

Les perturbateurs endocriniens dans l'alimentation humaine: impact potentiel sur la santé

SCIPPO M.-L., MAGHUIN-ROGISTER G.

Université de Liège, Faculté de Médecine Vétérinaire, Département des Sciences des Denrées Alimentaires, Secteur Analyse, Centre d'Analyse des Résidus en Traces (CART), Boulevard de Colonster, 20 à 4000 Liège, Belgique

Correspondance : Professeur Marie-Louise Scippo - Mail : mlscippo@ulg.ac.be, tél : +32(0)4/366.40.46, fax : +32(0)4/366.40.44

RESUME : Plusieurs études scientifiques ont montré que des substances à activité hormonale (ou antihormonale) sont largement distribuées dans l'environnement et se retrouvent également dans l'alimentation humaine, soit en tant que constituants naturels (comme les phytoœstrogènes), soit comme substances d'origine anthropogène (par exemple, les pesticides organochlorés).

Diverses observations concernant aussi bien la faune sauvage que l'espèce humaine ont conduit à désigner ces produits à activité hormonale de perturbateurs endocriniens. De nombreuses études éco-toxicologiques ont mis en évidence des perturbations importantes de la fertilité de la faune sauvage notamment dans des zones contaminées par des pesticides. Chez l'homme, des études épidémiologiques ont montré une augmentation significative de certains cancers (entre autres, celui des testicules) et une diminution de la fertilité masculine. Les substances à effet œstrogènes sont souvent visées, mais d'autres effets dus à des hormones stéroïdes sexuelles sont de plus en plus fréquemment mis en évidence (effet anti-androgène par exemple).

De nombreuses inquiétudes émergent quant aux effets à long terme sur la santé humaine liés à une exposition chronique à ces substances par la voie alimentaire. Il est urgent de faire le point, non seulement sur la contamination effective de notre alimentation par des perturbateurs endocriniens (en termes d'identification et de quantification de chaque substance individuelle), mais également sur l'activité potentiellement toxique d'une alimentation contenant un mélange de contaminants à des concentrations inférieures à leur seuil individuel de toxicité.

LES HORMONES STÉROÏDES SEXUELLES

Le terme « hormone » est apparu dans la langue française en 1911, après avoir été emprunté à l'anglais. Il s'agit d'un terme proposé en 1904 par Bayliss et Starling, venant du grec et qui signifie « mettre en mouvement », pour désigner une substance produite par une glande dite « endocrine » (du latin –endo : en dedans et –crine : sécréter).

Les hormones sont transportées dans la circulation sanguine à partir de leur lieu de synthèse vers un tissu cible où se produit, sous l'action de cette hormone, une stimulation ou une inhibition résultant d'une interaction avec un récepteur (activation ou blocage).

Les hormones existent sous des formes chimiques diverses : protéines, polypeptides, stéroïdes, dérivés d'acides aminés... Nous nous intéresserons plus particulièrement ici aux hormones stéroïdes (celles fabriquées par les glandes surrénales et sexuelles), qui sont dérivées du cholestérol.

Les hormones mâles : la testostérone et la dihydrotestostérone (appelées également hormones androgènes) permettent la différenciation et le développement des organes génitaux et des caractères sexuels masculins secondaires (pilosité, mue de la voix). Ce type d'hormone permet également le développement des muscles et la répartition des graisses dans la partie supérieure du corps. La sécrétion

de ces hormones à l'intérieur des testicules débute précocement chez l'embryon (vers la fin du deuxième mois de sa formation), ce qui assure le développement des caractères sexuels masculins. Quand la sécrétion de testostérone et de ses dérivés ne s'effectue pas normalement, on constate un défaut de développement des organes précédemment cités, entraînant une différenciation de type féminin (pseudohermaphrodisme). Au moment de la puberté, chez l'homme, survient le renforcement de la sécrétion des hormones provoquant le développement de la spermatogenèse (fabrication des spermatozoïdes), des caractères sexuels secondaires (mue de la voix, développement de la musculature et

des poils) et une poussée de croissance avec soudure des cartilages de conjugaison.

Les hormones femelles : les œstrogènes stimulent le développement de la puberté et permettent le maintien des caractères sexuels féminins (organes génitaux, glandes mammaires). Ces hormones assurent également la prolifération de la muqueuse utérine pendant la première moitié du cycle (l'ancienne muqueuse ayant été éliminée avec les règles durant les premiers jours du cycle). Elles permettent de retenir le sodium dans le sang et favorisent la fabrication de protéines dont le rôle est primordial (fabrication des muscles, des os, du collagène de la peau...). Les œstrogènes stimulent la répartition de la masse grasseuse dans la région du bassin et des cuisses. En ce qui concerne les os, les œstrogènes stimulent l'allongement des os longs et la féminisation du squelette, particulièrement du bassin. Ils aident d'autre part la résorption osseuse et stimulent la soudure des articulations. Ces hormones augmentent le taux sanguin des HDL cholestérol (« bon cholestérol ») et diminuent celui des LDL cholestérol (« mauvais cholestérol »). C'est la raison pour laquelle on parle de protection cardio-vasculaire (effet de protection des vaisseaux contre l'athérome, c'est-à-dire les dépôts de cholestérol à l'intérieur des artères). La progestérone, autre hormone sexuelle femelle, est synthétisée dans les ovaires ou dans le placenta. Sa concentration évolue au cours du cycle menstruel, augmentant sensiblement après l'ovulation et chutant si aucune fécondation ne se produit. Elle prépare la muqueuse utérine à la nidation de l'œuf, en cas de fécondation, et inhibe de nouvelles ovulations lors de la grossesse. Les surrénales et les testicules produisent aussi de faibles quantités de progestérone

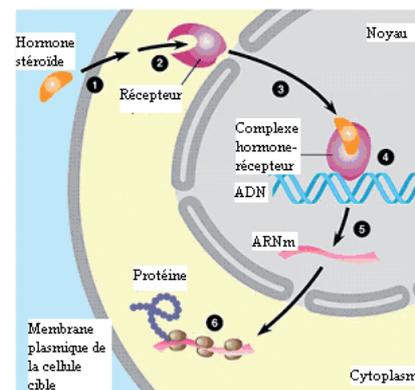
Les hormones stéroïdes présentent un mode d'action commun décrit ici de manière simplifiée : leur caractère lipophile leur permet de traverser la membrane cellulaire afin de rejoindre le cytoplasme des cellules du tissu cible, où elles se fixent à un récepteur intracellulaire. Cette fixation au récepteur démasque une séquence d'adressage nucléaire, ce qui va déclencher la translocation du complexe hormone-récepteur dans le noyau cellulaire, où

l'expression de certains gènes cibles va être activée (voir ci-dessous). Ensuite, les protéines codées par ces gènes cibles seront synthétisées, avec comme conséquence, les effets hormonaux décrits ci-dessus.

LES RÉCEPTEURS INTRACELLULAIRES QUI RÉGULENT L'EXPRESSION DE NOS GÈNES

Il existe plusieurs familles de récepteurs intracellulaires appelés facteurs de transcription car ils régulent la transcription de gènes cibles. Ces récepteurs sont des protéines cytoplasmiques ou nucléaires, qui, lorsqu'elles ont fixé leur ligand, sont activées en une forme qui a la propriété de se fixer, au niveau du noyau, à une séquence spécifique de l'ADN. Il en résulte un phénomène complexe de mobilisation de divers facteurs au niveau de l'ADN avec pour conséquence la transcription du gène cible et *in fine*, la synthèse de la protéine correspondante (figure 1). Parmi ces récepteurs, on trouve les récepteurs stéroïdiens qui appartiennent à la superfamille des récepteurs nucléaires (Evans, 1988) et le récepteur Ah (récepteur des hydrocarbures aromatiques), membre de la famille PAS (Mimura et Fujii-Kuriyama, 2003) (protéines Per, Arnt et Sim, voir ci-dessous).

Figure 1 : Représentation schématique du mode d'action des hormones stéroïdes.



Les récepteurs aux stéroïdes

Les récepteurs aux hormones stéroïdes sont des protéines intracellulaires appartenant à une famille de récepteurs nucléaires qui présentent une structure commune (Evans, 1988). Ce sont des régulateurs transcriptionnels en majorité hormono-inductibles. Dans la

catégorie des récepteurs nucléaires aux hormones, on trouve les récepteurs des androgènes (AR), œstrogènes (ER), glucocorticoïdes (GR), minéralocorticoïdes (MR), de la progestérone (PR), des acides rétinoïques, des hormones thyroïdiennes (TR), de la vitamine D3 ainsi que de plusieurs autres ligands dont les acides gras pour le PPAR (*peroxysome proliferator activated receptor*) (Truss et Beato, 1993 ; Brinkman, 1994 ; Tsai et O'Malley, 1994 ; Williams et Franklyn, 1994 ; Garcia-Valve et Palau, 1998 ; White et Parker, 1998). Cette famille compte également des membres « orphelins », c'est-à-dire des récepteurs identifiés et caractérisés mais pour lesquels on ne connaît pas encore le ligand (Ingraham et Redinbo, 2005).

Ces récepteurs, de nature protéique, présentent une structure commune, avec 3 domaines principaux :

- une séquence N-terminale variable en longueur et en composition (25 à 500 acides aminés) ;
- un domaine liant l'ADN, de longueur constante (66 à 68 acides aminés), avec plus de 50 % d'identité entre les différents membres de la famille. Dans le complexe ligand-récepteur, cette région se lie à une séquence d'ADN située sur le gène cible, appelée « *Steroid Responsive Element* » (SRE) ;
- une extrémité C-terminale contenant le domaine qui lie le ligand, de longueur constante (400 acides aminés environ) mais variable en composition (de moins de 15 % à 57 % d'identité entre les membres de la famille).

Le récepteur Ah

Le récepteur Ah, aussi appelé « récepteur à la dioxine » appartient à la famille des facteurs de transcription appelée bHLH PAS (voir ci-dessous), structurellement distincte de la superfamille des récepteurs nucléaires. La dioxine se lie au récepteur Ah probablement parce qu'elle ressemble à un ligand physiologique naturel encore inconnu à ce jour.

Le mécanisme d'action est cependant analogue à celui montré en figure 1.

Le récepteur Ah humain a été cloné en 1997 (Micka *et al.*, 1997). Il s'agit également d'une protéine de 800 acides aminés organisée en domaines, avec le domaine de liaison à l'ADN situé en N-terminal et un domaine de

liaison du ligand en aval de ce dernier. La structure du domaine de liaison à l'ADN est commune à tous les membres de la famille et présente le motif caractéristique bHLH (*basic Helix Loop Helix*). La région adjacente au domaine de liaison de l'ADN s'est révélée, au moment de son identification, commune aux protéines Per (de la drosophile), Arnt (de l'homme) et Sim (de la drosophile), raison pour laquelle cette famille de molécules a été appelée PAS. Per et Sim (*single minded locus*) sont des facteurs de transcription importants chez la drosophile intervenant dans la régulation du cycle circadien et le développement du système nerveux central, respectivement. Arnt (*Ah receptor nuclear translocator*) est une protéine nucléaire qui forme un hétérodimère avec le récepteur Ah ayant fixé son ligand. La formation de cet hétérodimère est une condition indispensable à la fixation à l'ADN.

Le récepteur Ah active une série de gènes endogènes (dont le cytochrome P450 1A1 (« CYP1A1 »), responsables du catabolisme de composés néfastes pour l'organisme (détoxication), mais dans d'autres cas, de l'activation du « pouvoir toxique » de certains composés (les métabolites formés possèdent une toxicité accrue par rapport aux composés de départ).

Des composés de type dioxines sont classés comme des perturbateurs endocriniens car ils peuvent interagir avec les voies de signalisation des récepteurs stéroïdiens (Kietz *et al.*, 2004). Les interactions décrites sont le blocage du ER par le récepteur Ah activé (Ohtake *et al.*, 2003), la dégradation du récepteur ER (Wormke *et al.*, 2003) ou l'interférence avec les voies de synthèse des hormones (Fukuzawa *et al.*, 2004).

LES PERTURBATEURS ENDOCRINIENS

Les perturbateurs endocriniens sont des molécules organiques d'origines diverses qui ont la propriété de se lier à certains récepteurs intracellulaires. Ces molécules, que l'on peut retrouver dans l'environnement ou dans la chaîne alimentaire animale ou humaine, ont donc, via cette activité de liaison aux récepteurs intracellulaires, un effet néfaste sur l'organisme humain, en perturbant notamment toute une série de fonctions hormonales.

Le programme international pour la sécurité chimique a défini l'expression « perturbateur endocrinien » de la manière suivante : « substance qui altère une ou plusieurs fonctions du système endocrine et, en conséquence, provoque des effets délétères sur la santé d'un individu, de sa descendance, ou de populations entières ».

Perturbateurs endocriniens : mécanisme d'action

Les perturbateurs endocriniens interagissent avec le système endocrine par au moins trois voies :

- en mimant l'action des hormones naturelles (effet agoniste), comme celle des œstrogènes ou de la testostérone, et par conséquent, en provoquant des effets similaires dans l'organisme,
- en bloquant le récepteur (effet antagoniste), empêchant ainsi l'action normale des hormones endogènes,
- en affectant la synthèse, le transport, le métabolisme et l'excrétion des hormones, avec pour conséquence, des modifications de concentration des hormones naturelles dans l'organisme.

Dans cette synthèse, nous allons examiner les effets potentiels de molécules qui interfèrent avec au moins deux familles majeures de facteurs de transcription (la superfamille des récepteurs nucléaires à laquelle appartiennent les récepteurs stéroïdiens et la famille PAS à laquelle appartient le récepteur Ah) en les activant (ou en les bloquant) de manière non souhaitée. Sachant que ces récepteurs régulent l'expression de nombreux gènes et donc la synthèse de nombreuses protéines, et *in fine*, contrôlent des fonctions importantes (reproduction, croissance et développement, réponse immunitaire, détoxication...) de notre organisme, il est important de connaître les risques associés à la présence de polluants environnementaux ou même de certains constituants naturels dans notre alimentation.

Pour certains composés, des limites maximales de concentration ont été établies dans les denrées alimentaires sur base d'études toxicologiques. Par contre, il existe de nombreux composés industriels pour lesquels aucune limite légale n'existe encore à l'heure actuelle. La mise sur pied du pro-

gramme concernant l'enregistrement, l'évaluation et l'autorisation des substances chimiques, ainsi que les restrictions applicables à ces substances (REACH, *Registration, Evaluation and Authorisation of Chemicals*) (anonyme, 2006a), qui vise à caractériser complètement d'un point de vue toxicologique tous les produits industriels mis sur le marché, devrait permettre de combler cette lacune.

Dans la suite de cet article, nous résumerons d'abord les désordres observés chez les humains attribués aux perturbateurs endocriniens, et, après avoir donné un bref aperçu des méthodes d'étude de ces molécules, les différentes familles de perturbateurs endocriniens potentiels seront envisagées du point de vue de leur toxicité, de leur teneur dans les denrées alimentaires et des aspects législatifs.

Effets probables des perturbateurs endocriniens chez l'homme

C'est principalement par comparaison avec les effets observés chez la faune sauvage que certains désordres humains ont été attribués aux contaminants environnementaux. Des exemples spécifiques seront cités plus loin dans le texte.

Chez les humains, les épidémiologistes ont relevé les anomalies suivantes :

- altération de la fonction de reproduction : baisse de la qualité du sperme (Carlsen *et al.*, 1992 ; Irvine *et al.*, 1992 ; Auger *et al.*, 1995) du nombre et de la mobilité des spermatozoïdes dans la population exposée ; anomalies congénitales des organes reproducteurs (cryptorchidie, hypospadias...) (Saradha *et al.*, 2006), augmentation de cas de cancers du sein (Reynolds *et al.*, 2004). Une littérature abondante témoigne de ces effets sur la fonction de la reproduction de l'espèce humaine (Anway *et al.*, 2005) ;
- altération du système immunitaire : effets sur la susceptibilité aux infections et, indirectement, pouvant influencer une augmentation de l'incidence de certaines tumeurs : cancers du sein, des testicules, de la prostate, endométriose ;

- Perturbation de la fonction thyroïdienne : pouvant entraîner des perturbations de la croissance et du développement ainsi que des problèmes neurologiques.

Cependant, bien que l'étude des perturbateurs endocriniens soit une priorité, tant aux Etats-Unis (*Endocrine Disruptor Screening Program*, U.S. EPA), qu'en Europe (*Endocrine Disrupter Research*, site web Europa), tous les effets décrits plus hauts sont encore controversés en ce qui concerne l'espèce humaine, et le lien entre un « perturbateur endocrinien » particulier et l'augmentation des cas de cancers ou la diminution de la qualité du sperme n'a pas été formellement démontré dans la littérature (Safe, 2004 ; 2005). Pour le consommateur, il est difficile d'intégrer ces données. Récemment, un reportage télévisé attribuait une soi-disant augmentation des cas de gynécomastie à la nourriture riche en « pseudo-œstrogènes » (*fast food*, boissons...).

Malheureusement, très peu de données existent quant à la contamination alimentaire par ces « pseudo-œstrogènes ».

MÉTHODES D'ÉTUDE DES PERTURBATEURS ENDOCRINIENS

Tests in vivo

Les tests *in vivo* qui permettent d'étudier l'effet hormonal des substances d'intérêt comprennent des études sur des animaux de laboratoire traités par des substances dont on veut étudier l'effet hormonal. Les paramètres mesurés sont le poids utérin, l'histologie des organes génitaux, etc.

Tests in vitro

Plusieurs tests *in vitro* permettent de mettre en évidence le caractère de perturbateur endocrinien potentiel d'une substance chimique.

Citons d'abord les tests de liaison sur récepteur. Plusieurs équipes ont proposé de mesurer la capacité de liaison de ces substances à des récepteurs stéroïdiens, soit naturels (à partir d'extraits cellulaires) (Helbo *et al.*, 1994), soit recombinants (c'est-à-dire produits en bactéries par génie génétique) (Scippo *et al.*, 2002 ; 2004a). Des tests commerciaux existent également. La capacité de liaison de nombreux xénobiotiques aux récepteurs œstrogé-

nique, androgénique et à la progestérone a pu ainsi être montrée. Ce type d'étude permet de mesurer l'affinité relative des substances étudiées par rapport au ligand naturel (par exemple le 17-beta œstradiol pour le récepteur œstrogénique), mais ne permet pas de distinguer leur effet agoniste de l'effet antagoniste.

Par contre, les tests de type « gène rapporteur », basés sur l'utilisation de lignées cellulaires génétiquement modifiées, permettent de déterminer l'activité biologique d'une substance ou d'un mélange de substances. Les cellules contiennent un gène rapporteur (généralement la luciférase), sous le contrôle d'un élément de réponse au complexe ligand-récepteur. Lorsque le récepteur est activé par la liaison du ligand (naturel ou exogène), il va interagir avec cet élément de réponse qui est une séquence d'ADN qui contrôle l'expression du gène rapporteur. La cellule va donc synthétiser la luciférase qui pourra être mise en évidence dans des extraits totaux des cellules par une mesure de luminescence après ajout des substrats adéquats. Les substances à effet agoniste vont stimuler cette émission de lumière tandis que les substances à effet antagoniste vont éteindre la réponse en présence du ligand naturel, dans les deux cas de manière dose-dépendante. Ces tests permettent également de mesurer l'éventuel effet synergique de mélanges de substances. En cas d'effets synergique, l'effet obtenu pour un mélange de substances est supérieur à la somme des effets individuels attendus. Cet aspect est particulièrement important car notre alimentation est susceptible de contenir un mélange de contaminants qui possèdent souvent des effets similaires (souvent de type œstrogénique). De nombreux tests avec gène rapporteur (basés sur des cellules eucaryotes ou des levures) sont décrits dans la littérature pour les hormones stéroïdes et les dioxines (Willemsen *et al.*, 2002 ; Scippo *et al.*, 2004b ; Willemsen *et al.*, 2004 ; 2005 ; Scippo *et al.*, 2006), et sont mêmes commercialisés.

La combinaison des tests de liaison sur récepteur et des essais cellulaires de type « gène rapporteur » est intéressante car elle permet une approche rationnelle de l'étude des composés : le test de liaison sur récepteur, plus rapide et moins cher que le test cellulaire, permet un premier criblage

afin de déterminer la présence d'une activité de liaison. En cas de réponse positive, le test cellulaire avec gène rapporteur permet de déterminer s'il s'agit d'une activité agoniste ou antagoniste. Ce type de stratégie pourrait être utilisé pour l'analyse d'échantillons de denrées alimentaires afin de mettre en évidence la présence de perturbateurs endocriniens dans notre alimentation.

Parmi les tests cellulaires, citons également le test E-screen, qui n'est pas un test de type gène rapporteur mais qui est basé sur l'étude de la prolifération de cellules eucaryotes MCF-7 en présence de substances à effet œstrogéniques (Sonnenschein *et al.*, 1995).

Méthodes physico-chimiques

Les méthodes physico-chimiques telles que la chromatographie gazeuse ou liquide couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS ou LC-MS) permettent d'identifier et de quantifier les substances individuellement dans un échantillon inconnu.

Elles complètent la stratégie décrite plus haut qui vise à déterminer la présence de perturbateurs endocriniens dans un échantillon de denrée alimentaire. En cas de réponse positive suite aux tests *in vitro* (liaison sur récepteur et/ou test cellulaire), l'échantillon est analysé par GC ou LC-MS afin d'identifier la ou les substances présentes dans l'échantillon.

Méthodes de transcriptomique et de protéomique

Les méthodes modernes de transcriptomique et de protéomique permettent de mesurer de manière plus fine l'action au niveau tissulaire ou cellulaire de perturbateurs endocriniens.

Les études sont réalisées soit à partir de tissus prélevés sur des animaux traités ou à partir de cellules traitées par la ou les substances d'intérêt. Une analyse transcriptomique permet de mettre en évidence l'ensemble des gènes exprimés ou réprimés suite au traitement, grâce à l'utilisation d'un damier contenant des sondes d'ADN. L'analyse protéomique va permettre de comparer le protéome des cellules ou tissus avant et après traitement et de mettre en évidence les protéines dont l'expression est inhibée ou activée. Selon la nature des gènes et protéines

exprimés ou réprimés, des conclusions plus fines peuvent être tirées quant au mécanisme d'action des substances étudiées.

Ces deux méthodes sont très utiles pour mettre en évidence de nouveaux biomarqueurs d'exposition à des contaminants environnementaux ou alimentaires.

DIFFÉRENTES CLASSES DE PERTURBATEURS ENDOCRINIENS

1) *les substances naturelles*

Certaines plantes produisent des phytoœstrogènes qui sont des molécules présentant une structure analogue à celle de l'œstrogène naturel, le 17β-oestradiol (E2) (figure 2), avec une affinité pour le récepteur aux œstrogènes (ER) de l'ordre de 1000 fois moindre de celle de E2. La notion de substances naturelles ayant un effet de type œstrogénique est apparue dès 1940, avec l'identification de troubles de la reproduction et de la lactation dans des troupeaux ovins australiens (dite « maladie du trèfle »). Diverses substances actives existent, comme les isoflavones (génistéine, daïdzéine...), présentes surtout dans le soja, les lignans (dans les graines de lin), les coumestans (coumestrol), les flavonoïdes. Les plantes ayant fait la démonstration de leurs propriétés œstrogénique sont le soja (graines), le trèfle (feuilles), la luzerne (feuilles), le houblon (cônes), le kudzu (*Pueraria lobata*) (feuilles et racine), la réglisse (racine), le lin (graine) et le fenouil (fruits) (anonyme, 2005).

Des mycotoxines comme la zéaralénone sont aussi œstrogéniques.

Les phyto-œstrogènes sont connus dans le grand public pour leur effet bénéfique sur la santé (effet « anti-cancer » du soja, effet « anti-oxydant » du resveratrol du vin rouge...), mais le fait que ces molécules puissent agir à la fois en tant qu'agonistes et antagonistes des récepteurs stéroïdiens laisse supposer que des effets délétères sur la santé pourraient être attendus également.

En effet, ils peuvent :

- agir comme agonistes et apporter des effets bénéfiques (au niveau du système cardio-vasculaire et osseux) à la femme ménopausée chez qui la production d'œstrogènes endogènes est éteinte, par contre ils peuvent augmenter le risque de cancer du sein et de l'utérus ;
- agir comme antagonistes (anti-œstrogènes) avec un effet protecteur contre le cancer du sein ;
- exercer des effets toxiques au stade du développement, en interférant avec la différenciation sexuelle normale.

Les effets attendus seront donc différents en fonction des individus cibles (enfants, femmes pré-ménopausées ou post-ménopausées et hommes).

D'autre part, même si leur activité œstrogénique est 1000 fois moindre que celle de l'œstradiol 17β, leur concentration dans certaines denrées alimentaires est nettement supérieure, ce qui conduit à des taux circulants chez l'homme largement supérieurs à

ceux des hormones endogènes.

Les effets bénéfiques des phytoœstrogènes sont notamment des propriétés anti-cancéreuses, anti-oxydantes, de protection contre l'ostéoporose et des maladies cardio-vasculaires (Anderson et Garner, 1997 ; Mishra *et al.*, 2000). Ces effets ont été observés dans les populations d'Asie ayant un régime alimentaire riche en isoflavones. L'apport alimentaire des principaux phytoœstrogènes (génistéine et daïdzéine) est de 0 à 2 mg/jour dans les pays occidentaux (Europe et Etats-Unis) contre 45 mg/jour au Japon (anonyme, 2005).

Des effets néfastes sur la santé ont été décrits également, lorsque l'exposition a lieu à une phase critique du développement (Aldercreutz, 1999).

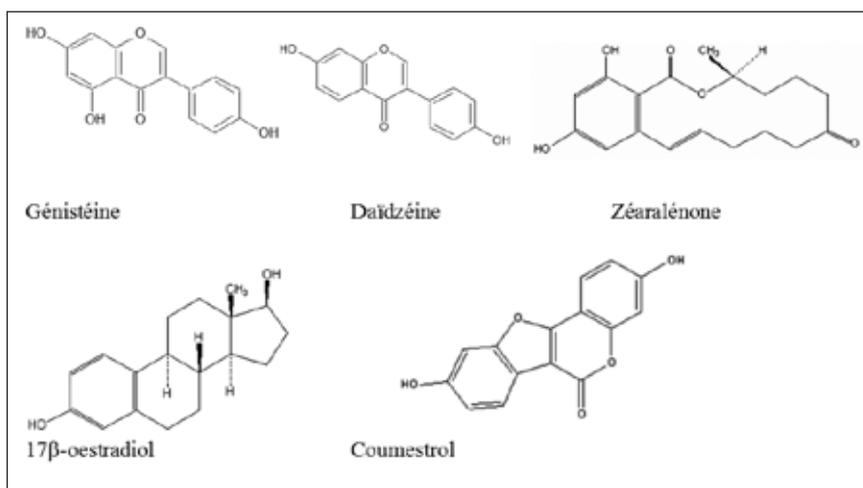
Les principaux effets délétères sont liés à une exposition intra-utérine aux phytoœstrogènes, qui peut s'accompagner d'effets tératogènes et carcinogènes au niveau du système reproducteur. On peut citer les nombreux dommages humains créés par l'utilisation du DES (diéthylstilbestrol) comme médicament chez les femmes enceintes dans les années '70. Ce médicament a provoqué de nombreux cas de cancers des organes génitaux chez la descendance de sexe féminin des femmes traitées (Marcus *et al.*, 1994).

Les effets délétères des phytoœstrogènes sont cependant controversés. Pour preuve, le lait de soja (qui contient 18 à 47 mg d'isoflavones/L) administré aux nouveaux-nés allergiques au lait de vache. Cette pratique existe depuis plus de trente ans en Europe, sans qu'aucune preuve d'effet négatif n'ait été avancée. Toutefois, il n'existe pas encore d'étude à long terme portant notamment sur la fertilité (anonyme, 2005).

Sur base d'études toxicologiques, l'AFSSA (Agence française pour la Sécurité sanitaire des Aliments) propose une limite d'ingestion maximale, au-delà de laquelle des effets toxiques pourraient être observés, de 1 mg/kg de poids corporel et par jour pour les isoflavones et a recommandé en 2005 l'étiquetage des aliments ou compléments alimentaires de la manière suivante :

« - Aliments à base de soja (tonyu, miso, tofu, yaourts et desserts au soja) : contient Xmg d'isoflavones (famille des phytoœstrogènes). À consommer

Figure 2 : Structure de quelques phytoœstrogènes, comparée à celle du 17β-oestradiol.



avec modération (limiter la consommation quotidienne à 1mg/kg poids corporel). Déconseillé aux enfants de moins de 3 ans.

- Compléments alimentaires (phytoœstrogènes purs ou extraits de plante en contenant) et aliments enrichis : contient X mg de [molécule (s) concernée (s)]* (famille des phytoœstrogènes). Ne pas dépasser 1mg/kg poids et par jour. Déconseillé aux femmes ayant des antécédents personnels ou familiaux de cancer du sein. Parlez-en à votre médecin.

* isoflavones et/ou isoflavanes et/ou coumestanes et/ou flavanones et/ou chalcones et/ou entérolignanes »

2) les produits chimiques synthétiques (« man made chemicals ») :

Cette catégorie comprend plusieurs classes de molécules :

Les pesticides organochlorés : ce sont surtout les insecticides, fongicides, herbicides.

On distingue (figure 3) :

- les dichlorodiphényléthanes (DDT, méthoxychlore) ;
- les cyclodiènes chlorés (aldrine, dieldrine...) ;
- les benzènes et autres cycles chlorés (lindane, trichlorobenzènes,...)

Les pesticides organochlorés appartiennent au groupe des POPs (Polluants Organiques Persistants) pointés du doigt par la Convention de Stockholm en 2001 (anonyme, 2006b), ratifiée par 152 pays en mai 2001, qui cible 12 POPs : aldrine, chlordane, dieldrine, DDT, endrine, heptachlor, hexachlorobenzène, mirex, toxaphène, PCB, dioxines et furannes. Ces POPs sont très stables dans l'environnement (avec des demi-vies de plusieurs années). Lipophiles, ils s'accumulent dans les tissus gras de divers organismes (y compris l'humain) et sont susceptibles de contaminer les denrées alimentaires. Ils sont également ubiquistes et contaminent de manière importante les régions de l'Arctique (alors qu'ils n'y ont jamais été utilisés) à tel point

que l'on interdit aux femmes enceintes Inuites de consommer des denrées alimentaires d'origine animale. Ils sont interdits d'utilisation depuis les années '70, mais une exception existe toujours pour le DDT, qui peut être utilisé pour lutter contre le paludisme en Afrique.

De nombreux pesticides présentent des effets œstrogéniques ou anti-androgéniques.

Pour illustrer ces derniers, citons l'exemple des alligators du lac Apopka, en Floride, contaminés accidentellement dans les années '90, par des insecticides organochlorés (DDT en particulier). Très vite, la population d'alligators présente dans le lac a diminué de façon importante, en raison d'anomalies au niveau du système reproducteur dues à la présence de DDT (Guillette *et al.*, 2000).

Les pesticides non organochlorés, comme le vinclozolin, un fongicide bien connu pour les effets anti-androgéniques de ses métabolites M1 et M2 (Kelce *et al.*, 1994 ; Uzumcu *et al.*, 2004).

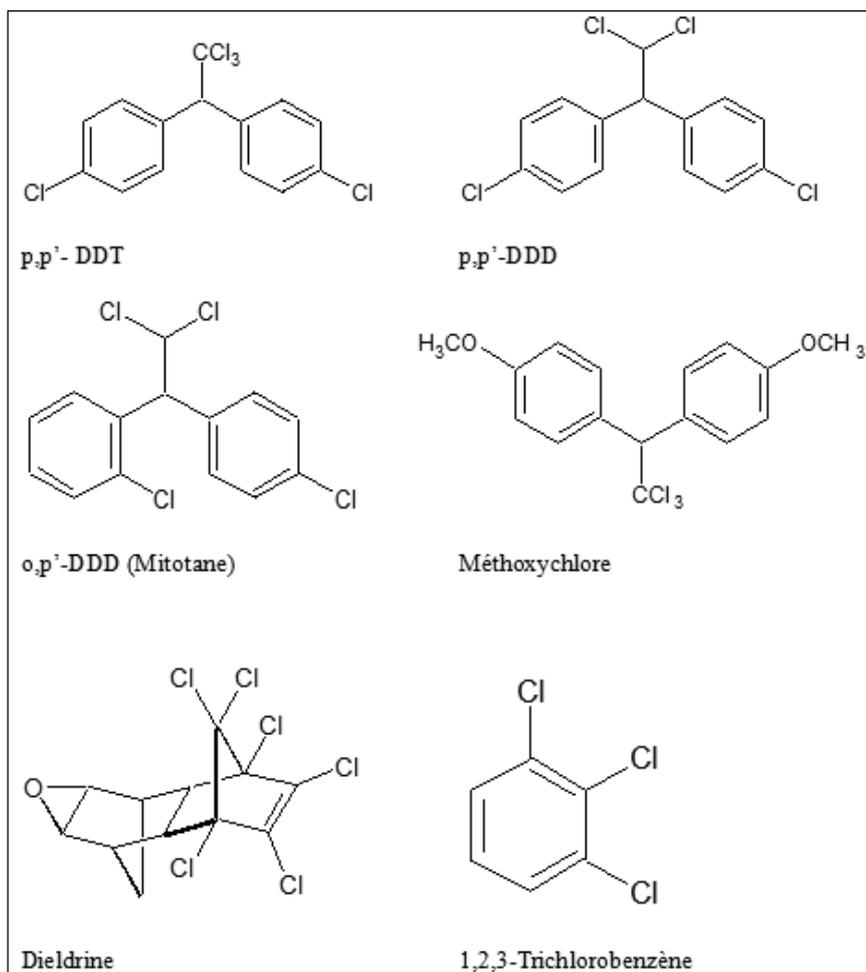
Les directives 86/363/CEE et 44 90/642/CEE (anonyme, 1986 ; 1990) du Conseil européen, et leurs amendements, fixent des limites maximales de résidus pour un grand nombre de pesticides dans les aliments d'origine animale et végétale, respectivement.

Chaque année, la Commission européenne organise le monitoring des pesticides dans l'alimentation d'origine végétale. Il est apparu que 58 % des échantillons ne présentaient pas de résidus détectables, tandis que 37 % présentaient des niveaux inférieurs aux limites maximales de résidus (LMR), mais environ 20 % de ces aliments végétaux contiennent parfois plusieurs résidus de pesticides, jusqu'à 8 différents. Les 5 % d'échantillons restants présentaient des concentrations en résidus de pesticides supérieures à la LMR (anonyme, 2003).

Les dioxines, furannes et PCB sont produits en sidérurgie, dans l'industrie chimique et dans la combustion des déchets ménagers et industriels.

Les composés apparentés aux dioxines, chimiquement stables (persistance) et semi-volatils, sont largement distribués dans l'environnement. Le transport et la déposition par voie atmosphérique constituent les moyens majeurs pour leur dispersion générale dans l'environnement. Ils s'ad-

Figure 3 : Structures de quelques pesticides organochlorés.



sorbent aux particules (poussières et matière en suspension dans l'eau) et se déposent dans les sédiments. Ils pénètrent dans les chaînes trophiques par deux voies principales : la voie air/plantes/animaux et eau/matière en suspension/végétaux-animaux. Ces composés lipophiles sont ensuite « bio-accumulés » jusqu'aux prédateurs et à l'homme. Les polychloro-*p*-dibenzodioxines et -dibenzofurannes (PCDD/Fs) et les composés apparentés (polychlorobiphényles « PCBs » coplanaires et semi-planaires référés en tant que composés de type « dioxine ») (figure 4) exercent une activité toxique très spécifique et typique par l'intermédiaire du récepteur cellulaire « Ah ».

La Commission européenne a établi des limites maximales de concentration à ne pas dépasser dans l'alimentation (anonyme, 2006c), sur base de données toxicologiques : la dose hebdomadaire tolérable fixée par l'OMS à 14 pg TEQ/kg de poids corporel et par semaine. Les TEQ (« Toxic Equivalent ») sont des équivalents toxiques calculés à partir de facteurs équivalents toxiques (TEF) établis pour 17 congénères de dioxines et furannes et 12 congénères de PCBs de type dioxine (Van den Berg *et al.*, 1998 ; 2006), le composé de référence étant la TCDD (tétrachlorodibenzodioxine). Le seuil de 14 pg TEQ/kg PC/semaine englobe donc tous les composés susceptibles de produire un effet de type dioxine. Cependant, pour des raisons de disponibilité de méthodes analytiques, seuls les 17 congénères de dioxines et furannes ont fait l'objet d'une limite

maximale de résidus dans un premier temps. Ce n'est que depuis novembre 2006 (anonyme, 2006d), que les PCBs de type dioxine (qui contaminent fréquemment les poissons) sont inclus dans cette limite. Il existe également d'autres composés de type dioxine (composés bromés, voir ci-dessous) qui ne font encore l'objet d'aucune concentration maximale tolérable.

Les composés bromés et fluorés. La présence d'autres composés halogénés dans l'environnement inquiète également la communauté scientifique. C'est le cas des polybromodiphényl-ethers (PBDEs) abondamment utilisés comme retardateurs de flamme dans la plupart des matériaux plastiques et textiles. Incorporés aux polymères en tant qu'additifs, ces composés peuvent migrer hors de leur matrice en fin de vie du matériau et se retrouver ainsi relâchés dans l'environnement. Étant persistants et lipophiles (tout comme les dioxines et PCBs), ils ont tendance à s'accumuler tout au long des chaînes trophiques. On les retrouve que ce soit dans les sédiments, poissons, oiseaux, mammifères, et même chez l'Homme. Leurs niveaux sont légèrement inférieurs aux PCBs, mais alors que la tendance est à la baisse pour la plupart des polluants organohalogénés, la concentration des PBDEs ne cesse d'augmenter depuis ces 20 dernières années, et ce partout dans le monde (Birnbaum *et al.*, 2004).

Certains retardateurs de flammes bromés, comme le tétrabromobisphénol-A, présentent également des propriétés oestrogéniques (Meerts *et al.*, 2001).

Les PBDE se lient faiblement au

récepteur Ah (Chen et Bunce, 2003), par contre, les dioxines bromées, présentes dans des mélanges techniques de retardateurs de flammes bromés ou produites lors de l'incinération de déchets contenant des PBDE, sont, comme les congénères chlorés, des ligands à part entière du récepteur Ah (Behnisch *et al.*, 2003 ; Brown *et al.*, 2004). Notons qu'il se forme également, lors de l'incinération des déchets, des composés mixtes chlorés et bromés à la fois.

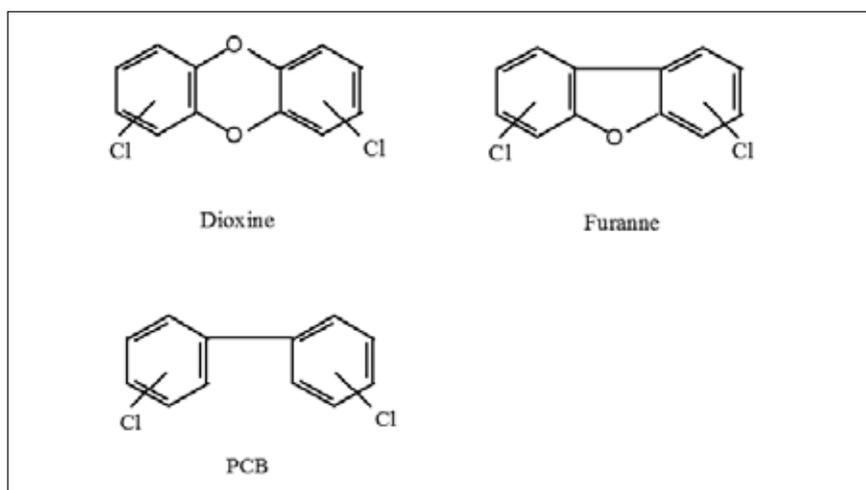
La combustion de déchets fluorés devrait conduire à la formation de dioxines fluorées mais de tels composés n'ont pas été retrouvés sans doute en raison de leur grande instabilité (Weber et Haenmaier, 1997), par contre des composés mixtes chlorés et fluorés à la fois devraient être plus stables et contaminent sans doute notre environnement également.

Les alkyls phénols sont utilisés comme surfactants dans la fabrication des détergents, des peintures, des pesticides et en cosmétique. Le nonylphénol provient de la dégradation de ces détergents ou du vieillissement de certains plastiques dans la composition desquels entre le nonylphénol.

Les dérivés de l'industrie des plastiques : ce sont les phtalates, des agents plastifiants (Latini, 2005) et le bisphénol-A (figure 5), utilisé pour le revêtement des boîtes de conserve et dans les polymères utilisés en dentisterie.

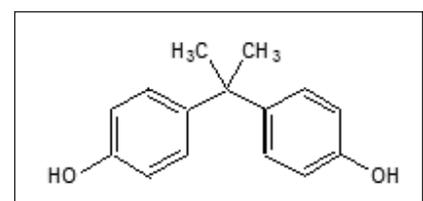
C'est de manière accidentelle que l'on a découvert que les produits issus de l'industrie du plastique avaient des effets oestrogéniques, à cause des interférences qu'ils produisaient dans les expériences de laboratoire. Par exemple, les tubes de polystyrène relarguent du nonylphénol et les flacons de polycarbonate, du bisphénol-A.

Figure 4 : Structure des polychloro-*p*-dibenzodioxines (PCDD), polychloro-*p*-dibenzofurannes (PCDF) et des polychlorobiphényles (PCB).



De nombreuses études récentes indiquent que ces agents plastifiants interfèrent avec la fonction de reproduction, que ce soit chez les animaux (Munoz

Figure 5 : Structure du bisphénol-A



et al., 2005 ; Tims *et al.*, 2005) ou chez l'homme (Anway *et al.*, 2005). Aux États-Unis, la Californie est le premier état qui propose d'interdire (6 ans après l'Europe) l'utilisation du bisphénol-A et des phtalates dans la fabrication des ustensiles pour bébés (biberons, tétines...), à cause de leur effet œstrogénique supposé (Weitzman *et al.*, 2005). La directive 2002/72/CE de la Commission (anonyme, 2002) et ses amendements fixent des teneurs maximales dans les denrées alimentaires (en terme de limite de migration spécifique ou LMS) pour toute une série de substances susceptibles de migrer de récipients en matières plastique dans l'alimentation. Notons que pour le bisphénol-A, la LMS est passée de 3 mg/Kg en 2002 à 0,6 en 2004.

Tributylétain. L'un des exemples les plus classiques de perturbations endocriniennes en milieu naturel concerne les gastéropodes marins exposés au tributylétain (ou TBT). Cette substance toxique pour les algues entre dans la composition de certaines peintures anti-salissures (ou *anti-fouling*) appliquées sur la carène des bateaux. Mais cette molécule est également extrêmement active sur les mollusques marins. Ainsi, des populations entières de bulots ont disparu en mer du Nord à cause du TBT, qui peut entraîner des effets androgéniques à une concentration très faible (0,1 ng/L seulement).

Les hormones de synthèse, issues de l'industrie pharmaceutique pour usage médical, telles que le 17 α -éthynylœstradiol, le mestranol, le DES (utilisé jusqu'en 1970 lors des grossesses à risques).

Ces hormones de synthèses répandues dans l'environnement (hormones des pilules contraceptives par exemple) sont largement suspectées de perturber la fonction endocrine des populations touchées (Swan *et al.*, 2005).

CONCLUSION

La présence de perturbateurs endocriniens dans notre alimentation nuit-elle gravement à notre santé ?

À court terme (toxicité aigue), la réponse est certainement non, mis à part des cas exceptionnels de contamination accidentelle ou volontaire des denrées alimentaires (cf le président ukrainien Yuchencko récemment empoisonné à la dioxine).

Quid des effets à long terme ?

La situation pourrait sembler rassurante, pour quelques groupes de molécules en tout cas, puisque des textes légaux prévoient des limites maximales de résidus dans les denrées alimentaires ainsi qu'un *monitoring* de celles-ci (dioxines et PCBs, pesticides). Mais il subsiste un grand nombre de substances industrielles, dont certaines sont connues pour leur toxicité mais pour lesquelles rien n'est encore prévu (les retardateurs de flamme bromés par exemple), tandis que d'autres n'ont jamais fait l'objet d'études toxicologiques. Le programme REACH (*Registration, Evaluation and Authorisation of Chemicals*) devrait combler cette lacune et éviter qu'à l'avenir, on constate les effets néfastes de certains produits seulement après plusieurs années d'utilisation (comme cela fut le cas pour les pesticides organochlorés).

Si on considère les molécules individuellement, la situation devrait alors être sous contrôle. Il subsiste cependant de nombreuses interrogations quant à l'effet délétère de la présence, dans l'alimentation, de mélanges de substances, présentes chacune individuellement en dessous de leur limite maximale de résidus. C'est pourtant fréquemment le cas. Pour les dioxines, les limites maximales de résidus sont exprimées en TEQ (équivalents toxiques). Il serait intéressant de procéder de même pour d'autres substances (pesticides, produits de l'industrie des matières plastiques...) que l'on mesurerait en équivalents toxiques à l'aide d'un ou de plusieurs tests *in vitro* (de type « gène rapporteur » par exemple). Des limites maximales de résidus dans l'alimentation, exprimées en équivalents toxiques, complèteraient utilement les limites individuelles appliquées de nos jours.

SUMMARY

Endocrine disruptors in food: potential impact on human health.

Several scientific studies revealed that substances with hormonal (or antihormonal) activity are widely distributed in the environment as well as in food, either as natural constituents (as phytoestrogens), or as substances of anthropogenic origin (for example, organochlorine pesticides).

Several observations concerning both the wild fauna and humans indicate that these products with hormonal activity are endocrine disruptors. Numerous ecotoxicological studies evidenced important disturbances of the fertility of the wild fauna in zones contaminated by pesticides.

In humans, epidemiological studies revealed a significant increase of certain cancers (among others, that of the testicles) and a decrease of the male fertility. Substances with estrogenic activity are often considered, but other hormonal effects are more and more frequently discovered (i.e. anti-androgenic). Numerous worries appear concerning the long-term effects on human health linked to a chronic exposure to these substances by food ingestion. It is urgent to review, not only on the actual contamination of our food by endocrine disruptors (in terms of identification and quantification of every individual chemical), but also the potentially toxic activity of food containing a mixture of contaminants present at levels below their individual toxicity threshold.

BIBLIOGRAPHIE

- ADLERCREUTZ H. Phytoestrogens: state of the art. *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, 1999, **7**, 201–207.
- ANDERSON J.J.B., GARNER S.C. The effects of phytoestrogens on bone. *Nutr. Res.*, 1997, **17**, 1617–1632.
- ANONYME Directive 86/363/CEE du Conseil du 24 juillet 1986 concernant la fixation de teneurs maximales pour les résidus de pesticides sur et dans les denrées alimentaires d'origine animale. *J. Off.*, 1986, **L 221**, 43 – 47.
- ANONYME Directive 90/642/CEE du Conseil, du 27 novembre 1990, concernant la fixation de teneurs maximales pour les résidus de pesticides sur ou dans certains produits d'origine végétale, y compris les fruits et légumes. *J. Off.*, 1990, **L 350**, 71–79.
- ANONYME Directive 2002/72/CE de la Commission du 6 août 2002 concernant les matériaux et objets en matière plastique destinés à entrer en contact avec les denrées alimentaires. *J. Off.*, 2002, **L 220**, 18–58.
- ANONYME Monitoring of pesticide residues in products of plant origin in the European Union, Norway, Iceland and Liechtenstein. [en ligne] (2003). Adresse URL : http://ec.europa.eu/food/fvo/specialreports/pesticide_residues/report_2003_en.pdf, consulté le 18 juillet 2006.
- ANONYME Sécurité et bénéfices des phytoœstrogènes apportés par l'alimentation : recommandations. AFSSA (Agence Française de sécurité sanitaire des aliments). [en ligne] (Mars 2005) Adresse URL : <http://www.afssa.fr/Object.asp?IdObj=28496&Pge=0&CCH=060717171637:26:4&cwSID=1ADC3134A7C94DB1981464078436CD48&AID=0>, consulté le 18 juillet 2006.
- ANONYME Règlement CE n°1907/2006 du parlement européen et du conseil du 18 décembre 2006 concernant l'enregistrement, l'évaluation et l'autorisation des substances chimiques, ainsi que les restrictions applicables à ces substances (REACH), instituant une agence européenne des produits chimiques, modifiant la directive 1999/45/CE et abrogeant le règlement (CEE) n° 793/93 du Conseil et le règlement (CE) n° 1488/94 de la Commission ainsi que la directive 76/769/CEE du Conseil et les directives 91/155/CEE, 93/67/CEE, 93/105/CE et 2000/21/CE de la Commission. *J. Off.*, 2006a, **L 396**, 1–849.
- ANONYME Convention de Stockholm sur les polluants organiques persistants. *J. Off.*, 2006b, **L 209**, 3–29.
- ANONYME Règlement CE n°1881/2006 de la Commission du 19 décembre 2006 portant fixation de teneurs maximales pour certains contaminants dans les denrées alimentaires. *J. Off.*, 2006c, **L 364**, 5–24.
- ANONYME Règlement (CE) No 199/2006 de la Commission du 3 février 2006 modifiant le règlement (CE) n° 466/2001 portant fixation de teneurs maximales pour certains contaminants dans les denrées alimentaires, en ce qui concerne les dioxines et les PCB de type dioxine. *J. Off.*, 2006d, **L 32**, 32–34.
- ANONYME The International Programme for Chemical Safety. [en ligne], (sans date) Adresse URL : <http://www.who.int/ipcs/en/>, consulté le 20 février 2007.
- ANWAY M.D., CUPP A.S., UZUMCU M., SKINNER M.K. Epigenetic transgenerational actions of endocrine disruptors and male fertility. *Science*, 2005, **308**, 1466–1469.
- AUGER J., KUNSTMANN J.M., CZYGLIK F., JOUANNET P. Decline in semen quality among fertile men in Paris during the past 20 years. *N. Engl. J. Med.*, 1995, **332**, 281–285.
- BAYLISS W.M., STARLING E.H. The chemical regulation of the secretory process. *Proceedings of the Royal Society of London. Series A*, 1904, **73**, 310–322.
- BEHNISCH P.A., HOSOE K., SAKAIS. Brominated dioxin-like compounds: in vitro assessment in comparison to classical dioxin-like compounds and other polyaromatic compounds. *Environ. Int.*, 2003, **29**, 861–877.
- BIRNBAUM L.S., STASKAL D.F. Brominated flame retardants: cause for concern? *Environ. Health Perspect.*, 2004, **112**, 9–17.
- BRINKMANN A.O. Steroid hormone receptors: activators of gene transcription. *J. Pediatr. Endocrinol.*, 1994, **7**, 275–282.
- BROWN D.J., VAN OVERMEIRE I., GOEYENS L., DENISON M.S., DE VITO M.J., CLARK G.C. Analysis of Ah receptor pathway activation by brominated flame retardants. *Chemosphere*, 2004, **55**, 1509–1518.
- CARLSEN E., GIWERCMAN A., KEIDING N., SKAKKEBAEK N.E. Evidence for decreasing quality of semen during past 50 years. *BMJ*, 1992, **305**, 609–613.
- CHEN G., BUNCE N.J. Polybrominated diphenyl ethers as Ah receptor agonists and antagonists. *Toxicol. Sci.*, 2003, **76**, 310–320.
- EVANS R.M. The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science*, 1988, **240**, 889–895.
- FUKUZAWA N.H., OHSAKO S., WU Q., SAKAUE M., FUJII-KURIYAMA Y., BABA T., TOHYAMA C. Testicular cytochrome P450scc and LHR as possible targets of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) in the mouse. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 2004, **221**, 87–96.
- GARCIA-VALLVE S., PALAU J. Nuclear receptors, nuclear-receptor factors, and nuclear-receptor-like orphans form a large paralog cluster in Homo sapiens. *Mol. Biol. Evol.*, 1998, **15** 665–682.
- HELBO V., VANDENBROECK M., MAGHUIN-ROGISTER G. Development of a Radioreceptor Assay for $[^2]$ adrenergic agonists. *Arch. Lebensmittelhyg.*, 1994, **45**, 57–61.
- INGRAHAM H.A., REDINBO M.R. Orphan nuclear receptors adopted by crystallography. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 2005, **15**, 708–715.
- IRVINE S., CAWOOD E., RICHARDSON D., MACDONALD E., AITKEN J.

- Evidence of deteriorating semen quality in the United Kingdom: birth cohort study in 577 men in Scotland over 11 years. *BMJ*, 1996, **312**, 467-471.
- KELCE W.R., MONOSSON E., GAMCSIK M.P., LAWS S.C., GRAY L.E. Environmental hormone disruptors: evidence that vinclozolin developmental toxicity is mediated by antiandrogenic metabolites. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 1994, **126**, 276-285.
- KIETZ S., THOMSEN J.S., MATTHEWS J., PETTERSSON K., STROM A., GUSTAFSSON J.A. The Ah receptor inhibits estrogen-induced estrogen receptor beta in breast cancer cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2004, **320**, 76-82.
- GUILLETTE L.J., CRAIN D.A., GUNDERSON M.P., KOOLS S.A.E., MILNES M.R., ORLANDO E.F., ROONEY A.A., WOODWARD A.R. Alligators and Endocrine Disrupting Contaminants: A Current Perspective. *Am. Zool.*, 2000, **40**, 438-452.
- LATINI G. Monitoring phthalate exposure in humans. *Clin. Chim. Acta*, 2005, **361**, 20-29.
- MARCUS A.I. Cancer From Beef. DES, Federal Food Regulation, and Consumer Confidence. Johns Hopkins University Press : Baltimore, 1994, 235 p.
- MEERTS I.A. LETCHER R.J., HOVING S., MARSH G., BERGMAN A., LEMMEN J.G., VANDERBURG B. BROUWER A. In vitro estrogenicity of polybrominated diphenyl ethers, hydroxylated PDBEs, and polybrominated bisphenol A compounds. *Environ. Health Perspect.*, 2001, **109**, 399-407.
- MICKA J., MILATOVICH A., MENON A., GRABOWSKI G.A., PUGA A., NEBERT D.W. Human Ah receptor (AHR) gene: localization to 7p15 and suggestive correlation of polymorphism with CYP1A1 inducibility. *Pharmacogenetics*, 1997, **7**, 95-101.
- MIMURA J., FUJII-KURIYAMA Y. Functional role of AhR in the expression of toxic effects by TCDD. *Biochim. Biophys. Acta*, 2003, **1619**, 263-268.
- MISHRA S.K., ABBOT S.E., CHOUDHURY Z., CHENG M., KHATAB N., MAYCOCK N.J., ZAVERY A., AARONSON P.I. Endothelium-dependent relaxation of rat aorta and main pulmonary artery by the phytoestrogens genistein and daidzein. *Cardiovasc. Res.*, 2000, **46**, 539-546.
- MUNOZ-DE-TORO M., MARKEY C., WADIA P.R., LUQUE E.H., RUBIN B.S., SONNENSCHIN C., SOTO A.M. Perinatal exposure to Bisphenol A alters peripubertal mammary gland development in mice. *Endocrinology*, 2005, **146**, 4138-4147.
- OHTAKE F., TAKEYAMA K., MATSUMOTO T., KITAGAWA H., YAMAMOTO Y., NOHARA K., TOHYAMA C., KRUST A., MIMURA J., CHAMBON P., YANAGISAWA J., FUJII-KURIYAMA Y., KATO S. Modulation of oestrogen receptor signalling by association with the activated dioxin receptor. *Nature*, 2003, **423**, 545-550.
- REYNOLDS P., HURLEY S.E., GOLDBERG D.E. YERABATI S., GUNIER R.B., HERTZ A., ANTON-CULVER H., BERNSTEIN L., DEAPEN D., HORN-ROSS P.L., PEEL D., PINDER R., ROSS R.K., WEST D., WRIGHT W.E., ZIOGAS A. Residential proximity to agricultural pesticide use and incidence of breast cancer in the California Teachers Study cohort. *Environ. Res.*, 2004, **96**, 206-218.
- SAFE S. Endocrine disruptors and human health: is there a problem? *Toxicology*, 2004, **205**, 3-10.
- SAFE S. Clinical correlates of environmental endocrine disruptors. *Trends Endocrinol. Metab.*, 2005, **16**, 139-144.
- SARADHA B., MATHUR P.P. Effect of environmental contaminants on male reproduction. *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, 2006, **21**, 34-41.
- SCIPPO M.L., VAN DE WEERDT C., WILLEMSSEN P. FRANCOIS J.M., RENTIER-DEL RUE F., MULLER M., MARTIAL J.A., MAGHUIN-ROGISTER G. Detection of illegal growth promoters in biological samples using receptor binding assays. *Anal. Chim. Acta*, 2002, **473**, 135-141.
- SCIPPO M.L., ARGIRIS C., VAN DE WEERDT C., MULLER M., WILLEMSSEN P., MARTIAL J., MAGHUIN-ROGISTER G. Recombinant human estrogen, androgen and progesterone receptors for detection of potential endocrine disruptors. *Anal. Bioanal. Chem.*, 2004a, **378**, 664-669.
- SCIPPO M.L., EPPE G., DE PAUW E., MAGHUIN-ROGISTER G. DR-CALUX screening of food samples: evaluation of the quantitative approach to measure dioxin, furans and dioxin-like PCBs. *Talanta*, 2004b, **63**, 1193-1202.
- SCIPPO M.L., RYBERTT S., EPPE G., MASSART A.C., DEPAUW E., MAGHUIN-ROGISTER G. Dioxin analysis in feed: cell-based assay versus mass spectrometry method. *Accreditation Qual. Assur.*, 2006, **11**, 38-43.
- SONNENSCHIN C., SOTO A.M., FERNANDEZ M.F., OLEA N., OLEA-SERRANO M.F., RUIZ-LOPEZ M.D. Development of a marker of estrogenic exposure in human serum. *Clin. Chem.*, 1995, **41**, 1888-1895.
- SWAN S.H., MAIN K.M., LIU F., KRUSE R.L., CALAFAT A.M., MAO C.S., REDMON J.B., TERNAND C.L., SULLIVAN S., TEAGUE J.L. Decrease in anogenital distance among male infants with prenatal phthalate exposure. *Environ. Health Perspect.*, 2005, **113**, 1056-1061.
- TIMMS B.G., HOWDESHILL K.L., BARTON L., BRADLEY S., RICHTER C.A., VOM SAAL F.S. Estrogenic chemicals in plastic and oral contraceptives disrupt development of the fetal mouse prostate and urethra. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2005, **102**, 7014-7019.
- TRUSS M., BEATO M. Steroid hormone receptors: interaction with deoxyribonucleic acid and transcription factors. *Endocr. Rev.*, 1993, **14**, 459-479.
- TSAI M.J., O'MALLEY B.W. Molecular mechanisms of action of steroid/thyroid receptor superfamily members. *Annu. Rev.*

- Biochem.*, 1994, **63**, 451-486.
- UZUMCU M., SUZUKI H., SKINNER M.K. Effect of the anti-androgenic endocrine disruptor vinclozolin on embryonic testis cord formation and postnatal testis development and function. *Reprod. Toxicol.*, 2004, **18**, 765-774.
- VAN DEN BERG M., BIRNBAUM L., BOSVELD A.T.C., BRUNSTROM B., COOK P., FEELEY M., GIESY J.P., HANBERG A., HASEGAWA R., KENNEDY S.W., KUBIAK T., LARSEN J.C., VAN LEEUWEN F.X., LIEM A.K., NOLT C., PETERSON R.E., POELLINGER L., SAFE S., SCHRENK D., TILLITT D., TYSKLIND M., YOUNES M., WAERN F., ZACHAREWSKI T. Toxic Equivalency Factors (TEFs) for PCBs, PCDDs, PCDFs for humans and wildlife. *Environ. Health Perspect.*, 1998, **106**, 775-792.
- VANDENBERG M., BIRNBAUM L.S., DENISON M., VITO M.D., FARLAND W., FEELEY M., FIEDLER H., HAKANSSON H., HANBERG A., HAWS L., ROSE M., SAFE S., SCHRENK D., TOHYAMAC., TRITSCHER A., TUOMISTO J., TYSKLIND M., WALKER N., PETERSON R.E. The 2005 World Health Organization reevaluation of human and mammalian toxic equivalency factors for dioxins and dioxin-like compounds. *Toxicol. Sci.*, 2006, **93**, 223-241.
- WEBER R., HAGENMAIER H. Synthesis and analysis of mixed chlorinated-fluorinated dibenzop-dioxins and dibenzofurans and assessment of formation and occurrence of the fluorinated and chlorinated-fluorinated dibenzop-dioxins and dibenzofurans. *Chemosphere*, 1997, **34**, 13-28.
- WEITZMAN J. A ban on estrogens ? *Scientist*, 2005, **19**, 24-25.
- WHITE R., PARKER M.G. Molecular mechanisms of steroid hormone action. *Endocr. Relat. Cancer*, 1998, **5**, 1-14.
- WILLEMSSEN P., SCIPPO M.L., MAGHUIN-ROGISTER G., MARTIAL J.A., MULLER M. Use of specific bioluminescent cell lines for the detection of steroid hormone (ant)agonists in meat producing animals. *Anal. Chim. Acta*, 2002, **473**, 119-126.
- WILLEMSSEN P., SCIPPO M.L., KAUSEL G., FIGUEROA J., MAGHUIN-ROGISTER G., MARTIAL J.A., MULLER M. Use of reporter cell lines for detection of endocrine-disrupter activity. *Anal. Bioanal. Chem.*, 2004, **378**, 655-663.
- WILLEMSSEN P., SCIPPO M.L., MAGHUIN-ROGISTER G., MARTIAL J.A., MULLER M. Enhancement of steroid receptor-mediated transcription for the development of highly responsive bioassays. *Anal. Bioanal. Chem.*, 2005, **382**, 894-905.
- WILLIAMS G.R., FRANKLYN J.A. Physiology of the steroid-thyroid hormone nuclear receptor superfamily. *Baillieres Clin. Endocrinol. Metab.*, 1994, **8**, 241-266.
- WORMKE M., STONER M., SAVILLE B., WALKER K., ABDELRAHIM M., BURGHARDT R., SAFE S. The aryl hydrocarbon receptor mediates degradation of estrogen receptor alpha through activation of proteasomes. *Mol. Cell. Biol.*, 2003, **23**, 1843-1855.