

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

relatif à une demande d'autorisation de mise sur le marché d'un nouvel aliment ou d'un ingrédient alimentaire via la procédure d'équivalence substantielle : extrait de quinoa

L'Anses met en œuvre une expertise scientifique indépendante et pluraliste.

L'Anses contribue principalement à assurer la sécurité sanitaire dans les domaines de l'environnement, du travail et de l'alimentation et à évaluer les risques sanitaires qu'ils peuvent comporter.

Elle contribue également à assurer d'une part la protection de la santé et du bien-être des animaux et de la santé des végétaux et d'autre part l'évaluation des propriétés nutritionnelles des aliments.

Elle fournit aux autorités compétentes toutes les informations sur ces risques ainsi que l'expertise et l'appui scientifique technique nécessaires à l'élaboration des dispositions législatives et réglementaires et à la mise en œuvre des mesures de gestion du risque (article L.1313-1 du code de la santé publique).

Ses avis sont rendus publics.

1. RAPPEL DE LA SAISINE

L'Agence nationale de la sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail a été saisie le 18 juillet 2011 par la Direction générale de la concurrence, de la consommation et de la répression des fraudes (Dgccrf) d'une demande d'avis relatif à une demande d'autorisation de mise sur le marché d'un nouvel aliment ou d'un ingrédient alimentaire, via la procédure d'équivalence substantielle : extrait de quinoa.

2. CONTEXTE ET OBJET DE LA SAISINE

Cette demande s'inscrit dans le cadre du règlement (CE) n°258/97 relatif aux nouveaux aliments et nouveaux ingrédients alimentaires. L'équivalence substantielle est demandée entre la graine de quinoa et un extrait du son de quinoa.

3. ORGANISATION DE L'EXPERTISE

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

L'expertise collective a été réalisée par le Comité d'experts spécialisé (CES) « Nutrition humaine » réuni le 24 novembre, sur la base de rapports de 3 rapporteurs.

4. ANALYSE ET CONCLUSION DU CES

4.1 Concernant l'origine et le mode de production

Le nouvel ingrédient est obtenu à partir de téguments de graines de quinoa (du nom scientifique *Chenopodium quinoa*). Le quinoa est une plante traditionnelle d'Amérique latine cultivée depuis des siècles. Réputé pour sa capacité de résistance face à des conditions climatiques extrêmes (sécheresse, gel), le quinoa se développe dans un milieu aride où les sols, pauvres, sont exposés à la sécheresse, au gel, aux vents violents et à la forte radiation solaire due à l'altitude. Pour supporter le succès commercial de la graine, les agriculteurs ont également développé la culture en plaine où les risques de gelée nocturne sont importants.

Le quinoa est considéré comme une pseudo-céréale, puisqu'il ne fait pas partie de la famille des graminées, mais de celle de la betterave et des épinards (les Chénopodiacées). Le quinoa était la base de l'alimentation des civilisations précolombiennes, mais son essor a été limité par la richesse en saponine de l'enveloppe de ses graines non écorcées, et par le fait que la farine qui en est tirée n'est pas panifiable, par défaut de gluten. Ses graines, pauvres en lipides, ont une teneur élevée en protéines (entre 14 et 18%) d'une excellente qualité car riches en acides aminés essentiels, tels que l'histidine et la lysine, qui sont déficients dans la plupart des céréales. D'autre part, par rapport à l'orge, le riz ou le blé, le quinoa est plus riche en vitamines telles que la riboflavine, l'alpha-tocophérol et les carotènes, ainsi qu'en minéraux tels que le Ca, Fe, K, Mg, Cu, Mn.

Le pétitionnaire ne donne aucune information sur le pays producteur, le lieu de culture, la variété cultivée, le traitement sur place de la graine entière, le mode d'expédition, etc. Le dossier indique que la graine est importée en France par la filière du commerce bio équitable puis transformée en son de quinoa. Le nouvel ingrédient est ensuite préparé à partir du son (téguments externes) par abrasion et lavage des graines.

Le CES considère que la description du mode de production est insuffisante dans le dossier. Le cultivar, les modes de culture et de production, de transport, de stockage de la graine ne sont pas précisés. Le pétitionnaire devra bien distinguer l'incidence sur la qualité du son d'un traitement « d'abrasion et de lavage » tel qu'il le cite, par rapport à un traitement inverse (où un lavage précéderait le décorticage des graines) beaucoup plus souhaitable pour éliminer les saponines du son.

Le protocole de fabrication de l'extrait sec est décrit très succinctement. Les modalités de centrifugation, de filtration après coagulation des protéines, les conditions de séchage, la qualité et la quantité des différents solvants, ainsi que la quantité, l'origine et la composition exacte de maltodextrines (son Dextrose Equivalent) ne sont pas indiquées.

4.2 Concernant la composition nutritionnelle du produit

Le pétitionnaire fournit l'analyse nutritionnelle de 2 lots, avec 2 « répétitions » pour chaque, afin d'évaluer la stabilité. Le processus d'extraction ne modifie pas le pouvoir calorique, par rapport à la graine de quinoa. En revanche, dans le nouvel ingrédient, un enrichissement en glucides totaux et un appauvrissement en lipides sont à noter par rapport au son, en raison de l'ajout de maltodextrines à hauteur de 58%. Enfin, en ce qui concerne les protéines, et notamment la teneur en acides aminés, des données sont fournies pour His, Ile, Leu, Met, Cyst, Phe, Tyr, Thr, Val, Lys et sont comparées aux valeurs de la littérature pour la graine de quinoa (car le pétitionnaire n'a pas analysé ces paramètres dans les graines qu'il utilise). Les dosages dans les 2 extraits sont comparables. Une diminution significative des teneurs en protéines est à noter.

Paramètres	Graine de quinoa (pour 100 g) Données bibliographiques	Graine de quinoa (pour 100 g) Données Alisa (internet)	Graine de quinoa (pour 100 g) Données du pétitionnaire	Son de quinoa (pour 100 g) Données du pétitionnaire	Nouvel ingrédient (pour 100 g) Moyennes sur 2 lots
Humidité	12,6 g		8,17 g	8 g	4,0 g
Glucides	59,7 g	64 g	78,43 g	45,26 g	80,15 g (dont 58,7 g maltodextrine)
Protéines	13,8 g	12 g	8,1 g	18,9 g	13,5 g
Lipides	5,0 g	5 g	4,0 g	10,7 g	<1,3 g
Cendres	3,4 g		1,3 g	3,5 g	1,4 g
Fibres	4,1 g	7 g	-	14,3 g	-
Calories		364 Kcal	382,12 Kcal	352,94 Kcal	382,2 Kcal

Le CES estime que l'étude du profil nutritionnel du produit est très incomplète. Les teneurs en vitamines et minéraux doivent être mesurées. De plus, l'analyse en deux répétitions (2 lots) uniquement est très insuffisante. Ceci n'est pas représentatif des éventuelles variations liées à la composition des matières premières, ni à la variabilité liée au procédé d'extraction, ou encore à la variabilité inter-dosages pour les différents paramètres. Le pétitionnaire doit indiquer les caractéristiques des dosages utilisés (notamment les coefficients de variation). Pour argumenter d'une équivalence en substance, le pétitionnaire devrait appliquer le même mode opératoire dans les différentes fractions issues d'un même lot : les graines entières, le son, et la farine. Par ailleurs, les taux de 20 hydroxyecdysone et de saponosides devraient être évalués dans ces trois fractions. Enfin, le CES souligne que la teneur en protéines ainsi que les ratios en différents acides aminés essentiels sont modifiées et que l'enrichissement en maltodextrines en de telles quantités est discutable.

4.3 Concernant la stabilité du produit

La quantité de phytoecdysones, principe actif, est évaluée entre 2,4% et 2,55% (dans l'étude de stabilité). Le contenu des graines de quinoa en ecdystéroïdes est variable, en fonction de l'origine des graines (diversité génétique, conditions culturelles...). La détection de ce composé dans les produits à base de quinoa est très bien corrélée avec leur contenu en quinoa, ce qui signifie que ces molécules sont plutôt stables durant la transformation des aliments. Le pétitionnaire, pour évaluer la stabilité de son produit, a dosé la quantité de 20 hydroxyecdysone (20E), dans les 2 extraits, à deux reprises, à 8 mois d'intervalle pour le premier et à 5 mois pour le deuxième.

Le CES note que la stabilité du principe actif est vérifiée par l'étude conduite par le pétitionnaire mais s'étonne que le pétitionnaire n'ait pas réalisé une réelle étude de vieillissement avec un intervalle de temps défini et sur une période plus longue (au moins 12 mois, comme la durée des cures préconisées par le pétitionnaire).

Le CES précise que la présence d'ecdysones (ou de phytoecdysones), des composés E et 20E (respectivement ecdysone et 20-hydroxyecdysone), dans la plante et dans l'extrait n'est qu'une réalité chimique et ne doit pas donner lieu à la description d'un bénéfice santé (aujourd'hui mentionné sur Internet).

4.4 Concernant le métabolisme et la biodisponibilité

Le pétitionnaire n'a pas réalisé d'étude de métabolisme et de biodisponibilité avec son extrait, estimant que « le métabolisme des molécules présentes dans l'extrait de son devrait être très similaire à celui de la graine, compte-tenu des similitudes de composition ». Il cite, comme référence, les travaux de Simon et Koolman (1989), menés sur un seul volontaire de sexe masculin, qui ont analysé la pharmacocinétique de E et 20E grâce à un suivi par dosage radio-immunologique de la teneur plasmatique et urinaire : soit une 1/2 vie de 4 heures pour E et de 9 heures pour 20E. Si le catabolisme de ces molécules est rapide, cela signifie que les quantités requises pour le maintien d'une imprégnation suffisante pour les systèmes biologiques seraient importantes.

Concernant la question des transformations métaboliques des ecdystéroïdes chez les mammifères (Lafont et Dinan, 2003), le pétitionnaire ne mentionne pas les travaux de Tsitsimpikou *et al.* (2001) qui ont analysé l'urine (recueil de 5 j) d'un bénévole ayant ingéré 20 mg d'une préparation commerciale contenant 20E. Ils retrouvent au moins 2 métabolites hydroxylés (le 2d20E et le 2DE). D'autre part, Brandt (2003) a identifié du 14d20E dans les urines d'un homme ayant consommé 20 mg de 20E et Destrez *et al.* (2008, 2009) ont trouvé également du 14d20E, ainsi que 2 autres métabolites (20,26-dihydroxyecdysone et le 14-déoxy-20,26-dihydroxyecdysone) dans les urines de veaux ayant reçu du 20E per os. L'impact biologique de ces différents métabolites n'est actuellement pas connu.

Le métabolisme dans les tissus périphériques est à un point important car le clivage entre le C-20 et le C-22 entraînerait d'une part la formation de stéroïdes 21C (qui partagent certaines similitudes avec des neurostéroïdes chez les vertébrés), et d'autre part, dans certaines études pharmacologiques, de rubrostérone un métabolite aussi actif que 20-hydroxyecdysone (Otaka *et al.*, 1968). A noter que les ecdystéroïdes diffèrent nettement des hormones stéroïdes chez les vertébrés par leur polarité (polyhydroxylés, C27-C29) et leur forme (jonction A/B *cis*). La 20-hydroxyecdysone ne se fixe pas sur les récepteurs nucléaires des hormones stéroïdes.

Le CES estime que les données fournies par le pétitionnaire sont insuffisantes pour conclure sur le métabolisme et la biodisponibilité de l'extrait.

4.5 Concernant la recherche de substances indésirables

Les saponines ne sont pas quantifiées. Or, la présence de diverses saponines triterpéniques (saponines triterpéniques monodesmosidiques et bidesmosidiques de l'acide oléanolique, hédéragénine, acide phytolaccagénique et acide serjanique) a été décrite dans le quinoa (Dini *et al.*, 2002). Ce sont des métabolites secondaires glycosylés constitués d'une ou de deux chaînes glucidiques hydrophiles attachées à un aglycone triterpénique lipophile (Wink, 2004). Leur concentration dans le quinoa varie classiquement de 0,01% à 4,65% de matière sèche, en fonction de la variété et des conditions environnementales (Koziol, 1991 ; 1992). Ces molécules forment avec l'eau une mousse stable et agissent comme détergents. Elles sont extrêmement toxiques pour les animaux à sang froid (Dini *et al.*, 2005). Concernant les mammifères, une activité hémolytique des monodesmosides a été observée sur des érythrocytes de mouton (Wolldemichael et Wink, 2001). Le mécanisme d'action pourrait impliquer une interaction des saponines avec le cholestérol, créant une rupture de la membrane cellulaire et une fuite de l'hémoglobine extracellulaire (Lacaille-Dubois et Wagner, 2000). En outre, il a été démontré que la saponine isolée d'un arbrisseau (*Sesbania sesban*) peut induire une nécrose des tubules séminifères et inhiber la spermatogenèse chez les moutons et les chèvres (Woldemeskel *et al.*, 2001). Toutefois, les saponines dans les feuilles peuvent avoir une structure différente et donc une activité différente de celle des graines. Ainsi les graines de quinoa sont communément trempées dans l'eau pour éliminer les saponines, mais aussi pour enlever leur goût amer. Or, dans le cas présent, il n'est pas précisé si les graines ont été trempées avant la préparation du son et donc si elles sont encore présentes dans l'extrait.

Le CES estime que la représentativité de 2 analyses microbiologiques, de teneurs en métaux lourds et en pesticides est sujette à caution. De plus, tout risque de présence de saponosides dans le son et dans l'extrait ne peut être écarté en l'absence de dosage.

Concernant l'étude de toxicité avec le nouvel ingrédient, le pétitionnaire ne rapporte aucune altération au niveau des organes après administration orale chez la souris. Le pétitionnaire ne constate pas d'augmentation du poids des foies ni de leur teneur en triglycérides, chez des souris nourries avec un régime riche en matières grasses supplémenté avec le nouvel ingrédient. Il se base également sur le fait qu'aucun évènement indésirable n'a été décrit dans l'étude clinique qu'il a conduite. En outre, il cite quelques études bibliographiques d'innocuité des phytoecdysones, mais pas du 20-hydroxyecdysone. Il fait également référence à des données issues de 2 études cliniques. D'une part, une étude clinique russe de 3 semaines à partir de produits contenant les phytoecdysones (Ecdysten et Prime Plus) a montré une réduction de masse grasse, sans effet toxique (Gadzhieva *et al.*, 1995). D'autre part, Simakina *et al.* (1988) ont observé une diminution de 10% de masse grasse et une augmentation de 7% de masse maigre chez des athlètes russes recevant 5 mg/kg pc/j de 20-hydroxyecdysone pendant 10-20 jours, sans effet toxique patent. Dans une étude supplémentaire réalisée chez 45 athlètes pratiquant un sport d'endurance, recevant 30 mg/j de 20-hydroxyecdysone sous forme de gélules pendant 8 semaines, aucun effet indésirable n'a été observé. Aucune variation des taux plasmatiques de testostérone libre ou totale ou de cortisol n'a également été observée (Wilborn *et al.*, 2006). Le dossier mentionne aussi 2 études chez l'Homme qui ne décèlent pas d'altération des fonctions sexuelles après consommation de 5-10mg/j de 20-hydroxyecdysone pendant 10 jours ou de 7,5-10 mg/j pendant 2 mois (Kibrik et Reshetnyak, 1997 ; Mirzaev *et al.*, 2000).

Le CES constate qu'il n'existe pas d'étude de toxicité conduite avec le principe actif (20-hydroxyecdysone) du nouvel ingrédient. Les données de sécurité des ecdysones (chez l'animal et l'Homme) apparaissent insuffisantes. En outre, les études cliniques sont rares et certaines sont publiées en russe. Aucune donnée ne concerne l'exposition à long terme alors que le pétitionnaire préconise une cure de 12 mois. Le dossier de demande fait état d'études « propriétaires » du pétitionnaire mais aucun document ou rapport ne figure en annexe (ce qui constitue une non-conformité avec les exigences du règlement CE n°258/97). L'étude telle qu'elle est rapportée dans le document du pétitionnaire, ne donne aucune précision sur les doses administrées, sa durée, le nombre d'animaux testés, les organes examinés, les données hématologiques et biochimiques (à l'exception des triglycérides).

Le CES souhaite également des précisions sur les critères physiologiques, hormonaux et/ou psychologiques utilisés dans l'analyse des fonctions sexuelles des sujets ayant consommé du 20-hydroxyecdysone.

4.6 Concernant la consommation et le niveau d'utilisation prévue

Les ecdystéroïdes sont probablement les stéroïdes les plus abondants dans la nature parce qu'ils sont produits, non seulement par des arthropodes, mais aussi par de nombreuses espèces végétales (épinards, betteraves blanches, graines de quinoa...) (Slama et Lafont, 1995). Chez les insectes, le 20-hydroxyecdysone contrôle ou induit la mue et autres processus morphogénétiques. Chez les plantes, il peut agir comme substance de défense contre les insectes. Chez les vertébrés, on leur attribue un large éventail d'effets pharmacologiques, (adaptogènes, anabolisants, anti-diabétiques, hépatoprotecteurs, immunoprotecteurs, et peut-être même anti-tumoraux). C'est pourquoi le marché des préparations contenant l'ecdystéroïde s'est considérablement développé. Actuellement, 300 produits contenant la molécule sont disponibles sur le marché, avec certaines formulations recommandant jusqu'à 1 g d'apport quotidien, généralement en combinaison avec d'autres anabolisants et/ou un régime riche en protéines (Dinan et Lafont, 2006). Une étude est en cours pour une utilisation éventuelle en thérapie génique (Dinan, 2001 ; Kumpun *et al.*, 2011).

Le pétitionnaire prévoit d'utiliser le nouvel ingrédient dans le cadre de la prise en charge du syndrome métabolique. Ceci a fait l'objet d'un brevet (Veillet et Lafont, 2011). Une étude préclinique a montré que le nouvel ingrédient réduit de 25% le développement du tissu adipeux lors de la consommation d'un régime hyper-lipidique (Foucault *et al.*, 2011).

Le pétitionnaire envisage d'utiliser l'extrait de son comme ingrédient alimentaire dans un aliment ou dans un complément alimentaire. L'extrait est destiné à être consommé en cures de 1 à 12 mois (conformément aux premiers résultats précliniques exposés par le pétitionnaire sur la réduction du tissu adipeux chez la souris).

La teneur de 20-hydroxyecdysone analysée dans cet extrait a été évaluée à $2,5 \pm 0,5\%$. La dose quotidienne recommandée du nouvel ingrédient par le pétitionnaire est de $1,5 \pm 0,5$ g, soit un apport de 37,5 mg de 20E ; la dose maximale préconisée par le pétitionnaire est de 4 g, ce qui équivaut à 100 mg de 20E. Selon Grebenok et Adler (1991), diverses plantes alimentaires en contiennent des quantités non négligeables : 50-200 mg/kg poids frais pour l'épinard (*Spinacia oleracea*), 400-800 mg/kg pour les graines de quinoa, 2-8 mg/kg poids frais dans les champignons de Paris. Plus récemment, Kumpun *et al.* (2011) ont estimé que la consommation de 50 g de graines de quinoa correspond à au moins 15 mg de 20-hydroxyecdysone. En outre, le pétitionnaire fournit un tableau de contenu en 20-hydroxyecdysone de différents produits à base de quinoa qui apportent entre 3 et 58 mg/100 g. Enfin, la consommation dans les Andes serait estimée à 30-50 mg/j de 20-hydroxyecdysone.

Le CES considère que les doses préconisées du nouvel ingrédient peuvent conduire à une consommation supérieure à celle estimée dans les Andes (la dose maximale est équivalente à 100 mg de 20-hydroxyecdysone) et peuvent présenter des risques sans même considérer les apports alimentaires (non négligeables). Les doses préconisées devraient donc être revues à la baisse en tenant compte également de l'exposition de la population à la 20-hydroxyecdysone via l'alimentation.

4.7 Concernant l'allergénicité du produit

Le très faible taux de gluten et de prolamines réduit le risque d'intolérance lié au nouvel ingrédient lui-même.

Bien que des mesures soient prises pour éviter des contaminations croisées (cf. cahier des charges), le CES note que la chaîne d'extraction du sous-traitant sert à traiter d'autres espèces végétales et que le pétitionnaire ne pourrait garantir l'absence totale de risque allergique avec son produit.

4.8 Conclusion du CES

Le CES émet un avis défavorable car le dossier est jugé insuffisant pour accorder l'équivalence en substance.

En particulier, le CES demande que le pétitionnaire fournisse les copies de toutes les références citées dans le dossier en stricte application du règlement (CE) n°258/97. Le pétitionnaire doit démontrer que le traitement des graines et le processus d'extraction et de purification conduisent à fabriquer un ingrédient dépourvu en saponines. Sur la base des données scientifiques disponibles, le CES identifie la nécessité de définir une dose sans effet en 20-hydroxyecdysone après analyse approfondie et critique des études animales. L'étude du profil nutritionnel et la recherche de substances indésirables devront être complétées. Une évaluation du risque devra être réalisée dans l'étude pilote 12 semaines chez l'Homme en précisant les doses du nouvel ingrédient administrées et avec une analyse approfondie des effets indésirables, même mineurs, observés, sachant que la recommandation de consommation est de 1 à 12 mois sans la moindre justification. En complément de l'évaluation des risques toxicologiques, le CES suggère d'effectuer une estimation des consommations futures du nouvel ingrédient en France.

5. CONCLUSION ET RECOMMANDATIONS DE L'AGENCE

L'Agence nationale de la sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail adopte les conclusions du CES « Nutrition humaine ».

Le directeur général

Marc MORTUREUX

MOTS-CLES

QUINOA, EXTRAIT, SON, PHYTOECDYSONES, EQUIVALENCE SUBSTANTIELLE.

BIBLIOGRAPHIE

Brandt F (2003). Pharmacokinetik und Metabolismus des 20-Hydroxyecdysons in Menschen. PhD Thesis, University of Marburg (Germany).

Destrez B, Pinel G, Bichon E, Monteau F, Lafont R, Le Bizec B (2008). Detection of 20-hydroxyecdysone in calf urine by comparative liquid chromatography/high-resolution mass spectrometry and liquid chromatography/tandem mass spectrometry measurements: application to the control of the potential misuse of ecdysteroids in cattle. Rapid Commun Mass Spectrom 22: 4073-80.

Destrez B, Pinel G, Monteau F, Lafont R, Le Bizec B (2009). Detection and identification of 20-hydroxyecdysone metabolites in calf urine by liquid chromatography-high resolution or tandem mass spectrometry measurements and establishment of their kinetics of elimination after 20-hydroxyecdysone administration. Anal Chim Acta 637: 178-84.

Dinan L (2001). Phytoecdysteroids: biological aspects. Phytochemistry 57: 325-39.

- Dinan L, Lafont R (2006). Effects and applications of arthropod steroid hormones (ecdysteroids) in mammals. *J Endocrinol* 191: 1-8.
- Dini I, Tenore GC, Dini A (2002). Oleanane saponins in "kancolla", a sweet variety of *Chenopodium quinoa*. *J Nat Prod* 65: 1023-6.
- Foucault AS, Mathé V, Lafont R, Even P, Dioh W, Veillet S, Tomé D, Huneau JF, Hermier D, Quignard-Boulangé A (2011). Quinoa extract enriched in 20-hydroxyecdysone protects mice from diet-induced obesity and modulates adipokines expression. *Obesity (Silver Spring)*. 2011 Aug 25. doi: 10.1038/oby.2011.257.
- Gadzhieva RM, Portugalov SN, Paniushkin VV, Kondrat'eva II (1995). A comparative study of the anabolic action of ecdysten, leveton and Prime Plus, preparations of plant origin [in Russian]. *Eksp Klin Farmakol* 58: 46-8.
- Gomez-Caravaca AM, Segura-Carretero A, Fernandez-Gutiérrez A, Caboni MF (2011). Simultaneous determination of phenolic compounds and saponins in quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd) by a liquid chromatography-diode array detection-electrospray ionization-time-of-flight mass spectrometry methodology. *J Agric Food Chem* 59: 10815-25.
- Grebencok RJ, Adler JH (1991). Ecdysteroid distribution during development of spinach. *Phytochemistry* 30: 2905-10.
- Kibrik ND, Reshetnyak JA (1996). Therapeutical approaches to sexual disadaptation. *Eur Neuropsychopharmacol* 6 (Suppl 4): S4-167.
- Koziol MJ (1991). Afrosimetric estimation of threshold saponin concentration for bitterness in quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd). *J Sci Food Agric* 54: 211-9.
- Koziol MJ (1992). Chemical composition and nutritional evaluation of quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.). *J Food Compos Anal* 5:35-68.
- Kuljanabhagavad T, Thongphasuk P, Chamulitrat W, Wink M (2008). Triterpene saponins from *Chenopodium quinoa* Willd. *Phytochemistry* 69: 1919-26.
- Kumpun S, Girault JP, Dinan L, Blais C, Maria A, Dauphin-Villemant C, Yingyongnarongkul B, Suksamrarn A, Lafont R (2011). The metabolism of 20-hydroxyecdysone in mice: relevance to pharmacological effects and gene switch applications of ecdysteroids. *J Steroid Biochem Mol Biol* 126: 1-9.
- Lacaille-Dubois MA, Wagner H (2000). Bioactive saponins from plants: an update. *Stud Nat Prod Chem* 21: 633-687.
- Lafont R, Dinan L (2003). Practical uses for ecdysteroids in mammals including humans: an update. *J Insect Sci* 3: 7.
- Ma WW, Heinstejn PF, McLaughlin JL (1989) Additional toxic, bitter saponins from the seeds of *Chenopodium quinoa*. *J Nat Prod* 52: 1132-5.
- Mirzaev IuR, Syrov VN, Khrushev SA, Iskanderova SD (2000). Effect of ecdystene on parameters of the sexual function under experimental and clinical conditions [in Russian]. *Eksp Klin Farmakol* 63: 35-37.
- Otkaka T, Uchiyama M, Okui S, Takemoto T, Hikino H (1968). Stimulatory effect of insect-metamorphosing steroids from *Achyranthes* and *Cyathula* on protein synthesis in mouse liver. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 16: 2426-9.
- Simakin SY, Panyushkin VV, Portugalov SN, Kostina LV, Martirosov EG (1988). Combined application of preparation of Ecdsten and product Bodrost 1 during training in cyclic sports. *Sports Bull* 2: 29-31.
- Simon P, Koolman J (1989). Ecdysteroids in vertebrates : pharmacological aspects. In Koolman J, editor. *Ecdysone - from chemistry to mode of action*, pp. 254-9, Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
- Slama K, Lafont R (1995). Insect hormones – ecdysteroids: their presence and actions in vertebrates. *Eur J Entomol* 92:355-77.
- Tsitsimpikou C, Tsamis GD, Siskos PA, Spyridaki MH, Georgakopoulos CG (2001). Study of excretion of ecdysterone in human urine. *Rapid Comm Mass Spectrom* 15: 1796-1801.
- Veillet S, Lafont R (2011). Use of phytoecdysones in the preparation of a composition for acting on the metabolic syndrome. US2011/0033561 A1.
- Wilborn CD, Taylor LW, Campbell BI, Kerksick C, Rasmussen CJ, Greenwood M, Kreider RB (2006). Effects of methoxyisoflavone, ecdysterone, and sulfo-polysaccharide supplementation on training adaptations in resistance-trained males. *J Int Soc Sports Nutr* 3: 19-27.
- Wink M (2004). *Phytochemical diversity of secondary metabolites*. Dekker, New York, pp 915-9.
- Whiteman EL, Cho H, Birnbaum MJ (2002). Role of Akt/protein kinase B in metabolism. *Trends Endocrinol Metabol* 13: 444-51.
- Woldemeskel M, Tegegne A, Umunna NN, Kaitho RJ, Tamminga S (2001). Effects of *Leucaena pallida* and *Sesbania sesban* supplementation on testicular histology of tropical sheep and goats. *Anim Reprod Sci* 67: 253-65.
- Woldemichael GM, Wink M (2001). Identification and biological activities of triterpenoid saponins from *Chenopodium quinoa*. *J Agric Food Chem* 49: 2327-32.