

N° d'ordre : 2501

# THESE

Présentée

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE TOULOUSE

École doctorale des Sciences Écologiques, Vétérinaires, Agronomiques et Bioingénieries

Spécialité : Qualité et Sécurité des Aliments

Par

*Claudine Aimée RASOLOHERY*

**Étude des variations de la teneur en isoflavones et de leur composition dans le germe et le cotylédon de la graine de soja [*Glycine max* (L.) Merrill]**

Soutenue le 12 Juillet 2007 devant le jury composé de :

Jean DAYDE  
Ghislaine GRENIER  
Giuliano MOSCA  
Antoine GASET  
Monique BERGER

Professeur EI Purpan  
Professeur Institut La Salle –Beauvais  
Professeur Université de Padoue  
Professeur INP Toulouse  
Enseignant-Chercheur EI Purpan

Directeur de thèse  
Rapporteur  
Rapporteur  
Président de jury  
Invitée

## ***REMERCIEMENTS***

**Je dédie ce travail à**

*Ma congrégation*

*Mon diocèse*

*Mes frères et sœurs*

Ce travail a été réalisé au laboratoire d'Agrophysiologie de l'École d'Ingénieurs de Purpan (Toulouse), sous la direction du Professeur Jean Daydé et de Monique Berger, Enseignante Chercheur.

**Aux membres de jury :**

Je tiens à remercier tout particulièrement Mme Ghislaine Grenier, Enseignante Chercheur de l'Institut Polytechnique La Salle-Beauvais et le Professeur Giuliano Mosca de l'Université de Padoue qui m'ont fait l'honneur d'examiner ce travail en qualité de rapporteurs.

Merci également à Mr le Professeur Antoine Gaset pour avoir accepté de juger ce travail.

A Mme Monique Berger, Enseignante Chercheur à l'École d'Ingénieurs de Purpan, qui a codirigé ce travail, je la remercie aussi pour la qualité de son encadrement en m'offrant la liberté d'exprimer mes idées, tout en me guidant vers la bonne direction. Sa patience, sa disponibilité et ses critiques constructives m'ont beaucoup aidée à avoir toujours un esprit de recherche. Elle m'a accompagnée dans les débuts, initiée à la recherche, aidée dans les manips.

Un grand merci également à Mr Jean Daydé, Directeur de la Recherche à l'École d'Ingénieurs de Purpan pour avoir accepté de diriger cette thèse malgré ses responsabilités, et m'avoir donné de son temps pour l'avancement de ce travail. Qu'il trouve ici ma profonde reconnaissance. Grâce à votre optimisme, votre dynamisme, j'ai pu réaliser le projet de mon diocèse, de mon pays. Grâce à vous, mon pays va pouvoir commencer un projet de développement sous une autre forme pour améliorer la vie des malgaches.

**Je tiens également à remercier :**

Mes premiers remerciements vont à Mme Vassilia Theodorou, Professeur à l'École d'Ingénieurs de Purpan et directrice du laboratoire d'Agrophysiologie, pour m'avoir accueillie dans son équipe, pour sa confiance et ses conseils toujours très encourageants. J'ai apprécié les qualités d'organisation et de planification dans son emploi du temps chargé pour répondre avec une grande disponibilité aux demandes qui lui sont faites.

Je suis très reconnaissante à Mr Roland Cazalis pour le partage de ses expériences, et de ses compétences scientifiques.

L'association des Ami(e)s de Fianarantsoa et l'Archidiocèse de Fianarantsoa, Monsieur L'Abbé Zocco économiste général du diocèse de Fianarantsoa, Monsieur Peltreau Villeneuve Beloha aumônier national de la Communauté Malgache en France qui m'ont soutenue moralement et matériellement pendant mon séjour en France. "*Ampoky ny hafenoana aho ka na ny teny MISAOTRA tsy ampy ahy hisaorako noho ny soa nataonareo tamiko*". "*Ny vavaka no atolotro anareo ho fisaorana*".

Mireille Gaucher-Delmas, technicienne au laboratoire d'Agrophysiologie, pour son aide technique et sa compréhension entre les cultures différentes des 2 pays France-Madagascar.

Anne Calmon, Frédéric Violleau pour leurs encouragements et leurs conseils.

Ma Congrégation CIM de Diego-Suarez, mes frères et sœurs à Madagascar et merci de m'avoir remplacée à mon travail pendant mon absence durant une longue période pour la réalisation de cette thèse.

A l'Association FMMF (Fo Madio Madagacar-France) pour m'avoir soutenue dans la vie courante. Je me retrouve vraiment dans ma famille au milieu de vous. *Misaotra tompoko*.

Enfin, à tous mes compagnons du laboratoire. Permettez moi de citer tout spécialement Alicia et Michael, car nous avons vécu de riches moments ensemble depuis mon premier jour ici au laboratoire et jusqu'à maintenant, merci pour leurs conseils dans la vie quotidienne, leurs encouragements et leur soutien amical, les échanges scientifiques et culturels que nous avons pu avoir.

## **Etude des variations de la teneur en isoflavones et de leur composition dans le germe et le cotylédon de la graine de soja [*Glycine max* (L.) Merrill]**

### **Résumé :**

La graine de soja est très riche en isoflavones, molécules réparties entre les cotylédons et le germe. Ce travail porte sur l'étude de la variabilité et de la cinétique d'accumulation des isoflavones dans ces deux fractions de la graine. Les isoflavones du germe (daidzéine et glycitéine) ont une concentration 5 à 10 fois supérieure à celle des cotylédons (composés de génistéine et daidzéine). Alors que les pourcentages des différentes isoflavones dans les deux compartiments sont principalement sous contrôle génétique, les variations de température pendant le remplissage de la graine affectent essentiellement les teneurs dans les cotylédons. L'étude des cinétiques d'accumulation suggère que les régulations de la synthèse et de la concentration des isoflavones dans les deux compartiments sont indépendantes, offrant ainsi des possibilités de maîtrises différenciées par les voies de la sélection végétale et/ou de la conduite culturale.

**Mots clés :** soja ; fractions de la graine ; isoflavones ; facteurs environnementaux ; effets variétaux ; cinétique d'accumulation.

## **Study on the variation of isoflavone content and composition in the germ and the cotyledons of soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] seed**

### **Abstract :**

The soybean seed is highly concentrated in isoflavones, secondary metabolism molecules found in both cotyledons and hypocotyls. This study focuses on isoflavone variability and accumulation kinetics in these two seed fractions. Hypocotyl isoflavones content (daidzein and glycitein) up 5 to 10 fold upper than in cotyledons (composed of genistein and daidzein). Isoflavone composition in both fractions is mostly dependant on genetic control and changes in temperatures mainly affect cotyledon contents. Accumulation kinetics suggest that the regulations of isoflavone synthesis and accumulation in both fractions are independant. Thus distinct managements of isoflavone contents and compositions could be possible by the mean of breeding and or crop management.

**Key words :** soybean ; seed fractions ; isoflavones ; environmental factors ; cultivar effects ; accumulation kinetics.

## **SOMMAIRE**

## **Introduction Générale**

### **Chapitre I - Éléments Bibliographiques et Problématique**

1. Le soja, la Plante et sa Culture
2. Composition de la Graine de Soja
3. Cinétique d'Accumulation des Divers Composés de la Graine
4. Les Isoflavones : Rôles dans la Plante et Intérêt
5. Facteurs de Variation de la Teneur et de la Composition des Isoflavones dans les Graines de Soja
6. Objectifs de la Thèse

### **Chapitre II - Matériel et Méthodes**

1. Matériel Végétal
2. Conditions de Culture et Facteurs Environnementaux Étudiés
3. Analyses des Échantillons et Traitement des Résultats

### **Chapitre III - Variabilité Génétique et Environnementale**

1. Introduction
2. Publication Scientifique
3. Synthèse et Conclusion

### **Chapitre IV - Cinétiques d'Accumulation**

1. Introduction
2. Publication Scientifique
3. Synthèse et Conclusion

### **Chapitre V - Discussion Générale et Conclusion**

### **Liste des tables et figures**

### **Bibliographie**

### **Table des matières**

## **INTRODUCTION GENERALE**



La graine de soja, [*Glycine max* (L.) Merrill], tient une grande place dans l'alimentation humaine et animale. Introduit aux États-Unis au début du 19<sup>ème</sup> siècle, le soja s'y est fortement développé au cours des 50 dernières années pour atteindre, aujourd'hui, 50% de la production mondiale. En France, les premiers semis ont été réalisés en 1740 par des missionnaires venant de Chine.

L'intérêt économique du soja est lié à la qualité de sa graine, et particulièrement à sa teneur élevée en protéines présentant un excellent profil d'acides aminés essentiels, tels que la lysine. La graine contient également 20% d'huile riche en acide gras polyinsaturés. Plusieurs facteurs physiologiques jouent un rôle important sur l'amélioration de l'espèce, notamment le type de croissance, la précocité en lien avec le choix des lieux de culture (de Toledo *et al.*, 2006). Les conditions environnementales telles que la température et l'irrigation sont des facteurs importants pour la production et leurs effets se répercutent directement sur le rendement (CETIOM, 2005). De plus, un manque d'eau peut être responsable de l'attaque de ravageurs tels que les acariens (Soltner, 1999). Une inoculation des graines par des bactéries *Bradyrhizobium japonicum* avant le semis, est souvent indispensable afin de maximiser la fixation symbiotique de l'azote par l'intermédiaire des nodosités qui se développent au niveau de la racine de la plante. L'utilisation d'herbicides diminue généralement le nombre de nodules (Zawoznik *et al.*, 2005).

Actuellement, dans le domaine de la santé, de nombreuses études ont montré que les asiatiques qui consomment régulièrement des produits à base de soja présentent moins de risques de développer des maladies cardiovasculaires ou certains cancers hormono-dépendants. La présence de composés majeurs dans la graine de soja tels que les protéines ou d'autres molécules en concentrations plus faibles, notamment les isoflavones et les saponines, atténue certaines maladies chroniques, ce qui confère au soja son intérêt en alimentation humaine (Setchell et Cassidy, 1999). Du fait de sa forte concentration en isoflavones, par rapport aux autres compartiments de la graine, le germe de soja intéresse aujourd'hui particulièrement les industries pharmaceutiques et agro-alimentaires. Aux États-Unis, les aliments ou compléments alimentaires riches en isoflavones connaissent un fort développement. De nombreuses études ont été réalisées sur les variétés afin de distinguer les plus riches et de caractériser leurs profils en isoflavones.

D'autre part, bien que les isoflavones aient de faibles effets oestrogéniques chez les nourrissons, leur présence dans les formules infantiles à base de soja pose question (AFSSA et AFSSAPS, 2005). Actuellement, au même titre que des variétés de soja riches en isoflavones, des variétés à faible concentration sont également demandées en fonction des types de consommateurs auxquels les produits dérivés de la graine sont destinés. Ainsi au cours de ce travail de thèse, nous nous sommes intéressés à l'étude de la variabilité et de la cinétique d'accumulation des isoflavones dans les différentes fractions de la graine de soja, afin de permettre aux sélectionneurs, aux producteurs et aux transformateurs de mieux maîtriser les teneurs et compositions de cette famille de molécules

Cependant, même si les sélectionneurs parviennent à créer des variétés potentiellement riches ou pauvres, les teneurs en isoflavones et leurs compositions sont sous forte dépendance des facteurs environnementaux. De nombreuses études ont été menées afin de préciser les facteurs qui peuvent affecter la teneur en isoflavones et leur composition dans la graine de soja. Lee *et al.* (2003) ont montré que la teneur en isoflavones et leurs compositions sont significativement différentes selon le génotype, mais la température (Tsukamoto *et al.*, 1995 ; Carrao – Panizzi *et al.*, 1999 ; Daydé et Lacombe, 2000), l'irrigation (Bennett *et al.*, 2004) ou le type de croissance de la plante (Wang *et al.*, 2000) les affectent également significativement.

Le laboratoire d'Agro-physiologie de l'EI Purpan travaille en partenariat avec une équipe de l'Université d'Urbana-Champaign (Illinois, USA) afin d'étudier les effets des facteurs environnementaux sur la teneur en isoflavones totales et leur composition dans le germe et dans le cotylédon ; l'accumulation des isoflavones dans les graines depuis leur formation jusqu'à leur maturation.

Après une présentation synthétique des données de la littérature qui sous-tendent cette démarche scientifique (Chapitre I), nous décrirons le matériel végétal et les méthodes mises en œuvre pour mener à bien nos travaux (Chapitre II).

Le Chapitre III sera l'objet d'une première étude valorisée par une publication scientifique insérée dans le présent document, basée sur des expérimentations en conditions contrôlées (serre) et en champ conduites aux États-Unis. L'objectif de ce travail est de permettre de mieux déterminer les effets de la température et de l'irrigation, sur la teneur en isoflavones et leur composition, dans les germes et les cotylédons de la graine de soja.

Dans le Chapitre IV, nous rendrons compte, également en insérant la publication scientifique valorisant ces travaux, d'une étude réalisée, au cours de trois années d'expérimentations en serre et au champ, au laboratoire d'Agrophysiologie de l'École d'Ingénieurs de Purpan et sur le site d'expérimentation de la société Euralis semences, également partenaire de ce projet par le biais du GIE soja et de l'ONIDOL qui a financé une partie de ces travaux. Le but de ces essais était de caractériser la cinétique d'accumulation des isoflavones dans les germes et les cotylédons depuis la période du début du développement de la graine, soit 20 JAF (jours après floraison), jusqu'à sa maturation (environ 80 JAF) afin d'accéder à une meilleure connaissance des phénomènes physiologiques régissant la synthèse de ces molécules.

Enfin, dans le cadre d'une discussion générale (Chapitre V), nous synthétiserons les résultats acquis eu égard à ceux de la littérature et nous envisagerons le champ de l'analyse génétique en présentant des résultats préliminaires concernant la ségrégation des teneurs et la composition en isoflavones, dans deux populations F2 issues du croisement réciproque entre deux variétés à teneurs et profils distincts. Ainsi serons-nous en mesure d'établir un certain nombre de préconisations transférables tant au niveau de la sélection variétale que de la production au champ, dans l'objectif d'une maîtrise des contenus et compositions en isoflavones de la graine de soja.

## **CHAPITRE I**

### **ÉLEMENTS BIBLIOGRAPHIQUES ET PROBLEMATIQUE**

# 1. LE SOJA, LA PLANTE ET SA CULTURE

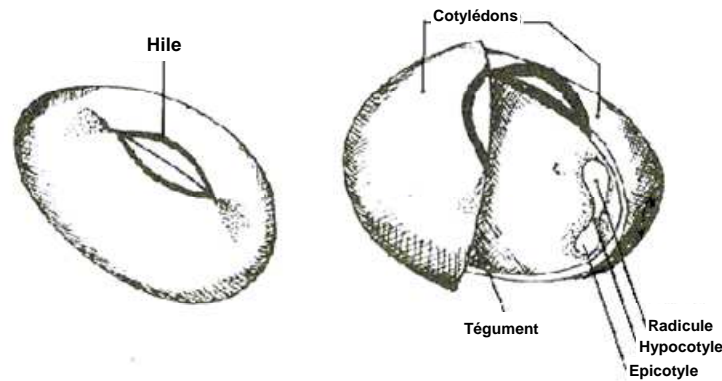
## 1.1. Description générale

Le soja [*Glycine max* (L.) Merrill] appartient à la famille des Fabacées, sous-famille des *Faboideae*, tribu des *Phaseoleae*, genre *Glycine*.

Les feuilles de soja sont de quatre types : deux cotylédonaires, deux feuilles simples, les feuilles trifoliolées et les bractéales. Pendant la floraison, toutes les feuilles contribuent à l'approvisionnement en éléments nutritifs de l'ensemble de la plante ; lors du grossissement du grain, chaque feuille alimente préférentiellement les gousses situées au même étage. La défoliation peut provoquer une diminution de 50% de la production surtout pour les variétés de type déterminé (Li *et al.*, 2005). Les feuilles participent également à l'amélioration de la teneur en protéines de la graine de soja par la photosynthèse (Planchon, 1980 ; Suc, 1993). Pendant l'assimilation de l'azote, les nitrates réductases (NR) réduisent les ions nitrates ( $\text{NO}_3$ ) puisés dans le sol, en ions nitrites ( $\text{NO}_2$ ), et les nitrites réductases (NiR) réduisent les ions nitrites en ammoniums ( $\text{NH}_4^+$ ). Cette réduction a lieu essentiellement au niveau de la feuille. L'activité de l'enzyme NR foliaire permet donc d'apprécier la quantité d'azote assimilée par la plante. Cette activité photosynthétique des feuilles de soja varie en fonction de l'âge de la feuille. Les feuilles contiennent aussi des composés mineurs, notamment des flavones, dont la concentration peut varier en fonction de divers paramètres comme par exemple lors de l'attaque de pathogènes (Wegulo *et al.*, 2005) ou en fonction du stade végétatif de la plante.

Les racines du soja jouent un rôle important pour le ravitaillement en azote de la plante. Elles assurent les deux voies d'alimentation azotée : l'absorption des nitrates du sol et la fixation de l'azote atmosphérique par les bactéries. L'inoculation du soja par la bactérie *Rhizobium japonicum* permet à la culture de couvrir les trois quarts de ses besoins en azote grâce à la symbiose (CETIOM, 2005). La présence des isoflavones dans la racine (Romani *et al.*, 2003) favorise l'activité symbiotique entre le soja et les bactéries. Cette symbiose a lieu au sein d'excroissances racinaires appelées nodules ou nodosités. A l'intérieur de ces nodosités, les bactéries fixent l'azote de l'air, le rendant ainsi disponible pour le soja qui fournit le carbone nécessaire à la croissance des bactéries. L'azote d'origine symbiotique est orienté vers les graines : 80 à 90% de cet azote se retrouve dans les graines à maturité tandis que l'azote minéral se localise davantage au niveau des feuilles et des tiges (Warembourg et Fernandez,

1985 ; Sattin *et al.*, 1987). Le système racinaire pivotant et ligneux du soja lui permet de puiser l'eau en profondeur et de bien fissurer le sol ce qui améliore sa porosité et sa structure.



**Figure 1 : Structure de la graine de soja**

La graine (**Figure 1**) est divisée en trois fractions principales.

- Les cotylédons qui deviendront les premières structures photosynthétiques de la jeune plantule. Ce sont les principaux organes de réserve en protéines et en lipides. Ils représentent 90% de la masse de la graine
- Le tégument représente 8% de la graine. Sa couleur noire, brune, jaune ou verte est variable selon les variétés.
- Le germe — qui se compose de l'épicotyle, l'hypocotyle et la radicule — ne représente que 2% de la matière sèche de la graine, mais il contient, en proportions beaucoup plus grandes que les cotylédons, certains composés mineurs, notamment les isoflavones.

## **1.2. Développement et croissance de la graine**

Il existe deux phases pour le développement de la graine.

- La première phase est appelée "lag-phase" (Egli, 1989). Pendant cette phase, les divisions cellulaires ont lieu. Cette phase coïncide avec l'allongement de la gousse.
- La deuxième phase consiste en l'accumulation de matière sèche dans la graine.

Ces deux phases sont bien distinctes dans le temps (Egli *et al.*, 1981). Ainsi quels que soient le type de croissance de la plante et la situation du bourgeon reproducteur, le remplissage des graines ne commence, à un site donné (nœud), que lorsque la phase d'allongement des gousses de tous les organes présents est terminée. Pour déterminer ces deux

phases de développement de la graine, Ney *et al.* (1993), à partir de travaux sur le pois suggèrent d'utiliser la teneur en eau de la graine. Durant la lag-phase, la teneur en eau reste constante. Le Deunff et Rachidian (1988) et Bradford (1994) ont montré que le début de la diminution rapide de la teneur en eau de la graine coïncide avec la phase de remplissage de la graine et se poursuit jusqu'à sa maturité physiologique.

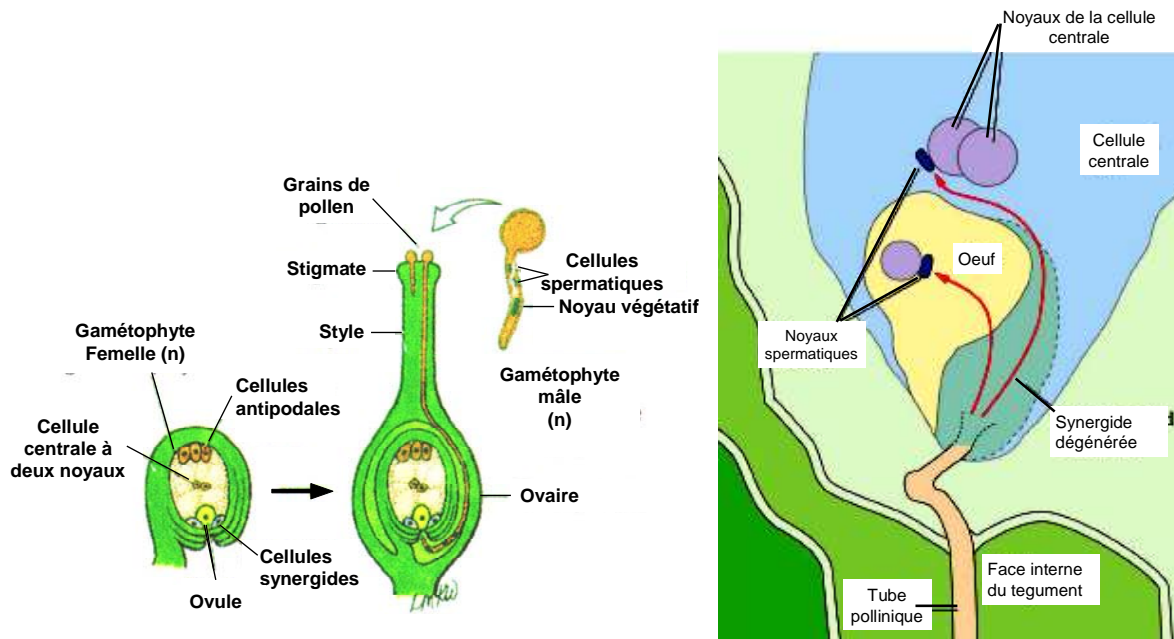
### **1.3. Croissance – Développement – Précocité**

Pendant leur vie, les plantes montrent des changements progressifs et importants de taille et d'aspect dont le rythme et l'amplitude sont très variables selon les espèces, les variétés et même les individus. La croissance au sens strict du terme, correspond à l'augmentation de taille, de masse et de volume. Pour suivre cette croissance on peut réaliser des mesures à différents moments de la vie de la plante. Chez le soja, la croissance peut être déterminée selon la forme de l'extrémité de la tige principale. Hartung *et al.*, (1981) ont classifié le soja en 3 types de croissance : type déterminé, indéterminé et semi-déterminé. Ce caractère aurait un déterminisme génétique fondé sur deux gènes majeurs épistatiques interagissant avec des gènes modificateurs à effets quantitatifs (Bernard, 1972 ; Daydé, 1989).

Le développement détermine l'ensemble des modifications d'un organe ou tissu ou de la plante toute entière durant sa vie. Le développement des plantes est un processus cyclique. Il s'agit de commencer par la germination de la graine jusqu'à la floraison et la sénescence en passant par la croissance végétative et la maturation. Les graines se développent dans l'ovaire de la fleur, où une plante rudimentaire, l'embryon, se forme.

#### **1.3.1. La graine**

La graine est un ensemble complexe de tissus d'origine maternelle ou issus de la fécondation. Après la méiose, le gamète femelle haploïde subit 3 divisions pour donner 8 cellules. Le sac embryonnaire se différencie alors, avec 3 cellules basales : l'ovule entouré de 2 synergides, et 3 cellules antipodales. Les deux cellules restantes fusionnent pour donner une grosse cellule centrale à deux noyaux. Le grain de pollen produit deux gamètes mâles haploïdes identiques. Le premier féconde l'ovule pour former l'œuf, ou zygote. Le second gamète mâle féconde la cellule centrale à deux noyaux, pour donner l'albumen triploïde (*Figure 2*).



**Figure 2 : La double fécondation à l'origine des différents tissus de la graine (traduction des schémas de Goldberg et al., 1997; Bewley 2000, cité par Bradford, 2004)**

L'endosperme qui entoure le zygote, commence à se développer en premier. Les noyaux se divisent rapidement sans division cellulaire (syncytium), et forment une masse « gélatineuse » qui accumule transitoirement des substances nutritives pour l'embryon. C'est une sorte de placenta végétal.

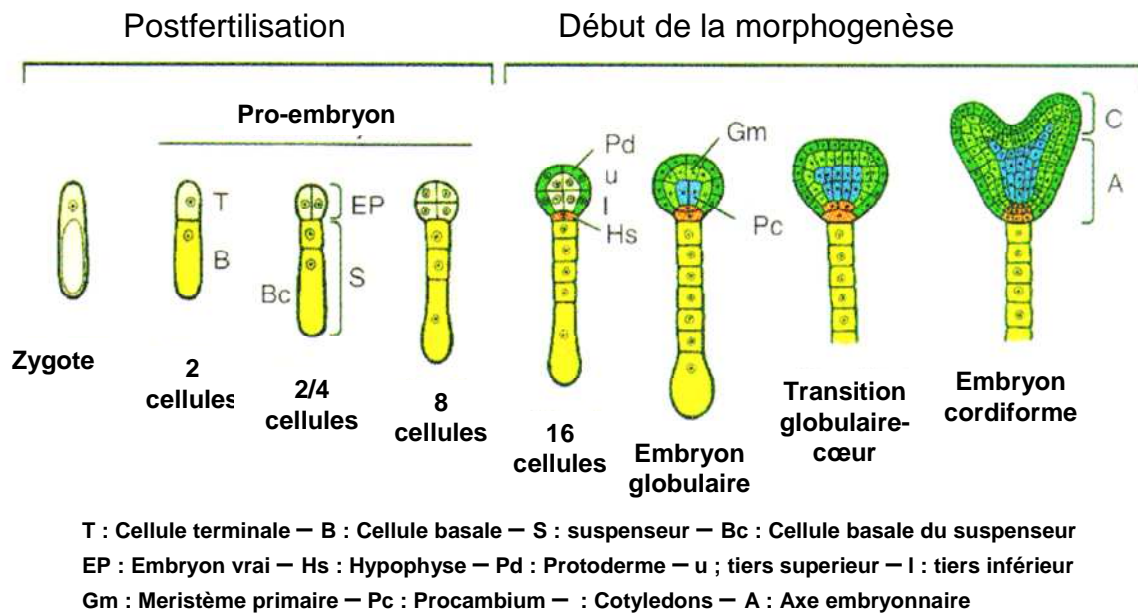
Le zygote (**Figure 3**) subit une division asymétrique qui donnera une grosse cellule basale à l'origine du suspenseur, tandis que la petite cellule terminale donnera la plantule proprement dite. Une seule cellule du suspenseur sera incluse dans l'embryon pour donner l'hypophyse, à la pointe de la future radicule. L'hypophyse évoluera en méristème racinaire.

L'embryon subit plusieurs cycles de divisions en conservant une forme globulaire, puis la différenciation des cotylédons produit une déformation caractéristique en forme de cœur. Dès le stade « torpille » (**Figure 4**), les différentes parties de l'embryon sont parfaitement reconnaissables. Il comprend :

- un axe embryonnaire, avec à sa base, le méristème racinaire, et à son apex, le méristème apical qui développera les tissus aériens de la plante ;
- deux cotylédons, sortes de feuilles primitives, qui se développent en stockant des quantités importantes de carbone sous forme de glucides, de lipides et de protéines, ainsi que des nutriments minéraux et des hormones qui permettent la croissance et le

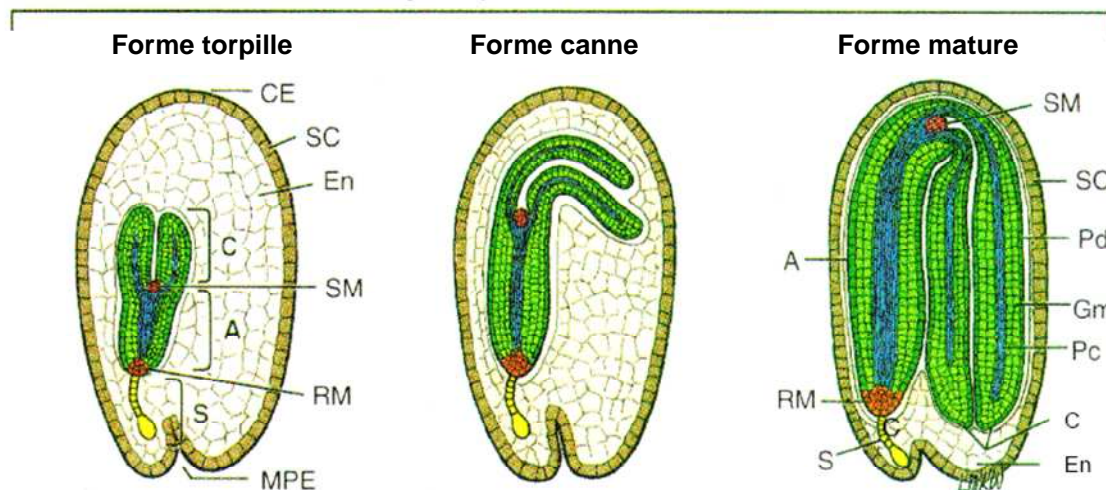


développement des plantules, jusqu'à ce qu'elles acquièrent la capacité d'avoir une photosynthèse active.



*Figure 3 : Premiers stades de développement de l'embryon des angiospermes (d'après Goldberg et al. 1997)*

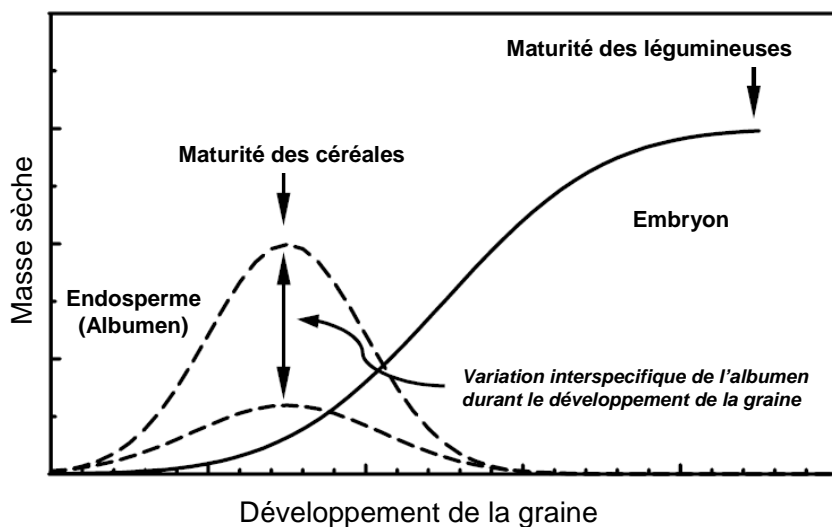
### Organogénèse et maturation



C : Cotylédons — A : Axe embryonnaire — S : Suspenseur — CE : Chalaze — MPE : Micropyle — SC : « Seed coat » ou tégument — En : « Endosperm » ou albumen — SM : Méristème apical — RM ; Méristème racinaire  
 Gm : Meristème primaire — Pc : Procambium

*Figure 4 : Schéma général de la fin de l'organogénèse des dicotylédones d'après les modèles Arabidopsis et Capsella (Goldberg et al., 1997)*

Chez la plupart des dicotylédones, l'albumen, utilisé pour le développement de l'embryon, occupe pratiquement tout le volume de la graine puis, il peut régresser jusqu'à disparaître complètement à maturité. On parle alors de graine exalbuminée. C'est le cas des légumineuses où l'albumen n'a qu'un rôle transitoire dans le stockage des réserves de la graine. A la fin de la maturation, les cotylédons remplissent complètement l'intérieur de la graine. Il ne reste donc plus que deux types de tissus : le tégument, d'origine maternelle, et, issus de la fécondation, les cotylédons surmontant le germe.



**Figure 5 : Importance relative des masses de l'albumen et de l'embryon durant le développement de la graine selon les espèces (Bradford, 2004)**

### 1.3.2. La plante

Fehr et Caviness (1977) ont scindé le développement du soja en deux cycles : végétatif et reproductif (**Figure 6**). Le cycle végétatif débute à la phase d'émergence jusqu'à la terminaison du développement des feuilles trifoliolées au n<sup>ième</sup> nœud au-dessus du nœud cotylédonnaire (stades notés Vn). Le cycle reproducteur commence à partir de la floraison (stade R1) jusqu'à la maturation des graines (stade R8). La durée de la période végétative dépend des caractéristiques de chaque variété en termes de précocité, *i.e.* de sa sensibilité à la photopériode, de la disponibilité en sommes de température et de la disponibilité hydrique. A l'échelle de la plante entière, pour le type indéterminé, on observe un chevauchement des cycles végétatifs et reproducteur.

La précocité est une notion complexe. Elle correspond chez le soja à la durée relative du cycle de développement de la plante si l'on compare différentes variétés semées à la même date, dans le même lieu.



R1 (60) Début floraison.

Une fleur est épanouie à n'importe quel nœud sur la tige principale.

R3 (65) Premières gousses.

Une gousse a 5 mm de long sur l'un des 4 nœuds les plus élevés de la tige principale et portant une feuille pleinement développée.

R5 (69) Premières graines.

Une graine mesure 3 mm dans une des gousses portées par l'un des 4 nœuds les plus élevés sur la tige principale.

R6 (75) Une gousse contient une graine verte qui remplit la cavité sur l'un des 4 nœuds les plus élevés de la tige principale.

R6+ (80) Généralement, fin du franchissement du seuil limite d'avortement par tous les organes. La graine verte atteint 11 mm de long.

R7 (81) Première gousse mûre.

Une gousse contenant au moins une graine sur la tige principale a atteint sa couleur de maturité (marron-beige). La graine s'arrondit dans la gousse.

R8 (90) Maturité.

95 % des gousses sont à R7 (au-delà de ce stade, 5 à 10 jours sont nécessaires pour que l'humidité de la graine soit inférieure à 15 %). La graine est libre dans la gousse.

**Figure 6 : Principaux stades physiologiques du cycle reproducteur du soja (CETIOM, 2005)**

La durée du cycle peut être exprimée en nombre de jours ou mieux, en unités de chaleur (thermopériode) (Ecochard *et al.*, 1978). Ces groupes qui vont de 000 (très précoce, besoin photo-périodique et thermo-périodique peu important et adapté à certaines zones très septentrionales) jusqu'au groupe X (très tardif, besoins photo-périodique et thermo-périodique importants, adapté à la zone équatoriale) ont été définis initialement en Amérique du Nord.

Le choix de la variété de précocité adaptée au milieu constitue la clé de la réussite d'une culture de soja. Ainsi, par exemple, le **Tableau 1** montre le groupe de précocité adéquat selon les zones de production du soja en France (CETIOM, 2005). Pour un même lieu et une même date de semis, les groupes précoces ramifieront moins que des groupes plus tardifs et seront donc moins capables de maintenir leur production lorsque le nombre de plantes par m<sup>2</sup> diminuera (Roumet, 1988).

**Tableau 1 : Groupe de précocité selon les zones de production du soja en France (Source CETIOM, 2005)**

| Régions                                                             | Groupe de précocité conseillé / période de semis                                              |
|---------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------|
| Alsace, Bourgogne, Franche-Comté, Nord Rhône Alpes, Vallées alpines | Groupe 000 / semi tardif de fin mai<br>Groupe 00 / courant mai                                |
| Centre                                                              | Groupe 000 et 00 / début mai                                                                  |
| Poitou-Charentes                                                    | Groupe 00 et 0 / à partir de la fin avril                                                     |
| Région lyonnaise                                                    | Groupe 0 / courant mai                                                                        |
| Moyenne vallée du Rhône                                             | Groupe I / jusqu'à fin mai<br>Groupe II / avril à mi-mai                                      |
| Bordure de l'Atlantique Sud et bordure pyrénéenne                   | Groupe 0 / en semis retardés<br>Groupe I / jusqu'à fin mai                                    |
| Midi Pyrénées et Ouest Audois (sauf bordure pyrénéenne)             | Groupe 0 / semis très retardés<br>Groupe I / jusqu'à fin mai<br>Groupe II / mi-avril à mi-mai |
| Sud méditerranéen                                                   | Groupe I / à partir de la fin mai<br>Groupe II / avril jusqu'à fin mai                        |

#### **1.4. Élaboration du rendement**

Le lit de semence doit être affiné mais sans trop pour éviter le risque de formation d'une croûte de battance très préjudiciable à la germination du soja. L'autre cause de fonte des semis résulte de la sensibilité de la graine à des champignons pathogènes et à un ravageur (mouche du semis) surtout en conditions humides et froides. L'implantation de la culture est primordiale en sols suffisamment réchauffés au printemps.

De plus, la croissance de la plante et la nodulation des racines demandent un type de sol dont le taux de calcaire actif soit inférieur à 10% (CETIOM, 2005). Une fois que les graines sont inoculées, elles doivent être semées immédiatement car les bactéries ont une durée de vie courte à l'air libre et sous exposition lumineuse (3 heures).

La disponibilité hydrique du sol est également une des conditions majeures afin d'obtenir un bon rendement. Dans les conditions de culture du sud-ouest de la France, l'absence d'irrigation conduit à des rendements irréguliers. L'irrigation est liée à la profondeur du sol, au stade de développement de la plante, au groupe de précocité et à la date de semis. Les plantes de variété de groupe I ou II semées dans des sols superficiels ont besoin d'eau à partir de l'apparition des premières fleurs. Par contre pour les mêmes variétés et la même date de semis mais semés dans un sol profond, l'irrigation débute à partir de 12 à 15 jours après floraison mais se poursuit jusqu'à l'apparition des premières gousses mûres pour les deux cas. Ces dates sont modifiables selon le climat de l'année (CETIOM 2005). L'alimentation en eau en fin de cycle permet d'obtenir le grossissement des graines nécessaire à un bon rendement et à une forte teneur en protéines. Quelques résultats obtenus dans la littérature montrent l'incidence d'un déficit hydrique appliqué à différentes périodes du cycle, sur le rendement du soja :

- Avant la floraison, le stress hydrique ne réduit pas significativement le rendement (Elmore *et al.*, 1988 ; Mingeau, 1975).
- Le stress hydrique appliqué pendant la floraison peut, selon son intensité, provoquer une diminution très significative du nombre de graines par plante, jusqu'à 50% par rapport au témoin (Mingeau, 1975 ; Mengistu *et al.*, 2006).
- Pendant la phase de formation des gousses (R3) ou de remplissage (R5), le stress hydrique diminue fortement le rendement (Sionit et Kramer, 1977 ; Dornboss, 1989 ; Sloane *et al.*, 1990 ; Andriani *et al.*, 1991 ; Karam *et al.*, 2005) et la diminution est d'autant plus forte que l'intensité de stress est sévère (Momen *et al.*, 1979).

En résumé la plante ne doit pas subir de stress significatif lors des phases cruciales de mise en place des composantes du rendement : nombre de gousses par plante, nombre de grains par gousse et poids du grain.

Le poids de la graine est en outre fonction de la durée de son remplissage, et de la vitesse de migration des assimilats vers cet organe. Le rendement en graines est corrélé positivement et significativement avec la longueur de la période de remplissage de la graine (Smith et Nelson, 1987 ; Morandi *et al.*, 1994).

Le soja est une plante préférant les climats tempérés chauds. La température intervient sur de nombreux processus physiologiques affectant les vitesses de croissance et de

développement de la plante. Le soja nécessite beaucoup de chaleur, outre le fait d'être sensible à la longueur du jour et à la durée d'ensoleillement (photopériode). A la floraison la température ne doit pas être inférieure à 13°C car en dessous de ce seuil, il y a une diminution importante de la fertilité des fleurs (Abel, 1970). La température s'avère être un facteur limitant pour la culture du soja. Les températures très élevées réduisent le rendement en gousses et en graines d'environ 10% (Peter *et al.*, 1971 ; Baker and Allen, 1989 ; Kim *et al.*, 2004 ; Kim *et al.*, 2005). Le développement du soja dépend bien également des températures nocturnes. L'augmentation de la température de nuit de 20 à 30°C fait diminuer la taille de la graine et augmenter le nombre de fleurs et de gousses sur la 2ème et 3ème ramification (Zheng *et al.*, 2002). Le rythme de développement du soja est étroitement lié aux facteurs température et photopériode (lumière). Ecochard *et al.*, (1978) ont montré que, dans certaines plages de températures, la vitesse de développement suit une variation linéaire en fonction de la température. Les variétés précoces sont généralement plus sensibles à la température que les variétés tardives.

L'avortement des organes reproducteurs peut se produire différemment depuis la période de la floraison jusqu'à une taille critique de développement du grain, soit 6-7 mm selon Pigeaire (1984). Cet avortement est évalué par le rapport entre le nombre de gousses contenant des graines et le nombre d'organes floraux émis. Ce caractère détermine directement le niveau du rendement. Il est aussi important chez les types indéterminés (80%) que chez les autres types de croissance de 70 à 72% (Vidal et Astruc, 1984). En situation de déficit hydrique, Pigeaire *et al.*, (1988) ont montré que les organes de tous âges avortent depuis le stade pré-floral jusqu'au stade limite d'avortement des graines. Cependant, l'irrigation tardive réduit l'avortement des graines dans les gousses en développement, tandis que l'irrigation précoce réduit fortement l'avortement des fleurs et des gousses (Korte *et al.*, 1983). La diminution du nombre de graines peut atteindre jusqu'à 28% en cas de déficit hydrique au stade R5, alors que pour le stade R7, cette diminution n'est pas significative (Karam *et al.*, 2005).

## **2. COMPOSITION DE LA GRAINE DE SOJA**

### **2.1. Composés majeurs de la graine de soja**

La graine de soja est particulièrement riche en protéines (en moyenne 40%), en sucres (35%) et en lipides (20%) et 5% de fibres (en % de matière sèche ; d'après Snyder et Kwon, 1987). Ces composés présentent un grand intérêt pour les industries agroalimentaires.

#### **2.1.1. Les protéines**

Les protéines de soja sont solubles dans l'eau et donc constituées surtout de globulines (80 à 90%), en moindre part d'albumines (10 à 20%) et d'une fraction de glutélines (Hymowitz et Collins, 1974). La classification de ces protéines est étudiée depuis longtemps. Il existe trois classes de protéines selon les coefficients de sédimentation: 2.2S, 7.5S, 11.8S (Catsimpoolas, 1967 ; Hill et Breidenbach, 1974). La fraction 11S correspond à la glycinine, la fraction 7S aux amylases, aux lipoxygénases, aux hémagglutinines et aux conglycinines, la fraction 2S comprend les globulines, les inhibiteurs antitrypsiques, le cytochrome C. Les globulines de types 11S et 7S ont une composition en acides aminés différents : les 11S contiennent plus d'arginine, d'acides aspartique et glutamique, tandis que les 7S sont plus riches en lysine (Gueguen et Alanza, 1985). Les 7S et 11S sont les deux composants très remarquables dans le soja (Wilson, 1987). Le rapport 7S/11S est en moyenne de 1,6 chez le soja (Thanh et Shibasaki, 1976). La différence de concentration de ces deux fractions et leur proportion ont des effets sur la qualité des produits à base de soja (Murphy *et al.*, 1997; Cai and Chang, 1999; Tezuka *et al.*, 2000).

La composition en acides aminés de la graine de soja est satisfaisante. Ces protéines contiennent les 8 acides aminés essentiels et sont particulièrement riches en lysine (7%) (**Tableau 2**). Par contre elles sont pauvres en tryptophane et en acides aminés soufrés (méthionine et cystéine). Ce profil particulier met en évidence la remarquable complémentarité du soja avec les céréales et cette déficience en acides aminés soufrés permet une meilleure fixation du calcium par l'organisme. En plus de leur valeur nutritionnelle, les protéines de soja sont également dotées de plusieurs propriétés bénéfiques pour la santé humaine, en particulier contre l'hypercholestérolémie (Anderson *et al.*, 1995) et les risques de maladies cardiovasculaires (Food and Drug Administration, 1999). En effet, les protéines de soja avec une complémentarité de quantité d'isoflavones, (métabolite secondaire dans la graine de soja que nous découvrirons dans cette étude), diminuent significativement le taux de

mauvais cholestérol chez l'homme, de façon plus efficace que la protéine sans isoflavones (Crouse *et al.*, 1999; Cassidy *et al.*, 1995).

**Tableau 2 : Composition de la graine de soja en acides aminés essentiels**  
(Source : CETIOM 2005 ; FAO/OMS 2003)

| Acides aminés essentiels | Protéine de soja<br>(mg /g de protéines) | Protéine de référence<br>FAO/OMS |
|--------------------------|------------------------------------------|----------------------------------|
| Histidine                | 28                                       | 19                               |
| Isoleucine               | 50                                       | 28                               |
| Leucine                  | 85                                       | 77                               |
| Lysine                   | 70                                       | 58                               |
| Méthionine + cystéine    | 28                                       | 19                               |
| Phénylalanine + tyrosine | 88                                       | 63                               |
| Thréonine                | 42                                       | 34                               |
| Tryptophane              | 14                                       | 11                               |
| Valine                   | 53                                       | 35                               |

Fehr *et al.* (2003) en analysant les protéines totales et en composition dans la graine de soja de 14 génotypes de groupe II sur 24 lieux différents ont montré que les conditions environnementales influencent significativement la concentration en protéines. La teneur en protéine de la graine de soja est très variable en fonction de la température et de la disponibilité hydrique. Cette teneur augmente significativement lorsqu'on passe d'une température de 29°C à une température de 35°C (Dornbos et Mullen, 1992), cependant, Piper et Boote (1999) n'ont pas mis en évidence un effet température sur la teneur en protéine dans la graine entre R5 et R7. Quant au stress hydrique, lorsque l'irrigation est limitée à 70% des besoins globaux de la plante à partir des phases reproductives, la teneur en protéine de la graine est significativement plus élevée (1,6%) par rapport à une culture de soja alimentée à la satisfaction des besoins (Piva, 2001).

### **2.1.2. Les lipides**

La teneur en huile est définie par le pourcentage de lipides contenus dans la graine, généralement déterminé après extraction à l'hexane sous reflux. La teneur en huile de la graine de soja est relativement faible (20,5 %) par rapport à d'autres oléagineux, bien que l'huile de soja soit l'une des plus produites au monde (Daydé *et al.*, 2002). La graine de soja, en comparaison avec les autres graines huileuses, est parmi les plus riches en acides gras poly insaturés (63,6% par rapport au % des acides gras totaux) (Favier *et al.*, 1995). Sa teneur est très variable en fonction de la variété, des conditions de cultures (Bhardwaj *et al.*, 2004) et de la fraction de la graine (**Tableau 3**).



**Tableau 3: Profil des acides gras contenus dans les fractions de graines de soja  
(en % des acides gras totaux)**

|                                  | <b>Germe*</b> | <b>Cotylédons*</b> |
|----------------------------------|---------------|--------------------|
| Acide palmitique C16:0           | 15-20         | 11-15              |
| Acide stéarique C18:0            | 2-5           | 2-5                |
| Acide oléique C18:1              | 5-10          | 20-30              |
| Acide linoléique C18:2           | 40-50         | 45-55              |
| Acide $\alpha$ -linoléique C18:3 | 20-25         | 5-9                |

\* Fiche technique Genibio (Hubert, 2006)

Des études ont mis en évidence les effets bénéfiques des acides gras sur la santé humaine selon la nature et la quantité de ces acides gras. La consommation d'acides gras insaturés est corrélée négativement aux risques de développer des maladies cardiovasculaires (Silbernagl et Despopoulos, 1992). L'acide oléique conduit à une diminution de cholestérol (Martin, 2001) tandis que l'acide  $\alpha$ -linoléique, précurseur des acides oméga-3, a été associé à un risque réduit d'arrêt cardiaque en réduisant l'arythmie (Leaf *et al.*, 1995 ; Mac Lennan *et al.*, 1995). L'acide linoléique, précurseur des acides oméga-6, a un rôle immuno-stimulant et diminue les risques de développement de maladies cardiovasculaires (Demaison et Moreau, 2002).

### **2.1.3. Les glucides**

Les glucides sont des polysaccharides qui peuvent être classés en deux catégories : les sucres solubles et les sucres insolubles. La graine de soja contient de 30 à 35% de sucres dont les sucres solubles, ne représentent que 10% des sucres totaux: 5% de saccharose, 1% de raffinose et 4% de stachyose (Obendorf *et al.*, 1998). Cependant, ces deux derniers peuvent provoquer des problèmes physiologiques tels que la flatulence (Dupuy *et al.*, 1994). *In vivo*, il a été mis en évidence qu'une alimentation avec une concentration de moins de 0,2% de raffinose et de moins de 2,2% de stachyose améliore la digestibilité des nutriments sans avoir de problème de flatulence (Yamka *et al.*, 2006). Des études ont montré aussi que *in vivo* et *in vitro*, les polysaccharides du soja possèdent une activité anti-allergène (Kobayashi, 2005).

La majorité des sucres (21 à 25%), dans la graine de soja, sont des sucres insolubles (cellulose, hémicellulose, lignine). Ils ont deux rôles importants : un rôle de

structure et un rôle de réserve. Les celluloses, les hémicelluloses et les pectines sont des constituants des parois végétales et l'amidon est stocké dans les chloroplastes.

## **2.2. Composés mineurs de la graine de soja**

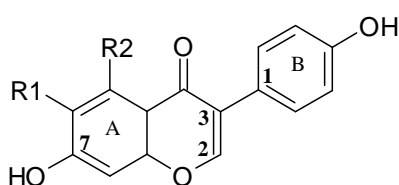
D'autres composés mineurs sont présents dans la graine de soja. Certains peuvent avoir un effet bénéfique sur la santé, d'autres sont considérés comme indésirables car ils altèrent la qualité nutritionnelle des dérivés de la graine. Ils comprennent:

- L'acide phytique accompagnant les protéines et jouant un rôle de chélateur sur certains minéraux en particulier le zinc.
- Divers minéraux dont les quantités dépendent des conditions de culture et du sol.
- De l'azote non protéique comprenant des acides aminés libres, des peptides, des polyamines.
- Des vitamines et des caroténoïdes
- Des saponines qui possèdent deux groupes selon leurs structures chimiques: le groupe A et B. Les saponines A semblent être responsables de goût amer et astringent dans des produits à base de soja (Okubo *et al.*, 1992), tandis que les saponines B ont des effets positifs pour la santé humaine (Lasztity *et al.*, 1998 ; Shiraiwa *et al.*, 1991) tels que hypocholestérolémiant (Sidhu and Oakenfull, 1986 ; Lin *et al.*, 2004), anticarcinogéniques (Gurfinkel *et al.*, 2003 ; Berhow *et al.*, 2000), hépatoprotecteurs (Kinjo *et al.*, 1998). Les saponines A, se trouvent exclusivement dans les germes de soja (Shiraiwa *et al.*, 1991 ; Tsukamoto *et al.*, 1995). Les saponines jouent un rôle important dans les défenses de la plante (Osborn, 1996).
- Des composés phénoliques notamment les isoflavones qui ont un atout majeur actuellement dans le domaine agronomique, et alimentaire - santé.

### 3. LES ISOFLAVONES : ROLES DANS LA PLANTE ET INTERET

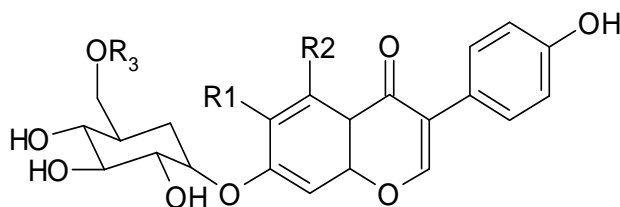
#### 3.1. Structure et caractéristiques

Les isoflavones font partie d'un groupe de composés phénoliques appelés flavonoïdes. Elles sont caractérisées par migration du groupement B de la position 2 vers la position 3. Les isoflavones sont les principaux composés phénoliques du soja. Le structure a deux anneaux de benzène (A et B, **Figure 7**) liés par un anneau de pyranne hétérocyclique. Dans la graine de soja, on ne trouve que les formes 7-O glycosylées.



**Formes aglycones**

| Isoflavone | R1               | R2 |
|------------|------------------|----|
| daidzéine  | H                | H  |
| glycitéine | OCH <sub>3</sub> | H  |
| génistéine | H                | OH |



**Formes conjuguées (glucosides)**

| Isoflavone        | R1               | R2 | R3                     |
|-------------------|------------------|----|------------------------|
| génistine         | H                | OH | H                      |
| glycitine         | OCH <sub>3</sub> | H  | H                      |
| daidzine          | H                | H  | H                      |
| Malonyl-génistine | H                | OH | COCH <sub>2</sub> COOH |
| Malonyl-glycitine | OCH <sub>3</sub> | H  | COCH <sub>2</sub> COOH |
| Malonyl-daidzine  | H                | H  | COCH <sub>2</sub> COOH |
| Acétyl-génistine  | H                | OH | COCH <sub>3</sub>      |
| Acétyl-glycitine  | OCH <sub>3</sub> | H  | COCH <sub>3</sub>      |
| Acétyl-daidzine   | H                | H  | COCH <sub>3</sub>      |

**Figure 7 : Structure des isoflavones du soja**

On trouve des isoflavonoïdes dans un grand nombre de familles de végétaux (Mackova *et al.*, 2006), mais les légumineuses, en particulier les *Papilionoideae* sont les producteurs les plus caractéristiques. Comme tous les flavonoïdes, elles sont dérivées de la phenyl-3-chromone. Ces molécules sont formées à partir de deux voies de synthèse : celle de l'acide shikimique et celle du malonyl CoA.

Dans la graine de soja, il existe 12 isoflavones repartis en trois familles d'isoflavones dérivées de la daidzéine, de la glycitéine et de la génistéine. Ces trois isoflavones existent sous quatre formes : aglycones, dite « forme simple », ou conjuguée : glucosides, acétyl-glucosides, et malonyl-glucosides (Kudou *et al.*, 1991). Les formes acétyles sont considérées comme des artéfacts, issus de la transformation spontanée des malonyles après traitement thermique (Jackson *et al.*, 2002).

### **3.2. Biosynthèse des isoflavones**

La biosynthèse des composés phénoliques est composée de trois voies : la voie des shikimates, la voie des phénylpropanoïdes et la voie des flavonoïdes.

#### **3.2.1. La voie des shikimates**

La synthèse des acides aminés aromatiques commence par la condensation d'une molécule d'érythrose-4-phosphate avec une molécule de phosphoénolpyruvate (PEP). Le glucide à 7 atomes de carbone qui en résulte subit ensuite une cyclisation puis une réduction qui forme le shikimate, d'où la dénomination de la voie.

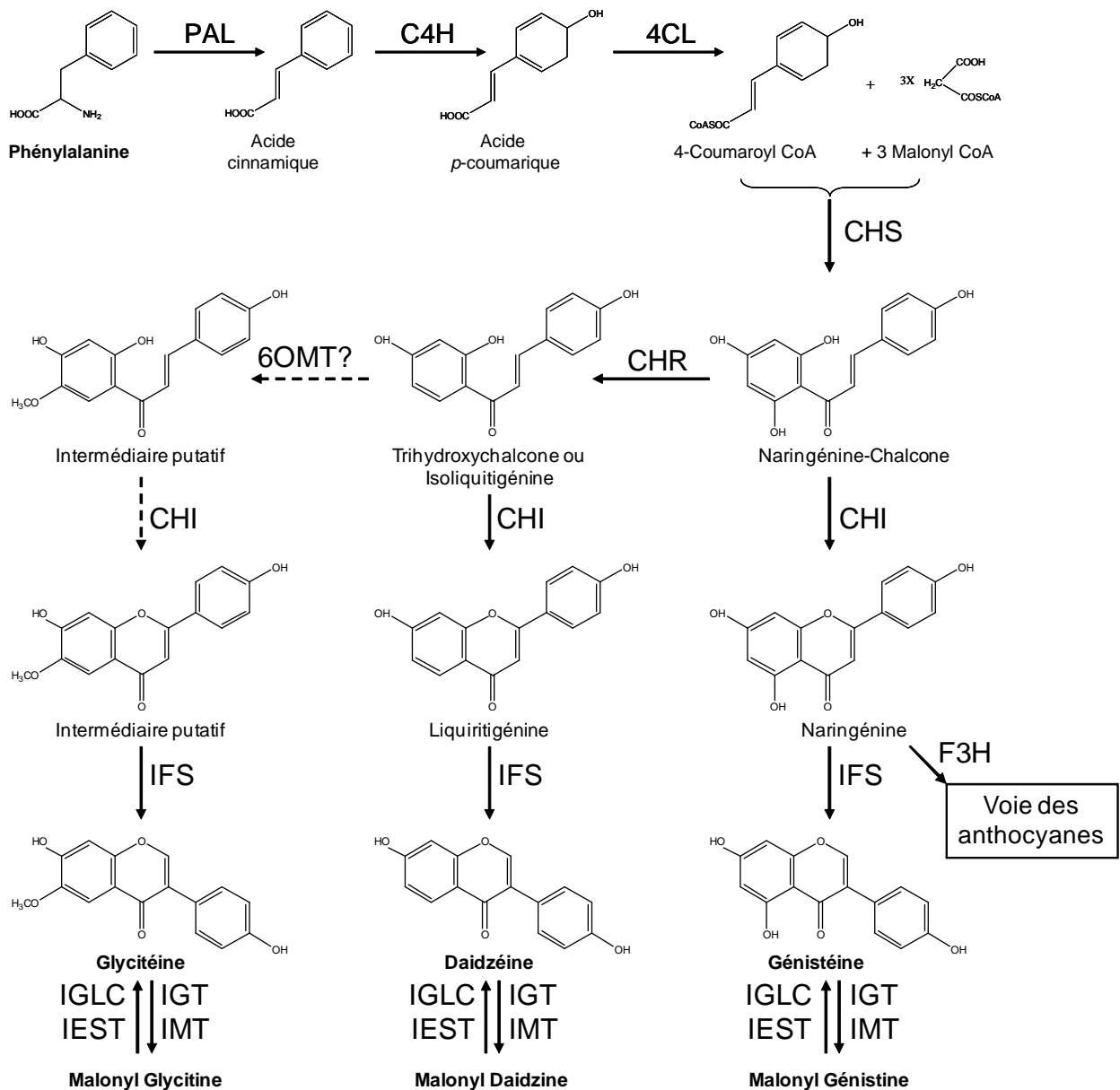
#### **3.2.2. La voie des phénylpropanoïdes ou les composés phénoliques simples**

La synthèse de la plupart des composés secondaires phénoliques commence par la désamination de la phénylalanine en acide cinnamique. L'enzyme responsable de cette réaction, la phénylalanine ammonia lyase (PAL), est une enzyme clé puisqu'elle contrôle l'orientation du carbone vers la production de composés phénoliques plutôt que vers la production de métabolites primaires comme les protéines.

#### **3.2.3. La voie des flavonoïdes : vers les isoflavones ou les anthocyanes**

La chalcone synthase (CHS) provoque la condensation séquentielle de trois molécules de malonyl-CoA et d'une molécule de p-coumaroyl-CoA (**Figure 8**), formant la naringénine-

chalcone (une chalcone est une séquence C6-C3-C6 dans laquelle le cycle C n'est pas encore fermé). Ensuite, la chalcone isomérase (CHI) permet la fermeture du cycle, produisant la naringénine.



PAL : Phenylalanine Aminia Lyase – C4H : Cinnamic acid 4 Hydroxylase – 4CL : 4 Coumarate CoA ligase – CHS : Chalcone Synthase – CHR : Chalcone Reductase – CHI : Chalcone isomérase – ISF : isoflavone synthase F3H : Flavanone 3 Hydroxylase – IGT : Isoflavone 7-O- Glucosyl Transferase – IMT : Isoflavone Malonyl transférase – IEST : isoflavone malonyl glucoside esterase – IGLC : isoflavone glucoside glucosidase

**Figure 8 : Biosynthèse des isoflavones (d'après Winkel-Shirley, 2001; Dixon et Sumner, 2003; Yu et al., 2003)**

La naringénine est le composé intermédiaire dans la formation de la génistéine, mais c'est aussi le premier précurseur des anthocyanes, la Flavanone 3 Hydroxylase – F3H est donc en compétition avec l'Isoflavone Synthase pour ce composé (Yu et al., 2003). La Chalcone

Réductase (CHR) catalyse la synthèse du 6'-deoxychalcone ou isoliquiritigénine (intermédiaire dans la formation de la daidzéine) (Welle et Grisebach, 1988). Puis la chalcone isomérase (CHI) catalyse ensuite l'isomérisation en liquiritigénine. L'isoflavone synthase (IFS) assure l'arrangement moléculaire (migration aryl) au cours duquel

- la liquiritigénine est transformée en daidzéine ;
- la naringénine produit la génistéine (Hagman et Grisebach, 1984).
- La synthèse de la glycitéine n'est pas encore complètement élucidée. Elle fait probablement intervenir une 6 - O - Methyl transférase (6 OMT) qui transforme l'isoliquiritigénine en une flavanone intermédiaire (Latunde-Dada *et al.*, 2001). Cette dernière serait alors isomérisée par l'IFS en glycitéine.

Enfin, plusieurs enzymes assurent la conversion réciproque des formes aglucones vers les formes conjuguées de plus en plus complexes (glucosides, acétyles et malonyles) (Dixon, 1995 ; Barz *et al.*, 1990).

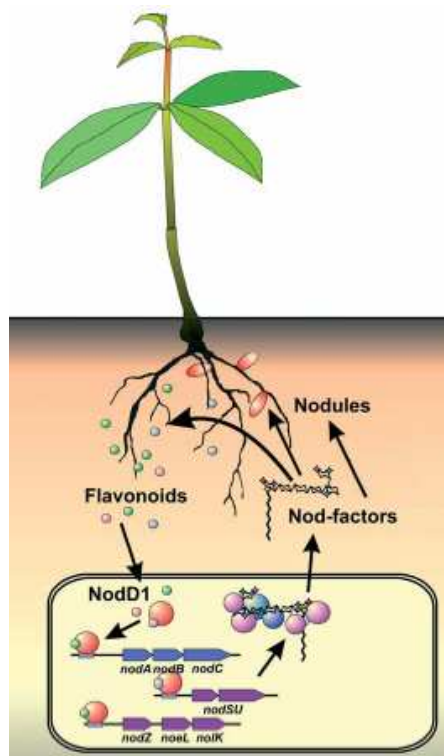
Outre le rôle clé de la PAL et de la CHS dans la production des isoflavones, on peut noter aussi (**Figure 8**) que la CHR, tout comme la F3H peuvent jouer un rôle crucial dans la balance entre la daidzéine et la génistéine ; tandis que le rapport Glycitéine vs. Daidzéine est probablement déterminé par la méthylation de l'isoliquiritigénine.

### **3.3. Rôles physiologiques des isoflavones dans la plante**

Les isoflavones jouent différents rôles importants dans la plante. Elles interviennent dans la mise en place de la symbiose, et plus généralement au niveau des relations plante – microorganismes. Elles jouent aussi un rôle dans la réponse aux stress abiotiques.

#### **3.3.1. Isoflavones et symbiose**

La plante sécrète des composés qui lui permettent d'interagir avec la microflore du sol. Ce sont certains exsudats produits par les légumineuses qui sont spécifiquement reconnus par les rhizobiums et induisent un changement de comportement chez ceux-ci. Les flavonoïdes produits par les racines des légumineuses-hôtes étaient suffisants et les plus grands inducteurs de l'expression de gènes bactériens sont nécessaires pour la nodulation (Broughton *et al.*, 2000) (**Figure 9**).



**Figure 9 : Rôle des flavonoïdes dans la mise en place de la symbiose d'après (Broughton *et al.*, 2003)**

Chez le soja, la daidzéine et la génistéine sont les constituants principaux des extraits racinaires. Chacun de ces composés induit l'expression de "gène nod" de *Bradyrhizobium japonicum* (Kosslak *et al.*, 1987). Les gènes nod, nol, noe sont organisés en opérons et leur expression est régulée par des gènes régulateurs de la famille "nodD". Les gènes nod en opérons sont responsables de la synthèse des enzymes nécessaires à la production des "facteurs nod", tétra- et penta-saccharides de résidus N-acétyl-glucosamine (Lerouge *et al.*, 1990), semblent être à l'origine de la différenciation et de la division cellulaire conduisant, au niveau des racines des légumineuses hôtes, à la formation des nodules (Fisher et Long, 1993 ; Perret *et al.*, 2000 ; Irving *et al.*, 2000; Cullimore *et al.*, 2001; Miklashevichs *et al.*, 2001).

La génistéine semble plus efficace à cette induction que la daidzéine (Sutherland *et al.*, 1990). Il a été montré qu'elle accélère la nodulation et augmente le taux de la fixation de l'azote atmosphérique (Zhang and Smith, 1996; 1997)

La concentration en isoflavones des extraits racinaires peut donc être un indicateur de potentiel de nodulation et de fixation de N<sub>2</sub> d'une variété et donc indirectement de son métabolisme azoté au sens large. L'effet des isoflavones sur la mise en place de l'activité

symbiotique peut présenter plusieurs intérêts d'ordre agronomique : augmentation du taux de l'azote dans la plante, du taux de protéines dans les graines et du rendement (Ali, 1999).

### ***3.3.2. Isoflavone et défense contre les microorganismes***

Les isoflavones jouent aussi un rôle dans les défenses de la plante vis-à-vis des attaques pathogènes : les isoflavones, sont en effet des phytoalexines, qui contribuent à limiter l'extension des infections bactériennes et fongiques dans les plantes (Park *et al.*, 2002). Les phytoalexines sont généralement présentes en très faible concentration ou absentes mais sont rapidement synthétisées lors d'un envahissement par des pathogènes bactériens et fongiques (Graham et Graham, 1991). La génistéine et une molécule dérivée de la daidzéine, la glycéolline, qui interviennent dans la lutte contre les infections (Park *et al.*, 2002).

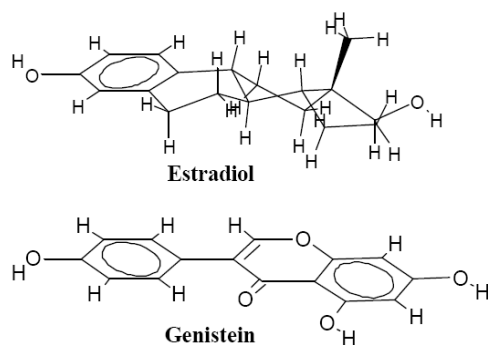
### ***3.3.3. Rôles des isoflavones au niveau des stress environnementaux***

Les isoflavones jouent aussi un rôle très important dans la défense contre les stress abiotiques, tels que l'exposition aux UV (Graham et Graham, 1991). Dans les plantes exposées aux radiations UV, la teneur en flavonoïdes augmente, suggérant qu'ils offrent une protection contre les radiations nocives de l'UV-B (propriétés antiradicalaires et inhibition d'enzymes) (Caldwell *et al.*, 1983).

### ***3.4. Effets des isoflavones sur la santé humaine***

De nombreuses études épidémiologiques, d'essais *in vitro*, d'études chez l'animal et d'essais cliniques chez l'homme suggèrent que les isoflavones pourraient avoir des effets positifs ou négatifs sur la santé. Ces effets sont attribués à leurs propriétés phytoestrogéniques. En effet, les récepteurs estrogéniques (ER) des animaux sont peu spécifiques, et peuvent reconnaître de nombreuses molécules ayant une forme proche des estrogènes. Or, les isoflavones, et en particulier la genistéine, ont une structure très proche de l'estrogène naturel, le 17- $\beta$ -estradiol (**Figure 10**). Ainsi, selon les concentrations et les récepteurs, les isoflavones peuvent avoir des activités agonistes ou antagonistes des estrogènes endogènes, mais elles peuvent aussi agir par des mécanismes non hormonaux (Barnes *et al.*, 2000; Hwang *et al.*, 2006). En effet, la genistéine est un inhibiteur puissant de la thyrosine kinase (Akiyama *et al.*, 1987). Les isoflavones et surtout leur métabolites, ont aussi une action antioxydante (Hodgson *et al.*, 1996).





**Figure 10 : Ressemblance structurelle entre le 17- $\beta$ -estradiol et la genistéine**

Par leurs propriétés phytoestrogéniques, les isoflavones ont suscité beaucoup d'intérêt pour le soulagement des troubles liés à la ménopause, tels que les bouffées de chaleur (Drapier-Faure *et al.*, 2002; Penotti *et al.*, 2003; Huntley et Ernst, 2004; Nahas *et al.*, 2004; Howes *et al.*, 2006). Actuellement, il semblerait que les isoflavones puissent agir dans la lutte contre l'ostéoporose, en stimulant l'ostéogenèse (Dang et Lowik, 2005). Quand aux effets sur les cancers hormono-dépendants, les résultats sont parfois contradictoires, mais les travaux les plus récents semblent s'accorder sur un effet protecteur vis-à-vis du cancer de la prostate (Kim *et al.*, 1998; Awad et Fink, 2000; Adlercreutz, 2002; Castle et Thrasher, 2002; Sarkar et Li, 2003; Greenwald, 2004; Sarkar et Li, 2004; Singh et Agarwal, 2005; Yan et Spitznagel, 2005)

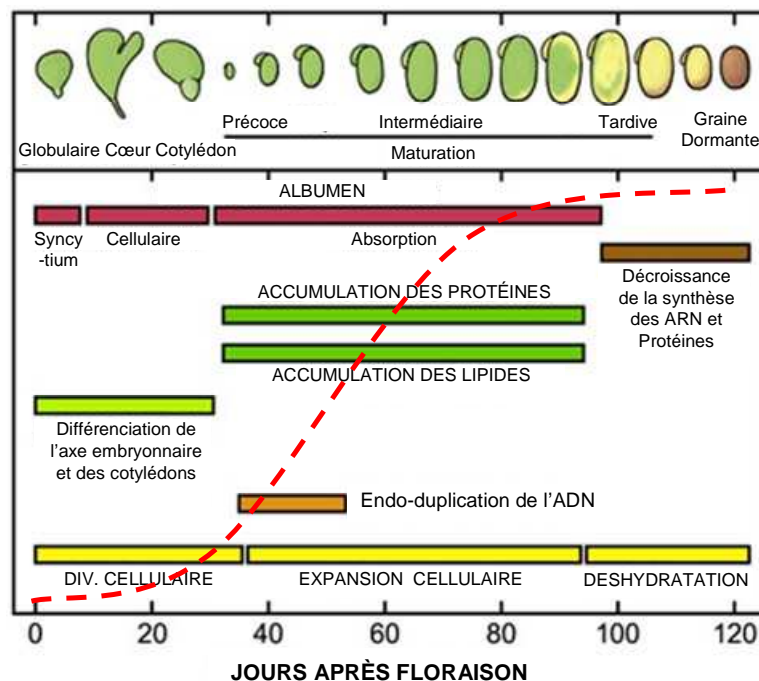
Cependant, en raison de leurs effets phytoestrogéniques, les isoflavones peuvent devenir indésirables dans certains produits à base de soja couramment utilisés en alimentation, tels que les préparations infantiles de substitution que l'on utilise dans les cas d'intolérance au lait, ou l'alimentation des femmes enceintes (Setchell *et al.*, 1998; Whitten et Naftolin, 1998; Fitzpatrick, 2000; This *et al.*, 2001; Franke *et al.*, 2004; Giampietro *et al.*, 2004; Donma et Donma, 2005; Morandi *et al.*, 2005; Todaka *et al.*, 2005; Zlotkin, 2006). Pour ces raisons, l'AFSSA (2005) a émis une recommandation de dose maximale chez l'adulte (1mg d'isoflavones aglycone par kilo et par jour), et préconisé de ne pas donner de soja aux enfants de moins de 3 ans.

Une telle recommandation a produit une forte pression sur les industries de transformation, mais pour l'instant, la mention des quantités d'isoflavones sur l'étiquetage des produits n'est pas demandée. La difficulté vient surtout du fait que l'analyse n'est pas encore standardisée, et de ce fait, on peut observer une forte variabilité des résultats entre laboratoires

(Verbruggen, 2001; Bennetau-Pelissero *et al.*, 2003), tout autant que de très gros écarts entre les teneurs annoncées sur les compléments alimentaires et les quantités effectivement trouvées (Setchell *et al.*, 2001; Nurmi *et al.*, 2002; Hubert *et al.*, 2006)

#### 4. CINÉTIQUE D'ACCUMULATION DES DIVERS COMPOSÉS DE LA GRAINE

Le développement de la graine depuis la fécondation jusqu'à la maturité peut être divisé en 3 étapes : *i*) une phase d'embryogénèse proprement dite, caractérisée par une division cellulaire active, *ii*) l'expansion cellulaire correspondant à la croissance de l'embryon, accompagnée d'une intense activité de synthèse et d'accumulation de réserves protéiques, lipidiques et de sucres, puis *iii*) la préparation à la dormance associée à la déshydratation de la graine (**Figure 11**)(Goldberg *et al.*, 1997; Weber *et al.*, 2005).



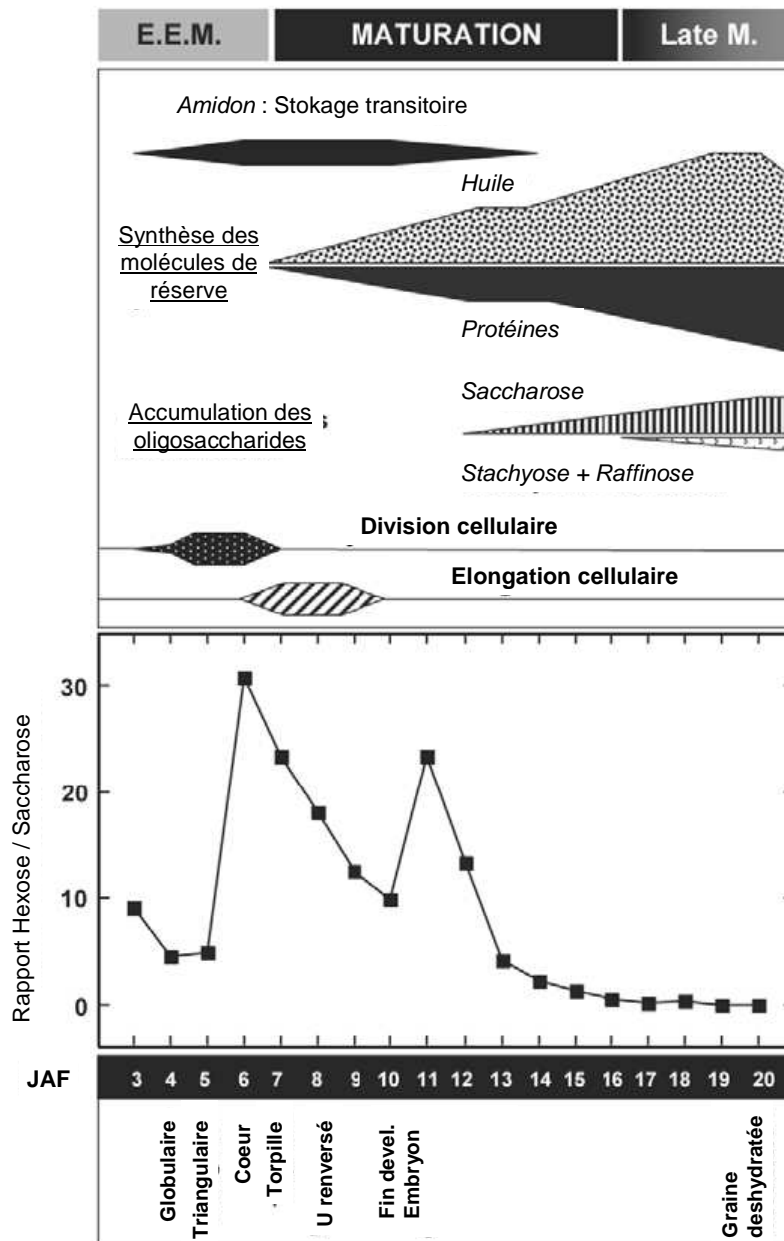
**Figure 11 : Succession des processus physiologiques intervenant durant le développement de la graine de soja – en pointillés rouges : variation de la matière sèche (d'après Goldberg, 2007 – site internet : <http://estdb.biology.ucla.edu/seed/project#seed> )**

Lors la phase d'accumulation, l'embryon grandit en taille avec peu de divisions cellulaires. La synthèse et l'accumulation des protéines et des lipides commencent très tôt, et constituent la principale contribution à l'augmentation de la matière sèche. Ces produits seront utilisés par l'embryon dans les premières étapes de la germination avant la mise en place d'un appareil photosynthétique fonctionnel. La dernière étape de développement est l'étape de dessiccation et entrée en dormance, où la graine perd, selon les espèces de 40 à 90% d'eau. Le développement de la graine est alors arrêté. La paroi de l'ovule se durcit et se différencie en téguments protecteurs, plus ou moins imperméables à l'eau et l'air.

#### 4.1. Composés majeurs : protéines – lipides – sucres

Le stockage des composés majeurs de la graine, étant donné son importance dans l'alimentation humaine a été très étudié. Le pois (Lhuillier-Soundele *et al.*, 1999), soja (Mori *et al.*, 2004) ou la légumineuse modèle *Medicago truncatula* (Gallardo *et al.*, 2003; Abirached-Darmency *et al.*, 2005) ont été les principales légumineuses modèles en ce qui concerne l'étude de l'accumulation des protéines. L'accumulation des lipides a été étudiée chez le colza et le tournesol (Scialabba *et al.*, 1999; Weselake, 2000; O'Hara *et al.*, 2002; Ruuska *et al.*, 2004; Borisjuk *et al.*, 2005; Pleite *et al.*, 2005). Il en ressort que la succession des phases est globalement conservée entre ces différentes plantes (Baud *et al.*, 2002). Nous utiliserons comme guide général une étude globale de l'accumulation des différents composés chez *Arabidopsis thaliana* récemment publiée (**Figure 12**).

L'accumulation des sucres subit des changements caractéristiques des trois phases de développement de la graine : lors de la différenciation embryonnaire, alors que l'albumen est encore un tissu syncytial, la graine contient une forte concentration d'hexoses (glucose et fructose) produits par une invertase qui hydrolyse le saccharose apporté par les tissus maternels. Lorsque l'embryon a suffisamment grossi et qu'il touche la face interne des téguments, l'activité invertase cesse brutalement. Cette étape, qui correspond au début de la phase de maturation est donc marquée par un pic de la teneur en saccharose dans la graine, tandis que les hexoses disparaissent rapidement. Ce pic a probablement un rôle régulateur très important dans le développement de la graine (Weber *et al.*, 2005). Dès son apparition, une intense accumulation transitoire d'amidon débute dans les cotylédons. Elle a lieu dans des chloroplastes qui se spécialisent en amyloplastés où l'amidon forme des masses compactes. Cet amidon servira de réserve énergétique lors de la synthèse des lipides et des protéines de réserve. On observe aussi une accumulation tardive de sucres solubles (stachyose et raffinose) qui débute après le stade R6, un peu plus tôt dans le germe que dans les cotylédons, peut se prolonger pratiquement jusqu'à la fin de la maturation. Cette accumulation coïncide avec le jaunissement des tissus concernés (Kuo *et al.*, 1997; Obendorf *et al.*, 1998). Ces oligosaccharides, jouent un rôle crucial dans l'acquisition de la tolérance à la deshydratation et la dormance des graines. Ils s'accumulent sous l'influence de l'acide abscissique (Blöchl *et al.* 2005)



**Figure 12 : Accumulation des différents composés dans la graine de la plante modèle *Arabidopsis thaliana* d'après Baud *et al.* (2002) — E.E.M : Early Embryo Morphogenesis ; Late M : late maturation stage**

L'accumulation des lipides et des protéines de réserve, suit la courbe d'évolution de la masse sèche de la graine (Baud *et al.*, 2002). Ce qui chez le soja correspond au début du stade R5.

La synthèse des lipides demande beaucoup d'énergie, et l'activité photosynthétique des chloroplastes semblent essentielle (Borisjuk *et al.*, 2005). Ils s'accumulent principalement sous forme de triacylglycérols dans le réticulum endoplasmique où ils sont stabilisés grâce à des protéines, les oléosines, qui empêchent les membranes d'être déstructurées par leurs

interactions hydrophobes avec le contenu lipidique. Les oléosomes, organites de stockage spécialisés se différencient alors et s'accumulent dans le cytoplasme.

La courbe d'accumulation des protéines suit celle de la matière sèche et des lipides. Les protéines sont synthétisées au niveau du réticulum endoplasmique, puis stockées dans les vacuoles via l'appareil de Golgi. Ces vacuoles se divisent en corps protéiques au fur et à mesure de leur remplissage. Contrairement aux lipides qui ralentissent, voire dans certains cas diminuent en fin de maturation, les protéines peuvent continuer de s'accumuler jusqu'à la fin de la maturation si les conditions sont favorables. Il semblerait dans ce cas que les lipides soient dégradés pour favoriser la synthèse des protéines (Baud *et al.*, 2002).

Les cellules accumulent donc conjointement des lipides, des protéines et des sucres. Cette accumulation se fait selon un gradient de la face externe vers la face interne des cotylédons (Weber *et al.*, 2005). Il a été montré que les cellules de l'axe embryonnaire accumulaient ces mêmes composés (Obendorf *et al.*, 1998; Krishnan, 2002).

#### **4.2. Composés mineurs : phytates – saponines - isoflavones**

Les études sur les composés mineurs sont moins nombreuses. On peut toutefois retenir qu'ils peuvent présenter une grande diversité de cinétiques. Ainsi par exemple, l'acide phytique, un composé détecté majoritairement dans les cotylédons de soja où il constitue la principale réserve de phosphore de la graine, s'accumule d'abord dans des vacuoles spécialisées de l'albumen où seront aussi séquestrés le zinc et le magnésium. Ces composés sont ensuite remobilisés vers l'embryon, mais selon des timings différents : le zinc est intégré dans les tissus embryonnaires beaucoup plus tôt, dès le stade torpille. L'acide phytique est déplacé via le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi dans les vacuoles de stockage des protéines où il formera des cristaux (Otegui *et al.*, 2002). Sa concentration augmente progressivement pendant cette période et atteint le maximum à la maturation de la graine (Raboy et Dickinson, 1987 ; Raboy *et al.*, 2000 ; Bowen *et al.*, 2006).

L'accumulation des isoflavones dans la graine de soja a été étudiée. Kudou *et al.*, (1991) ont montré que cette accumulation est différente selon les isoflavones. La génistéine et sa forme malonyle s'accumulent un peu plus tard que la daidzéine et sa forme malonyle correspondante pendant la période de développement de la graine (entre 35 JAF et 60 JAF). Par contre, les saponines, autres composés mineurs très présents dans les graines des légumineuses, diminuent constamment tout au long de la maturation de la graine (Kim *et al.*, 2006).

## **5. FACTEURS DE VARIATION DE LA TENEUR ET DE LA COMPOSITION DES ISOFLAVONES DANS LES GRAINES DE SOJA**

De nombreux facteurs susceptibles de faire varier la teneur en isoflavones de la graine ont été étudiés. Il semble aujourd'hui admis que la teneur totale de la graine est autant influencée par l'environnement que le génotype. Les études de stabilité montrent une interaction génotype environnement significative, mais celle-ci est en général assez faible (Aussenac *et al.*, 1998; Hoeck *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 2003; Daydé *et al.*, 2004; Seguin *et al.*, 2004).

### **5.1. Facteur génétique**

Dans un lieu donné, la teneur en isoflavones de la graine peut varier du simple au double entre deux variétés extrêmes. Cet écart est en général conservé d'un lieu à l'autre, d'une année à l'autre (Daydé *et al.*, 2002). Il y a donc une grande variabilité génotypique des teneurs dans l'espèce soja, qui, combinée à une bonne stabilité des variétés, se traduit par des estimations assez élevées de l'héritabilité (Meksem *et al.*, 2001; Daydé *et al.*, 2004; Kassem *et al.*, 2004; Primomo *et al.*, 2005; Chiari *et al.*, 2006). L'effet génotypique s'est avéré prépondérant sur la composition en isoflavones : les profils sont toujours très bien conservés.

Ces caractéristiques génotypiques pourraient être liées au groupe de précocité, avec des teneurs plus élevées pour les variétés tardives (Wang *et al.*, 2000). Ce phénomène a été démontré aussi sur une série de lignées isogéniques : la teneur en isoflavones est corrélée avec la durée de développement et à précocité égale, elle est plus élevée chez les type indéterminés pour la précocité et le type de croissance (Daydé et Lacombe, 2000).

### **5.2. Facteurs environnementaux**

Selon l'environnement, un génotype peut faire varier sa teneur en isoflavones totale dans la graine d'un facteur deux ou trois, ce qui a conduit à penser que ce caractère pourrait être difficilement maîtrisable en production.

### **5.2.1. Effets lieux**

Les travaux pionniers dans ce domaine ont très vite établi de fortes variations des variétés testées : de 460 à 1950 µg/g pour les mêmes variétés plantées dans quatre lieux différents (Eldridge et Kwolek, 1983) ; de 1149 à 1176 µg/g pour une même variété dans différents lieux de culture (Wang et Murphy, 1994). Une étude multilocale menée au laboratoire d'agrophysiologie de l'E I Purpan sur deux variétés et 9 lieux a montré un écart du simple au double, par contre, les pourcentages des isoflavones sont restés remarquablement stables (Berger *et al.*, 2002; Daydé *et al.*, 2002). Les différences pédo-climatiques de divers lieux de culture jouent un rôle dans ces variations de teneurs en isoflavones. Parmi les éléments minéraux qui pourraient être impliqués, certains ont signalé, un effet du potassium (Vyn *et al.*, 2002). Mais bien entendu, les facteurs climatiques ont aussi une grande importance.

### **5.2.2. Effet température**

L'effet de la température lors du remplissage du grain semble de loin le plus influent sur la teneur en isoflavones totales. Les lieux de culture dont la moyenne de température est plus élevée sont aussi ceux où on relève les plus faibles teneurs en isoflavones. cet effet est parfaitement démontré en conditions contrôlées (Kitamura, *et al.*, 1991 ; Tsukamoto *et al.*, 1995; Caldwell *et al.*, 2005; Lozovaya *et al.*, 2005). On constate aussi que les températures anormalement fraîches en fin de remplissage induisent une très forte accumulation des isoflavones dans la graine.

En se basant sur la biosynthèse des isoflavones, les enzymes clés sont la PAL (Phénylalanine Amonia Liase) et la Chalcone synthase (CHS). Les activités enzymatiques de ces deux enzymes diminuent quand la température augmente, et inversement (Posmyk *et al.*, 2005 ; Campos-Vargas *et al.*, 2005).

### **5.2.3. Effet irrigation**

L'autre facteur généralement très différent d'un lieu à l'autre est la disponibilité en eau. On a en effet constaté un effet de l'irrigation : une irrigation tardive augmente significativement la teneur en isoflavone (Boscredon, 2001). De même, Bennet *et al.* (2004) ont montré en étudiant des variétés tardives et non tardives, que l'irrigation augmente la



teneur en isoflavones d'un facteur 2,5. En conditions contrôlées, un stress hydrique après R6, la teneur est diminuée significativement (Lozovaya *et al.*, 2005). Le stress hydrique induit la diminution de rendement et surtout le PMG. Ce traitement réduit le transfert des assimilats des organes sources (feuilles, tiges) vers les organes puits (les gousses et les graines). Cette réduction affecterait davantage les composés mineurs, notamment les isoflavones au même titre que les molécules de réserve de la graine (protéines et surtout l'huile) (Lacombe, 2000). Un déficit hydrique à partir du stade R5 provoque un raccourcissement de la période de remplissage (Giovanardi et Ceccon, 1990). Quand la période de remplissage est courte, la plante mûrit vite. En effet, la période de l'assimilation des isoflavones dans la graine est assez limitée.

Les teneurs en daidzéine et en génistéine sont significativement élevées en condition irriguée dans les cotylédons ou dans les graines entières (Bennett *et al.*, 2004). Cependant, l'influence de l'irrigation sur la glycitéine et en particulier dans le germe n'a pas encore été étudiée ni lors d'essais en champ, ni en serre.

### **5.3. *Compartiments de la graine***

Les différences de concentration en isoflavones sont très significatives dans les différentes parties de la graine. En effet, le germe de soja possède la plus importante teneur en isoflavones. Bien que le germe ne représente que 2% du poids de la graine de soja, il contient 4 à 10 fois plus d'isoflavones que les cotylédons (Eldridge et Kwolek 1983). Quant à la composition, deux isoflavones sont majoritaires dans le germe : la daidzéine et la glycitéine qui se trouve exclusivement dans le germe. Elle représente 5 à 10% des isoflavones de la graine, mais peut constituer jusqu'à 50% des isoflavones totales du germe (Tsukamoto *et al.*, 1995; Song *et al.*, 1998; Daydé *et al.*, 2004).

Lors de la transformation industrielle de la graine, le germe est écarté, en raison de son goût désagréable. Il devient alors un coproduit de mieux en mieux valorisé, en particulier pour les compléments alimentaires (De Boever *et al.*, 2000; De Boever *et al.*, 2001; Schryver, 2002; Nahas *et al.*, 2004; Tsangalis *et al.*, 2004; Ye *et al.*, 2004a, 2004b).

## 6. OBJECTIFS DE LA THESE

Les isoflavones du soja connaissent un succès grandissant depuis une douzaine d'années et le marché des compléments alimentaires fondant leurs allégations santé sur les propriétés oestrogéniques de ces molécules, s'est considérablement développé tant aux États-Unis qu'en Europe. Les produits alimentaires à base de protéines de soja contiennent aussi des isoflavones et sont également de plus en plus adoptés par les consommateurs, notamment tous les produits "laitiers" déclinés à partir du jus de soja ("tonyu") : boissons, yaourts, crèmes desserts... Dans ce contexte, la controverse sur les effets délétères potentiels de ces molécules, en particulier chez le nourrisson et le jeune enfant (AFSSA et AFSASP, 2005), a provoqué une inflexion à la baisse sur les marchés et une inquiétude des industriels transformateurs. De plus, il a été clairement montré que l'origine des compléments alimentaires à base de soja enrichis en isoflavones est variable (Hubert *et al.*, 2006) : certains sont issus de la graine entière (ou de ses cotylédons) et d'autres des germes, coproduits des fabrications alimentaires. Leurs teneurs et leurs compositions en sont rendues très variables sans que leur étiquetage n'en informe réellement le consommateur.

Le Laboratoire d'Agro-Physiologie de L'E.I.Purpan a engagé des recherches sur les isoflavones du soja depuis la fin des années 90 (Lacombe, 2000), en partenariat avec des scientifiques au niveau international (USA) et les acteurs de toute la filière : producteurs, interprofession, industriels du soja aliment et du secteur des compléments alimentaires. Après un travail conséquent sur la maîtrise (Aussenac *et al.*, 1998) puis l'amélioration des méthodes analytiques de ces molécules, les approches entreprises ont permis une bonne compréhension des effets des facteurs de régulation de la teneur en isoflavones et de leur composition dans la graine entière. S'agissant de molécules issues du métabolisme secondaire de la plante ces facteurs sont bien sûr génétiques mais l'environnement joue toujours un rôle majeur (Daydé et Lacombe, 2000 ; Daydé *et al.*, 2002 ; Lozovaya *et al.*, 2005). Cependant, les pratiques industrielles qui font du germe de soja une matière première innovante sur le marché de l'aliment santé (Hubert, 2006), et les demandes d'autres transformateurs (marché des "soyfoods") qui attendraient plutôt des cotylédons appauvris en isoflavones, ont conduit à considérer les isoflavones dans deux compartiments distincts de la graine : les cotylédons et le germe. Le but visé est la maîtrise de la teneur en isoflavones et de leur composition dans les deux compartiments de la graine. La démarche entreprise consiste à faire se rencontrer, d'une

part, un certain nombre d'études sur le déterminisme génétique de ces caractères et, d'autre part, une approche physiologique visant à préciser les voies de synthèse des isoflavones dans les cotylédons et le germe, en considérant les facteurs de variation génotypiques et environnementaux potentiellement impliqués. C'est ce deuxième point qui constitue l'objectif du présent travail de thèse qui inclut deux volets : une recherche sur la variabilité génétique et environnementale, notamment la réponse de la plante aux variations de température et d'état hydrique du sol, et l'étude des cinétiques d'accumulation des isoflavones dans le germe et les cotylédons de la graine de soja. *In fine*, le transfert de technologie espéré doit concerner le sélectionneur (pour la voie d'amélioration génétique des variétés) et le producteur (par la combinaison du choix variétal et de la mise en œuvre de conduites culturales adaptées).

**CHAPITRE II**  
**MATERIEL ET METHODES**

L'étude de la variabilité des teneurs et des compositions en isoflavones a été réalisée essentiellement à travers le comportement d'Imari et Queen, deux variétés très contrastées qui ont déjà fait l'objet de nombreuses études au laboratoire (Lacombe, 2000; Boscredon, 2001; Berger *et al.*, 2002; Daydé *et al.*, 2002; Salingues, 2003). Selon les essais, elles ont été comparées avec d'autres variétés d'origine, de durée de cycle de reproduction, de composition et/ou teneur en isoflavones remarquables. Ces travaux ont nécessité le fractionnement systématique de tous les échantillons analysés. La cohérence des séries d'analyses a été maintenue grâce à l'utilisation d'une carte de contrôle.

L'étude de l'effet de l'environnement a été réalisée à travers deux expérimentations en collaboration avec le centre national de recherche sur le soja de l'USDA, Université de l'Illinois (Urbana, IL- USA). Une expérimentation en champ visant à tester l'effet d'une irrigation tardive, et un essai en serre selon en plan complet à trois facteurs croisés (5 variétés, 3 régimes de températures après R6, et deux régimes hydriques).

L'étude des cinétiques d'accumulation des isoflavones a été réalisée pendant 2 années (2003 et 2004), sur des plantes cultivées en pot, en serre, au laboratoire d'agrophysiologie, et en champ (année 2005), sur des plantes cultivées en lignes de pépinière, sur le domaine d'expérimentations d'Euralis à Mondonville (31).

## 1. MATERIEL VEGETAL

Imari et Queen ont été utilisées dans chaque expérimentation. Ce sont des variétés de groupe de précocité I-II, particulièrement adaptées aux conditions pédo-climatiques du Sud Ouest de la France. Elles ont d'ailleurs été parmi les plus cultivées dans cette région durant la seconde moitié des années 1990 et longtemps été témoins de référence de leur catégorie. Imari est une obtention Asgrow distribuée par Monsanto, inscrite en 1992, c'est une variété à croissance semi-déterminée, à fleurs violettes, pilosité grise et gros grains beiges à hile brun clair, riche en protéines, très adaptés à l'utilisation en alimentation humaine. Queen a été inscrite en 1992 par Dekalb, et distribuée par la RAGT, c'est une variété à croissance indéterminée, fleurs violettes, pilosité fauve, à petits grains parfois tachetés de noir, au hile noir, de bonne teneur en protéines, cependant inférieure à Imari.

Imari est à teneur en isoflavones particulièrement faible dans les cotylédons et moyenne dans les germes. Elle présente en moyenne 65% de genistéine dans les cotylédons, tandis que la daidzéine est majoritaire dans les germes (plus de 50%). A l'opposé, les graines de la variété Queen présentent une teneur en isoflavones totales en moyenne double de celle d'Imari, surtout en raison de la teneur des cotylédons qui, de plus, contiennent majoritairement de la daidzéine (souvent près de 50%). Les germes de Queen ont une teneur à peine plus élevée que ceux d'Imari, mais leur profil de composition est inversé par rapport à Imari : ceux-ci- contiennent environ 50% de glycitéine, et 30% de daidzéine (Dayd *et al.*, 2004)

Afin de mieux cerner d'éventuelles interactions génotypes - environnement, les variétés américaines Dwight, Loda et Jack, de précocité similaire, ont été incluses dans les essais serre et champ aux USA. Après étude de la collection variétale d'Euralis (Ayerdi-Gotor, 2002; Sensiau, 2002), deux variétés ont été ajoutées pour l'étude des cinétiques d'accumulation des isoflavones :

- la variété Noir de Toulouse (NT), semi-déterminée, à gros grains noirs, un peu plus précoce qu'Imari et Queen (groupe I), présente une très forte teneur en isoflavone dans les germes (elle était présente en serre en 2004 et en champ en 2005) ;
- la variété NS Kasha (NSK), déterminée, précoce (groupe I) a un profil très particulier des isoflavones de ses germes : à maturité, NSK concentre plus de 70% de glycitéine dans ses germes, tout en ayant une teneur comparable à Imari et Queen (testée en serre en 2003 et en champ en 2005).

## **2. CONDITIONS DE CULTURE ET FACTEURS ENVIRONNEMENTAUX ÉTUDIÉS**

Les conditions de culture des essais en champ et en serre concernant l'étude de l'effet de la température et de la disponibilité en eau durant la fin de la maturation sur la teneur et la composition en isoflavones dans les différentes fractions de la graine, sont données de manière détaillées dans la section matériel et méthodes de la publication constituant le chapitre III.

Les traitements ont été appliqués en fin de maturation de la graine, c'est-à-dire après le stade R6. Ils consistent en :

- une irrigation supplémentaire pour les essais en champ ;
- en serre, régime spécifique de températures — plus fraîches (13°C Nuit/23°C Jour) ou plus chaudes (23/33°C) que le régime optimal (18/28°C) —, croisé avec un régime hydrique non limitant, à 70% de la capacité au champ, ou limitant, à 30% de la capacité au champ. Ces conditions ont été maintenues jusqu'à maturité complète.
- Les conditions de culture en serre et en champ pour l'étude de l'accumulation des isoflavones sont décrites en détail dans la section matériel et méthode de la seconde publication présentée au Chapitre IV

L'aspect le plus critique de ces essais était le prélèvement d'un nombre suffisant de graines au même stade de développement. L'objectif étant d'avoir pour chaque variété deux répétitions de 10 à 15 graines par date de prélèvement. Chaque jour, des séries synchrones de gousses de même stade de développement ont été marquées individuellement au moyen d'étiquettes d'horloger datées et colorées de pastilles de couleurs différentes. Une même série devait avoir été marquée la même journée, mais provenait en général de plusieurs plantes. Le stade repère choisi était la longueur de la gousse à 1 cm, qui correspond à Floraison + 7 jours. A chaque prélèvement, les graines étaient le plus rapidement possible disséquées, puis les fractions pesées et le tout congelé pour lyophilisation.

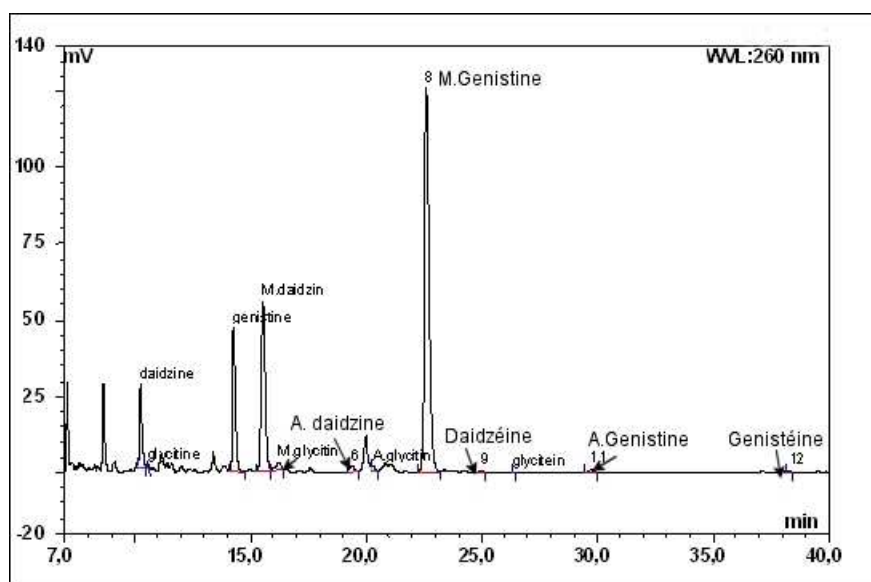
### 3. ANALYSES DES ÉCHANTILLONS ET TRAITEMENT DES RESULTATS

Le protocole de préparation des échantillons et d'analyse des isoflavones est décrit en détail dans les publications insérées aux Chapitres III et IV de ce document de thèse.

#### Analyse des isoflavones - Chromatogrammes

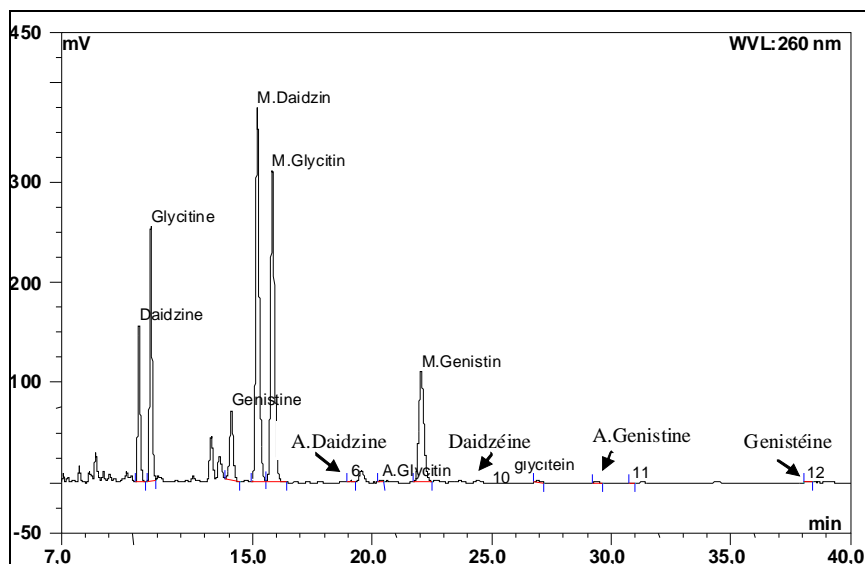
Le protocole détaillé dans les publications ci-après est le protocole d'analyses mis au point au laboratoire d'agrophysiologie utilisé depuis 2001 (Daydé et al. 2002). Il aboutit à la collecte de chromatogrammes d'absorption UV à 260nm dont l'allure est spécifique de la fraction analysée (Figures 13 et 14).

D'une manière générale, l'ordre d'éluition (*i*) daidzine, *ii*) glycitine ; *iii*) genistéine) est respecté, quel que soit l'état de conjugaison de ces molécules. Les formes glucosylées (daidzine, glycitine et genistéine) étant les plus polaires, elles sont éluées en premier, entre la 10<sup>ème</sup> et la 14<sup>ème</sup> minute. Suivent les formes malonylées (M. Daidzine, M Glycitine et M Genistéine), éluées entre la 15<sup>ème</sup> et la 24<sup>ème</sup> minute), puis acétylées (A. Daidzine, A. Glycitine et A. Genistéine) entre la 19<sup>ème</sup> et la 30<sup>ème</sup> minute, et enfin, les formes aglycones (Daidzéine, Glycitéine et Genistéine) entre la 25<sup>ème</sup> et la 40<sup>ème</sup> minute.



**Figure 13 : Chromatogramme d'absorption UV à 260 nm obtenu après séparation HPLC sur colonne RP C18 d'un extrait de cotylédons.**





**Figure 14 : Chromatogramme d'absorption UV à 260 nm obtenu après séparation HPLC sur colonne RP C18 d'un extrait de germes.**

Dans la graine native, les formes conjuguées : glycosyl et malonyl sont largement majoritaires. Les pics correspondant aux formes acétylées et aux aglycones sont à la limite de la détection. Les cotylédons (Figure 13) ont des teneurs en isoflavones plus faibles que les germes (Figure 14), on constate aussi la présence spécifique de glycitéine (et de ses formes conjuguées) dans les germes.

### Traitement des données

Pour valider nos analyses, nous avons mis en œuvre une démarche de type « carte de contrôle ». Une quantité suffisante de poudre de germe (lot industriel produit en 2003, fourni par la société Génibio, Saint Girons, France) et de graine (lot de cv. Imari, culture 2003, domaine de Sandreau, Mondonville, France) a été préparée et réservée dans les meilleures conditions de conservation : lots déshydratés placés dans des piluliers au congélateur. Ils ont fait l'objet d'une série d'analyses de références pour en établir les teneurs et compositions moyennes, puis, ils ont été inclus systématiquement comme témoins à chaque série analytique (environ toutes les 10 analyses). Les valeurs des témoins « germe » et « graine » ont ensuite été utilisées pour valider les analyses de tous les échantillons traités dans ces deux études. Lorsque les résultats étaient différents des valeurs moyennes attendues, les analyses ont été refaites, ou selon les cas, les valeurs ont été corrigées en fonction des témoins.

Les traitements statistiques ont été réalisés à l'aide de SPSS v11, ou de Statistica v7. Pour l'étude des effets de l'environnement, les effets ont été testés à l'aide d'analyses de la variance adéquates, et les moyennes comparées a posteriori par test de Student, Newman et Keuls. Pour les cinétiques d'accumulation, les erreurs standard des moyennes ont été calculées en regroupant, variété par variété, les écart-types des répétitions de mesures selon la

formule :  $s_{regroupé} = \sqrt{\sum_{i=1}^r s_i \cdot n_i / \sum_{i=1}^r n_i}$ , pour r dates et  $n_i+1$  répétitions par dates L'erreur

standard d'un point issu de n répétitions est alors  $SE = s_{regroupé} / \sqrt{n}$ .

Les ajustements de courbes ont été réalisés à l'aide Sigmaplot v9.01, selon un modèle

sigmoïde à 3 paramètres :  $y = a / \left( 1 + e^{-\left(\frac{x-x_a}{b}\right)} \right)$ .

## **CHAPITRE III**

### **VARIABILITE GENETIQUE ET ENVIRONNEMENTALE**



## **1. INTRODUCTION**

Les demandes des transformateurs industriels sont souvent en opposition si l'on considère comme des matières premières distinctes, d'une part les cotylédons et, d'autre part, les germes de la graine de soja. De nombreux compléments alimentaires riches en isoflavones extraites du soja, sont obtenus à partir de germes, comme en attestent leurs compositions (Chen *et al.*, 2005 ; Hubert *et al.*, 2006). Par contre, compte tenu des avis récents des autorités sanitaires, quant aux effets potentiellement délétères des phyto-estrogènes, notamment chez l'enfant (AFSSA et AFSSAPS, 2005), les industriels des aliments à base de protéines de soja recherchent préférentiellement des graines, donc des cotylédons, à faibles concentrations en isoflavones.

La teneur en isoflavones des graines de soja est très dépendante à la fois du facteur génotypique et des conditions environnementales de culture de la plante (par exemple : Tsukamoto *et al.*, 1995 ; Aussenac *et al.*, 1998 ; Carrao-Panizzi *et al.*, 1999 ; Lozovaya *et al.*, 2005). Cependant, les connaissances sont très limitées quant à ces effets sur la répartition de ces molécules entre les germes et les cotylédons. Les expérimentations entreprises visent à lever une partie du voile sur les différences génotypiques et environnementales rencontrées pour la teneur en isoflavones et leur composition dans les germes et les cotylédons de la graine de soja. Afin de déterminer les effets des températures et de l'état hydrique du sol pendant le développement de la graine, deux variétés provenant de France et trois autres originaires des États-Unis ont été cultivées en serre. Au stade "début remplissage de graines" (R6), les plantes ont été soumises à trois alternances de températures diurne / nocturne (23/13°C ; 28/18°C et 33/28°C) et à deux régimes hydriques (70 et 30 % de la capacité au champ). Cette approche a été complétée par une expérimentation au champ, sur le même matériel végétal, en vue de mesurer les effets d'une irrigation tardive. Les résultats obtenus ont fait l'objet d'une première publication scientifique insérée dans ce document de thèse :

RASOLOHERY C. A., BERGER M., LYGIN A. V., LOZOVAYA V. V., NELSON R. L., DAYDÉ J., 2007.

**Effect of temperature and water availability during late maturation of the soybean seed on germ and cotyledon isoflavone content and composition.**

*Journal of Science of Food and Agriculture* (accepté pour publication).

## **2. PUBLICATION SCIENTIFIQUE**

## TITLE

# **Effect of temperature and water availability during late maturation of the soybean seed on germ and cotyledon isoflavone content and composition**

## RUNNING TITLE

Temperature and water availability effects on isoflavones in soybean seed fractions

## AUTHORS' NAMES

Claudine A Rasolohery<sup>1</sup>, Monique Berger<sup>1</sup>, Anatoliy V Lygin<sup>2</sup>, Vera V Lozovaya<sup>2</sup>, Randall L Nelson<sup>3</sup>, Jean Daydé<sup>1</sup>

## AUTHORS' ADDRESSES

<sup>1</sup>UMR 1054 INRA/ESA-Purpan - Laboratoire d'Agrophysiologie, Ecole Supérieure d'Agriculture de Purpan, Toulouse, France

<sup>2</sup>Dep. of Crop Sciences, 1201 W. Gregory Dr., University of Illinois, Urbana, IL 61801, USA

<sup>3</sup>USDA-ARS, Soybean/Maize Germplasm, Pathology, and Genetics Research Unit, Dep. Of Crop Sciences, 1101 W. Peabody Dr., Univ. of Illinois, Urbana, IL 61801, USA

## CORRESPONDING AUTHOR

Monique Berger, UMR INRA/ESAP 1054 - Laboratoire d'agrophysiologie, ESA Purpan, 31076 Toulouse CEDEX 03, France. Tel : 00 33 5 61 15 29 67 – Fax : 00 33 5 61 15 30 -0 – e-mail : monique.berger@esa-purpan.fr

## ACKNOWLEDGEMENTS

This study was supported by grants from the ONIDOL (Organisation Nationale Interprofessionnelle des Graines et Fruits Oléagineux) and the Midi-Pyrénées Région and its Health-Food Network. We thank all these institutions for their financial support.

## ABSTRACT

**BACKGROUND:** Isoflavone content in soybean seeds is strongly influenced by both environment and genotype. However, little is known about the effect of environment and genotype on isoflavones in germ *vs* cotyledons. To determine the effect of temperature and soil moisture status during soybean seed development on seed isoflavone concentration and composition, a set of two French and three U.S. cultivars of similar maturity were grown in the greenhouse. At the R6 growth stage, plants were subjected to one of three night/day temperature regimes (13/23°, 18/28°, or 23/33° C) in either optimal or sub-optimal soil water conditions.

**RESULTS:** In cotyledons, a 3 to 6 fold variation in total isoflavone content was observed between the high and low temperature treatments, whereas the germ contents had less than a two-fold variation. Soil water supply had less effect than temperature on the isoflavone contents and compositions. In both seed parts, the isoflavone concentrations were highly dependent on the cultivar.

**CONCLUSION:** These results show that isoflavone content and composition in cotyledon and germ are unrelated and it should be possible to independently manipulate these seed traits through plant breeding and crop management systems.

## KEYWORDS

Isoflavones; soybean; *Glycine max*; soy germ; hypocotyls; environment, genotype



## INTRODUCTION

Isoflavones are biologically important phytochemicals found in many legumes with high concentrations in soybean seeds. Two major isoflavones, genistein and daidzein and a minor one, glycitein, are found in soybean seeds. The interest in isoflavones has been growing since the late 1990s, as epidemiological and clinical studies have suggested that the consumption of soyfoods is associated with many health benefits, such as lowered risks for breast, prostate and colon cancers,<sup>1,2</sup> cardiovascular diseases,<sup>3,4</sup> or post menopausal bone health.<sup>5</sup> These beneficial effects may partly be due to the weak estrogenic activity of isoflavones which can bind estrogenic receptors.<sup>6</sup> Isoflavones can also exert non-estrogenic effects such as biological antioxidant effects.<sup>7</sup> Individual isoflavones can have specific effects,<sup>7-10</sup> and depending on the gut microflora activity, they may be metabolized into more estrogenic compounds, such as equol produced from daidzein.<sup>11,12</sup> The isoflavone composition of consumed food could influence the health effects. The potential of isoflavones to cause undesirable or deleterious effects has recently been highlighted. Owing to reports of their possible hormonal effects, the safety of isoflavones in infant formulas has been questioned<sup>13</sup> and is still being debated.<sup>14,15</sup> As a result many national health authorities have recommended safe upper limits in daily isoflavone intake.<sup>16,17</sup> Thus, in the soyfood industry there is a growing demand for soybeans with low isoflavone content. In contrast, more and more new soy dietary supplements based on high content isoflavone concentrates are designed, essentially for the menopausal and post menopausal health supplement food market. Isoflavones are 4 to 10 times more concentrated in soy germ than in cotyledons (they generally account for more than 1.5% of the mass of the germ), whereas the seed coats have only traces of isoflavones.<sup>18</sup> During soy food processing, the germ can be separated from the cotyledons, thus becoming a valuable by-product.<sup>19</sup> The isoflavone content and composition of soyfoods and soy dietary supplements are directly related to those found in the raw soybean that they are derived from, and can be highly

variable.<sup>20-23</sup> The main factors responsible for the variation of isoflavone content and composition are the soy genotype and the environmental conditions encountered during seed maturation.<sup>18,24-31</sup> In all these studies, environmental effects can induce more than a twofold variation, but genotypic effects are also very significant. The major environmental factor influencing the seed isoflavone content is temperature during seed filling period.<sup>18,24-27</sup> This is likely why the late sowing dates<sup>18,28</sup> or late maturity groups,<sup>29,32</sup> have generally higher total isoflavone contents. Total content is positively correlated with genistein and daidzein contents, but it can be negatively correlated with the glycitein contents.<sup>30</sup> Genotype by environment interaction is often a significant component of the total isoflavone variation<sup>30,31</sup> but in many cases, the genotype ranking is conserved across environments. Heritability for seed isoflavone content has been estimated from 64 to 70 %<sup>33,34</sup> to 90%.<sup>35</sup> However, heritabilities for individual aglycones (daidzein, genistein or glycitein) displayed significant variations. Heritability was often higher for glycitein,<sup>35,36</sup> but it was sometimes inconsistent because of the low concentration of this isoflavone in the seed.<sup>37</sup> Water status of the plant is also an important component of the whole seed isoflavone content. Isoflavone concentration can be increased by irrigation<sup>38</sup> or decreased by drought.<sup>25,27,39</sup>

Except for two reports<sup>18,40</sup> published in 1983 and 1995, genotypic and environmental effects were investigated only at the whole seed level. The soy germ represents only 2 to 3% of the total seed, thus variation in isoflavone concentration in the germ can be easily masked by the variation in cotyledons even if the germ can contribute up to 20% of the whole seed isoflavone amount.<sup>18,40</sup> The germ is rich in daidzein and contain nearly all the glycitein. This can produce confusing data if the germ and cotyledons do not respond similarly to differences in environmental and genetic factors. Generally, a decrease in the seed weight is accompanied by an increase of the percentage weight of germ,<sup>18</sup> thus, the percentage of the seed that is germ can increase under unfavorable conditions. Such an effect can explain why the total

isoflavone content is negatively correlated with glycitein content in segregating populations,<sup>34</sup> after a drought stress,<sup>39</sup> or as a response to atmospheric CO<sub>2</sub> and/or soil N enrichment.<sup>26</sup> The pattern of expression of the isoflavone synthase isoforms varies among tissues and development stages,<sup>41</sup> and studies on the spatial regulation of the Kunitz trypsin inhibitor gene during the soybean seed development highlighted the specificity of the germ expression patterns.<sup>42</sup>

Soybean cotyledons and germ often have opposite processor demands. Many dietary supplements rich in isoflavones are derived from germ as shown by isoflavone compositional analysis, while protein products derived from cotyledons are screened for low isoflavone concentrations.<sup>43-45</sup> The objectives of this research were to determine the effects of temperature and soil water status during the late seed filling stage on isoflavone concentration and composition of both cotyledons and germ in soybean cultivars.

## EXPERIMENTAL

### Plant material and growth conditions

Five cultivars were selected based on similar times of maturity, and their contrasted difference in isoflavone concentration and profile. Two of them were French cultivars (Imari and Queen), and the other three were U.S. cultivars (Dwight, Jack and Loda). Two experiments, one in controlled conditions in a greenhouse, and the other in the field, were conducted. In the greenhouse, the plants were grown one plant per 30 cm diameter plastic pot under night/daytime temperatures of 18/28°C with high soil moisture in the Plant Science Laboratory greenhouses on the campus of the University of Illinois (Urbana, IL). A sand/soil/perlite (1:1:1) mixture was used and plants were fertilized by watering with micronutrients (Plant Marvel Laboratories Inc., Chicago Heights, IL). A 14.5h photoperiod was maintained with the use of 1000W-high pressure sodium lamps (600W m<sup>2</sup>). When the

plants reached the R6 stage,<sup>46</sup> they were moved into one of three different temperature regimes until maturity: i) intermediate (as above), ii) low (13/23°C), and iii) high (23/33°C). In each temperature treatment, one-half of the plants were grown in high soil moisture ( $\approx 70\%$  of soil holding capacity) and one-half in low soil moisture ( $\approx 30\%$  of the high treatment as measured with a HydroSense Soil Water Measurement System device, SC620 (Spectrum Technologies Inc., Plainfield, IL)). Soil moisture was adjusted every morning. For each cultivar by treatment combination, 5 plants were grown and harvested separately.

The field experiment was grown at the Crop Sciences Research and Education Center of the University of Illinois, Urbana, IL. Five cultivars were planted in one-row plots 3 m long and 0.75 m apart, and seed was sown on June 11, 2001 at a rate of 31 seeds  $\text{m}^{-1}$  row<sup>-1</sup>. Conventional tillage practices were followed maintaining a weed-free environment and recommended fertilization levels were applied. The experimental design was a randomized complete block with two replicates. The treatment design was a split plot with half of the plots receiving only natural rainfall and half of the plots were given approximately 3 cm of irrigation applied on August 10. From the beginning of flowering in early July until August 30 when seed filling was nearly completed, only 12 cm of rainfall was received at the nearest weather recording station approximately 5 km from the test site.

## Chemicals

Acetonitrile and methanol with HPLC purity were purchased from SDS (Peypin, France). Deionized water was generated from a Milli-Q analytical deionization system (Millipore, Saint Quentin Yvelines, France). Purified standards of genistein, daidzein, glycitein, and of their 7-O-glycoconjugates, genistin, daidzin and glycitin were purchased from Chromadex (Santa Ana, CA, USA). Pure DL-methionin used for elementary analysis N calibration was purchased from Sigma Aldrich Chimie (Lyon, France).

## Sample preparation, isoflavone extraction and analysis

For each plant in the greenhouse experiment and for each seed lot harvested from the field experiment, 30 seeds were sampled, freeze-dried and weighed. Samples were fractionated by hand and the fractions were weighed to determine 1000 germ weight and germ percentage. The cotyledons were ground with a mill (IKA Labortechnik, Germany) and the germ by a mortar and pestle. Duplicate aliquots of each finely powdered sample (0.1 g particles  $\text{\O} < 0.200\text{mm}$ ) were extracted with 80% aqueous methanol (7 mL) for 2h at room temperature. The residue was removed after centrifugation and decantation of the clear supernatant. The final solutions were filtered (0.2  $\mu\text{m}$ , Acrodisc Syringe Filters, GHP membranes) and analyzed by HPLC with a P4000 pump controller, AS3000 autosampler and UV2000 detector (Spectra Physics Analytical Inc., Fremont, California, US). The analytical column, 250 x 4.6 mm i.d., 5  $\mu\text{m}$ , Satisfaction RP-C<sub>18</sub>-AB (Cluzeau, Sainte Foy La Grande, France) was kept at 30 °C. The mobile phases were 0.05% (v/v) trifluoroacetic acid in water (solvent A) and acetonitrile (solvent B). The gradient elution was carried out as reported by Murphy et al.<sup>47</sup> with minor modifications as reported previously:<sup>48</sup> solvent B increased from 0 to 15% in 2 min, then to 18% in 4 min, to 24.5% in 26 min, to 40% over 7 min, then to 50% in 1 min, and finally increased to 100% in 6 min. The gradient program recycled back to the initial state of 100% solvent A in 2 min. UV absorbance was monitored at 260 nm. The injection volume was 10  $\mu\text{L}$  and the flow rate was 1.5 mL min<sup>-1</sup>. Calibration curves were established using the  $\beta$ -glucosides and aglycone isoflavones standard molecules. Due to their unstable structure, the malonyl- and acetyl- conjugated isoflavones were not used as external standards. Their response factor was calculated from those of their corresponding  $\beta$ -glucoside forms, correcting them in a molecular mass ratio. Since the malonyl- and acetyl- group does not contain an ultraviolet chromophore, it was hypothesized that the absorption properties of the  $\beta$ -glucoside structures at 260 nm should not be modified by a malonyl- or an acetyl-

conjugation, and that their response factor was only dependent upon their molecular weight. Isoflavones were expressed as aglycone equivalents, in  $\text{g kg}^{-1}$  of dry weight.

#### Quantification of total proteins

The total protein percentage in the cotyledons was determined according to the method of Dumas<sup>49</sup> through the quantification of total nitrogen using an elementary analyzer (NA 2000 Nitrogen analyzer, Fisons Instruments, Milano, Italy). This method involves a total combustion of the matrix under oxygen, followed by a reduction of nitrogen oxides to  $\text{N}_2$  and trapping sulphur components and excess oxygen by copper. The carrier gas was helium. The oxidation tube, containing chromium oxide, cobalt oxide and quartz wool, was heated to  $900^\circ\text{C}$ , while the reduction tube, containing copper and held back by the quartz wool, was heated to  $750^\circ\text{C}$ . The total nitrogen level was determined using a catharometer detector (NA 2000, Nitrogen analyser, Fisons Instruments, Milano, Italy), which was kept in a thermal chamber at  $60^\circ\text{C}$ . Pure DL-methionine (Sigma Aldrich Chimie. Lyon, France) was used as standard, and the coefficient converting nitrogen content into total soy-derived proteins was 6.25. Determinations were made in duplicate on 50 mg aliquots.

#### Statistical analysis

ANOVA and post hoc comparisons between treatments (Newman and Keuls) were made using GLM procedure of the STATISTICA V. 7 for windows (StatSoft France, 2005).

The experimental design in the greenhouse (3 factors: 5 cultivars, 3 temperatures and 2 irrigations) was analysed with a three way ANOVA model where only main factors and second order interactions were taken into account. The third order interaction was pooled with error. The field experiment (5 cultivars and 2 irrigations) was analysed with a complete two-way ANOVA. Post hoc tests used the residual mean square of their respective ANOVA.

## RESULTS

The 12 isoflavone forms were separately analysed in cotyledons and germ, their contents were expressed in aglycone equivalents ( $\text{g kg}^{-1}$ ) and in percentage of total isoflavone in each seed fraction (composition). The other seed characteristics used were seed and germ dry weights (in g per 1000 units), germ ratios (in % of the seed weight), and % protein in cotyledons. Among the 3 factors studied in the greenhouse experiment (cultivar, temperature and soil moisture), the effect of cultivar was highly significant ( $p < 0.001$ ) for all the seed and germ characteristics (Table 1). The temperature effect was also significant, with particularly high values ( $F > 300$ ) for isoflavone contents in cotyledons. The effect of soil moisture during late seed filling was only significant for cotyledon total isoflavone, genistein and daidzein, but not for glycitein content. The cultivar by temperature interaction was highly significant for total isoflavone and daidzein content as well as for the percentages of all of the isoflavone components in cotyledons. Thus, depending on the cultivar, the temperature effect can have a specific influence on the daidzein content, therefore changing the percentages of genistein and daidzein. In the germ, the cultivar by temperature interaction was significant for all four measurements of isoflavone content but only affected the percentage of genistein.

The effect of water supply was also tested in the field (Table 2). The average height of the irrigated plots was 12 cm taller than the non-irrigated plots indicating a drought stress in the plots supplied with only natural rainfall. The effect of irrigation was significant on the major isoflavone contents for both cotyledons and germ except for genistein in the germ. None of the isoflavone percentages was affected by the irrigation except genistein in the germ. In each seed part, the percentage of the major isoflavones was strongly dependent on the cultivar. Late irrigation also had a significant effect on the seed weight, germ ratio and protein content. There was no significant cultivar by irrigation interaction.

Cultivar characteristics for seed traits and isoflavone content and composition in the seed parts.

For all measures of isoflavone content and composition in both seed fractions, as well as seed fraction weights and cotyledon protein percentage, there were significant differences among the 5 cultivars tested (Table 3). Despite the very different conditions encountered, the genotypes had similar ranking in the two experiments. There were larger cultivar difference for seed weight in the greenhouse than in the field but Loda consistently had the largest seeds (greater than 180g per 1000 seeds), whereas Queen, Dwight and Jack were significantly smaller than Loda in both environments (Table 3). Germ weights were also cultivar dependent, but changes in cultivar ranking in the two growing conditions indicate important genotype by environment interaction for this character. The germ ratio displayed significant differences between the cultivars, generally negatively correlated with the seed weights. The larger seeds had small germ ratios (from 2.0 to 2.3% in Imari and Loda seeds), and the smaller seeds had higher ratios (from 2.5% in Queen to 3.2% in Dwight seeds). Thus germ weight was less variable than cotyledon weight between the cultivars. In the two experiments, Imari displayed significantly higher protein contents ( $\approx 40\%$ ) than the other 4 cultivars (34.5 to 36.5% in the greenhouse and slightly higher values in the field).

Despite large differences in the cotyledonary isoflavone amounts, the percentages of each isoflavone were generally consistent in both experiments, and were not correlated with the total content. The cotyledon isoflavone contents were highly genotype-dependent in both experiments. Queen and Dwight had higher total isoflavone contents than the other three cultivars. However, these two cultivars had significantly different percentages of genistein (Queen had always the lowest genistein percentage). The highest genistein ratio was found in the cotyledons of Loda ( $>70\%$ ) and the highest daidzein ratio was found in Queen ( $\approx 40\%$ ). In the germ, the isoflavone contents were also significantly different between the cultivars



(Table 3), with higher contents in Queen, Dwight and Loda and lower amounts in Imari and Jack ( $\approx 10$  to  $12 \text{ g kg}^{-1}$ ). There was not a strong correlation between cotyledon and germ contents. For example, Loda had low total isoflavone content in the cotyledon, but the highest concentration in the germ. The germ isoflavone percentages are stable among the various treatments but highly different among the cultivars, with high glycitein percentages for Queen and Jack ( $\approx 55\%$ ) and low percentages for Imari, Dwight and Loda ( $< 40\%$ ).

#### Temperature and soil moisture effects on seed weights and protein contents

Non-optimal temperatures tended to reduce seed and germ weight (Table 4). Mean seed weight was decreased by 5% under lower temperatures and by 16% under higher temperatures, whereas mean germ weight was significantly reduced by 15% under high temperature. This effect was very consistent for seed weight in Imari but inconsistent for Jack but generally the effects were non-significant at the cultivar level. High temperatures significantly reduced the germ weight for all cultivars except Jack. Drought treatment had no significant effect on seed weight in the greenhouse experiment, except in Jack. However, the 12% decrease of the mean germ weights was significant. In the field experiment (Table 5), the late irrigation induced a slight increase in the seed weights (significant for Queen). Low temperature decreased the mean protein concentration (7%). This was significant for three cultivars but no significant differences were found between the normal and high temperature (the mean protein content only increased from 37.3 to 38.3%) (Table 4). Low soil moisture induced a slight increase in mean protein content, but it was significant only for the mean value. In the field experiment, irrigation significantly decreased the protein concentration for all the cultivars (Table 5).

## Temperature and soil moisture effects on isoflavone contents and composition in cotyledons

In all cultivars tested, the low temperature treatment induced a dramatic increase in cotyledon daidzein and genistein contents. Mean genistein was increased by 130% and daidzein by more than 200% (Table 4). As a result, the compositions were also significantly modified, with a significant mean decrease in the genistein percentage and a significant increase in daidzein percentage. In Queen, daidzein became the major isoflavone. The high temperature treatment had very significant but less dramatic effects. The total isoflavone content in the cotyledons was significantly decreased only in Queen and Dwight. However, the genistein content was significantly decreased under the high temperature in all the cultivars, except Imari. The effect on the composition was consistent with that of the cold temperature. Genistein percentage was increased and daidzein percentage was decreased.

The drought treatment applied in the greenhouse induced moderate decreases in the total contents in all the cultivars, but this effect was significant only for Queen. On the other hand, all isoflavone contents were increased in the late irrigation treatment applied in the field experiment, significantly for Queen, Imari and Dwight (Table 5). The effect of irrigation was not significant on the isoflavone composition, except in the field experiment, where the genistein percentage was decreased.

## Temperature and soil moisture effects on isoflavone contents and composition in germ

Isoflavone contents and compositions in the germ were less sensitive to the environmental effects than in the cotyledon (Table 1 and Table 2). Nevertheless, in the greenhouse experiment (Table 4 and Table 6), the high temperature treatment significantly reduced the total isoflavone contents in all the cultivars. The mean isoflavone content was decreased by 18%, whereas the cold temperature had no effect, except for a significant increase in Imari.

The glycitein contents were more affected by high temperature (significantly in Queen, Imari, Dwight and Jack) than the daidzein contents (significant only in Imari and Loda). The lower temperatures induced a significant increase in the total isoflavone content only in Imari germ. For the individual isoflavones, lower temperatures significantly increased the glycitein content in Jack and the daidzein and genistein contents in Imari. The cold temperature had an effect only on the mean daidzein content. The effect of reduced soil moisture was not significant on the germ characteristics in the greenhouse, but the late irrigation treatment in the field induced a 20% increase of the isoflavone contents in the germ (total isoflavone means: 13.91 vs 11.58 g kg<sup>-1</sup> for Irrigated vs Non Irrigated) with significant increases in glycitein contents in Queen and Loda, and in daidzein contents in Imari and Dwight. The germ weights were not significantly changed by the irrigation treatment.

## DISCUSSION

Most of the previous studies on the variability of isoflavone content in soybeans focused on the whole seed isoflavone contents.<sup>18,24-27,30,31,37</sup> The results of this research shows a significant difference in isoflavone content between cotyledon and germ and alternate effects of temperature and genotype on the isoflavone content of these components. This is important because germ and cotyledons may be subjected to opposite demands for isoflavone content since isoflavones are becoming undesirable in some soy foods.<sup>17</sup> Genistein, which is probably the most studied isoflavone<sup>8</sup> is a minor isoflavone in the germ. However, glycitein, a minor isoflavone component in the whole seed, can comprise as much as 50% of the isoflavone content of the germ.

The prevailing effect of temperature on the isoflavone content was corroborated in this study. However, temperature induced changes were greater in the cotyledons than in the germ. There was a 3 to 6 fold variation in total isoflavone content in cotyledons between the low and high

temperature treatment in the greenhouse, but less than a two-fold variation was observed in the germ. Low temperature had more effect on the cotyledons than on the germ whereas germ contents were significantly decreased by the high temperature. In germ the isoflavone content (in aglycone equivalent) is rarely below 1% of the dry weight. This can probably be related to the role of isoflavones in plant-microbe interactions such as symbiosis with *Bradyrhizobium japonicum*,<sup>50</sup> arbuscular mycorrhizal fungi<sup>51</sup> or seedling defence against pathogens.<sup>52,53</sup> Thus, some unknown regulatory mechanism may ensure a minimal isoflavone content in the germ. Additionally, as mentioned in a previous work,<sup>18</sup> this study showed that the germ weight was only slightly reduced by unfavourable environmental conditions. Germ contribution to whole seed daidzein content can be strongly increased at high temperature. Since daidzein concentration is strongly cultivar dependent, the observed environmental effect in whole seeds may be due to germ-cotyledon weight variations.

Percentage of each isoflavone is mainly under genetic control. The key enzymes of the first common phenylpropanoid pathway steps, phenyl ammonia lyase (PAL), chalcone synthase (CHS) and chalcone reductase (CHR) are known to be strongly over expressed when temperature is decreased<sup>54</sup> and down regulated by high temperature,<sup>55</sup> leading to a general increase or decrease of the synthesis of all isoflavones. The first branching point leads to the synthesis of either daidzein or genistein. The genistein precursor, naringenin, can be taken away by the first enzymes of the anthocyanin pathway, flavanone 3-hydroxylase (F3H) and flavonoid-3'-hydroxylase (F3'H).<sup>56-58</sup> Genotypic variation in this competitive use of naringenin can be a major cause of the cultivar differences in the cotyledon composition.<sup>57,59</sup>

Each isoflavone may not have the same function in the seed. Daidzein, the phytoalexin glyceollin precursor, was shown to be selectively accumulated in cotyledons elicited with a wall glucan preparation from *Phytophthora sojae* whereas genistein could act as an internal plant signal triggering the local hypersensitive cell death and distally inducing the cellular

competency to accumulate phytoalexin.<sup>60</sup> In our study, the composition in each seed fraction appeared mainly under genetic control. However, under low temperature treatment the daidzein percentage was increased in all the cultivars, except Imari which had exactly the opposite behaviour. The daidzein percentages in the germ and cotyledons also displayed opposite trends under high temperature. In the germ, the balance is between daidzein and glycitein, and this metabolism branch point is not yet elucidated. In this study, intriguing environmental effects or interaction have been observed for the minor isoflavone of each fraction. Recent works on isoflavone synthesis and accumulation in developing seeds have pointed out that isoflavones can be transported between maternal and seed tissues.<sup>41</sup> Thus, the hypothesis of some genistein flux from the cotyledons to the germ, as well as some glycitein migration from the germ to the cotyledons is consistent with our observations.

The results of this research indicate that it may be possible to manipulate separately the contents and composition in different seed parts both through plant breeding programs as well as in crop management. However, considering the possibility of the use of soy germ as raw material, more investigations are needed on the role of glycitein in the germ and on its health effects.

## REFERENCES

1. Birt DF, Hendrich S and Wang W, Dietary agents in cancer prevention: Flavonoids and isoflavonoids. *Pharmacol Therapeutics* **90**:157-77 (2001)
2. Sarkar FH and Li YW, Soy isoflavones and cancer prevention. *Cancer Invest.* **21**:744-757 (2003)
3. Clarkson TB, Soy, soy phytoestrogens and cardiovascular disease. *J Nutr* **132**:566S-569S (2002)
4. Teede HJ, McGrath BP, DeSilva L, Cehun M, Fassoulakis A and Nestel PJ, Isoflavones reduce arterial stiffness - a placebo-controlled study in men and postmenopausal women. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **23**:1066-1071 (2003)
5. Satchell KDR and Lydeking-Olsen E, Dietary phytoestrogens and their effect on bone: Evidence from *in vitro* and *in vivo*, human observational, and dietary intervention studies. *Am J Clin Nutr* **78**:593S-609S (2003)
6. Barnes S, Kim H, Darley-USmar V, Patel R, Xu J, Boersma B and Luo M, Beyond ER alpha and ER beta: Estrogen receptor binding is only part of the isoflavone story. *J Nutr* **130**:656S-657S (2000)
7. Lee CH, Yang L, Xu JZ, Yeung SYV, Huang Y and Chen ZY, Relative antioxidant activity of soybean isoflavones and their glycosides. *Food Chem* **90**:735-741 (2005)
8. Dixon RA and Ferreira D, Genistein. *Phytochemistry* **60**:205-211 (2002)
9. Keung WM, Anti-dipsotropic isoflavones: The potential therapeutic agents for alcohol dependence. *Med Res Rev* **23**:669-696 (2003)

10. Gutierrez-Zepeda A, Santell R, Wu Z, Brown M, Wu Y, Khan I, Link CD, Zhao B and Luo Y, Soy isoflavone glycitein protects against beta amyloid-induced toxicity and oxidative stress in transgenic *Caenorhabditis elegans*. *BMC Neurosci* **6**:54 (2005)
11. Rafii F, Davis C, Park M, Heinze TM and Beger RD, Variations in metabolism of the soy isoflavonoid daidzein by human intestinal microfloras from different individuals. *Arch Microbiol* (2003)
12. Atkinson C, Frankenfeld CL and Lampe JW, Gut bacterial metabolism of the soy isoflavone daidzein: Exploring the relevance to human health. *Exp Biol Med* **230**:155-170 (2005)
13. Chen AM and Rogan WJ, Isoflavones in soy infant formula: A review of evidence for endocrine and other activity in infants. *Annu Rev Nutr* **24**:33-54 (2004)
14. Hoey L, Rowland IR, Lloyd AS, Clarke DB and Wiseman H, Influence of soya-based infant formula consumption on isoflavone and gut microflora metabolite concentrations in urine and on faecal microflora composition and metabolic activity in infants and children. *Brit J Nutr* **91**:607-616 (2004)
15. Giampietro PG, Bruno G, Furcolo G, Casati A, Brunetti E, Spadoni GL and Galli E, Soy protein formulas in children: No hormonal effects in long-term feeding. *J Pediatr Endocrin Metab* **17**:191-196 (2004)
16. AFSSA and AFSSAPS, *Sécurité et bénéfices des phyto-estrogènes apportés par l'alimentation - Recommandations*. 2005, AFSSA. pp. 370.
17. Sirtori CR, Arnoldi A and Johnson SK, Phytoestrogens: End of a tale? *Ann Med* **37**:423-438 (2005)
18. Tsukamoto C, Shimada S, Igita K, Kudou S, Kokubun M, Okubo K and Kitamura K, Factors affecting isoflavone content in soybean seeds: Changes in isoflavones,

- saponins, and composition of fatty acids at different temperatures during seed development. *J Agric Food Chem* **43**:1184-1192 (1995)
19. Schryver T, Increasing health benefits using soy germ. *Cereal Foods World* **47**:185-188 (2002)
  20. Nurmi T, Mazur W, Heinonen S, Kokkonen J and Adlercreutz H, Isoflavone content of the soy based supplements. *J Pharm Biomed Anal* **28**:1-11 (2002)
  21. Setchell KDR and Cole SJ, Variations in isoflavone levels in soy foods and soy protein isolates and issues related to isoflavone databases and food labeling. *J Agric Food Chem.* **51**:4146-4155 (2003)
  22. Erdman JW, Badger TM, Lampe JW, Setchell KDR and Messina M, Not all soy products are created equal: Caution needed in interpretation of research results. *J Nutr* **134**:1229S-1233S (2004)
  23. Murphy PA, Isoflavones in soybean processing, in *Nutritionally enhanced edible oil and oilseed processing*, ed by Dunford NT and Dunford HB. AOCS, Champaign, IL. pp. 38-70 (2004)
  24. Carrao-Panizzi MC, Beleia AdP, Kitamura K and Oliveira MCN, Effects of genetics and environment on isoflavone content of soybean from different regions of Brazil. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira* **34**:1787-1795 (1999)
  25. Seguin P, Zheng WJ, Smith DL and Deng WH, Isoflavone content of soybean cultivars grown in eastern Canada. *J Sci Food Agric* **84**:1327-1332 (2004)
  26. Kim S-H, Jung W-S, Ahn J-K, Kim J-A and Chung I-M, Quantitative analysis of the isoflavone content and biological growth of soybean (*Glycine max* L.) at elevated temperature, CO<sub>2</sub> level and N application. *J Sci Food Agric* **85**:2557 - 2566 (2005)



27. Lozovaya VV, Lygin AV, Ulanov AV, Nelson RL, Dayde J and Widhohn JM, Effect of temperature and soil moisture status during seed development on soybean seed isoflavone concentration and composition. *Crop Sci* **45**:1934-1940 (2005)
28. Aussenac T, Lacombe S and Dayde J, Quantification of isoflavones by capillary zone electrophoresis in soybean seeds: Effects of variety and environment. *Am J Clin Nutr* **68**:1480S-1485S (1998)
29. Daydé J and Lacombe S, Variation of isoflavone content and composition in soybean seeds and related products, in *Dawn of the Innovative Era for Soybeans - Third International Soybean Processing and Utilisation Conference - October 15-20. 2000*. Tsukuba, Ibaraki, Japan.
30. Lee SJ, Yan WK, Ahn JK and Chung IM, Effects of year, site, genotype and their interactions on various soybean isoflavones. *Field Crop Res* **81**:181-192 (2003)
31. Hoeck JA, Fehr WR, Murphy PA and Welke GA, Influence of genotype and environment on isoflavone contents of soybean. *Crop Sci* **40**:48-51 (2000)
32. Wang CY, Sherrard M, Pagadala S, Wixon R and Scott RA, Isoflavone content among maturity group 0 to II soybeans. *J Am Oil Chemists Soc* **77**:483-487 (2000)
33. Dayde J, Berger M and Theodorou V, Screening and breeding soybeans for isoflavone content and composition, in *Proceedings VII World Soybean Research Conference, IV International Soybean Processing and Utilization Conference, III Congresso Brasileiro de Soja*, pp. 845-851 (2004)
34. Primomo VS, Poysa V, Ablett GR, Jackson CJ and Rajcan I, Agronomic performance of recombinant inbred line populations segregating for isoflavone content in soybean seeds. *Crop Sci* **45**:2203-2211 (2005)

35. Chiari L, Piovesan ND, Naoe LK, Jose IC, Viana EMS, Moreira MA and de Barros EG, Genetic parameters relating isoflavone and protein content in soybean seeds. *Euphytica* **138**:55-60 (2004)
36. Kassem MA, Meksem K, Iqbal MJ, Njiti VN, Banz WJ, Winters TA, Wood A and Lightfoot DA, Definition of soybean genomic regions that control seed phytoestrogen amounts. *J Biomed Biotech* **1**:52–60 (2004)
37. Primomo VS, Poysa V, Ablett GR, Jackson CJ, Gijzen M and Rajcan I, Mapping QTL for individual and total isoflavone content in soybean seeds. *Crop Sci* **45**:2454-2464 (2005)
38. Bennett JO, Yu O, Heatherly LG and Krishnan HB, Accumulation of genistein and daidzein, soybean isoflavones implicated in promoting human health, is significantly elevated by irrigation. *J Agric Food Chem* **52**:7574-7579 (2004)
39. Caldwell CR, Britz SJ and Mirecki RM, Effect of temperature, elevated carbon dioxide, and drought during seed development on the isoflavone content of dwarf soybean *Glycine max* (L.) merrill grown in controlled environments. *J Agric Food Chem* **53**:1125-1129 (2005)
40. Eldridge AC and Kwolek WF, Soybean isoflavones: Effect of environment and variety on composition. *J Agric Food Chem* **31**:394-396 (1983)
41. Dhaubhadel S, McGarvey BD, Williams R and Gijzen M, Isoflavonoid biosynthesis and accumulation in developing soybean seeds. *Plant Mol Biol* **53**:733-743 (2003)
42. Perez-Grau L and Goldberg RB, Soybean seed protein genes are regulated spatially during embryogenesis. *Plant Cell* **1**:1095-1109 (1989)
43. Chen LJ, Zhao X, Plummer S, Tang J, and Games DE, Quantitative determination and structural characterisation of isoflavones in nutrition supplements by liquid chromatography – mass spectrometry. *J Chromatogr A* **1082**:60-70 (2005)

44. Nurmi T, Mazur W, Heinonen S, Kokkonen J and Adlercreutz H, Isoflavone content of the soy based supplements. *J Pharm Biomed Anal* **28**:1-11 (2002)
45. Hubert J, Paul F, Daydé J and Berger M, Composition variability in soy derived dietary supplements designated for menopausal symptom prevention. *OCL* **13**(4)In press (2006)
46. Fehr WR and Caviness CE, *Stages of soybean development*. Iowa Agric. Home Econ. Exp. Stn., Iowa State, Ames, pp.11 (1977)
47. Murphy PA, Song T, Buseman G, Barua K, Beecher GR, Trainer D and Holden J, Isoflavones in retail and institutional soy foods. *J Agric Food Chem* **47**:2697-2704 (1999)
48. Hubert J, Berger M and Dayde J, Use of a simplified HPLC-UV analysis for soyasaponin B determination: Study of saponin and isoflavone variability in soybean cultivars and soy-based health food products. *J. Agric. Food Chem.* **53**:3923-3930 (2005)
49. Buckee GK, Determination of total nitrogen in barley, malt and beer by Kjeldahl procedures and the Dumas combustion method - collaborative trial. *J Instit Brewing* **100**:57-64 (1994)
50. Broughton WJ, Zhang F, Perret X and Staehelin C, Signals exchanged between legumes and rhizobium: Agricultural uses and perspectives. *Plant and Soil* **252**:129-137 (2003)
51. Antunes PM, Rajcan I and Gross MJ, Specific flavonoids as interconnecting signals in the tripartite symbiosis formed by arbuscular mycorrhizal fungi, *Bradyrhizobium japonicum* (Kirchner) Jordan and soybean (*Glycine max* (L.) merr.). *Soil Biol Biochem* **38**:533-543 (2006)

52. Lozovaya VV, Lygin AV, Zernova OV, Li SX, Hartman GL and Widholm JM, Isoflavonoid accumulation in soybean hairy roots upon treatment with *Fusarium solani*. *Plant Physiol Biochem* **42**:671-679 (2004)
53. Subramanian S, Graham MY, Yu O and Graham TL, RNA interference of soybean isoflavone synthase genes leads to silencing in tissues distal to the transformation site and to enhanced susceptibility to *Phytophthora sojae*. *Plant Physiol* **137**:1345-1353 (2005)
54. Dixon RA and Paiva NL, Stress-induced phenylpropanoid metabolism. *Plant Cell* **7**:1085-1097 (1995)
55. Mori K, Sugaya S and Gemma H, Decreased anthocyanin biosynthesis in grape berries grown under elevated night temperature condition. *Scientia Horticulturae* **105**:319-330 (2005)
56. Jung W, Yu O, Lau SMC, O'Keefe DP, Odell J, Fader G and McGonigle B, Identification and expression of isoflavone synthase, the key enzyme for biosynthesis of isoflavones in legumes. [erratum: May 2000, v. 18 (5), p. 559.]. *Nature Biotech* **18**:208-212 (2000)
57. Yu O, Shi J, Hession AO, Maxwell CA, McGonigle B and Odell JT, Metabolic engineering to increase isoflavone biosynthesis in soybean seed. *Phytochemistry* **63**:753-763 (2003)
58. Schijlen EGW, de Vos CHR, van Tunen AJ and Bovy AG, Modification of flavonoid biosynthesis in crop plants. *Phytochemistry* **65**:2631-2648 (2004)
59. Kim HK, Jang YH, Baek HS, Lee JH, Park MJ, Chung YS, Chung JI and Kim JK, Polymorphism and expression of isoflavone synthase genes from soybean cultivars. *Molecules and Cells* **19**:67-73 (2005)

60. Graham TL and Graham MY, Signaling in soybean phenylpropanoid responses. Dissection of primary, secondary, and conditioning effects of light, wounding, and elicitor treatments. *Plant Physiol* **110**:1123-1133 (1996)

**Table 1. Effect of temperature and water availability during late maturation on isoflavone contents and composition in cotyledons and germs in the greenhouse experiment: F values and Standard Deviations (SD) of the Analysis of Variance (ANOVA). The factors were cultivars (n=5), temperature (3 levels) and irrigation (2 levels) with 5 plants for each combination of treatments. The 3<sup>rd</sup> order interaction was not taken in the model (pooled with the error). Isoflavone contents (total and by aglycone forms) were calculated in aglycone equivalent g kg<sup>-1</sup>, isoflavone compositions were expressed as aglycone equivalent percentages of the total isoflavone of the seed part (% moles).**

| Variable                     | Factors  |                   |                    | Interactions      |                   |                   | SD <sup>a</sup> |
|------------------------------|----------|-------------------|--------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-----------------|
|                              | Cultivar | Temp.             | Irrig.             | Cv*Temp.          | Cv*Irrig.         | Temp*Irrig.       |                 |
| <b>Cotyledon content</b>     |          |                   |                    |                   |                   |                   |                 |
| Total isoflavones            | 47.6***  | 352.8***          | 10.7**             | 6.0***            | 1.9 <sup>NS</sup> | 0.4 <sup>NS</sup> | 0.40            |
| Genistein                    | 38.2***  | 321.8***          | 9.0**              | 1.7 <sup>NS</sup> | 0.9 <sup>NS</sup> | 0.7 <sup>NS</sup> | 0.25            |
| Daidzein                     | 71.2***  | 308.9***          | 10.0**             | 24.9***           | 3.8**             | 1.4 <sup>NS</sup> | 0.17            |
| Glycitein                    | 61.3***  | 6.3**             | 1.6 <sup>NS</sup>  | 1.6 <sup>NS</sup> | 2.6*              | 1.7 <sup>NS</sup> | 0.01            |
| <b>Cotyledon composition</b> |          |                   |                    |                   |                   |                   |                 |
| %Genistein                   | 95.4***  | 31.0***           | 0.1 <sup>NS</sup>  | 22.7***           | 4.6**             | 2.7 <sup>NS</sup> | 3.7%            |
| %Daidzein                    | 166.7*** | 136.6***          | 2.4 <sup>NS</sup>  | 21.3***           | 1.4 <sup>NS</sup> | 0.7 <sup>NS</sup> | 3.3%            |
| %Glycitein                   | 25.9***  | 88.0***           | 11.7***            | 6.7***            | 6.7***            | 3.5*              | 1.9%            |
| <b>Germ content</b>          |          |                   |                    |                   |                   |                   |                 |
| Total isoflavones            | 20.6***  | 31.8***           | 1.1 <sup>NS</sup>  | 2.7**             | 1.2 <sup>NS</sup> | 2.3 <sup>NS</sup> | 1.88            |
| Genistein                    | 15.0***  | 8.1***            | 0.1 <sup>NS</sup>  | 5.5***            | 0.6 <sup>NS</sup> | 3.2*              | 0.32            |
| Daidzein                     | 55.1***  | 25.3***           | 0.02 <sup>NS</sup> | 3.0**             | 1.6 <sup>NS</sup> | 2.3 <sup>NS</sup> | 1.03            |
| Glycitein                    | 63.0***  | 20.5***           | 2.7 <sup>NS</sup>  | 2.3*              | 0.8 <sup>NS</sup> | 1.3 <sup>NS</sup> | 1.07            |
| <b>Germ composition</b>      |          |                   |                    |                   |                   |                   |                 |
| %Genistein                   | 29.6***  | 28.3***           | 3.2 <sup>NS</sup>  | 2.8**             | 5.3***            | 1.3 <sup>NS</sup> | 1.7%            |
| %Daidzein                    | 134.8*** | 4.8**             | 1.1 <sup>NS</sup>  | 1.3 <sup>NS</sup> | 1.0 <sup>NS</sup> | 0.9 <sup>NS</sup> | 5.5%            |
| %Glycitein                   | 129.8*** | 4.2*              | 2.5 <sup>NS</sup>  | 1.9 <sup>NS</sup> | 0.4 <sup>NS</sup> | 1.0 <sup>NS</sup> | 5.6%            |
| 1000 Seed Weight (g)         | 102.9*** | 24.2***           | 1.7 <sup>NS</sup>  | 4.8***            | 1.2 <sup>NS</sup> | 0.1 <sup>NS</sup> | 15.6            |
| 1000 Germ Weight (g)         | 13.8***  | 34.3***           | 10.1***            | 4.9***            | 1.0 <sup>NS</sup> | 0.6 <sup>NS</sup> | 0.34            |
| %Germ                        | 158.5*** | 1.5 <sup>NS</sup> | 1.7 <sup>NS</sup>  | 4.3***            | 0.7 <sup>NS</sup> | 1.1 <sup>NS</sup> | 0.2%            |
| %Protein                     | 14.9***  | 20.0***           | 0.3 <sup>NS</sup>  | 4.5***            | 1.1 <sup>NS</sup> | 0.4 <sup>NS</sup> | 3.0%            |
| Df <sup>b</sup>              | 4        | 2                 | 1                  | 8                 | 4                 | 2                 | 124             |

\*\*\*, \*\*, \*, <sup>NS</sup> : p<0.001 ; p<0.01 ; p<0.05 and p>0.05, respectively.

<sup>a</sup> : Standard Deviation (square root of the ANOVA residual mean square)

<sup>b</sup> : Degree of freedom

**Table 2. Effect of late irrigation on the isoflavone content and composition in cotyledons and germs: F values and Standard Deviations (SD) of the Analysis of Variance (ANOVA. The factors were cultivars (n=5), and irrigation (2 levels) with 2 plots for each combination of treatments. Isoflavone contents (total and by aglycone forms) were calculated in aglycone equivalent (g kg<sup>-1</sup>), isoflavone compositions were expressed as aglycone equivalent percentages of the total isoflavone of the seed part (% moles).**

| Variable                     | Factors              |                     | Interaction       | SD <sup>a</sup> |
|------------------------------|----------------------|---------------------|-------------------|-----------------|
|                              | Cultivar             | Irrig.              | Cv*Irrig.         |                 |
| <b>Cotyledon content</b>     |                      |                     |                   |                 |
| Total isoflavones            | 20.4 <sup>***</sup>  | 30.2 <sup>***</sup> | 0.6 <sup>NS</sup> | 0.25            |
| Genistein                    | 12.5 <sup>**</sup>   | 30.3 <sup>***</sup> | 0.5 <sup>NS</sup> | 0.15            |
| Daidzein                     | 37.4 <sup>***</sup>  | 23.8 <sup>***</sup> | 1.2 <sup>NS</sup> | 0.10            |
| Glycitein                    | 7.9 <sup>**</sup>    | 13.7 <sup>**</sup>  | 0.3 <sup>NS</sup> | 0.01            |
| <b>Cotyledon composition</b> |                      |                     |                   |                 |
| % Genistein                  | 236.4 <sup>***</sup> | 2.3 <sup>NS</sup>   | 1.6 <sup>NS</sup> | 0.8%            |
| % Daidzein                   | 172.9 <sup>***</sup> | 0.7 <sup>NS</sup>   | 1.3 <sup>NS</sup> | 1.0%            |
| % Glycitein                  | 1.0 <sup>NS</sup>    | 1.4 <sup>NS</sup>   | 0.3 <sup>NS</sup> | 0.4%            |
| <b>Germs content</b>         |                      |                     |                   |                 |
| Total isoflavones            | 8.0 <sup>**</sup>    | 17.8 <sup>**</sup>  | 0.4 <sup>NS</sup> | 1.18            |
| Genistein                    | 3.7 <sup>*</sup>     | 1.2 <sup>NS</sup>   | 0.7 <sup>NS</sup> | 0.22            |
| Daidzein                     | 27.9 <sup>***</sup>  | 16.4 <sup>**</sup>  | 0.7 <sup>NS</sup> | 0.58            |
| Glycitein                    | 54.3 <sup>***</sup>  | 22.1 <sup>**</sup>  | 0.7 <sup>NS</sup> | 0.50            |
| <b>Germ composition</b>      |                      |                     |                   |                 |
| % Genistein                  | 4.7 <sup>*</sup>     | 41.0 <sup>***</sup> | 0.6 <sup>NS</sup> | 0.7%            |
| % Daidzein                   | 467.5 <sup>***</sup> | 3.7 <sup>NS</sup>   | 0.8 <sup>NS</sup> | 1.1%            |
| % Glycitein                  | 293.3 <sup>***</sup> | 2.7 <sup>NS</sup>   | 1.1 <sup>NS</sup> | 1.5%            |
| 1000 Seeds Weight            | 15.8 <sup>***</sup>  | 9.4 <sup>***</sup>  | 0.5 <sup>NS</sup> | 8.4             |
| 1000 Germs Weight            | 19.5 <sup>***</sup>  | 0.5 <sup>NS</sup>   | 1.1 <sup>NS</sup> | 0.19            |
| %Germ                        | 84.8 <sup>***</sup>  | 19.9 <sup>***</sup> | 1.7 <sup>NS</sup> | 0.1%            |
| %Protein                     | 6.2 <sup>**</sup>    | 32.2 <sup>**</sup>  | 0.8 <sup>NS</sup> | 0.9%            |
| Df <sup>b</sup>              | 4                    | 1                   | 4                 | 10              |

\*\*\*, \*\*, \*, <sup>NS</sup> : p<0.001 ; p<0.01 ; p<0.05 and p>0.05, respectively.

<sup>a</sup> : Standard Deviation (square root of the ANOVA residual mean square)

<sup>b</sup> : Degree of freedom.

**Table 3. Cultivar means for cotyledons and germs: Comparison of isoflavone contents, composition, and seed characteristics in the greenhouse (Gr) and field (Fi) experiments. For each variable (table line), means with the same letter did not differ significantly. Least Significant Differences at  $\alpha=5\%$  were calculated with the ANOVA mean square errors, with 124 or 10 freedom degrees in Gr or Fi, respectively. For each mean,  $n = 30$  plants in Gr and  $n = 4$  plots in Fi.**

| Cultivar                                                  |    | Queen               | Imari               | Dwight               | Jack                | Loda               | LSD<br>(5%) |
|-----------------------------------------------------------|----|---------------------|---------------------|----------------------|---------------------|--------------------|-------------|
| Cotyledon contents (g kg <sup>-1</sup> )                  |    |                     |                     |                      |                     |                    |             |
| Tot. isoflavones                                          | Gr | 1.87 <sup>a</sup>   | 0.84 <sup>b</sup>   | 2.08 <sup>a</sup>    | 1.32 <sup>b</sup>   | 1.18 <sup>b</sup>  | 0.46        |
|                                                           | Fi | 2.50 <sup>a</sup>   | 1.30 <sup>b</sup>   | 2.67 <sup>a</sup>    | 1.82 <sup>b</sup>   | 1.80 <sup>b</sup>  | 0.39        |
| Genistein                                                 | Gr | 0.98 <sup>b</sup>   | 0.55 <sup>c</sup>   | 1.33 <sup>a</sup>    | 0.93 <sup>b</sup>   | 0.89 <sup>b</sup>  | 0.12        |
|                                                           | Fi | 1.38 <sup>b</sup>   | 0.90 <sup>c</sup>   | 1.65 <sup>a</sup>    | 1.25 <sup>b</sup>   | 1.26 <sup>b</sup>  | 0.24        |
| Daidzein                                                  | Gr | 0.86 <sup>a</sup>   | 0.27 <sup>c</sup>   | 0.70 <sup>b</sup>    | 0.32 <sup>c</sup>   | 0.26 <sup>c</sup>  | 0.09        |
|                                                           | Fi | 1.09 <sup>a</sup>   | 0.38 <sup>b</sup>   | 0.99 <sup>a</sup>    | 0.56 <sup>b</sup>   | 0.47 <sup>b</sup>  | 0.15        |
| Glycitein                                                 | Gr | 0.03 <sup>c</sup>   | 0.02 <sup>d</sup>   | 0.05 <sup>b</sup>    | 0.06 <sup>a</sup>   | 0.04 <sup>c</sup>  | 0.01        |
|                                                           | Fi | 0.03 <sup>a</sup>   | 0.01 <sup>b</sup>   | 0.04 <sup>a</sup>    | 0.02 <sup>b</sup>   | 0.02 <sup>b</sup>  | 0.01        |
| Cotyledon composition (% moles of total cot. isoflavones) |    |                     |                     |                      |                     |                    |             |
| Genistein                                                 | Gr | 58.9 <sup>e</sup>   | 63.2 <sup>d</sup>   | 65.6 <sup>c</sup>    | 71.1 <sup>b</sup>   | 76.8 <sup>a</sup>  | 1.9         |
|                                                           | Fi | 55.4 <sup>d</sup>   | 69.3 <sup>b</sup>   | 61.7 <sup>c</sup>    | 68.3 <sup>b</sup>   | 72.2 <sup>a</sup>  | 1.3         |
| Daidzein                                                  | Gr | 38.5 <sup>a</sup>   | 32.2 <sup>b</sup>   | 31.3 <sup>c</sup>    | 21.8 <sup>d</sup>   | 19.0 <sup>e</sup>  | 1.7         |
|                                                           | Fi | 43.4 <sup>a</sup>   | 29.6 <sup>c</sup>   | 37.0 <sup>b</sup>    | 30.8 <sup>c</sup>   | 26.9 <sup>d</sup>  | 1.4         |
| Glycitein                                                 | Gr | 2.6 <sup>c</sup>    | 4.6 <sup>b</sup>    | 3.1 <sup>c</sup>     | 7.0 <sup>a</sup>    | 4.2 <sup>b</sup>   | 0.9         |
|                                                           | Fi | 1.2                 | 1.2                 | 1.4                  | 0.9                 | 0.9                | 0.6         |
| Germ contents (g kg <sup>-1</sup> )                       |    |                     |                     |                      |                     |                    |             |
| Tot. isoflavones                                          | Gr | 12.89 <sup>ab</sup> | 9.56 <sup>c</sup>   | 11.59 <sup>abc</sup> | 10.62 <sup>bc</sup> | 13.42 <sup>a</sup> | 0.96        |
|                                                           | Fi | 14.14 <sup>a</sup>  | 10.14 <sup>b</sup>  | 13.59 <sup>a</sup>   | 11.87 <sup>ab</sup> | 13.98 <sup>a</sup> | 1.86        |
| Genistein                                                 | Gr | 2.19 <sup>ab</sup>  | 1.73 <sup>c</sup>   | 2.35 <sup>a</sup>    | 2.04 <sup>b</sup>   | 2.17 <sup>ab</sup> | 0.16        |
|                                                           | Fi | 2.26 <sup>a</sup>   | 1.77 <sup>b</sup>   | 2.29 <sup>a</sup>    | 1.95 <sup>ab</sup>  | 2.13 <sup>ab</sup> | 0.35        |
| Daidzein                                                  | Gr | 3.68 <sup>c</sup>   | 4.88 <sup>b</sup>   | 5.01 <sup>b</sup>    | 2.45 <sup>d</sup>   | 6.18 <sup>a</sup>  | 0.52        |
|                                                           | Fi | 3.96 <sup>c</sup>   | 5.20 <sup>b</sup>   | 6.56 <sup>a</sup>    | 3.05 <sup>c</sup>   | 6.78 <sup>a</sup>  | 0.92        |
| Glycitein                                                 | Gr | 7.02 <sup>a</sup>   | 2.94 <sup>e</sup>   | 4.24 <sup>d</sup>    | 6.06 <sup>b</sup>   | 5.09 <sup>c</sup>  | 0.55        |
|                                                           | Fi | 7.92 <sup>a</sup>   | 3.18 <sup>d</sup>   | 4.74 <sup>c</sup>    | 6.87 <sup>b</sup>   | 5.07 <sup>c</sup>  | 0.79        |
| Germ composition (% moles of total germ isoflavones)      |    |                     |                     |                      |                     |                    |             |
| Genistein                                                 | Gr | 17.1 <sup>c</sup>   | 18.3 <sup>b</sup>   | 20.5 <sup>a</sup>    | 19.7 <sup>a</sup>   | 16.3 <sup>d</sup>  | 0.9         |
|                                                           | Fi | 16.1 <sup>a</sup>   | 17.6 <sup>a</sup>   | 16.9 <sup>a</sup>    | 16.5 <sup>a</sup>   | 14.8 <sup>b</sup>  | 1.1         |
| Daidzein                                                  | Gr | 28.3 <sup>c</sup>   | 50.8 <sup>a</sup>   | 43.5 <sup>b</sup>    | 23.0 <sup>d</sup>   | 45.5 <sup>b</sup>  | 2.8         |
|                                                           | Fi | 27.9 <sup>c</sup>   | 51.2 <sup>a</sup>   | 48.1 <sup>b</sup>    | 25.7 <sup>d</sup>   | 48.5 <sup>b</sup>  | 1.8         |
| Glycitein                                                 | Gr | 54.6 <sup>b</sup>   | 30.9 <sup>d</sup>   | 36.1 <sup>c</sup>    | 57.3 <sup>a</sup>   | 38.2 <sup>c</sup>  | 2.8         |
|                                                           | Fi | 56.0 <sup>a</sup>   | 31.3 <sup>c</sup>   | 35.0 <sup>b</sup>    | 57.8 <sup>a</sup>   | 36.2 <sup>b</sup>  | 2.3         |
| 1000 Seeds weight (g)                                     | Gr | 147.8 <sup>bc</sup> | 169.9 <sup>ab</sup> | 125.9 <sup>cd</sup>  | 115.6 <sup>d</sup>  | 185.9 <sup>a</sup> | 7.9         |
|                                                           | Fi | 150.8 <sup>b</sup>  | 172.9 <sup>a</sup>  | 149.9 <sup>b</sup>   | 146.5 <sup>b</sup>  | 182.0 <sup>a</sup> | 13.2        |
| 1000 Germs weight (g)                                     | Gr | 3.87 <sup>ab</sup>  | 3.96 <sup>a</sup>   | 4.05 <sup>a</sup>    | 3.45 <sup>b</sup>   | 3.73 <sup>ab</sup> | 0.17        |
|                                                           | Fi | 3.75 <sup>b</sup>   | 3.64 <sup>b</sup>   | 4.57 <sup>a</sup>    | 4.41 <sup>a</sup>   | 4.24 <sup>a</sup>  | 0.29        |
| %Germ                                                     | Gr | 2.6 <sup>c</sup>    | 2.3 <sup>d</sup>    | 3.2 <sup>a</sup>     | 3.0 <sup>b</sup>    | 2.0 <sup>e</sup>   | 0.1         |
|                                                           | Fi | 2.5 <sup>b</sup>    | 2.1 <sup>d</sup>    | 3.1 <sup>a</sup>     | 3.0 <sup>a</sup>    | 2.3 <sup>c</sup>   | 0.1         |
| %Protein                                                  | Gr | 36.1 <sup>b</sup>   | 40.2 <sup>a</sup>   | 36.4 <sup>b</sup>    | 34.5 <sup>b</sup>   | 36.5 <sup>b</sup>  | 1.5         |
|                                                           | Fi | 39.0 <sup>b</sup>   | 41.6 <sup>a</sup>   | 39.1 <sup>b</sup>    | 39.8 <sup>b</sup>   | 39.2 <sup>b</sup>  | 1.0         |



**Table 4. Effect of cultivar, temperature and irrigation on cotyledon isoflavones, protein, and seed fraction weights: Isoflavone contents were in aglycone equivalents (g.kg<sup>-1</sup>), isoflavone composition in % moles (in italic), and 1000 seeds and germs weights in g. For the temperature treatments, each cultivar mean was calculated with n = 10 measurements and Least Significant Differences (LSD) were 0.35, 0.15, 0.22 and 0.01 for total isoflavone, genistein, daidzein and glycitein respectively. For the irrigation treatments, n = 15 and LSD were 0.29, 0.13, 0.18 and 0.01 for total isoflavone, genistein, daidzein and glycitein, respectively. General means were calculated with n=50 (temperature effect) or n=75 (irrigation effect).**

| Cultivar          | Component         | Temperature       |                     |                   | Irrigation  |             |
|-------------------|-------------------|-------------------|---------------------|-------------------|-------------|-------------|
|                   |                   | Low<br>(13/23°C)  | Normal<br>(18/28°C) | High<br>(23/33°C) | Normal      | Dry         |
| Queen             | Total isoflavones | 3.56*             | 1.29                | 0.76*             | 2.14        | 1.60*       |
|                   | Genistein         | 1.66*(46%*)       | 0.76(59%)           | 0.53*(69%*)       | 1.10(51%)   | 0.86*(54%)  |
|                   | Daidzein          | 1.87*(52%*)       | 0.50(39%)           | 0.21*(27%*)       | 1.01(47%)   | 0.71*(44%*) |
|                   | Glycitein         | 0.04 (1%)         | 0.03 (2%)           | 0.03 (4%)         | 0.03 (2%)   | 0.03 (2%)   |
|                   | 1000 seeds weight | 147.3             | 155.5               | 139.7             | 150.1       | 143.8       |
|                   | 1000 germs weight | 4.03              | 4.20                | 3.32*             | 3.98        | 3.67        |
|                   | % Protein         | 33.4*             | 36.6                | 38.2              | 35.9        | 36.2        |
|                   | Imari             | Total isoflavones | 1.63*               | 0.61              | 0.29        | 0.97        |
| Genistein         |                   | 1.10*(67%*)       | 0.38(63%)           | 0.18(62%)         | 0.64(66%)   | 0.47(65%)   |
| Daidzein          |                   | 0.51*(32%)        | 0.20(33%)           | 0.09(31%)         | 0.31(32%)   | 0.23(32%)   |
| Glycitein         |                   | 0.02 (1%*)        | 0.02 (4%)           | 0.02 (7%*)        | 0.02 (2%)   | 0.02 (3%)   |
| 1000 seeds weight |                   | 165.5*            | 182.8               | 161.4*            | 171.0       | 168.7       |
| 1000 germs weight |                   | 3.97              | 4.30                | 3.60*             | 4.04        | 3.87        |
| % Protein         |                   | 35.1*             | 41.7                | 44.0              | 39.1        | 41.2        |
| Dwight            |                   | Total isoflavones | 3.43*               | 1.73              | 1.08*       | 2.12        |
|                   | Genistein         | 2.12*(62%)        | 1.11(65%)           | 0.75*(69%*)       | 1.35(64%)   | 1.30(64%)   |
|                   | Daidzein          | 1.25*(37%*)       | 0.55(32%)           | 0.29*(27%*)       | 0.71(33%)   | 0.69(34%)   |
|                   | Glycitein         | 0.06 (2%)         | 0.06 (3%)           | 0.04*(4%)         | 0.05 (3%)   | 0.05 (2%)   |
|                   | 1000 seeds weight | 129.4             | 133.4               | 115.0*            | 130.4       | 121.4       |
|                   | 1000 germs weight | 4.26              | 4.23                | 3.64*             | 4.16        | 3.93        |
|                   | % Protein         | 34.0*             | 37.4                | 37.6              | 36.6        | 36.1        |
|                   | Jack              | Total isoflavones | 2.50*               | 0.90              | 0.56        | 1.32        |
| Genistein         |                   | 1.75*(70%)        | 0.65(72%)           | 0.40*(72%)        | 0.94(72%)   | 0.92(70%)   |
| Daidzein          |                   | 0.69*(27%*)       | 0.19(21%)           | 0.10(18%*)        | 0.31(24%)   | 0.34(26%)   |
| Glycitein         |                   | 0.06 (2%*)        | 0.06 (7%)           | 0.06(11%*)        | 0.06 (5%)   | 0.06 (4%)   |
| 1000 seeds weight |                   | 122.1             | 110.6               | 114.0             | 119.0       | 112.0       |
| 1000 germs weight |                   | 3.96*             | 3.27                | 3.56*             | 3.61        | 3.32*       |
| % Protein         |                   | 33.3              | 34.0                | 36.3              | 35.2        | 35.1        |
| Loda              |                   | Total isoflavones | 2.15*               | 0.86              | 0.53        | 1.30        |
|                   | Genistein         | 1.57*(73%*)       | 0.67(78%)           | 0.42*(78%)        | 0.95(73%)   | 0.82(77%*)  |
|                   | Daidzein          | 0.54*(25%*)       | 0.15(17%)           | 0.08(16%)         | 0.30(23%)   | 0.21(20%)   |
|                   | Glycitein         | 0.04 (2%*)        | 0.04 (5%)           | 0.03 (6%)         | 0.04 (3%)   | 0.03 (3%)   |
|                   | 1000 seeds weight | 195.3             | 208.4               | 153.7*            | 180.8       | 190.1       |
|                   | 1000 germs weight | 3.96              | 3.94                | 3.29*             | 3.70        | 3.77        |
|                   | % Protein         | 37.4              | 36.6                | 35.6              | 36.5        | 36.7        |
|                   | Mean              | Total isoflavones | 2.65*               | 1.08              | 0.64*       | 1.57        |
| Genistein         |                   | 1.64*(64%*)       | 0.71 (67%)          | 0.46* (70%*)      | 1.00* (65%) | 0.87* (66%) |
| Daidzein          |                   | 0.97*(35%*)       | 0.32 (28%)          | 0.15* (24%*)      | 0.53* (32%) | 0.44* (31%) |
| Glycitein         |                   | 0.04 (2%*)        | 0.04 (4%)           | 0.04 (6%*)        | 0.04 (3%)   | 0.04 (3%)   |
| 1000 seeds weight |                   | 151.9*            | 158.1               | 136.8*            | 150.3       | 147.2       |
| 1000 germs weight |                   | 4.04              | 3.99                | 3.48*             | 3.98        | 3.71*       |
| % Protein         |                   | 34.6*             | 37.3                | 38.3*             | 36.7        | 37.1*       |

\*: significantly different (p<0.05) from the "normal" treatment (Student's test with Standard deviation (SD) and 124 degrees of freedom from table 1)

**Table 5. Field experiment: Effect of cultivar and late irrigation on isoflavone content and composition in the seed fractions. Isoflavone contents were expressed in aglycone equivalents (g kg<sup>-1</sup>). In each seed fraction, the isoflavone composition (in italic) was calculated in percentage of the total isoflavones (moles). Mean were on n = 2 plots. In cotyledon, Least Significant Differences (LSD) were 0.56, 0.35, 0.23 and 0.02 for total isoflavone, genistein, daidzein and glycitein, respectively. In germ, LSD were 2.67, 0.50, 1.32 and 1.14 for total isoflavone, genistein, daidzein and glycitein, respectively. General means were on n=10 plots**

| Cultivar | Component                    | Cotyledons   |            | Germ        |            |
|----------|------------------------------|--------------|------------|-------------|------------|
|          |                              | Irrigated    | Normal     | Irrigated   | Normal     |
| Queen    | Total isoflavones            | 2.87*        | 2.13       | 15.62*      | 12.65      |
|          | Genistein                    | 1.56* (54%*) | 1.21 (57%) | 2.37 (15%*) | 2.15 (17%) |
|          | Daidzein                     | 1.28* (45%*) | 0.90 (42%) | 4.46 (29%)  | 3.45 (27%) |
|          | Glycitein                    | 0.04 (1%)    | 0.02 (1%)  | 8.79* (56%) | 7.05 (56%) |
|          | Seed or Germ weight (g.1000) | 160.3*       | 141.3      | 3.70        | 3.81       |
|          | % of the seed (g/g)          | -            | -          | 2.3%*       | 2.7%       |
|          | % Protein                    | 40.2*        | 42.9       | -           | -          |
| Imari    | Total isoflavones            | 1.70*        | 0.89       | 11.65*      | 8.64       |
|          | Genistein                    | 1.18* (69%)  | 0.62 (69%) | 1.94 (17%*) | 1.60 (19%) |
|          | Daidzein                     | 0.50* (30%)  | 0.26 (30%) | 6.03* (52%) | 4.36 (51%) |
|          | Glycitein                    | 0.02 (1%)    | 0.01 (1%)  | 3.68 (32%)  | 2.67 (31%) |
|          | Seed or Germ weight (g.1000) | 174.7        | 171.1      | 3.53        | 3.76       |
|          | % of the seed (g/g)          | -            | -          | 2.3%        | 2.4%       |
|          | % Protein                    | 37.5*        | 40.5       | -           | -          |
| Dwight   | Total isoflavones            | 3.07*        | 2.28       | 14.67       | 12.50      |
|          | Genistein                    | 1.88* (61%)  | 1.41 (62%) | 2.38 (16%*) | 2.20 (18%) |
|          | Daidzein                     | 1.15* (37%)  | 0.83 (37%) | 7.26* (49%) | 5.87 (47%) |
|          | Glycitein                    | 0.04* (1%)   | 0.03 (1%)  | 5.03 (34%)  | 4.44 (35%) |
|          | Seed or Germ weight (g.1000) | 157.5        | 142.3      | 4.70        | 4.44       |
|          | % of the seed (g/g)          | -            | -          | 3.0%        | 3.1%       |
|          | % Protein                    | 38.1*        | 40.1       | -           | -          |
| Jack     | Total isoflavones            | 2.04         | 1.61       | 12.42       | 11.31      |
|          | Genistein                    | 1.39 (68%)   | 1.10 (68%) | 1.88 (15%*) | 2.02 (18%) |
|          | Daidzein                     | 0.62 (31%)   | 0.50 (31%) | 3.24 (26%)  | 2.86 (25%) |
|          | Glycitein                    | 0.02 (1%)    | 0.01 (1%)  | 7.30 (59%)  | 6.43 (57%) |
|          | Seed or Germ weight (g.1000) | 151.3        | 141.4      | 4.49        | 4.34       |
|          | % of the seed (g/g)          | -            | -          | 3.0%        | 3.1%       |
|          | % Protein                    | 39.3*        | 40.3       | -           | -          |
| Loda     | Total isoflavones            | 2.02         | 1.59       | 15.17       | 12.78      |
|          | Genistein                    | 1.45 (72%)   | 1.15 (72%) | 2.12 (14%*) | 2.14 (17%) |
|          | Daidzein                     | 0.54 (27%)   | 0.43 (27%) | 7.31 (48%)  | 6.24 (49%) |
|          | Glycitein                    | 0.02 (1%)    | 0.01 (1%)  | 5.74* (38%) | 4.40 (34%) |
|          | Seed or Germ weight (g.1000) | 188.7        | 179.3      | 4.25        | 4.23       |
|          | % of the seed (g/g)          | -            | -          | 2.3%        | 2.4%       |
|          | % Protein                    | 38.1*        | 40.4       | -           | -          |
| Mean     | Total isoflavones            | 2.34*        | 1.70       | 13.91*      | 11.58*     |
|          | Genistein                    | 1.40* (65%)  | 1.07 (66%) | 2.11 (15%*) | 2.00 (18%) |
|          | Daidzein                     | 0.71* (34%)  | 0.50 (33%) | 5.60* (41%) | 4.51 (40%) |
|          | Glycitein                    | 0.02 (1%)    | 0.01 (1%)  | 4.13 (44%)  | 4.92 (43%) |
|          | Seed or Germ weight (g.1000) | 166.5*       | 155.1      | 4.13        | 4.12       |
|          | % of the seed (g/g)          | -            | -          | 2.3%        | 2.4%       |
|          | % Protein                    | 38.6*        | 40.8       | -           | -          |

\*: significantly different (p<0.05) from the "normal" treatment (Student's test using SD with 10 degrees of freedom from Table 2)

**Table 6. Effect of cultivar, temperature and irrigation soygerm isoflavones: Isoflavone contents were in aglycone equivalents (g kg<sup>-1</sup>) and isoflavone composition were in % moles (in italic). For the temperature treatments, each mean was calculated on n = 10 measurements and Least Significant Differences (LSD) were 1.66, 0.29, 0.91 and 0.95 for total isoflavone, genistein, daidzein and glycitein respectively. For irrigation treatments, n = 15 and LSD were 1.36, 0.23, 0.74 and 0.77 for total isoflavone, genistein, daidzein and glycitein, respectively. General means were calculated with n=50 (temperature effect) or n=75 (irrigation effect).**

| Cultivar | Component         | Temperature       |                     |                  | Irrigation |             |
|----------|-------------------|-------------------|---------------------|------------------|------------|-------------|
|          |                   | Cold<br>(13/23°C) | Normal<br>(18/28°C) | Hot<br>(23/33°C) | Normal     | Dry         |
| Queen    | Total isoflavones | 13.56             | 13.50               | 11.61*           | 13.31      | 12.47       |
|          | Genistein         | 2.31 (17%)        | 2.15 (16%)          | 2.10 (18%*)      | 2.26 (17%) | 2.11 (17%)  |
|          | Daidzein          | 4.32 (32%*)       | 3.67 (27%)          | 3.05 (26%)       | 3.77 (28%) | 3.59 (29%)  |
|          | Glycitein         | 6.93 (51%*)       | 7.68 (57%)          | 6.46*(56%)       | 7.27 (55%) | 6.77 (54%)  |
| Imari    | Total isoflavones | 12.38*            | 9.71                | 6.58*            | 10.13      | 8.98        |
|          | Genistein         | 2.19*(18%)        | 1.80 (19%)          | 1.20*(18%)       | 1.73 (17%) | 1.74 (19%*) |
|          | Daidzein          | 6.54*(53%)        | 4.78 (49%)          | 3.33*(51%)       | 5.27*(52%) | 4.50 (50%)  |
|          | Glycitein         | 3.65 (29%)        | 3.13 (32%)          | 2.04*(31%)       | 3.13 (31%) | 2.75 (31%)  |
| Dwight   | Total isoflavones | 11.65             | 12.59               | 10.53*           | 11.89      | 11.30       |
|          | Genistein         | 2.24 (19%)        | 2.38 (19%)          | 2.42 (23%*)      | 2.38 (20%) | 2.32 (21%)  |
|          | Daidzein          | 5.23 (45%*)       | 5.08 (40%)          | 4.71 (45%*)      | 4.92 (41%) | 5.09 (45%*) |
|          | Glycitein         | 4.18 (36%*)       | 5.13 (41%)          | 3.40*(32%*)      | 4.59 (39%) | 3.89 (34%*) |
| Jack     | Total isoflavones | 12.31             | 10.77               | 8.78*            | 10.40      | 10.83       |
|          | Genistein         | 2.25 (18%)        | 2.03 (19%)          | 1.86 (21%*)      | 2.02 (19%) | 2.08 (19%)  |
|          | Daidzein          | 2.81 (23%)        | 2.46 (23%)          | 2.14 (24%)       | 2.36 (23%) | 2.59 (24%)  |
|          | Glycitein         | 7.25*(59%)        | 6.27 (58%)          | 4.77*(54%)       | 6.03 (58%) | 6.17 (57%)  |
| Loda     | Total isoflavones | 14.01             | 14.13               | 12.12*           | 13.16      | 13.68       |
|          | Genistein         | 2.07 (15%)        | 2.20 (16%)          | 2.20 (18%*)      | 2.12 (16%) | 2.19 (16%)  |
|          | Daidzein          | 6.82 (49%)        | 6.48 (46%)          | 5.20*(43%)       | 5.94 (45%) | 6.39 (47%)  |
|          | Glycitein         | 5.12 (37%)        | 5.45 (39%)          | 4.72 (39%)       | 5.10 (39%) | 5.09 (37%)  |
| Mean     | Total isoflavones | 12.78             | 12.14               | 9.92*            | 11.78      | 11.45       |
|          | Genistein         | 2.21 (17%*)       | 2.20 (16%)          | 1.96*(20%*)      | 2.10 (18%) | 2.09 (18%)  |
|          | Daidzein          | 5.14*(40%*)       | 4.49 (46%)          | 3.69*(38%)       | 4.45 (38%) | 4.43 (39%)  |
|          | Glycitein         | 5.43 (42%*)       | 5.53 (39%)          | 4.28*(42%*)      | 5.22 (44%) | 4.93 (43%)  |

\*: significantly different (p<0.05) from the "normal" treatment (Student's test with SD and 124 degrees of freedom from table)



### 3. SYNTHÈSE ET CONCLUSION

Les résultats de cette étude ont montré que les cotylédons et les germes de la graine de soja présentent des concentrations en isoflavones très significativement différentes. En termes de composition les écarts entre les deux compartiments de la graine sont aussi très importants. La génistéine qui est l'isoflavone la plus étudiée et la plus mise en avant pour ses effets santé (Dixon et Ferreira, 2002), est très minoritaire dans le germe, alors que ce dernier est très souvent la base des compléments alimentaires qui sont préconisés pour des effets attribués aux isoflavones sans distinction dans la famille de ces molécules (Hubert *et al.*, 2006). Par contre, la glycitéine peut atteindre ou dépasser 50% des isoflavones dans le germe alors que si l'on considère la graine entière les contenus en cette forme particulière sont extrêmement faibles. De plus, il n'y a que peu ou pas de données fiables concernant les effets santé de la glycitéine. Enfin, même si les effets du facteur génotypique sont très hautement significatifs dans toutes les situations, tant pour les cotylédons que pour les germes, les concentrations en isoflavones dans ces derniers ne descendent pas au dessous de ce qui apparaît comme un plancher (autour de 1% de la matière sèche). Cette donnée, très intéressante pour les utilisateurs de germes comme sources d'isoflavones, est certainement à relier au rôle que jouent ces molécules lors de la germination, notamment dans l'établissement des interactions plante – bactérie, lors de la mise en place de la symbiose du soja avec *Bradyrhizobium Japonicum* (Broughton *et al.*, 2003).

La température pendant la phase de remplissage de la graine est apparue comme le facteur environnemental majeur de variation de la teneur en isoflavones. Cependant, ses effets se sont révélés différents dans les cotylédons (une multiplication de 3 à 6 des concentrations en isoflavones, en fonction des traitements) et les germes (facteur multiplicatif inférieur à 2, dans les mêmes situations). Les effets de la disponibilité en eau du sol, quoique non négligeables, ont été moins notables.

Les pourcentages des différentes isoflavones dans les deux compartiments de la graine, sont principalement sous contrôle génétique. Pour les cotylédons, les variations portent sur l'équilibre entre génistéine et daidzéine, ces deux types de molécules ne jouant pas les mêmes rôles dans la graine mais étant chacune issues de la même voie métabolique, avec probablement une compétition sous contrôle génétique pour le même précurseur, la

naringénine (Yu *et al.*, 2003 ; Kim *et al.*, 2005). Pour les germes, la balance se situe entre la daidzéine et la glycitéine mais l'embranchement de la voie métabolique reste à préciser. Bien que l'effet variétal soit prépondérant, les températures ont souvent modifié les équilibres entre les différentes formes d'isoflavones des cotylédons comme des germes, avec quelques interactions génotype – environnement qui mériteront d'être approfondies. Enfin, les formes mineures dans chaque compartiment, glycitéine pour les cotylédons et génistéine pour les germes, ont révélé des variations inattendues dans les différentes conditions étudiées (effets environnementaux et interactions génotype – environnement). Ces observations pourraient corroborer une hypothèse d'échanges d'isoflavones entre les deux compartiments puisque les isoflavones peuvent être transportées de tissus maternels vers la graine comme cela a été montré récemment (Dhaubhadel *et al.*, 2003).

L'ensemble de ces résultats suggère qu'il doit être possible de maîtriser la teneur et la composition en isoflavones, à la fois dans le germe et dans les cotylédons, en vue de répondre aux attentes diverses des transformateurs et, indirectement, à l'indispensable information objective du consommateur. Cela devrait être possible, compte tenu du déterminisme apparent de ces caractères en jouant sur les facteurs génotypique (choix variétal ou sélection créatrice) et environnemental (itinéraire cultural : date de semis, pilotage de l'irrigation, zone de culture en relation à la précocité de la variété, etc.). Cependant, pour parvenir à ce type de gestion, il demeure des zones d'ombre sur certains éléments fondamentaux de la physiologie de la plante, en particulier sur les voies de synthèse et d'accumulation des isoflavones dans les cotylédons et les germes tout au long du cycle reproducteur. Une approche de la cinétique d'accumulation de ces molécules dans les deux compartiments de la graine, devrait donner des éléments de réponse essentiels à ce type de question. Ce travail de recherche constituera le deuxième volet de notre étude qui sera développé dans le chapitre qui suit.

**CHAPITRE IV**  
**CINETIQUES D'ACCUMULATION**





## 1. INTRODUCTION

Comme nous l'avons démontré dans la première partie de nos travaux de recherche, la teneur en isoflavones et leur composition dans les graines de soja, présentent une variabilité marquée si l'on considère séparément les deux compartiments majeurs de la graine : les cotylédons et le germe. Une meilleure compréhension des fondements physiologiques des différences de comportement génotypique et de réactions aux facteurs environnementaux, doit être permise par l'étude des cinétiques d'accumulation des isoflavones dans les germes et les cotylédons. Ainsi la problématique consistera-t-elle notamment à évaluer si les phases d'accumulation dans les deux compartiments sont décalées ou synchrones et/ou si les cinétiques, à proprement parler, diffèrent significativement.

Afin de prendre en compte la diversité génétique déjà évaluée (Rasolohery *et al.*, 2007), les travaux ont porté sur quatre variétés aux comportements contrastés dont deux ayant déjà été étudiées dans le premier volet de notre recherche (*cv.* Imari et Queen). Les expérimentations ont été conduites dans trois conditions différentes – deux en serre et une au champ – et les prélèvements se sont étalés du stade R5 (début du grossissement de la graine), soit 20 JAF (jours après floraison) environ, à la maturité (stade R8).

Les résultats obtenus ont fait l'objet de la deuxième publication scientifique insérée dans ce document de thèse :

BERGER M., RASOLOHERY C. A., CAZALIS R., DAYDÉ J., 2007.

**Isoflavone accumulation kinetics in soybean seed cotyledons vs. hypocotyls: distinct pathways and genetic controls.**

*Crop Science* (soumis pour publication).

## **2. PUBLICATION SCIENTIFIQUE**

**ISOFLAVONES ACCUMULATION KINETICS IN SOYBEAN SEED COTYLEDONS  
AND HYOPCOTYLS: DISTINCT PATHWAYS AND GENETIC CONTROLS**

**Monique Berger\*, Claudine Aimée Rasolohery, Roland Cazalis and Jean Daydé**

Laboratoire d'Agrophysiologie, Ecole d'Ingénieurs Purpan, 75, voie du TOEC - BP 57611 –  
31076 Toulouse cedex 3 – France

Received \_\_\_\_\_; Corresponding author (m.berger@purpan.fr)

## ***ABSTRACT***

There is a growing interest in the management of the soybean seed isoflavone content. Seed isoflavone content is influenced by environment and genotype, but seeds fractions, such as hypocotyls and cotyledons display highly contrasted isoflavone contents and compositions. Hypocotyls also appeared less influenced by environment than cotyledons. The purpose of this study was a better understanding of isoflavone repartition between the two parts of the embryo during the maturation of the seed. The accumulation kinetics of individual and total isoflavones in hypocotyls and cotyledons were recorded in four contrasted cultivars in three growing conditions, from 20 DAF (R5 stage) to the maturity of the seed (R8 stage). Very early isoflavone accumulation, till 20 DAF, was observed in the hypocotyls, whereas isoflavone accumulation began the cotyledons after the hypocotyls had reached a plateau (at the R6 stage). Depending on the growth conditions, a longer accumulation was observed in cotyledons, resulting to a 4-fold increase of the total isoflavone content. Whatever the growth conditions the isoflavone accumulation in the hypocotyls was unchanged, suggesting mainly genotypic control. This study clearly shows that isoflavone synthesis and accumulation results from highly differentiated regulations in hypocotyls and cotyledons.

## ***INTRODUCTION***

Soybean (*Glycine max* L. Merrill) seed is one of the best protein sources, with high content of essential amino acids. Soy based food is also known as functional food, owing to their content in potentially active molecules, such as isoflavones and saponins (Tsukamoto et al., 1995). The biological activity of isoflavones has been extensively studied (Barnes, 2004; Manach et al., 2005; Messina, 1999; Setchell, 1998; Shimoyamada, 2003; Williamson and Manach, 2005). It has been suggested that, due to their weak estrogen-like or antiestrogenic activities (Molteni et al., 1995), they may have protective effects against breast, prostate and colon cancers (Barnes, 2001; Messina, 2003; Sarkar and Li, 2004), cardiovascular diseases (Clarkson, 2002; de Kleijn et al., 2002), or post menopausal symptoms (Penotti et al., 2003; Setchell, 1998). However, recent studies have also raised some concern about undesirable effects in childhood (Chen and Rogan, 2004; Mendez et al., 2002). As a result many national health authorities have recommended safe upper limits in daily isoflavone intake (Morandi et al., 2005). That's why the soyfood industry exerts a growing demand for soybeans with low isoflavone content. In contrast, more and more new soy dietary supplements based on high isoflavone content concentrates are designed, essentially for the menopausal and post menopausal health supplement food market. One seed part, the hypocotyl which industrial name is soygerm, is often discarded during food processing, owing to its astringent taste due to its high content of secondary metabolites. Isoflavones are 4 to 10 times more concentrated in soygerm than in cotyledons, hence becoming a valuable by-product (Schryver, 2002).

Soybean seed is constituted by a developed embryo which contains two primary organ systems, the axis or hypocotyl radicle region and the cotyledons, surrounded by a seed coat of maternal origin. The embryogenesis is divided into five stages: globular, heart, cotyledon, maturation and dormancy (Glodberg et al., 1997). During maturation, the embryonic cells synthesize proteins and secondary metabolites, among which isoflavones. Isoflavonoids

constitute a distinct group of plant natural product derived from the phenylpropanoid pathway. Isoflavones are involved in nodulation of leguminous plant, inducing expression of nodulation genes in rhizobial bacteria during symbiosis (Pueppke et al., 1998). Isoflavone also belongs to a group of active plant defense compounds known as phytoalexins, acting as a repellent against insect feeding and pathogenic fungi (Dixon et al., 2002; Graham and Graham, 1991; Graham and Graham, 1994).

In soybean, the isoflavones daidzein, genistein, and glycitein are synthesized via the phenylpropanoid pathway and stored in the vacuole as glucosyl- and malonyl-glucose conjugates (Graham, 1991; Kudou et al., 1991). The pathway to daidzein branches from the phenylpropanoid pathway, following the chalcone synthase (CHS) catalyzed reaction through a legume-specific enzyme, chalcone reductase (CHR). Glycitein synthesis is not yet clearly defined, but is likely to be derived from isoliquiritigenin (Latunde-Dada et al., 2001). Genistein synthesis shares the naringenin intermediate with the flavonoid/anthocyanin branch of the phenylpropanoid pathway. In all cases the unique aryl migration reaction to create the isoflavones is mediated by isoflavone synthase (IFS). In the mature seed, these aglycone forms are found essentially as conjugated forms: glycosides (daidzin, glycitin and genistin), and malonylglucosides (Kudou et al., 1991; Yu et al., 2003). Time course of soybean isoflavone isoform accumulation in seed indicates that glucosides, malonylglucosides, total genistein (aglycone + conjugates) and total daidzein represent the main part of the total isoflavones in seeds at R5 to R7 stages and generally, there is a positive correlation between total isoflavone concentration and growth stages (Kim and Chung, 2007). Soybean seed express key genes involved in isoflavonoid synthesis. However, these genes are also expressed in maternal tissues, such as seed coat or pod. Developing embryos may import isoflavonoids from a synthetic medium, and hence, the seed isoflavones can have maternal or local origin. (Dhaubhadel et al., 2003)

Effects of environment on isoflavone content have been reported (Aussenac et al., 1998; Caldwell et al., 2005; Carrao-Panizzi et al., 1999; Eldridge and Kwolek, 1983; Hoeck et al., 2000; Lee et al., 2003; Lozovaya et al., 2005). High temperature drastically decreased the total isoflavone content of the seed (Lozovaya et al., 2005; Tsukamoto et al., 1995), but this effect was less pronounced in the hypocotyl and the content and composition of these two fractions of the seed have displayed a relative independence between cultivars (Rasolohery et al., 2007).

As industrial uses of the seed parts can imply divergent objectives in terms of isoflavone contents, the purpose of this work was a better understanding of isoflavone repartition between the two parts of the embryo during its maturation. The kinetics of isoflavones accumulation in the seed fractions were recorded under varying environmental conditions in three experiments. Moreover, because environmental conditions affect in a higher degree cotyledon isoflavone content than hypocotyl content, the purpose was also to know if this difference between the two seed compartments were due to an isoflavone accumulation periods dephasing, or if it were due to differences in kinetics of accumulation of the respective isoflavones.

## **MATERIALS AND METHODS**

### Plant material

Four cultivars were used: Imari and Queen, two French modern semi-determinate to indeterminate cultivars, widely used in the South Ouest of France. They belong to the maturity group I-II. They have highly contrasted isoflavones content and compositions (Lozovaya et al., 2005; Rasolohery et al., 2007). The other cultivars belong to the maturity group I. NSK is a determinate cultivar with a very short maturation cycle and NT is a semi-determinate cultivar, with very high isoflavone content in hypocotyls.

### Growth conditions

*Greenhouse experiments:* Two greenhouse experiments were conducted in 2003 and 2004. The first with Imari, Queen and NSK and the second with Imari, Queen and NT. Inoculated seeds were planted in 30 cm diameter (5L) pots in a 1:1:1 soil : sand : peat mixture (March, 12<sup>th</sup> 2003 and April 14<sup>th</sup> 2004). After germination, one plant per pot was maintained. Temperatures were not controlled (under high temperatures, the door and roof were opened). The natural light was supplemented with 1000W-high pressure sodium lamps (600W m<sup>2</sup>) the evening and cloudy days to maintain a 14 hours photoperiod, and 400 $\mu$ mol.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup> PPAR (photosynthetically active radiation). Irrigation was well controlled, and twice a week, the plant were fertilized with 200mL of a solution of N:P:K and micro elements (modified Hoagland solution with half strength N).

*Field experiments:* The field experiment was grown in 2005 at the Euralis experimental station (Mondonville, France). The four cultivars were sown on May, 23 in one-row plots 4m long and 0.45m apart. Inoculated seeds were sown on May 25, 2005 at a rate of 30 seeds m<sup>-1</sup> row<sup>-1</sup>. Conventional tillage practices were followed maintaining a weed-free environment and recommended fertilization levels were applied. The experimental design was a randomized complete block with two replicates. Each cultivar replicate included 2 rows.



From the beginning of flowering (mid-July) until August 15, an irrigation of 30 mm per week was applied. In September the rainfall is sufficient to irrigate the plant.

#### Pod sampling

Pods were regularly sampled during the maturation of the seed: from the beginning of their the growth (R5 stage) to the complete maturity (R8). For each sample, 7 to 10 pods were collected the same day. Pods were tagged with the flowering date and periodically collected. Each sample was made of the seeds of 5 to 7 pods collected the same day, on different plants of the same cultivar. The seeds were rapidly fractionated by hand, hypocotyls and cotyledons were separately frozen during 24h and freeze-dried. Then they were weighted for the dry weight determination, and maintained at -20°C until the analysis.

#### Chemicals

Acetonitrile and methanol with HPLC purity were purchased from SDS (Peypin, France). Deionized water was generated from a Milli-Q analytical deionization system (Millipore, Saint Quentin Yvelines, France). Purified standards of genistein, daidzein, glycitein, and of their 7-O-glycoconjugates, genistin, daidzin and glycitin were purchased from Chromadex (Santa Ana, CA, USA).

#### Isoflavone extraction and HPLC analysis

The cotyledons were ground with a mill (IKA Labortechnik, Germany) and the germ by a mortar and pestle. Duplicate aliquots of each finely powdered sample (0.1 g particles  $\text{\O} < 0.200\text{mm}$ ) were extracted with 80% aqueous methanol (7 mL) for 2h at room temperature. The residue was removed after centrifugation and decantation of the clear supernatant. The final solutions were filtered (0.2  $\mu\text{m}$ , Acrodisc Syringe Filters, GHP membranes) and analyzed by HPLC with a P4000 pump controller, AS3000 autosampler and UV2000 detector (Spectra Physics Analytical Inc., Fremont, California, US). The analytical column, 250 x 4.6 mm i.d., 5  $\mu\text{m}$ , Satisfaction RP-C<sub>18</sub>-AB (Cluzeau, Sainte Foy La Grande, France) was kept at 30 °C. The mobile phases were 0.05% (v/v) trifluoroacetic acid in water (solvent A) and

acetonitrile (solvent B). The gradient elution was carried out as reported by Murphy et al., (1999) with minor modifications as reported previously (Hubert *et al.*, 2005): solvent B increased from 0 to 15% in 2 min, then to 18% in 4 min, to 24.5% in 26 min, to 40% over 7 min, then to 50% in 1 min, and finally increased to 100% in 6 min. The gradient program recycled back to the initial state of 100% solvent A in 2 min. UV absorbance was monitored at 260 nm. The injection volume was 10  $\mu\text{L}$  and the flow rate was  $1.5 \text{ mL min}^{-1}$ . Calibration curves were established using the  $\beta$ -glucoside and aglycone isoflavones standard molecules. Due to their unstable structure, the malonyl- and acetyl- conjugated isoflavones were not used as external standards. Their response factor was calculated from those of their corresponding  $\beta$ -glucoside forms, correcting them in a molecular mass ratio. Since the malonyl- and acetyl- group does not contain an ultraviolet chromophore, it was hypothesized that the absorption properties of the  $\beta$ -glucoside structures at 260 nm should not be modified by a malonyl- or an acetyl- conjugation, and that their response factor was only dependent upon their molecular weight. Isoflavones were expressed in  $\mu\text{mol.g}^{-1}$  of dry weight. The conjugated and aglycone concentration were then added for each aglycone form to obtain the total genistein, daidzein and glycitein.

#### Curve fitting

Each data point was the mean of 2 independent samples. For each experiment, an intra series variance was calculated for each cultivar and used to calculate the mean standard error. Curve fitting was performed with the Sigmaplot v9.01 (2004) regression wizard. A classical 3 parameters sigmoid model was used.

## ***RESULTS***

### Cultivar reproductive development in the three experiments

In the 2 greenhouse experiments (2003 and 2004), the four cultivars began their flowering during the same week. NT and NSK were followed by Imari and Queen 4 and 6-7 days later, respectively. All the plants were harvested at 80 DAF which correspond to the R8 stage in Imari, Queen and NT. NSK is a determinate cultivar with a short reproductive stage which raised the R8 (maturity) stage 10 days before NT. In the greenhouse conditions, Imari and Queen were fully indeterminate. In the field, NT, Imari and Queen had the same flowering day, but NSK was 10 days later. The plants were harvested at 56 DAF for NSK, 63 DAF for Imari and NT, and 61 DAF for Queen. The harvesting date corresponded to the R7 stage for NSK (maturity group III), to the R8 stage for Imari and Queen (group I-II), and was one week after the R8 stage for NT (group 0-I). The R6 stage was reached at 40 DAF in the greenhouse conditions, and at 30-35 DAF in the field.

### Dry matter accumulation in hypocotyls vs cotyledons

Dry matter accumulation began at 20 DAF, simultaneously in the cotyledons (Figure 1A and 1B) and the hypocotyl (Figure 1C and 1D). Whatever the cultivar, the final hypocotyl weight was reached at 50 DAF in greenhouse experiment (Figure 1C), and a few days earlier in the field (Figure 1D). At this moment, whatever the growing conditions, the dry matter accumulation was slower in the cotyledons, but increased until 60 DAF. The cotyledon weight at maturity was higher in Imari (Figures 1A and 1B), which had larger seeds than Queen (Rasolohery et al., 2007). The higher variability in dry matter accumulation (higher mean standard error) observed in the field was probably due to lower stage homogeneity of the samples than in the greenhouse experiment.

### Total isoflavones accumulation kinetics in the seed fractions

The isoflavone accumulation began later in cotyledons (Figures 2A, 2B and 2C) than in hypocotyl (Figures 2D, 2E and 2F). In cotyledons, depending on the growth conditions, the increase was maintained until the complete maturity of the seed (Queen in 2004; Queen and NT in 2005). The cultivar ranking in cotyledons was maintained but the final total isoflavone content was highly different between the three growth conditions. For example, Queen had  $4.45 \mu\text{mol.g}^{-1}$  in 2003 greenhouse experiment (Figure 2A), had a more than two fold increase ( $9.37 \mu\text{mol.g}^{-1}$ ) the second year in the 2004 greenhouse experiment (Figure 2B), and near a 4-fold increase ( $15.14 \mu\text{mol.g}^{-1}$ ) in the 2005 field experiment (Figure 2C). The changes in Imari followed the same ratios. For each cultivar, the high isoflavone content was the consequence of an earlier beginning, a steeper increase and a prolonged accumulation.

In contrast, the isoflavone accumulation began very early in hypocotyl and reached a plateau at the beginning of the active accumulation in cotyledons (Figure 2D, 2E and 2F). Concerning Queen and NT, presenting the highest final contents, the isoflavone accumulation in hypocotyls began before 20 DAF. The growth conditions had little effects on the final isoflavone contents in hypocotyls. Despite a high positive effect of the field conditions on the cotyledon isoflavone contents, few or negative effects on hypocotyl content were observed: at the harvesting date Queen had  $45.75 \mu\text{mol.g}^{-1}$  and  $47.33 \mu\text{mol.g}^{-1}$  in the greenhouse 2003 and 2004 experiments, respectively, and  $41.83 \mu\text{mol.g}^{-1}$  in the field. The cultivar hypocotyls isoflavone content ranking was maintained in the three experiments. In NSK, the hypocotyl isoflavone level was intermediate between Imari and Queen. In the greenhouse 2004 and field experiments, the total isoflavone content was 40 to 50% higher in NT than in Queen hypocotyl. In the case of a short maturation phase, as it can be seen in NSK, the slopes were steepened and the plateau reached earlier (in cotyledon and in hypocotyl).

### Individual isoflavone accumulation

The aglycone equivalents (in  $\mu\text{mol.g}^{-1}$  DW) of each conjugated form were added by class of aglycone to study the accumulation kinetics of total genistein, total daidzein and total glycitein in the two seed fractions.

In the cotyledons (Figure 3), Imari and Queen had very contrasted individual isoflavone profiles: Queen a high relative content in daidzein (near 50%) (Figure 3A, 3B and 3C), and Imari had a high relative content in genistein (more than 60%) (Figure 3D, 3E and 3F). Differences between the cultivars appeared in the ability to prolonge the intensive accumulation of one isoflavone under favourable conditions whereas the other reached a plateau. However, cultivar differences were globally conserved in the three growth conditions.

In the hypocotyls, daidzein and genistein accumulated earlier than glycitein wich was specific of this fraction (Figure 4). At 20 DAF, glycitein content was very low in all the cultivars, but increased steeply in NSK, Queen and NT (Figure 4D, 4E and 4F). Contrary to glycitein, in favorable conditions, daidzein (Figure 4A, 4B and 4C) and genistein (Figure 4G, 4H and 4I) could reach a higher plateau. Each cultivar had a typical profile, such as Imari which had a steeper daidzein accumulation and a limited glycitein accumulation, resulting in a daidzein-rich germ fraction at maturity. On the contrary, NSK had a very low daidzein increase. In consequence, the hypocotyls of this cultivar can have more than 70% of glycitein at maturity. These characteristics have been observed in the three growing conditions. For all the cultivars, accumulation kinetic profiles were remarkably maintained under the three growing conditions.

## ***DISCUSSION***

The controversy about the benefits or the risks of isoflavone consumption had raised a high interest in controlling the accumulation and/or the compartmentalization of isoflavones in the seed parts. This work investigates the differences in accumulation of total and individual isoflavones in the cotyledons and hypocotyls of the soybean seed. Isoflavones occurs in high concentrations in the hypocotyls which also contain a specific individual isoflavone, *i.e.* glycitein and its conjugated forms (Tsukamoto et al., 1995). Two cultivars (Imari and Queen) belonging to the same maturity group, with similar reproductive and growth behavior and contrasted isoflavone content and composition, were compared under three growing conditions for three years. Two other cultivars were also used: the first (NSK) having a very short maturation phase and the second one (NT) with a particularly high isoflavone content in the hypocotyl. For these four cultivars, in all the growing conditions, there has been a clear succession of the isoflavones accumulation, which accumulated first in hypocotyls. Even if this two seed fractions began simultaneously their dry matter accumulation, around 20 DAF, the isoflavone accumulation was clearly delayed in the cotyledons. Actually, isoflavone accumulation seemed to begin in the cotyledons when a plateau was reached in the hypocotyl. Thus, whatever the cultivar or the environmental conditions, the accumulation in cotyledons appeared to be a late maturation event which began after R6 (35-40 DAF). High and low content cultivars had the same ranking above the different environmental conditions encountered, but a same cultivar can have a 4 fold cotyledon isoflavone content increase in a favorable environment. In this case, the isoflavone accumulation did not clearly reach a plateau, and continuously increased until complete maturity. In the field, because of a late sowing date, the maturity was delayed at the beginning of October. At this moment, the night temperatures were relatively low (around 10°C). The low temperatures increase the activity of key enzymes of the phenylpropanoid and flavonoid pathways such as PAL and CHS (Janas et

al., 2002; Posmyk et al., 2005). On the contrary, the exceptionally high temperatures encountered in 2003 (during the summer, the day and night mean temperatures were above 35°C and 28°C, respectively), can have exactly the reverse effect on these enzymes (Caldwell et al., 2005; Lozovaya et al., 2005). Interestingly, the isoflavone accumulation in hypocotyls was not influenced. This was also the case in a previous study in controlled conditions where contrasted night/day temperature were applied at the end of the seed maturation (Lozovaya et al., 2005; Rasolohery et al., 2007). However, in such conditions hypocotyls could have accumulated most of their final isoflavones content before the temperature treatment. In this study, this was obviously not the case: in 2003, very high temperatures were encountered all along July and August, but the hypocotyls isoflavone contents were higher in this experiment than in 2005. The optimal plant nutrition applied in the greenhouse conditions had positively influenced the high seed and hypocotyl weights, and might have also influenced the isoflavone accumulation. The isoflavone synthesis in hypocotyls seemed mainly under genotypic control: even under favorable conditions the plateau was maintained in opposition with the behavior observed in cotyledons.

As far as individual isoflavone aglycones are concerned and whatever the cultivar, similar accumulation kinetics occurred in cotyledons and hypocotyls. However, in cotyledons, according to their genotypes, the cultivars can preferentially accelerate the accumulation of one isoflavone. This was particularly the case of Imari vs. Queen, which favored genistein or daidzein, respectively. In hypocotyls, daidzein and genistein accumulate prior glycitein. This latter isoflavone is probably under a specific pathway, or could be expressed in specific cells of the embryonic axis. In NT which expressed dramatically high levels of total isoflavones in hypocotyls, all the three isoflavones were over-accumulated, this phenomenon appeared almost independent of the isoflavone accumulation in cotyledons.

It has been suggested that isoflavones found in the developing embryo could be simultaneously imported from the other tissues, such as seed coat, and locally synthesized from precursor molecules (Dhaubhadel et al., 2003). In the Dhaubhadel *et al.* studies (2003; 2007) late expression of the some isoflavone (IFS2) and chalcone synthase genes have been observed, contrary to the expression of one isoflavone synthase (IFS1), which was already detected at 30 DAF and maintained all along the development of the embryo. These differences could reflect local variations in the embryo, such as in developing axis and cotyledons. The accumulation kinetics of isoflavones in hypocotyls could also result from the summation of two phenomenons: before R5 (20 DAF), daidzein and genistein could firstly be imported from the seed coat, and after R5 an active local synthesis of glycitein and daidzein could occur. Remarkably, hypocotyl had the nearly same final genistein content than cotyledons.

Intensive isoflavone accumulation in the cotyledons always begins when this accumulation has reached the plateau in the hypocotyls. Nevertheless, the contents in cotyledon are very low compared to those of the hypocotyl and glycitein was never observed, except traces, in the cotyledons. Thus, transport between these two seed parts is uncertain. The coincidence of these two events may be the sign of the transition toward the late maturation stage. This is consistent with the end of the fast protein accumulation (Kim and Chung, 2007; Kim et al., 2007)

The preservation of the global profiles despite very different growing conditions indicated a large part of genetic control of each accumulation phase and their transition: initiation, slope, and plateau. In hypocotyls, there was little effects of the environment. Moreover, nutrition factors could have more effect than temperature on this seed part. This work has shown that these two seed fractions have very distinct regulation of the isoflavone accumulation. Thus, it must be taken into account in studies on genetic and environmental effects on seed isoflavone



contents as hypocotyl contribution to total seed content may be substantial, particularly under high temperature conditions during seed filling period. This work has also shown a high cultivar variability of individual isoflavone accumulation in the hypocotyl, which allows the management of isoflavone profile and compartmentation in breeding programs.

**Acknowledgements:** The authors thanks Yolaine Brevard for her help in the field experiment which was part of his Bachelor practical training experience, and Francis Alric, responsible for the breeder team at Euralis Semences, France, for his advice and cares to the soybeans in the field experiment. This study was supported by grants from Genibio Company (Saint Girons, France), the Midi-Pyrénées Région and its health-food network, and the Organisation Nationale Interprofessionnelle des Oléagineux (ONIDOL). We thank all these institutions for financial support.

## **REFERENCES**

- Aussenac, T., S. Lacombe, and J. Dayde. 1998. Quantification of isoflavones by capillary zone electrophoresis in soybean seeds: effects of variety and environment. *American Journal of Clinical Nutrition* 68:1480S-1485S.
- Barnes, S. 2001. Soy, Isoflavones and cancer, p. 49-53 *Soy and Health 2000*. GARANT PUBLISHERS, Leuven.
- Barnes, S. 2004. Soy isoflavones - Phytoestrogens and what else? *Journal of Nutrition* 134:1225S-1228S.
- Caldwell, C.R., S.J. Britz, and R.M. Mirecki. 2005. Effect of temperature, elevated carbon dioxide, and drought during seed development on the isoflavone content of dwarf soybean *Glycine max* (L.) Merrill grown in controlled environments. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53:1125-1129.
- Carrao-Panizzi, M.C., A.d.P. Beleia, K. Kitamura, and M.C.N. Oliveira. 1999. Effects of genetics and environment on isoflavone content of soybean from different regions of Brazil. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira* 34:1787-1795.
- Chen, A.M., and W.J. Rogan. 2004. Isoflavones in soy infant formula: A review of evidence for endocrine and other activity in infants. *Annual Review of Nutrition* 24:33-54.
- Clarkson, T.B. 2002. Soy, soy phytoestrogens and cardiovascular disease. *Journal of Nutrition* 132:566S-569S.
- de Kleijn, M.J.J., Y.T. van der Schouw, P.W.F. Wilson, D.E. Grobbee, and P.F. Jacques. 2002. Dietary intake of phytoestrogens is associated with a favorable metabolic cardiovascular risk profile in postmenopausal US women: The Framingham Study. *Journal of Nutrition* 132:276-282.
- Dhaubhadel, S., B.D. McGarvey, R. Williams, and M. Gijzen. 2003. Isoflavonoid biosynthesis and accumulation in developing soybean seeds. *Plant Molecular Biology* 53:733-743.
- Dhaubhadel, S., M. Gijzen, P. Moy, and M. Farhangkhoe. 2007. Transcriptome analysis reveals a critical role of CHS7 and CHS8 genes for isoflavonoid synthesis in soybean seeds. *Plant Physiology* 143:326-338.
- Dixon, R.A., L. Achnine, P. Kota, C.J. Liu, M.S.S. Reddy, and L.J. Wang. 2002. The phenylpropanoid pathway and plant defence - a genomics perspective. *Molecular Plant Pathology* 3:371-390.

- Eldridge, A.C., and W.F. Kwolek. 1983. Soybean isoflavones: effect of environment and variety on composition. *Journal of Agricultural & Food Chemistry* 31:394-396.
- Goldberg, R.B., G. de Paiva, and R. Yadegari. 1997. Plant embryogenesis: Zygote to seed. *Science* 266:605-614.
- Graham, M.Y., and T.L. Graham. 1991. Rapid accumulation of anionic peroxidases and phenolic polymers in soybean cotyledon tissues following treatment with *Phytophthora megasperma* f. sp. *Glycinea* wall glucan. *Plant Physiol* 97:1445-1455
- Graham, M.Y., and T.L. Graham. 1994. Wound-associated competency factors are required for the proximal cell responses of soybean to the *Phytophthora sojae* wall glucan elicitor. *Plant Physiology* 105:571-578.
- Graham, T.L. 1991. Flavonoid and isoflavonoid distribution in developing soybean seedling tissues and in seed and root exudates. *Plant Physiology* 95:594-603.
- Hoeck, J.A., W.R. Fehr, P.A. Murphy, and G.A. Welke. 2000. Influence of genotype and environment on isoflavone contents of soybean. *Crop Science* 40:48-51.
- Hubert, J., M. Berger, and J. Dayde. 2005. Use of a simplified HPLC-UV analysis for soyasaponin B determination: Study of saponin and isoflavone variability in soybean cultivars and soy-based health food products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53:3923-3930.
- Janas, K.M., M. Cvikrova, A. Palagiewicz, K. Szafranska, and M.M. Posmyk. 2002. Constitutive elevated accumulation of phenylpropanoids in soybean roots at low temperature. *Plant Science* 163:369-373.
- Kim, J.A., and I.M. Chung. 2007. Change in isoflavone concentration of soybean (*Glycine max* L.) seeds at different growth stages. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 87:496-503.
- Kim, J.A., S.B. Hong, W.S. Jung, C.Y. Yu, K.H. Ma, J.G. Gwag, and I.M. Chung. 2007. Comparison of isoflavones composition in seed, embryo, cotyledon and seed coat of cooked-with-rice and vegetable soybean (*Glycine max* L.) varieties. *Food Chemistry* 102:738-744.
- Kudou, S., Y. Fleury, D.H. Welti, D. Magnolato, T. Uchida, K. Kitamura, and K. Okubo. 1991. Malonyl isoflavone glycosides in soybean seeds (*Glycine max* MERRILL). *Agric. Biol. Chem.* 55:2227-2233.
- Latunde-Dada, A.O., F. Cabello-Hurtado, N. Czittrich, L. Didierjean, C. Schopfer, N. Hertkorn, D. Werck-Reichhart, and J. Ebel. 2001. Flavonoid 6-hydroxylase from

- soybean (*Glycine max* L.), a novel plant P-450 monooxygenase. *Journal of Biological Chemistry* 276:1688-1695.
- Lee, S.J., W.K. Yan, J.K. Ahn, and I.M. Chung. 2003. Effects of year, site, genotype and their interactions on various soybean isoflavones. *Field Crops Research* 81:181-192.
- Lozovaya, V.V., A.V. Lygin, A.V. Ulanov, R.L. Nelson, J. Dayde, and J.M. Widhohn. 2005. Effect of temperature and soil moisture status during seed development on soybean seed isoflavone concentration and composition. *Crop Science* 45:1934-1940.
- Manach, C., G. Williamson, C. Morand, A. Scalbert, and C. Remesy. 2005. Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. *American Journal of Clinical Nutrition* 81:230S-242S.
- Mendez, M.A., M.S. Anthony, and L. Arab. 2002. Soy-based formulae and infant growth and development: A review. *Journal of Nutrition* 132:2127-2130.
- Messina, M.J. 1999. Legumes and soybeans: overview of their nutritional profiles and health effects. *American Journal of Clinical Nutrition* 70:439S-450S.
- Messina, M.J. 2003. Emerging evidence on the role of soy in reducing prostate cancer risk. *Nutrition Reviews* 61:117-131.
- Molteni, A., L. Brizio-Molteni, and V. Persky. 1995. In Vitro Hormonal Effects of Soybean Isoflavones. *J. Nutr.* 125:751S-756.
- Morandi, S., A. D'Agostina, F. Ferrario, and A. Arnoldi. 2005. Isoflavone content of Italian soy food products and daily intakes of some specific classes of consumers. *European Food Research and Technology* 221:84-91.
- Murphy, P.A., T. Song, G. Buseman, K. Barua, G.R. Beecher, D. Trainer, and J. Holden. 1999. Isoflavones in retail and institutional soy foods. *Journal of Agricultural & Food Chemistry* 47:2697-2704.
- Penotti, M., E. Fabio, A.B. Modena, M. Rinaldi, U. Omedei, and P. Vigano. 2003. Effect of soy-derived isoflavones on hot flushes, endometrial thickness, and the pulsatility index of the uterine and cerebral arteries. *Fertility and Sterility* 79:1112-1117.
- Posmyk, M.M., C. Bailly, K. Szafranska, K.M. Janas, and F. Corbineau. 2005. Antioxidant enzymes and isoflavonoids in chilled soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) seedlings. *Journal of Plant Physiology* 162:403-412.
- Pueppke, S.G., M.C. Bolanos-Vasquez, D. Werner, M.P. Bec-Ferte, J.C. Prome, and H.B. Krishnan. 1998. Release of flavonoids by the soybean cultivars McCall and Peking and their perception as signals by the nitrogen-fixing symbiont *Sinorhizobium fredii*. *Plant Physiology* 117:599-608.

- Rasolohery, C.A., M. Berger, A.V. Lygin, V.V. Lozovaya, R.L. Nelson, and J. Daydé. 2007. Effect of temperature and water availability during late maturation of the soybean seed on germ and cotyledon isoflavone content and composition. *Journal of Science Of Food and Agriculture* Accepted for publication.
- Sarkar, F.H., and Y.W. Li. 2004. The role of isoflavones in cancer chemoprevention. *Frontiers in Bioscience* 9:2714-2724.
- Schryver, T. 2002. Increasing health benefits using soy germ. *Cereal Foods World* 47:185-188.
- Setchell, K.D. 1998. Phytoestrogens: the biochemistry, physiology, and implications for human health of soy isoflavones. *American Journal of Clinical Nutrition* 68:1333S-1346S.
- Shimoyamada, M. 2003. Food functionality through the interactions among soybean constituents. *Journal of the Japanese Society for Food Science and Technology-Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi* 50:445-450.
- Tsukamoto, C., S. Shimada, K. Igita, S. Kudou, M. Kokubun, K. Okubo, and K. Kitamura. 1995. Factors affecting isoflavone content in soybean seeds: changes in isoflavones, saponins, and composition of fatty acids at different temperatures during seed development. *Journal of Agricultural & Food Chemistry* 43:1184-1192.
- Williamson, G., and C. Manach. 2005. Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. II. Review of 93 intervention studies. *American Journal of Clinical Nutrition* 81:243S-255S.
- Yu, O., J. Shi, A.O. Hession, C.A. Maxwell, B. McGonigle, and J.T. Odell. 2003. Metabolic engineering to increase isoflavone biosynthesis in soybean seed. *Phytochemistry* 63:753-763.

## **FIGURES**

**Figure 1** Dry weight accumulation in cotyledons (A, B) and hypocotyls (C, D) in 4 soybean cultivars cultivated under two culture conditions: greenhouse 2003 (A, C) and field 2005 (B, D). Means  $\pm$  SE (n=2). Imari (●) and Queen (○) are fitted with a solid line; NSK (▼) with a dotted line, and NT (Δ) with a dashed line.

**Figure 2** Total isoflavones accumulation in cotyledons (A, B, C) and hypocotyls (D, E, F) in 4 soybean cultivars cultivated under three culture conditions: greenhouse 2003 (A, D) and 2004 (B, E) and field 2005 (C, F). Means  $\pm$  SE (n=2). Imari (●) and Queen (○) are fitted with a solid line; NSK (▼) with a dotted line, and NT (Δ) with a dashed line.

**Figure 3** Individual isoflavones accumulation in cotyledons (A, B, C) and hypocotyls (D, E, F) in 4 soybean cultivars cultivated under three culture conditions: greenhouse 2003 (A, D) and 2004 (B, E) and field 2005 (C, F). Means  $\pm$  SE (n=2). Imari (●) and Queen (○) are fitted with a solid line; NSK (▼) with a dotted line, and NT (Δ) with a dashed line.

**Figure 4** Individual isoflavones accumulation in hypocotyls in 4 soybean cultivars cultivated under three culture conditions: greenhouse 2003 (A, D) and 2004 (B, E) and field 2005 (C, F). Means  $\pm$  SE (n=2). Imari (●) and Queen (○) are fitted with a solid line; NSK (▼) with a dotted line, and NT (Δ) with a dashed line. For each isoflavone: daidzein (A, B, C) and genistein (D, E, F), the masses of conjugated and non conjugated forms have been converted in aglycones equivalents and added

Figure 1

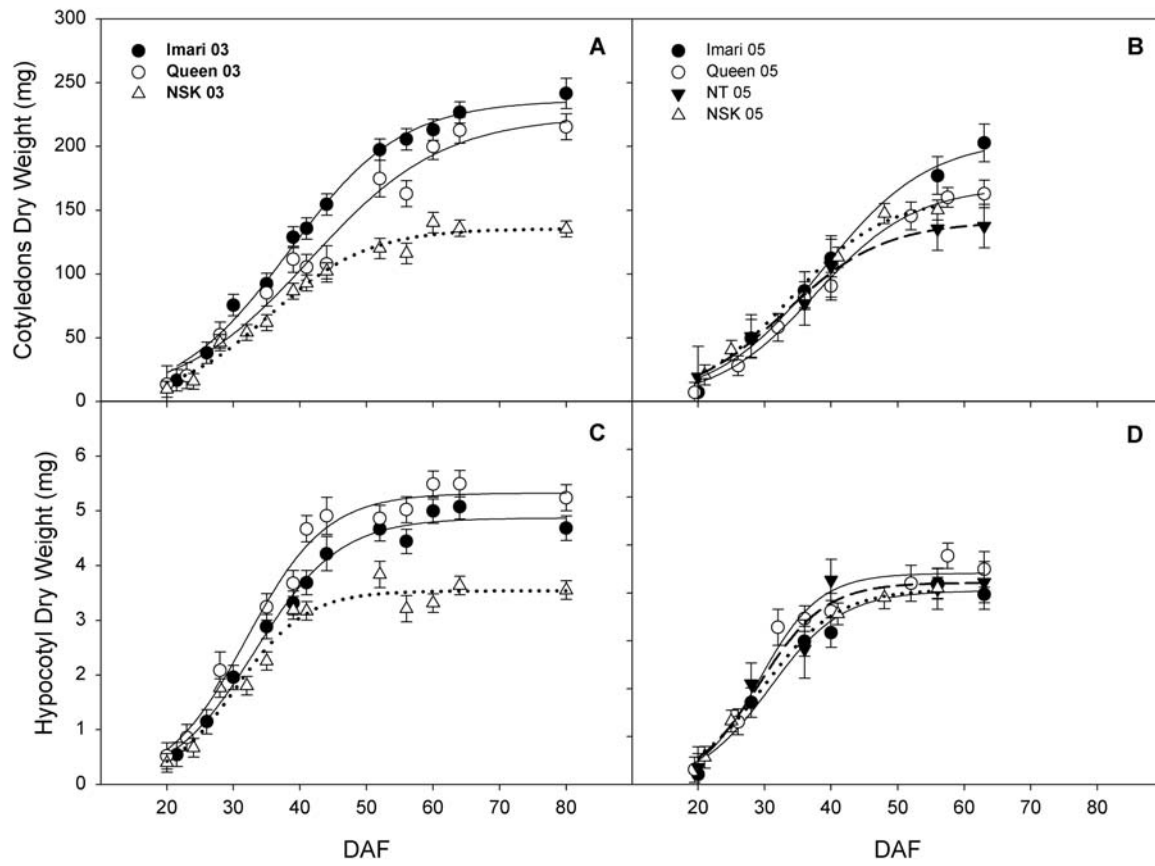


Figure 2

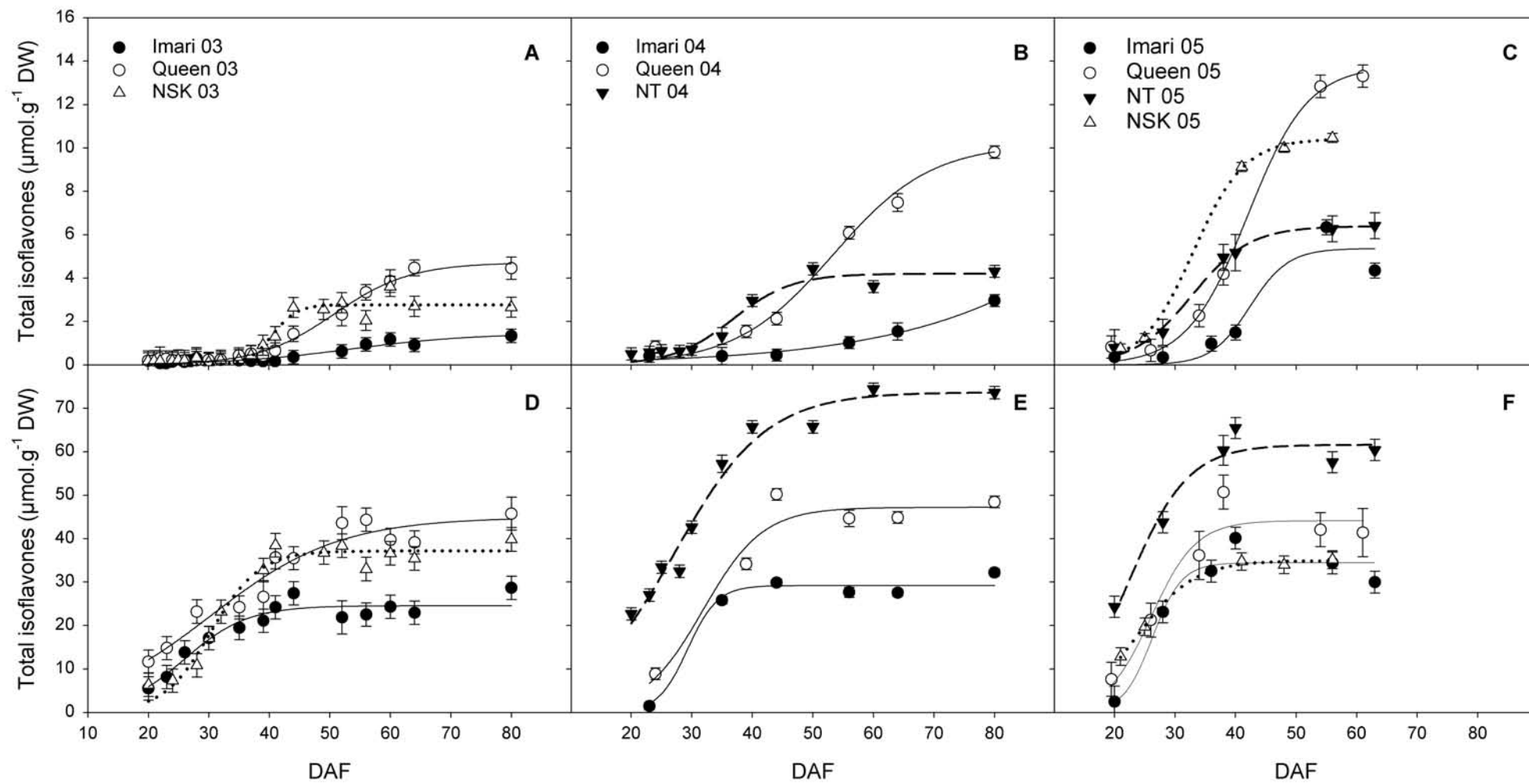




Figure 3

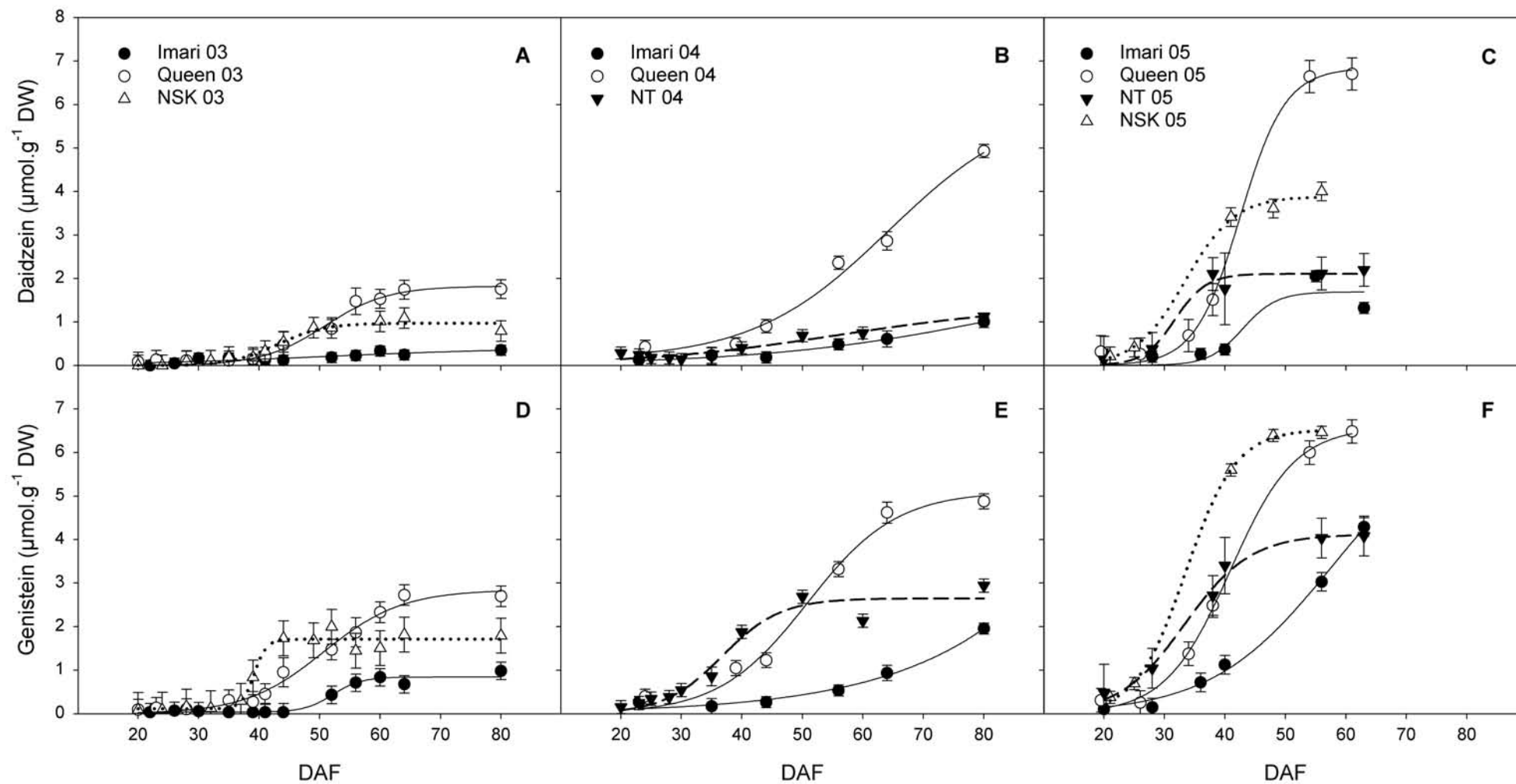
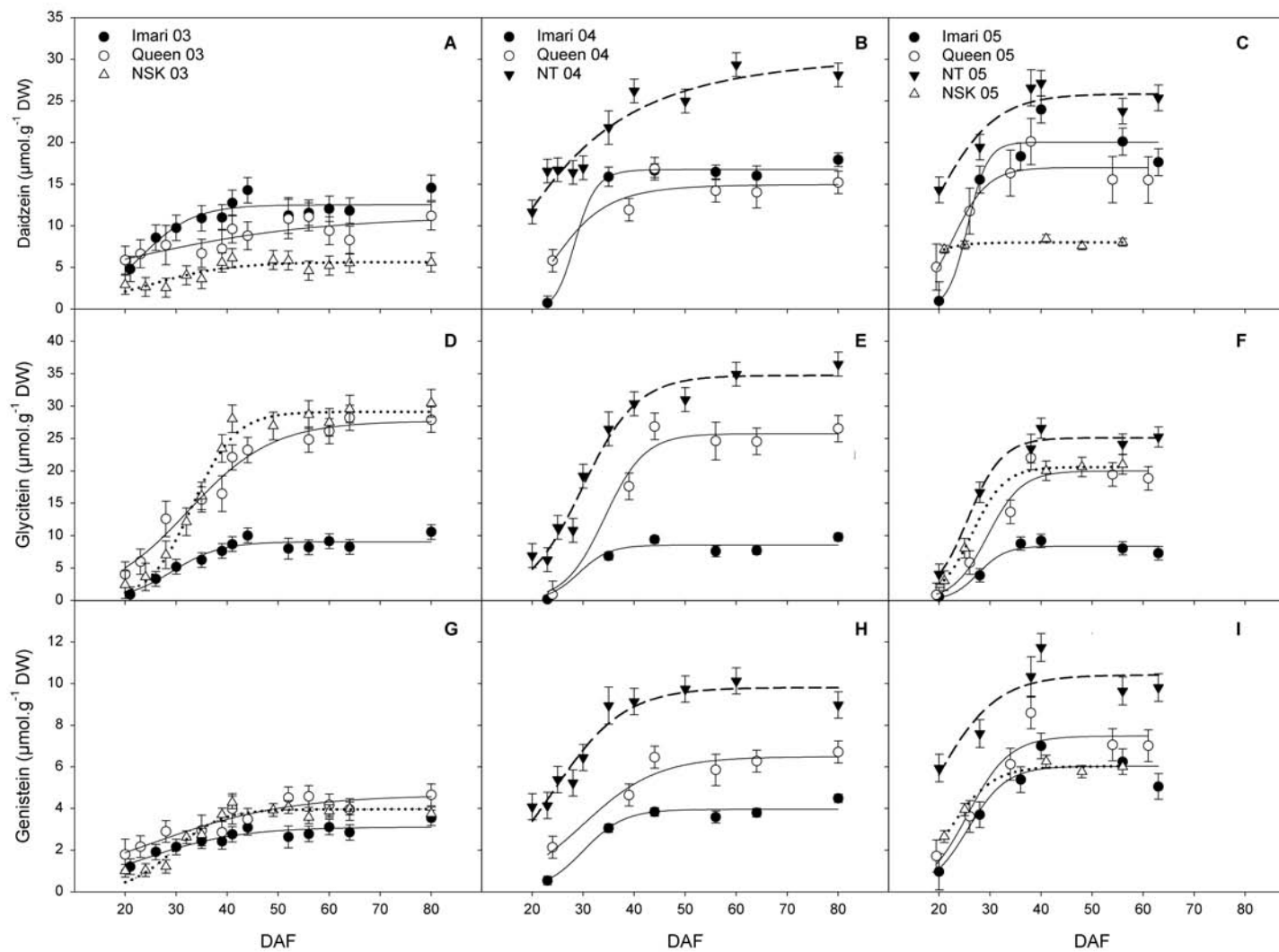


Figure 4



### **3. SYNTHÈSE ET CONCLUSION**

Les principaux résultats obtenus dans cette deuxième partie des travaux, concernent la comparaison des cinétiques d'accumulation des isoflavones dans les deux compartiments de la graine : cotylédons et germe.

Quelle que soit la variété on observe une accumulation synchrone de la matière sèche dans les cotylédons et le germe. Par contre, pour les isoflavones il y a toujours un très net décalage, avec un démarrage très précoce, dès 20 jours après floraison environ, dans les germes, alors que l'accumulation dans les cotylédons est réellement tardive. Elle ne débute qu'au stade R6 lorsque le plateau est déjà atteint dans les germes. Selon les conditions environnementales, cette accumulation dans les cotylédons peut se poursuivre sans jamais n'atteindre de réel plateau, jusqu'à la maturité physiologique. Ceci peut conduire à des variations de teneurs finales très importantes : du simple au quadruple dans nos expérimentations, et plus si l'on fait davantage varier les facteurs environnementaux (Rasolohery *et al.*, 2007). C'est à ce niveau que les différences génotypiques sont aussi marquées, avec des vitesses d'accumulation qui s'accroissent soit pour la daidzéine, soit pour la génistéine en fonction des variétés. A l'opposé, dans les germes, l'accumulation ne varie pas dans sa cinétique en fonction des conditions du milieu et les plateaux sont toujours atteints au même stade du développement de la graine. Ce résultat confirme l'hypothèse de la prépondérance du contrôle génétique de la synthèse et de l'accumulation des isoflavones du germe.

Cette étude démontre clairement que le soja dispose de deux voies distinctes de régulation de la teneur en isoflavones et de leur composition dans les cotylédons, d'une part, et dans le germe, d'autre part, que l'on considère la composante génétique ou environnementale de ces régulations. Cela permet de clairement envisager une maîtrise de ces molécules dans les deux compartiments de la graine, en combinant le choix variétal — et donc la sélection créatrice — à la gestion de la conduite culturale.

## **CHAPITRE V**

### **DISCUSSION GENERALE ET CONCLUSION**

Au cours de ces travaux, nous avons montré, en accord avec de nombreux résultats de la littérature (Eldridge et Kwolek, 1983; Wang et Murphy, 1994; Tsukamoto *et al.*, 1995; Aussenac *et al.*, 1998; Carrao-Panizzi *et al.*, 1999; Hoeck *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 2003; Seguin *et al.*, 2004; Caldwell *et al.*, 2005; Kim *et al.*, 2005; Lozovaya *et al.*, 2005) que les teneurs et compositions en isoflavones de la graine de soja présentaient un fort déterminisme génétique et environnemental, avec un effet prépondérant de la température. Cependant, après les travaux préliminaires d'Eldridge et Kwolek (1983) et de Tsukamoto *et al.* (1995), qui avaient signalé une grande différence de teneur et de composition entre les germes et les cotylédons, peu de travaux ont été consacrés à ces deux fractions séparément. Face à la demande actuelle d'une maîtrise des teneurs et compositions dans la graine, avec une utilisation très différente des deux sous parties de la graine, l'étude de la compartimentation des isoflavones entre le germe et les cotylédons s'est imposée. Le germe présente, en fait, une teneur beaucoup plus élevée et moins variable que les cotylédons. Ainsi, bien qu'il ne représente que 2 à 3 % de la masse totale de la graine, selon les conditions environnementales, il peut contribuer pour jusqu'à 20% des isoflavones totales. Nous avons pu aussi montrer que le germe et les cotylédons n'étaient pas soumis de la même manière à l'influence des facteurs environnementaux : l'effet négatif des températures élevées lors de la fin de la maturation sur la teneur en isoflavones totales de la graine, est surtout dû à la réaction des cotylédons (Rasolohery *et al.*, 2007). *A contrario*, les températures fraîches, rencontrées lors de maturations retardées, après un semis tardif, ont un effet stimulant sur l'accumulation des isoflavones dans les cotylédons. Cet effet de la température est observé quelle que soit la variété. Une première piste de maîtrise des teneurs en isoflavones dans les cotylédons pourrait donc se traduire par une adaptation des dates de semis. (Aussenac *et al.*, 1998; Daydé et Lacombe, 2000)

Les teneurs en isoflavones totales des germes et des cotylédons sont cependant aussi sous un fort contrôle génétique. Ainsi, en ce qui concerne les cotylédons, les classements des variétés sont en général conservés d'un environnement à l'autre (Daydé *et al.*, 2002), ceci est aussi vrai pour les teneurs en isoflavones totales dans les germes. Lorsque l'on compare des variétés, les teneurs en isoflavones des germes et des cotylédons ne sont pas strictement corrélées (Rasolohery *et al.*, 2007), ce qui corrobore une étude préliminaire sur 162 variétés (Ayerdi-Gotor, 2002; Daydé *et al.*, 2004). Il serait donc possible de sélectionner des variétés avec des fortes teneurs dans les germes et des faibles teneurs dans les cotylédons.

Afin de mieux comprendre cette relative indépendance entre les deux compartiments de la graine, la seconde partie de ces travaux a été consacrée au suivi de l'accumulation des isoflavones durant la maturation de la graine dans des variétés très contrastées. Nous avons ainsi pu constater que les isoflavones s'accumulent d'abord dans le germe, et ceci dès le stade R5, c'est-à-dire au tout début du grossissement de la graine. L'accumulation y est alors très rapide, pour atteindre la teneur finale en une dizaine de jours, c'est-à-dire au stade R6. C'est à ce moment là seulement que l'accumulation commence dans les cotylédons. Ce phénomène est observé sur les quatre génotypes étudiés, et dans les trois conditions de cultures comparées. Lorsque les conditions sont favorables à une forte accumulation des isoflavones dans les cotylédons, elle semble se produire de manière continue jusqu'à la maturité complète. Dans tous les cas, la teneur finale des cotylédons sera bien inférieure à celle des germes. Certains auteurs ont émis l'hypothèse d'une importation des isoflavones des cotylédons depuis d'autres parties de la graine (Dhaubhadel *et al.*, 2003), cependant, étant donné les différences de profils, il est peu probable qu'elles proviennent du germe, ni même que les isoflavones de ces deux compartiments aient la même origine. De plus, les enzymes nécessaires à la synthèse des isoflavones ont été retrouvées dans l'embryon. Leur cinétique d'expression montre un démarrage à partir du stade R5, mais les résultats publiés ne séparent pas le germe et les cotylédons (Dhaubhadel *et al.*, 2007). Au vu de nos résultats, il semble très probable que les germes synthétisent leurs propres isoflavones. Par contre, la provenance des isoflavones des cotylédons est moins certaine : une accumulation transitoire a été observée dans le tégument, ainsi qu'un effet maternel lorsque des graines hybrides issues de croisements réciproques sont comparées (Dhaubhadel *et al.*, 2003).

Ces travaux permettent d'envisager plusieurs pistes intéressantes, notamment vers une étude plus fine du déterminisme génétique des teneurs et des compositions dans les deux compartiments de la graine, à la lumière d'autres travaux précédents réalisés au laboratoire d'agro-physiologie de l'EI Purpan. Le croisement des variétés Imari et Queen a été réalisé en 1999, mais seules 39 lignées fixées en génération F6 ont été produites. Elles ont cependant fait l'objet d'un essai sur 2 lieux : Mondonville, près de Toulouse, et Urbana-Champaign dans l'Illinois (Salingues, 2003). Ces lignées ont montré une grande variabilité de teneurs et compositions en isoflavones dans les germes comme dans les cotylédons (**Tableau 4**).

**Tableau 4 : Variabilité des teneurs totales en isoflavones ( $\text{mg.g}^{-1}$  MS) des germes et des cotylédons des lignées F6 issues du croisement Imari x Queen, comparées à leurs parents (Salingues, 2003)**

|            | Germes |      | Cotylédons |     |
|------------|--------|------|------------|-----|
|            | France | USA  | France     | USA |
| Imari      | 26.1   | 21.1 | 4.1        | 2.9 |
| Queen      | 34.8   | 29.3 | 7.4        | 5.5 |
| Lignée Min | 22.8   | 18.3 | 3.5        | 1.8 |
| Lignée Max | 31.1   | 25.5 | 8.3        | 4.7 |

*Erreurs Standards: 0.9 et 0.4  $\text{mg.g}^{-1}$  MS (n=2), pour les germes et les cotylédons, respectivement*

Malgré une grande différence entre les teneurs moyennes en isoflavones des deux lieux de cultures, les valeurs des lignées F6 sont très corrélées. Les héritabilités au sens large calculées sur cet essai sont de 0.60 et 0.79 pour les teneurs totales des cotylédons et des germes, respectivement. Des héritabilités du même ordre de grandeurs ont déjà été rapportées dans la littérature :

- 0.79 et 0.88 pour la daidzeine et la glycitéine, respectivement, estimation sur 40 lignées recombinantes fixées (Meksem *et al.*, 2001) ;
- plus de 0.90 pour chacune des formes les plus représentées dans la graine (daidzine, genistine, et leurs forme malonyles), estimation sur 97 individus F2 (Chiari *et al.*, 2004) ;
- entre 0.35 et 0.50 sur 207 lignées recombinantes fixées (F6), testées dans deux lieux (Primomo *et al.*, 2005).

Cependant, toutes ces études ont été réalisées sur la graine entière ce qui limite la précision des résultats concernant la glycitéine, et combine deux sources de daidzéine qui, comme nous l'avons démontré dans le présent travail, sont sous des contrôles distincts. Plusieurs travaux récents sur des croisements réciproques entre lignées à fortes et à faibles teneurs, ont mis en évidence des effets maternels. Ces différences ont été interprétées comme un phénomène de transport (Dhaubhadel *et al.*, 2003), ou selon un schéma plus complexe d'effets cytoplasmiques et d'interactions nucléo-cytoplasmiques (Chiari *et al.*, 2006).

Nous avons créé une nouvelle série de lignées recombinantes afin de permettre une recherche de QTL, en séparant les germes des cotylédons. Les croisements réciproques entre Imari et Queen ont été réalisés, 124 lignées Imari x Queen (IQ) et 132 lignées Queen x Imari (QI) sont en filiation monograinne. L'analyse de graines F3 est en cours. La génération F4 devrait être produite cet été. Une première étude (résultats non publiés) sur des graines F2

issues de ces croisements réciproques (150 graines de chaque croisement) est en cours de traitement des résultats

Les travaux préliminaires qui ont été réalisés au laboratoire sur les premières lignées recombinantes fixées F6 entre Imari et Queen ont aussi montré que les caractéristiques de composition étaient plus héritable encore que les teneurs, avec des valeurs particulièrement élevées (héritabilités supérieures à 0.98) pour les pourcentages de glycitéine et de daidzéine dans les germes, ce qui en fait des caractéristiques quasiment mendéliennes (Salingues, 2003; Daydé *et al.*, 2004). Ainsi, deux types de lignées, appelées « Glycitéine + » avec environ 50% de glycitéine et 30% de daidzéine ; et « Glycitéine – », présentant les proportions inverses ont été distingués. Leur répartition en  $\frac{3}{4}$  « Glycitéine + » et  $\frac{1}{4}$  « Glycitéine – » parmi des lignées recombinantes fixées suggérait un contrôle simple par deux gènes épistatiques. L'étude d'une collection de 162 variétés a montré une faible représentation des types « Glycitéine + ». Remarquablement, il y a très peu de lignées qui présentent des valeurs intermédiaires entre ces deux types (Daydé *et al.*, 2004). Par ailleurs, nous avons isolé des mutants spontanés d'un type vers l'autre dans la variété Dwight : 6 lignées « Glycitéine + » et 7 lignées « Glycitéine - » ont été multipliées et testées depuis 3 ans. Ces lignées se sont montrées stables et semblables en tout autre point, elles peuvent donc être considérées comme des lignées isogéniques (*Tableau 5*).

**Tableau 5 : Analyse des germes et des cotylédons des lignées isogéniques de la variété Dwight ; résultats en 2004 après 2 générations d'autofécondation (données non publiées)**

|                   |                                              | Glycitéine +                     | Glycitéine –                     |
|-------------------|----------------------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|
| Nombre de lignées |                                              | 6                                | 7                                |
| <b>GERMES</b>     | Total isoflavones ( $\mu\text{mol.g}^{-1}$ ) | 50.4 $\pm$ 0.7                   | 50.6 $\pm$ 3.2                   |
|                   | Genistéine ( $\mu\text{mol.g}^{-1}$ )        | 6.6 $\pm$ 0.1                    | 6.1 $\pm$ 0.4                    |
|                   | %                                            | 13.0 $\pm$ 0.2                   | 11.9 $\pm$ 0.3                   |
|                   | Daidzéine ( $\mu\text{mol.g}^{-1}$ )         | 18.9 $\pm$ 0.4                   | 30.1 $\pm$ 1.9                   |
|                   | %                                            | 37.4 $\pm$ 0.6                   | 59.4 $\pm$ 0.2                   |
|                   | <b>Glycitéine</b> ( $\mu\text{mol.g}^{-1}$ ) | <b>25.0 <math>\pm</math> 0.4</b> | <b>14.5 <math>\pm</math> 0.9</b> |
| %                 | <b>49.6 <math>\pm</math> 0.6</b>             | <b>28.6 <math>\pm</math> 0.3</b> |                                  |
| <b>COTYLEDONS</b> | Total isoflavones ( $\mu\text{mol.g}^{-1}$ ) | 8.0 $\pm$ 0.3                    | 8.5 $\pm$ 0.7                    |
|                   | Genistéine ( $\mu\text{mol.g}^{-1}$ )        | 4.4 $\pm$ 0.1                    | 4.5 $\pm$ 0.3                    |
|                   | %                                            | 55.4 $\pm$ 1.1                   | 53.2 $\pm$ 0.8                   |
|                   | Daidzéine ( $\mu\text{mol.g}^{-1}$ )         | 3.5 $\pm$ 0.2                    | 3.9 $\pm$ 0.4                    |
|                   | %                                            | 44.0 $\pm$ 0.9                   | 46.4 $\pm$ 1.1                   |
|                   | Glycitéine ( $\mu\text{mol.g}^{-1}$ )        | 0.04 $\pm$ 0.1                   | 0.03 $\pm$ 0.1                   |
| %                 | 0.50 $\pm$ 0.8                               | 0.30 $\pm$ 0.7                   |                                  |



Ce matériel fortuitement créé, associé à l'étude de mutants quasiment sans daidzéine (NS Kasha) ou sans glycitéine découverts à travers les « screenings » de collections (Ayerdi-Gotor, 2002; Sensiau, 2002), permet d'envisager la caractérisation précise du déterminisme génétique de la biosynthèse de la glycitéine et de son équilibre avec la daidzéine dans le germe. A un niveau plus fondamental, l'étude du rôle des isoflavones dans la physiologie de l'embryon et de la plantule, en particulier lors de l'établissement de la symbiose, sera permise grâce à la mise en œuvre de ce matériel végétal.

Ainsi, l'ensemble de ces pistes de recherches sur le volet génétique combiné à l'apport du présent travail de thèse en matière de physiologie et de compréhension du métabolisme, doit permettre de proposer un modèle global de maîtrise de la teneur et de la composition en isoflavones dans la graine de soja répondant aux besoins de l'ensemble des utilisateurs.

## LISTE DES TABLEAUX ET FIGURES

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |     |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| <i>Tableau 1 : Groupe de précocité selon les zones de production du soja en France (Source CETIOM, 2005).....</i>                                                                                                                                                                                                                        | 20  |
| <i>Tableau 2 : Composition de la graine de soja en acides aminés essentiels.....</i>                                                                                                                                                                                                                                                     | 24  |
| <i>Tableau 3: Profil des acides gras contenus dans les fractions de graines de soja (en % des acides gras totaux) .....</i>                                                                                                                                                                                                              | 25  |
| <i>Tableau 4 : Variabilité des teneurs totales en isoflavones (mg.g<sup>-1</sup> MS) des germes et des cotylédons des lignées F6 issues du croisement Imari x Queen, comparées à leurs parents (Salingues, 2003).....</i>                                                                                                                | 119 |
| <i>Tableau 5 : Analyse des germes et des cotylédons des lignées isogéniques de la variété Dwight ; résultats en 2004 après 2 générations d'autofécondation (données non publiées) 120</i>                                                                                                                                                |     |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |     |
| <i>Figure 1 : Structure de la graine de soja .....</i>                                                                                                                                                                                                                                                                                   | 14  |
| <i>Figure 2 : La double fécondation à l'origine des différents tissus de la graine (traduction des schémas de Goldberg et al., 1997; Bewley 2000, cité par Bradford, 2004) .....</i>                                                                                                                                                     | 16  |
| <i>Figure 3 : Premiers stades de développement de l'embryon des angiospermes (d'après Goldberg et al. 1997) .....</i>                                                                                                                                                                                                                    | 17  |
| <i>Figure 4 : Schéma général de la fin de l'organogénèse des dicotylédones d'après les modèles Arabidopsis et Capsella (Goldberg et al., 1997) .....</i>                                                                                                                                                                                 | 17  |
| <i>Figure 5 : Importance relative des masses de l'albumen et de l'embryon durant le développement de la graine selon les espèces (Bradford, 2004) .....</i>                                                                                                                                                                              | 18  |
| <i>Figure 6 : Principaux stades physiologiques du cycle reproducteur du soja (CETIOM, 2005) .....</i>                                                                                                                                                                                                                                    | 19  |
| <i>Figure 7 : Succession des processus physiologiques intervenant durant le développement de la graine de soja – en pointillés rouges : variation de la matière sèche (d'après Goldberg, 2007 – site internet : <a href="http://estdb.biology.ucla.edu/seed/project#seed">http://estdb.biology.ucla.edu/seed/project#seed</a>) .....</i> | 35  |
| <i>Figure 8 : Accumulation des différents composés dans la graine de la plante modèle Arabidopsis thaliana d'après Baud et al. (2002) — E.E.M : Early Embryo Morphogenesis ; Late M : late maturation stage .....</i>                                                                                                                    | 37  |
| <i>Figure 9 : Structure des isoflavones du soja .....</i>                                                                                                                                                                                                                                                                                | 27  |
| <i>Figure 10 : Biosynthèse des isoflavones (d'après Winkel-Shirley, 2001; Dixon et Sumner, 2003; Yu et al., 2003) .....</i>                                                                                                                                                                                                              | 29  |
| <i>Figure 11 : Rôle des flavonoïdes dans la mise en place de la symbiose d'après (Broughton et al., 2003) .....</i>                                                                                                                                                                                                                      | 31  |
| <i>Figure 12 : Ressemblance structurelle entre le 17-β-estradiol et la genistéine .....</i>                                                                                                                                                                                                                                              | 33  |

## BIBLIOGRAPHIE

1. ABEL, G. H. 1970. Winter and summer soybean growth in southern California. *Agronomy Journal*, 62: 118-120.
2. ABIRACHED-DARMENCY, M. ; ABDEL-GAWWAD, M. R. ; CONEJERO, G. ; VERDEIL, J. L. ; THOMPSON, R. 2005. In situ expression of two storage protein genes in relation to histo-differentiation at mid-embryogenesis in *Medicago truncatula* and *Pisum sativum* seeds. *Journal of Experimental Botany*, 56(418): 2019-2028.
3. ADLERCREUTZ, H. 2002. Phyto-oestrogens and cancer. *Lancet Oncology*, 3(6): 364-73.
4. AFSSA ; AFSSAPS, (2005). Sécurité et bénéfices des phyto-estrogènes apportés par l'alimentation - Recommandations, AFSSA, pp. 370.
5. AKIYAMA, T. ; ISHIDA, J. ; NAKAGAWA, S. ; OGAWARA, H. ; WATANABE, S.-I. ; ITOH, N. ; SIBUYA, M. ; FUKAMI, Y. 1987. Genistein, a specific inhibitor of tyrosine-specific protein kinases. *The Journal of Biological Chemistry*, 262(12): 5592-5595.
6. ALI, M. B. 1999. Variability among soybean [*Glycine max* (L.) Merr.] cultivars in response to genistein pre-incubated *Bradyrhizobium japonicum*. *Thèse de 3ème cycle Institut National Polytechnique, Toulouse*.
7. ANDERSON, J. W ; JOHNSTONE, B. M. ; COOK-NEWELL, M. E. 1995. Meta-analysis of the effects of soy protein intake on serum lipids. *New England Journal of Medicine*, 333(5): 276-82.
8. ANDRIANI, J. M. ; ANDRADE, F. H. ; SUERO, E. E. ; DARDANELLI, J. L. 1991. Water deficits during reproductive growth of soybeans. I. Their effects on dry matter accumulation, and its components. *Agronomie*, 11: 737-746.
9. ANTUNES, P. M. ; RAJCAN, I. ; GOSS, M. J. 2006. Specific flavonoids as interconnecting signals in the tripartite symbiosis formed by arbuscular mycorrhizal fungi, *Bradyrhizobium japonicum* (Kirchner) Jordan and soybean (*Glycine max* (L.) Merr.). *Soil Biology and Biochemistry*, 38(3): 533-543.
10. APPELBAUM, E. 1990. The *Rhizobium/Bradyrhizobium*-legume symbiosis. In Molecular biology of symbiotic nitrogen fixation. PM Gresshof ed. *CRC Press, Boca Raton*, 131-158.
11. ATKINSON, C. ; FRANKENFELD, C. L. ; LAMPE, J. W. 2005. Gut bacterial metabolism of the soy isoflavone daidzein: Exploring the relevance to human health. *Experimental Biology and Medicine*, 230(3): 155-170.
12. AUSSENAC, T. ; LACOMBE, S. ; DAYDE, J. 1998. Quantification of isoflavones by capillary zone electrophoresis in soybean seeds: effects of variety and environment. *American Journal of Clinical Nutrition*, 68(Supplement 6): 1480S-1485S.
13. AWAD, A. B. and FINK, C. S. 2000. Phytosterols as anticancer dietary components: Evidence and mechanism of action. *Journal of Nutrition*, 130(9): 2127-2130.

14. AYERDI-GOTOR, A. 2002. Étude des teneurs en isoflavones d'une collection de variétés de soja. Mémoire de fin d'études, Universidad Politecnica de Valencia - École d'Ingénieurs Purpan, Toulouse. pp 51.
15. BAKER, J. T. and ALLEN, L. 1989. Response of soybean to air temperature and carbon dioxide concentration. *Crop Science*, 29: 98-105.
16. BARNES, S. ; BOERSMA, B. ; PATEL, R. ; KIRK, M. ; DARLEY-USMAR, V. M. ; KIM, H. ; XU, J. 2000. Isoflavonoids and chronic disease: mechanisms of action. *Biofactors* 12(1-4), 209-15.
17. BARNES, S. ; KIM, H. ; DARLEY-USMAR, V. ; PATEL, R. ; XU, J. ; BOERSMA, B. ; LUO, M. 2000. Beyond ER alpha and ER beta: estrogen receptor binding is only part of the isoflavone study. *Journal of Nutrition*, 130(3): 656S-657S.
18. BARNES, S. 2001. Soy, Isoflavones and cancer, *Soy and Health 2000*, Garant Publishers, pp. 49-53.
19. BARNES, S. 2004. Soy isoflavones - Phytoestrogens and what else? *Journal of Nutrition*, 134(5): 1225S-1228S.
20. BARZ, W. ; BEIMEN, A.; JAQUES, U. ; OTTO, CH. ; SÜPPER, E.; UPMEIER, B. 1990. Turnover and storage of secondary products in cell cultures. In: Secondary Products From Plant Tissue Culture., BV CAHARL-WOOD and MJC RHODES eds, *Proceeding of the Phytochemical Society Europe*, 30: 79-102.
21. BAUD, S. ; BOUTIN, J. P. ; MIQUEL, M. ; LEPINIEC, L. ; ROCHAT, C. 2002. An integrated overview of seed development in *Arabidopsis thaliana* ecotype WS. *Plant Physiology and Biochemistry*, 40 (2): 151-160.
22. BENNETAU-PELISSERO, C. ; ARNAL-SCHNEBELEN, B. ; LAMOTHE, V. ; SAUVANT, P. ; SAGNE, J. L. ; VERBRUGGEN, M. A. ; MATHEY, J. ; LAVIALLE, O. 2003. ELISA as a new method to measure genistein and daidzein in food and human fluids. *Food Chemistry*, 82(4): 645-658.
23. BENNETT, J. O. ; YU, O. ; HEATHERLY, L. G. ; KRISHNAN, H. B. 2004. Accumulation of genistein and daidzein, soybean isoflavones implicated in promoting human health, is significantly elevated by irrigation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(25): 7574-7579.
24. BERGER, M. ; ARTAL, J. ; THEODOROU, V. ; NEPVEU, F. ; DAYDÉ, J. 2002. Facteurs de variation de la teneur en isoflavones du soja. *Symposium Aliment Santé*. Toulouse, 25 Avril 2002.
25. BERHOW, M. A. ; WAGNER, E. D. ; VAUGHN, S. F. ; PLEWA, M. J. 2000. Characterization and antimutagenic activity of soybean saponins. *Mutation Research*, 448: 11-22.
26. BERNARD, R. L. 1972. Two genes affecting stem termination in soybeans. *Crop Science*, 12 : 235-239.
27. BHARDWAJ, H. L. ; HAMAMA, A. A. ; RANGAPPA, M. ; JOSHI, J. M. ; SAPRA, V. T. 2004. Effects of soybean genotype and growing location on oil and fatty acids in tofu, *Plant Foods for Human Nutrition*, 58: 197-205.
28. BIRT, D. F. ; HENDRICH, S. ; WANG, W. 2001. Dietary agents in cancer prevention: flavonoids and isoflavonoids. *Pharmacology & Therapeutics*, 90(2-3): 157-77.

29. BLÖCHL, A. ; GRENIER-DE MARCH, G. ; SOURDIOUX, M. ; PETERBAUER, T. ; RICHTER, A. 2005. Induction of raffinose oligosaccharide biosynthesis by abscisic acid in somatic embryos of alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Plant Science*, 168(4): 1075-1082.
30. BORISJUK, L. ; NGUYEN, T. H. ; NEUBERGER, T. ; RUTTEN, T. ; TSCHIERSCHE, H. ; CLAUS, B. ; FEUSSNER, I. ; WEBB, A. G. ; JAKOB, P. ; WEBER, H. ; WOBUS, U. ; ROLLETSCHKE, H. 2005. Gradients of lipid storage, photosynthesis and plastid differentiation in developing soybean seeds. *New Phytologist* 167(3): 761-776.
31. BOSCREDON, A. 2001. Variabilité de la teneur et de la composition en isoflavones de la graine de soja (*Glycine max* L. Merr) : effet des facteurs génotypiques et environnementaux. *Mémoire d'ingénieur*, laboratoire d'agrophysiologie, École d'Ingénieurs Purpan, Toulouse. pp 83.
32. BOWEN, D. E. ; GUTTIERI, M. J. ; PETERSON, K. ; PETERSON, K. ; RABOY, V. ; SOUZA, E. J. 2006. Phosphorus fractions in developing seeds of four low phytate barley (*Hordeum vulgare* L.) genotypes. *Crop Science*, 46: 2468-2473.
33. BRADFORD, K. J. 1994. Water stress and water relations of seed development: a critical review. *Crop Science*, 34: 1-11.
34. BRADFORD, K. J. 2004. Seed Biology and Quality. University of California. Seed Biotechnology Center. Practical 2 days course. April 2004. pp.69
35. BROUGHTON, W. J. ; JABBOURI, S. ; PERRET, X. 2000. Keys to symbiotic harmony. *American Society for Microbiology*, 182: 5641-5652.
36. BROUGHTON, W. J. ; ZHANG, F. ; PERRET, X. ; STAEHELIN, C. 2003. Signals exchanged between legumes and Rhizobium: agricultural uses and perspectives. *Plant and Soil* 252(1): 129-137.
37. BUCKEE, G. K. 1994. Determination of Total Nitrogen in Barley, Malt and Beer by Kjeldahl Procedures and the Dumas Combustion Method - Collaborative Trial. *Journal of the Institute of Brewing*, 100(2): 57-64.
38. CAI, T. and CHANG, K. 1999. Processing effect on soybean storage proteins and their relationship with tofu quality. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47: 720-727.
39. CALDWELL, M. M. ; ROBBERECHT, R. ; FLINT, S. 1983. Internal filters: prospects for UV-acclimation in higher plants. *Physiologia Plantarum*, 58: 445-450.
40. CALDWELL, C. R. ; BRITZ, S. J. ; MIRECKI, R. M. 2005. Effect of temperature, elevated carbon dioxide, and drought during seed development on the isoflavone content of dwarf soybean (*Glycine max* L. Merrill) grown in controlled environments. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53(4): 1125-1129.
41. CAMPOS-VARGAS, R. ; NONOGAKI, H. ; SUSLOW, T. ; SALTVEIT, M. E. 2005. Heat shock treatments delay the increase in wound-induced phenylalanine ammonia-lyase activity by altering its expression, not its induction in Romaine lettuce (*Lactuca sativa*) tissue. *Physiologia Plantarum*, 123: 82-91.

42. CARRAO-PANIZZI, M. C. ; BELEIA, A. D. P. ; KITAMURA, K. ; OLIVEIRA, M. C. N. 1999. Effects of genetics and environment on isoflavone content of soybean from different regions of Brazil. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira*, 34(10): 1787-1795.
43. CASSIDY, A. ; BINGHAM, S. ; SETCHELL, K. 1995. Biological effects of isoflavonoids in young women: importance of the chemical composition of soybean products. *British Journal of Nutrition*, 74: 587-601.
44. CASTLE, E. P. and THRASHER, J. B. 2002. The role of soy phytoestrogens in prostate cancer. *Urol Clin North Am*, 29(1): 71-81, viii-ix.
45. CATSIMPOOLAS, N. 1967. A note on the proposal of an immunochemical system of reference and nomenclature for the major soybeans globulins. *Cereal Chemistry*, 46: 369-372.
46. CETIOM, 2005. Soja 2005. ed CETIOM. pp 21.
47. CHEN, A. M. ; ROGAN, W. J. 2004. Isoflavones in soy infant formula: A review of evidence for endocrine and other activity in infants. *Annual Review of Nutrition*, 24: 33-54.
48. CHEN, L. J. ; ZHAO, X. ; PLUMMER, S. ; TANG, J. ; GAMES, D. E. 2005. Quantitative determination and structural characterization of isoflavones in nutrition supplements by liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1082(1): 60-70.
49. CHIARI, L. ; NAOE, L. K. ; PIOVESAN, N. D. ; JOSÉ, I. C. ; CRUZ, C. D. ; MOREIRA, M. A. ; DE BARROS, E. G. 2006. Inheritance of isoflavone contents in soybean seeds. *Euphytica* 150(1-2): 141-147.
50. CHIARI, L. ; PIOVESAN, N. D. ; NAOE, L. K. ; JOSE, I. C. ; VIANA, J. M. S. ; MOREIRA, M. A. ; de BARROS, E. G. 2004. Genetic parameters relating isoflavone and protein content in soybean seeds. *Euphytica*, 138(1): 55-60.
51. CHO, M. J. ; HARPER, J. E. 1991. Root isoflavonoid response to grafting between wild-type and nodulation-mutant soybean plants. *Plant Physiology*, 96: 1277-1282.
52. CLARKSON, T. B. 2002. Soy, soy phytoestrogens and cardiovascular disease. *Journal of Nutrition*, 132(3): 566-569.
53. CROUSE, J. R ; MORGAN, T. ; TERRY, J. G. ; ELLIS, J. ; VITOLINS, M. ; BURKE, G. L. 1999. A randomised trial comparing the effect of casein with that of soy protein containing varying amounts of isoflavones on plasma concentrations of lipids and lipoproteins. *Archives of Internal Medicine*, 159: 2070-2076.
54. CULLIMORE, J. V. ; RANJEVA, R. ; BONO, J. 2001. Perception of lipo-chitooligosaccharidic Nod factors in legumes. *Trends in Plant Sciences*, 6: 24-30.
55. DANG, Z. C. and LOWIK, C. 2005. Dose-dependent effects of phytoestrogens on bone. *Trends in Endocrinology and Metabolism* 16(5): 207-213.
56. DAYDÉ, J. ; BERGER, M. ; THEODOROU, V. (2004). Screening and breeding soybeans for isoflavone content and composition, Proceedings VII World Soybean Research Conference, IV International Soybean Processing and Utilization Conference, III Congresso Brasileiro de Soja, Feb. 29 – March 5, Foz do Iguassu, PR, Brasil. pp. 845-851.

57. DAYDÉ, J. ; BERGER, M. ; THEODOROU, V. 2002. Variation of soybean isoflavones content and composition. Proceedings of CISCE 2002 (*China and international soybean conference and exhibition 2002*), November 6-9, Beijing, China. pp. 361-362
58. DAYDÉ, J. and LACOMBE, S. 1999. Amélioration variétale du soja pour la valorisation de ses protéines en alimentation humaine. *Oléagineux, Corps Gras, Lipides* 6, (6): 509-512.
59. DAYDÉ, J. and LACOMBE, S. 2000. Variation of isoflavone content and composition in soybean seeds and related products. Proceedings. *Dawn of the Innovative Era for Soybeans - Proceedings of the Third International Soybean Processing and Utilisation Conference* - October 15-20. Tsukuba, Ibaraki, Japan, pp. 55-58.
60. DAYDÉ, J. 1989. Contribution à l'amélioration génétique du soja (*Glycine max (L.) Merrill*) par la création de variétés semi-déterminées ou déterminées. *Thèse - Biologie et technologie Végétale, option Amélioration des Plante*. Institut National Polytechnique. Toulouse. pp 134.
61. DE BOEVER, P. ; DEPLANCKE, B. ; VERSTRAETE, W. 2000. Fermentation by gut microbiota cultured in a simulator of the human intestinal microbial ecosystem is improved by supplementing a soygerm powder. *Journal of Nutrition* 130(10): 2599-2606.
62. DE BOEVER, P. ; WOUTERS, R. ; VERSTRAETE, W. 2001. Combined use of *Lactobacillus reuteri* and soygerm powder as food supplement. *Letters in Applied Microbiology* 33(6): 420-424.
63. DE KLEIJN, M. J. J. ; VAN DER SCHOUW, Y. T. ; WILSON, P. W. F. ; ADLERCREUTZ, H. ; MAZUR, W. ; GROBBEE, D. E. ; JACQUES, P. F. 2001. Intake of dietary phytoestrogens is low in postmenopausal women in the United States: The Framingham Study. *Journal of Nutrition*, 131(6): 1826-1832.
64. DE KLEIJN, M. J. J. ; VAN DER SCHOUW, Y. T. ; WILSON, P. W. F. ; GROBBEE, D. E. ; JACQUES, P. F. 2002. Dietary intake of phytoestrogens is associated with a favourable metabolic cardiovascular risk profile in postmenopausal US women: The Framingham Study. *Journal of Nutrition*, 132(2): 276-282.
65. DE TOLEDO, J. F. F. ; DE CARVALHO, C. G. P. ; ARIAS, C. A. A. ; DE ALMEIDA, L. A. ; BROGIN, R. L. ; DE OLIVEIRA, M. F. ; MOREIRA, J. U. V. ; RIBEIRO, A. S. ; HIROMOTO, D. M. 2006. Genotype and environment interaction on soybean yield in Mato Grosso State, Brazil. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 41: 785-791.
66. DEMAISON, L. and MOREAU, D. 2002. Dietary n-3 polyunsaturated fatty acids and coronary heart disease-related mortality: a possible mechanism of action. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 59: 463-477.
67. DHAUBHADEL, S. ; GIJZEN, M. ; MOY, P. ; FARHANGKHOEE, M. 2007. Transcriptome analysis reveals a critical role of CHS7 and CHS8 genes for isoflavonoid synthesis in soybean seeds. *Plant Physiology*, 143(1): 326-338.
68. DHAUBHADEL, S. ; MCGARVEY, B. D. ; WILLIAMS, R. ; GIJZEN, M. 2003. Isoflavonoid biosynthesis and accumulation in developing soybean seeds. *Plant Molecular Biology*, 53(6): 733-743.

69. DIXON, R. A. ; ACHNINE, L. ; KOTA, P. ; LIU, C. J. ; REDDY, M. S. S. ; WANG, L. J. 2002. The phenylpropanoid pathway and plant defence - a genomics perspective. *Molecular Plant Pathology*, 3(5): 371-390.
70. DIXON, R. A. and FERREIRA, D. 2002. Genistein. *Phytochemistry*, 60(3): 205-211.
71. DIXON, R. A. and PAIVA, N. L. 1995. Stress-Induced Phenylpropanoid Metabolism. *Plant Cell*, 7(7): 1085-1097.
72. DIXON, R. A. and SUMNER, L. W. 2003. Legume natural products: Understanding and manipulating complex pathways for human and animal health. *Plant Physiology* 131(3): 878-885.
73. DONMA, M. M. and DONMA, O. 2005. Phytonutrients and children: The other side of the medallion. *Food Research International* 38(6): 681-692.
74. DORNBOS, D. L. ; MULLEN, R. E. ; SHIBLES, R. M. 1989. Drought stress effects during seed fill on soybean seed germination and vigour. *Crop Science*, 29: 476-480.
75. DORNBOS, D. L. and MULLEN, R. E. 1992. Soybean seed protein and oil contents and fatty acid composition adjustments by drought and temperature. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 69: 228-231.
76. DRAPIER-FAURE, E. ; CHANTRE, P. ; MARES, P. 2002. Effects of a standardized soy extract on hot flushes: a multicenter, double-blind, randomized, placebo-controlled study. *Menopause* 9(5): 329-334.
77. DUPUY, P.; SAUTIER, C. ; STIEVENARD, S. 1994. Le soja en alimentation humaine. *Cahiers de la Nutrition et de la Diététique*, XXIX: 47-53.
78. ECOCHARD, R. ; DENUC, M. ; AUSSEL, P. 1978. Développement plastique et productivité du soja: étude variétale. *Annuaire Amélioration des Plantes*, 28 : 4: 351-370.
79. EGLI, D. B. ; FRASER, J. ; LEGGETT, J. E. ; PONELEIT, C. G. 1981. Control of seed growth in soybeans. *Annals of Botany*, 48: 171-176.
80. EGLI, D. B. 1989. Seed growth and development in soybean. *In World soybean research conf. IV.* Buenos Aires, Argentina, 5-9 March 1989 pp. 256-261.
81. ELDRIDGE, A. C. and KWOLEK, W. F. 1983. Soybean isoflavones: effect of environment and variety on composition. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 31(2): 394-396.
82. ELMORE, R. W. ; EISENHAUER, D. E. ; SPECHT, J. E. ; WILLIAMS, J. H. 1988. Soybean yield and yield component response to limited capacity sprinkler irrigation systems. *Journal of Production Agriculture*, 1: 196-201.
83. ERDMAN, J. W. ; BADGER, T. M. ; LAMPE, J. W. ; SETCHELL, K. D. R. ; MESSINA, M. 2004. Not all soy products are created equal: Caution needed in interpretation of research results. *Journal of Nutrition*, 134(5): 1229-1233.
84. FAO/OMS, 2003. Les qualités nutritionnelles des soyfoods. [www.sojaxa.com](http://www.sojaxa.com). Site visité le 01 avril 2003.
85. FAVIER, J. C. ; IRELAND-RIPERT, J. ; TOQUE, C. ; FEINBERG, M. 1995. *Répertoire général des aliments - Table de composition. Deuxième édition*, ed. INRA-AFSSA-CIQUAL-TEC & DOC. pp 928.



86. FDA, 1999. Food labelling: Health claims; soy proteins and coronary heart disease. 21 CFR Part 101. *Federal Register*, 64: 57700-57733.
87. FEHR, W. R. and CAVINESS, C. E. 1977. *Stages of soybean development*. Iowa Agric. Home Econ. Exp. Stn., Iowa State: Ames, IA., Vol. 80. pp11.
88. FEHR, W. R. ; HOECK, J. A. ; JOHNSON, S. L. ; MURPHY, P. A. ; NOTT, J. D. ; PADILLA, G. I. ; WELKE, G. A. 2003. Genotype and environment influence on protein components of soybean. *Crop Science*, 43: 511-514.
89. FISHER, R. F. and LONG, S. R. 1993. Interactions of NodD at the *nod box*: NodD binds to two distinct sites on the same face of the helix and induces a bend in the DNA. *Journal of Molecular Biology*, 233: 336-348.
90. FITZPATRICK, M. 2000. Soy formulas and the effects of isoflavones on the thyroid. *New Zealand Medical Journal* 113(1103): 24-26.
91. FRANKE, A. A. ; HALM, B. M. ; HEBISHI, S. ; CUSTER, L. J. 2004. Presence of isoflavones in human milk-fed infants after mothers consume soy. *Journal of Nutrition* 134(5): 1246S-1246S.
92. GIAMPIETRO, P. G. ; BRUNO, G. ; FURCOLO, G. ; CASATI, A. ; BRUNETTI, E. ; SPADONI, G. L. ; GALLI, E. 2004. Soy protein formulas in children: No hormonal effects in long-term feeding. *Journal of Pediatric Endocrinology and Metabolism*, 17(2): 191-196.
93. GIOVANARDI, R. ; P. CECCON, FASAN. T. 1990. Risposta agronomica e fisiologica della soia a carenze idriche interessanti diverse fasi di sviluppo. II. Resa, sue componenti e aspetti qualitativi. *Rivista di Agronomia*, XXIV(2/3) : 218-227
94. GOLDBERG, R. B. ; DE PAIVA, G. ; YADEGARI, R. 1997. Plant embryogenesis: Zygote to seed. *Science*, 266(5185): 605-614.
95. GOLBERG, 2007. Site de l'Université de Californie – <http://estdb.biology.ucla.edu/seed/project#seed> « Gene Networks in seed development » visité le 2 Avril 2007
96. GRAHAM, M. Y. and GRAHAM, T. L. 1991. Rapid accumulation of anionic peroxidases and phenolic polymers in soybean cotyledon tissues following treatment with *Phytophthora megasperma* f. sp. *Glycinea* wall glucan. *Plant Physiology*, 97(4): 1445-1455.
97. GRAHAM, M. Y. and GRAHAM, T. L. 1994. Wound-associated competency factors are required for the proximal cell responses of soybean to the *Phytophthora sojae* wall glucan elicitor. *Plant Physiology*, 105(2): 571-578.
98. GRAHAM, T. L. and GRAHAM, M. Y. 1991. Glyceollin elicitors induce major but distinctly different shifts in isoflavonoid metabolism in proximal and distal soybean all populations. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 3: 157-166.
99. GRAHAM, T. L. ; GRAHAM, M. Y. 1996. Signaling in soybean phenylpropanoid responses. Dissection of primary, secondary, and conditioning effects of light, wounding, and elicitor treatments. *Plant Physiology*, 110(4): 1123-1133.
100. GRAHAM, T. L. 1991. Flavonoid and isoflavonoid distribution in developing soybean seedling tissues and in seed and root exudates. *Plant Physiology*, 95(2): 594-603.

101. GREENWALD, P. 2004. Clinical trials in cancer prevention: Current results and perspectives for the future. *Journal of Nutrition*, 134(12): 3507S-3512S.
102. GUEGUEN, J. ; ALANZA, J. L. 1985. Propriétés biochimiques et physicochimiques des protéines végétales. A-Composition et propriétés physicochimiques des protéines de légumineuses et d'oléagineux. In *Protéines végétales. Collection Sciences et Techniques Agro Alimentaires. Ed. Lavoisier. Apria.* p 135-159.
103. GURFINKEL, D. M. ; RAO, A. V. Soyasaponins: the relationship between chemical structure and colon anticarcinogenic activity. *Nutrition and Cancer*, 2003(47): 24-33.
104. GUTIERREZ-ZEPEDA, A. ; SANTELL, R. ; WU, Z. ; BROWN, M. ; WU, Y. ; KHAN, I. ; LINK, C. D. ; ZHAO, B. ; LUO, Y. 2005. Soy isoflavone glycitein protects against beta amyloid-induced toxicity and oxidative stress in transgenic *Caenorhabditis elegans*. *Biomed Central Neuroscience*, 6: 54.
105. HARTUNG, R.C. ; SPECHT, J. E. ; WILLIAMS, J.M. 1981. Modification of soybean plant architecture by genes for stem growth habit and maturity. *Crop Science*, 21: 51-56.
106. HILL, J. E. ; BREIDENBACH, R. W. 1974. Proteins of soybeans seeds. I. Isolation and characterization of the major components. *Plant Physiology*, 53: 742-746.
107. HODGSON, J. M. ; CROFT, K. D. ; PUDDEY, I. B. ; MORI, T. A. ; BEILIN, L. J. 1996. Soybean isoflavonoids and their metabolic products inhibit in vitro lipoprotein oxidation in serum. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 7(12): 664-669.
108. HOECK, J. A. ; FEHR, W. R. ; MURPHY, P. A. ; WELKE, G. A. 2000. Influence of genotype and environment on isoflavone contents of soybean. *Crop Science*, 40(1): 48-51.
109. HOEY, L. ; ROWLAND, I. R. ; LLOYD, A. S. ; CLARKE, D. B. ; WISEMAN, H. 2004. Influence of soya-based infant formula consumption on isoflavone and gut microflora metabolite concentrations in urine and on faecal microflora composition and metabolic activity in infants and children. *British Journal of Nutrition*, 91(4): 607-616.
110. HOWES, L. G. ; HOWES, J. B. ; KNIGHT, D. C. 2006. Isoflavone therapy for menopausal flushes: A systematic review and meta-analysis. *Maturitas* 55(3) 203-211.
111. HUBERT, J . PAUL, F. ; DAYDE, J. ; BERGER, M. 2006. Composition variability in soy-derived dietary supplements designated for menopausal symptom prevention. *Oleagineux, Corps Gras, Lipides* 13 (5): 352-362.
112. HUBERT, J.; BERGER, M.; DAYDE, J. 2005. Use of a simplified HPLC-UV Analysis for soyasaponin B determination: Study of saponin and isoflavone variability in soybean cultivars and soy-based health food products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53 (10): 3923-3930.
113. HUBERT, J. 2006. Caractérisation biochimique et propriétés biologiques des micronutriments du germe de soja – Etude des voies de sa valorisation en nutrition et santé humaines. *Thèse, Sciences Ecologiques, Vétérinaires, Agronomiques et Bioingénieries. Institut National Polytechnique, Toulouse.* pp173.

114. HUNTLEY, A. L. and ERNST, E. 2004. Soy for the treatment of perimenopausal symptoms - a systematic review. *Maturitas*, 47(1): 1-9.
115. HWANG, C. S. ; KWAK, H. S. ; LIMB, H. J. ; LEE, S. H. ; KANGA, Y. S. ; CHOEC, T. B. ; HURD, H. G. ; HAN, K. O. 2006. Isoflavone metabolites and their in vitro dual functions: They can act as an estrogenic agonist or antagonist depending on the estrogen concentration. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 101: 246-253.
116. HYMOWITZ, T. ; COLLINS, F. L. 1974. Variability of sugar content in seed of *G. max* and *G. soja*. *Agronomy Journal*, 66: 239-240.
117. IRVING, H. R. ; BOUKLI, N. M. ; KELLY, M. N. ; BROUGHTON, W. J. 2000. Nod-factors in symbiotic development of root hairs. In *Root Hairs: Cell and Molecular Biology*. Eds. R. W. Ridge and A. M. Emons. Springer, Tokyo, Japan. pp 241-265.
118. JANAS, K. M. ; CVIKROVA, M. ; PALAGIEWICZ, A. ; SZAFRANSKA, K. ; POSMYK, M. M. 2002. Constitutive elevated accumulation of phenylpropanoids in soybean roots at low temperature. *Plant Science*, 163(2): 369-373.
119. JACKSON, C. J. C. ; DINI, J. P. ; LAVANDIER, C. ; RUPASINGHE, H. P. V. ; FAULKNER, H. ; POYSA, V. ; BUZZELL, D. ; DEGRANDIS, S. 2002. Effects of processing on the content and composition of isoflavones during manufacturing of soy beverage and tofu. *Process Biochemistry*, 37(10): 1117-1123.
120. JUNG, W. S. ; YU, O. ; LAU, S. ; O'KEEFE, D. ; ODELL, J. ; FADER, G. ; Mc GONIGLE, B. 2000. Identification and expression of isoflavone synthase, the key enzyme for biosynthesis of isoflavones in legumes. *Nature Biotechnology*, 18: 208-212.
121. KARAM, F. ; MASAAD, R. ; SFEIR, T. ; MOUNZER, O. ; ROUPHAEL, Y. 2005. Evapotranspiration and seed yield of field grown soybean under deficit irrigation conditions. *Agricultural Water Management*, 75(3): 226-244.
122. KASSEM, M. A. ; MEKSEM, K. ; IQBAL, M. J. ; NJITI, V. N. ; BANZ, W. J. ; WINTERS, T. A. ; WOOD, A. ; LIGHTFOOT, D. A. 2004. Definition of Soybean Genomic Regions That Control Seed Phytoestrogen Amounts. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 1: 52-60.
123. KEUNG, W. M. 2003. Anti-dipsotropic isoflavones: the potential therapeutic agents for alcohol dependence. *Medicinal Research Reviews*, 23(6): 669-696.
124. KIM, H. ; PETERSON, T. G. ; BARNES, S. 1998. Mechanisms of action of the soy isoflavone genistein: emerging role for its effects via transforming growth factor beta signaling pathways. *American Journal of Clinical Nutrition*, 68(6): 1418S-1425S.
125. KIM, H. K. ; JANG, Y. H. ; BAEK, H. S. ; LEE, J. H. ; PARK, M. J. ; CHUNG, Y. S. ; CHUNG, J. I. ; KIM, J. K. 2005. Polymorphism and expression of isoflavone synthase genes from soybean cultivars. *Molecules and Cells*, 19(1): 67-73.
126. KIM, H. R. ; SONG, H. K. ; LEE, S. J. ; HAN, S. J. ; AHN, J. K. ; CHUNG, I. M. 2004. Response of soybean to elevated CO<sub>2</sub> concentrations and temperatures at two levels of nitrogen application. *Korean Journal of Crop Science*, 49: 73-81.

127. KIM, I-E and CHUNG I-M. 2007. Change in isoflavone concentration of soybean (*Glycine max* L.) seeds at different growth stages. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 87: 496-503.
128. KIM, J. A. ; HONG, S. B. ; JUNG, W. S. ; YU, C. Y. ; MA, K. H. ; GWAG, J. G. ; CHUNG, I. M. 2007. Comparison of isoflavones composition in seed, embryo, cotyledon and seed coat of cooked-with-rice and vegetable soybean (*Glycine max* L.) varieties. *Food Chemistry*, 102(3): 738-744.
129. KIM, S. H. ; JUNG, W. S. ; AHN, J. K. ; KIM, J. A. ; CHUNG, I. M. 2005. Quantitative analysis of the isoflavone content and biological growth of soybean (*Glycine max* L.) at elevated temperature, CO<sub>2</sub> level and N application. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 85: 2557-2566.
130. KIM, S-L ; BERHOW, M. A ; KIM J-T ; CHI, H-Y ; LEE, S-J ; CHUNG, I-M. 2006. Evaluation of soyasaponin, isoflavone, protein, lipid and free sugar accumulation in developing soybean seeds. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 54: 10003-10010.
131. KINJO, J. ; IMAGIRE, M. ; UDAYAMA, M. ; ARAO, T. ; NOHARA, T. 1998. Studies on the hepatoprotective drugs part 3 – Studies on the constituents of the leguminous plants part 56 – Structure-hepatoprotective relationships study of soyasaponins I-IV having soyasapogenol B as aglycone. *Planta Medica*, 64: 233-236.
132. KITAMURA, K. ; AGATE, K. ; KICHUCHI, A. ; KUDOU, S. ; OKUBO, K. 1991. Low isoflavone content in early maturing cultivars, so called summer-type soybean (*Glycine max* (L.) Merrill). *Japanese Journal of Breeding*, 41: 651-654.
133. KOBAYASHI, M. 2005. Immunological functions of soy sauce: hypoallergenicity and antiallergic activity of soy sauce. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 100(2): 144-51
134. KORTE, L. L. ; SPECHT, J. E. ; WILLIMAS, J. H. ; SORENSEN, R. C. 1983. Irrigation of soybean genotypes during reproductive ontogeny. II. Yield component responses. *Crop Science*, 23: 528-533.
135. KOSSLAK, R. M. ; BOOKLAND, R. ; BARKEI, J. ; PAARENN, H. ; APPELBAUM, E. R. 1987. Induction of *Bradyrhizobium japonicum* common nod genes by isoflavones isolated from *Glycine max*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 84: 7428-7432.
136. KRISHNAN, H. B. 2002. Evidence for accumulation of the beta-subunit of beta-conglycinin in soybean [*Glycine max* (L) Merr.] embryonic axes. *Plant Cell Reports*, 20(9): 869-875.
137. KUDOU, S. ; FLEURY Y. ; MAGNOTALO, D. ; UCHIDA, T. ; KITAMURA, K. ; OKUBO, K. 1991. Malonyl isoflavone glycosides in soybeans seeds (*Glycine max* (L) Merrill). *Agricultural and Biological Chemistry*, 55(9): 2227-2233.
138. KUO, T. M. ; LOWEL, C. A. ; SMITH, P. T. 1997. Changes in soluble carbohydrates and enzymic activities in maturing soybean seed tissues. *Plant Science*, 125(1): 1-11
139. LACOMBE, S. 2000. Variabilité de la teneur et de la composition en isoflavones de la graine de soja (*Glycine max* L. Merrill) et de ses dérivés alimentaires. *Thèse*, Science des Agro-ressources, Institut National Polytechnique, Toulouse. pp 179.
140. LASZTITY, R. ; HIDEVEGI, M. ; BATA, A. Saponins in food. 1998. *Food Reviews. International*, 14: 371-390.

141. LATUNDE-DADA, A. O. ; CABELLO-HURTADO, F. ; CZITTRICH, N. ; DIDIERJEAN, L. ; SCHOPFER, C. ; HERTKORN, N. ; WERCK-REICHHART, D. ; EBEL, J. 2001. Flavonoid 6-hydroxylase from soybean (*Glycine max* L.), a novel plant P-450 monooxygenase. *Journal of Biological Chemistry*, 276(3): 1688-1695.
142. LE DEUNFF, Y. ; RACHIDIAN, Z. 1988. Interruption of water delivery at physiological maturity is essential for seed development, germination and seedling growth in pea. *Journal of Experimental Botany*, 39: 1221-1230.
143. LEAF, A. ; KANG, J. ; XIAO, Y. ; BILLMAN, G. 1995. N-3 fatty acids in the prevention of cardiac arrhythmias. *Lipids*, 34: 187-189.
144. LEE, C. H. ; YANG, L. ; XU, J. Z. ; YEUNG, S. Y. V. ; HUANG, Y. ; CHEN, Z. Y. 2005. Relative antioxidant activity of soybean isoflavones and their glycosides. *Food Chemistry*, 90(4): 735-741.
145. LEE, S. ; AHN, J. ; KIM, S. ; KIM, J. ; HAN, S. ; JUNG, M. ; CHUNG, I. 2003 Variation in isoflavone of soybean cultivars with location and storage duration. *Journal of Agricultural and Food chemistry*, 51: 3382-3389.
146. LEE, S. J. ; YAN, W. K. ; AHN, J. K. ; CHUNG, I. M. 2003. Effects of year, site, genotype and their interactions on various soybean isoflavones. *Field Crops Research* 81(2-3): 181-192.
147. LEROUGE, P. ; ROCHE, P. ; FAUCHER, C. ; MAILLET, F. ; PROME, J. C. ; DENARIE, J. 1990. Symbiotic host-specific of *Rhizobium meliloti* is determined by on sulphated and acetylated glucosamine oligosaccharide signal. *Nature*, 344: 781-784.
148. LHUILLIER-SOUNDELE, A. ; MUNIER-JOLAIN, N. G. ; NEY, B. 1999. Dependence of seed nitrogen concentration on plant nitrogen availability during the seed filling in pea. *European Journal of Agronomy*, 11(2): 157-166.
149. LI, X. J. ; AN, P. ; ENEJI, A. E. ; HAMAMURA, K. ; LUX, A. ; INANAGA, S. 2005. Growth and yield responses of two soybean cultivars to defoliation and water stress. *Biologia*, 60: 467-472.
150. LIN, Y. G. ; MEIJER, G. W. ; VERMEER, M. A. ; TRAUTWEIN, E. A. 2004. Soy protein enhances the cholesterol-lowering effect of plant sterol esters in cholesterol-fed hamsters. *Journal of Nutrition*, 134: 143-148.
151. LOZOVAYA, V. V. ; LYGIN, A. V. ; ULANOV, A. V. ; NELSON, R. L. ; DAYDE, J. ; WIDHOLM, J. M. 2005. Effect of temperature and soil moisture status during seed development on soybean seed isoflavone concentration and composition. 2005. *Crop Science*, 45 (5): 1934-1940.
152. LOZOVAYA, V. V. ; LYGIN, A. V. ; ZERNOVA, O. V. ; LI, S. X. ; HARTMAN, G. L. ; WIDHOLM, J. M. 2004. Isoflavonoid accumulation in soybean hairy roots upon treatment with *Fusarium solani*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 42(7-8): 671-679.
153. MAC, L. and DALLIMORE, J. 1995. Dietary canola oil modifies myocardial fatty acids and inhibits cardiac arrhythmias in rats. *Journal of Nutrition*, 125: 1003-1009.
154. MACKOVA, Z. ; KOBLOVSKA, R. ; LAPCIK, O. 2006. Distribution of isoflavonoids in non - leguminous taxa - An update. *Phytochemistry*, 67: 849-855.

155. MANACH, C. ; WILLIAMSON, G. ; MORAND, C. ; SCALBERT, A. ; REMESY, C. 2005. Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. *American Journal of Clinical Nutrition*, 81(1): 230-242.
156. MARTIN, A. 2001. Les apports nutritionnels conseillés pour la population in *Traité de nutrition clinique de l'adulte*. Basdevant A., Laville. M.; Lerebours, E. *Edition Médecine Sciences Flammarion*. 2001. 26: 265-281.
157. MEKSEM, K. ; NJITI, V. N. ; BANZ, W. J. ; IQBAL, M. J. ; KASSEM, M. M. ; HYTEN, D. L. ; YUANG, J. ; WINTERS, T. A. ; LIGHTFOOT, D. A. 2001. Genomic regions that underlies soybean seed isoflavone content. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 1(1): 38-45.
158. MENDEZ, M. A. ; ANTHONY, M. S. ; ARAB, L. 2002. Soy-based formulae and infant growth and development: A review. *Journal of Nutrition*, 132(8): 2127-2130.
159. MENGISTU, A., HEATHERLY, L. G. 2006. Planting date, irrigation, maturity group, year, and environment effects on *Phomopsis longicolla*, seed germination, and seed health rating of soybean in the early soybean production system of the mid southern USA. *Crop Protection*, 25: 310-317.
160. MESSINA, M. J. 1999. Legumes and soybeans: overview of their nutritional profiles and health effects. *American Journal of Clinical Nutrition*, 70(3 Suppl): 439-450.
161. MESSINA, M. J. 2003. Emerging evidence on the role of soy in reducing prostate cancer risk. *Nutrition Reviews*, 61(4): 117-131.
162. MIKLASHEVICH, E.; ROHRIG, H.; SCHELL, J. ; SCHMIDT, J. 2001. Perception and signal transduction of rhizobial Nod factors. *Critical Reviews in Plant Science*, 20: 373-394.
163. MINGEAU, M. 1975. Étude de la sensibilité du soja à la sécheresse. *Info Tech CETIOM*, 47: 1-14.
164. MOLTENI, A. ; BRIZIO-MOLTENI, L. ; PERSKY, V. 1995. In Vitro Hormonal Effects of Soybean Isoflavones. *Journal of Nutrition*, 125(3 Suppl): 751-756.
165. MOMEN, N. N. ; CARLSON, R. E. ; SHAW, R. H. ; ARJMAND, O. 1979. Moisture stress effects on the yield components of two soybean cultivars. *Agronomy Journal*, 71: 86-90.
166. MORANDI, E. N. ; BODERRO, M. L. ; MARTIGONE, R. A. ; QUIJANO, A. 1994. Sowing date and irrigation effects on soybean dry matter partitioning and yield in the southern Santa Fe area of Argentina. *In World soybean research conference Vn 20-26 February 1994. Thaïlande*.
167. MORANDI, S. ; D'AGOSTINA, A. ; FERRARIO, F. ; ARNOLDI, A. 2005. Isoflavone content of Italian soy food products and daily intakes of some specific classes of consumers. *European Food Research and Technology*, 221(1-2): 84-91.
168. MORI, K. ; SUGAYA, S. ; GEMMA, H. 2005. Decreased anthocyanin biosynthesis in grape berries grown under elevated night temperature condition. *Scientia Horticulturae*, 105(3): 319-330.
169. MORI, T. ; MARUYAMA, N. ; NISHIZAWA, K. ; HIGASA, T. ; YAGASAKI, K. ; ISHIMOTO, M. ; UTSUMI, S. 2004. The composition of newly synthesized proteins in the endoplasmic reticulum determines the transport pathways of soybean seed storage proteins. *Plant Journal*, 40(2): 238-249.

170. MURPHY, P. A. (2004). Isoflavones in soybean processing, *Nutritionally Enhanced Edible Oil and Oilseed Processing*, ed Dunford N.T. and Dunford H.B. AOCS, Champaign, IL. pp. 38-70
171. MURPHY, P. A. ; CHEN, H. ; HAUCK, C. C. ; WILSON, L. A. 1997. Soybean protein composition and tofu quality. *Food Technology*, 51: 86-88, 110.
172. MURPHY, P. A. ; SONG, T. ; BUSEMAN, G. ; BARUA, K. ; BEECHER, G. R. ; TRAINER, D. ; HOLDEN, J. 1999. Isoflavones in retail and institutional soy foods. *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, 47(7): 2697-2704.
173. NAHAS, E. P. ; NETO, J. N. ; DE LUCA, L. ; TRAIMAN, P. ; PONTES, A. ; DALBEN, I. 2004. Benefits of soy germ isoflavones in postmenopausal women with contraindication for conventional hormone replacement therapy. *Maturitas*, 48(4): 372-380.
174. NEY, B. ; DUTHION, C. ; FONTAINE, E. 1993. Timing of reproductive abortions in relation to cell division, water content, and growth of pea seeds. *Crop Science*, 33: 267-270.
175. NURMI, T. ; MAZUR, W. ; HEINONEN, S. ; KOKKONEN, J. ; ADLERCREUTZ, H. 2002. Isoflavone content of the soy based supplements. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 28(1): 1-11.
176. OBENDORF, R. L. ; HORBOWICZ, M. ; DICKERMAN, A. M. ; BRENAC, P. ; SMITH, M. E. 1998. Soluble oligosaccharides and galactosyl cyclitols in maturing soybean seeds *in planta* and *in vitro*. *Crop Science*, 38(1): 78-84.
177. O'HARA, P. ; SLABAS, A. R. ; FAWCETT, T. 2002. Fatty acid and lipid biosynthetic genes are expressed at constant molar ratios but different absolute levels during embryogenesis. *Plant Physiology*, 129(1): 310-320.
178. OKUBO, K.; LIJIMA, M.; KBAYASHI, Y.; YOSHIKOSHI, M.; UCHIDA, T. ; KUDOU, S. 1992. Components responsible for the undesirable taste of soybean seeds. *Biosciences, Biotechnology and Biochemistry*, 56(1): 99- 103.
179. OSBOURN, A. E. 1996. Saponins and plant defence – a soap story. *Trends in Plant Science*, 1: 4-9.
180. OTEGUI, M. S. ; CAPP, R. ; STAEHELIN, L. A. 2002. Developing seed of Arabidopsis store different minerals in two types of vacuoles and in the endoplasmic reticulum. *The Plant Cell*, 14: 1311-1327.
181. PARK, D.S. ; LANDINI, S. ; GRAHAM, M. Y. ; GRAHAM, T. L. 2002. Induced distal defence potentiation against *Phytophthora sojae* in soybean. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 60: 293-310.
182. PENOTTI, M. ; FABIO, E. ; MODENA, A. B. ; RINALDI, M. ; OMEDEI, U. ; VIGANO, P. 2003. Effect of soy-derived isoflavones on hot flushes, endometrial thickness, and the pulsatility index of the uterine and cerebral arteries. *Fertility and Sterility*, 79(5): 1112-1117.
183. PEREZ-GRAU, L. ; GOLDBERG, R. B. 1989. Soybean Seed Protein Genes Are Regulated Spatially during Embryogenesis. *The Plant Cell*, 1: 1095-1109.
184. PERRET, X. ; STAEHELIN, C. ; BROUGHTON, W. J. 2000. Molecular basis of symbiotic promiscuity. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 64: 180-201.

185. PETERS, D. B. ; PENDLETON, J. W. ; HAGEMAN, R. H.; BROWN, C. M. 1971. Effect of night air temperature on grain yield of corn, wheat and soybean. *Agronomy Journal*, 63:(5) 809.
186. PIGEAIRE, A. 1984. Elaboration des composantes du rendement chez le soja de type indéterminé (cv. Hodgson et cv. Kingsoy). *Thèse*, Institut National Polytechnique, Toulouse.
187. PIGEAIRE, A.; SEBILLOTTE, M.; BLANCHET, R. 1988. Water stress in indeterminate soybeans: no critical stage in fruit development. *Agronomie*, 8 (10): 881-888.
188. PIPER, E. L. and BOOTE, K. L. 1999. Temperature and cultivar effects on soybean seed oil and protein concentrations. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 76(10): 1233-1241.
189. PIVA, G. 2001. Maîtrise de la qualité biochimique de la graine pour deux légumineuses: soja, haricot: impact des conditions de culture et des choix génotypiques. *Thèse*, Sciences des Procédés. Option Elaboration des Agro-ressources. Institut National Polytechnique, Toulouse.
190. PLANCHON, C. 1980. Photosynthèse et sélection. *Le sélectionneur français*, 28: 7-19.
191. PLEITE, R. ; PIKE, M. J. ; GARCES, R. ; MARTINEZ-FORCE, E. ; RAWSTHORNE, S. 2005. The sources of carbon and reducing power for fatty acid synthesis in the heterotrophic plastids of developing sunflower (*Helianthus annuus* L.) embryos. *Journal of Experimental Botany*, 56(415): 1297-1303.
192. POSMYK, M. M. ; BAILLY, C. ; SZAFRANSKA, K. ; JANAS, K. M. ; CORBINEAU, F. 2005. Antioxidant enzymes and isoflavonoids in chilled soybean [*Glycine max* (L.) Merr.] seedlings. *Journal of Plant Physiology*, 162: 403-412.
193. PRIMOMO, V. S. ; POYSA, V. ; ABLETT, G. R. ; JACKSON, C. J. ; GIJZEN, M. ; RAJCAN, I. 2005a. Mapping QTL for individual and total isoflavone content in soybean seeds. *Crop Science*, 45(6): 2454-2464.
194. PRIMOMO, V. S. ; POYSA, V. ; ABLETT, G. R. ; JACKSON, C. J. ; RAJCAN, I. 2005b. Agronomic performance of recombinant inbred line populations segregating for isoflavone content in soybean seeds. *Crop Science*, 45(6): 2203-2211.
195. PUEPPKE, S. G. ; BOLANOS-VASQUEZ, M. C. ; WERNER, D. ; BEC-FERTE, M. P. ; PROME, J. C. ; KRISHNAN, H. B. 1998. Release of flavonoids by the soybean cultivars McCall and Peking and their perception as signals by the nitrogen-fixing symbiont *Sinorhizobium fredii*. *Plant Physiology*, 117(2): 599-608.
196. RABOY, V. and DICKINSON, D. B. 1987. The timing and rate of phytic acid accumulation in developing soybean seeds. *Plant Physiology*, 85: 841-844.
197. RABOY, V. ; GERBASI, P.F. ; YOUNG, K. A. ; STONEBERG, S.D. ; PICKETT, S. G. ; BAUMAN, A. T. ; MURTHY, P.P.N. ; SHERIDAN, W.F. ; ERTL, D. S. 2000. Origin and seed phenotype of maize low phytic acid 1-1 and low phytic acid 2-1. *Plant Physiology*, 124: 355-368.
198. RAFII, F. ; DAVIS, C. ; PARK, M. ; HEINZE, T. M. ; BEGER, R. D. 2003. Variations in metabolism of the soy isoflavonoid daidzein by human intestinal microfloras from different individuals. *Archives of Microbiology*, 180(1): 11-16



199. RASOLOHERY, C. A. ; BERGER, M. ; LYGIN, A. V. ; LOZOVAYA, V. V. ; NELSON, R. L. ; DAYDÉ, J. 2007. Effect of temperature and water availability during late maturation of the soybean seed on germ and cotyledon isoflavone content and composition. *Journal of Science Of Food and Agriculture* (Accepted for publication.)
200. ROMANI, A. ; VIGNOLINI, P. ; GALARDI, C. ; AROLDI, C. ; VAZZANA, C. ; HEIMLER, D. 2003. Polyphenolic content in different plant parts of soy cultivars grown under natural conditions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51: 5301-5306.
201. ROUMET, P. 1988. Effets de densités croissants sur la productivité de différents genotypes de soja [*Glycine max* (L.)] liens avec la morphologie de la plante. *Thèse. Physiologie et Biologie des organismes et des populations. Montpellier.*
202. RUUSKA, S. A. ; SCHWENDER, J. ; OHLROGGE, J. B. 2004. The capacity of green oilseeds to utilize photosynthesis to drive biosynthetic processes. *Plant Physiology*, 136(1): 2700-2709.
203. SALINGUES, F. 2003. Les isoflavones. Déterminisme génétique de la teneur et de la composition de la graine de soja (*Glycine max* L. Merr). *Mémoire d'ingénieur, Laboratoire d'agrophysiologie, Ecole d'Ingénieurs Purpan, Toulouse.* pp 108.
204. SARKAR, F. H. and LI, Y. W. 2003. Soy isoflavones and cancer prevention. *Cancer Investigation*, 21(5): 744-757.
205. SARKAR, F. H. and LI, Y. W. 2004. The role of isoflavones in cancer chemoprevention. *Frontiers in Bioscience*, 9: 2714-2724.
206. SATTIN, M. ; MERLO, D. ; MOSCA, G., 1987. Effect of applied nitrogen on soybean growth and yield. *Eurosoya*, 6: 15-21.
207. SCHIJLEN, E. G. W. ; DE VOS, C. H. R. ; VAN TUNEN, A. J. ; BOVY, A. G. 2004. Modification of flavonoid biosynthesis in crop plants. *Phytochemistry*, 65(19): 2631-2648.
208. SCHRYVER, T. 2002. Increasing health benefits using soy germ. *Cereal Foods World*, 47(5): 185-188.
209. SCHULTZE, M. ; QUICLET-SIRE, B. ; KONDOROSI, E. ; VIRELIZIER, H. ; GLUSHKA, J. N. ; ENDRE, G. ; GERO, S. D. ; KONDOROSI, A. 1992. *Rhizobium meliloti* produces a family of sulfated lipooligosaccharides exhibiting different degrees of plant host specificity. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 89: 192-196.
210. SEGUIN, P. ; ZHENG, W. J. ; SMITH, D. L. ; DENG, W. H. 2004. Isoflavone content of soybean cultivars grown in eastern Canada. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 84(11): 1327-1332.
211. SENSIAU, E. 2002. Etude des teneurs et des compositions en isoflavones de graines de soja issues d'une collection variétale. *Rapport de stage, Laboratoire d'agrophysiologie, Ecole d'Ingénieurs Purpan, Toulouse.* pp 23.
212. SETCHELL, K. D. ; ZIMMER-NECHEMIAS, L. ; CAI, J. ; HEUBI, J. E. 1998. Isoflavone content of infant formulas and the metabolic fate of these phytoestrogens in early life. *American Journal of Clinical Nutrition*, 68(6 Suppl): 1453S-1461S.

213. SETCHELL, K. D. 1998. Phytoestrogens: the biochemistry, physiology, and implications for human health of soy isoflavones. *American Journal of Clinical Nutrition*, 68(6 Suppl): 1333-1346.
214. SETCHELL, K. D. R and CASSIDY, A. 1999. Dietary isoflavones: biological effects and relevance to human health. *Journal of Nutrition*, 129: 758-767.
215. SETCHELL, K. D. R. ; BROWN, N. M. ; DESAI, P. ; ZIMMERNECHEMIAS, L. ; WOLFE, B. E. ; BRASHEAR, W. T. ; KIRSCHNER, A. S. ; CASSIDY, A. ; HEUBI, J. E. 2001. Bioavailability of pure isoflavones in healthy humans and analysis of commercial soy isoflavone supplements. *Journal of Nutrition* 131: 1362S-1375S.
216. SETCHELL, K. D. R. and COLE, S. J. 2003. Variations in isoflavone levels in soy foods and soy protein isolates and issues related to isoflavone databases and food labeling. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(14): 4146-4155.
217. SETCHELL, K. D. R. ; LYDEKING-OLSEN, E. 2003. Dietary phytoestrogens and their effect on bone: evidence from in vitro and in vivo, human observational, and dietary intervention studies. *American Journal of Clinical Nutrition*, 78(3): 593-609.
218. SHIMOYAMADA, M. 2003. Food functionality through the interactions among soybean constituents. *Journal of the Japanese Society for Food Science and Technology-Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi*, 50(10): 445-450.
219. SHIRAIWA, M. ; HARADA, K. ; OKUBO, K. 1991. Composition and structure of "Group B Saponin" in soybean seed. *Agricultural and Biological Chemistry*, 55: 911-917.
220. SIDHU G. S. and OAKENFULL D. G. 1986. A mechanism for the hypocholesterolemic activity of saponins. *British Journal of Nutrition*, 55: 643-649.
221. SILBERNAGL, S. and DESPOPOULOS, A. Nutrition et digestion in Atlas de Poche de Physiologie 2ème édition française. 1992. *Edts Médecine Sciences Flammarion*. 218-220.
222. SINGH, R. P. and AGARWAL, R. 2005. Prostate cancer and inositol hexaphosphate: Efficacy and mechanisms. *Anticancer Research*, 25(4): 2891-2903.
223. SIONIT, K. and KRAMER, P. J. 1977. Effect of water stress during different stages of growth of soybean. *Agronomy Journal*, 69: 274-278.
224. SIRTORI, C. R. ; ARNOLDI, A. ; JOHNSON, S. K. 2005. Phytoestrogens: End of a tale? *Annals of Medicine*, 37(6): 423-438.
225. SLOANE, R. J. ; PATTERSON, R. P. ; CARTER, T. E. 1990. Field drought tolerance of a soybean plant introduction. *Crop Science*, 30: 118-123.
226. SMITH, J. R. and NELSON, R. L. 1987. Predicting yield from early generation estimates of reproductive growth periods in soybeans. *Crop Science*, 27: 471-474.
227. SNYDER, H. E. and KWON, T. W. 1987. Morphology and composition. In soybean utilization. *Ed. van Nostrand Reinhold Company New York*. p 19-70.
228. SOLTNER, S., 1999. Les grandes productions végétales. *Editions Sciences et Techniques Agricoles*, 19ème éditions, Angers, 309-314.

229. SONG, T. T. ; BARUA, K. ; BUSEMAN, G. ; MURPHY, P. A. 1998. Soy isoflavone analysis: quality control and a new internal standard. *American Journal of Clinical Nutrition*, 68(6): 1474S-1479S.
230. SUBRAMANIAN, S. ; GRAHAM, M. Y. ; YU, O. ; GRAHAM, T. L. 2005. RNA interference of soybean isoflavone synthase genes leads to silencing in tissues distal to the transformation site and to enhanced susceptibility to *Phytophthora sojae*. *Plant Physiology*, 137(4): 1345-1353.
231. SUBRAMANIAN, S. ; STACEY, G. ; YU, O. 2006. Endogenous isoflavones are essential for the establishment of symbiosis between soybean and *Bradyrhizobium japonicum*. *Plant journal*, 48(2): 261-273.
232. SUBRAMANIAN, S. ; XU, L. ; LU, G. ; ODELL, J. ; YU, O. 2004. The promoters of isoflavone synthase genes respond differentially to nodulation and defense signals in transgenic soybean roots. *Plant Molecular Biology*, 54: 623-639.
233. SUC, S. 1993. Amélioration génétique de la teneur en protéines du soja [*Glycine max* (L.) Merrill]. *Thèse. Biotechnologie et Amélioration des plantes*. Institut National Polytechnique, Toulouse. pp.124.
234. SUTHERLAND, T. D.; BASSAM, B. J.; SCHULLER, L. J.; GRESSHOLF, P. M. 1990. Early nodulation signals of the wild type and symbiotic mutants of soybean (*Glycine max*). *Molecular Plant-Microbe Interaction*, 3: 122-128.
235. TEEDE, H. J. ; MCGRATH, B. P. ; DESILVA, L. ; CEHUN, M. ; FASSOULAKIS, A. ; NESTEL, P. J. 2003. Isoflavones reduce arterial stiffness - A placebo-controlled study in men and postmenopausal women. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology*, 23(6): 1066-1071.
236. TEZUKA, M. ; TIARA, H. ; IGARASHI, Y. ; YAGASAKI, K. ; ONO, T. 2000. Properties of tofus and soy milks prepared from soybean having different subunits of glycinin. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 49: 729-735.
237. THANH, V. H. and SHIBASAKI, K. 1976. Major protein of soybean seeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 24: 1117-1121.
238. THIS, P. ; DE LA ROCHEFORDIERE, A. ; CLOUGH, K. ; FOURQUET, A. ; MAGDELENAT, H. 2001. Phytoestrogens after breast cancer. *Endocr Relat Cancer*, 8(2): 129-34.
239. THOMAS, A. L. and COSTA, J. A. 1994. Influence of water deficits on soybean development and yield. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 29(9): 1389-1396.
240. TODAKA, E. ; SAKURAI, K. ; FUKATA, H. ; MIYAGAWA, H. ; UZUKI, M. ; OMORI, M. ; OSADA, H. ; IKEZUKI, Y. ; TSUTSUMI, O. ; IGUCHI, T. ; MORI, C. 2005. Fetal exposure to phytoestrogens - The difference in phytoestrogen status between mother and fetus. *Environmental Research*, 99(2): 195-203.
241. TSANGALIS, D. ; ASHTON, J. F. ; STOJANOVSKA, L. ; WILCOX, G. ; SHAH, N. P. 2004. Development of an isoflavone aglycone-enriched soymilk using soy germ, soy protein isolate and bifidobacteria. *Food Research International*, 37(4) 301-312.
242. TSUKAMOTO, C. ; SHIMADA, S. ; IGITA, K. ; KUDOU, S. ; OKUBO, K. ; KITAMURA, K. 1995. Factors affecting isoflavone content in soybean seeds: changes in isoflavones, saponins, and

- composition of fatty acids at different temperatures during seed development. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43 (5): 1184-1192.
243. VERBRUGGEN, M. A. 2001. Analysis of isoflavones - Results of a ring test in Pfannhauser, W., Fenwick, G. R. and Khokhar, S. (Eds), *Biologically-Active Phytochemicals in Food*, pp. 167-167.
  244. VIDAL, A. and ASTRUC, C. 1984. Etude comparative de la croissance et du développement de quelques variétés de soja. *Eurosoya*, 2: 39-46.
  245. VYN, T. J. ; YIN, X. H. ; BRUULSEMA, T. W. ; JACKSON, C. J. C. ; RAJCAN, I. ; BROUDER, S. M. 2002. Potassium fertilization effects on isoflavone concentrations in soybean *Glycine max* (L.) Merr. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(12): 3501-3506.
  246. WANG, C. Y. ; SHERRARD, M. ; PAGADALA, S. ; WIXON, R. ; SCOTT, R. A. 2000. Isoflavone content among maturity group 0 to II soybeans. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 77(5): 483-487.
  247. WANG, H. J. and MURPHY, P. A. 1994. Isoflavone composition of American and Japanese soybean in Iowa: effects of variety, crop year, and location. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42: 1674-1677.
  248. WAREMBOURG, F. R. and FERNANDEZ, M. P. 1985. Distribution and remobilization of symbiotically fixed nitrogen in soybean (*Glycine max*). *Physiologia Plantarum*, 65: 281-286.
  249. WEBER, H. ; BORISJUK, L. ; WOBUS, U. 2005. Molecular Physiology of Legume Seed Development. *Annual Review of Plant Biology*, 56: 253-259.
  250. WEGULO, S. N. ; YANG, X. B. ; MARTINSON, C. A. ; MURPHY, P. A. 2005. Effects of wounding and inoculation with *Sclerotinia sclerotiorum* on isoflavones concentrations in soybean. *Canadian Journal of plant science*, 85: 749-760.
  251. WELLE, R. and GRISEBACH, H. 1988. Isolation of a novel NADPH-dependent reductase which coacts with chalcone synthase in the biosynthesis of 6'-deoxychalcone. *FEBS Letters*, 236: 221-225.
  252. WESELAKE, R. J. 2000. Lipid biosynthesis in cultures of oilseed rape. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 36(5): 338-348
  253. WHITTEN, P. L. and NAFTOLIN, F. 1998. Reproductive actions of phytoestrogens. *Baillieres Clinical Endocrinology and Metabolis*, 12(4): 667-690.
  254. WILLIAMSON, G. and MANACH, C. 2005. Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. II. Review of 93 intervention studies. *American Journal of Clinical Nutrition*, 81(1): 243-255.
  255. WILSON, R. 1987. Seed metabolism. In WILCOX J. R. (ed.) *Soybeans: Improvement, production, and uses*. ASA, CSSA, and SSSA, Madison WI. pp 643-686
  256. WINKEL-SHIRLEY, B. 2001. Flavonoid biosynthesis. A colorful model for genetics, biochemistry, cell biology and biotechnology. *Plant Physiology*, 126: 485-483.
  257. YAMKA, R. M. ; HARMON, D. L. ; SCHOENHERR, W. D. ; KHOO, C. ; GROSS, K. L. ; DAVIDSON, S. J. ; JOSHI, D. K. 2006. In vivo measurement of flatulence and nutrient digestibility in dogs fed poultry by-product meal, conventional soybean meal, and low-

- oligosaccharide low-phytate soybean meal. *American Journal of veterinary research*, 67 (1): 88-94.
258. YAN, L. and SPITZNAGEL, E. L. 2005. Meta-analysis of soy food and risk of prostate cancer in men. *International Journal of Cancer*, 117(4): 667-669.
259. YE, Y. B. ; SU, Y. X. ; VERBRUGGEN, M. 2004a. The effect of soy germ isoflavone extract on serum lipids in postmenopausal women. *Journal of Nutrition*, 134(5): 1268S-1268S.
260. YE, Y. B. ; SU, Y. X. ; VERBRUGGEN, M. 2004b. A prospective clinical trial of soy germ isoflavone extract attenuating bone loss in postmenopausal women. *Journal of Nutrition*, 134(5): 1243S-1243S
261. YU, O. ; SHI, J. ; HESSION, A. O. ; MAXWELL, C. A. ; MCGONIGLE, B. ; ODELL, J. T. 2003. Metabolic engineering to increase isoflavone biosynthesis in soybean seed. *Phytochemistry*, 63(7): 753-763.
262. ZAWOZNIK, M. S. and TOMARO, M. S. 2005. Effect of chlorimuron-ethyl on *Bradyrhizobium japonicum* and its symbiosis with soybean. *Pest Management Science*, 61: 1003-1008.
263. ZHANG, F. and SMITH, D. L. 1996. Inoculation of soybean [*Glycine max* (L.) Merr.] with genistein-preincubated *Bradyrhizobium japonicum* or genistein directly applied into soil and soybean protein and dry matter yield under short season conditions. *Plant and Soil*, 179: 233-241.
264. ZHANG, F. and SMITH, D. L. 1997. Application of genistein to inoculate and soil to overcome low spring soil temperature inhibition of soybean nodulation and nitrogen fixation. *Plant and Soil*, 192: 141-151.
265. ZHENG, S. H. ; NAKAMOTO, H. ; YOSHIKAWA, K. ; FURUYA, T. ; FUKUYAMA, M. 2002. Influences of high night temperature on flowering and pod setting in soybean. *Plant Production Sciences*, 5 (3): 215-218
266. ZLOTKIN, S. 2006. A critical assessment of the upper intake levels for infants and children. *Journal of Nutrition*, 136(2): 502S-506S.

# TABLE DES MATIERES

|                                                                                                             |           |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>Sommaire .....</b>                                                                                       | <b>6</b>  |
| <b>Introduction Générale.....</b>                                                                           | <b>8</b>  |
| <b>Chapitre I Éléments Bibliographiques et Problématique .....</b>                                          | <b>12</b> |
| 1. LE SOJA, LA PLANTE ET SA CULTURE .....                                                                   | 13        |
| 1.1. Description générale .....                                                                             | 13        |
| 1.2. Développement et croissance de la graine.....                                                          | 14        |
| 1.3. Croissance – Développement – Précocité.....                                                            | 15        |
| 1.4. Élaboration du rendement.....                                                                          | 20        |
| 2. COMPOSITION DE LA GRAINE DE SOJA .....                                                                   | 23        |
| 2.1. Composés majeurs de la graine de soja.....                                                             | 23        |
| 2.2. Composés mineurs de la graine de soja.....                                                             | 26        |
| 3. Cinétique d'Accumulation des Divers Composés de la Graine.....                                           | 35        |
| 3.1. Composés majeurs : protéines – lipides – sucres .....                                                  | 36        |
| 3.2. Composés mineurs : phytates – saponines - isoflavones.....                                             | 38        |
| 4. Les Isoflavones : Rôles dans la Plante et Intérêt.....                                                   | 27        |
| 4.1. Structure et caractéristiques .....                                                                    | 27        |
| 4.2. Biosynthèse des isoflavones .....                                                                      | 28        |
| 4.3. Rôles physiologiques des isoflavones dans la plante .....                                              | 30        |
| 4.4. Effets des isoflavones sur la santé humaine .....                                                      | 32        |
| 5. Facteurs de Variation de la Teneur et de la Composition des Isoflavones dans les<br>Graines de Soja..... | 35        |
| 5.1. Facteur génétique.....                                                                                 | 39        |
| 5.2. Facteurs environnementaux .....                                                                        | 39        |
| 5.3. Compartiments de la graine .....                                                                       | 41        |
| 6. OBJECTIFS DE LA THESE .....                                                                              | 42        |
| <b>Chapitre II Matériel et Méthodes .....</b>                                                               | <b>44</b> |
| 1. MATERIEL VEGETAL .....                                                                                   | 46        |
| 2. Conditions de Culture et Facteurs Environnementaux Étudiés.....                                          | 47        |
| 3. Analyses des Échantillons et Traitement des Résultats.....                                               | 48        |
| <b>Chapitre III Variabilité Génétique et Environnementale .....</b>                                         | <b>51</b> |
| 1. INTRODUCTION .....                                                                                       | 53        |
| 2. PUBLICATION SCIENTIFIQUE.....                                                                            | 54        |
| ABSTRACT .....                                                                                              | 56        |
| INTRODUCTION.....                                                                                           | 57        |

|                                                                                                         |            |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| EXPERIMENTAL .....                                                                                      | 59         |
| Plant material and growth conditions .....                                                              | 59         |
| Chemicals .....                                                                                         | 60         |
| Sample preparation, isoflavone extraction and analysis .....                                            | 61         |
| Quantification of total proteins .....                                                                  | 62         |
| Statistical analysis .....                                                                              | 62         |
| RESULTS.....                                                                                            | 63         |
| Cultivar characteristics for seed traits and isoflavone content and composition in the seed parts. .... | 64         |
| Temperature and soil moisture effects on seed weights and protein contents .....                        | 65         |
| Temperature and soil moisture effects on isoflavone contents and composition in cotyledons.....         | 66         |
| Temperature and soil moisture effects on isoflavone contents and composition in germ                    | 66         |
| DISCUSSION .....                                                                                        | 67         |
| REFERENCES .....                                                                                        | 70         |
| 3. SYNTHÈSE ET CONCLUSION .....                                                                         | 85         |
| <b>Chapitre IV Cinétiques d'Accumulation .....</b>                                                      | <b>87</b>  |
| 1. INTRODUCTION .....                                                                                   | 89         |
| 2. PUBLICATION SCIENTIFIQUE.....                                                                        | 90         |
| <i>ABSTRACT</i> .....                                                                                   | 92         |
| <i>INTRODUCTION</i> .....                                                                               | 93         |
| <i>MATERIALS AND METHODS</i> .....                                                                      | 96         |
| <i>RESULTS</i> .....                                                                                    | 99         |
| <i>DISCUSSION</i> .....                                                                                 | 102        |
| <i>REFERENCES</i> .....                                                                                 | 106        |
| <i>FIGURES</i> .....                                                                                    | 110        |
| 3. SYNTHÈSE ET CONCLUSION.....                                                                          | 115        |
| <b>Chapitre V Discussion Générale et Conclusion.....</b>                                                | <b>116</b> |
| <b>Liste des Tables et Figures.....</b>                                                                 | <b>122</b> |
| <b>Bibliographie.....</b>                                                                               | <b>123</b> |
| <b>Table des matières.....</b>                                                                          | <b>142</b> |