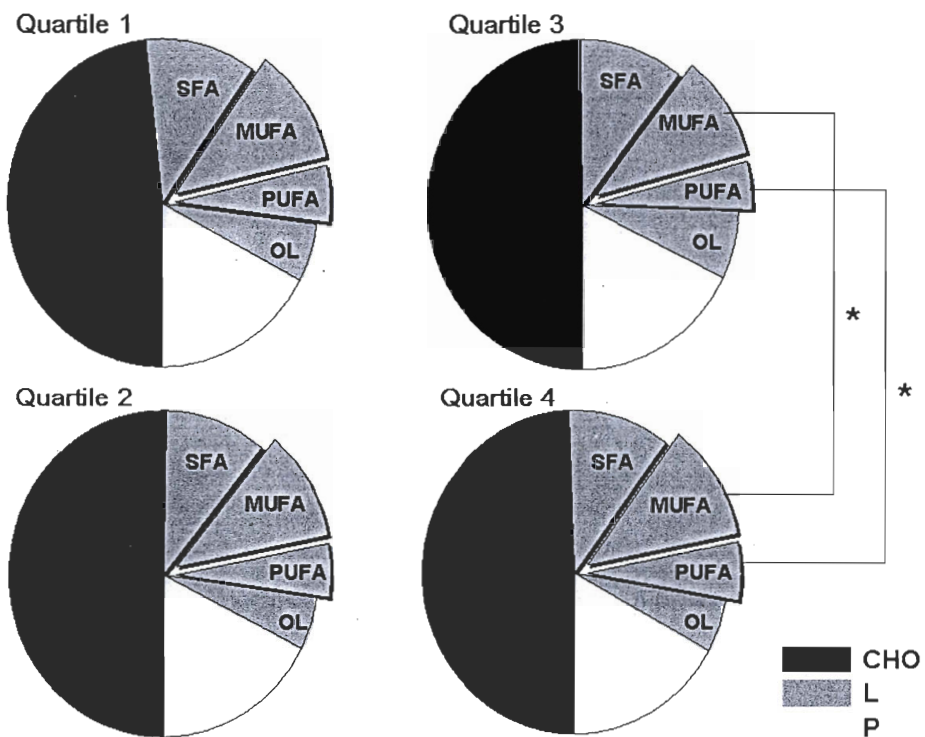


Figure III. Macronutrient energy distribution according to ENL quartiles
 CHO: carbohydrate, SFA: saturated fatty acid, MUFA: monounsaturated fat, PUFA:
 polyunsaturated fatty acid, OL: other lipids P: proteins L: lipids
 * $p \leq 0.05$

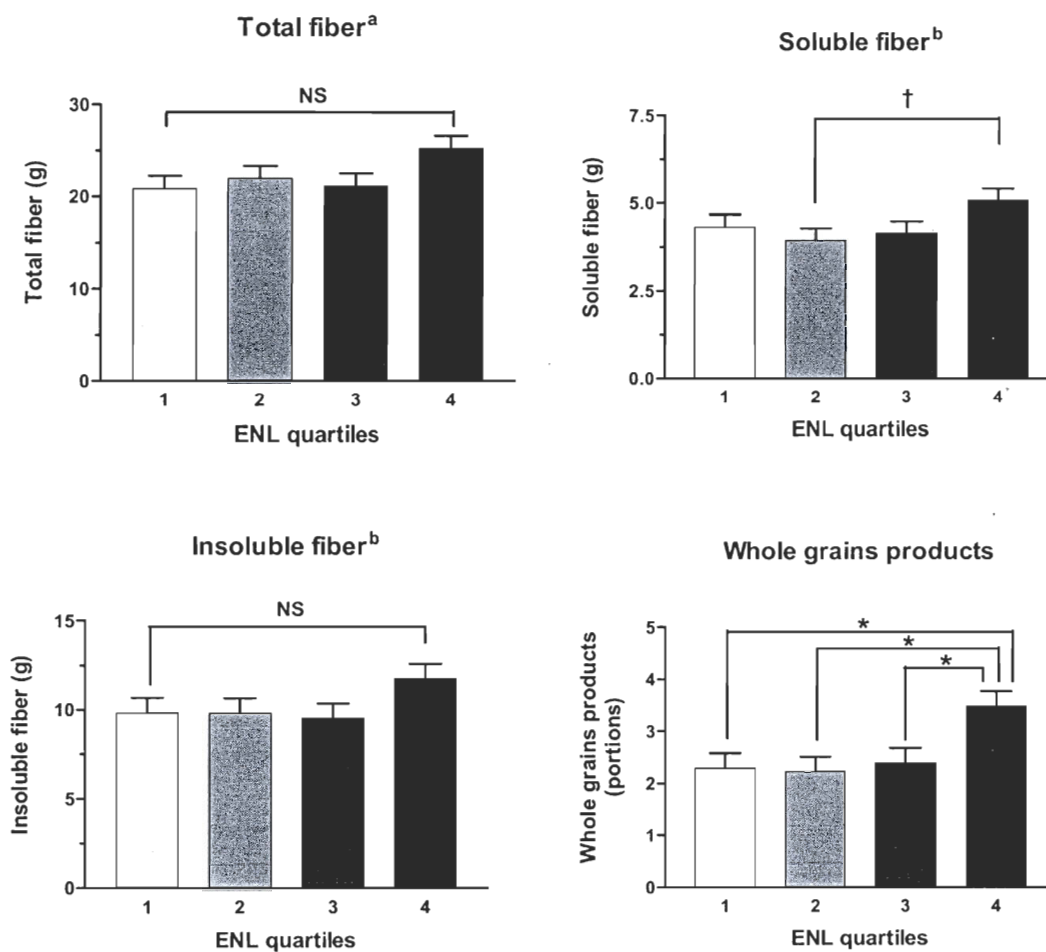


Figure IV. Fiber intake according to ENL quartiles.

† $p \leq 0.10$, * $p \leq 0.05$

^a $n = (1)27, (2)28, (3)29, (4)29$, ^b $n = (1)26, (2)27, (3)28, (4)$

Conclusion

Au cours des dernières décennies, la prévalence de l'obésité a sans cesse augmenté (1). Cette augmentation est concomitante à la prévalence de plusieurs complications métaboliques résultant en une détérioration de la qualité de vie et en une augmentation faramineuse des coûts de santé (4). Il ne fait aucun doute que l'endocrinologie du tissu adipeux est d'une importance primordiale dans la compréhension de l'obésité, de ses complications et de ses traitements potentiels. C'est pour ces raisons que mes travaux de maîtrise se sont penchés sur cette problématique.

Des niveaux plus élevés d'IL-6 reflètent un tissu adipeux dysfonctionnel caractérisé par une infiltration de macrophages et la production de cytokines inflammatoires. Tel que mentionné précédemment, il est clairement démontré que des niveaux d'IL-6 plus élevés sont associés à des mesures d'adiposité plus élevées (119-121), ce que démontre également nos résultats. Ce profil inflammatoire détérioré est également associé à une augmentation de la lipolyse stimulée par l'isoprotérénol, particulièrement dans les adipocytes intra-abdominaux et ce, indépendamment de l'adiposité et du diamètre adipocytaire. Il est donc évident que l'activité lipolytique des adipocytes est influencée par l'IL-6. Certaines études ont d'ailleurs déjà démontré l'effet stimulateur de l'IL-6 sur la lipolyse de façon directe ou via la stimulation de l'isoprotérénol (122-124). Nos résultats suggèrent indirectement que l'IL-6 pourrait réguler l'action des agonistes des récepteurs bêta-adrénergiques via des mécanismes post-récepteurs. Bref, des mesures d'adiposité plus élevées se caractérisent par un profil inflammatoire détérioré, ce qui altère le métabolisme, entre autres au niveau de l'adipocyte intra-abdominal. Puisque la perte de poids améliore le profil inflammatoire en diminuant les niveaux de cytokines (125), il convient d'adopter ou de maintenir de saines habitudes de vie, l'alimentation étant un élément clé dans l'équilibre de la balance énergétique.

Ainsi, l'alimentation, de par son contenu énergétique, peut conduire à la perte de poids en induisant une balance énergétique négative et en améliorant le profil métabolique. Mais quel type d'alimentation doit-on privilégier ? Plusieurs études se sont intéressées à l'effet de

différentes diètes restrictives et la perte de poids qu'elles engendrent en relation avec le statut hormonal, la distribution des graisses et les niveaux de SHBG. La littérature actuelle nous montre que l'alimentation peut avoir des effets sur les niveaux circulants d'hormones sexuelles et de SHBG. Cependant, ces effets s'observent principalement via des changements au niveau du poids corporel, de la masse grasse totale et/ou de la sensibilité à l'insuline, indépendamment de la composition de la diète. Comment expliquer l'effet de la perte de poids et l'amélioration du profil métabolique sur les niveaux plasmatiques de SHBG ? En fait, l'insuline semble avoir un effet direct sur la diminution de la sécrétion de SHBG par le foie (126;127), ce qui suggère un effet du statut insulinémique sur les niveaux circulants de SHBG. De plus, sachant que le cortisol inhibe la production de SHBG (128), celui-ci pourrait être un acteur important dans la réduction des niveaux de SHBG chez les sujets ayant un BMI plus élevé. Les niveaux plasmatiques d'hormones sexuelles pourraient également jouer un rôle sur les niveaux circulants de SHBG de par l'augmentation de la conversion locale d'androgènes en estrogènes ou en androgènes inactifs, ce qui est observé chez les sujets avec une masse adipeuse augmentée (129). Cependant, notre revue de littérature n'a pas clairement établi l'effet de la diète sur les niveaux d'androgènes plasmatiques. Finalement, les fibres alimentaires pourraient avoir un effet sur les niveaux de SHBG en améliorant le contrôle glycémique et en améliorant la sensibilité à l'insuline (130;131). Ainsi, via divers mécanismes, il est évident que l'alimentation peut être bénéfique sur le profil hormonal et la distribution des graisses et ce, via un changement au niveau du poids. Mis à part les diètes spécifiquement restrictives d'un point de vue énergétique (ex : faibles en glucides, faibles en lipides), certains facteurs alimentaires peuvent favoriser l'atteinte d'un déséquilibre énergétique et donc la perte de poids. La réduction d'aliments à haute densité énergétique dans l'alimentation, de la taille des portions ainsi que l'effet rassasiant de certains nutriments comme les protéines et les fibres peuvent contribuer à l'atteinte d'une balance énergétique négative (132).

L'alimentation, de par sa composition, peut également être bénéfique sur le profil métabolique. En effet, nous avons constaté que les femmes ayant des concentrations plus élevées d'ENL plasmatique, ce qui reflète une consommation importante de lignanes alimentaires, ont un meilleur profil métabolique caractérisé par des mesures d'adiposité

plus faibles et une meilleure sensibilité à l'insuline. Ceci suggère donc un effet potentiel des lignanes sur le profil métabolique. Tel que mentionné précédemment, plusieurs études ont également associé la consommation de lignanes ou les concentrations d'ENL à un IMC plus faible ainsi qu'à une meilleure homéostasie glucidique (112-116). Plusieurs mécanismes pourraient expliquer l'effet des lignanes sur le métabolisme via l'action de l'ENL sur les récepteurs des œstrogènes (99), notamment au niveau de la balance énergétique ou en agissant directement sur le métabolisme de l'insuline (133-135). Cependant, le rôle des œstrogènes n'est pas clairement établi en ce qui concerne ses effets sur l'adiposité et la sensibilité à l'insuline. Ainsi, d'autres facteurs doivent être pris en considération. Les femmes de l'étude qui avaient des concentrations plus élevées en ENL consommaient également majoritairement de la graine de lin, qui est également une source importante d'acides gras oméga-3 et de fibres alimentaires (108). Cependant, les apports en acides gras oméga-3 n'étaient pas différents entre les divers groupes de femmes. Toutefois, les femmes de l'étude ayant les concentrations les plus élevées d'ENL avaient aussi une consommation de fibres alimentaires de 5 grammes supérieurs aux femmes ayant les concentrations les plus faibles d'ENL. Tel que mentionné précédemment, les fibres alimentaires peuvent, d'une part avoir un impact positif sur la sensibilité à l'insuline(136;137) et d'autre part, jouer un rôle positif sur les mesures d'adiposité via une augmentation de la satiété, une diminution de l'absorption des nutriments, et/ou via l'altération au niveau de la sécrétion d'hormones digestives (138). Ainsi, l'effet bénéfique des lignanes que nous avons observé sur le profil métabolique des femmes ménopausées peut être en partie direct, mais pourrait également s'exercer via une consommation plus élevée de fibres alimentaires.

Il semble que la consommation de lignanes soit également associée à la stimulation de SHBG (99). Suite à différentes études d'intervention, l'ENL pourrait stimuler ou inhiber la production de SHBG selon les concentrations initiales de SHBG et les concentrations plasmatiques d'ENL atteintes (99). Ainsi, l'effet de l'ENL sur les concentrations de SHBG n'est pas clairement déterminé, mais reste à clarifier afin de mieux comprendre l'association entre une alimentation riche en lignanes, les niveaux de SHBG, le profil hormonal, la distribution des graisses et le profil métabolique.

Une alimentation riche en lignanes pourrait également être en lien avec un meilleur profil inflammatoire. Très récemment, une étude randomisée en chassé-croisé a évalué l'impact d'un muffin enrichi en sécoisolaricirésinol sur le profil inflammatoire de 22 femmes post-ménopausées en santé (139). Les concentrations plasmatiques d'ENL étaient significativement plus élevées suite à la consommation du muffin enrichi en lignanes. De plus, les sujets avaient des niveaux de CRP plus faibles après la consommation du muffin enrichi en lignanes comparativement au muffin faible en gras. Ceci suggère un effet de l'ENL sur les niveaux de CRP, probablement via son activité antioxydant (139). Cependant, aucun effet n'a été observé sur les niveaux d'IL-6 et les autres marqueurs inflammatoires mesurés. Cette étude réalisée auprès d'un petit échantillon et sur une courte période de temps ne permet pas de conclure à un effet des lignanes sur le profil inflammatoire, mais ouvre la porte à d'autres études de plus grande envergure qui s'intéresseront à l'effet des lignanes sur les marqueurs de l'inflammation systémique. La réduction de l'inflammation (CRP) qui est liée à des concentrations plus élevées d'ENL dans cette étude pourrait en partie expliquer l'association positive que nous avons observée entre les concentrations d'ENL et la sensibilité à l'insuline (Chapitre 3).

En plus de son effet bénéfique sur le profil métabolique, une alimentation riche en lignanes pourrait donc avoir un impact sur d'autres facteurs, notamment sur la sécrétion de la SHBG ou sur les marqueurs inflammatoires, ce qu'il reste à déterminer par des études subséquentes. Il pourrait également être intéressant de mesurer, par le biais d'une étude d'intervention, l'effet d'une diète riche en lignanes comparativement à une diète pauvre en lignanes sur le profil métabolique et ce, pour un même apport en fibres alimentaires, afin d'identifier l'effet réel des lignanes indépendamment de celui des fibres alimentaires.

En conclusion, une alimentation saine, riche en légumes et fruits ainsi qu'en produits céréaliers à grains entiers incluant la consommation régulière de graines de lin, est associée un meilleur profil métabolique caractérisé par de plus faibles mesures d'adiposité et une meilleure sensibilité à l'insuline. D'un point de vue de nutrition clinique, il pourrait donc être intéressant de recommander une alimentation riche en lignanes aux individus qui sont à

risque de complications métaboliques. Au sens plus large, sachant que de plus faibles mesures d'adiposité sont associées à des niveaux plus élevés de SHBG ainsi qu'à un meilleur profil inflammatoire, caractérisé par des niveaux d'interleukine-6 et de CRP plus faibles, il importe à tous les individus de maintenir ou d'adopter une alimentation saine, de façon à prévenir l'obésité et les nombreuses complications associées à l'accumulation de graisse viscérale.

Bibliographie

1. Katzmarzyk PT, Mason C. Prevalence of class I, II and III obesity in Canada. *CMAJ* 2006; 174(2):156-157.
2. Tjepkema M. Measured obesity: adult obesity in Canada - measured height and weight. In: *Nutrition: findings from the Canadian Community Health Survey*. Ottawa: Statistica Canada, 2005, editors. Issue no 1. Cat no 82-630-MWE2005001. 2005.
Ref Type: Report
3. Le Petit Robert. Société Dictionnaires Le Robert, Pierre Varrod ed. 2000.
4. Stein CJ, Colditz GA. The epidemic of obesity. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89(6):2522-2525.
5. NEEL JV. Diabetes mellitus: a "thrifty" genotype rendered detrimental by "progress"? *Am J Hum Genet* 1962; 14:353-362.
6. Tchernof A, Despres JP. Sex steroid hormones, sex hormone-binding globulin, and obesity in men and women. *Horm Metab Res* 2000; 32(11-12):526-536.
7. Lemieux S, Prud'homme D, Bouchard C, Tremblay A, Després JP. Sex differences in the relation of visceral adipose tissue accumulation to total body fatness. *Am J Clin Nutr* 1993; 58(4):463-467.
8. Poirier P, Giles TD, Bray GA et al. Obesity and cardiovascular disease: pathophysiology, evaluation, and effect of weight loss: an update of the 1997 American Heart Association Scientific Statement on Obesity and Heart Disease from the Obesity Committee of the Council on Nutrition, Physical Activity, and Metabolism. *Circulation* 2006; 113(6):898-918.
9. Tchernof A and Després JP. Obesity and dyslipidaemia: importance of body fat distribution. *Clinical obesity in adults and children*. Blackwell Publishing, Peter G.Kopelman, Ian D.Caterson and William H.Dietz, 2005.
10. Yusuf S, Hawken S, Ounpuu S et al. Effect of potentially modifiable risk factors associated with myocardial infarction in 52 countries (the INTERHEART study): case-control study. *Lancet* 2004; 364(9438):937-952.
11. Yusuf S, Hawken S, Ounpuu S et al. Obesity and the risk of myocardial infarction in 27,000 participants from 52 countries: a case-control study. *Lancet* 2005; 366(9497):1640-1649.
12. Kuk JL, Katzmarzyk PT, Nichaman MZ, Church TS, Blair SN, Ross R. Visceral fat is an independent predictor of all-cause mortality in men. *Obesity (Silver Spring)* 2006; 14(2):336-341.

13. Klebanova EM, Balabolkin MI, Kreminskaia VM. [The role of the fat tissue and its hormones in the mechanisms of insulin resistance and the development of type 2 diabetes mellitus]. *Klin Med (Mosk)* 2007; 85(7):20-27.
14. Farnier M. [Dyslipidemia and abdominal obesity: mechanisms and characteristics (Part I)]. *Arch Mal Coeur Vaiss* 2007; 100(12):979-984.
15. Pradham AD, Manson JE, Rifai N, Buring JE, Ridker PM. C-reactive protein, interleukin 6, and risk of developing type 2 diabetes mellitus. *JAMA* 2001; 286(3):327-334.
16. Despres JP. Intra-abdominal obesity: an untreated risk factor for Type 2 diabetes and cardiovascular disease. *J Endocrinol Invest* 2006; 29(3 Suppl):77-82.
17. Yudkin JS. Inflammation, obesity, and the metabolic syndrome. *Horm Metab Res* 2007; 39(10):707-709.
18. Despres JP, Lemieux I. Abdominal obesity and metabolic syndrome. *Nature* 2006; 444(7121):881-887.
19. van Hout GC, van O, I, van Heck GL. Psychological profile of the morbidly obese. *Obes Surg* 2004; 14(5):579-588.
20. Katzmarzyk PT, Janssen I. The economic costs associated with physical inactivity and obesity in Canada: an update. *Can J Appl Physiol* 2004; 29(1):90-115.
21. Antipatis VJ, Kumanyika S, Jeffery RW, Morabia A, Ritenbaugh C. Confidence of health professionals in public health approaches to obesity prevention. *Int J Obes Relat Metab Disord* 1999; 23(9):1004-1006.
22. Klein S, Burke LE, Bray GA et al. Clinical implications of obesity with specific focus on cardiovascular disease: a statement for professionals from the American Heart Association Council on Nutrition, Physical Activity, and Metabolism: endorsed by the American College of Cardiology Foundation. *Circulation* 2004; 110(18):2952-2967.
23. Hecker KD, Kris-Etherton PM, Zhao G, Coval S, St Jeor S. Impact of body weight and weight loss on cardiovascular risk factors. *Curr Atheroscler Rep* 1999; 1(3):236-242.
24. Selwyn AP. Weight reduction and cardiovascular and metabolic disease prevention: clinical trial update. *Am J Cardiol* 2007; 100(12A):33P-37P.
25. Wisse BE. The inflammatory syndrome: the role of adipose tissue cytokines in metabolic disorders linked to obesity. *J Am Soc Nephrol* 2004; 15(11):2792-2800.

26. Tchernof A, Nolan A, Sites CK, Ades PA, Poehlman ET. Weight loss reduces C-reactive protein levels in obese postmenopausal women. *Circulation* 2002; 105:564-569.
27. Manco M, Fernandez-Real JM, Equitani F et al. Effect of massive weight loss on inflammatory adipocytokines and the innate immune system in morbidly obese women. *J Clin Endocrinol Metab* 2007; 92(2):483-490.
28. Pi-Sunyer FX. How effective are lifestyle changes in the prevention of type 2 diabetes mellitus? *Nutr Rev* 2007; 65(3):101-110.
29. Lau DC. Synopsis of the 2006 Canadian clinical practice guidelines on the management and prevention of obesity in adults and children. *CMAJ* 2007; 176(8):1103-1106.
30. Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III) final report. *Circulation* 2002; 106(25):3143-3421.
31. Ahima RS. Adipose tissue as an endocrine organ. *Obesity (Silver Spring)* 2006; 14 Suppl 5:242S-249S.
32. Coppack SW. Pro-inflammatory cytokines and adipose tissue. *Proc Nutr Soc* 2001; 60(3):349-356.
33. Trujillo ME, Sullivan S, Harten I, Schneider SH, Greenberg AS, Fried SK. Interleukin-6 regulates human adipose tissue lipid metabolism and leptin production in vitro. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89(11):5577-5582.
34. Fried SK, Bunkin DA, Greenberg AS. Omental and subcutaneous adipose tissues of obese subjects release interleukin-6: depot difference and regulation by glucocorticoid. *J Clin Endocrinol Metab* 1998; 83(3):847-850.
35. Zeyda M, Stulnig TM. Adipose tissue macrophages. *Immunol Lett* 2007; 112(2):61-67.
36. Fain JN. Release of interleukins and other inflammatory cytokines by human adipose tissue is enhanced in obesity and primarily due to the nonfat cells. *Vitam Horm* 2006; 74:443-477.
37. Cencello R, Clement K. Is obesity an inflammatory illness? Role of low-grade inflammation and macrophage infiltration in human white adipose tissue. *BJOG* 2006; 113(10):1141-1147.
38. Trujillo ME, Sullivan S, Harten I, Schneider SH, Greenberg AS, Fried SK. Interleukin-6 regulates human adipose tissue lipid metabolism and leptin production in vitro. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89(11):5577-5582.

39. Fenkci S, Rota S, Sabir N, Sermez Y, Guclu A, Akdag B. Relationship of serum interleukin-6 and tumor necrosis factor alpha levels with abdominal fat distribution evaluated by ultrasonography in overweight or obese postmenopausal women. *J Investig Med* 2006; 54(8):455-460.
40. Bastard JP, Maachi M, Lagathu C et al. Recent advances in the relationship between obesity, inflammation, and insulin resistance. *Eur Cytokine Netw* 2006; 17(1):4-12.
41. Wisse BE. The inflammatory syndrome: the role of adipose tissue cytokines in metabolic disorders linked to obesity. *J Am Soc Nephrol* 2004; 15(11):2792-2800.
42. Wisse BE. The inflammatory syndrome: the role of adipose tissue cytokines in metabolic disorders linked to obesity. *J Am Soc Nephrol* 2004; 15(11):2792-2800.
43. Manco M, Fernandez-Real JM, Equitani F et al. Effect of massive weight loss on inflammatory adipocytokines and the innate immune system in morbidly obese women. *J Clin Endocrinol Metab* 2007; 92(2):483-490.
44. Tchernof A, Nolan A, Sites CK, Ades PA, Poehlman ET. Weight loss reduces C-reactive protein levels in obese postmenopausal women. *Circulation* 2002; 105(5):564-569.
45. Nishimoto N, Kishimoto T. Interleukin 6: from bench to bedside. *Nat Clin Pract Rheumatol* 2006; 2(11):619-626.
46. Jacobi SK, Gabler NK, Ajuwon KM, Davis JE, Spurlock ME. Adipocytes, myofibers, and cytokine biology: new horizons in the regulation of growth and body composition. *J Anim Sci* 2006; 84 Suppl:E140-E149.
47. Wisse BE. The inflammatory syndrome: the role of adipose tissue cytokines in metabolic disorders linked to obesity. *J Am Soc Nephrol* 2004; 15(11):2792-2800.
48. Mohamed-Ali V, Goodrick S, Rawesh A et al. Subcutaneous adipose tissue releases interleukin-6, but not tumor necrosis factor-alpha, in vivo. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82(12):4196-4200.
49. Fenkci S, Rota S, Sabir N, Sermez Y, Guclu A, Akdag B. Relationship of serum interleukin-6 and tumor necrosis factor alpha levels with abdominal fat distribution evaluated by ultrasonography in overweight or obese postmenopausal women. *J Investig Med* 2006; 54(8):455-460.
50. Fried SK, Bunkin DA, Greenberg AS. Omental and subcutaneous adipose tissues of obese subjects release interleukin-6: depot difference and regulation by glucocorticoid. *J Clin Endocrinol Metab* 1998; 83(3):847-850.
51. Fain JN, Madan AK, Hiler ML, Cheema P, Bahouth SW. Comparison of the release of adipokines by adipose tissue, adipose tissue matrix, and adipocytes from visceral

- and subcutaneous abdominal adipose tissues of obese humans. *Endocrinology* 2004; 145(5):2273-2282.
52. Fried SK, Bunkin DA, Greenberg AS. Omental and subcutaneous adipose tissues of obese subjects release interleukin-6: Depot difference and regulation by glucocorticoid. *J Clin Endocrinol Metab* 1998; 83(3):847-850.
 53. Trujillo ME, Sullivan S, Harten I, Schneider SH, Greenberg AS, Fried SK. Interleukin-6 regulates human adipose tissue lipid metabolism and leptin production in vitro. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89(11):5577-5582.
 54. van Hall G, Steensberg A, Sacchetti M et al. Interleukin-6 stimulates lipolysis and fat oxidation in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88(7):3005-3010.
 55. Petersen EW, Carey AL, Sacchetti M et al. Acute IL-6 treatment increases fatty acid turnover in elderly humans in vivo and in tissue culture in vitro. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2005; 288(1):E155-E162.
 56. Path G, Bornstein SR, Gurniak M, Chrousos GP, Scherbaum WA, Hauner H. Human breast adipocytes express interleukin-6 (IL-6) and its receptor system: increased IL-6 production by beta-adrenergic activation and effects of IL-6 on adipocyte function. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86(5):2281-2288.
 57. Tchernof A, Belanger C, Morisset AS et al. Regional differences in adipose tissue metabolism in women: minor effect of obesity and body fat distribution. *Diabetes* 2006; 55(5):1353-1360.
 58. Muller G, Wied S, Over S, Frick W. Inhibition of lipolysis by palmitate, H₂O₂ and the sulfonylurea drug, glimepiride, in rat adipocytes depends on cAMP degradation by lipid droplets. *Biochemistry* 2008; 47(5):1259-1273.
 59. Trujillo ME, Sullivan S, Harten I, Schneider SH, Greenberg AS, Fried SK. Interleukin-6 regulates human adipose tissue lipid metabolism and leptin production in vitro. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89(11):5577-5582.
 60. Beaulieu EE, Kelly PA. *Hormones: From molecules to disease*. 1 ed. New York and London: Hermann Publishers in Arts and Science, Chapman and Hall, 1990.
 61. Tortora JGS. *Principes d'anatomie et de physiologie*. 2001.
 62. Blouin K, Robitaille J, Bélanger C et al. Effect of a six-week National Cholesterol Education Program step 1 diet on plasma sex hormone-binding globulin levels in overweight premenopausal women. *Metabolic Syndrome and related disorders* 2007; 5(1):34-45.
 63. Allen NE, Appleby PN, Davey GK, Key TJ. Lifestyle and nutritional determinants of bioavailable androgens and related hormones in British men. *Cancer Causes Control* 2002; 13(4):353-363.

64. Allen NE, Appleby PN, Davey GK, Key TJ. Lifestyle and nutritional determinants of bioavailable androgens and related hormones in British men. *Cancer Causes Control* 2002; 13(4):353-363.
65. Fortunati N. Sex hormone-binding globulin: not only a transport protein. What news is around the corner? *J Endocrinol Invest* 1999; 22(3):223-234.
66. Elbers JM, Asscheman H, Seidell JC, Gooren LJ. Effects of sex steroid hormones on regional fat depots as assessed by magnetic resonance imaging in transsexuals. *Am J Physiol* 1999; 276(2 Pt 1):E317-E325.
67. Blouin K, Despres JP, Couillard C et al. Contribution of age and declining androgen levels to features of the metabolic syndrome in men. *Metabolism* 2005; 54(8):1034-1040.
68. Phillips GB, Jing T, Heymsfield SB. Relationships in men of sex hormones, insulin, adiposity, and risk factors for myocardial infarction. *Metabolism* 2003; 52(6):784-790.
69. Marin P. Testosterone and regional fat distribution. *Obes Res* 1995; 3 Suppl 4:609S-612S.
70. Blouin K, Boivin A, Tchernof A. Androgens and body fat distribution. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2008; 108(3-5):272-280.
71. Dunaif A. Insulin resistance and the polycystic ovary syndrome: mechanism and implications for pathogenesis. *Endocr Rev* 1997; 18(6):774-800.
72. Blouin K, Boivin A, Tchernof A. Androgens and body fat distribution. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2007.
73. Tchernof A, Després JP. Sex steroid hormones, sex hormone-binding globulin, and obesity in men and women. *Horm Metab Res* 2000; 32:526-536.
74. Niskanen L, Laaksonen DE, Punnonen K, Mustajoki P, Kaukua J, Rissanen A. Changes in sex hormone-binding globulin and testosterone during weight loss and weight maintenance in abdominally obese men with the metabolic syndrome. *Diabetes Obes Metab* 2004; 6(3):208-215.
75. Tymchuk CN, Tessler SB, Barnard RJ. Changes in sex hormone-binding globulin, insulin, and serum lipids in postmenopausal women on a low-fat, high-fiber diet combined with exercise. *Nutr Cancer* 2000; 38(2):158-162.
76. Berrino F, Bellati C, Ooldani S et al. DIANA trials on diet and endogenous hormones. *IARC Sci Publ* 2002; 156:439-444.
77. Field AE, Colditz GA, Willett WC, Longcope C, McKinlay JB. The relation of smoking, age, relative weight, and dietary intake to serum adrenal steroids, sex

hormones, and sex hormone- binding globulin in middle-aged men. *J Clin Endocrinol Metab* 1994; 79(5):1310-1316.

78. World Health Organization. Research on the menopause in the 90's. Report of a WHO Scientific Group. WHO ed. Geneva: 1991.
79. Bellino FL. *Biology of menopause*. Springer ed. USA: 2000.
80. Prior JC. Perimenopause: The complex endocrinology of the menopausal transition. *Endocr Rev* 1998; 19(4):397-428.
81. Labrie F, Luu-The V, Labrie C et al. Endocrine and intracrine sources of androgens in women: inhibition of breast cancer and other roles of androgens and their precursor dehydroepiandrosterone. *Endocr Rev* 2003; 24(2):152-182.
82. Tchernof A, Poehlman ET, Després JP. Body fat distribution, the menopause transition, and hormone replacement therapy. *Diabete Metab* 2000; 26:12-20.
83. Toth MJ, Tchernof A, Sites CK, Poehlman ET. Menopause-related changes in body fat distribution. *Ann NY Acad Sci* 2002; 904:502-506.
84. Alexander J, Clearfield M. Cardiovascular disease after menopause: a growing epidemic. *Minerva Ginecol* 2006; 58(1):35-40.
85. Haffner SM, Valdez RA. Endogenous sex hormones: impact on lipids, lipoproteins, and insulin. *Am J Med* 1995; 98(1A):40S-47S.
86. Kalin MF, Zumoff B. Sex hormones and coronary disease: a review of the clinical studies. *Steroids* 1990; 55(8):330-352.
87. Barrett-Connor E. Heart disease in women. *Fertil Steril* 1994; 62(supl. 2):127S-132S.
88. Nelson HD. Menopause. *Lancet* 2008; 371(9614):760-770.
89. Mendelsohn ME, Karas RH. The protective effects of estrogen on the cardiovascular system. *N Engl J Med* 1999; 340(23):1801-1811.
90. Carr MC. The emergence of the metabolic syndrome with menopause. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88(6):2404-2411.
91. Grady D, Herrington D, Bittner V et al. Cardiovascular disease outcomes during 6.8 years of hormone therapy. *JAMA* 2002; 288(1):49-57.
92. Wassertheil-Smoller S, Hendrix SL, Limacher M et al. Effect of estrogen plus progestin on stroke in postmenopausal women: the Women's Health Initiative: a randomized trial. *JAMA* 2003; 289(20):2673-2684.

93. Guay MP, Dragomir A, Pilon D, Moride Y, Perreault S. Changes in pattern of use, clinical characteristics and persistence rate of hormone replacement therapy among postmenopausal women after the WHI publication. *Pharmacoepidemiol Drug Saf* 2007; 16(1):17-27.
94. Dodin S, Blanchet C, Marc I. [Phytoestrogens in menopausal women: a review of recent findings]. *Med Sci (Paris)* 2003; 19(10):1030-1037.
95. Ososki AL, Kennelly EJ. Phytoestrogens: a review of the present state of research. *Phytother Res* 2003; 17(8):845-869.
96. Shelly W, Draper MW, Krishnan V, Wong M, Jaffe RB. Selective estrogen receptor modulators: an update on recent clinical findings. *Obstet Gynecol Surv* 2008; 63(3):163-181.
97. Thompson LU, Boucher BA, Liu Z, Cotterchio M, Kreiger N. Phytoestrogen content of foods consumed in Canada, including isoflavones, lignans, and coumestan. *Nutr Cancer* 2006; 54(2):184-201.
98. Yuan JP, Wang JH, Liu X. Metabolism of dietary soy isoflavones to equol by human intestinal microflora--implications for health. *Mol Nutr Food Res* 2007; 51(7):765-781.
99. Adlercreutz H. Lignans and human health. *Crit Rev Clin Lab Sci* 2007; 44(5-6):483-525.
100. Milder IE, Kuijsten A, Arts IC et al. Relation between plasma enterodiol and enterolactone and dietary intake of lignans in a Dutch endoscopy-based population. *J Nutr* 2007; 137(5):1266-1271.
101. Lampe JW. Isoflavonoid and lignan phytoestrogens as dietary biomarkers. *J Nutr* 2003; 133 Suppl 3:956S-964S.
102. Usui T. Pharmaceutical prospects of phytoestrogens. *Endocr J* 2006; 53(1):7-20.
103. Gikas PD, Mokbel K. Phytoestrogens and the risk of breast cancer: a review of the literature. *Int J Fertil Womens Med* 2005; 50(6):250-258.
104. Feng Y, Xia XY, Huang YF. [Effects of phytoestrogens on prostate cancer and benign prostatic hyperplasia]. *Zhonghua Nan Ke Xue* 2007; 13(5):457-461.
105. Von Low EC, Perabo FG, Siener R, Muller SC. Review. Facts and fiction of phytotherapy for prostate cancer: a critical assessment of preclinical and clinical data. *In Vivo* 2007; 21(2):189-204.
106. Lemay A, Dodin S, Kadri N, Jacques H, Forest JC. Flaxseed dietary supplement versus hormone replacement therapy in hypercholesterolemic menopausal women. *Obstet Gynecol* 2002; 100(3):495-504.

107. Cassidy A, Albertazzi P, Lise N, I et al. Critical review of health effects of soyabean phyto-oestrogens in post-menopausal women. *Proc Nutr Soc* 2006; 65(1):76-92.
108. Bloedon LT, Szapary PO. Flaxseed and cardiovascular risk. *Nutr Rev* 2004; 62(1):18-27.
109. Cassidy A, Hooper L. Phytoestrogens and cardiovascular disease. *J Br Menopause Soc* 2006; 12(2):49-56.
110. van der Schouw YT, Kreijkamp-Kaspers S, Peeters PH, Keinan-Boker L, Rimm EB, Grobbee DE. Prospective study on usual dietary phytoestrogen intake and cardiovascular disease risk in Western women. *Circulation* 2005; 111(4):465-471.
111. Milder IE, Feskens EJ, Arts IC, Bueno de Mesquita HB, Hollman PC, Kromhout D. Intake of the plant lignans secoisolariciresinol, matairesinol, lariciresinol, and pinoresinol in Dutch men and women. *J Nutr* 2005; 135(5):1202-1207.
112. Horner NK, Kristal AR, Prunty J, Skor HE, Potter JD, Lampe JW. Dietary determinants of plasma enterolactone. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2002; 11(1):121-126.
113. Kilkinen A, Stumpf K, Pietinen P, Valsta LM, Tapanainen H, Adlercreutz H. Determinants of serum enterolactone concentration. *Am J Clin Nutr* 2001; 73(6):1094-1100.
114. Pan A, Sun J, Chen Y et al. Effects of a flaxseed-derived lignan supplement in type 2 diabetic patients: a randomized, double-blind, cross-over trial. *PLoS ONE* 2007; 2(11):e1148.
115. Cunnane SC, Ganguli S, Menard C et al. High alpha-linolenic acid flaxseed (*Linum usitatissimum*): some nutritional properties in humans. *Br J Nutr* 1993; 69(2):443-453.
116. van der Schouw YT, Sampson L, Willett WC, Rimm EB. The usual intake of lignans but not that of isoflavones may be related to cardiovascular risk factors in U.S. men. *J Nutr* 2005; 135(2):260-266.
117. Ouellet V, Marois J, Weisnagel SJ, Jacques H. Dietary cod protein improves insulin sensitivity in insulin-resistant men and women: a randomized controlled trial. *Diabetes Care* 2007; 30(11):2816-2821.
118. Weickert MO, Pfeiffer AF. Metabolic effects of dietary fiber consumption and prevention of diabetes. *J Nutr* 2008; 138(3):439-442.
119. Fenkci S, Rota S, Sabir N, Sermez Y, Guclu A, Akdag B. Relationship of serum interleukin-6 and tumor necrosis factor alpha levels with abdominal fat distribution evaluated by ultrasonography in overweight or obese postmenopausal women. *J Investig Med* 2006; 54(8):455-460.

120. Khaodhiar L, Ling PR, Blackburn GL, Bistrrian BR. Serum levels of interleukin-6 and C-reactive protein correlate with body mass index across the broad range of obesity. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 2004; 28(6):410-415.
121. Park HS, Park JY, Yu R. Relationship of obesity and visceral adiposity with serum concentrations of CRP, TNF-alpha and IL-6. *Diabetes Res Clin Pract* 2005; 69(1):29-35.
122. Trujillo ME, Sullivan S, Harten I, Schneider SH, Greenberg AS, Fried SK. Interleukin-6 regulates human adipose tissue lipid metabolism and leptin production in vitro. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89(11):5577-5582.
123. van Hall G, Steensberg A, Sacchetti M et al. Interleukin-6 stimulates lipolysis and fat oxidation in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88(7):3005-3010.
124. Path G, Bornstein SR, Gurniak M, Chrousos GP, Scherbaum WA, Hauner H. Human breast adipocytes express interleukin-6 (IL-6) and its receptor system: increased IL-6 production by beta-adrenergic activation and effects of IL-6 on adipocyte function. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86(5):2281-2288.
125. Manco M, Fernandez-Real JM, Equitani F et al. Effect of massive weight loss on inflammatory adipocytokines and the innate immune system in morbidly obese women. *J Clin Endocrinol Metab* 2007; 92(2):483-490.
126. Plymate SR, Matej LA, Jones RO, Friedl KE. Inhibition of sex hormone-binding globulin production in the human hepatoma (Hep G2) cell line by insulin and prolactin. *J Clin Endocrinol Metab* 1988; 67:460-464.
127. Nestler JE, Powers LP, Matt DW et al. A direct effect of hyperinsulinemia on serum sex hormone-binding globulin levels in obese women with the polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 1991; 72(1):83-89.
128. Rosner W. Plasma steroid-binding proteins. *Endocrinol Metab Clin North Am* 1991; 20(4):697-720.
129. Deslypere JP, Verdonck L, Vermeulen A. Fat tissue: a steroid reservoir and site of steroid metabolism. *J Clin Endocrinol Metab* 1985; 61:564-570.
130. Galisteo M, Duarte J, Zarzuelo A. Effects of dietary fibers on disturbances clustered in the metabolic syndrome. *J Nutr Biochem* 2007.
131. Hanai H, Ikuma M, Sato Y et al. Long-term effects of water-soluble corn bran hemicellulose on glucose tolerance in obese and non-obese patients: improved insulin sensitivity and glucose metabolism in obese subjects. *Biosci Biotechnol Biochem* 1997; 61(8):1358-1361.
132. Algert S, Shragg P, Hollingsworth DR. Moderate caloric restriction in obese women with gestational diabetes. *Obstet Gynecol* 1985; 65(4):487-491.

133. Munoz J, Derstine A, Gower BA. Fat distribution and insulin sensitivity in postmenopausal women: influence of hormone replacement. *Obes Res* 2002; 10(6):424-431.
134. Asarian L, Geary N. Modulation of appetite by gonadal steroid hormones. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2006; 361(1471):1251-1263.
135. D'Eon TM, Souza SC, Aronovitz M, Obin MS, Fried SK, Greenberg AS. Estrogen regulation of adiposity and fuel partitioning. Evidence of genomic and non-genomic regulation of lipogenic and oxidative pathways. *J Biol Chem* 2005; 280(43):35983-35991.
136. Galisteo M, Duarte J, Zarzuelo A. Effects of dietary fibers on disturbances clustered in the metabolic syndrome. *J Nutr Biochem* 2007.
137. Hanai H, Ikuma M, Sato Y et al. Long-term effects of water-soluble corn bran hemicellulose on glucose tolerance in obese and non-obese patients: improved insulin sensitivity and glucose metabolism in obese subjects. *Biosci Biotechnol Biochem* 1997; 61(8):1358-1361.
138. Slavin JL. Dietary fiber and body weight. *Nutrition* 2005; 21(3):411-418.
139. Hallund J, Tetens I, Bugel S, Tholstrup T, Bruun JM. The effect of a lignan complex isolated from flaxseed on inflammation markers in healthy postmenopausal women. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2008.