

2008

ACADÉMIE DES SCIENCES

**HORMONES,
SANTÉ PUBLIQUE
ET ENVIRONNEMENT**

Sous la direction de
EDWIN MILGROM et
ÉTIENNE-ÉMILE BAULIEU



INSTITUT DE FRANCE
Académie des sciences

Hormones, santé publique et environnement

RAPPORT SUR LA SCIENCE ET LA TECHNOLOGIE N° 28

Animateurs : Edwin Milgrom et Étienne-Émile Baulieu

ACADÉMIE DES SCIENCES



17, avenue du Hoggar
Parc d'activités de Courtabœuf, BP 112
91944 Les Ulis Cedex A, France

Rapports sur la science et la technologie

- *Sciences et pays en développement. Afrique subsaharienne francophone*
RST n° 21, 2006.
- *La recherche spatiale française*
RST n° 22, 2006.
- *L'épidémiologie humaine. Conditions de son développement en France, et rôle des mathématiques*
RST n° 23, 2006.
- *La maîtrise des maladies infectieuses. Un défi de santé publique, une ambition médico-scientifique*
RST n° 24, 2006.
- *Les eaux continentales*
RST n° 25, 2006.
- *La fusion nucléaire : de la recherche fondamentale à la production d'énergie ?*
RST n° 26, 2006.
- *Cycles biogéochimiques et écosystèmes continentaux*
RST n° 27, 2007.

Imprimé en France

© 2008, EDP Sciences, 17, avenue du Hoggar, BP 112, Parc d'activités de Courtabœuf,
91944 Les Ulis Cedex A

Tous droits de traduction, d'adaptation et de reproduction par tous procédés réservés pour tous pays. Toute reproduction ou représentation intégrale ou partielle, par quelque procédé que ce soit, des pages publiées dans le présent ouvrage, faite sans l'autorisation de l'éditeur est illicite et constitue une contrefaçon. Seules sont autorisées, d'une part, les reproductions strictement réservées à l'usage privé du copiste et non destinées à une utilisation collective, et d'autre part, les courtes citations justifiées par le caractère scientifique ou d'information de l'œuvre dans laquelle elles sont incorporées (art. L. 122-4, L. 122-5 et L. 335-2 du Code de la propriété intellectuelle). Des photocopies payantes peuvent être réalisées avec l'accord de l'éditeur. S'adresser au : Centre français d'exploitation du droit de copie, 3, rue Hautefeuille, 75006 Paris. Tél. : 01 43 26 95 35.

ISBN 978-2-86883-895-7

Académie des sciences

Rapport Science et Technologie

Le Comité interministériel du 15 juillet 1998, à l'initiative du ministre de l'Éducation nationale, de la Recherche et de la Technologie, a confié à l'Académie des sciences l'établissement du rapport biennal sur l'état de la science et de la technologie.

Pour répondre à cette demande, l'Académie des sciences a mis en place en son sein le Comité « *Rapport Science et Technologie* » (RST), chargé de choisir les sujets d'étude et de suivre les travaux.

Chaque thème retenu est conduit par un groupe de travail animé par un membre ou un correspondant de l'Académie, entouré d'experts.

Chaque rapport est soumis au Comité RST, à un Groupe de lecture critique, et à l'Académie des sciences.

Depuis 1999, vingt-sept rapports ont ainsi été édités et remis au ministre délégué à la Recherche.

COMPOSITION DU COMITÉ RST

Christian AMATORE

Membre de l'Académie des sciences – Professeur à l'École normale supérieure, université Pierre-et-Marie-Curie

Jean-François BACH

Secrétaire perpétuel de l'Académie des sciences – Professeur à l'université René-Descartes

François BACCELLI

Membre de l'Académie des sciences – Directeur de recherche à l'Institut national de recherche en informatique et en automatique

Roger BALIAN

Membre de l'Académie des sciences – Conseiller scientifique au Commissariat l'énergie atomique

Patrick CHARNAY

Correspondant de l'Académie des sciences – Directeur de recherche au Centre national de la recherche scientifique

François CUZIN

Membre de l'Académie des sciences – Professeur à l'université de Nice-Sophia-Antipolis

Jean DERCOURT

Secrétaire perpétuel de l'Académie des sciences – Professeur émérite à l'université Pierre-et-Marie-Curie

Henri DÉCAMP

Correspondant de l'Académie des sciences – Directeur de recherche émérite au Centre national de la recherche scientifique

Christian DUMAS

Membre de l'Académie des sciences – Professeur à l'École normale supérieure de Lyon

Pierre ENCRENAZ

Membre de l'Académie des sciences – Professeur à l'université Pierre-et-Marie-Curie

Jules HOFFMANN

Président de l'Académie des sciences –
Directeur de recherche au Centre national de recherche scientifique

Marc JEANNEROD

Membre de l'Académie des sciences – Professeur émérite à l'université Claude-Bernard

Jean-Pierre KAHANE

Membre de l'Académie des sciences – Professeur émérite à l'université Paris-Sud Orsay

Bernard MEUNIER

Membre de l'Académie des sciences – Président-directeur général de Palumed
– Professeur chargé de cours à l'École polytechnique

Paul-Henri REBUT

Correspondant de l'Académie des sciences – Conseiller scientifique auprès du Haut commissaire à l'énergie atomique

Jean SALENÇON

Vice-président de l'Académie des sciences – Ingénieur général honoraire des ponts et chaussées – Professeur honoraire à l'École polytechnique et à l'École nationale des ponts et chaussées

Erich SPITZ

Correspondant de l'Académie des sciences – Conseiller du groupe Thales

Pierre SUQUET

Membre de l'Académie des sciences – Directeur de recherche au Centre national de recherche scientifique

Philippe TAQUET

Membre de l'Académie des sciences – Professeur au Muséum national d'histoire naturelle

Alain-Jacques VALLERON

Membre de l'Académie des sciences – Professeur à l'université Pierre-et-Marie-Curie

Jean-Christophe YOCCOZ

Membre de l'Académie des sciences – Professeur au Collège de France

Coordination éditoriale :**Jean-Yves CHAPRON**

Directeur du service des Publications de l'Académie des sciences, assisté de
Joëlle FANON

AVANT-PROPOS

Jean-François Bach

Secrétaire perpétuel

L'existence d'hormones, jouant un rôle crucial pour le fonctionnement physiologique et pathologique de l'organisme, est connue depuis très longtemps. Ainsi, c'est en 1921 que Frederick Grant Banting et Charles Herbert Best découvrirent l'insuline. Il suffira ensuite de quelques années pour que les premiers malades diabétiques reçoivent l'insuline nécessaire à leur survie. La découverte des principales hormones, de leurs caractéristiques structurales et de leurs propriétés diversifiées allait suivre rapidement. Parallèlement, les récepteurs des hormones étaient découverts et leur structure identifiée, ouvrant les perspectives d'une nouvelle pharmacologie et d'une ouverture considérable sur les voies de signalisation cellulaire ayant des applications majeures au-delà même du champ des hormones.

En ce début de XXI^e siècle, de nombreuses questions restent posées au plan scientifique fondamental, recouvrant la problématique plus générale de la biologie cellulaire et des régulations qui permettent à l'organisme de s'adapter, avec une finesse extraordinaire, aux situations variables, parfois extrêmes, auquel il est soumis.

Mais le problème n'est pas seulement d'ordre scientifique, il est aussi, dans une large mesure, d'ordre médical et sociétal. C'est l'objet de ce présent rapport que d'évoquer les plus importants de ces problèmes situés à l'interface des sciences médicales et de la société. Du point de vue strictement médical, quatre questions se posent avec une acuité croissante et une importance illustrée par le nombre considérable de sujets concernés : les relations entre hormones et cancers, le traitement substitutif de la ménopause, la contraception hormonale au long terme et l'influence de certaines hormones sur le développement de l'obésité et du diabète de type 2. Un autre sujet important, également traité dans cet ouvrage, concerne le vieillissement, conçu comme un ensemble complexe de facteurs biologiques, cognitifs, sociaux et finalement sociétaux, une question mise au premier plan des préoccupations devant la croissance persistante de la longévité.

Un dernier aspect concerne l'utilisation des hormones hors de la médecine, notamment chez les animaux comestibles. Un chapitre inédit de qualité exceptionnelle fait le point sur le sujet. Un autre aspect, plus technique mais également

de grande importance, concerne les perturbateurs hormonaux, des produits chimiques de l'environnement qui peuvent modifier, de façon indésirable, la production de certaines hormones.

En bref, un rapport sur un sujet de grande actualité réalisé au plus haut niveau par les meilleurs experts du domaine. Nous remercions Edwin Milgrom, Étienne-Émile Baulieu, bien sûr, mais aussi tous les auteurs qui ont participé à la rédaction de l'ouvrage.

COMPOSITION DU GROUPE DE TRAVAIL

Animateurs

Edwin MILGROM	Professeur des universités-praticien hospitalier honoraire – Faculté de médecine de Bicêtre
Étienne-Émile BAULIEU	Professeur honoraire au Collège de France – Unité mixte de recherche Stéroïdes, neuroprotection et neurorégénération (UMR 788 Inserm)

Membres

Philippe BOUCHARD	Professeur des universités-praticien hospitalier – Service Endocrinologie – Hôpital Saint-Antoine
Alain PARIS	Directeur de recherche à l'Inra de Toulouse – Unité Xénobiotiques (UMR 1089 Inra/ENVT)
Jean-Paul RIOU	Professeur des universités-praticien hospitalier – Service Endocrinologie, diabétologie, nutrition – Hôpital Édouard Herriot
Henri ROCHEFORT	Correspondant de l'Académie des sciences – Professeur des universités-praticien hospitalier – Unité Endocrinologie moléculaire et cellulaire des cancers (U 540 Inserm) – Faculté de médecine de Montpellier
Jean-François SAVOURET	Directeur de recherche à l'Inserm – Unité mixte de recherche Pharmacologie, toxicologie et signalisation cellulaire (UMR-S747 Inserm/Université Paris V)

Coordonnateur

Jean-François BACH

Secrétaire perpétuel de l'Académie
des sciences – Professeur à l'université
René-Descartes**Ont également participé à la rédaction du rapport***Chapitre 1*

Vincent CAVAILLÈS

Directeur de l'unité Signalisation hormonale,
environnement et cancer (SHEC)
(U 824 Inserm) – Centre de recherche
en cancérologie de Montpellier

Dany CHALBOS

Directeur de recherche à l'Inserm – Unité
Contrôle de la progression des cancers,
hormonodépendants – Centre de recherche
en cancérologie de Montpellier

Olivier CUSSENOT

Professeur des universités-praticien
hospitalier – Service Urologie –
Hôpital Tenon

Thierry MAUDELONDE

Professeur des universités-praticien
hospitalier – Chef de service du laboratoire
de Biologie cellulaire et hormonale –
Hôpital Arnaud de Villeneuve – Montpellier

Louis MAURIAC

Praticien hospitalier – Centre régional
de lutte contre le cancer de Bordeaux –
Institut Bergonié

Pascal PUJOL

Professeur des universités-praticien
hospitalier – Laboratoire de biologie
cellulaire et hormonale et service
d'oncogénétique – Hôpital Arnaud
de Villeneuve – Montpellier

Paul ROBEL

Directeur de recherche émérite au CNRS –
Unité Stéroïdes et systèmes nerveux :
physiopathologie moléculaire et clinique
(U 488 Inserm)

Dominique STOPPA-LYONNET Chef du service de Génétique oncologique –
Institut Curie Paris

Sous-chapitre 2.1

Christian ROUX Professeur des universités-praticien
hospitalier – Président du Groupe
de recherche et d’informations sur les
ostéoporoses (GRIO) – Centre d’évaluation
des maladies osseuses – Hôpital Cochin

Régine SITRUK-WARE Endocrinogynécologue – Hôpital Necker

Sous-chapitre 2.2

Zelia FRANCIS Service d’endocrinologie –
Hôpital Saint-Antoine

Sophie CHRISTIN-MAÎTRE Professeur des universités-praticien
hospitalier – Service d’endocrinologie –
Hôpital Saint-Antoine

Chapitre 4

Yves LE BOUC Professeur des universités-praticien
hospitalier – Faculté de médecine
Saint-Antoine

Jean-Claude SOUBERBIELLE Praticien hospitalier – Explorations
fonctionnelles multidisciplinaires –
Hôpital Necker

Alex VERMEULEN Professeur à l’hôpital universitaire de Gand –
Belgique

Chapitre 5

Denis BARD Docteur en médecine, épidémiologiste –
École nationale de la santé publique
de Rennes – Vice-président du Comité
de la prévention et de la précaution

André PICOT
Directeur de recherche honoraire au CNRS –
Président de l'Association toxicologie-Cnam
– Expert auprès de l'Union européenne pour
la fixation des normes des produits
chimiques en milieu de travail
(DG. V – Luxembourg)

Chapitre 6

François ANDRÉ
Professeur à l'École nationale vétérinaire de
Nantes – Unité de recherche LABERCA

Jean-Philippe ANTIGNAC
Ingénieur à l'École nationale vétérinaire de
Nantes – Unité de recherche LABERCA

Michel BONNEAU
Directeur de recherche à l'Unité mixte
de recherche Systèmes d'élevage,
nutrition animale et humaine
(UMR 1079 SENAH Inra) – Rennes

Christian BRIANT
Ingénieur à l'Unité mixte de recherche
Physiologie de la reproduction
et des comportements (UMR 6175
Inra/CNRS/Université de Tours/Haras
nationaux)

Alain CARATY
Ingénieur à l'Unité mixte de recherche
Physiologie de la reproduction
et des comportements (UMR 6175
Inra/CNRS/Université de Tours/Haras
nationaux)

Yves CHILLIARD
Directeur de recherche à l'Unité
de recherche sur les Herbivores (UR 1213) –
Inra Saint-Genes Champanelle

Yves COGNIE
Ingénieur à l'Unité mixte de recherche
Physiologie de la reproduction
et des comportements (UMR 6175
Inra/CNRS/Université de Tours/Haras
nationaux)

Yves COMBARNOUS	Directeur de recherche à l'Unité mixte de recherche Physiologie de la reproduction et des comportements (UMR 6175 Inra/CNRS/Université de Tours/Haras nationaux)
Jean-Pierre CRAVEDI	Directeur de recherche à l'Unité Xénobiotiques (UMR 1089 Inra/ENV) – Toulouse
Claude FABRE-NYS	Directeur de recherche à l'Unité mixte de recherche Physiologie de la reproduction et des comportements (UMR 6175 Inra/CNRS/Université de Tours/Haras nationaux)
Adriana FERNANDEZ-SUAREZ	Instituto Nacional de Tecnologia Agropecuaria (INTA) – Argentine
Alex FOSTIER	Directeur de recherche à l'Institut fédératif de recherche Génétique fonctionnelle agronomie et santé (IFR 140) – Station commune de recherches en ichtyophysiologie, biodiversité et environnement (UR 1037 Inra/Scribe) – Rennes
Patrice HUMBLLOT	Directeur scientifique à l'Union nationale des coopératives d'élevage et d'insémination animale (UNCEIA) – Département Recherche et développement
Vincent LAUDET	Professeur à l'Institut fédératif de recherche Biosciences Gerland-Lyon Sud (IFR 128) – Laboratoire de Biologie moléculaire de la cellule (UMR 5161CNRS/ENS Lyon – UMR1237 Inra)
Bruno LE BIZEC	Professeur à l'École nationale vétérinaire de Nantes – Unité de recherche LABERCA
Bernard LEBOEUF	Ingénieur de l'Unité d'enseignement Insémination caprine et porcine (UE 88 Inra) – Rouillé

Isabelle LOUVEAU	Chargé de recherche à l'Unité mixte de recherche Systèmes d'élevage, nutrition animale et humaine (UMR 1079 SENAH Inra) – Rennes
Benoît MALPAUX	Directeur de recherche à l'Unité mixte de recherche Physiologie de la reproduction et des comportements (UMR 6175 Inra/CNRS/Université de Tours/Haras nationaux)
Françoise MARTINAT-BOTTE	Ingénieur à l'Unité mixte de recherche Physiologie de la reproduction et des comportements (UMR 6175 Inra/CNRS/Université de Tours/Haras nationaux)
Marie-Christine MAUREL	Ingénieur à l'Unité mixte de recherche Physiologie de la reproduction et des comportements (UMR 6175 Inra/CNRS/Université de Tours/Haras nationaux)
Maria-Teresa PELICER-RUBIO	Ingénieur à l'Unité mixte de recherche Physiologie de la reproduction et des comportements (UMR 6175 Inra/CNRS/Université de Tours/Haras nationaux)
Nicole PICARD-HAGEN	Professeur à l'École nationale vétérinaire de Toulouse – Unité mixte de recherche Physiopathologie et toxicologie expérimentales (UMR 181 Inra/ENVT)
Louis PINAULT	Professeur émérite à l'École nationale vétérinaire de Nantes
Gaud PINEL	Ingénieur à l'École nationale vétérinaire de Nantes – Unité de recherche LABERCA
Claire PONSART	Ingénieur à l'UNCEIA – Département Recherche et développement

Marie-Agnès POPOT	Ingénieur au Laboratoire des courses hippiques – Verrières-le-Buisson
Philippe SCHMIDELY	Professeur à l'unité mixte de recherche Physiologie de la nutrition et alimentation (UMR 791 Inra Paris-Grignon) – Département des sciences animales
Pierre-Louis TOUTAIN	Professeur à l'unité mixte de recherche Physiopathologie et toxicologie expérimentales (UMR 181 Inra/ENVT) – Toulouse
Daniel ZALKO	Chargé de recherche à l'Unité mixte de recherche Xénobiotiques (UMR 1089 Inra/ENVT) – Toulouse

TABLE DES MATIÈRES

Rapport Science et Technologie	iii
Composition du Comité RST	v
Avant-propos	vii
Composition du groupe de travail	ix
Résumé	xxiii
Summary	xxxiii
Recommandations générales	xliii
Introduction	1
CHAPITRE 1 Les cancers hormonodépendants	11
1. Mécanismes de base du contrôle de la transcription par les hormones stéroïdes	15
1.1. Les récepteurs des œstrogènes	15
1.2. Expression des RE	17
1.3. Les cofacteurs transcriptionnels	17
1.4. Activation en deux temps des RE par les œstrogènes	19
1.5. Effets génomiques ERE-indépendants par interactions protéine-protéine	20
1.6. Modifications post-traductionnelles des récepteurs	21
2. Les mécanismes généraux de la cancérogenèse hormonale	21
2.1. Les mécanismes généraux de la cancérogenèse	21

2.2.	Arguments expérimentaux de l'effet cocarcinogène des hormones	22
2.3.	Arguments cliniques et épidémiologiques	22
2.4.	Deux grands types de mécanismes	23
2.5.	Les premières étapes de la cancérogenèse hormonale humaine sont encore mystérieuses	25
2.6.	Les cancers héréditaires sont rares	25
3.	Cancers du sein et hormones ovariennes	26
3.1.	Des lignées cellulaires aux malades : gènes et protéines régulés par les œstrogènes et marqueurs pronostiques et prédictifs dans les cancers du sein	26
3.2.	Mécanismes de régulation de la prolifération de lignées de cellules cancéreuses par les œstrogènes et leurs récepteurs	28
3.3.	Les autres effets des œstrogènes et de leurs récepteurs	31
3.4.	Les étapes initiales de la cancérogenèse mammaire sont très mal connues	31
3.5.	Mécanismes d'action de la progestérone et des progestatifs en cancérogenèse humaine	32
3.6.	Les causes endogènes et exogènes responsables d'un apport accru d'œstrogènes	35
4.	Les aspects cliniques des cancers du sein	35
4.1.	Les traitements hormonaux	35
4.2.	Les essais de chimioprévention des cancers du sein	39
4.3.	Formes héréditaires de cancer du sein liées à BRCA1/2 et leur prévention	42
4.4.	Le cancer du sein chez l'homme est rare	43
5.	Les autres cancers sensibles aux œstrogènes et aux progestatifs	44
5.1.	Cancer de l'endomètre	44
5.2.	Cancer de l'ovaire	45
5.3.	Cancers des tissus non sexuels	45
6.	Hormones et cancers de la prostate	46
6.1.	Introduction	46
6.2.	Rôle des hormones stéroïdes sexuelles dans le développement, la prolifération et le vieillissement de la prostate	46
6.3.	Facteurs de risque	49
6.4.	Prévention et dépistage des cancers de la prostate	51
6.5.	Hormonothérapie des cancers de la prostate	52

CHAPITRE 2	Le traitement substitutif de la ménopause – La contraception	67
SOUS-CHAPITRE 2.1	Réévaluation des modalités et de la place du traitement hormonal de la ménopause	69
1.	L'évolution des idées	72
2.	Les faits	74
3.	Les leçons des grandes études d'intervention et des autres études contrôlées	76
3.1.	Heart and Estrogen/Progestin Study (HERS and HERS II) (2002)	76
3.2.	L'étude WHI	78
3.3.	Les études EPAT et WELL-HART	80
3.4.	L'étude « The Million Women Study » (MWS)	81
3.5.	L'étude ESTHER	82
3.6.	L'étude E3N-EPIC	82
3.7.	La mortalité et le traitement hormonal de la ménopause	83
3.8.	Les dernières données de 2006 et 2007	83
4.	L'os après la ménopause	86
4.1.	Les faits	86
4.2.	Discussion	87
5.	Le bon choix	88
6.	Les cas particuliers	90
SOUS-CHAPITRE 2.2	Contraception, état des lieux et nouvelles cibles	101
1.	Cibles de la contraception	103
2.	La contraception d'aujourd'hui	104
2.1.	La contraception œstroprogestative	104
2.2.	La contraception progestative	107
2.3.	Les modulateurs sélectifs des récepteurs de la progestérone (SPRM)	108
3.	La contraception du futur	111
3.1.	Contraception hormonale masculine	112
3.2.	Les méthodes non hormonales de contraception masculine	115
3.3.	La chimiotaxie du sperme	116
3.4.	Protéines impliquées dans le métabolisme et la maturation des gamètes	116

3.5. Interaction spermatozoïde-ovocyte	117
3.6. Les protéines impliquées dans la mobilité des spermatozoïdes	117
3.7. Les cytokines impliquées dans l'ovulation et dans l'implantation	118
3.8. Les spermicides	118
3.9. L'immunocontraception	119

CHAPITRE 3 Obésité et diabète de type 2 127

1. L'obésité	131
1.1. Épidémiologie	131
1.2. Une maladie de l'adaptation	131
1.3. Le tissu adipeux (TA) : un tissu complexe aux fonctions multiples	132
1.4. Relations entre obésité abdominale, pathologies cardiovasculaires et diabète de type 2	134
1.5. Rôle du cerveau dans la régulation de l'appétit et de la dépense énergétique	135
1.6. Évaluation des politiques scientifiques, de santé publique et des industries agroalimentaires face à l'épidémie d'obésité	137
2. Le diabète	138
2.1. Classification, évolution de la prise en charge et de la recherche	138
2.2. Physiopathologie du diabète de type 2 : le paradigme	140
2.3. Génétique, diabète de type 2 et environnement	140
2.4. Insulinorésistance et diabète de type 2	141
2.5. Insulinosécrétion et diabète de type 2	142
2.6. Complications micro- et macro-angiopathiques du diabète de type 2	143
2.7. Évaluation des politiques scientifiques, de santé publique et des industries pharmaceutiques	144

CHAPITRE 4 Hormones, longévité et vieillissement humain 149

1. Trois séries hormonales modifiées avec l'âge	154
1.1. Des changements majeurs de la fonction des gonades et de la reproduction : les hormones sexuelles	154
1.2. Les corticosurrénales : l'adrénopause, une dissociation surprenante (cortisol vs. DHEA)	160
1.3. Diminution de l'hormone de croissance hypophysaire et de l'IGF-1 : la somatopause	164

2.	Trois domaines endocrinologiques intégrés en péril – autres hormones	167
2.1.	Le vieillissement de l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien (HPA) et le stress	167
2.2.	Complexité hormonale, longévité : insuline, pancréas, « maladie métabolique », tissus graisseux, restriction calorique, autres hormones	171
2.3.	Vieillesse du cerveau : le rôle des hormones	174
2.4.	Autres hormones	179
3.	Globalement : fragilité du vieillissement, un phénomène hormono-sensible	183
3.1.	La fragilité et ses critères	184
3.2.	Le vieillissement, un phénotype hormono-sensible	186
3.3.	Et la durée de la vie ?	187

CHAPITRE 5 Perturbateurs hormonaux 193

1.	La perturbation hormonale	196
1.1.	Définition	196
1.2.	Mécanismes de la perturbation hormonale	198
2.	Les initiatives internationales	199
3.	Sources et absorption des xénobiotiques	201
3.1.	Eau	201
3.2.	Alimentation et sources diffuses	202
4.	Les familles chimiques de perturbateurs endocriniens	203
4.1.	Pesticides xéno-œstrogènes	203
4.2.	Plastifiants et produits industriels divers	204
4.3.	Xénobiotiques végétaux et phyto-œstrogènes	205
4.4.	Polyhalogénobiphényles	206
4.5.	Les dioxines et autres ligands du récepteur AhR	207
4.6.	Métaux et éléments mixtes	209
5.	Cibles et mécanismes d'action	209
5.1.	Synthèse et transport des hormones	209
5.2.	Liaison directe aux récepteurs nucléaires	212
5.3.	Interférences entre AhR et récepteurs nucléaires	212
5.4.	Variations inter-espèces – Données génétiques et populations à risque	213
5.5.	Morphologie cellulaire	214
5.6.	Maturation des cellules germinales	215
5.7.	Effets <i>in utero</i> et épigénèse	215
6.	La controverse sur la perturbation endocrine	216

7. La détection des perturbateurs endocriniens	217
7.1. Les méthodes de détection	217
7.2. L'interprétation des données	218
8. Quelques voies de recherche	219
8.1. Le tabagisme : un modèle de perturbation hormonale générale .	219
8.2. Ligands AhR et diabète	220
8.3. Les possibilités thérapeutiques	221

**CHAPITRE 6 L'utilisation des hormones en élevage :
les développements zootecniques
et les préoccupations de santé publique 239**

1. Les maîtrises de la physiologie des animaux d'élevage	243
1.1. La croissance et l'engraissement	243
1.2. La reproduction	249
1.3. La production d'embryons	256
1.4. La production laitière	258
1.5. La croissance et la reproduction des poissons	261
2. L'évaluation et la gestion des risques toxicologiques éventuels liés à l'utilisation des hormones en élevage	263
2.1. L'évaluation toxicologique des substances utilisées	263
2.2. Le cadre réglementaire	276
2.3. L'évolution des contrôles	279

Groupe de lecture critique 289

Composition du Groupe de lecture critique	291
Commentaire de l'Académie vétérinaire de France	293
Commentaire de la Conférence des présidents d'université	297
Commentaire du LEEM	299

**Présentation à l'Académie des sciences,
par Michel Le Moal 301**

RÉSUMÉ

L'endocrinologie étudie la physiologie et la pathologie des glandes à sécrétion interne et de leurs produits, les hormones.

Au cours des dernières décennies, les découvertes faites initialement en endocrinologie, et en particulier dans le domaine du mécanisme d'action cellulaire et moléculaire, ont pu être généralisées à un grand nombre d'autres mécanismes de signalisation (facteurs de croissance, neuromédiateurs, interleukines, etc.). L'endocrinologie est donc devenue un modèle pour l'étude de l'ensemble des mécanismes de signalisation inter- et intracellulaires, un des domaines-clés de la biologie et actuellement en très rapide développement.

On peut citer, comme exemple de l'évolution de la discipline, le cas des récepteurs couplés aux protéines G. C'est ainsi qu'en partant de l'étude de la synthèse du glucose dans le foie sous l'influence de l'adrénaline et du glucagon, on arriva à la découverte de l'AMP cyclique, à celle des protéines G, à la description des récepteurs β -adrénergiques qui, elle-même, déboucha sur la caractérisation de la **famille des récepteurs couplés aux protéines G**. Cette énorme famille caractérisée par ses sept domaines transmembranaires (récepteurs serpentins) comprend dans l'espèce humaine plus de 800 membres différents. À elle seule, elle correspond à environ 2-3 % de tous les gènes humains. En fait, la majorité des récepteurs couplés aux protéines G reconnaît des ligands non endocriniens : lumière, odeur, goût, etc. Certains interviennent dans le développement (détermination et prolifération cellulaires, polarisation. . .).

Un grand nombre de récepteurs à sept domaines transmembranaires n'ont même pas de ligand *stricto sensu* mais interviennent dans l'adhésion cellulaire par l'intermédiaire de domaines EGF (epidermal growth factor) inclus dans leur partie N terminale extracellulaire.

Sur le plan thérapeutique, ces récepteurs sont devenus des cibles majeures pour le développement de nouveaux médicaments : environ 50 % de nouvelles molécules thérapeutiques sont dirigés contre eux. D'ores et déjà, un quart des 100 médicaments les plus utilisés appartient à cette catégorie.

L'étude de la **famille des récepteurs nucléaires** montre également comment l'endocrinologie a débouché sur des mécanismes de signalisation très variés.

Là où, à l'origine, on suspectait l'existence de six récepteurs (les cinq familles de stéroïdes et les hormones thyroïdiennes), on a découvert 48 gènes différents

de fonctions très variées. Beaucoup des protéines correspondantes restent en attente de ligand.

Il faut souligner que les récepteurs nucléaires ont été les premiers régulateurs transcriptionnels de mammifères caractérisés, purifiés, clonés. Ils ont servi et servent encore de modèles de première importance dans l'étude des mécanismes généraux de la transcription des gènes.

Inversement, de nouvelles hormones ont été décrites à partir de la découverte de leurs récepteurs (endocrinologie reverse). Dans certains cas, des systèmes entiers hormone-récepteur ont été décrits à partir de l'analyse du génome.

Les régulations endocriniennes, qui permettent à l'organisme de répondre à l'environnement, ont été sélectionnées au cours de l'évolution. Or, relativement récemment, l'homme est devenu capable de modifier son environnement dans des proportions telles qu'un certain nombre de mécanismes hormonaux se sont trouvés en porte-à-faux, entraînant l'apparition ou l'exacerbation de pathologies nouvelles.

Pour ce rapport, nous avons choisi de traiter sept exemples particulièrement importants dans leurs conséquences pour les domaines de la santé publique et de l'environnement :

- cancers hormonodépendants ;
- traitement substitutif de la ménopause ;
- contraception, état des lieux et nouvelles cibles ;
- obésité et diabète de type 2 ;
- hormones et vieillissement ;
- perturbateurs hormonaux ;
- utilisation des hormones en élevage : les développements zootechniques et les préoccupations de santé publique.

Dans chaque cas, les données scientifiques actuelles sont exposées et des recommandations avancées sur le plan de la recherche, des soins ou de la réglementation.

Les cancers stimulés par les hormones stéroïdes sexuelles incluent les cancers les plus fréquents chez la femme (sein) et chez l'homme (prostate) avec environ 40 000 nouveaux cas de chaque par an. Ils constituent un problème

majeur de santé publique. Leur prévalence en France a doublé en vingt ans pour le cancer du sein. À l'exception de cancers héréditaires dus à des gènes de susceptibilité (seulement 1 à 2 % des cancers du sein sont dus aux mutations des gènes BRCA1/2), la grande majorité de ces cancers sont sensibles à l'effet de promoteur de tumeur des hormones stéroïdes correspondantes, œstrogènes et progestérone pour le sein et testostérone pour la prostate. Ces hormones ne modifient pas la structure des gènes mais leur expression en protéines responsables des activités favorisant la croissance et l'invasion tumorale. Cet effet réversible est essentiellement dû à la stimulation des cellules transformées (ou initiées) par d'autres agents *via* leur interaction avec des récepteurs nucléaires spécifiques, par modulation de l'expression de plusieurs gènes dont certains restent à préciser. Les cancers exprimant ces récepteurs peuvent être inhibés par des antagonistes hormonaux et/ou en supprimant la production des hormones correspondantes. Le tamoxifène, qui est maintenant très largement utilisé dans le monde, a constitué le premier exemple de thérapie « intelligente » des tumeurs solides, ciblée sur une molécule impliquée en cancérogenèse.

Parmi les recherches réalisables pouvant diminuer l'incidence et la mortalité de ces cancers, citons : a) les mécanismes de résistance aux traitements antihormonaux ; b) le rôle des hormones dans les étapes initiales de la cancérogenèse, ce qui permettrait d'améliorer les actions de prévention ; c) un développement concerté (chercheurs, cliniciens, industries pharmaceutiques) de nouvelles cibles thérapeutiques avec des essais cliniques randomisés ambitieux et sur des molécules originales découvertes et développées en France. En attendant le résultat de ces recherches, une hygiène de vie évitant les facteurs de risque connus (obésité, alcool, substitution hormonale de la ménopause...) doit être encouragée par une information actualisée des médecins.

La ménopause est la période de la vie qui succède à l'épuisement du capital folliculaire ovarien, lequel survient à 51 ans en moyenne. C'est dire que, compte tenu de l'espérance de vie actuelle, les femmes passent presque un tiers de leur vie sans hormones ovariennes. L'absence de follicules et la carence hormonale qui en résultent ont pour conséquence l'apparition de symptômes qui compromettent la qualité de vie des femmes, comme les bouffées de chaleur, les sueurs nocturnes, la sécheresse vaginale. L'absence d'œstrogènes a aussi pour conséquence une diminution inéluctable de la masse osseuse, une disparition des effets protecteurs cardiovasculaires de cette hormone, et peut-être des effets cognitifs. La non-protection cardiovasculaire est démontrée chez le sujet jeune aux ovaires inactifs mais est toujours incertaine chez la femme de plus de 50 ans. Les grandes études cliniques, notamment la plus importante d'entre elles, fondées sur les preuves, l'étude *Women Health Initiative*, dont les résultats publiés en 2002, 2003, 2004 et 2006, montrent que, dans les limites du protocole thérapeutique utilisé (œstrogène équin par voie orale, avec ou sans progestatif synthétique, l'acétate de médroxy-progestérone), ce traitement est

capable d'augmenter faiblement le risque absolu de maladie cardiovasculaire, de cancer du sein, d'accident vasculaire cérébral, de thrombose veineuse, tandis qu'il protège contre les fractures du col et les cancers du côlon. Cinq ans après les premiers résultats, il apparaît raisonnable de conclure que le traitement œstrogénique, associé ou non à un dérivé de la progestérone, ne peut être proposé à tout le monde en raison du risque, lié à l'âge, de cancer du sein, et, surtout, du risque principal de la femme, le risque cardiovasculaire. Les femmes ayant des facteurs de risque notables doivent donc être exclues, ce qui permet ainsi de proposer le traitement chez les femmes symptomatiques. Le rapport bénéfice/risque chez les femmes présentant des troubles sévères provoqués par la ménopause peut être acceptable pendant 5 à 10 ans, mais les THS ne doivent pas être prescrits chez les femmes asymptomatiques et doivent être interrompus dès que les symptômes ne réapparaissent pas après une interruption-test du traitement. Ce traitement est probablement réalisé au mieux par des stéroïdes physiologiques, et peut-être, en ce qui concerne les œstrogènes, par la voie transdermique pendant 5 à 10 ans, toujours dans le cadre d'un partenariat entre la femme et le médecin. Le traitement hormonal de la ménopause n'est donc plus un remplacement hormonal mais un traitement des symptômes, limité dans le temps.

La contraception œstroprogestative, « la pilule », existe depuis 45 ans et rend des services exceptionnels en permettant aux femmes de décider du moment de leur procréation. Les progrès faits pour rendre la contraception plus efficace et sans effets secondaires sont considérables, et nous disposons actuellement de procédés pour toutes les femmes, y compris pour celles qui présentent des facteurs de risques vasculaires ou mammaires. Le coût de la contraception est aussi devenu très accessible, y compris dans les pays en développement, grâce aux efforts notamment de l'OMS et d'organisations non gouvernementales. Le nombre de grossesses non désirées reste cependant trop élevé, et nous devons poursuivre la recherche pour rendre la contraception encore plus accessible et encore plus facile à prendre. Des méthodes associant contraception et prévention des maladies sexuellement transmissibles (sida) seraient particulièrement utiles.

La recherche dans le domaine de l'obésité et du diabète de type 2 a été marquée, durant les quinze dernières années par quatre événements majeurs.

- La reconnaissance d'une « explosion » de la fréquence de l'obésité, **maladie de l'adaptation aux changements de l'environnement hygiéno-diététique** (diminution de l'activité physique, augmentation de la densité alimentaire, diminution du coût des calories). Cette épidémie touche notamment les milieux les plus défavorisés et les enfants. Son apparition, associée au vieillissement de la population, est à l'origine du nombre crois-

sant de diabète de type 2 : 180 millions en 2005 de par le monde, 330 millions prévus en 2025. . .

- La reconnaissance des **fonctions endocrines du tissu adipeux**. Celui-ci n'apparaît plus comme un simple réservoir énergétique indispensable en cas de famine mais comme un tissu complexe, sécrétant de vraies hormones (leptine, résistine, adiponectine. . .) et aussi des protéines pro-inflammatoires (interleukine 6, tumor necrosis factor alpha. . .). Ces dernières sont probablement impliquées dans l'apparition du diabète de type 2 mais aussi dans les complications associées à l'obésité : hypertension artérielle, infarctus du myocarde, cancer de l'utérus et de la prostate.
- **Le contrôle neuro-hormonal de la prise alimentaire et/ou de la dépense énergétique** a révélé toute sa complexité. Il met en cause des signaux périphériques endocriniens (insuline, leptine, hormones thyroïdiennes, cortisol), métaboliques (glucose, acides gras libres) et digestifs (estomac, intestin). Ces signaux sont intégrés au niveau hypothalamique par un réseau complexe de neurones sécrétant peptides orexigènes ou anorexigènes (PYY, MSH, CRF, CART. . .). Ces peptides semblent correctement caractérisés. Leurs fonctions ont été précisées grâce à de nombreux modèles de souris transgéniques. Des obésités « génétiques » chez l'homme ont été caractérisées, notamment en France.
- **Le substratum génétique du diabète de type 2** (90 % de concordance chez les jumeaux homozygotes) est en passe d'être compris. Les diabètes de type MODY (autosomique dominant) sont maintenant définis et phénotypés. Le mécanisme du diabète de type 2 avec obésité androïde, caractérisé par une insulino-résistance majeure et un déficit de l'insulinosécrétion probablement précoce, reste encore mystérieux mais les progrès de la génétique et de l'épigénétique devraient rapidement déboucher sur une compréhension des mécanismes de cette pathologie.

La France, à travers l'Inserm, l'Inra, l'ANR et les ministères de la Santé et de la Recherche, a su mettre en place, à la fin des années 1980 une vraie politique associant financement de la recherche, mesures de santé publique (Programme national nutrition santé) et plus récemment soutien des réseaux diabète et obésité par la Sécurité sociale.

Ces engagements, au service de l'excellence de la recherche, ont permis à plusieurs équipes (Paris, Lyon, Toulouse, Lille. . .) d'être leader mondial dans leurs domaines.

Il est proposé que cette politique soit renforcée notamment :

- en créant de petites équipes de pointe en liaison forte avec l'industrie pharmaceutique ;
- en lançant un grand projet de prévention primaire de l'obésité androïde chez l'enfant et/ou dans les milieux défavorisés ;
- en favorisant des regroupements humains et technologiques sur les thèmes : nutrition, cerveau et imagerie métabolique.

Toutes ces mesures seront sans effet si les organismes publics impliqués n'arrivent pas à simplifier l'organigramme du financement de la recherche et le travail administratif du chercheur.

Les perturbateurs hormonaux

L'endocrinologie est passée en quelques décennies des hormones aux interactions entre hormones et récepteurs, puis aux mécanismes moléculaires du contrôle du métabolisme et de l'expression des gènes. Il fut rapidement observé que des molécules étrangères à la physiologie, les xénobiotiques, pouvaient s'immiscer dans ces équilibres pour les perturber.

Les premiers xénobiotiques identifiés comme perturbateurs hormonaux furent des toxines végétales ou des composés chimiques utilisés par les industries et diverses activités humaines et répandus dans l'environnement au cours de leur utilisation ou de leur élimination incontrôlée. De nombreux exemples de troubles du développement sexuel et de la reproduction causés par ces perturbateurs hormonaux ont été analysés sous l'angle de la toxicologie environnementale et de la pollution. Les effets œstrogéniques des insecticides et des antifongiques sont l'exemple le plus connu. Certains xénobiotiques, comme les dioxines, montrent une aptitude à l'activation de récepteurs « orphelins », à l'hormone inconnue, capables de générer leurs propres régulations hormonales autant que de perturber celles de couples hormone/récepteur connus.

Un nouveau chapitre s'écrit aujourd'hui avec le double élargissement du concept de perturbation hormonale. D'une part, celle-ci se doit maintenant d'englober toute l'endocrinologie et non plus seulement la reproduction, comme en témoignent les exemples présentés du tabagisme et du diabète. D'autre part, de nouveaux xénobiotiques présents dans l'alimentation, naturellement (phytoœstrogènes) ou comme additifs autorisés, rejoignent les polluants industriels

dans la liste des molécules à surveiller, de par leur utilisation en association, massive et insuffisamment contrôlée.

Cette liste en augmentation constante a conduit à la création du projet REACH (acronyme anglais pour enRegistrement, Evaluation et Autorisation des produits CHimiques), en réponse à l'insuffisance actuelle des connaissances. Ce projet de loi européen permettra l'élimination progressive des produits chimiques les plus dangereux. Les producteurs devront transmettre à une agence centrale européenne un dossier d'enregistrement contenant des données de sécurité sur les substances produites, données proportionnelles aux volumes de production. Le dossier sera évalué par des experts, en particulier pour les substances produites en grande quantité ou qui comportent un risque. Les composés « extrêmement préoccupants » (cancérogènes, toxiques bio-accumulatifs dont les perturbateurs hormonaux) seront éliminés et remplacés par des produits plus sûrs, à moins que l'industrie ne puisse prouver que ces substances aient un intérêt « socio-économique » supérieur aux risques et que ces risques sont contrôlés. REACH devrait aussi permettre d'optimiser l'application du principe de précaution pour les nouvelles molécules.

Notre équilibre intérieur est donc de plus en plus confronté aux xénobiotiques, que ce soit par la pollution ou les procédés de l'alimentation industrielle. Les possibilités de potentialisation croisée entre polluants et/ou entre polluants et additifs alimentaires autorisés sont pratiquement inconnues. La recherche épidémiologique doit documenter l'exposition générale du public aux xénobiotiques et identifier l'exposition ou la vulnérabilité particulières de certaines populations à risque. La recherche fondamentale doit élucider les mécanismes d'action des xénobiotiques et développer la production de marqueurs, de techniques de détection et de mesure ainsi que d'agents thérapeutiques. Enfin, les pathologies liées aux xénobiotiques industriels doivent être reconsidérées dans le contexte de maladies professionnelles. Tout cela suppose que la science comme la législation agissent au niveau européen et international.

L'utilisation des hormones en élevage a contribué durant ces quarante dernières années à modifier en profondeur les performances zootechniques, tant en production de viande que de lait, ou même en élevage piscicole. Pour ce faire, différentes stratégies se sont progressivement dessinées. À un niveau très intégré, la maîtrise des cycles de reproduction des femelles et leur synchronisation au sein des troupeaux, l'induction de l'ovulation combinée ou non à une stimulation ovarienne, le dessaisonnement de l'activité sexuelle dans certaines espèces, voire l'induction des comportements sexuels, font appel à des traitements hormonaux complexes, mais dont l'utilisation reste limitée dans le temps à certaines « fenêtres » de sensibilité physiologique. Ces traitements utilisent aussi bien des stéroïdes sexuels que les hormones gonadotropes ou les facteurs de stimulation de la synthèse de ces hormones et des prostaglandines suivant des protocoles

maintenant bien ajustés à l'espèce et au contexte d'élevage considérés. L'objectif principal est de pouvoir améliorer la prolificité des troupeaux, d'accélérer la diffusion du progrès génétique et d'optimiser l'utilisation de la ressource alimentaire durant les pleines périodes de production de viande ou de lait ou d'allaitement et de croissance des jeunes. À l'opposé, l'augmentation de la vitesse de croissance des animaux ou de la production laitière en élevage bovin-lait repose sur un traitement chronique et relativement simple des individus, ceci jusqu'à la fin de la période d'engraissement des animaux ou jusqu'au tarissement des femelles. Les traitements anabolisants en élevage bovin reposent sur l'utilisation quasi exclusive de stéroïdes naturels ou de synthèse de type progestine ou de type androgène en association à des œstrogènes, qui sont administrés le plus souvent sous forme d'implants, plus rarement par voie orale. Des traitements par β -agonistes administrés par voie orale peuvent aussi se faire. L'hormone de croissance peut aussi être utilisée en élevage porcin pour améliorer les performances de croissance des animaux. La stimulation de la production laitière en élevage bovin est obtenue par l'utilisation d'hormone de croissance recombinante. Les traitements anabolisants ou la stimulation de la production laitière permettent d'obtenir un gain de l'ordre de 10-15 %.

La palette d'utilisation des hormones est large et se fait, dans les zones économiques où elles sont utilisées, dans un cadre réglementaire strict. Leurs analogues n'ayant pas reçu d'autorisation légale d'utilisation sont donc prohibés, les utilisations frauduleuses étant de plus en plus rares, compte tenu des moyens techniques lourds mis en œuvre pour les détecter de façon non ambiguë. Dans l'Union européenne, seules quelques hormones stéroïdiennes et peptidiques et des prostaglandines sont autorisées pour la maîtrise de la reproduction des espèces domestiques. En revanche, les substances pouvant être utilisées pour améliorer la croissance des animaux ou la production laitière en élevage bovin y sont interdites. Certaines de ces interdictions sont d'ailleurs l'objet de litiges entre l'Union européenne et les États-Unis ou le Canada, la première arguant du fait que l'innocuité des résidus retrouvés dans les produits animaux destinés à la consommation humaine n'est pas démontrée, notamment parce qu'elle s'appuie sur des données toxicologiques très anciennes et, pour certaines d'entre elles, largement caduques au regard des connaissances scientifiques actuelles, les seconds, au contraire, plaidant l'absence de données nouvelles inquiétantes qui inviteraient alors à reconsidérer en profondeur les expertises toxicologiques réalisées par le passé.

Les pratiques agricoles sont à l'heure actuelle largement interrogées quant au lien, avéré ou non, qu'elles peuvent avoir avec une qualité des produits agricoles que certains consommateurs jugent comme médiocre, voire dégradée. D'autres considérations de nature économique et sociologique rendent encore plus difficile l'analyse fine de ces pratiques. C'est dans ce contexte complexe que la recherche de nouvelles stratégies visant à contrôler la physiologie des

animaux devra être réfléchi de façon à garantir tout à la fois la « durabilité » économique, écologique et sociale des systèmes de production, la qualité de vie des éleveurs et la qualité des produits animaux offerts aux consommateurs.

Une recherche forte en endocrinologie est nécessaire pour le maintien d'une recherche compétitive en signalisation inter- et intracellulaire, domaine devenu fondamental dans l'étude de tous les champs de la biologie.

En dehors des recherches cognitives, qui, ici comme ailleurs en biologie, pour être fécondes doivent laisser libre cours à l'initiative et à l'inventivité de petits groupes d'excellence, quelques domaines se prêtent à une organisation plus dirigée.

Des **centres d'études structurales tridimensionnelles des protéines** devraient être associés à des groupes d'excellence de biologie moléculaire et cellulaire. Ces centres permettraient d'établir les structures des acteurs de la signalisation (ligands, récepteurs, messagers, enzymes, etc.). De tels résultats auraient des conséquences majeures pour la compréhension des mécanismes et s'avèreraient également indispensables pour la synthèse dirigée de médicaments innovants. Le domaine des récepteurs membranaires serait à développer tout particulièrement.

Pour les récepteurs nucléaires, la synthèse et l'étude de leurs modulateurs spécifiques (SERM, SPRM, SARM, etc.) est fondamentale si on espère aboutir à des progrès importants dans le domaine des cancers hormonodépendants ainsi que dans le traitement substitutif de la ménopause et éventuellement dans celui de certaines conséquences du vieillissement.

Des actions d'incitation devraient également être menées dans le domaine de **l'endocrinologie de la reproduction féminine**. La vie de la moitié de la population est rythmée par la puberté, la contraception, la stérilité ou au contraire la grossesse, la ménopause, la crainte ou la survenue des très fréquents cancers hormonodépendants (sein, ovaire, endomètre, etc.).

Enfin nous connaissons un retard considérable dans le domaine **des études épidémiologiques** :

- évaluation des méthodes de diagnostic, de pronostic et de traitement des **cancers hormonodépendants** ;
- évaluation de nouvelles molécules utilisées dans le traitement substitutif de la **ménopause** et dans la prévention des **troubles du vieillissement** ;

- évaluation de projets de **prévention primaire de l'obésité** androïde, en particulier dans les populations défavorisées, ou présentant des facteurs de risques familiaux ;
- évaluation des effets des **xénobiotiques** sur les fonctions endocriniennes et en particulier sur la **reproduction**.

Abréviations

AMP : acétate de médroxy-progestérone
EGF : epidermal growth factor
CART : cocain and amphetamine related transcript
CRF : corticotropin-releasing factor
MSH : melanocyte stimulating hormone
OMS : Organisation mondiale de la santé
PYY : peptide YY
SARM : selective androgen receptor modulator
SERM : selective estrogen receptor modulator
Sida : syndrome d'immunodéficience acquise
SPRM : selective progesterone receptor modulator

SUMMARY

Endocrinology is the study of the physiology and pathology of glands and the hormones that they secrete inside the body.

In recent decades, discoveries that were first made in endocrinology, in particular in the area of cellular and molecular mechanisms of hormone action, have now been found to be general to a large number of other signaling processes (growth factors, neuromediators, interleukines, etc.). Endocrinology has thus become a model for studying inter- and intracellular signaling mechanisms in general, a rapidly evolving key field of current biology.

The discovery of G-protein coupled receptors is an example of how the field has advanced. The starting point was the study of how adrenaline and glucagon affect glucose synthesis in liver. This led to the discovery of cyclic AMP, then to G-proteins and β -adrenergic receptors and finally the **family of G-protein coupled receptors**. This large family of proteins characterized by seven transmembrane domains, known as serpentine receptors, includes over 800 different members in the human species. By itself, it represents about 2-3% of all human genes. In fact, most G-protein coupled receptors recognize non-endocrine ligands, such as light, smells and taste. Some are involved in developmental processes, such as cell determination, differentiation and polarization.

Many receptors with seven transmembrane domains do not have a ligand in the strict sense but are involved in cellular adhesion through EGF (epidermal growth factor) domains at their extracellular N terminus.

From the therapeutic point of view, these receptors have become major targets for new drug development, with about 50% of all new therapeutic agents aimed at them. Already one quarter of the 100 most used pharmaceuticals belong to this category.

The **nuclear receptor family** is also another instance where work in endocrinology led to the discovery of a great diversity of signaling mechanisms. Initially, 6 types of receptors (the 5 steroid hormone families and the thyroid hormone receptors) were presumed to exist. Forty-eight different genes with widely diverse functions were later discovered. The ligands corresponding to many of the proteins encoded by these genes have yet to be identified.

Nuclear receptors were the first mammal transcriptional regulators characterized, purified and cloned. They have been and still are the most important and relevant models for studying general mechanisms of gene transcription.

Inversely, new hormones were discovered starting from the receptors (reverse endocrinology). In certain cases, whole hormone-receptor systems were identified based on genome analysis.

Endocrine regulation helps the organism respond to its environment and has been subjected to evolutionary selection. However, relatively recently, Man has acquired the capacity to modify the environment to such a degree that a certain number of hormonal mechanisms are out of balance causing the appearance or the exacerbation of new pathologies.

In this report, we have chosen to discuss seven particularly important examples in view of their consequences for public health and the environment:

- hormone-dependent cancers;
- hormone replacement therapy during menopause;
- contraception, current state and new targets;
- obesity and type 2 diabetes;
- hormones and ageing;
- endocrine disruption agents;
- use of hormones in livestock: zootechnical developments and public health concerns.

In each case, current scientific data is discussed and recommendations are put forward for research, medicine and regulation.

Cancers induced by sexual steroid hormones include the most frequent cancer in women (breast cancer) and men (prostate cancer) with about 40 000 new cases in France each year. These cancers are a major concern for public health. The prevalence of breast cancer in France has doubled in the last twenty years. Except hereditary cancers linked to gene-based susceptibility (only 1 to 2% of breast cancers are due to mutations of the BRCA 1 and 2 genes), most cancers are sensitive to the tumor-inducing effects of steroid hormones, respectively estrogens and progesterone for breast cancer and testosterone for prostate cancer. These hormones do not modify the structure of the genes; they modify the expression of the encoded gene products, resulting in proteins that stimulate growth and invasiveness. This reversible effect is essentially due to the stimulation of cells that have been previously transformed or initiated by other agents that interact with specific nuclear receptors, thus modulating the expression of several genes. Some of these genes have yet to be characterized. Cancers that express these receptors can be inhibited by hormone antagonists and/or by suppressing the production of the appropriate hormones. Tamoxifen, which

is now widely used, was the first example of an “intelligent” therapy for solid tumors, aimed at a molecule involved in carcinogenesis.

Among the research directions that could lead to a lower incidence and mortality from these cancers are: a) understanding resistance mechanisms to anti-hormone treatments; b) understanding the role of hormones in the first steps of carcinogenesis which would improve preventive action; c) the development of new therapeutic targets through a collaborative effort (academic researchers, clinicians, pharmaceutical industry) and with large-scale randomized clinical trials of original molecules discovered and developed in France. In the meantime, a lifestyle that avoids known risk factors (obesity, alcohol, hormone replacement therapy, etc.) must be encouraged by updating information to doctors.

Menopause is the period in a woman’s life after the ovarian follicle capital has been exhausted, on average around 51 years of age. Taking into account today’s life expectancy, women spend a third of their life without ovarian hormones. As a result of the absence of follicles and related hormonal deficiency, symptoms appear which compromise women’s quality of life, such as heat flushes, night sweats, vaginal dryness. The absence of estrogens also results in an inescapable reduction in bone mass, a disappearance of cardiovascular protection linked to the hormones, and a likely effect on cognitive functions. The deficiency in cardiovascular protection was demonstrated in young subjects with inactive ovaries. The phenomenon however is still discussed for women over 50 years. Proof-based large clinical trials, the most important of which being the Women Health Initiative, published in 2002, 2003, 2004 and 2006, have shown within the limits of the therapeutic protocol used (equine estrogen by oral administration, in the presence or absence of the synthetic progesterone medroxyprogesterone) that hormone replacement therapy increased slightly the absolute risk of cardiovascular disease, breast cancer, vascular cerebral accident, venous thrombosis, while it protected against hip fracture and colon cancer. Five years after the first results, it seems reasonable to conclude that an estrogen treatment with or without progesterone should not be offered to all women mainly because of the cardiovascular risk and of the risk of breast cancer associated with ageing. Women at high risk must be excluded. The treatment should only be given to symptomatic women with severe menopausal disorders who have an acceptable benefit/risk ratio over a 5 to 10 year period. Treatment should be interrupted as soon as tests show a stable disappearance of symptoms. HRT should not be given to asymptomatic women. It is probably best to use physiological steroids for this treatment, possibly by transdermal application of estrogens for 5 to 10 years in a close partnership between a woman and her doctor. Menopausal hormone treatment should not be viewed as a hormone replacement treatment anymore, but just as a time-limited symptomatic treatment.

Contraception based on the combination of an estrogen and a progestin, the “pill”, has existed for 45 years and is providing an outstanding service to women by allowing them to choose the moment of procreation. The advances made to eliminate secondary effects while making this type of contraception more efficient have been considerable. A pill exists now for all women, including those that present mammary or vascular risks. The cost of contraception has become very accessible, even in developing countries, as a result of efforts by WHO and non-governmental organizations. The number of unwanted pregnancies is however still too high and research must continue to make contraception even more accessible and easier to take. Methods associating contraception and prevention of sexually transmitted diseases (AIDS) would be particularly useful.

Research in the areas of **obesity** and **type-2 diabetes** has witnessed in the last fifteen years four major events:

- the acknowledgement of a dramatic increase in the frequency of obesity, a disease that is associated to **adaptation to changes in diet and lifestyle** (reduced physical activity, increased food intake, decreased cost of dietary calories). The obesity epidemic is mostly prevalent in poorer social environments and children. Its appearance in association with the ageing of the general population has caused an increase in the number of type 2 diabetes patients : 180 million worldwide in 2005, 330 million expected in 2025;
- the discovery of **endocrine functions of adipose tissue**. Adipose tissue is no longer considered a simple energy reservoir used in case of starvation but as a complex tissue secreting true hormones (for example, leptin, resistin, adiponectin) and pro-inflammatory proteins (for example, interleukin 6, tumor necrosis factor alpha). The latter are probably involved in the appearance of type 2 diabetes and in obesity-related complications: high blood pressure, myocardial infarction, uterine cancer and prostate cancer;
- the realization that **neurohormonal control of food intake and energy expenditure** is very complex. It involves peripheral endocrine (insulin, leptin, thyroid hormones, cortisol), metabolic (glucose, free fatty acids) and digestive (stomach, intestine) signals. These signals are integrated at the level of the hypothalamus by a complex network of neurons that secrete orexigenic and anorexigenic peptides (such as PYY, MSH, CRF, CART). These peptides have been characterized. Their functions have been identified using transgenic mice models. Cases of human “hereditary” obesity have been studied in particular in France;
- the **hereditary causes of type 2 diabetes** are starting to be unraveled (90% concordance rate for homozygote twins). MODY type diabetes,

which has an autosomal dominant inheritance, is now well-defined and phenotyped. The mechanism of type 2 diabetes associated to android obesity, which is characterized by an early development of insulin resistance and deficit of insulin secretion, is still unknown, but progress in genetics and epigenetics should rapidly lead to an understanding of the mechanisms of this pathology.

France, through Inserm, Inra, ANR and the Health and Research Ministries, started in the late 1980s a policy that brings together research funding, public health measures (a national program for health and nutrition) and more recently support of the social security system for the diabetes networks. These commitments to foster excellence in research have enabled several groups (Paris, Lyon, Toulouse, Lille and others) to be at the forefront of their fields.

We recommend that this policy be strengthened in particular by:

- creating small world-leading groups tightly linked to the pharmaceutical industry;
- launching a large-scale project for the primary prevention of android obesity in children and/or in lower social environment;
- bringing together technological and human resources over research themes such as nutrition, brain and metabolic imaging.

None of these measures will be efficient if the relevant public institutions cannot simplify the structure of research funding and the administrative load of researchers.

Hormonal perturbators

In just a few decades, endocrinology has moved from hormones to receptor-hormone interactions and then to molecular mechanisms regulating metabolism and gene expression. Very quickly, foreign molecules, xenobiotics, were found to be metabolically active and affect hormonal balances.

The first xenobiotics that were found to perturb hormonal balance were plant toxins and chemical compounds used in industry and various human activities that were dispersed in the environment as a consequence of their use or non-restricted elimination. Many cases of sexual development and fertility disorders caused by these hormonal perturbators have been analyzed from the point of

view of environmental toxicology and pollution. Some xenobiotics, such as dioxins, are capable of activating orphan receptors, for which no ligands have been identified, and generate their own hormone regulation as well as disrupt the hormonal regulation mediated by known hormone/receptor pairs.

Two new developments have broaden the concept of endocrine disruption. First, it should now be extended to all of endocrinology not just reproduction, as was shown by the study of tabagism and diabetes. Secondly, due to their combined widespread and insufficiently controlled use, new dietary xenobiotics, either naturally occurring or legally authorized additives, should be added to the list of monitored molecules that already includes industrial pollutants.

This progressively increasing list of compounds has led to the creation of the REACH project (Registration, Evaluation and Authorization of Chemicals) to deal with current insufficient level of knowledge. REACH regulation will be enforced by European legislation to ensure future progressive elimination of the most dangerous chemicals. Producers will be required to forward to a central European agency a registration dossier containing the safety data and the quantities produced for each compound on the list. The dossier will be evaluated by experts, in particular for substances produced in large quantities or posing a health risk. "Extremely worrisome" compounds (carcinogens, bioaccumulating toxic compounds among which are hormonal perturbators) will be eliminated and replaced by safer compounds, unless industry can prove that the social and economical benefits of these compounds outweigh the risks associated with their use and that these risks are controlled. REACH will also ensure that the principle of precaution be applied to all new molecules.

Our internal equilibrium is increasingly confronted with xenobiotics, either through pollution or industrial food processes. The possibilities of cross-potentialization among pollutants and/or pollutants and authorized dietary additives are practically unknown. Epidemiological research must gather data on the general exposure of the public to xenobiotics and must identify the exposure and sensitivity of specific populations at risk. Fundamental research must clarify the mechanisms of action of xenobiotics and develop markers, detection techniques, measuring techniques and therapeutics. Finally, diseases linked to industrial xenobiotics must be now considered within the framework of occupational diseases. All this supposes that both science and legislation act at the European and international levels.

The **use of hormones in livestock** has contributed in the last forty years to profoundly modify the zootechnical performance of meat and milk production and even fish farming. Various strategies have been progressively applied to reach today's results. At the level of the whole organism, the control of female reproduction cycles and their synchronization within herds, the induction

of ovulation with and without ovarian stimulation, out-of-season sexual activity of certain species, induction of sexual behavior, all require complex hormonal treatments, limited in time to particular periods of physiological sensitivity. The treatments rely on sexual steroids and gonadotropic hormones as well as factors stimulating the synthesis of these hormones and prostaglandins according to protocols that are now well adapted to the species and the breeding context. The main objective is to improve livestock reproduction, increase the application of genetic advances and optimize the use of feed resources during the highest periods of meat or milk production and development of young animals. By contrast, the increased rate of growth and milk yield in bovine livestock is based on the chronic and relatively simple treatment of animals until the end of the fattening period or lactation. Anabolic treatments of cattle is based on the use nearly exclusively of natural steroids and synthetic steroids such as progestin-like and androgen-like steroids in association with estrogens that are administered as subcutaneous implants and less frequently orally. Beta-agonists are also administered orally. Growth hormones are used in pig to improve the growth performance of the animals. Stimulation of milk production by cows is obtained through use of a recombinant growth hormone. Anabolic and milk-stimulating treatments have increased gains by 10-15%.

The range of hormone treatments is large and strictly regulated in the economic areas where they are used. Non-approved analogs are banned and their fraudulent use is decreasing due to the considerable means used for their unambiguous detection. In the European union, only a few steroid hormones, peptides and prostaglandins, are authorized for controlling the reproduction of livestock. By contrast, substances that improve animal growth and milk production in cattle are banned. Some of these restrictions are a source of dispute between the EU and the United States and Canada. The EU argues that residues found in animal products for human consumption have not been proven safe, in particular because the information is based on very old toxicological data that is mostly obsolete when considered from the point-of-view of current scientific knowledge. By contrast, North American countries claim that a reconsideration of past toxicological data is not necessary because no new worrisome findings have come to light.

Current farming practices are considered, rightly or wrongly, by some consumers to be linked to the mediocre and degraded quality of agricultural products. Economic and social considerations make further analysis of such practices difficult. In this complex context, research should find new strategies to control animal physiology while ensuring the economic, ecological and social durability of the production systems, farmers' quality of life and the quality of animal products offered to consumers.

A strong effort in endocrinology research is necessary to maintain a competitive level in the area of inter- and intra-cellular signaling, a field that has become fundamental to all biological disciplines.

Apart from the cognitive sciences, which like other biological fields must be left to the creativity and initiative of small groups of excellence, the organization of other fields should be more tightly controlled.

Centers for the three-dimensional study of proteins should be associated to groups of excellence in molecular and cellular biology. These centers would make it possible to determine the structure of molecules involved in signaling pathways (such as ligands, receptors, messengers, enzymes). Such collaborations would have major consequences for understanding the mechanisms involved and would also be indispensable for the targeted synthesis of innovating drugs. In particular, the area of membrane receptors still needs to be developed.

Concerning nuclear receptors, the synthesis and study of specific modulators (SERM, SPRM, SARM, etc.) are fundamental in order to make progress in the areas of hormone-dependent cancers, menopause hormone replacement treatments and the consequences of ageing.

Funding should also be provided in the area of **female reproductive endocrinology**. The life of half of the world's population is marked by puberty, contraception, sterility or pregnancy, menopause, the fear of and frequent occurrence of hormone-dependent cancers (among which breast, ovarian and endometrial cancers).

Finally, we are far behind in the field of **epidemiological studies**, in particular in the following areas:

- assessment of diagnostic, prognostic and treatment methods for hormone-dependent cancers;
- evaluation of new molecules used in hormone replacement treatment during menopause and prevention of ageing disorders;
- evaluation of projects for android **primary prevention of obesity**, in particular in poorer populations and populations with a hereditary risk;
- evaluation of the effects of xenobiotics on endocrine functions and in particular on **reproduction**.

Abbreviations

MPA: medroxyprogesterone acetate

EGF: epidermal growth factor

CART: cocaine and amphetamine related transcript

CRF: corticotropin-releasing factor

MSH: melanocyte stimulating hormone

WHO: World Health Organization

PYY: peptide YY

SARM: selective androgen receptor modulator

SERM: selective estrogen receptor modulator

AIDS: acquired immunodeficiency syndrome

SPRM: selective progesterone receptor modulator

RECOMMANDATIONS GÉNÉRALES

À la fin de chaque chapitre composant ce rapport, sont regroupées des recommandations spécifiques du domaine traité. Nous souhaitons avancer également quelques recommandations ayant une portée plus générale.

La France a traditionnellement eu une recherche de haut niveau en endocrinologie. Ces travaux ont non seulement débouché sur une meilleure compréhension de l'action des hormones et de leur utilisation thérapeutique mais ont également servi dans un second temps de modèle pour aborder l'étude d'un très grand nombre de mécanismes de signalisation s'appliquant à d'autres domaines de la biologie. Ce transfert de connaissances continue à s'observer actuellement et **une recherche forte en endocrinologie est nécessaire pour le maintien d'une recherche compétitive en signalisation inter- et intracellulaire, domaine devenu fondamental dans l'étude de tous les champs de la biologie.**

En dehors des recherches cognitives, qui ici comme ailleurs en biologie pour être fécondes doivent laisser libre cours à l'initiative et à l'inventivité de petits groupes d'excellence, quelques domaines se prêtent à une organisation plus dirigée.

Des **centres d'études structurales tridimensionnelles des protéines** devraient être associés à des groupes d'excellence de biologie moléculaire et cellulaire. Ces centres permettraient d'établir les structures des acteurs de la signalisation (ligands, récepteurs, messagers, enzymes, etc.). De tels résultats auraient des conséquences majeures pour la compréhension des mécanismes et s'avèreraient également indispensables pour la synthèse dirigée de médicaments innovants. La France manque de telles structures à l'exception de celle de Strasbourg, travaillant sur les récepteurs nucléaires. Le domaine des récepteurs membranaires serait à développer tout particulièrement.

L'enseignement d'endocrinologie en facultés de sciences et de médecine devrait être modernisé en fonction des récentes avancées de la recherche.

Pour les récepteurs nucléaires, la synthèse et l'étude de leurs modulateurs spécifiques (SERM, SPRM, SARM, etc.) est fondamentale si on espère aboutir à des progrès importants dans le domaine des cancers hormonodépendants ainsi que dans le traitement substitutif de la ménopause et éventuellement dans celui de certaines conséquences du vieillissement.

Le volet pharmacologique de cette recherche sur les ligands des récepteurs nucléaires où la France était au premier rang il y a encore vingt ans y est actuellement presque complètement délaissé.

Des actions d'incitation devraient également être menées dans le domaine de **l'endocrinologie de la reproduction féminine**.

La vie de la moitié de la population est rythmée par la puberté, la contraception, la stérilité ou au contraire la grossesse, la ménopause, la crainte ou la survenue des très fréquents cancers hormonodépendants (sein, ovaire, endomètre, etc.). L'absence de mouvements féministes très actifs a fait sans doute que la recherche dans ce domaine n'a pas été autant favorisée en France que dans d'autres pays.

Enfin nous connaissons un retard considérable dans le domaine **des études épidémiologiques** :

- évaluation des méthodes de diagnostic, de pronostic et de traitement des **cancers hormonodépendants** ;
- évaluation de nouvelles molécules utilisées dans le traitement substitutif de la **ménopause** et dans la prévention des **troubles du vieillissement** ;
- évaluation de projets de **prévention primaire de l'obésité** androïde, en particulier dans les populations défavorisées, ou présentant des facteurs de risques familiaux ;
- évaluation des effets des **xénobiotiques** sur les fonctions endocriniennes et en particulier sur la **reproduction**.

Une attention particulière devra être portée aux **études sur l'environnement**. En fonction de leurs résultats, des adaptations réglementaires devront être adoptées rapidement au niveau européen.

INTRODUCTION

Edwin Milgrom

De l'endocrinologie à la signalisation

Au cours du XIX^e siècle et du début du XX^e siècle, la plupart des glandes à sécrétion interne ont été décrites, les hormones qu'elles sécrétaient isolées et les effets de celles-ci sur leurs organes cibles caractérisés. Cependant le mécanisme d'action des hormones restait mystérieux, la notion de récepteur décrite en termes uniquement pharmacologiques ne reposait sur aucun substrat moléculaire. Des théories furent même proposées selon lesquelles les hormones agissaient en tant que modulateurs enzymatiques et donc les récepteurs n'existaient pas en tant qu'entités distinctes. Cependant, vers 1958-1970, des méthodes de marquage radioactif très efficaces furent développées et il fut possible de suivre la destinée des hormones aux concentrations très faibles (environ pico- ou nanomolaire) où elles sont actives. Il devint alors évident que les entités pharmacologiques précédemment décrites correspondaient bien à des protéines spécifiques. Dans un premier temps, ces récepteurs ne purent être étudiés qu'à travers leurs propriétés de liaison.

Il fallut attendre la fin des années 1980 pour que certains récepteurs soient purifiés puis clonés, ouvrant la possibilité d'études structurales et fonctionnelles à un niveau précédemment inatteignable. Parallèlement, l'identification d'homologies de séquence ou de motifs structurels communs entre des protéines connues et des nouvelles protéines déduites de leurs séquences nucléotidiques ainsi que les progrès dans le séquençage de génome humain menaient à un schéma infiniment plus complexe.

C'est ainsi qu'en partant de l'étude de la synthèse du glucose dans le foie sous l'influence de l'adrénaline et du glucagon, on arriva à la découverte de l'AMP cyclique, à celle des protéines G, à la description des récepteurs β -adrénergiques qui, elle-même, déboucha sur la caractérisation de la **famille des récepteurs couplés aux protéines G**. Cette énorme famille (Perez, 2005 ; Bjarnadottir *et al.*, 2004 ; Schioth et Fredriksson, 2005) caractérisée par ses sept domaines transmembranaires (récepteurs serpentins) comprend dans l'espèce humaine plus de 800 membres différents. À elle seule, elle correspond à environ 2-3 % de tous les gènes humains. Sur le plan thérapeutique, ces récepteurs sont devenus des cibles majeures pour le développement de nouveaux médicaments : environ 50 % de nouvelles molécules thérapeutiques sont dirigés contre eux. D'ores et déjà, un quart des 100 médicaments les plus utilisés appartient à cette catégorie.

Mais en fait, si l'endocrinologie (ainsi que l'étude de la rhodopsine) est à l'origine de la découverte des récepteurs dits « couplés aux protéines G », la majeure partie d'entre eux reconnaissent des ligands non endocriniens : lumière, odeur, goût, etc. Certains interviennent dans le développement (détermination et prolifération cellulaires, polarisation. . .). Dans cette catégorie, citons l'importante voie de signalisation des récepteurs de la famille frizzled reconnaissant les glycoprotéines sécrétées Wnt.

Un grand nombre de récepteurs à sept domaines transmembranaires n'ont pas de ligand *stricto sensu* mais interviennent dans l'adhésion cellulaire par l'intermédiaire de domaines EGF (*epidermal growth factor*) inclus dans leur partie N terminale extracellulaire.

La famille des récepteurs nucléaires illustre également, quoique de façon moins spectaculaire, le même type de développement scientifique où, partant de l'endocrinologie, on aboutit à une problématique beaucoup plus vaste (Chambon, 2005 ; Evans, 2005). Là où les pharmacologues avaient décrit huit types de récepteurs (les cinq groupes de stéroïdes, les hormones thyroïdiennes, les vitamines liposolubles D et A) quarante-huit gènes humains différents ont été clonés (l'examen plus récent de la séquence du génome n'en a pas montré d'autres). La moitié d'entre eux n'a pas de ligand connu. Il peut s'agir soit de récepteurs réellement orphelins ou de récepteurs dont les ligands physiologiques existent mais restent à découvrir. Là encore l'importance thérapeutique est majeure, puisque à l'heure actuelle environ 20 % des prescriptions médicamenteuses aux États-Unis se font pour des agonistes ou des antagonistes des récepteurs nucléaires. Ceci alors que des dizaines de composés nouveaux sont en cours d'essais cliniques.

Il faut souligner que les récepteurs nucléaires ont été les premiers régulateurs transcriptionnels de mammifères caractérisés, purifiés, clonés. Ils ont servi et

servent encore de modèle de première importance dans l'étude des mécanismes généraux de la transcription des gènes.

L'endocrinologie reverse – La découverte de nouvelles hormones et de nouveaux systèmes endocriniens

L'approche traditionnelle dans la recherche endocrinologique avait été la découverte initiale d'une hormone puis, en général beaucoup plus tard, la description de son ou ses récepteurs et de son mécanisme d'action.

Les progrès de la biologie moléculaire puis du séquençage du génome humain aboutirent à la caractérisation d'un certain nombre de gènes et de protéines dont on soupçonnait par leur homologie de séquence qu'ils étaient des récepteurs hormonaux mais dont les ligands étaient inconnus. Il fut ainsi possible de découvrir des hormones à partir de leurs récepteurs (endocrinologie reverse). Le premier exemple en fut les récepteurs RXR qui avaient été caractérisés à partir des récepteurs de l'acide rétinoïque (RAR). Il fut rapidement établi qu'ils en étaient les partenaires obligatoires dans les dimères se liant aux RARE (retinoic acid receptor elements). Un peu plus tard, leur dimérisation avec d'autres récepteurs nucléaires (vitamine D, PPAR, etc.) fut également démontrée.

En revanche, le ligand des récepteurs RXR restait inconnu. La solution du problème vint de l'observation selon laquelle RXR incubé avec de l'acide rétinoïque était inactif au début de l'incubation puis devenait progressivement activé. La recherche d'un métabolite de l'acide rétinoïque révéla que le ligand des RXR était un isomère : l'acide 9cis rétinoïque (Chambon, 2005 ; Evans, 2005).

Toute une série de récepteurs initialement clonés en tant que récepteurs orphelins ont depuis acquis des ligands physiologiques ou pharmacologiques : les PPAR (peroxisome proliferator-activated receptors) lient un ensemble d'acides gras, d'acides biliaires, de prostaglandines etc. ; le LXR (liver X receptor) lie des oxystérols, le FXR (farnesoid X receptor) des sels biliaires. Ces récepteurs jouent un rôle majeur dans l'homéostasie du métabolisme des triglycérides, du cholestérol et de ses dérivés.

Un autre groupe est constitué de SXR (steroid X receptor) appelé aussi PXR (pregnane X receptor) et de CAR (constitutive androstane receptor) qui lient des xénobiotiques et régulent les enzymes ainsi que les transporteurs impliqués dans la détoxification de ceux-ci (Chambon, 2005 ; Evans, 2005).

L'approche génétique permet non seulement de découvrir de nouveaux récepteurs, mais aussi d'identifier directement de nouvelles hormones et même dans certains cas de mettre en évidence des systèmes de régulation complets précédemment ignorés.

L'identification par clonage positionnel du gène muté chez les souris ob/ob permet de découvrir une première hormone synthétisée dans le tissu adipeux et intervenant dans le contrôle de l'appétit. La leptine se révéla importante dans la compréhension de la physiopathologie de l'obésité mais s'avéra décevante sur le plan pharmacologique. Lors de son administration, des mécanismes de résistance se mettent rapidement en place (Friedman et Halaas, 1998).

Si la découverte de nouvelles hormones intervenant dans le mécanisme de l'obésité ne fut pas surprenante, compte tenu de notre ignorance alors avérée des mécanismes régulateurs intervenant dans ce domaine, il n'en fut pas de même dans le cas de la régulation de la fonction gonadotrope. C'est un des domaines qui avaient été les plus étudiés en physiologie et en pathologie endocrinienne. L'étude génétique des hypogonadismes hypogonadotrophiques permet d'identifier plusieurs gènes intervenant dans la migration ou la mise en place des neurones à GnRH au cours du développement (gènes *Kal 1*, *FGFR1* et *NELF*). Comme attendu, des mutations du gène de la GnRH (uniquement chez la souris *hpg*) et du récepteur de la GnRH furent décrites. En revanche, ce qui fut tout à fait inattendu fut l'identification de tout un nouveau système régulateur. Des mutations du récepteur *GPR54* (ainsi dénommé avant la découverte de son ligand et de sa fonction) furent observées chez certains malades atteints d'hypogonadisme hypogonadotrophique (de Roux *et al.*, 2003). Le ligand de ce récepteur à sept domaines transmembranaires fut identifié à un peptide dérivant de la protéine codée par le gène *Kiss-1*.

Depuis cette découverte, de nombreuses études en physiologie et pathologie humaines ainsi que dans des modèles animaux ont montré que *GPR54* est localisé dans les neurones à GnRH et est régulé par des neurones sécrétant le peptide *Kiss-1*. Cette régulation intervient non seulement au moment de la puberté qu'elle semble déclencher mais continue à s'exercer pendant toute la vie adulte.

La découverte de nouvelles hormones a pu également être faite *in silico*, en examinant la séquence du génome humain. Nakabayashi *et al.* (2002) se sont intéressés à la famille des hormones glycoprotéiques hypophysaires (gonadotrophines LH et FSH, thyrotrophine TSH). Ces hormones sont des dimères comportant une sous-unité α commune et des sous-unités β distinctes. Or, l'examen systématique du génome humain révéla à ces auteurs l'existence d'une sous-unité α supplémentaire qu'ils ont dénommée $\alpha 2$ et d'une sous-unité β supplémentaire dénommée $\beta 5$. Après avoir confirmé que ces deux sous-unités formaient des

dimères, les auteurs démontrèrent que l'hormone ainsi obtenue activait le récepteur de la TSH. Elle reçut le nom de thyrostimuline. Sa fonction exacte est en cours d'étude.

Nous nous trouvons donc en face d'une situation extrêmement complexe. Les récepteurs hormonaux (ainsi que certaines hormones protéiques) font partie de familles de protéines auxquelles appartiennent des récepteurs de ligands non hormonaux mais également des protéines non-récepteurs.

L'analyse phylogénétique des gènes des différents organismes a permis de comprendre l'origine de cette complexité. En fait, les gènes ancestraux des récepteurs et des hormones (ou des enzymes d'hormonosynthèse) ont initialement évolué de façon indépendante. Ce n'est que le hasard des mutations successives qui a pu produire la rencontre d'un futur récepteur avec son futur ligand (Ben-Schlomo et Hsueh, 2005). Si cette combinaison était favorable, elle était sélectionnée au cours de l'évolution. Des mutations successives renforçaient éventuellement l'affinité du ligand pour le récepteur, des duplications des gènes permettaient d'obtenir de nouveaux couples ligand-récepteur. Mais la trace de cette évolution se retrouve dans les homologies avec des gènes codant pour des protéines dont le rôle est étranger à celui de la régulation endocrinienne ou même non endocrinienne (voir par exemple la famille des récepteurs couplés aux protéines G).

Évolution actuelle de la recherche en endocrinologie : souris aux gènes délétés, réceptosomes, transcriptomes et protéomes

Le déchiffrement du génome humain n'a pas livré tous ses secrets : on trouve des gènes nouveaux codant pour des protéines présentant des similitudes structurales avec des familles de récepteurs ou d'hormones connues mais dont la fonction est totalement ignorée. La délétion de ces gènes chez la souris permet quelquefois d'établir leur fonction. Plus rarement, des études génétiques de maladies humaines aboutissent au même résultat. Mais la difficulté d'analyse des phénotypes obtenus, leur caractère quelquefois létal, la redondance des différents systèmes de régulations endocriniennes, peuvent empêcher toute conclusion.

Beaucoup de recherches actuelles partent de la constatation que les récepteurs humains font partie en réalité de structures polymériques beaucoup plus importantes comportant des activateurs, des inhibiteurs, des protéines de trafic cellulaire, des enzymes modificatrices (kinases, enzymes de sumoylation), des

systèmes de protéolyse, etc. La caractérisation de ces complexes quelquefois appelés « réceptosomes » (Bockaert *et al.*, 2004 ; Dennis et O'Malley, 2005) est tout à fait indispensable pour progresser dans la compréhension des mécanismes de signalisation. La variation de la composition de ces réceptosomes selon les types cellulaires, au cours de l'activation hormonale et de sa désensibilisation, au cours des déplacements intracellulaires des récepteurs, devra être établie pour appréhender la physiologie cellulaire.

Parallèlement, des études sont en cours en utilisant des puces ADN pour faire l'inventaire aussi complet que possible de la réponse transcriptionnelle de cellules en culture mais aussi d'organes *in situ* à l'administration de diverses hormones. Encore plus important mais techniquement à l'heure actuelle plus difficile sera la description du protéome correspondant. La mise en œuvre de ces méthodes devrait nous permettre de dépasser le stade actuel qui consiste essentiellement en l'étude de systèmes modèles. Elle devrait nous donner une idée précise de l'**ensemble** des fonctions régulées par les hormones dans leurs organes cibles ainsi que des voies de régulation utilisées.

À long terme, nous pouvons espérer établir un jour des modèles bio-informatiques nous permettant de prévoir *in silico* le détail de l'action des hormones dans diverses conditions physiologiques ou pathologiques.

Évolution des sociétés humaines – Endocrinologie et santé publique

Les régulations endocriniennes permettant à l'organisme de répondre à l'environnement ont été sélectionnées au cours de l'évolution. Or, relativement récemment, l'homme est devenu capable de modifier son environnement dans des proportions telles qu'un certain nombre de mécanismes hormonaux se sont trouvés en porte-à-faux, entraînant l'apparition ou l'exacerbation de pathologies nouvelles.

Ainsi, sur le plan nutritionnel nous étions programmés pour de brusques mises en réserve de graisses suivies de périodes de famine. De même, pour favoriser la constitution de ces réserves, nous avons acquis une appétence particulière pour les aliments sucrés et gras. Or, dans les sociétés développées, l'accès à ces aliments est devenu constant, les périodes de famine ont disparu, l'exercice physique n'est pas pratiqué par tous. D'où une épidémie d'obésité ainsi que de diabète de type 2 avec leurs complications variées, en particulier cardiovasculaires.

De même, nos mécanismes de détoxification étaient efficaces pour un nombre limité d'hormones ainsi que de toxiques végétaux ou animaux. Or, nous synthétisons actuellement 800 à 1 000 molécules nouvelles chaque année, dont beaucoup se retrouvent dans notre environnement. Un grand nombre de ces xénobiotiques ont des effets sur les régulations endocriniennes, d'où leur nom de perturbateurs endocriniens.

L'utilisation des hormones en zootechnie (« veau aux hormones ») provoque encore plus d'inquiétude dans l'opinion publique, dans la mesure où il s'agit d'un acte volontaire d'adjonction dans la chaîne alimentaire de composés actifs. Une controverse persiste sur l'innocuité de ces procédés qui sont d'autant plus mal reçus que la justification de leur utilisation est considérée comme purement économique.

Certaines hormones, en particulier stéroïdes, exercent un effet de stimulation sur la division cellulaire. À la suite de l'activation de divers oncogènes ou de la perte de gènes suppresseurs de tumeurs, ces mécanismes aboutissent à l'apparition de cancers hormonodépendants. Là encore, le rôle du mode de vie, de l'alimentation, de l'environnement semble déterminant. L'augmentation de la fréquence du cancer du sein dans les sociétés développées est frappante (une femme sur neuf souffrira d'un cancer du sein au cours de sa vie). L'observation de femmes proches sur le plan génétique, mais vivant soit au Japon soit aux États-Unis, confirme cet effet de l'environnement (entendu au sens large du terme). Le cancer de la prostate touche environ 40 % d'hommes de plus de soixante-dix ans. Cependant un assez grand nombre de ces cancers sont très peu évolutifs et ne donneront pas de complication pendant la durée de vie du sujet.

L'allongement de la longévité amène une partie de plus en plus importante de la population à des préoccupations de qualité de vie au cours du vieillissement. L'espoir de ralentir un certain nombre d'effets dégénératifs en utilisant des traitements hormonaux soulève beaucoup d'intérêt. De même, chez la femme, les inconvénients réels ou plus discutables de la ménopause ont appelé à l'utilisation de traitements substitutifs. Ces diverses thérapeutiques données chez les personnes âgées posent plusieurs problèmes difficiles. L'administration de médicaments à titre préventif chez des sujets sains rend difficile l'acceptation d'accidents iatrogènes. Ceux-ci, même rares, ne passent pas inaperçus, compte tenu de l'importance des populations traitées. Les études épidémiologiques se proposant d'évaluer l'efficacité de ces traitements ainsi que leurs complications sont rendues très difficiles par la durée nécessaire des observations et l'importance des cohortes à suivre.

L'ambition des six chapitres qui suivent et qui constituent ce rapport est de donner l'arrière-plan scientifique permettant de comprendre les mécanismes

biologiques impliqués dans ce groupe de problèmes majeurs de santé publique. Les voies de recherches actuelles sont résumées, les voies futures indiquées. Les principaux partenaires institutionnels intervenant dans chaque cas sont cités. Lorsqu'elles existent, les controverses scientifiques et quelquefois politico-médiatiques sont explicitées.

La recherche en endocrinologie a été un des points forts de la recherche biologique française au cours des dernières décennies. Elle joue un rôle majeur sur le plan fondamental où, en dehors de son intérêt propre, elle sert de modèle à la compréhension des mécanismes généraux de signalisation. Enfin, elle débouche sur certains des problèmes les plus préoccupants de santé publique, donnant lieu à de très importantes approches pharmacologiques et thérapeutiques.

Références bibliographiques

- Ben-Schlomo I. et Hsueh AJ. (2005). Three company: two or more unrelated receptors pair with the same ligand. *Mol Endocrinol*, **19** : 1097-1109.
- Bjarnadottir TK., Fredriksson R., Hoglund PJ., Gloriam DE., Lagerstrom MC. et Schioth HB. (2004). The human and mouse repertoire of the adhesion family of G-protein-coupled receptors. *Genomics*, **84** : 23-33.
- Bockaert J., Roussignol G., Becamel C., Gavarini S., Joubert L., Dumuis A., Fagni L. et Marin P. (2004). GPCR-interacting proteins (GIPs): nature and functions. *Biochem Soc Trans*, **32** : 851-855.
- Chambon P. (2005). The nuclear receptor superfamily: a personal retrospect of the first two decades. *Mol Endocrinol*, **19** : 1418-1428.
- Dennis AP. et O'Malley BW. (2005). Rush hour at the promoter: how the ubiquitin-proteasome pathway polices the traffic flow of nuclear receptor-dependent transcription. *J Steroid Biochem Mol Biol*, **93** : 139-151.
- Evans RM. (2005). The nuclear receptor superfamily: a Rosetta stone for Physiology. *Mol Endocrinol*, **19** : 1429-1438.
- Friedman JM. et Halaas JL. (1998). Leptin and the regulation of body weight in mammals. *Nature*, **395** : 763-776.
- Nakabayashi K., Matsumi H., Bhalla A., Bae J., Mosselman S., Hsu SY. et Hsueh AJ. (2002). Thyrostimulin, a heterodimer of two new glycoprotein hormone subunits, activates the thyroid-stimulating hormone receptor. *J Clin Invest*, **109** : 1445-1452.
- Perez DM. (2005). From Plants to Man: the GPCR Tree of Life. *Molecular Pharmacology*, **67** : 1383-1386.

- de Roux N., Genin E., Carel JC., Matsuda F., Chaussain JL. et Milgrom E. (2003). Hypogonadotropic hypogonadism due to loss of function of the Kiss-1 derived peptide receptor GPR54. *Proc Natl Acad Sci*, **100** : 10972-10976.
- Schioth HB. et Fredriksson R. (2005). The GRAFS classification system of G-protein couples receptors in comparative perspective. *General and comparative endocrinology*, **142** : 94-101.

Abréviations

- ADN : acide désoxyribonucléique
CAR : constitutive androstane receptor
EGF : epidermal growth factor
FSH : follicle-stimulating hormone
FXR : farnesoid X receptor
GnRH : gonadotropin releasing hormone
LH : luteinizing hormone
LXR : liver X receptor
PPAR : peroxisome proliferators-activated receptor
PXR : pregnane X receptor
RAR : retinoic acid receptor
RARE : retinoic acid receptor elements
RXR : retinoid X receptor
SXR : steroid X receptor
TSH : thyroid stimulating hormone

CHAPITRE 1

Les cancers hormonodépendants

HENRI ROCHEFORT, VINCENT CAVAILLÈS, DANY CHALBOS, OLIVIER CUSSENOT,
THIERRY MAUDELONDE, LOUIS MAURIAC, PASCAL PUJOL, PAUL ROBEL
ET DOMINIQUE STOPPA-LYONNET

Résumé

Ce chapitre a été initié en 2003-2004, avec la contribution de chercheurs et de cliniciens engagés dans la compréhension et la prise en charge des cancers stimulés par les hormones stéroïdes sexuelles. Ceux-ci comprennent les cancers les plus fréquents chez la femme (sein) et chez l'homme (prostate) avec environ 42 000 nouveaux cas de chaque par an. Ils constituent un problème majeur de santé publique. Leur incidence en France a doublé en vingt ans pour les cancers du sein et de la prostate. À l'exception de cancers héréditaires dus à des gènes de susceptibilité (seulement 2 à 3 % des cancers du sein sont dus aux mutations des gènes BRCA1/2), la grande majorité de ces cancers est sensible à l'effet de promoteur de tumeur des hormones stéroïdes correspondantes, œstrogènes et progestérone pour le sein et testostérone pour la prostate. Ces hormones ne modifient pas la structure des gènes mais leur expression en protéines responsables des activités favorisant la croissance et régulant l'invasion tumorale. Cet effet réversible est essentiellement dû à la stimulation des cellules transformées (ou initiées) par d'autres agents *via* leur interaction avec des récepteurs nucléaires spécifiques, par modulation de l'expression de plusieurs gènes dont certains restent à préciser. La croissance des cancers exprimant ces récepteurs peut être inhibée par des antagonistes hormonaux et par des inhibiteurs enzymatiques supprimant la production des hormones correspondantes. Le tamoxifène, qui est maintenant très largement utilisé dans le monde, a constitué le premier exemple de thérapie « intelligente » des tumeurs solides, ciblée sur une molécule, le récepteur des œstrogènes impliquée en cancérogenèse.

La France a été très compétitive dans la compréhension moléculaire des mécanismes d'action des hormones stéroïdes et de leurs antagonistes sur leurs récepteurs. Cependant la valorisation et le transfert en clinique ont surtout été le fait des pays anglo-saxons. Les réformes initiées ces dernières années tendent à faciliter ce transfert, mais pour améliorer la visibilité des recherches en France elles doivent être accompagnées de profondes réformes visant à : a) améliorer l'évaluation et éviter la tendance à la régionalisation de la recherche, très sensible dans certaines cancérôpôles ; b) donner des moyens et du temps pour la recherche aux individus et leurs équipes faisant les bons choix stratégiques. La multiplication des structures administratives diminue l'efficacité ; c) décloisonner et en particulier faciliter la coopération entre cliniciens, épidémiologistes et chercheurs de laboratoire sur des programmes communs afin d'éviter de disperser les efforts et les moyens vers des questions secondaires.

Parmi les recherches réalisables pouvant diminuer l'incidence et la mortalité de ces cancers, citons : a) les mécanismes de résistance aux traitements par les anti-hormones ; b) le rôle des hormones dans les étapes initiales de la cancérogenèse et sur les cellules souches, ce qui permettrait d'améliorer les actions

de prévention ; c) un développement concerté (chercheurs, cliniciens, industries pharmaceutiques) de nouvelles cibles thérapeutiques avec des essais cliniques randomisés ambitieux et sur des molécules originales découvertes et développées en France. Dans tous les cas, une hygiène de vie évitant les facteurs de risque connus (obésité, alcool, traitements hormonaux non contrôlés. . .) doit être encouragée par une information actualisée des patient(e)s et de leur médecins.

Introduction

Les cancers hormonodépendants constituent **un problème majeur de santé publique. Ce sont les cancers les plus fréquents en France** chez la femme (sein) comme chez l'homme (prostate) avec environ 42 000 nouveaux cas de chaque par an. De plus, leur incidence en France et dans les pays « développés » après correction tenant compte de l'augmentation de la longévité dans les deux sexes **a doublé en vingt ans. Du fait des progrès de la thérapeutique et du dépistage, le taux de mortalité pour le cancer du sein a baissé d'environ 40 %. Mais le nombre total de décès ne diminue que très peu du fait de l'augmentation du nombre de cas. Le cancer du sein reste en France la première cause de mortalité par cancer chez la femme.**

Le rôle favorisant des hormones stéroïdes sexuelles dans le développement des cancers du sein et de l'endomètre est établi depuis longtemps par l'efficacité des castrations et l'étude de modèles animaux (cancers induits par les œstrogènes (Lacassagne, 1932), souris KO et transgéniques). Il a ensuite été confirmé *in vitro* sur des lignées cellulaires humaines et *in vivo* par l'efficacité thérapeutique et préventive des anti-œstrogènes et des inhibiteurs des aromatasés sur les cancers du sein ainsi que par l'effet favorisant des hormones ovariennes sur l'incidence des cancers de l'endomètre et du sein chez les femmes ménopausées recevant une substitution hormonale (cf. rapports Académie nationale de médecine, Rochefort et Sureau, 2003, et chapitre 2). Il en est de même pour les androgènes et leurs antagonistes dans les cancers de la prostate.

Bien que les hormones aient été proposées pour agir directement comme **agents cytotoxiques initiateurs** en modifiant la structure de l'ADN, c'est surtout leur effet comme **agents promoteurs de tumeurs** qui est admis. Les mécanismes passant par une dérégulation du contrôle de la prolifération et de la différenciation cellulaire normales ne sont pas totalement élucidés d'autant qu'il existe une grande hétérogénéité pour un même type de cancer.

On sait qu'une **altération des systèmes de signalisation cellulaire** impliquant de **nombreux médiateurs** endocrines, paracrines, autocrines et ligands d'autres

récepteurs nucléaires et membranaires jouent un rôle essentiel en cancérogenèse. **Nous nous limiterons ici aux hormones stéroïdes sexuelles** et aux cancers de leur tissus cibles : sein, endomètre, voire ovaire pour les hormones ovariennes. C'est-à-dire les cancers pour lesquels des traitements visant à supprimer la production ou l'action des hormones stéroïdes sexuelles sont efficaces et de toxicité limitée car n'inhibant en priorité que les fonctions de reproduction.

Les actions des hormones sexuelles sur les cancers féminins et le cancer de la prostate présentent des points communs concernant : a) la régulation de la transcription par les hormones *via* leurs récepteurs, qui est élucidée dans ses grandes lignes ; b) les mécanismes généraux de la cancérogenèse hormonale qui passent par l'effet mitogène de ces hormones, principal responsable de leur action comme agents promoteurs de tumeur.

1 | Mécanismes de base du contrôle de la transcription par les hormones stéroïdes (avec Vincent Cavallès)

Ils seront décrits pour les œstrogènes, les particularités concernant androgènes et progestérone seront mentionnées plus loin.

1.1 Les récepteurs des œstrogènes

Les effets génomiques des œstrogènes résultent de l'action de deux récepteurs nucléaires des œstrogènes ($RE\alpha$ et $RE\beta$) (figure 1.1). Le $RE\alpha$ est codé par le bras long du chromosome 6 (Chambon, 1992). Le $RE\beta$ est codé par la région q22-24 du chromosome 14 (Gustafsson, 1999). Ils comportent 8 exons correspondant, au niveau de la protéine, à des domaines fonctionnels (A à F). Ces molécules font partie de la superfamille des récepteurs nucléaires et agissent comme des facteurs de transcription activés par la liaison de l'hormone. Ces récepteurs nucléaires ont une **organisation structurale commune** et des homologies de séquences variables selon les domaines considérés. Le domaine central de liaison à l'ADN constitué de deux structures en doigt de zinc est le plus conservé au sein de la superfamille (97 % d'homologie, entre les deux RE). La partie NH2 terminale des récepteurs renferme une première fonction d'activation de la transcription (AF1). La région C-terminale contient le domaine de liaison des ligands (LBD pour *ligand binding domain*), les motifs de dimérisation et la fonction d'activation de la transcription dépendante du ligand (domaine AF2) (Chambon, 1992 ; Berry *et al.*, 1990). Les deux fonctions transactivatrices sont plus ou moins actives selon le contexte cellulaire.

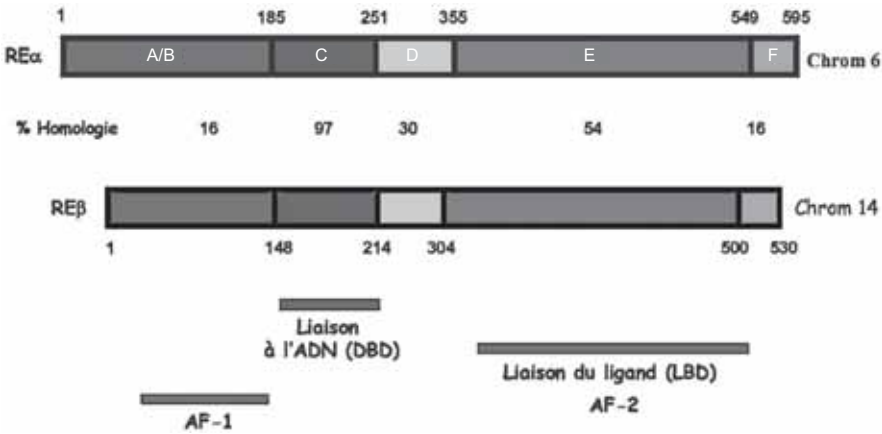


Figure 1.1

Représentation schématique de la structure des récepteurs des œstrogènes. Les domaines fonctionnels des deux récepteurs aux œstrogènes (RE α et RE β) sont représentés avec leur pourcentage d'homologie et le nombre d'acides aminés pour chacun des deux récepteurs dans les différents domaines. Le domaine central (région C) permet la liaison à l'ADN (DBD) et est situé entre les deux domaines d'activation de la transcription (AF1 et AF2). La fonction transactivatrice AF2 est localisée dans le domaine de liaison du ligand (LBD) et nécessite la présence d'hormone pour être active. La fonction AF1 est activée à la fois par les œstrogènes et les SERM.

Différentes antihormones ou **modulateurs sélectifs des RE (SERM)** sont capables de se lier aux RE et d'activer la fonction AF1 mais pas la fonction AF2, ce qui rend compte de leurs effets antagonistes partiels. La cristallographie aux rayons X a permis de déterminer la structure tridimensionnelle du LBD du RE α et du RE β , en présence d'agonistes (17- β œstradiol, diéthylstilbestrol) ou d'antagonistes (hydroxy-tamoxifène, raloxifène, génistéine, ICI164384) (Brzozowski *et al.*, 1997). Le LBD est constitué d'une douzaine d'hélices α et de deux petits feuillets β et la fixation du ligand, au sein d'une cavité hydrophobe enfouie au cœur du domaine, induit un changement de conformation très important. L'hélice 12, en se rabattant sur la poche de fixation du ligand crée à la surface du domaine une nouvelle zone d'interaction pour différents coactivateurs transcriptionnels. En présence de SERM, le repliement de l'hélice 12 est altéré de façon différente pour le tamoxifène et le raloxifène, et le LBD adopte une conformation différente expliquant les effets antagonistes de ces molécules sur les fonctions AF1. L'apport de ces données structurales a contribué à l'identification de ligands spécifiques du RE α ou du RE β . Certaines de ces molécules sont agonistes sur le RE α et antagonistes sur le RE β . D'autres molécules sont plus spécifiquement agonistes du RE α tels que le propyl-pyrolazole-triol (PPT) ou du RE β tels que le diarylpropionitrile (DPN) ou le phyto-œstrogène génistéine (Pyke *et al.*, 1999).

1.2 Expression des RE

Le RE α est préférentiellement exprimé dans les tissus cibles classiques des œstrogènes (utérus, glande mammaire hypophyse, etc.), alors que le RE β est distribué dans un grand nombre de tissus y compris le côlon, le système vasculaire, le poumon et les fibroblastes. Il est majoritairement exprimé dans la prostate, les ovaires et les testicules (Gustafsson, 1999). Dans les cancers du sein et de l'ovaire, le rapport des niveaux d'expression des deux récepteurs (RE α /RE β) est significativement augmenté par la diminution de l'expression du RE β dans les étapes précoces de la tumorigénèse (Roger *et al.*, 2001).

De nombreux facteurs (hormones, facteurs de croissance peptidiques, seconds messagers...) régulent le RE α par des mécanismes transcriptionnels et post-transcriptionnels (stabilité de l'ARNm). La progestérone diminue la concentration du RE α dans l'endomètre et la glande mammaire, mais le tamoxifène maintient un taux élevé. De nombreux variants des ARNm codants pour les RE α et β sont générés par épissage alternatif. Ils correspondent à des délétions d'exons pour le RE α et à des épissages alternatifs pour le RE β . La plupart de ces récepteurs mutants peuvent interférer sur l'activité de la forme sauvage.

1.3 Les cofacteurs transcriptionnels

Les changements conformationnels induits par la liaison du ligand permettent aux récepteurs d'interagir avec un grand nombre de partenaires agissant comme coactivateurs ou corépresseurs transcriptionnels (Smith et O'Malley, 2004). Ces cofacteurs interviennent dans la formation du complexe de pré-initiation de la transcription en interagissant avec différents composants de la machinerie transcriptionnelle de base. Ils agissent également sur la structure de la chromatine en modulant l'accessibilité de différents facteurs de transcription sur l'ADN (figure 1.2). Les coactivateurs qui sont recrutés par la fonction AF2 en présence d'agoniste possèdent un ou plusieurs motifs (LxxLL ou NR box). Ce motif établit des contacts avec différents acides aminés du LBD, dont un acide glutamique et une lysine très conservés, qui forment une pince électrostatique importante pour le maintien du motif LxxLL. Différentes approches thérapeutiques sont envisagées pour inhiber la fixation des coactivateurs sur les récepteurs (compétiteurs peptidiques ou molécules organiques). En présence d'antihormones, la conformation du LBD ne permet pas l'interaction avec les coactivateurs mais permet le recrutement de corépresseurs transcriptionnels tels que SMRT et N-CoR qui inhibent la transcription (figure 1.3). L'expression relative des coactivateurs et des corépresseurs transcriptionnels est une des explications de l'activité agoniste/antagoniste partiel des SERM qui varie selon les tissus cibles. Enfin, certains partenaires des RE, recrutés par les œstrogènes, inhibent la transcription.

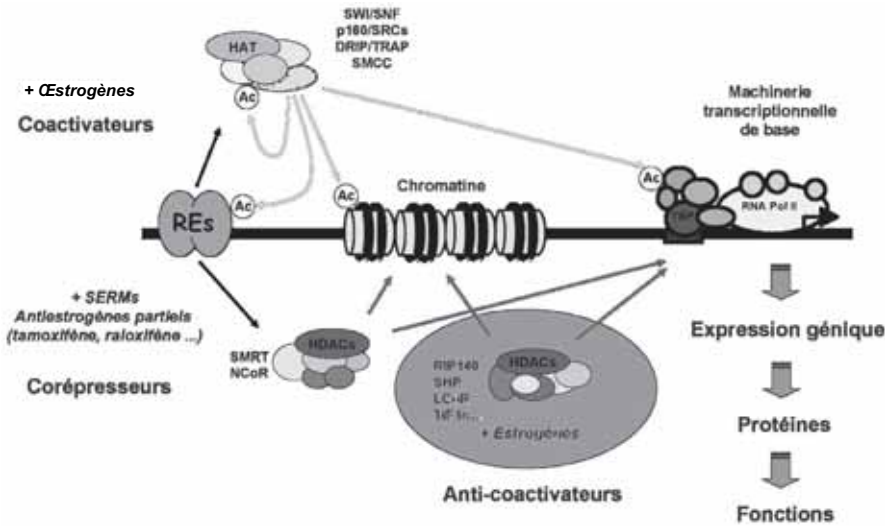


Figure 1.2

Mécanismes d'action des cofacteurs transcriptionnels.

La liaison du ligand (agoniste ou antagoniste) induit des changements conformationnels du récepteur permettant le recrutement de cofacteurs transcriptionnels : coactivateurs en présence d'agoniste et corépresseurs en présence d'antagonistes partiels (SERM). Les anticoactivateurs sont atypiques car, bien que recrutés par les agonistes, ils inhibent l'activité des récepteurs nucléaires. Les coactivateurs transcriptionnels agissent en stimulant l'initiation de la transcription par stabilisation de la machinerie transcriptionnelle basale, et en remodelant la structure chromatinienne via différentes activités enzymatiques. L'acétylation (Ac) des histones est une des modifications post-traductionnelles impliquées dans la transition entre chromatine compactée et ouverte, par l'intermédiaire des histones acétyltransférase (HAT) et désacétylases (HDAC).

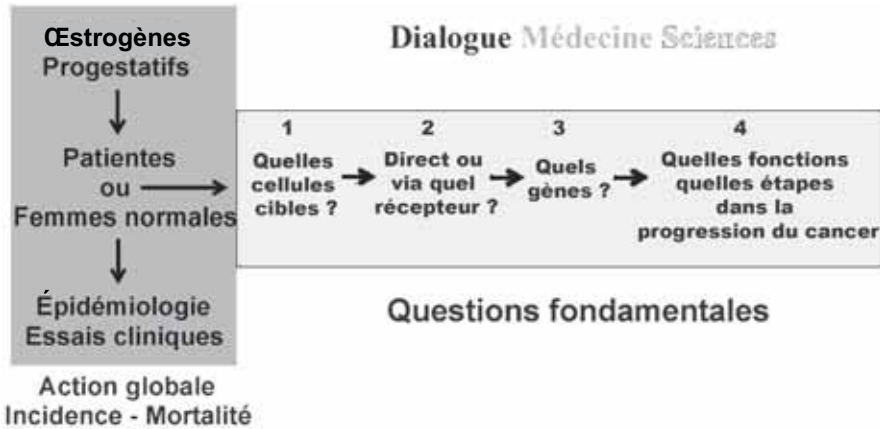


Figure 1.3

Des lignées cellulaires aux malades et des malades aux mécanismes.

Le rôle des hormones ovariennes dans les cancers génitaux chez la femme abordé de façon intégrée par les cliniciens et épidémiologistes et analysé dans leur mécanisme par les biologistes cellulaires et moléculaires. Pour les œstrogènes dans les cancers du sein, il y a cohérence entre les deux approches, et les études fondamentales ont facilité les applications thérapeutiques. Ce n'est pas le cas pour les progestatifs où les résultats cliniques relancent la nécessité d'autres études fondamentales.

C'est le cas des cofacteurs RIP140 ou L-CoR. Les cofacteurs transcriptionnels sont souvent recrutés sous forme de complexes multiprotéiques qui associent parfois des acides ribonucléiques tel que le coactivateur SRA. De nombreux corégulateurs transcriptionnels des RE possèdent des activités enzymatiques qui permettent le remodelage de la chromatine (.) (McKenna *et al.*, 2002). Plusieurs coactivateurs (CBP/p300, p/CAF, SRC-1 et SRC-3) sont des acétyltransférases capables de modifier différentes lysines sur la queue N-terminale des histones. L'hyperacétylation des histones est retrouvée dans les régions du génome activement transcrites. À l'opposé, les corépresseurs SMRT, N-CoR et RIP140 recrutent des histones désacétylases qui vont favoriser la compaction de la chromatine au niveau des gènes régulés par les œstrogènes pour terminer la stimulation hormonale. Ces mécanismes expliquent les effets décrits en microscopie électronique de dispersion de la chromatine et de sa condensation par les anti-œstrogènes. D'autres activités enzymatiques (méthylases ou kinases) modifient également les histones. D'autres cofacteurs doués d'activité ubiquitine-ligase pourraient participer à la dégradation des récepteurs en présence d'hormones. Le gène codant pour le coactivateur SRC3 est amplifié dans certains cancers du sein et de l'ovaire, d'où son autre nom AIB1 (amplified in breast cancer 1). Sa surexpression pourrait favoriser la cancérogenèse mammaire. Le rôle physiologique de certains corégulateurs des RE a été analysé par invalidation des gènes correspondants chez la souris (.) (Smith et O'Malley, 2004). Ainsi les souris SRC1^{-/-} et SRC3^{-/-} ont une sensibilité aux œstrogènes diminuée (.) (Xu *et al.*, 2000). L'invalidation du gène RIP140 provoque une stérilité due à une absence d'ovulation par défaut de rupture des follicules ovariens.

1.4 Activation en deux temps des RE par les œstrogènes

Les récepteurs des hormones stéroïdes sont synthétisés dans le cytoplasme. *En l'absence d'hormone*, ils interagissent avec des « heat-shock proteins » protéines de choc thermique (HSP 90 et HSP 70). Le complexe présent dans un extrait cellulaire de faible force ionique, appelé « cytosol » par les biochimistes, migre avec un coefficient de sédimentation de 8S. Les HSP empêchent l'interaction du RE avec l'ADN mais semblent nécessaires à l'activité ultérieure du récepteur par leur fonction de protéine chaperon, en assurant le repliement de la protéine en une structure 3D fonctionnelle. L'hormone interagit spécifiquement avec son récepteur et induit des changements conformationnels qui vont modifier les interactions moléculaires en au moins deux étapes :

- **dissociation des HSP et translocation du RE du compartiment cytosolique vers un compartiment nucléaire** où son interaction avec la chromatine nécessitera une extraction des noyaux par des tampons à haute force ionique (KCl 0,5 M) (Jensen *et al.*, 1968). La translocation du RE, qui passe d'un

compartiment soluble (cytosol ou nucléosol) à un compartiment plus fortement lié à la chromatine, est induite par les œstrogènes mais aussi les anti-œstrogènes (Rochefort et Borgna, 1981). Cette première étape associée à la dimérisation du RE, permet, en exposant l'extrémité N-terminale, d'activer la fonction activatrice AF1 et de comprendre l'activité agoniste des SERM qui varie selon les tissus.

La localisation intracellulaire des RE, par immunocytochimie, est en majorité intranucléaire grâce à la présence de sites de localisation nucléaire situés dans le domaine E. Le RE α effectue en permanence la navette entre le cytoplasme et le noyau. Dans le noyau, la mobilité du RE α diminue en présence d'hormone et le RE α passe en quelques minutes d'une localisation diffuse à un marquage très ponctué ;

- **recrutement des RE sur les promoteurs œstrogéno-régulés.** L'activation de la transcription par les RE implique la liaison directe des récepteurs sur des séquences palindromiques de l'ADN appelées « ERE » estrogen response element (Chambon, 1992). Ces éléments sont généralement présents en amont des gènes cibles, leur séquence consensus est AGGT-C_{xxx}TGACCT. Les RE se fixent sous forme d'homodimères sur les ERE par l'intermédiaire des premiers doigts de zinc du domaine de liaison à l'ADN de chacune des unités du dimère (RE)₂. Le RE α et le RE β peuvent former des hétérodimères. L'efficacité transcriptionnelle du RE β étant inférieure à celle du RE α (Gustafsson, 1999), celui-ci atténue l'effet du RE α . L'immunoprécipitation de la chromatine (ChIP) a permis de visualiser l'association du RE α avec différents partenaires sur les promoteurs des gènes œstrogéno-régulés. Après stimulation par les œstrogènes, on observe la fixation rapide du récepteur sur l'ADN. Cette association est cyclique, de même que le recrutement séquentiel de différents complexes corégulateurs. La synchronisation de ces événements permet d'aboutir à l'initiation efficace de la transcription et varie pour un même gène avec la nature des cellules cibles.

1.5 Effets génomiques ERE-indépendants par interactions protéine-protéine

Les RE, comme la plupart des récepteurs nucléaires, peuvent également, sans se lier à l'ADN, moduler l'activité transcriptionnelle d'autres facteurs de transcription en interagissant directement avec ces protéines. Les interactions avec les *facteurs de transcription AP-1*, pourraient induire des facteurs mitogènes comme l'IGF-1 et la cycline D1. L'induction de l'activité AP-1 par l'œstradiol résulte de la liaison directe du RE α avec la sous-unité Jun du complexe AP1. L'œstradiol n'a pas cet effet stimulant sur le RE β . Le RE α interagit également avec le *facteur NF- κ B* qui pourrait favoriser la cancérogenèse par son effet pro-inflammatoire, et

avec le *facteur de transcription ubiquitaire Sp1*. L'induction par l'œstradiol des gènes *c-fos*, *c-myc*, et *cathepsine D* ferait intervenir ce type d'interférence, leurs gènes ayant dans leur promoteur un demi-site ERE associé à un site Sp1.

1.6 Modifications post-traductionnelles des récepteurs

Différentes modifications post-traductionnelles des RE modulent leur concentration ou leur activation. La *phosphorylation du RE* stimule son activité transcriptionnelle et la prolifération cellulaire en l'absence de ligand.

L'*acétylation de lysines de la région C du RE α* par le coactivateur p300 diminue la réponse transcriptionnelle aux œstrogènes. En présence d'hormones le RE α est *ubiquitinylé* puis dégradé par le protéasome ce qui diminue sa concentration. Ces modifications post-traductionnelles affectent aussi des cofacteurs transcriptionnels.

2 | Les mécanismes généraux de la cancérogenèse hormonale

2.1 Les mécanismes généraux de la cancérogenèse

Les cellules épithéliales peuvent subir l'altération séquentielle de la structure de plusieurs gènes modifiant les mécanismes normaux de la transduction des signaux impliqués dans le contrôle normal de la prolifération, de la différenciation cellulaire, de l'apoptose et de la réparation du génome (Vogelstein et Kinzler, 2004). Il s'agit d'un processus lent à plusieurs étapes impliquant plusieurs mutations somatiques, ce qui explique que l'âge est un facteur de risque important pour de nombreux cancers. Les facteurs externes responsables de ces altérations peuvent être physiques, mécaniques, infectieux (virus par exemple). Les facteurs endogènes proviennent essentiellement du métabolisme de l'oxygène (ROS). Les hormones *via* leur effet mitogène pourraient faciliter l'effet mutagène de ces agents, mais c'est surtout leur effet de promoteur de tumeur par modulation de l'expression de certains gènes, sans altérer leur structure, qui est démontré.

Le cas des cancers expérimentaux provoqués plus rapidement chez le jeune animal par cancérigène chimique, physique ou viral ou par surexpression d'un seul oncogène est exceptionnel dans l'espèce humaine où, dans la majorité des cas, les mécanismes sont multifactoriels et mis en place lentement en plusieurs étapes. Ces cancers subissent ensuite, du fait de leur instabilité génétique, des

gains et pertes de fragments de chromosomes correspondant souvent à des amplifications d'oncogènes et des délétions de gènes suppresseurs de tumeur. Les mécanismes varient cependant selon les tissus et organes considérés. De plus, il est maintenant démontré qu'il existe différents types moléculaires de cancers du sein, nécessitant des thérapies spécifiques différentes. Les cancers hormono-dépendants sont issus des organes cibles des hormones stéroïdes sexuelles. Leur étude a ouvert la voie aux premières thérapies « intelligentes » car ciblées sur des molécules impliquées dans les mécanismes de cancérogenèse.

2.2 Arguments expérimentaux de l'effet cocarcinogène des hormones

Les nombreuses études de tumeurs expérimentales, induites chez les rongeurs par des cancérogènes chimiques, ont permis de démontrer que les hormones ovariennes stimulaient le développement des tumeurs mammaires. Ces tumeurs régressent après ovariectomie ou traitement par les anti-œstrogènes et réapparaissent après l'administration d'œstrogène (tumeur hormonodépendante) ou spontanément (tumeur devenue résistante). De même, les androgènes induisent des cancers de la prostate chez le rat mâle, souvent en association avec un cancérogène chimique tel que le DMBA (Huggins, 1941) ou le NMU. Pour certaines souches consanguines, l'administration d'œstrogènes suffit à induire des tumeurs mammaires chez la souris (Lacassagne, 1936) et des tumeurs rénales chez le hamster. De plus, la surexpression de l'aromatase chez la souris induit des tumeurs mammaires par hyperœstrogénie locale. Enfin la testostérone, souvent associée aux œstrogènes, induit des cancers de la prostate chez le rat NB.

2.3 Arguments cliniques et épidémiologiques

Outre l'effet mitogène des hormones sur les lignées de cellules cancéreuses humaines en culture, au moins trois types d'arguments en situation réelle indiquent l'effet favorisant des hormones stéroïdes sexuelles en cancérogenèse :

- l'efficacité clinique des traitements par anti-œstrogènes et inhibiteurs de l'aromatase pour le sein et de la castration et des anti-androgènes pour la prostate ;
- les effets délétères de certains traitements hormonaux tels que les substitutions hormonales après la ménopause, ou l'effet de traitements anabolisants (voir chap. 2) ;
- les facteurs de risque exposant à un cancer du sein sporadique, outre l'âge et le rôle aggravant d'une première grossesse tardive ou d'une nulliparité, on note surtout des facteurs liés à une augmentation d'exposition

aux hormones ovariennes (Hulka et Stark, 1995) tels que THS prolongé, ménopause tardive, puberté précoce, obésité post-ménopausique, densité mammaire élevée, ainsi qu'une concentration plasmatique élevée d'œstradiol et d'IGF-1 libres.

2.4 Deux grands types de mécanismes

On distingue classiquement deux grands types de mécanismes, selon que les hormones suffisent à induire la cancérogenèse comme agent initiateur, ou agissent comme agents promoteurs en association avec d'autres cancérigènes ou oncogènes *via* leurs récepteurs.

2.4.1 Il est ni démontré ni exclu que les œstrogènes naturels soient des initiateurs de tumeurs par leur effet mutagène, qui a été observé *in vitro* mais pas *in vivo*

Le cas des cancers de l'utérus et du vagin induits par le traitement de femmes enceintes par le Distilbène (diéthylstilbestrol) (figure 1.4) dans les années 1970 était dû à son action mutagène sur l'ADN. Ce type d'œstrogène de synthèse n'est plus prescrit. Ce mécanisme reste possible pour les SERM non stéroïdiens qui peuvent aussi s'hydroxyler, aussi sont-ils contre-indiqués chez les femmes susceptibles d'être enceintes.

Le même mécanisme mutagène par liaison covalente directe de dérivés hydroxylés des œstrogènes naturels (ou adduits) aux bases de l'ADN reste envisagé (Pharoah, 2002) (voir aussi chap. 6). L'œstradiol endogène peut être métabolisé dans la glande mammaire en catéchol œstrogènes par hydroxylation en 4 *via* l'enzyme à cytochrome P450 codé par le gène CYP 1B1, dont le polymorphisme serait un facteur de risque. En stimulant la prolifération de cellules initialement non tumorales, l'œstradiol pourrait aussi, *via* le RE α en raccourcissant la phase G1 du cycle, entraver les processus de réparation et faciliter des mutations produites par d'autres mutagènes.

2.4.2 Les hormones stéroïdes sexuelles sont surtout des promoteurs de tumeur *via* leurs récepteurs spécifiques

Les hormones stéroïdes sexuelles ne modifient pas la structure des gènes par mutation, mais facilitent l'action d'autres cancérigènes chimiques présents dans

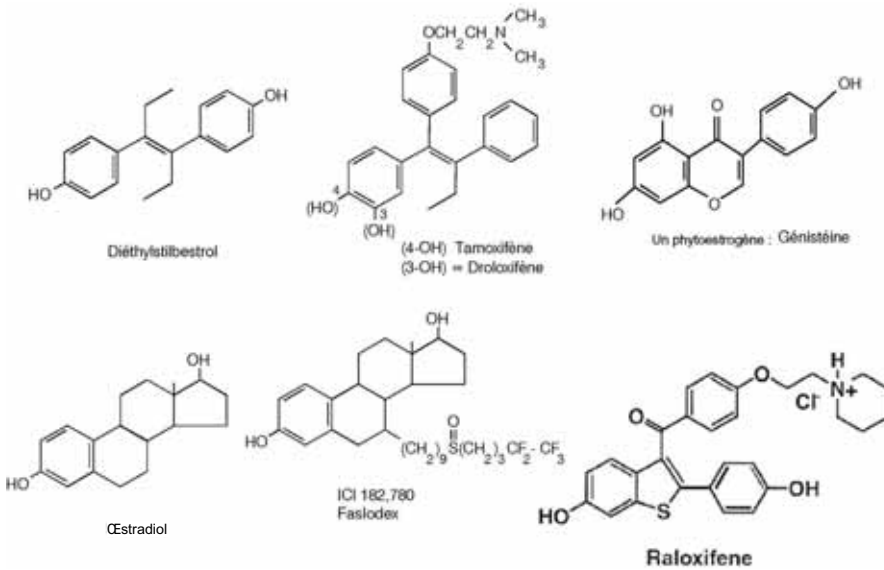


Figure 1.4

Formules des principaux anti-œstrogènes ou SERM utilisés en clinique comparé à celles de l'œstradiol et du diéthylstilbestrol. Par rapport au tamoxifène, le raloxifène n'induit pas de cancer de l'endomètre et le fulvestran est un anti-œstrogène pur proposé dans certains cas de résistance au tamoxifène. La génoméstatine, un phyto-œstrogène du soja, est proposé comme additif alimentaire dans le traitement alternatif de la ménopause. Se liant surtout au RE β , il est potentiellement intéressant, mais on manque d'études démontrant son efficacité et innocuité.

l'environnement ou physiques (irradiation du pelvis pour la prostate, radios thoraciques répétées pour le sein). Les hormones stéroïdes sexuelles *via* leur récepteur modifieraient l'expression de gènes décisifs (dont des proto-oncogènes), facilitant une prolifération anarchique de la cellule tumorale ou lui donnant un avantage sélectif par des mécanismes épigénétiques (enzymes de la chromatine), que ces gènes soient déjà mutés ou par simple effet de dosage. Elles interviendraient « en deuxième ligne », sur un génome vieilli qui aurait subi des mutations. Cet effet promoteur est réversible et surtout observé chez le sujet âgé, ce qui correspond à l'histoire naturelle des cancers de la prostate et du sein. Cela pourrait expliquer que les œstrogènes des contraceptifs oraux augmentent peu le risque de cancer du sein, alors qu'ils l'augmentent lors d'un THS prolongé de la ménopause. La femme ménopausée abriterait des cellules déjà transformées qui, sans stimulation hormonale, ne conduiraient pas à l'émergence clinique d'un cancer. Le même mécanisme interviendrait pour les androgènes sur le cancer de la prostate.

2.5 Les premières étapes de la cancérogenèse hormonale humaine sont encore mystérieuses

Contrairement aux tissus tumoraux prélevés en chirurgie et aux lignées tumorales humaines facilement accessibles, nous manquons de modèles d'étude partant de tissu normal et reproduisant le processus lent de la cancérogenèse. L'effet des hormones varie en fonction de l'âge de la femme et des étapes de la vie génitale. Délétère à la ménopause, il pourrait être bénéfique chez la jeune femme enceinte en favorisant la différenciation terminale de la glande mammaire. L'effet protecteur d'une grossesse précoce pourrait être dû à une inondation hormonale suivie de sevrage à l'origine de la diminution par apoptose du nombre de cellules souches exposées à des mutations et potentiellement cancéreuses. Le rôle du micro-environnement est important. La perte des contacts normaux entre les cellules épithéliales, la matrice extracellulaire et les cellules mésenchymateuses faciliteraient la transformation tumorale.

La cancérogenèse virale chez les oiseaux a été à l'origine de la découverte des oncogènes. Les tumeurs mammaires de souris induites par le rétrovirus MMTV transmis par le lait et s'insérant à proximité de plusieurs oncogènes pour augmenter leur expression ont constitué un modèle démontrant l'effet promoteur des hormones. Bien qu'on ne retrouve pas de particules virales dans les cancers du sein, on détecte des séquences virales homologues du gène *env* et des séquences LTR, suggérant un mécanisme d'insertion de ces séquences régulatrices à proximité d'oncogènes potentiels. Cette hypothèse n'est ni exclue ni démontrée. Le cancer du col utérin initié par certains papillomavirus est aussi facilité par les contraceptifs oraux.

2.6 Les cancers héréditaires sont rares

Les facteurs de risque héréditaires ne représenteraient que 6 à 10 % de la totalité des cancers du sein. Ils sont généralement dus à des altérations multigéniques de faible pénétrance dont la majorité (~ 70 %) est inconnue. Certaines mutations de forte pénétrance concernent généralement des gènes suppresseurs de tumeur ; transmises par les cellules germinales, elles touchent souvent le sujet jeune. Pour les cancers du sein, les mutations des gènes BRCA1 et BRCA2 ne représentent que 2 % des cancers du sein (§ 4.3). Les altérations géniques seraient multiples et de moindre pénétrance dans les cancers de la prostate (§ 6) avec un polymorphisme de gènes modulant le métabolisme des stéroïdes sexuels (Henderson et Feigelson, 2000).

3 | Cancers du sein et hormones ovariennes

Le cancer du sein, du fait de sa fréquence, a été le plus étudié (une femme sur neuf aura un cancer du sein dans sa vie).

Les hormones ovariennes facilitent l'émergence puis la progression de la majorité des cancers du sein par leur effet de promoteur de tumeur. L'approche globale des cliniciens et épidémiologistes concernés par la santé des malades et celle des scientifiques qui se posent des questions fondamentales pour comprendre les mécanismes par lesquels œstrogènes et progestérone favorisent ces cancers chez les femmes sont très différentes. Un haut degré de certitude est atteint quand les résultats de ces deux approches convergent (figure 1.3). C'est le cas pour les œstrogènes pour lesquels les modèles cellulaires ont facilité les applications médicales. En revanche, pour les progestatifs, les observations cliniques nous obligent à réorienter les études de laboratoire.

3.1 Des lignées cellulaires aux malades : gènes et protéines régulés par les œstrogènes et marqueurs pronostiques et prédictifs dans les cancers du sein

3.1.1 Les lignées de cancer du sein

Les lignées de cancer du sein contenant des RE ont permis de décrire les premières protéines induites par l'œstradiol puis de les transférer assez vite en clinique. L'induction du récepteur de la progestérone (RP) dans l'utérus de rongeur a été utilisée comme un premier test de fonctionnalité des RE dans les cancers du sein. Par marquage de protéines néosynthétisées à la méthionine S35, diverses protéines caractérisées par leur poids moléculaires (Westley et Rochefort, 1980) ont été ensuite identifiées par séquençage, réactivité immunologique et clonage cDNA. C'est ainsi que la protéine 52 k a été identifiée à la procathepsine D, une protéase lysosomale, après qu'on a établi sa signification pronostique de marqueur indépendant exposant au risque de métastases (revue dans Rochefort *et al.*, 2000). À l'inverse, le pS2/TFF1 (Rio *et al.*, 1988) s'est avéré un bon marqueur d'hormonodépendance. Par la suite, d'autres protéines et facteurs peptidiques ont été décrits, de signification très variable traduisant les effets polymorphes des œstrogènes. Ces premières études ont permis d'établir :

- a) que l'induction correspondait à l'occupation et à l'activation des RE concernés pour des doses physiologiques d'hormones (DE 50) correspondant en général à l'affinité de l'hormone pour son récepteur ;

- b) que le type de gènes et de protéines régulés était spécifique de la nature des hormones et des récepteurs activés par ces hormones. C'est ainsi que le 5-androstène diol, un androgène surrénalien, induit des réponses œstrogéniques en se liant au RE et des réponses androgéniques en se liant au récepteur des androgènes. De plus, certaines protéines induites par les œstrogènes sont également induites par les facteurs de croissance.

3.1.2 Étude globale des transcriptomes (puces à ADN, SAGE) et des protéomes

Avec l'ère de l'étude globale des transcriptomes (puces à ADN, SAGE) et des protéomes, un nombre beaucoup plus important de gènes induits ou réprimés est maintenant décrit. Les protéines décrites précédemment ont été confirmées. L'étude des gènes régulés par l'œstradiol et les anti-œstrogènes sur les lignées MCF7 et T47D permet de les classer selon leur cinétique de régulation et leur sensibilité aux anti-œstrogènes (Charpentier *et al.*, 2000 ; Cicatiello *et al.*, 2004). L'intérêt majeur de l'analyse globale des transcriptomes et protéomes sur les tumeurs prélevées chez les malades a été de classer les cancers du sein en plusieurs catégories (ou clusters) selon leur expression phénotypique (Sorlie *et al.*, 2003). Les cancers RE α positifs sont associés à des marqueurs de cellules luminales (kératines 5/6) en accord avec la localisation exclusive des RE α dans les cellules luminales. Ils représentent la majorité (70 %) des cancers invasifs. Les cancers RE négatifs associés à des marqueurs de cellules basales (kératines 8/18) (5-15 %) suggèrent une origine différente et sont résistants à l'hormonothérapie. Les cancers surexprimant neu/HER2 sont souvent RE négatifs mais bénéficient d'un traitement ciblé. La définition des fonctions des différents gènes dont l'expression caractérise une tumeur devrait aider à comprendre les effets complexes et parfois opposés des hormones ovariennes sur la croissance, l'apoptose, et la dissémination métastatique d'un cancer hormonodépendant. La signification biologique et physiopathologique de ces études globales à grande échelle va nécessiter plusieurs années pour être totalement élucidée. L'objectif à terme de ces études est de définir pour chaque malade une carte d'identité des tumeurs qui pourrait guider dans le choix d'un traitement individualisé. Le nombre très élevé d'informations parfois contradictoires données par ces nouvelles approches, ainsi que le coût des plates-formes technologiques, risquent dans un premier temps et paradoxalement d'accroître la confusion parmi les cliniciens et de ralentir le transfert des découvertes fondamentales vers les applications médicales. À ce jour, les cibles thérapeutiques spécifiques utilisées (RE, RP et HER2/neu) ou potentielles (protéases, autres récepteurs membranaires et facteurs transcriptionnels, etc.) avaient été déjà décrites par des approches classiques souvent inspirées de la signalisation hormonale. Les recherches devraient s'intensifier sur les cancers négatifs pour RE et HER2/neu qui ne bénéficient pas de thérapie ciblée.

3.2 Mécanismes de régulation de la prolifération de lignées de cellules cancéreuses par les œstrogènes et leurs récepteurs (avec Dany Chalbos)

Les lignées cellulaires établies à partir de cancers du sein humain ont été décisives en démontrant que l'effet mitogène des œstrogènes était direct, ce qui a permis de préciser leur mécanisme d'action ainsi que celui des anti-œstrogènes. Les effets *in vitro* des œstrogènes et anti-œstrogènes sont en accord avec ceux observés *in vivo* chez les femmes. Les œstrogènes sont la seule classe de stéroïdes capable de stimuler la prolifération des cellules RE+, alors qu'ils sont inefficaces sur les cellules RE négatives (Lippman *et al.*, 1976 ; Chalbos *et al.*, 1982). Globalement, ils agissent en accélérant l'entrée des cellules en phase S de synthèse de l'ADN du cycle cellulaire, en raccourcissant la durée de la phase G1. Ils augmentent également la survie de cellules quiescentes et diminuent leur entrée en apoptose. Plusieurs mécanismes moléculaires sont proposés, leur importance relative *in vivo* n'est pas élucidée, tous **impliquent une étroite interrelation entre œstrogènes et facteurs de croissance**. Les facteurs de croissance (IGF-I, EGF) et les œstrogènes ont un effet synergique sur le cycle cellulaire et stimulent souvent la transcription des mêmes gènes (*c-myc*, *c-fos*, cycline D1, pS2, cathepsine D). Les anti-œstrogènes, inhibent l'action des facteurs de croissance sur la prolifération des cellules MCF7 et la transcription du gène pS2 en l'absence d'œstrogènes (Vignon *et al.*, 1987). L'intégrité des deux voies de régulation par œstrogènes et facteurs de croissance est parfois indispensable (effet permissif). L'œstradiol ne stimule plus la prolifération des cellules stromales utérines chez des souris où le récepteur EGF a été invalidé ou inhibé par des anticorps. Inversement, l'EGF n'induit plus la croissance utérine de souris invalidées pour le gène *RE α* , bien que certaines réponses au facteur de croissance soient conservées. Ainsi, les facteurs de croissance miment les œstrogènes, inversement, les œstrogènes peuvent induire ou moduler des réponses attribuées aux facteurs de croissance.

3.2.1 Mécanismes d'action des œstrogènes sur leurs récepteurs via des facteurs mitogènes sécrétés

Ces mécanismes impliquent l'induction et la synergie avec des facteurs de croissance sécrétés par les mêmes cellules (**mécanisme autocrine**) ou par des cellules voisines de même type ou de type différent (**mécanisme paracrine ou juxtacrine**).

À partir de l'observation initiale d'un effet mitogène de milieux de culture conditionnés par des cellules MCF7 traitées par l'œstradiol, nous avons proposé l'hypothèse d'une régulation autocrine par des facteurs sécrétés induits

par l'œstradiol et agissant sur les récepteurs membranaires des mêmes cellules. Celle-ci a été ensuite confirmée par la description de plusieurs facteurs de croissance sécrétés induits par l'œstradiol au niveau transcriptionnel, tels que TGF α , IGF-II, HGF, cripto (Dickson et Lippman, 1986) mais aussi la protéase cathepsine D qui augmente le nombre de cellules cancéreuses *in vitro* et *in vivo* par un mécanisme complexe (Rochefort *et al.*, 2000).

3.2.2 L'effet des œstrogènes sur leurs récepteurs par des mécanismes intracellulaires (régulations intracrines)

Ces mécanismes, comme pour les régulations autocrines, ne semblent intervenir que pour des cellules déjà transformées devenues autonomes et qui à la fois se divisent et expriment le RE. Ils mettent en jeu : a) l'induction de protéines mitogènes tels que récepteurs de facteurs de croissance, c-myc, facteurs transcriptionnels de la famille AP-1 (c-Fos et c-Jun), ainsi que la régulation des protéines régulant directement le cycle cellulaire (§ 3.2.4); b) l'augmentation d'activité de facteurs transcriptionnels par simple interaction protéine-protéine avec RE α . Un mutant dominant négatif des facteurs AP-1, le TAM67, inhibe l'effet mitogène de l'œstradiol *in vitro* et *in vivo* chez la souris athymique.

3.2.3 L'activation du RE α par phosphorylation en l'absence d'œstrogènes

La phosphorylation du RE α sur la serine 118, induite par les facteurs de croissance, suffit à activer ce récepteur en passant par la cascade Ras-Raf-MAPK. Cette transactivation est inhibée par un anti-œstrogène pur. Cependant, en augmentant l'effet agoniste du tamoxifène, elle serait impliquée dans certains cas de résistance des cancers du sein au tamoxifène secondaires à l'hyperactivité du récepteur de l'EGF et de HER 2/Neu (Kato *et al.*, 1995).

La voie de survie PI3-kinase/AKT, stimulée par IGF-1, phosphoryle également le RE α sur des serines localisées en AF-1. La surexpression d'Akt augmente l'activité transcriptionnelle de RE α et l'inhibition de cette voie bloque les effets d'EGF ou d'IGF-I sur l'activité du RE.

3.2.4 In fine modulation des protéines intracellulaires contrôlant la transition G1 → S du cycle cellulaire

La régulation du cycle cellulaire passe par la phosphorylation de la protéine Rb ce qui permet la levée d'inhibition des facteurs de transcription tel que E2F. Elle est assurée par des kinases, principalement cdk2 et cdk4, dépendantes de cyclines, essentiellement cycline D1 puis cycline E lors de la phase G1 du cycle. Les complexes cdk-cyclines sont inhibés dans le noyau par des inhibiteurs p21 et p27. Les œstrogènes stimulent l'entrée en phase S en agissant sur la phase Go-G1 (Pestell *et al.*, 1999). Inversement, les SERM comme le tamoxifène bloquent les cellules en Go et ont surtout une action cytostatique. Les œstrogènes comme les facteurs de croissance facilitent la phosphorylation de la protéine Rb à plusieurs niveaux.

a) Ils induisent **la cycline D1**. Cette induction est nécessaire à l'effet des œstrogènes, les souris invalidées pour le gène cycline D1 ne développant pas de glandes mammaires lors de leur gravidité. De plus la micro-injection d'anticorps anti-cycline D1 bloque l'effet mitogène des œstrogènes. Cette induction peut résulter de l'interaction directe du RE avec des facteurs transcriptionnels tel que c-Jun ou être indirecte *via* des facteurs de croissance.

b) Ils stimulent indirectement **la cycline E**, après avoir induit *via* des ERE l'expression de **c-Myc** qui va neutraliser les inhibiteurs de cette cycline.

c) Ils neutralisent l'**activité des inhibiteurs de cycline p27 et p21** en réprimant leur synthèse ou en facilitant leur dégradation ou leur redistribution dans le cytoplasme. La neutralisation de p 27 et p 21 peut aussi être secondaire à des mutations et intervenir dans certains mécanismes de résistance aux anti-œstrogènes.

3.2.5 Effets membranaires non génomiques des œstrogènes

Les œstrogènes peuvent déclencher des effets rapides membranaires dans les minutes suivant l'addition de l'œstradiol en stimulant des phosphorylations. Cet effet est démontré dans les cellules nerveuses, les cellules endothéliales vasculaires et les ostéoblastes mais reste controversé pour expliquer la stimulation de la prolifération des cellules de cancer du sein. Deux cascades principales de phosphorylation peuvent être stimulées :

- celle de ras-ERK et MAP kinase, résultant de l'association ligand-dépendante du RE α avec c-src ou avec le récepteur IGF-I. Un récepteur

à 7 domaines transmembranaires, couplé aux protéines G a aussi été proposé ;

- la voie de la PI3 kinase déclenchée par la liaison de $RE\alpha$ à la sous-unité régulatrice p65 de la PI3K. L'œstradiol favoriserait ainsi la survie des cellules cancéreuses en inhibant leur entrée en apoptose.

3.3 Les autres effets des œstrogènes et de leurs récepteurs

3.3.1 Inhibition de la motilité et du caractère invasif à travers une matrice extracellulaire telle que le matrigel des cellules cancéreuses RE +

Ces effets observés sur les lignées de cancer du sein et *in vivo*, sont plutôt favorables. Ils pourraient être en accord avec le mauvais pronostic clinique des cancers du sein RE – qui sont améliorés expérimentalement par l'introduction des gènes codant pour $RE\alpha$ ou $RE\beta$.

3.3.2 Les autres effets sont plutôt défavorables

Les effets systémiques endocrines ou paracrines de l'œstradiol pourraient expliquer la stimulation de croissance de cancers du sein RE négatifs greffés chez la souris athymique. Ils font intervenir d'autres cellules RE positives, telles que les cellules vasculaires et immunologiques de l'hôte, qui pourraient indirectement faciliter la croissance tumorale en stimulant l'angiogenèse ou en interférant sur les défenses immunitaires. L'amplitude de ces effets est cependant très inférieure à celle des effets directs sur le tissu mammaire.

Les œstrogènes pourraient aussi faciliter l'instabilité génétique car les cancers expérimentaux induits par les œstrogènes chez les rats sont aneuploïdes, alors que les cancers chimio-induits par le DMBA ou le NMU sont diploïdes. La responsabilité de c-myc, induit par les œstrogènes et amplifié dans les cancers du sein, et de certaines Aurora kinases, qui régulent la phosphorylation des micro-tubules du fuseau mitotique, est évoquée.

3.4 Les étapes initiales de la cancérogenèse mammaire sont très mal connues

On doit faire appel à des modèles plus complexes que les seules lignées cancéreuses (*in vivo* et co-cultures) pour aborder les mécanismes de l'effet des hormones ovariennes sur la glande mammaire normale ou précancéreuse. Dans la glande normale, les œstrogènes et la progestérone réguleraient la prolifération

des cellules épithéliales par l'intermédiaire de facteurs paracrines ou juxtacrines. Les cellules épithéliales qui prolifèrent sont différentes de celles qui contiennent des RE (Clarke, 2003 ; Anderson *et al.*, 2002). Un des premiers critères de transformation pourrait être le passage d'une régulation paracrine à une régulation autocrine comme celle observée en lignée cancéreuse. Chez la souris, la stimulation de croissance des fibroblastes par les œstrogènes favoriserait la croissance des cellules tumorales RE α positives, en préparant une matrice extracellulaire favorable et en sécrétant des facteurs de croissance paracrines. Chez la femme, les hormones agissent essentiellement sur les cellules épithéliales luminales qui seules expriment les RE α et RP. Le RE β , aussi localisé dans certains fibroblastes et les cellules myo-épithéliales, ne semble pas essentiel pour stimuler la cancérogenèse mammaire, seule l'inactivation du gène codant pour le RE α chez la souris inhibant cette cancérogenèse. Un autre mécanisme pourrait être la perte de l'effet inhibiteur du TGF β observé sur les cellules épithéliales normales contenant des RE mais pas sur les cellules transformées. Enfin certaines **cellules souches** expriment les RE α et les RP (Clarke *et al.*, 2005). **Les cellules souches cancéreuses**, après acquisition des premières mutations, sont quiescentes et donc résistantes aux chimiothérapies classiques. Cependant elles gardent leur capacité de se diviser sous l'influence d'agressions diverses (y compris les hormones ovariennes) qui pourraient déclencher des processus de cicatrisation ne s'arrêtant plus par inhibition de contact. La persistance de cellules souches cancéreuses pourrait aussi expliquer les récives, elles font l'objet d'une intensification des recherches visant à les détecter et les éliminer. De même l'étude moléculaire des **lésions précancéreuses** et pré-invasives humaines par les pathologistes et les biologistes cellulaires sera essentielle pour comprendre les premières étapes de la cancérogenèse et les moyens pour les prévenir.

3.5 Mécanismes d'action de la progestérone et des progestatifs en cancérogenèse humaine

L'effet protecteur des progestatifs contre le cancer de l'endomètre, chez la femme ménopausée traitée par les œstrogènes, est démontré et justifie leur association chez les femmes ayant conservé leur utérus. Il est dû à l'activité anti-œstrogène des progestatifs qui s'oppose à l'effet mitogène des œstrogènes et à une stimulation de la différenciation de l'endomètre.

Les effets sur la glande mammaire sont très différents. Les résultats des études d'observation et des essais contrôlés de THS chez les femmes ménopausées (Writing group for WHI, 2002 et 2004) indiquent un effet délétère de l'addition d'un progestatif et sont en désaccord avec la plupart des études sur lignées humaines. *C'est un problème préoccupant particulièrement en France où l'utilisation des progestatifs en péri- et post-ménopause a été particulièrement élevée. D'ailleurs les progestatifs en préménopause administrés pendant plus de 5 ans augmentent le risque de cancers du sein (Fabre *et al.*, 2007).*

3.5.1 Les étapes initiales de l'activation de la transcription sont bien définies

Le récepteur de la progestérone humain (RP) est codé par un gène localisé en 11q 22-23 mais comprend deux isoformes A (85 kDa) et B (115 kDa) définies par deux promoteurs alternatifs correspondant à deux sites différents d'initiation de la traduction (AUG). La forme B est plus longue de 164 aminoacides que la forme A sur son extrémité N-terminale et contient un troisième domaine de transactivation (AF3). Ces deux isoformes peuvent former des homo- et hétérodimères. Les mécanismes généraux de régulation de l'expression génique sont semblables à ceux décrits pour l'œstradiol. La régulation non génomique par la progestérone passe par la stimulation de l'activité de c-Src, par interaction directe du RP ou indirecte *via* le RE α .

3.5.2 Le mécanisme d'action des progestatifs sur la glande mammaire

La progestérone assure le développement et la croissance lobulo-alvéolaire de la **glande mammaire normale**. L'invalidation du gène RP **chez la souris** empêche tout développement mammaire. Après transgénèse, seule l'isoforme B paraît suffisante pour assurer ce développement. Comme pour le RE α , les RP sont uniquement localisés dans les cellules mammaires épithéliales luminales et dans les cellules qui ne prolifèrent pas (Clarke, 2003). D'où la notion d'une régulation paracrine par l'intermédiaire de facteurs mitogènes ou inhibiteurs sécrétés agissant sur les cellules voisines. L'invalidation du gène RP chez la souris inhibe la cancérogenèse mammaire par carcinogène chimique (Lydon *et al.*, 1999). Comme pour les œstrogènes, il y a passage d'une régulation paracrine obligée pour la glande mammaire normale vers une régulation autocrine ou intracrine pour les cellules épithéliales cancéreuses qui expriment à la fois les gènes des RP, du Ki67 et de la cycline D1 contrairement aux cellules normales.

Chez la femme, on manque de bons modèles *in vitro* pour étudier la **glande mammaire normale**. Cependant les observations histologiques indiquent que le RP, comme le RE α , ne sont exprimés que dans 15 à 30 % des cellules épithéliales luminales et sont absents des cellules myo-épithéliales et des fibroblastes. Les cellules se divisant n'expriment pas le RP excluant une régulation directe. Les mitoses sont plus nombreuses en phase lutéale qu'en phase folliculaire, suggérant un effet mitogène de l'association œstradiol-progestérone (Ferguson et Anderson, 1981). La proportion des deux isoformes A et B du RP serait différente sur les cellules transformées et les cellules normales (Graham et Clarke, 1997).

3.5.3 Le mécanisme par lequel la progestérone et les progestatifs stimulent la cancérogenèse mammaire après la ménopause reste mystérieux

Les difficultés sont multiples :

- l'effet de ces hormones diffère selon l'âge et selon qu'elles agissent sur des cellules déjà transformées ou non. La progestérone assure le développement lobulo-alvéolaire à la puberté et participe à la différenciation terminale de la glande mammaire au cours de la grossesse. En péri- et post-ménopause, les premières étapes de la cancérogenèse sont souvent initiées et peuvent s'exprimer sous forme de mastopathies « bénignes » proliférantes avec ou sans atypies et de cancers *in situ infra* cliniques ;
- il existe sur le marché différents types de progestatifs. Leur structure variée (19-norstéroïdes, dérivés du prégnane ou de l'androstane) fait qu'ils peuvent agir sur différents récepteurs, outre les RPA et B, les RE α et β pour les 19-norstéroïdes, les récepteurs des glucocorticoïdes (RG) et des androgènes (RA) pour l'acétate de médroxyprogestérone le plus utilisé aux États-Unis ; en France, la progestérone micronisée est proposée pour remplacer les progestatifs de synthèse dans les THS de la ménopause (Fournier *et al.*, 2005.) Des études indépendantes sont nécessaires pour évaluer son activité (cf. § 2) ;
- les lignées cellulaires ne peuvent expliquer les effets cocarcinogènes révélés par les essais cliniques car les progestatifs ne sont pas mitogènes sur ces lignées, bien que le RU 486, un antiprogestatif, inhibe la prolifération cellulaire *via* le RP (Bardon *et al.*, 1985) ce qui a ouvert la voie à plusieurs essais cliniques.

Cependant, ces lignées ont permis de décrire plusieurs protéines régulées par les progestatifs dans les cancers du sein qui pourraient intervenir dans la cancérogenèse mammaire (Graham et Clarke, 1997). La progestérone augmente l'expression du récepteur de l'EGF et de la prolactine, ainsi que la sécrétion de RANK L et d'IGF-1 ce qui pourrait rendre compte de son effet mitogène. L'induction du VEGF augmenterait l'angiogenèse. **L'analyse globale des transcritomes montre un nombre très élevé de gènes régulés par la progestérone dans les cancers du sein.**

L'acide gras synthase (AGS) est une enzyme particulièrement intéressante : elle est surexprimée par rapport au tissu normal dans les cancers du sein et de la prostate. Cette enzyme est induite par les progestatifs dans la glande mammaire normale et les cancers du sein (Chalbos *et al.*, 1990) et par les androgènes dans les cancers de la prostate. Elle est également induite par plusieurs facteurs

de croissance et de produits d'oncogènes tels que HER2/neu. L'AGS est un marqueur de mauvais pronostic des cancers du sein et de la prostate. Cette enzyme facilite *in vivo* la croissance tumorale et son inhibition stimule l'apoptose des cellules cancéreuses. Le fait qu'un inhibiteur de cette enzyme, la cerulénine, ainsi que son si-RNA, bloquent la croissance de cancers du sein chez la souris immunocompétente, suggère l'AGS comme cible thérapeutique potentielle des cancers qui la surexpriment (Kuhadja *et al.*, 1994).

3.6 Les causes endogènes et exogènes responsables d'un apport accru d'œstrogènes

Le paradoxe selon lequel le blocage de la production et de l'action des œstrogènes est efficace aussi après la ménopause s'explique en partie par le fait que les œstrogènes continuent à être produits par le tissu adipeux chez ces femmes. Des œstrogènes d'origine exogène peuvent aussi être apportés par l'alimentation (voir chap. 6). La concentration locale d'œstradiol après la ménopause est ainsi 10 à 20 fois plus élevée dans le sein que dans la circulation. Elle est identique chez la femme avant et après la ménopause, principalement chez la femme en surpoids. La production non ovarienne des œstrogènes est essentiellement due à l'aromatase des androgènes catalysée par l'aromatase codée par le gène CYP 19 de la famille des cytochromes P 450 (Simpson, 2003). Cette enzyme est principalement localisée dans les adipocytes, elle est de plus surexprimée dans les cellules cancéreuses mammaires et les macrophages tumoraux. L'aromatase stimule la croissance des cancers du sein, comme l'indique la grande efficacité de ses inhibiteurs en clinique (§ 4.1.). Un polymorphisme génétique de diverses enzymes participant à la biosynthèse des œstrogènes et des androgènes pourrait, en s'associant, augmenter le risque de cancers du sein et de la prostate (Henderson et Feigelson, 2000 ; Cussenot et Cancel-Tassin, 2004) (*cf.* § 6).

4 | Les aspects cliniques des cancers du sein

4.1 Les traitements hormonaux

(Louis Mauriac et Thierry Maudelonde)

L'histoire de l'hormonothérapie des cancers du sein remonte au début du XX^e siècle et avec l'utilisation de la castration (Beatson). La découverte des récepteurs des œstrogènes (Jensen *et al.*, 1968) a permis de sélectionner au mieux

les tumeurs hormonosensibles et d'orienter sur des traitements ciblés avec l'anti-œstrogène tamoxifène, puis les inhibiteurs de l'aromatase (IA), de type I (stéroïdiens) et II (non stéroïdiens). Les oncologues ont donc aujourd'hui plusieurs moyens visant à la suppression de la production ou de l'action des œstrogènes.

4.1.1 Suppression de la synthèse d'œstrogènes

- La suppression des fonctions ovariennes peut être obtenue avec une efficacité équivalente par chirurgie, radiothérapie ou traitement par les agonistes de la LHRH (A LHRH). La chirurgie obtient une chute brutale profonde et définitive du taux des œstrogènes circulants, au prix d'un geste chirurgical simple (cœlioscopie). Les A LHRH ont une efficacité durable et réversible, atout majeur pour un traitement adjuvant.
- Les inhibiteurs de l'aromatase bloquent la transformation des androgènes (androstènedione et testostérone) en œstrogènes (œstradiol et œstrone) dans les corticosurrénales, le tissu adipeux, et la glande mammaire. On dispose maintenant d'anti-aromatases de deuxième génération qui sont des inhibiteurs stéroïdiens (exemestane oral). Les anti-aromatases de troisième génération sont des inhibiteurs non stéroïdiens (anastrozole, létrozole).

4.1.2 Traitement ciblé sur le récepteur des œstrogènes (RE)

Les anti-œstrogènes partiels ont à la fois des effets antagonistes et agonistes selon le tissu cible et le gène régulé d'où leur surnom de SERM (ou modulateurs sélectifs des RE). Ils diffèrent des anti-œstrogènes purs qui inhibent tout effet œstrogénique.

Deux SERM sont utilisables. Le tamoxifène bénéficie d'un recul de plus de vingt-cinq ans, c'est un des médicaments anticancéreux les plus prescrits du fait de sa sélectivité. Le raloxifène présente l'avantage de ne pas induire de cancer de l'endomètre mais n'est actuellement autorisé que pour prévenir l'ostéoporose après la ménopause (figure 1.4). L'action antiproliférative du tamoxifène sur les cancers du sein passe par sa liaison aux RE et il y a un parallélisme entre l'affinité du tamoxifène et de ses métabolites hydroxylés avec leur activité antiproliférative (Coezy *et al.*, 1982). La liaison d'un SERM au RE entraîne une activation partielle avec dimérisation, translocation nucléaire et activation de la fonction AF1, mais pas de la fonction AF2 (voir § 1.2). Cela permet d'expliquer que le tamoxifène se comporte selon les tissus cibles comme un œstrogène agoniste (fonction AF2 activée) ou comme un antagoniste (fonction AF2 inactivée). L'importance relative de ces deux fonctions d'activation selon les tissus cibles

pourrait être due à une concentration différente selon les tissus, de coactivateurs, de co-inhibiteurs ou de RE α ou β .

Les anti-œstrogènes purs se lient au RE mais bloquent sa dimérisation et induisent sa dégradation. On les appelle aussi SERD (*selective estrogen receptor down regulator*). Le fulvestrant (faslodex ou ICI 182.780) peut être utilisé en deuxième ligne dans les cancers du sein RE+ résistants au tamoxifène (Perey *et al.*, 2007).

Les progestatifs tels que l'acétate de médroxyprogestérone et l'acétate de mégestrol ont une efficacité équivalente ou inférieure à celle des inhibiteurs de l'aromatase. Leur tolérance est moins bonne à cause d'une toxicité vasculaire accrue et un risque de prise pondérale prolongée. Ils ne sont plus utilisés qu'en troisième ou quatrième ligne d'hormonothérapie palliative.

4.1.3 Les indications thérapeutiques

Historiquement, l'hormonothérapie a été introduite successivement dans trois situations :

1. la phase palliative, où la patiente présente une récurrence métastatique de son cancer du sein et ne pourra être guérie ;
2. la phase adjuvante, où après la chirurgie il y a un risque de récurrence métastatique qui fait poser l'indication d'un traitement médical complémentaire ;
3. la phase néoadjuvante visant à faciliter la chirurgie.

La phase palliative chez une femme ayant un cancer du sein métastatique.

L'objectif des traitements systémiques est de contrôler la progression de la maladie, obtenir une régression des symptômes au prix de la moindre toxicité et ainsi de prolonger la survie. Selon l'European Society of Mastology, les inhibiteurs de l'aromatase doivent être prescrits en première ligne. Après échappement de la maladie (18 mois en moyenne en cas de réponse initiale), une deuxième puis troisième ligne peuvent être prescrites si des critères d'hormonosensibilité persistent. On prescrira successivement un anti-aromatase d'un autre type ou un anti-œstrogène, SERM ou SERD puis un progestatif. Aucune étude ne permet de préciser l'ordre optimal de prescription (Mauriac, 2004). Chez la femme en activité ovarienne, le traitement hormonal palliatif de référence est la

suppression ovarienne associée au tamoxifène. Une réunion de consensus d'experts internationaux permet d'orienter les choix thérapeutiques (Beslija *et al.*, 2007).

La phase adjuvante. Jusqu'à la fin 2003, le traitement de référence était le tamoxifène, 20 mg/jour pendant cinq ans. Puis une autorisation de mise sur le marché (AMM) a permis de prescrire l'arimidex (Baum *et al.*, 2003) et le fémara (Thurlimann *et al.*, 2005). Néanmoins, les anti-aromatases peuvent générer une ostéoporose. Par ailleurs, nul ne connaît leur toxicité à long terme. La prescription d'un inhibiteur de l'aromatase pendant cinq ans après cinq ans de tamoxifène améliore la survie sans événement par rapport aux cinq années de tamoxifène seul (Goss *et al.*, 2005).

La phase néo-adjuvante. Quand la tumeur n'est pas accessible à un traitement local dans de bonnes conditions (femmes âgées ou tumeur de trop grande taille), on peut faire précéder le traitement locorégional par un traitement médical. L'hormonothérapie néo-adjuvante est indiquée chez les femmes âgées et RE positives.

4.1.4 Résistance au tamoxifène des cancers du sein et mécanismes

Environ 40 % des cancers du sein RE+ ne répondent pas au tamoxifène. Certains cancers sont résistants d'emblée au tamoxifène (résistance innée). D'autres apparaissent au cours du traitement (résistance acquise) dans un délai de dix-huit mois à cinq ans. Le traitement ne doit pas être prolongé au-delà de cinq ans, les résultats à dix ans étant moins favorables. Les mécanismes de résistance sont vraisemblablement multiples. Le plus souvent les cancers résistants ont conservé leurs RE α qui continuent à stimuler la prolifération cellulaire parfois même sous l'influence du tamoxifène qui devient un agoniste (Rochefort et Maudelonde, 1989). La résistance peut se situer à plusieurs niveaux : elle peut être due à une modification de la balance entre les 2 RE ou entre leurs cofacteurs. Une activation constitutive du RE par phosphorylation *via* les voies des kinases et des facteurs de croissance de la famille EGF a été proposée. D'ailleurs dans les tumeurs avec amplification de HER2/neu, l'inhibition de HER2 par l'herceptine lève la résistance au tamoxifène (Osborne *et al.*, 2003). Certaines résistances pourraient être secondaires à une stimulation de la voie des PI3 kinase/Akt. **Ces incertitudes appellent plus de recherches pour développer des tests individuels prédictifs de résistance et de nouvelles associations thérapeutiques.**

Conclusions et perspectives

L'hormonothérapie des cancers du sein continue à évoluer grâce à de nouvelles molécules ciblées sur des voies métaboliques différentes. Une meilleure connaissance des facteurs prédictifs de la réponse aux traitements hormonaux dont les dosages des RE α , RE β et RP et les études de pharmacogénétique devraient permettre d'augmenter leur efficacité en définissant des traitements « à la carte » adaptés pour chaque malade. Les traitements actuels sont uniquement basés sur la suppression de la production ou de l'activité des œstrogènes, d'autres cibles hormonales sont envisagées en particulier pour réduire la fréquence des résistances aux anti-œstrogènes tels que l'association d'inhibiteurs de tyrosine kinases, comme le trastuzumab en cas de tumeurs HER2/neu amplifiée (Osborne *et al.*, 2003). Les progestatifs favorisant la cancérogenèse mammaire après la ménopause, l'utilisation d'antiprogestatifs ou de nouveau SPRM peut être envisagée sur la base des études pilotes réalisées à Montpellier en 1987 avec le RU 486.

4.2 Les essais de chimioprévention des cancers du sein (Thierry Maudelonde)

À ce jour, la chimioprévention a surtout été étudiée avec les anti-œstrogènes tamoxifène et plus récemment raloxifène qui inhibent l'effet mitogène des œstrogènes médié par leur récepteur. Les essais randomisés (SERM *versus* placebo) ont surtout été réalisés chez les femmes à haut risque de cancer du sein (indice de Gail > 1,7).

4.2.1 Le tamoxifène

L'utilisation du tamoxifène en prévention est justifiée par la diminution de l'apparition d'un cancer du sein contralatéral sous tamoxifène en adjuvant (Early breast cancer trialists' collaborative group, 1998). Le tamoxifène diminue, de 50 % environ, l'incidence des cancers du sein et aussi la résorption osseuse. Quatre essais randomisés, en double aveugle, ont testé le tamoxifène à la dose de 20 mg/j contre placebo pendant un suivi d'au moins cinq ans sur des populations allant de 2 500 à 13 388 femmes. Deux essais montrent une réduction significative de l'incidence de cancer du sein NSABP-1 (risque relatif = 0,51 ; intervalle de confiance 95 % 0,39-0,66) (Fisher *et al.*, 1998) ; l'essai IBIS-1 (RR = 0,67 ; 0,49-0,90) (Cuzick, 2003) et les deux autres une tendance, non significative, à une réduction du risque. La diminution de l'incidence des cancers du sein ne concerne que les tumeurs RE+ ; l'incidence des cancers RE- n'est pas modifiée. Cet effet très positif est cependant contrebalancé par une

augmentation de phlébites et accidents thrombo-emboliques (RR~1,9 ; 1,4-2,6), des accidents vasculaires cérébraux (RR~1,59 ; 0,93-2,77) et des cancers de l'endomètre (RR~2,4 ; 1,5-4,0) (Cuzick *et al.*, 2003) dus aux activités agonistes du tamoxifène. Récemment, le suivi de l'essai anglais des femmes traitées 5 ans par le tamoxifène a révélé que la protection persistait plus de 8 ans après l'arrêt de la prévention. Le taux de mortalité est identique au groupe placebo mais pour des raisons différentes (Powles *et al.*, 2007). Cependant, selon une étude de simulation (Melnikow *et al.*, 2006), il y aurait un net bénéfice en mortalité globale et en coût pour les femmes à très haut risque projeté sur 5 ans (indice de Gail > 3). Ce bénéfice serait encore plus net chez les femmes hystérectomisées.

4.2.2 Le raloxifène

L'étude MORE évaluant le rôle antifracturaire du raloxifène (60 mg/j a démontré son intérêt non seulement pour réduire le risque de fractures vertébrales mais aussi celui des cancers du sein RE+ de 84 % (Cummings, 1999) mais pas celle des tumeurs RE-. Il n'y avait pas d'augmentation de cancers ou d'hyperplasie de l'endomètre. Cette étude a été poursuivie pendant quatre ans (soit huit ans de raloxifène) par l'essai CORE qui confirme son efficacité sur la réduction de l'incidence des cancers du sein RE+ (RR : 0,34, 0,18-0,66) (Martino *et al.*, 2004). L'étude STAR (Study of Tamoxifen and Raloxifen ; 19 000 femmes) montre que l'efficacité du raloxifène est identique à celle du tamoxifène en prévention du cancer du sein invasif (Vogel *et al.*, 2002) mais il induit moins de cancers de l'endomètre et d'accidents thrombo-emboliques. L'étude RUTH confirme la protection sur l'incidence des cancers du sein mais ne montre aucun effet positif ou négatif au plan cardiovasculaire (Mosca, 2001). Outre l'effet bénéfique sur l'os, ces données font du raloxifène un bon candidat pour le traitement préventif des cancers du sein en post-ménopause. Cependant la persistance ou l'induction de bouffées de chaleur pourrait limiter son utilisation. D'autres SERM sont attendus qui seraient dépourvus des effets négatifs tels qu'accidents thrombo-emboliques et bouffées de chaleur.

4.2.3 Les phyto-œstrogènes

Les phyto-œstrogènes sont proposés en prévention pour au moins trois raisons :

- les populations soumises à un régime riche en soja (asiatiques) ont une incidence plus faible de cancer du sein ; les phyto-œstrogènes contenus dans le soja, tels que la génistéine, lient de préférence le RE β (Gustafsson, 1999) qui atténue l'activité mitogène du RE α . Les études cristallographiques montrent qu'ils induisent des conformations du RE différentes de

celles induites par l'œstradiol ou le raloxifène (Pyke ACW *et al.*, 1999). Ils peuvent donc être assimilés à des SERM naturels ;

- en culture de cellules, la génistéine et la daidzéine ont des activités œstrogéniques dix à cent fois inférieures à celle de l'œstradiol. À de très fortes concentrations, non retrouvées chez l'humain ayant un régime alimentaire équilibré, la génistéine a un effet antiprolifératif *in vitro* ;
- cependant chez la femme, l'addition de phyto-œstrogènes à l'apport quotidien n'a fait la preuve ni de son efficacité, ni de son innocuité. Il n'existe pas d'étude contrôlée sur leur action, aussi rien ne justifie l'enrichissement de l'alimentation en phyto-œstrogènes et la prudence s'impose en l'absence d'essais cliniques contrôlés (Rapport Afssa/Afssaps, 2005).

4.2.4 Les autres moyens de prévention

D'autres produits sont à l'étude, tels que les anti-aromatases (anastrozole) (Howell *et al.*, 2003), des rétinoides, des antioxydants. Certains cherchent en induisant une différenciation mammaire à reproduire par des traitements hormonaux l'effet protecteur d'une grossesse précoce (Russo *et al.*, 2005).

Conclusion

Une chimioprévention par les anti-œstrogènes ou SERM n'est certes pas sans risque. Cependant le tamoxifène est autorisée aux États-Unis chez les femmes à risque sur la base d'un bilan individuel tenant compte des contre-indications et du désir de la patiente. Elle n'est pas encore autorisée en France, alors que le raloxifène a l'AMM pour les femmes exposées à l'ostéoporose. Ceci devrait évoluer, en particulier pour les femmes à très haut risque de cancer du sein pour lesquelles le bilan bénéfice/risque devient positif (Gail *et al.*, 1999 ; Melnikow *et al.*, 2006). Un effort accru de recherche est nécessaire pour améliorer les tests prédictifs de risque et pour suivre le devenir des essais randomisés qui ont été initiés. À ce jour, la prévention consiste surtout à éviter les facteurs de risque connus et évitables (alcool, sédentarité, obésité, hormones inadaptées, etc.). Il est intéressant de noter que **pour la première fois, l'incidence des cancers du sein post-ménopausique et RE+ a baissé aux États-Unis de 11 % en 2003, soit un an après l'arrêt chez environ 50 % des femmes, des traitements substitutifs de la ménopause** (Ravdin *et al.*, 2007). **Qu'en est-il en France ?** Le suivi de l'incidence des cancers du sein dans les départements disposant de registres des cancers sera particulièrement instructif.

4.3 Formes héréditaires de cancer du sein liées à BRCA1/2 et leur prévention (Pascal Pujol, Dominique Stoppa Lyonnet)

Le risque de cancer du sein chez des femmes porteuses d'une prédisposition génétique liée à une mutation des gènes *BRCA1* ou *BRCA2* peut atteindre 70 % au cours de la vie (Pharoah *et al.*, 2002). À ce jour, on dispose seulement de gestes chirurgicaux tels que l'ovariectomie bilatérale et la mastectomie bilatérale pour prévenir les cancers de l'ovaire et du sein. L'hormonodépendance des formes héréditaires de cancer du sein constitue donc une question essentielle pour envisager une prévention médicale moins mutilante.

Chez la femme, les cancers du sein héréditaires dus à des altérations génétiques constitutionnelles à forte pénétrance sont très minoritaires (5-10 %) par rapport aux cancers sporadiques (90 à 95 % des cancers du sein) (Pharoah, 2002). De plus, les mutations *BRCA1/2* ne sont identifiées que dans 20 % des cas familiaux faisant l'objet d'une indication d'étude génétique¹, soit dans 2 à 3 % des cancers du sein. Les prédispositions génétiques aux cancers du sein constituent un groupe hétérogène. Deux gènes ont été identifiés, *BRCA1* et *BRCA2*, localisés respectivement sur les chromosomes 17 et 13. Les gènes *BRCA1* et *BRCA2* sont des suppresseurs de tumeur dans la mesure où leur inactivation biallélique favorise la cancérogenèse. Leur expression est ubiquitaire, mais les mutations constitutionnelles ou germinales de ces deux gènes n'augmentent fortement le risque de cancer que dans les tissus mammaires et ovariens. Cette spécificité tissulaire des cancers liés à *BRCA1* et *BRCA2* reste une énigme mais suggère une interaction avec les hormones ovariennes. Cependant, plus de 70 % des tumeurs du sein survenant chez des femmes ayant une mutation de *BRCA1* n'expriment pas les RE (King *et al.*, 2001 ; Lakhani *et al.*, 2002) alors que le taux de positivité des RE est de 63 % dans les cancers avec mutation de *BRCA2* et de l'ordre de 70 % dans les cancers sporadiques.

Les protéines *BRCA1* et *BRCA2* sont impliquées dans la réparation des altérations de l'ADN. Dans la tumeur, on retrouve généralement une inactivation du deuxième allèle du gène *BRCA1* par mutation, délétion ou méthylation. Ceci est en accord avec l'hypothèse d'inactivation biallélique de gènes oncosuppresseurs de Knudson. Il existe aussi d'autres gènes de prédispositions tels que *TP53*, *PTEN* et *STK11* responsables de syndromes très rares. Récemment 4 autres gènes

¹ Indications principales d'étude des gènes *BRCA1* et *BRCA2* chez un cas index (première analyse familiale) : personne ayant été atteinte d'un cancer du sein ou de l'ovaire et ayant une apparentée de premier degré ayant été atteinte d'un cancer du sein avant l'âge de 40 ans ou d'un cancer de l'ovaire quel que soit l'âge, ou ayant deux apparentées de premier ou second degré et appartenant à la même branche parentale ayant été atteinte d'un cancer du sein ou de l'ovaire quel que soit l'âge.

ont été identifiés, dont le récepteur 2 du *fibroblast growth factor* (Easton *et al.*, 2007).

Plusieurs observations suggèrent une influence des hormones ovariennes chez les femmes porteuses d'une mutation du gène BRCA1 (Noruzinia *et al.*, 2005) :

- **arguments biologiques.** L'expression de BRCA1 est augmentée dans le tissu mammaire durant la puberté et la grossesse. Les œstrogènes stimulent l'expression mammaire de BRCA1, *in vivo*, chez des souris ovariectomisées et, *in vitro*, sur les lignées de cancer du sein RE+ (MCF7). Inversement, dans des lignées de cancer du sein RE+, l'expression de BRCA1 non muté inhibe la transcription dépendante du RE α de gènes impliqués dans la prolifération cellulaire. La protéine BRCA1 normale s'oppose donc à l'effet mitogène des œstrogènes ;
- **études cliniques.** L'ovariectomie prophylactique chez les femmes non ménopausées porteuses d'une mutation de BRCA1 diminue le risque de premier ou de second cancer du sein de 32 à 66 % dans cinq études concordantes (Rebbek *et al.*, 2002). La mise en place d'un traitement hormonal de la ménopause se pose chez ces jeunes femmes ayant subi une ovariectomie prophylactique (Rebbeck *et al.*, 2002). Les études d'observation sont contradictoires concernant l'effet protecteur du tamoxifène (King *et al.*, 2001). Cependant d'après une étude cas-témoin, sur 285 cas et 751 témoins, le traitement adjuvant par le tamoxifène protégerait de 50 % environ du risque de cancer du sein controlatéral chez les patientes porteuses d'une mutation BRCA1 ou BRCA 2 et n'ayant pas subi d'ovariectomie (Gronwald *et al.*, 2006). En France, un essai prospectif de prévention est initié par la Fédération nationale des centres de lutte contre le cancer avec le létrozole, un inhibiteur d'aromatase chez les femmes ménopausées porteuses des mutations BRCA1/2.

4.4 Le cancer du sein chez l'homme est rare

Le cancer du sein chez l'homme est rare (1 % des cancers du sein), car en l'absence d'hormones ovariennes la glande mammaire ne se développe pas. Il s'observe en cas d'hyperestrogénisme (syndrome de Klinefelter, hypogonadisme, alcoolisme, obésité) et est pour ~90 % RE positif, donc sensible au tamoxifène. L'homme transmet les gènes de susceptibilité BRCA1/2 mais seul BRCA2. est un facteur de risque pour l'homme et expose également au risque de cancer de la prostate (Fentiman *et al.*, 2006).

5 | Les autres cancers sensibles aux œstrogènes et aux progestatifs

L'effet mitogène des œstrogènes responsable de leur activité de promoteur de tumeur est bien établi. Cependant, *in vivo*, l'intensité du risque de cancer associé à l'utilisation des œstrogènes varie fortement selon le tissu cible d'après les études épidémiologiques et les essais contrôlés de THS de la ménopause en l'absence de progestatifs. Il est très puissant sur l'endomètre, modéré sur le sein, faible voire discuté sur l'ovaire et le poumon. Il existe également une grande variabilité d'effets des progestatifs et des SERM sur ces tissus cibles. Les bases moléculaires et cellulaires responsables de cette spécificité tissulaire de réponse aux hormones seront importantes à préciser pour guider vers le développement de nouvelles molécules sélectives. Cela semble réalisable, les acteurs principaux étant définis.

5.1 Cancer de l'endomètre

C'est le cancer le plus œstrogénodépendant, mais sa fréquence diminue du fait de l'effet bénéfique des contraceptifs oraux. Les facteurs de risque sont liés à une production accrue et prolongée d'œstrogènes dont l'obésité péri- et post-ménopausique, qui favorise la synthèse d'œstrogènes dans les adipocytes via l'aromatase. Le suivi épidémiologique des femmes ménopausées traitées initialement par les œstrogènes sans progestatif associé pendant dix ans a établi un surcroît de risque élevé (RR = 2,3 avec IC 95 % : 2,1-2,5). Ce risque est maintenant évité par l'addition d'un progestatif (Emons *et al.*, 2000) chez les femmes ayant conservé leur utérus. La protection par les progestatifs due à leur effet anti-œstrogène serait indirecte, médiée par les fibroblastes qui expriment des RP et produisent des facteurs inhibiteurs à action paracrine. Les modèles expérimentaux confirment *in vivo* cet effet opposé des œstrogènes et des progestatifs sur l'endomètre. Le fait que le tamoxifène augmente le risque de cancer de l'endomètre alors qu'il diminue celui de cancer du sein pourrait être dû à :

- une activité œstrogénique du tamoxifène sur les fonctions AF1 du RE α , plus efficaces dans l'endomètre que dans le sein ;
- à une concentration différente des RE α et β et de divers comodulateurs des RE dans ces deux tissus ;
- une interférence transcriptionnelle du complexe RE/tamoxifène avec les facteurs AP1 différente dans les cancers de l'endomètre et du sein.

5.2 Cancer de l'ovaire

Ce cancer constitue également un problème de santé publique car sa fréquence augmente. Il touche des femmes jeunes et a un pronostic très sombre du fait d'un diagnostic souvent tardif. Bien que l'ovaire soit la principale source de production des œstrogènes, son épithélium de surface est sensible aux hormones ovariennes surtout après la ménopause. Chez la jeune femme, les œstrogènes utilisés en contraception orale protègent du cancer de l'ovaire (RR = 0,6 : IC 95 % 0,5-0,7) (Pike *et al.*, 2004). En diminuant le nombre d'ovulations, ils diminuent le traumatisme local au niveau de l'épithélium ovarien provoqué par la rupture du follicule et les processus de cicatrisation pouvant favoriser l'émergence de cellules transformées. À l'inverse, les inducteurs d'ovulation (HCG, Clomifène, etc.) augmenteraient ce risque. Après la ménopause, les hormones ovariennes des THS augmentent le risque. Plusieurs études de cohorte indiquent une augmentation d'incidence (RR de 1,8 à 3,2) pour un THS avec œstrogène seul et prolongé de plus de dix ans. Une étude de 240 073 femmes décrit une augmentation de mortalité par cancer de l'ovaire avec un risque relatif de mortalité par cancer de l'ovaire de 1,23 (IC à 95 % : 1,06-1,43). Ce risque augmente avec la durée d'utilisation du traitement mais diminue lorsqu'on s'éloigne de la prise (Rodriguez *et al.*, 2001). Une étude cas témoin suédoise indique un risque élevé pour un THS avec un œstrogène seul. Récemment la cohorte du million de femmes britanniques montre un risque accru de cancers ovariens après 5 ans de THS, supérieur pour les œstrogènes seuls (RR = 1,48) que pour les œstro-progestatifs (RR = 1,15) (Béral *et al.*, 2007).

L'effet mitogène de l'œstradiol observé sur les lignées de cancer de l'ovaire contenant des RE est similaire à celui observé dans les lignées de cancer du sein. Les gènes de susceptibilité BRCA1/2 exposent également au risque de cancer de l'ovaire. Les mêmes protéines à activité mitogène (c-myc, c-fos, cathepsine D, etc.) sont induites par les œstrogènes. La fibuline 1, une protéine induite par les œstrogènes (Clinton *et al.*, 1996), sécrétée par les cellules cancéreuses et accumulée dans le stroma ovarien, est surexprimée par les cancers épithéliaux de l'ovaire. Ces arguments suggèrent un rôle promoteur des œstrogènes. Mais les anti-œstrogènes sont jusqu'ici inefficaces sur ces cancers (diagnostic tardif, résistance hormonale constitutive?).

5.3 Cancers des tissus non sexuels

L'effet protecteur des stéroïdes ovariens pour les cancers coliques (writing group for WHI, 2002) n'est pas retrouvé dans l'essai (WHI avec œstrogènes seuls, 2004). Une interférence des progestatifs est à préciser. Le rôle délétère éventuel des œstrogènes dans le cancer du poumon *via* leur récepteur est à l'étude.

6 | Hormones et cancers de la prostate (Olivier Cussenot et Paul Robel)

6.1 Introduction

L'influence des androgènes dans la biologie de la prostate et les effets bénéfiques de la déplétion androgénique ou des œstrogènes ont été largement établis dans le traitement des cancers de la prostate (Huggins et Hodges, 1941) bien que l'impact néfaste des androgènes sur la cancérogenèse prostatique et dans les cancers de la prostate soit parfois controversé (Bosland, 2000).

Le récepteur des androgènes (RA) est au centre des réflexions sur le traitement hormonal du cancer de la prostate. Comme les autres membres de la superfamille des récepteurs d'hormones à action nucléaire, il contient un domaine de liaison à l'ADN et un domaine de liaison de l'hormone et des fonctions de transactivation où interviennent plusieurs co-activateurs et corépresseurs. Le domaine N-terminal du RA est particulier, il porte deux types de séquences répétées de longueurs variables qui influent sur l'activité du récepteur sur une fonction de transactivation N-terminale prépondérante. Autre particularité majeure, le gène du RA est porté par le chromosome X, ainsi le génome masculin porte un seul allèle ce qui confère une importance phénotypique majeure à ses mutations.

Certains coactivateurs sont particuliers au RA, tel que ARA 70 qui n'interagit pas avec les RE et la protéine BAG1-L. Inversement, les anti-androgènes entraînent une recondensation de la chromatine et le recrutement de corépresseurs.

Nous n'envisagerons ici que les relations entre cancer de la prostate et hormones stéroïdes sexuelles (androgènes et œstrogènes), bien que d'autres facteurs hormonaux, tels que ceux de l'axe somatotrope, la différenciation neuro-endocrine ou certains métabolites de stéroïdes puissent être impliqués dans l'étiologie et la progression des cancers de la prostate.

6.2 Rôle des hormones stéroïdes sexuelles dans le développement, la prolifération et le vieillissement de la prostate

6.2.1 Ontogenèse prostatique

La prostate se développe et assure sa fonction physiologique (sécrétion du liquide prostatique, constituant important de l'éjaculat) sous la dépendance des androgènes.

La prostate embryonnaire se développe dans le sinus urogénital à partir des bourgeons urétraux sous l'effet de la testostérone sécrétée par les testicules fœtaux dès la douzième semaine. La testostérone est transformée *in situ* en dihydrotestostérone (DHT), le ligand physiologique le plus puissant du récepteur des androgènes, par la 5-alpha-réductase de type 2. Le développement de la prostate fœtale est induit par des facteurs de croissance (fibroblast growth factors : principalement FGF7 et FGF10 (andromédines)) au sein du mésenchyme périurétral sous l'action de la dihydrotestostérone et non directement par l'impact des androgènes sur l'épithélium glandulaire (Cunha *et al.*, 1996). Bien que l'architecture de la prostate humaine et de celle des murins diffère, les étapes initiales du développement des bourgeons prostatiques sont semblables en ce qui concerne le rôle inducteur du mésenchyme.

Le rôle des androgènes et des œstrogènes dans le développement de la prostate a été précisé par l'étude de souris transgéniques ou invalidées pour les gènes modulant leur activité. Les souris invalidées pour les 5-alpha-réductases 1 et 2 ont une organogenèse prostatique normale, mais le poids de la prostate est plus faible que chez les souris non invalidées, indiquant que la testostérone suffit au développement prostatique, et que la DHT joue le rôle d'amplificateur. D'ailleurs un déficit congénital en 5-alpha-réductase de type 2 (pseudohermaphrodisme de type 2) donne une ambiguïté sexuelle à la naissance avec prostate hypotrophique.

L'absence d'expression constitutive de l'aromatase ou des RE α ou β n'empêche pas le développement d'une prostate morphologiquement normale, mais les souris invalidées pour RE β développeront des hyperplasies glandulaires en vieillissant. Dans la prostate de fœtus humain, le RE α est exprimé dans l'utricule prostatique (reliquat du paramésonephros), le segment périurétral des tubes excréteurs prostatiques et le mésenchyme, alors que le RE β est exprimé dans l'épithélium et le mésenchyme dès la neuvième semaine. Les souris surexprimant l'aromatase présentent des concentrations circulantes d'œstradiol élevées et des prostates rudimentaires avec des lésions de métaplasie squameuse. À l'inverse, les souris invalidées pour l'aromatase ont une hypertrophie prostatique associée à de fortes concentrations d'androgènes.

Chez l'homme, à la puberté, la concentration de testostérone libre plasmatique passe de 0,6 pmol/L à 60 pmol/L, ce qui permet d'aboutir à une prostate adulte d'environ 15-20 grammes avec des glandes tubulo-alvéolaires différenciées et sécrétantes.

Les glandes prostatiques sont structurées avec une couche cellulaire basale et une couche cellulaire luminale sécrétante. Le RA est exprimé dans le stroma fibromusculaire et dans les cellules différenciées de la couche luminale. Les cellules basales n'expriment pas le RA, mais elles expriment le RE β , tandis que le

RE α est seulement exprimé dans le mésenchyme fibromusculaire. Après castration, les glandes prostatiques involuent, la couche luminale disparaît par apoptose. La couche basale reste quiescente, mais susceptible de régénérer des glandes normales avec les androgènes.

6.2.2 Vieillessement et cancérogénèse

Dans la zone périurétrale dite « de transition », des lésions adénomyofibromateuses sont observées de façon quasi constante au cours du vieillissement. L'amplification de ces modifications conduit à l'hypertrophie bénigne de la prostate, dont la fréquence augmente à partir de la cinquantaine. Des foyers d'adénocarcinome *in situ* ou micro-invasifs augmentent de fréquence avec l'âge et touchent 40 % des hommes après 70 ans. Ces lésions ont des caractéristiques histologiques de cancer de la prostate. Pour certains, ils n'auraient pas de signification clinique (cancers insignifiants ou PIN), bien qu'ils soient fréquents (plus de 20 % de foyers d'adénocarcinomes sont retrouvés sur des séries autopsiques). Pour d'autres ce sont des lésions pré-invasives correspondant à un stade initial de la cancérogénèse et doivent être surveillées.

La cancérogénèse prostatique fait intervenir des mécanismes inflammatoires et endocriniens (Nelson *et al.*, 2003). Les rôles respectifs des androgènes et surtout des œstrogènes dans la cancérogénèse prostatique sont encore discutés. Les androgènes facilitent surtout la promotion du cancer. Des rats Nb développent des adénocarcinomes du lobe dorsal de la prostate ventrale après treize mois avec une faible fréquence, celle-ci est fortement augmentée par l'administration prolongée de propionate, de testostérone et d'estrone.

6.2.3 Contrôle de la prolifération et de la différenciation cellulaire prostatique par les androgènes

Il est différent selon que la cellule prostatique est normale ou transformée.

Les cellules épithéliales prostatiques normales. La DHT, à l'instar de son rôle dans le développement embryonnaire des bourgeons prostatiques, n'a pas d'effet direct sur les cellules épithéliales prostatiques normales mais stimule indirectement leur prolifération à partir des fibroblastes. Les fibroblastes expriment les RA et régulent la prolifération des cellules épithéliales *via* l'induction de facteurs de croissance paracrines sécrétés tels que le KGF ou FGF7 (Cunha *et al.*, 2003).

Les cellules épithéliales prostatiques transformées. Si, dans le développement de la prostate normale ou dans les premières étapes de la carcinogénèse prostatique, les androgènes agissent par un mécanisme essentiellement indirect et

paracrine, une fois les cellules transformées, une action directe, médiée par le RA, est un élément clef de la progression tumorale. Les cellules des adénocarcinomes prostatiques expriment le RA, leur prolifération est stimulée par les androgènes, et devient soumise à des régulations autocrines et/ou intracrines (Cunha *et al.*, 2003). Seules les lignées cellulaires de cancer de la prostate qui expriment des RA voient leur croissance stimulée par les androgènes et inhibée par les anti-androgènes.

L'action bénéfique ou délétère des œstrogènes sur la prostate n'est pas élucidée. Sur les cellules prostatiques ils pourraient avoir un effet anti-androgène, ou indirect *via* leur activité anti-gonadotrope. Le diéthylstilbestrol, première molécule utilisée pour obtenir une « castration chimique », est abandonné du fait de sa toxicité. Le RE β est surexprimé dans la prostate où il pourrait avoir un rôle protecteur (Gustafsson, 1999).

6.3 Facteurs de risque

Elle est basée sur l'inhibition de facteurs inflammatoires et endocriniens (Nelson *et al.*, 2003) et sur des facteurs nutritionnels (prévention par consommation d'antioxydants).

6.3.1 Facteurs de risque environnementaux et nutritionnels

Il y aurait une augmentation du risque de cancer de la prostate ou une émergence clinique plus précoce des cancers de la prostate après exposition à des pesticides en milieu professionnel (Alavanja *et al.*, 2003) Le rôle cancérigène des pesticides dans l'environnement n'est pas résolu car on manque d'études épidémiologiques, bien que les mécanismes possibles d'action soient bien documentés (voir chap. 5).

Le type d'acide gras insaturé dans l'alimentation semble important. Les acides gras oméga 3 seraient protecteurs, expliquant la fréquence inférieure des cancers de la prostate chez les Japonais, l'huile de poisson étant riche en acides gras oméga 3. À l'inverse, les acides gras oméga 6, dont l'acide arachidonique transformé par la cyclo-oxygénase 2 (Cox-2) en prostaglandine PGE2, plus abondants dans les huiles végétales, pourraient favoriser le cancer de la prostate car la PGE2 stimule la croissance des lignées prostatiques. Tout au contraire, la PGJ2, ainsi que les thiazolidinones, qui se lient au récepteur nucléaire PPAR γ , seraient protectrices mais cela est discuté. Les antioxydants tels que le lycopène, constituant des tomates, peuvent avoir un effet protecteur. Le stress oxydant, stimulant la synthèse de prostaglandines *via* Cox 2, est bien démontré en cancérogenèse colique où l'aspirine et d'autres anti-inflammatoires

non stéroïdiens inhibiteurs de Cox-2 sont efficaces en prévention. Il pourrait en être de même pour les cancers de la prostate et du sein.

6.3.2 Les facteurs de risque génétiques et épigénétiques

L'activation du RA par ses ligands dépend de leur concentration et de leur type. Les *androgènes actifs* dans la prostate proviennent de la circulation à partir des testicules et à un moindre degré des corticosurrénales (Henderson et Feigelson, 2000). Ils sont aussi obtenus par la transformation intraprostatique d'androgènes à partir des précurseurs circulants (Labrie *et al.*, 2001). Dans la prostate, les enzymes 5-alpha-réductase de type 2, 17-bêta hydroxystéroïde déshydrogénases (17b-HSD de types 1 et 2), cytochromes P450 CYP3A4 et CYP1B1 sont exprimés. Dans le cancer de la prostate, l'aromatase et la 5-alpha-réductase de type 1 sont exprimées. L'aromatase périphérique de la testostérone en œstrogènes et l'augmentation du rapport œstrogènes/testostérone au cours de la sénescence masculine suggèrent que les œstrogènes pourraient aussi favoriser la cancérogenèse prostatique. L'activation des œstrogènes en hydroxy-œstrogènes, qui sont des composés génotoxiques (en particulier la forme 4-hydroxy-), sous l'action des enzymes CYP1A1, CYP1B1 et CYP3A4 suggère un effet cancérogène direct des œstrogènes par formation d'adduits sur les bases de l'ADN. Inversement, l'activation du RE β par ses ligands serait protectrice.

Dans ce contexte biologique, la recherche de mutations et de polymorphismes associés au risque de cancer de la prostate a porté sur les enzymes clés du métabolisme des androgènes et des œstrogènes ainsi que sur leurs récepteurs.

Les mutations activatrices « gain de fonction » du RA sont exceptionnelles au niveau germinale (0,03 % des cancers sporadiques, < 5 % des cancers héréditaires). *A contrario*, les mutations somatiques sont relativement fréquentes (50 %) (Gottlieb *et al.*, 2004).

L'activité transcriptionnelle du gène du RA est déterminée essentiellement par la région N-terminale de sa protéine. Ce domaine de transactivation contient des répétitions CAG et GGC. Un petit nombre de répétitions CAG (< 18–23) ou GGC (< 16) correspond à un haut niveau de transactivation du RA et est associé à une augmentation du risque de cancer de la prostate. Les allèles courts en CAG et GGC sont fréquents chez les populations d'origine africaine, où les cancers prostatiques sont évolutifs. D'autres polymorphismes génétiques concernent des gènes impliqués dans le métabolisme et la synthèse des androgènes ou la sensibilité à ceux-ci. C'est le cas du polymorphisme A49T du gène de l'enzyme 5-alpha-réductase de type 2 (SRD5A2) qui transforme la testostérone en DHT ou de l'enzyme CYP3A4 qui hydroxyle la testostérone en positions 2 β , 6 β ou 15 β . Un polymorphisme situé au niveau de la partie 5' régulatrice du gène

(mutation A → G), nommé CYP3A4-V, serait associé à des adénocarcinomes prostatiques de grade et de stade supérieurs à ceux observés en présence de l'allèle non muté. Les enzymes CYP17 (17- α -hydroxylase) et HSD3B1 & B2 (3- β -hydroxystéroïde déshydrogénases de types 1 et 2) interviennent dans la synthèse de la testostérone et leur polymorphisme est associé à un risque accru de cancer de la prostate.

Les variants génétiques impliqués dans le métabolisme des œstrogènes pourraient intervenir dans la cancérogenèse prostatique. C'est le cas d'un polymorphisme du gène de l'aromatase responsable de la synthèse des œstrogènes et d'un variant du gène du RE α (GGGA repeat- intron 1) (Cussenot et Cancel-Tassin, 2004). De plus, le polymorphisme du gène du CYP1B1, déterminant une activité élevée de l'enzyme à l'origine des 4-hydroxy-œstrogènes, est également associé à un risque accru de cancer de la prostate. Les polymorphismes qui augmentent l'activité des gènes du récepteur de la vitamine D (VDR) et de la Glutathion-S transférase (GSTP1) peuvent aussi interférer, comme protecteurs, dans l'action ou le métabolisme des androgènes ou des œstrogènes. Cependant ces altérations génétiques et épigénétiques sont de faible pénétrance, leur recherche est intéressante en physiopathologie mais n'est pas encore entrée dans la pratique médicale.

6.4 Prévention et dépistage des cancers de la prostate

Le meilleur moyen actuel visant à diminuer la mortalité des cancers de la prostate est le dépistage précoce par la surveillance du taux plasmatique d'une kallikréine humaine le PSA, protéase à serine induite par les androgènes. Les seuils de PSA, utilisés pour un dépistage individuel, devraient être interprétés en fonction du taux de testostérone circulante. Le dépistage généralisé n'est cependant pas recommandé du fait des incertitudes sur son intérêt global en terme de mortalité et de la morbidité des prostactectomies.

Les moyens de *prévention hormonale* sont à l'étude et leurs résultats sont encore controversés, comme l'est l'influence des androgènes sur une prostate non cancéreuse. L'incidence du cancer de la prostate augmente avec l'âge alors que le nombre de mutations augmente et le RA reste activable. Il n'y a pas de certitude concernant la signification du taux de testostérone circulante, une testostérone libre basse est souvent associée à des tumeurs plus agressives (score de Gleason > 7).

Le rôle des androgènes surrénaliens est controversé dans l'espèce humaine, la DHEA et ses métabolites ayant une faible activité androgène mais aussi œstrogène sur les RE.

Les seuls essais cliniques de prévention hormonale disponibles concernent les inhibiteurs de l'enzyme 5-alpha-réductase, car les anti-androgènes ont trop d'effets indésirables, en particulier sur l'activité sexuelle, pour être utilisés en prévention.

L'essai contrôlé de chimioprévention du cancer de la prostate chez 18 000 hommes (prostate cancer prevention trial : PCPT) par le finastéride (un inhibiteur de la 5-alpha-réductase type 2) (Thompson *et al.*, 2003), montre une protection de 25 % environ avec un taux de cancer de prostate supérieur dans le groupe placebo (24 %) au groupe recevant du finastéride (18 %). Cependant, les tumeurs de ces derniers ont plus de critères d'agressivité (37 %) que le groupe sous placebo (22 %) (score de Gleason > 7). La chimioprévention par inhibiteurs de la 5-alpha-réductase pourrait ainsi prévenir des « cancers insignifiants » ou initiaux et sélectionner les cancers en émergence clinique. Une autre étude en cours évalue le dutastéride (inhibiteur mixte des 5-alpha-réductases de types 1 et 2) (REDUCE study group, 2004). Les anti-œstrogènes sont aussi considérés pour la prévention du cancer de la prostate avec des résultats préliminaires intéressants pour le torimifène (agoniste ER β) sur les néoplasies intra-épithéliales.

6.5 Hormonothérapie des cancers de la prostate

6.5.1 Principe

Depuis la publication de Charles Huggins en 1941, amplement confirmée, le traitement « hormonal » du cancer de la prostate repose sur l'androgénosuppression obtenue par castration chirurgicale ou médicale.

Les métastases sont très souvent osseuses et celles-ci sont généralement hormonodépendantes et sensibles à l'hormonothérapie.

L'œstrogénothérapie et la castration chirurgicale ont été remplacées, en raison de leurs conséquences cardiovasculaires ou psychologiques respectives, par une castration médicamenteuse obtenue avec des analogues de la LHRH (luteinizing hormone-releasing hormone). Sur la même base pharmacodynamique, des antagonistes de la LHRH sont en évaluation clinique. Depuis 1980, le concept de blocage androgénique combiné (BAC) est développé (Labrie *et al.*, 2001). L'addition aux antigonadotropes d'anti-androgènes compétitifs sur le RA permet d'inhiber l'action mitogène de la DHT prostatique synthétisée à partir des précurseurs surrénaliens : androstènedione, DHEA et surtout sulfate de DHEA. En effet, la castration chirurgicale ou médicale entraîne une diminution de près de 95 % des concentrations de testostérone circulante, mais les concentrations intraprostatiques de DHT ne diminuent que de 60 % en raison du métabolisme

intraprostatique des précurseurs surrénaliens. Plusieurs études prospectives et randomisées montrent une prolongation de la survie des cancers de la prostate métastatiques de 3 à 6 mois. Des rémissions prolongées sont obtenues lorsque le BAC est administré dès le stade localisé de la maladie pour des périodes d'au moins 24 mois comme traitement néoadjuvant ou pour une période prolongée (au moins 6,5 ans) lorsqu'il est appliqué seul.

6.5.2 Modalités de l'hormonothérapie

Les médicaments utilisés pour la castration médicale sont les analogues de la LHRH (goséréline, leuproréline, triptoréline, buséréline) auxquels sont associés les anti-androgènes périphériques (non stéroïdes : nilutamide, flutamide, bicalutamide ou éventuellement stéroïdes, acétate de cyprotérone, progestatif à activité androgénique partielle) quand le BAC est choisi. Leur prescription est limitée au cancer de la prostate métastatique, à l'association à la radiothérapie pour le traitement des tumeurs localement avancées (dans le cas de la goséréline) et au traitement adjuvant des patients à haut risque de récurrence après prostatectomie. Des études récentes suggèrent la supériorité d'un traitement précoce mais soulignent les effets indésirables de l'hormonothérapie sur la qualité de vie (bouffées de chaleur, impuissance sexuelle, ostéoporose, surcharge pondérale avec les analogues de la LH-RH, complications hématologiques, viscérales, métaboliques et gynécomasties). Afin d'éviter ou ralentir le passage à la résistance hormonale par sélection ou induction de clones hormono-indépendants sous castration, diverses modalités d'hormonothérapie sont proposées, dont le traitement intermittent. Environ 80 % des cancers de la prostate métastatiques traités par castration ont une rémission d'une durée médiane de 18 mois. L'échappement à la castration est défini cliniquement par une progression tumorale contemporaine d'une concentration de testostérone circulante basse ($< 0,3$ ng/ml).

6.5.3 Des mécanismes de résistance aux hormonothérapies variés et mal connus

Les mécanismes de résistance aux hormonothérapies sont variés et mal connus malgré les approches modernes des études de transcriptomes, de génomique fonctionnelle et de protéomique.

L'échappement au traitement hormonal dépendrait de l'existence ou de la sélection de *clones cellulaires résistant à l'apoptose*. Certains de ces clones pourraient rester quiescents pendant des années et reprendre une activité proliférative. Les mécanismes de résistance à l'apoptose sont une des voies de recherche (p53, surexpression de MDM2, activation de gènes antiapoptotiques tels que

bcl2, voie Wnt/b-caténine, etc.). La prolifération des cellules cancéreuses pourrait échapper totalement à l'influence du RA par emballement des autres voies contrôlant la prolifération cellulaire telles que l'action de facteurs de croissance, de leurs récepteurs, ou de facteurs transcriptionnels indépendants du RA (Isaacs et Isaacs, 2004).

Dans la plupart des cancers résistants, le RA continue à être exprimé, voire surexprimé. *Les altérations moléculaires du RA et de ses voies d'activation* impliquées dans la prolifération cellulaire sont fréquentes et se traduisent par une hypersensibilité aux androgènes et une suractivité du RA. La persistance de l'activité du RA après castration peut s'expliquer par plusieurs mécanismes, maintien de concentrations intracellulaires fonctionnelles de DHT, dérégulation des coactivateurs ou corépresseurs, mutations activatrices du RA localisées surtout en N-terminal, ou sur le site de liaison transformant un antagoniste en agoniste comme dans le cas des cellules LNCaP. La surexpression de coactivateurs tels que TIF2, SRC1, ARA70, RAC3, Tip60 et du complexe histone-déacétylase 1 peut entraîner une hypersensibilité des cancers de la prostate aux androgènes ainsi que la diminution de l'expression de corépresseurs tels que HBO1 ou PAK6. L'activation du RA par phosphorylation *via* l'action de facteurs de croissance sur leurs récepteurs (tel HER2/neu) ou de facteurs transcriptionnels indépendamment des androgènes (Isaacs et Isaacs, 2004) conduit à proposer d'associer des inhibiteurs de Tyrosine kinases. L'intégrité des inhibiteurs de la voie AKT/PI3K et mTOR kinase semble importante en cancérogenèse prostatique car les mutations inactivatrices du gène suppresseur de tumeur PTEN qui conduisent à une hyperactivité de la voie AKT/PI3K sont fréquentes.

La différenciation neuro-endocrine fait aussi partie des mécanismes d'échappement des cancers de la prostate à la castration. Cette potentialité de transdifférenciation neuroendocrine des cancers de la prostate soumis à la privation androgénique s'inscrit dans la théorie selon laquelle les cellules à leur origine seraient issues de cellules de la couche basale androgéno-indépendantes, capables de se différencier en cellules luminales prostatiques en présence d'androgènes et pouvant survivre ou se diviser en l'absence d'androgènes grâce à des médiateurs neuroendocriniens. Le retrait d'androgènes ou l'inhibition de l'expression du RA, par interférence ARN (si-RNA), s'accompagne d'une différenciation neuroendocrine des cellules épithéliales prostatiques avec expression de facteurs de croissance comme la bombésine ou la neurotensine.

6.5.4 Thérapies alternatives et de deuxième ligne

Après échappement à la castration confirmé par le dosage de la testostéronémie, on dispose de chimiothérapies cytotoxiques ou d'une hormonothérapie de seconde ligne. Cette dernière consiste à introduire un BAC si celui-ci n'a pas

été instauré ou au contraire à retirer l'anti-androgène périphérique si l'échappement survient lors d'un blocage androgénique combiné. Cette attitude vise à induire un syndrome de retrait des anti-androgènes (progression de la maladie sous traitement par anti-androgène et rémission temporaire à l'arrêt de ce traitement), qui peut être dû à l'activation illégitime du RA par l'anti-androgène. Le syndrome de retrait est souvent associé à un RA dont le domaine de liaison hormonale a perdu sa spécificité par mutation. Un test fonctionnel en levure permet de déterminer le spectre des molécules stéroïdes ou non stéroïdes capables de se lier au RA cloné à partir de la tumeur et de l'activer. À ce stade de la maladie, l'addition ou la suppression d'anti-androgènes périphériques donne des réponses habituellement partielles et de courte durée (6 mois). La déplétion androgénique peut être complétée en inhibant la synthèse des androgènes dans la prostate (inhibiteurs des 5-alpha-réductases) ou les surrénales (kétokonazole, aminogluthétimide).

Conclusion

Les approches thérapeutiques actuelles visent surtout à diminuer la production et l'action des androgènes, mais cet effet est suivi d'une progression vers la résistance. Des recherches sont nécessaires pour comprendre les mécanismes du développement initial de ce cancer, différencier les cancers *in situ* à potentiel invasif de ceux qui resteront dormants afin d'améliorer la prévention secondaire visant à empêcher le développement de cancers invasifs et métastatiques à partir des petits cancers *in situ*. Pour contrôler les cancers de la prostate évoluant vers la résistance au traitement endocrinien, il faudrait développer de nouveaux anti-androgènes sélectifs (SARM) et développer de nouvelles cibles thérapeutiques.

Conclusions générales

Les cancers hormonodépendants constituent **un réel problème de santé publique. Ce sont les cancers les plus fréquents** chez la femme (sein) et chez l'homme (prostate) avec environ 42 000 nouveaux cas de chaque par an (Remontet *et al.*, 2003). De plus, la prévalence en France et dans les pays « développés » continue à augmenter pour les cancers du sein, de la prostate et des ovaires, cette augmentation n'étant que partiellement expliquée par l'augmentation de la longévité et du dépistage. Le nombre de cancers du sein et de la prostate a doublé en France dans les vingt dernières années. Cependant aux États-Unis, l'amorce d'une décroissance du nombre de cancers du sein est constatée à partir de 2003 (§ 4.2.4)

Les données cliniques et biologiques convergent sur le rôle des hormones stéroïdes comme **agents promoteurs de tumeur**. Leur mécanisme est associé à la stimulation de la prolifération cellulaire par les œstrogènes dans les cancers du sein et de l'endomètre et par les androgènes dans les cancers de la prostate. Ces cancers ont une spécificité thérapeutique, l'efficacité des traitements endocriniens constituant **le premier exemple d'un traitement ciblé de certains cancers basé sur une meilleure connaissance des mécanismes**.

Cependant, **l'explosion des connaissances fondamentales** sur la compréhension moléculaire des mécanismes de régulation de l'expression génique par les hormones à récepteurs nucléaires, et des mécanismes de la cancérogenèse, **contraste avec la lenteur des progrès en médecine**. Les difficultés sont grandes, dues en partie à l'accessibilité limitée des lésions précancéreuses pour ces tumeurs solides et à leur grande hétérogénéité récemment démontrées pour le sein.

Globalement, le nombre de données biologiques nouvelles explose. Il faudra du temps et plus de recherches pour parvenir à un schéma clair de ces mécanismes, du fait de l'instabilité de ces cancers et du nombre de facteurs génétiques et environnementaux impliqués.

Recommandations

1. Il faut accentuer les recherches : **les recherches de transfert basées sur une interface efficace entre chercheurs, chimistes, physiciens, biologistes et cliniciens travaillant sur un même objectif ; mais également des recherches fondamentales visant à mieux comprendre des questions essentielles de physiopathologie humaine afin d'agir avec plus d'efficacité dans leur traitement et leur prévention. La France est bien placée en recherche fondamentale avec les équipes des EPST et sa forte tradition en biologie moléculaire et en physiopathologie mais il faut faciliter le dialogue entre chercheurs plein temps et médecins sur un plan d'égalité et de respect mutuel.**
2. La stratégie essentielle pour diminuer l'incidence de ces cancers repose sur leur prévention.
 - a) **Elle est basée en amont sur une meilleure compréhension de leur étiologie.** Celle-ci passe obligatoirement par une bonne recherche scientifique fondamentale orientée sur des modèles adaptés et transposables à la pathologie humaine. Si l'on veut diminuer l'incidence et la mortalité des cancers hormonodépendants, l'accent devrait être mis sur **les mécanismes initiaux de la cancérogenèse**. En effet, au moment du diagnostic clinique, il devient souvent plus difficile de guérir du fait de l'acquisition

d'une instabilité génétique et de la sélection de cellules résistantes. C'est différent pour les cancers du poumon où la suppression du tabac est l'action de prévention évidente à entreprendre car on connaît le cancérigène principal.

b) Plus proche de la pratique médicale, une meilleure connaissance des facteurs individuels « de risque » et de leur quantification en améliorant les indices actuellement disponibles (Gail *et al.*, 1999), pourrait permettre une prévention individuelle « à la carte ».

La somme des facteurs de susceptibilité génétiques, épigénétiques et environnementaux (hormones, obésité, facteurs liés à la reproduction, éventuellement pesticides, etc.) devrait être mieux connue afin de définir un profil individuel de risque permettant d'agir pour chaque femme avec plus d'efficacité et au moindre risque. Il est clair qu'on ne pourra pas moduler les facteurs génétiques (eugénisme) mais **qu'on peut agir sur les facteurs hormonaux et nutritionnels le plus souvent réversibles.**

De nouveaux marqueurs prédictifs de risque doivent être découverts, permettant de différencier la lésion proliférante ou le cancer *in situ* qui développera un cancer invasif de celle qui restera quiescente. Outre des marqueurs tissulaires nécessitant biopsie ou ponction pas toujours anodines, il serait idéal de disposer de **moyens prédictifs non invasifs** issus des nouvelles techniques d'imagerie et des méthodes biochimiques d'analyse (par protéomique, etc.) des liquides biologiques (sang, urine, produits de sécrétion mammaire ou prostatique). Il ne suffira pas de mieux prédire un risque, il faudra aussi disposer de moyens dépourvus de toxicité pour l'empêcher.

3. Les approches expérimentales doivent être variées, certes aux niveaux moléculaire et cellulaire, mais aussi intégrées à l'organisme entier avec le souci de se référer à la situation rencontrée chez l'homme.

Sans être exhaustif, citons deux approches complémentaires pouvant être développées :

- *nouveaux modèles expérimentaux adaptés à la cancérogenèse humaine.* Outre la transgénèse chez les rongeurs, les tumeurs survenant spontanément chez les animaux domestiques (chien, chat) vieillissant avec l'homme, dans le même environnement et avec des modes de vies similaires, pourraient être de bons modèles ;
- *analyse des lésions précancéreuses et des cancers in situ à partir de banques humaines contrôlées et enregistrées de tissus congelés et fixés et inclus en paraffine.* Ces études peuvent permettre d'approcher la physiopathologie des phases initiales de la cancérogenèse et par suite, d'aider aux actions de dépistage et de prévention de ces cancers.

4. Émergence de nouveaux médicaments

La France a été très bien placée il y a 20 à 30 ans, grâce au savoir-faire et aux collaborations entre chimistes experts en stéroïdes et chercheurs biologistes des EPST aboutissant à la synthèse d'analogues et d'antagonistes des hormones stéroïdes qui ont été utilisés largement dans le monde par les chercheurs. On peut regretter que l'utilisation en clinique et la commercialisation se soit surtout développée dans d'autres pays que la France. Celle-ci a maintenant perdu sa place de leader (*cf.* Académie des sciences, RST N° 3, Le médicament). Peut-elle réanimer ces collaborations en choisissant des créneaux compétitifs du fait des expertises qu'elle conserve en sciences fondamentales ? La compréhension des bases de la **spécificité tissulaire d'action des hormones stéroïdes sexuelles et de leurs antagonistes** devrait permettre le développement de modulateurs spécifiques des récepteurs (SRM). Outre l'exemple des SERM développés surtout à l'étranger, il est envisageable de développer des SPRM nouveaux qui protégeraient à la fois l'endomètre et le sein des effets mitogènes des œstrogènes ainsi que des SARM, conservant les effets bénéfiques des androgènes mais supprimant leurs effets néfastes. De même pour des analogues interagissant avec d'autres récepteurs nucléaires (par exemple ER β) et pouvant être utilisés en prévention. Cela nécessitera des actions ciblées de collaborations entre chimistes, physiciens, biologistes, cliniciens avec l'aide de l'industrie pharmaceutique.

5. Sans multiplier le nombre de congrès de type EPU, des actions thématiques nationales et internationales et multidisciplinaires **focalisées** sur ce thème **ou sur un type de cancer précis et réunissant l'ensemble des chercheurs et cliniciens qui y travaillent seraient utiles**. Les actions régionales telles que les cancéropoles pourraient avoir l'avantage de bénéficier du financement des régions. Cependant, ces actions risquent de négliger l'aspect international de la recherche en suscitant des collaborations artificielles et en dispersant les efforts et les moyens selon des critères principalement locorégionaux. L'évaluation doit être nettement améliorée, faite au niveau national voire international et sur des critères uniques d'excellence et d'originalité.

Remerciements aux membres des unités Inserm Hormones et Cancers 148 et 540 et à JY Cance pour son aide iconographique.

Références bibliographiques

Alavanja MCR. *et al.* (2003). Use of Agricultural pesticides and prostate cancer risk in the agricultural health study cohort. *Am J Epidemiol*, **157** : 800-814.

- Anderson E. (2002). The role of estrogen receptors and progesterone receptors in human mammary development and tumorigenesis. *Breast Cancer Res*, **4** (5) : 197-201.
- Anzick SL. *et al.* (1997). AIB1, a steroid receptor coactivator amplified in breast and ovarian cancer. *Science*, **277** (5328) : 965-968.
- Bardon S. *et al.* (1985). RU486, a progestin and glucocorticoid antagonist, inhibits the growth of breast cancer cells via the progesterone receptor. *J Clin Endocrinol Metab*, **60** : 692-697.
- Baum M. *et al.* (2003). Anastrozole alone or in combination with tamoxifen versus tamoxifen alone for adjuvant treatment of postmenopausal women with early-stage breast cancer: results of the ATAC (Arimidex, Tamoxifen Alone or in Combination) trial efficacy and safety update analyses. *Cancer*, **98** (9) : 1802-1810.
- Béral V. *et al.* (2007). Ovarian cancer and hormone replacement therapy in the Million Women Study. *Lancet*, **369** (9574) : 1703-1710.
- Berry M. *et al.* (1990). Role of the two activating domains of the oestrogen receptor in the cell-type and promoter-context dependent agonistic activity of the anti-oestrogen 4-hydroxytamoxifen. *EMBO J*, **9** : 2811-2818.
- Beslija S. *et al.* (2007). Second consensus on medical treatment of metastatic breast cancer. *Ann Oncol*, **18** (2) : 215-25.
- Bosland MC. (1992). Animal models for the study of prostate carcinogenesis. *J Cell Biochem Suppl*, **16** H : 89-98.
- Bosland MC. (2000). The role of steroid hormone in Prostate carcinogenesis. *J Nat Cancer Inst Monograph*, **27** : 39-66.
- Brzozowski AM. *et al.* (1997). Molecular basis of agonism and antagonism in the oestrogen receptor. *Nature*, **389** : 753-758.
- Chalbos D. *et al.* (1982). Estrogens stimulate cell proliferation and induce secretory proteins in a human breast cancer cell line (T47D). *J Clin Endocrinol Metab*, **55** : 276-283.
- Chalbos D. *et al.* (1990). Expression of the progestin-induce fatty acid synthetase in benign mastopathies and breast cancer as measured by RNA in situ hybridisation. *J Natl Cancer Inst* **82** (7) : 602-606.
- Chambon P. (1992). Le récepteur des œstrogènes : De sa structure à sa fonction. *Annales de l'Institut Pasteur*, **1** : 51-61.

- Charpentier AH. *et al.* (2000). Effects of estrogen on global gene expression : identification of novel targets of estrogen action. *Cancer Res*, **60** : 5977-5983.
- Cicatiello L. *et al.* (2004). A genomic view of estrogen actions in human breast cancer cells by expression profiling of the hormone-responsive transcriptome. *J Mol Endocrinol*, **32** : 719-775.
- Clarke RB. (2003). Steroid receptors and proliferation in the human breast. *Steroids*, **68** : 789-794.
- Clarke RB. *et al.* (2005). A putative breast stem cell population is enriched for steroid receptor positive cells. *Developmental Biology*, **277** : 443-456.
- Clinton G. *et al.* (1996). Estrogens increase the expression of fibulin1, an extracellular matrix protein, secreted by human ovarian cancer cells. *Proc Nat Acad Sci USA*, **93** : 316-320.
- Coezy E. *et al.* (1982). Tamoxifen and metabolites in MCF7 cells : correlation between binding to estrogen and inhibition of cell growth. *Cancer Res*, **42** : 317-323.
- Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer (Oxford) (2001). Familial breast cancer: collaborative reanalysis of individual data from 52 epidemiological studies including 58 209 women with breast cancer and 101 986 without the disease. *Lancet*, **358** : 1389-1399.
- Cummings SR. *et al.* (1999). The effect of raloxifene on risk of breast cancer in postmenopausal women : results from the MORE randomised trial. *JAMA*, **281** : 2189-2197.
- Cunha GR. *et al.* (2003). Role of the stromal microenvironment in carcinogenesis of the prostate. *Int J Cancer*, **107** (1) : 1-10.
- Cussenot O. et Cancel-Tassin G. (2004). Susceptibilité génétique au cancer de la prostate. *Med Sci (Paris)*, **20** (5) : 562-568.
- Cuzick J. *et al.* (2003). Overview of the main outcomes in breast-cancer prevention trials. *Lancet*, **361** : 296-300.
- Dickson RB. et Lippman ME. (1987). Estrogenic regulation of growth and polypeptide growth factor secretion in human breast carcinoma. *Endocr Rev*, **8** : 29-43.
- Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (1998). Tamoxifen for early breast cancer: an overview of the randomised trials. *Lancet*, **351** : 1451-1467.

- Easton DF. *et al.* (2007). Genome-wide association study identifies novel breast cancer susceptibility loci. *Nature advance online publication* 27 May 2007.
- Emons *et al.* (2000). Hormonal interaction in endometrial cancer Endocrine-Related. *Cancer*, **7** : 227-242.
- Fabre A. *et al.* (2007). Oral progestogens before menopause and breast cancer risk. *Brit J Cancer*, **96** : 841-844.
- Fentiman IS (2006). Male breast cancer. *Lancet*, **367** : 595-604.
- Ferguson DJP. et Anderson TJ. (1981). Morphological evaluation of cell turnover in relation to the menstrual cycle in the resting human breast. *Br J Cancer*, **44** : 177-181.
- Fisher B. *et al.* (1998). Tamoxifen for prevention of breast cancer : report of the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project P-1 Study. *J Natl Cancer Inst*, **90** (18) : 1371-1388.
- Fournier A. *et al.* (2005). Breast cancer risk in relation to different type of hormone replacement therapy in the E3N-EPIC cohort. *Int J Cancer*, **114** : 448-454.
- Gail MH. *et al.* (1999). Weighing the risks and benefits of Tamoxifen treatment for preventing breast cancer. *J Natl Cancer Inst*, **91** : 1829-1846.
- Goss PE. *et al.* (2005). Randomized trial of letrozole following tamoxifen as extended adjuvant therapy in receptor-positive breast cancer: updated findings from NCIC CTG MA.17. *J Natl Cancer Inst*, **97** (17) : 1262-1271.
- Gottlieb B. *et al.* (2004). The androgen receptor gene mutations database (ARDB). *Hum Mutat*, **23** (6) : 527-533.
- Graham JD. et Clarke CL. (1997). Physiological action of progesterone in target tissues. *Endocr Rev*, **18** (4) : 502-519.
- Gronwald J. *et al.* (2006). Hereditary breast cancer clinical study group. Tamoxifen and contralateral breast cancer in BRCA1 and BRCA2 carriers an update. *Int J Cancer*, **118** : 2281-2284.
- Gustafsson JA. (1999). Estrogen receptor β . *J Endocrinology*, **163** : 379-383.
- Henderson BE. et Feigelson HS. (2000). Hormonal carcinogenesis. *Carcinogenesis*, **21** (3) : 427-433.
- Howell A. *et al.* (2003). New approaches to the endocrine prevention and treatment of breast cancer. *Cancer Chemother Pharmacol*, **52** : S39-S44.

- Howell A. *et al.* (2004). Comparison of fulvestrant versus tamoxifen for the treatment of advanced breast cancer in postmenopausal women previously untreated with endocrine therapy: a multinational, double-blind, randomized trial. *J Clin Oncol*, **22** (9) : 1605-1613.
- Huggins C. et Hodges CV. (1941). Studies of prostatic cancer. Effect of castration, oestrogens and androgen injections on serum phosphatases in metastatic carcinoma of the prostate. *Cancer Res*, **1** : 293-307.
- Hulka BS. et Stark AT. (1995). Breast cancer cause and prevention. *Lancet*, **346** : 883- 887.
- Isaacs JT. et Isaacs WB. (2004). Androgen receptor outwits prostate cancer drugs. *Nat Med*, **10** (1) : 26-27.
- Jensen EV. *et al.* (1966). Estrogen receptors in target tissues. In Nakao T., Pincus G., Tait J. (eds.) *Steroid Dynamics*. Academic Press Inc, New York, p. 133-157.
- Jensen EV. *et al.* (1968). A two step mechanism for the interaction of estradiol with rat uterus. *Proc Nat Acad Sc USA*, **59** : 632-638.
- Kato S. *et al.* (1995). Activation of the estrogen receptor through phosphorylation by mitogen-activated protein kinase. *Science*, **270** : 1491-1494.
- King MC. *et al.* (2001). Tamoxifen and breast cancer incidence among women with inherited mutations in BRCA1 and BRCA2 : National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project (NSABP-P1) Breast Cancer Prevention Trial. *JAMA*, **286** : 2251-2256.
- Kuhajda FP., Jenner K., Wood FD. *et al.* (1994). Fatty acid synthase: a potential selective target for antineoplastic therapy. *Proc Natl Acad Sci USA*, **91** : 6379-6383.
- Labrie F. (2002). Androgen blockade in prostate cancer in 2002: major benefits on survival in localized disease. *Mol Cell Endocrinol*, **198** (1-2) : 77-87.
- Lacassagne A. (1936). Hormonal pathogenesis of adenocarcinoma of the breast. *Amer J Cancer*, **27** : 217-228.
- Lakhani SR. *et al.* (2002). The Pathology of Familial Breast Cancer : Predictive Value of Immunohistochemical Markers Estrogen Receptor, Progesterone Receptor, HER-2, and p53 in Patients With Mutations in BRCA1 and BRCA2. *J Clin Oncol*, **20** : 2310-2318.
- Lippman ME., Bolan G. et Huff K. (1976). The effects of estrogens and antiestrogens on hormone responsive human breast cancer in long-term issue culture. *Cancer Res*, **36** : 4595-4601.

- Lydon JP. *et al.* (1999). Murine mammary gland carcinogenesis is critically dependent on progesterone receptor function. *Cancer Res*, **59** : 4276-4284.
- Malins DC. *et al.* (2003). Cancer-related changes in prostate DNA as men age and early identification of metastasis in primary prostate tumors. *Proc Natl Acad Sci USA*, **100** (9) : 5401-5406.
- Martino S., Cauley JA., Barrett-Connor E., Powles TJ., Mershon J., Disch D., Secrest RJ. et Cummings SR. (2004). CORE Investigators. Continuing outcomes relevant to Evista : breast cancer incidence in postmenopausal osteoporotic women in a randomized trial of raloxifene. *J Natl Cancer Inst*, **96** (23) : 1751-1761.
- Mauriac L. (2004). Tamoxifene et SERMs, inhibiteurs de l'aromatase, progestatifs, anti-estrogènes purs : quelle stratégie en situation métastatique. *Oncologie*, **6** : 114-119.
- McKenna NJ. *et al.* (2002). Combinatorial control of gene expression by nuclear receptors and coregulators. *Cell*, **108** : 465-474.
- Medina D. (2004). Breast cancer: the protective effect of pregnancy. *Clin Cancer Res*, **10** : 380s-384s.
- Melnikow J. *et al.* (2006). Chemoprevention: Drug Pricing and Mortality Cancer. Vol. 107 p. 950-958.
- Mosca L. *et al.* (2001). Design and methods of the Raloxifen Use for The Heart (RUTH) Study. *Am J Cardiol*, **88** : 392-395.
- Nelson WG. *et al.* (2003). Prostate cancer. *N Engl J Med*, **349** (4) : 366-81.
- Noruzinia M., Coupier I. et Pujol P. (2005). Is BRCA1/BRCA2-related breast carcinogenesis estrogen dependent? *Cancer*, **104** : 1567-1574.
- Osborne CK. *et al.* (2003). Role of the estrogen receptor coactivator AIB1 (SRC-3) and HER-2/neu in tamoxifen resistance in breast cancer. *J Natl Cancer Inst*, **95** : 353-361.
- Perey L. *et al.* (2007). Clinical benefit of fulvestrant in postmenopausal women with advanced breast cancer and primary or acquired resistance to aromatase inhibitors : final results of phase II Swiss Group for Clinical Cancer Research Trial (SAKK 21/00). *Ann Oncol*, **18** (1) : 64-69.
- Pestell RG. *et al.* (1999). The cyclins and cyclin-dependent kinase inhibitors in hormonal regulation of proliferation and differentiation. *Endocrine Reviews*, **20** (4) : 501-534.
- Pharoah PD. *et al.* (2002). Polygenic susceptibility to breast cancer and implications for prevention. *Nat Genet*, **31** : 33-6.

- Pike MC. *et al.* (2004). Prevention of cancers of the breast, endometrium and ovary. *Oncogene*, **23** : 6379-6391.
- Potti *et al.* (2003). Prevalence of pesticide exposure in young males (≤ 50 years) with adenocarcinoma of the prostate. *J Carcinog*, **2** (1) : 4.
- Powles TJ. *et al.* (2007). Twenty-year follow-up of the Royal Marsden randomized, double-blinded tamoxifen breast cancer prevention trial. *J Natl Cancer Inst*, **99** (4) : 283-290.
- Pyke ACW. *et al.* (1999). Structure of the ligand-binding domain of oestrogen receptor beta in the presence of a partial agonist and a full antagonist. *EMBO J*, **18** : 4608.
- Rapport Afssa/Afssaps (2005). Sécurité et bénéfice des phyto-œstrogènes apportés par l'alimentation.
- Ravdin PM *et al.* The Decrease in Breast Cancer Incidence in 2003 in the United States. The New England. *J Medicine*, **356** : 1670-1674.
- Rebbeck TR. *et al.* (2002). The Prevention and Observation of Surgical End Points Study Group. Prophylactic oophorectomy in carriers of BRCA1 or BRCA2 mutations. *N Engl J Med*, **346** : 1616-1622.
- REDUCE STUDY GROUP (2004). Chemoprevention of prostate cancer in men at high risk : rationale and design of the reduction by dutasteride of prostate cancer events (REDUCE). *J Urol*, **172** (4) : 1314-1317.
- Remontet L. *et al.* (2003). Cancer incidence and mortality in France over the period 1978-2000. *Rev Epidemiol Santé Publique*, **51** : 3-30.
- Rio MC. *et al.* (1988). Breast cancer-associated pS2 protein : Synthesis and secretion by normal stomach mucosa. *Science*, **241** : 705-708.
- Rochefort H. et Borgna JL. (1981). Differences between the activation of the oestrogen receptor by oestrogen and by anti-oestrogen. *Nature*, **292** : 257-259.
- Rochefort H. et Maudelonde T. (1989). Les anti-œstrogènes. *Éditions Flammarion Médecine-Sciences*, Paris.
- Rochefort H. *et al.* (2000). Cathepsin D in breast cancer: mechanisms and clinical applications a 1999 overview. *Clinica Chimica Acta*, **291** : 157-170.
- Rochefort H. et Sureau C. (2003). Les traitements hormonaux substitutifs (TSH) de la ménopause : évolution récente du rapport bénéfices/risques. *Bulletin de l'Académie Nationale de Médecine*, séance du 2/12/2003, **187** : 1707-1711 et www.academie-medecine.fr/

- Rodriguez C. *et al.* (2001). Estrogen replacement therapy and ovarian cancer. Mortality in a large prospective study of US women. *JAMA*, **201** : 1460-1465.
- Roger P. *et al.* (2001). Decreased expression of estrogen receptor beta protein in proliferative preinvasive mammary tumors. *Cancer Res*, **61** : 2537-2541.
- Russo J. *et al.* (2005). Breast differentiation and its implication in cancer prevention. *Clin Cancer Research*, **11** : 931-936.
- Simpson ER. (2003). Sources of estrogen and their importance. *J Steroid Biochem Mol Biol*, **86** : 225-230.
- Smith CL. et O'Malley. (2004). Coregulator function : a key to understanding tissue specificity of selective receptor modulators. *Endo Rev*, **25** : 45-71.
- Sorlie T. *et al.* (2003). Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. *PNAS*, **100** (14) : 8418-8423.
- Thompson IM. *et al.* (2003). The influence of finasteride on the development of prostate cancer. *N Engl J Med*, **349** (3) : 215-224.
- Thurlimann B. *et al.* (2005). A comparison of letrozole and tamoxifen in postmenopausal women with early breast cancer. *N Engl J Med*, **353** (26) : 2747-2757.
- Vignon F. *et al.* (1987). Antiestrogens inhibit the mitogenic effect of growth factors on breast cancer cells in the total absence of estrogens. *Biochem Biophys Res Commun*, **146** : 1502-1508.
- Vogel VG. *et al.* (2002). The study of tamoxifen and raloxifene (STAR). *Clinical Breast Cancer*, **3** : 153-159.
- Vogelstein B. et Kinzler KW. (2004). Cancer genes and the pathways they control. *Nature Medicine*, **10** (8) : 789-799.
- Westley B. et Rochefort H. (1980). A secreted glycoprotein induced by estrogen in human breast cancer cell lines. *Cell*, **20** : 352-362.
- Writing Group for the Women's Health Initiative Investigators (2002). Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women. *JAMA*, **288** : 321-333.
- Writing Group for the Women's Health Initiative Investigators (2004). Effects of conjugated equine estrogen in postmenopausal women with hysterectomy. *JAMA*, **291** : 1701-1712

Abréviations

AMM : autorisation de mise sur le marché
ADN : acide désoxyribonucléique
AGS : acide gras synthétase
AIB1 : amplified in breast cancer 1
ARN : acide ribonucléique
DHEA : déhydroépiandrostérone
DMBA : diméthylbenzanthracène
DPN : diarylpropionitryle
ERE : estrogen response element
HSP : heat shock proteins
LBD : ligand binding domain
LHRH : luteinizing hormone releasing hormone
MMTV : mouse mammary tumor virus
NB : nuclear body
N-CoR : nuclear receptors corepressor
NMU : N-nitrosométhylurée
PCPT : prostate cancer prevention trial
PPT : propyl-pyrolazole-triol
RA : récepteur des androgènes
RE : récepteur des œstrogènes
ROS : reactive oxygen species
SAGE : serial analysis of gene expression
SARM : selective androgen receptor modulators
SERD : selective estrogen receptor down regulator
SERM : selective estrogen receptor modulators
SMRT : silencing mediator of retinoid and thyroid receptors
SPRM : selective progesterone receptor modulator
TGF : transforming growth factor
THS : traitement hormonal substitutif de la ménopause
TMS : transcranial magnetic stimulation
VEGF : vascular endothelial growth factor

CHAPITRE 2

Le traitement substitutif de la ménopause – La contraception

SOUS-CHAPITRE 2.1

Réévaluation des modalités et de la place du traitement hormonal de la ménopause

PHILIPPE BOUCHARD, CHRISTIAN ROUX ET RÉGINE SITRUK-WARE

Résumé

La ménopause est la période de la vie qui succède à l'épuisement du capital folliculaire ovarien, qui survient à 51 ans en moyenne. C'est dire que, compte tenu de l'espérance de vie actuelle, les femmes passent presque un tiers de leur vie sans hormones. L'absence de follicules, et la carence hormonale qui en résulte, ont pour conséquence l'apparition de symptômes qui compromettent la qualité de vie des femmes, comme les bouffées de chaleur, les sueurs nocturnes, la sécheresse vaginale. L'absence d'œstrogènes a aussi pour conséquence une diminution inéluctable de la masse osseuse, une disparition des effets protecteurs cardiovasculaires de cette hormone, et peut-être des effets cognitifs. La non-protection cardiovasculaire est démontrée chez le sujet jeune aux ovaires inactifs mais est toujours incertaine chez la femme de plus de 50 ans. Les grandes études cliniques, notamment, la plus importante d'entre elles, à haut niveau de preuve, l'étude Women Health Initiative, dont les résultats, publiés régulièrement depuis 2002, montrent que, dans les limites du protocole thérapeutique utilisé

(œstrogène équin par voie orale, avec ou sans progestatif synthétique, l'acétate de médroxy progestérone), ce traitement est capable d'augmenter faiblement le risque absolu de maladie cardiovasculaire, de cancer du sein, d'accident vasculaire cérébral, de thrombose veineuse, tandis qu'il protège contre les fractures du col et les cancers du côlon. Cinq ans après les premiers résultats, il apparaît raisonnable de conclure que le traitement œstrogénique associé ou non à un dérivé de la progestérone, ne peut-être proposé à tout le monde en raison du risque, lié à l'âge, de cancer du sein, et, surtout, du risque principal de la femme, le risque cardiovasculaire. Les femmes à risque doivent donc être exclues, ce qui permet ainsi de proposer le traitement, chez les femmes symptomatiques. Les ré-analyses des résultats de cette grande étude suggèrent, en effet, que si le traitement est proposé immédiatement au moment de la ménopause, chez les femmes sans facteurs de risque connu, le rapport bénéfice risque est favorable pendant 5 à 10 ans. Ce traitement est probablement réalisé au mieux par des stéroïdes physiologiques, et peut-être, en ce qui concerne les œstrogènes, par la voie transdermique, toujours dans le cadre d'un partenariat entre la femme et le médecin. Le traitement hormonal de la ménopause n'est donc plus un remplacement hormonal mais un traitement des symptômes, limité dans le temps.

Introduction

Le traitement hormonal « substitutif » a fait place au traitement hormonal « tout court » à la suite des résultats des grandes études épidémiologiques anglo-saxonnes montrant ou suggérant un surrisque lié au traitement. Les deux conséquences pratiques de cet état de fait sont, d'une part la baisse significative des prescriptions hormonales d'environ 40 %, et d'autre part la multiplicité des procès aux États-Unis, dépassant plusieurs centaines, avec des « Class Action » qui font planer un doute sur l'avenir de ces thérapeutiques pourtant seules capables de réduire les symptômes du climatère, et donc d'améliorer la qualité de vie. Le but de ce chapitre est de faire le point sur l'ensemble des données inhérentes au traitement hormonal des femmes après la ménopause.

La définition de la ménopause a évolué au cours des dernières années. Si la définition de l'OMS l'a établie comme l'arrêt des règles définitif depuis un an, chez une femme de cinquante ans environ, les travaux de Soules, qui ont établi les différents stades de la période de transition ménopausique, incluent l'année entière qui suit la dernière période menstruelle dans la définition de la périménopause (Soules, 2005). Or, à ce stade l'hypo-œstrogénie est déjà dûment installée.

L'âge de la ménopause n'a pas varié depuis sa description dans l'antiquité, la disparition du capital folliculaire survient à 51 ans en moyenne, alors que la

puberté apparaît à un âge de plus en plus précoce. La carence œstrogénique qui en résulte est responsable de symptômes gênants ou invalidants pendant un temps plus ou moins long chez plus de 50 % des femmes. De plus, la carence hormonale est associée à une diminution de la masse osseuse, et, comme cela a été suggéré par l'étude des femmes ovariectomisées jeunes, à une augmentation du risque d'accidents cardiovasculaires. Disponible depuis 1942 aux États-Unis pour la voie orale et depuis 1960 en France (1974 pour la voie transdermique) pour le traitement des symptômes vasomoteurs, le traitement hormonal de la ménopause a soulevé de multiples controverses depuis la publication des résultats des grandes études épidémiologiques disponibles depuis les années 1990 qui s'opposent aux conclusions des données expérimentales sur les effets bénéfiques pleïotropiques des œstrogènes. Ceci est notamment le cas des effets protecteurs vasculaires et neurologiques qui ont servi de base à la plausibilité biologique du traitement hormonal au long cours de la ménopause.

Aujourd'hui, il est cependant possible de prendre du recul vis-à-vis de cette avalanche de résultats pour tirer des conclusions qui apparaissent claires, et somme toute rassurantes. En premier lieu, il est toujours approprié de proposer un traitement aux femmes de plus de cinquante ans, donc récemment ménopausées, qui présentent des symptômes du climatère susceptibles d'altérer leur qualité de vie. Le seul traitement efficace à ce jour reste le traitement hormonal de la ménopause. Les autres thérapeutiques n'ont aucune efficacité démontrée, contre placebo, pour éradiquer les bouffées de chaleur, les sueurs nocturnes et autres symptômes de la ménopause. En second lieu, les discussions qui ont suivi la publication des études d'intervention comme les études HERS I et II (Heart and Estrogen-Progestin Replacement Study) (2002), et bien sûr la WHI (2002, 2004) (Women's Health Initiative), sont bien entendu très importantes, mais aussi et surtout salutaires, car elles ont permis de mieux sécuriser l'administration du traitement hormonal en identifiant les femmes qui peuvent recevoir un traitement, en reconnaissant celles qui présentent des facteurs de risque (tabac, hypertension artérielle (HTA), hyperlipidémies athérogènes, surpoids, antécédent de thrombose veineuse, diabète, antécédent de cancer du sein,...). Il est de plus maintenant clairement accepté qu'une fois cette sélection faite et après exclusion d'une pathologie mammaire sur la base d'une mammographie de dépistage, les femmes puissent être traitées, dans le cadre d'un partenariat médecin - femme traitée, après une information aussi complète que possible sur le rapport bénéfice risque de ce traitement. Cette information devra si possible bénéficier d'un support écrit. De plus, le traitement est proposé sous réserve d'un suivi pour dépister en particulier les deux pathologies liées à l'âge qui sont aggravées par le traitement hormonal : les maladies cardiovasculaires, en premier lieu, et bien sûr le cancer du sein.

Enfin, les conclusions de l'ensemble de ces grandes études suggèrent qu'il est certainement très différent de traiter une femme de cinquante ans récemment

ménopausée, sans facteurs de risque identifiés, chez qui le risque cardiovasculaire est faible, de même que celui de cancer du sein, par rapport au traitement d'une femme de plus de soixante ans, *a fortiori* si elle présente des facteurs de risque comme cela était le cas dans la WHI, où un très grand pourcentage de femmes étaient obèses, hypertendues, tabagiques...

Comment ces conclusions sont-elles possibles et quelles recommandations sont possibles dans l'état actuel des connaissances ?

1 | L'évolution des idées

Le traitement hormonal de la ménopause est apparu en 1942 aux États-Unis avec la mise sur le marché d'extraits d'œstrogènes équins produits à partir d'urines de juments gravides. Cette nouveauté thérapeutique a été acceptée avec un certain enthousiasme, notamment après la parution du livre de Robert Wilson *Feminine Forever*, où la femme ménopausée, victime d'une injustice biologique, est l'objet d'une déchéance rapide, ou « living decay », qui seule peut-être évitée par la prise d'un traitement hormonal, considéré jusqu'à présent comme un traitement de substitution. Ce livre, aux propos machistes et fantaisistes, a connu un immense retentissement dès sa parution en 1960, sa promotion étant grandement aidée par l'industrie du médicament. On trouve d'ailleurs dans ce livre des propos définitifs sur la femme de plus de cinquante ans qui font sourire ou même parfois pleurer par leur infantilisme. Notamment, sous la plume du même auteur, on peut lire quelques années plus tard que grâce au traitement : « (With hormone replacement) breasts and genital organs will not shrivel. Such women will be much more pleasant to live with and will not become dull and unattractive... » positionnant ainsi le traitement comme esthétique, pour une jouvence prolongée.

Le traitement hormonal est disponible en France depuis 1960, et les œstrogènes transdermiques sont apparus en 1974 d'abord sous forme de gel percutané et plus tard de systèmes à libération contrôlée. On considère qu'il y a en France environ dix millions de femmes ménopausées dont environ deux millions sont traitées. Très rapidement, les effets bénéfiques décrits subjectivement par Wilson reçoivent des confirmations expérimentales. Dès 1972, des échelles de mesure des symptômes et de l'action correctrice des œstrogènes sont développées. En 1980, il est établi que le traitement de la ménopause augmente le cholestérol lié aux protéines de haute densité (HDLc) et diminue le cholestérol lié aux protéines de basse densité (LDLc), données qui vont servir de substratum théorique aux effets cardiovasculaires du traitement de ménopause. Ainsi, une vingtaine d'études d'observation suggèrent que le traitement diminue le risque cardiovasculaire de 20 à 40 % (Mendelsohn et Bkana, 1999). Parallèlement,

des études *in vitro* et *in vivo* sur des modèles animaux consolident le rationnel des effets bénéfiques cardiovasculaires en montrant des effets bénéfiques des œstrogènes sur les flux artériels, la formation de la plaque, et le fonctionnement endothélial. De plus, la prévention des bouffées de chaleur est évidente, et un effet des œstrogènes sur la masse osseuse est aussi montré. Curieusement, il faudra attendre les grandes études contrôlées dites « d'intervention », celles qui ont stigmatisé les risques du traitement hormonal, pour confirmer sur une grande échelle que le traitement a un effet de prévention très efficace sur la survenue de fractures du rachis et du col du fémur (WHI, 2002).

Ainsi les années 1990 ont-elles vu un développement sans précédent du marché du traitement de la ménopause, et les taux d'observance au traitement se sont améliorés partout dans le monde, avec une augmentation considérable des ventes, atteignant environ 3,5 milliards de dollars. Des perfectionnements étaient mis au point pour satisfaire toutes les utilisatrices, avec en particulier des régimes continus, visant à supprimer ou atténuer la survenue des hémorragies de privation.

Rappelons qu'une première révolution culturelle a surpris le corps médical impliqué dans le traitement de la ménopause, en 1975, avec la parution de deux articles importants dans le *New England Journal of Medicine*, démontrant l'augmentation du risque de cancer de l'endomètre chez les femmes non hystérectomisées, ayant reçu des œstrogènes, selon le schéma thérapeutique des années 1960 et 1970. Ce n'est que quelques années plus tard que la signification de ces études est apparue, à savoir la nécessité de l'adjonction d'un progestatif aux œstrogènes, afin d'éviter d'abord une hyperplasie puis une hyperplasie complexe et éventuellement un cancer différencié après un processus d'environ trois à dix ans (Smith *et al.*, 1975 ; Ziel et Finkle, 1975). Le risque veineux découvert dans les années 1970, et démontré en 1996, sera discuté plus loin. Ces deux risques n'ont cependant pas été considérés comme une remise en cause du traitement, puisque celui-ci apparaissait comme très utile notamment par ses effets sur les symptômes vasomoteurs et urogénitaux, et donc sur la qualité de vie, encore que cette dernière n'avait pas été évaluée avec les échelles dont nous disposons maintenant.

Une vague d'inquiétude a donc été responsable d'une baisse des ventes, lesquelles ont repris quelques années plus tard lorsque les études fondamentales ont permis de comprendre le rôle physiologique de la progestérone sur la régulation des récepteurs d'œstradiol et donc la possibilité de prévenir la prolifération endométriale avec un progestatif.

Les premières études qui ont remis en question le traitement sont apparues dans le milieu de la décennie 1990, avec en particulier la Nurses Health Study, qui pour la première fois suggère que le traitement par les œstrogènes augmente

le risque de cancer du sein après ~ 5 ans d'exposition. En 1997, les faits sont quasiment établis dans la remarquable étude de Valerie Beral *et al.*, celle du Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer (1997), qui montre une augmentation du risque relatif de cancer du sein avec les œstrogènes de 1,27 après cinq ans d'utilisation et une augmentation de ce risque avec la durée du traitement. Ces données n'ont cependant pas ralenti les ventes de THS, les effets bénéfiques sur la qualité de vie, sur la prévention de l'ostéoporose, et sur le risque cardiovasculaire semblant l'emporter largement sur cette faible augmentation du risque de cancer du sein. Il était d'ailleurs suggéré par les études d'observation que les cancers observés étaient de meilleur pronostic, mieux différenciés, et hormonodépendants et donc de moindre gravité. Enfin, plusieurs études ont rapporté un effet protecteur sur le cancer du côlon, véritable « cerise sur le gâteau » en faveur du traitement.

2 | Les faits

Le traitement hormonal de la ménopause utilise un œstrogène éventuellement associé à un dérivé de la progestérone, chez les femmes non hystérectomisées, pour réduire les symptômes du climatère, améliorer la qualité de vie, mais aussi pour prévenir la diminution de la masse osseuse.

Ces effets bénéfiques du traitement sont contrastés par les inconvénients de celui-ci, conséquence de la prescription d'œstrogènes chez des femmes qui, de par leur âge et éventuellement à cause de risques individuels, sont exposées à un risque accru de cancer du sein (Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer, 1997), dont l'incidence augmente de manière significative avec l'âge, et surtout à un risque d'accident cardiovasculaire, première cause de mortalité chez la femme de plus de cinquante ans, mortalité qui augmente aussi de manière significative avec l'âge. Rappelons qu'en France, le risque de cancer du sein augmente avec l'âge de manière significative. Selon l'Institut de veille sanitaire, l'incidence du cancer du sein est de 269,6 pour 100 000 personnes années, entre cinquante et cinquante-cinq ans, et 298,7 entre cinquante-cinq et cinquante-neuf ans. L'augmentation de l'incidence annuelle est d'environ 2,4 %, et l'incidence a doublé entre 1980 et 2000 avec environ 40 000 nouveaux cas par an.

Le nombre de décès par cancer du sein est très inférieur à celui qui est la conséquence de maladies cardiovasculaires. Le risque individuel a récemment été évalué dans la population australienne (Coombs, 2005). Les chiffres peuvent ne pas concerner certaines populations particulièrement à risque, mais ils confirment que si le risque relatif de cancer du sein augmente avec l'âge, le risque absolu diminue compte tenu de la diminution des années de vie prévisibles. Dans ce travail, l'espérance de vie est appréciée à 79 ans.

Chez une femme qui ne prend pas de traitement :

- à 40 ans, le risque d'avoir un cancer du sein au cours des quarante prochaines années est de 7,2 % ;
- à 45 ans, le risque est de 6,8 % ;
- à 50 ans, le risque d'avoir un cancer du sein dans les 30 années suivantes est de 6,1 % ;
- à 60 ans le risque est de 4,4 % ;
- à 70 ans, le risque est de 2,4 % ;
- à 75 ans le risque est de 1,14 %.

Le risque supplémentaire dû au traitement est faible :

- le risque absolu individuel qui résulte de l'usage des hormones sexuelles pendant cinq ans chez une femme de 50 ans est de 6,3 % pour un traitement par œstrogène seul et de 6,7 % (0,60 % de plus) pour un traitement combiné par œstrogène et progestatif ;
- après dix ans de traitement, le risque d'un traitement combiné est de 7,7 % ;
- après quinze ans, il est de 8,9 %, et négligeable pour les œstrogènes seuls (6,9 % après quinze ans de traitement).

Fait capital, une fois le traitement hormonal interrompu, le risque de cancer diminue et revient, au bout de quelques années, à celui de la population générale non traitée. Il n'est ainsi toujours pas clairement établi que les œstrogènes induisent de nouveaux cancers du sein ; en revanche, l'ensemble des données obtenues suggère que le traitement hormonal révèle probablement des tumeurs préexistantes, silencieuses.

En ce qui concerne le risque cardiovasculaire, risque le plus important puisqu'il constitue la cause de décès d'une femme sur deux, contre une femme sur vingt pour le cancer du sein, malgré une accumulation de données expérimentales et cliniques suggérant un effet protecteur de l'œstradiol contre le risque d'athérosclérose, les données obtenues depuis 1998 viennent contredire cet optimisme, principalement chez les femmes à risque, et chez les femmes plus âgées. En effet, dans la première grande étude randomisée contre placebo en prévention secondaire, la HERS study, puis dans des études d'intervention, fondées sur les preuves, en prévention secondaire, mais aussi en prévention primaire, comme les études WHI, EPAT, ERAT, HART-WELL, il apparaît clairement

que les œstrogènes peuvent augmenter le risque d'accidents vasculaires, notamment chez les femmes plus âgées ou porteuses de facteurs de risque. Le mécanisme en est complexe et dépendant de la dose, mais potentiellement aussi de la voie d'administration, la voie orale augmentant de manière dose-dépendante le risque thrombotique veineux, mais aussi, peut-être artériel, lorsque les flux artériels sont réduits par des plaques obstructives. De plus, l'élément fondamental à l'origine des accidents vasculaires, la rupture de la plaque, dépend de l'effet protéolytique des métalloprotéases dont l'activité est accrue par les œstrogènes indépendamment de leur voie d'administration. Enfin, dernière incertitude et non des moindres, l'effet des œstrogènes sur le risque de démence, et leurs effets cognitifs, établis aussi sur certaines modèles animaux, n'ont pas été démontrés chez la femme, à ce jour. Certaines études ont même rapporté une augmentation du risque de démence avec le traitement, encore que l'âge des femmes traitées (plus de soixante-cinq ans dans la Women's Health Initiative Memory Study (WHIMS)), fait suggérer que cette aggravation cognitive peut-être rapportée à des accidents vasculaires dont on sait qu'ils constituent la première cause de démence chez la femme âgée. Le risque est significatif (Hazard Ratio (HR) 2,34 (1,11-4,94)) uniquement dans le groupe de femmes âgées de soixante-dix à soixante-dix-neuf ans et qui reçoivent pour la première fois un traitement. C'est une situation de prévention plutôt secondaire où les artères sont déjà lésées et un traitement est entrepris pour la première fois (risque significatif de 1,98 (1,13-3,47) chez les femmes précédemment non traitées et non significatif chez les femmes précédemment traitées).

La dose de Prempro[®] utilisée dans cette étude est considérée comme une dose élevée pour des femmes de cet âge. Tous ces éléments suggèrent qu'il ne faut pas traiter les femmes qui présentent des facteurs de risque, et qu'encore une fois ceux-ci augmentent avec l'âge. Il n'est donc certainement pas similaire de traiter une femme de 50 ans ou une femme de 63 ans en moyenne comme dans la WHI.

3 | Les leçons des grandes études d'intervention et des autres études contrôlées

3.1 Heart and Estrogen/Progestin Study (HERS and HERS II) (2002)

L'étude HERS, publiée en 1998, est la première grande étude qui a fait entrer le traitement hormonal dans le XXI^e siècle. Il s'agit d'une étude d'intervention (randomisée contre placebo), en prévention secondaire chez des femmes de 63 ans d'âge moyen et qui ont eu précédemment un accident coronarien documenté.

	WHI E+P	E	HERS	Observation
Cancer du sein	1,26	0,77	1,30	1,15-1,53
Cancer du côlon	0,63	1,08		0,66
Fracture du col	0,66	0,61	1,10	0,75
AVC	1,41	1,39	1,2	1,45
E pulmonaire	2,13	1,34	2,8	2,1
Accident cardiovasculaire	1,29	0,91	0,99	0,61

Tableau 2.1-1

Résultats cliniques des études HERS, WHI et des études d'observation (risque relatif).

Cette étude analyse l'effet du THS sur le risque cardiovasculaire, en prévention secondaire, pendant quatre ans avec un traitement continu par Premarin 0,625 mg associé à 2,5 mg de MPA (Prempro®). Les résultats montrent une augmentation du risque veineux thrombo-embolique, de chirurgie biliaire (augmentation de 50 %), et une non-protection contre la récurrence des accidents coronariens, ainsi qu'une augmentation non significative du risque de cancer du sein. Compte tenu de la survenue des accidents cardiovasculaires la première année de traitement, l'étude a été prolongée de 2,7 ans en ouvert chez des volontaires. Les résultats en sont les mêmes avec une absence de protection contre les accidents cardiovasculaires (risque relatif (RR : 0,99)) sur une période d'observation de plus de six ans au total.

Récemment Herrington a étudié la population de cette étude et montré un polymorphisme des récepteurs œstrogéniques ER alpha, et ses résultats indiquent que les patientes ayant la plus grande réponse en termes d'élévation des HDL sont celles qui ont eu plus de récurrences d'accidents coronariens. Ces faits suggèrent donc qu'il n'est pas possible de généraliser les résultats de cette étude à l'ensemble de la population ménopausée, du fait de la susceptibilité particulière de certains individus porteurs de ces variantes.

3.2 L'étude WHI

L'étude WHI (Women's Health Initiative) reste à ce jour la plus grande étude d'intervention en prévention primaire (4,5) puisque les résultats publiés en 2002, ont porté sur 16 608 femmes de 50 à 79 ans qui ont pris soit un placebo (n = 8 102), soit le Prempro^R (n = 8 506). L'étude a été conduite dans quarante centres, aux États-Unis, de manière randomisée et contrôlée contre placebo, à partir de 1993. Cette étude a montré globalement que ce traitement est associé à une augmentation significative du risque coronarien, du risque d'AVC, et de maladie thrombo-embolique, dans la population étudiée. Cette étude est associée aussi, et surtout, à une augmentation du risque de cancer du sein, notamment de cancers plus évolutifs. Par ailleurs, il a été constaté une diminution significative du risque de fracture, et de cancer du côlon.

Ainsi pour 10 000 années-femmes existe-t-il :

- une augmentation de 26 % du risque de cancer du sein invasif ;
- une augmentation de 29 % du risque d'accidents coronariens (IM essentiellement) ;
- une augmentation de 41 % du risque d'AVC ;
- un doublement du risque de maladie thrombo-embolique ;
- une augmentation de 22 % du risque d'accident cardiovasculaire quel qu'il soit ;
- une diminution de 37 % du risque de cancer du côlon ;
- une diminution de 33 % du risque de fractures du col du fémur et de 24 % de toutes les autres fractures.

Ces chiffres représentent pour 10 000 femmes traitées pendant un an : un excès de sept cas d'infarctus du myocarde, huit AVC, huit cancers invasifs du sein, et huit embolies pulmonaires. Avec, du côté des avantages, pour le même nombre d'années femmes : six cancers du colon et cinq fractures du col de moins par rapport aux femmes non traitées.

D'autres résultats publiés plus tard en mars 2003, ont suggéré l'absence d'effets du traitement sur la qualité de vie, le déclin cognitif, les symptômes de dépression, et la satisfaction sexuelle, tandis que des effets positifs étaient démontrés sur les troubles vasomoteurs, les troubles urogénitaux et le sommeil dans le sous-groupe de femmes symptomatiques à l'entrée dans l'essai. Ces résultats n'étaient pas étonnants, dans la mesure où la population sélectionnée pour

l'étude n'était pas symptomatique et ce, dans le but d'éviter un grand nombre de sorties d'études du groupe placebo si les femmes symptomatiques étaient incluses. On peut s'interroger néanmoins sur la validité du contrôle de l'étude, certes proposée à des femmes pauci symptomatiques, mais capables d'avoir des hémorragies sous traitement hormonal !

Il a été aussi démontré dans cette étude que le risque de cancer du sein augmentait avec la durée de celui-ci, et revenait au niveau des contrôles dans les années qui suivent son interruption. L'étude a été interrompue cinq ans après son initiation à cause de l'augmentation des risques liés au traitement et précisément celui de cancer du sein, lequel, nous le verrons, ne concernait que les femmes déjà traitées avant leur entrée dans l'étude, et ceci en l'absence de bénéfice cardiovasculaire. La même étude a montré que le traitement associant œstrogène et progestatif est responsable d'une augmentation de la densité mammaire gênant la lecture de la mammographie, de cancers plus volumineux, et plus souvent associé à des adénopathies que le placebo. Enfin, le risque d'avoir une mammographie anormale pendant la durée de l'étude chez les femmes traitées était de 10 %.

Fait capital, les résultats concernant le bras œstrogène seul, récemment publiés, portant sur une population de 10 739 femmes de cinquante à soixante-dix-neuf ans qui ont reçu soit un placebo, soit 0,625 mg d'œstrogènes conjugués équins montrent une absence, voire une diminution de risque de cancer du sein attribuée à l'absence d'un effet amplificateur théorique du progestatif. En revanche, l'étude a été interrompue par le NIH (et non par le comité de surveillance, le « Data Safety Monitoring Board ») en raison d'un risque accru d'accident vasculaire cérébral (RR 1,39, avec un intervalle de confiance 1,10-1,77). Ceci représente douze accidents vasculaires cérébraux pour 10 000 personnes-années. Cette étude, à la différence du bras recevant un progestatif ne montre pas d'augmentation du risque cardiovasculaire (RR 0,91, 0,75-1,12).

Malgré les questions qu'elle soulève, l'étude WHI a véritablement constitué le tournant du traitement de la ménopause. Sa taille, son coût proche de 1 milliard de dollars américains, son design d'étude d'intervention, son analyse indépendante par un Data Safety Monitoring Board, imposent le respect. Toutefois ses résultats ont soulevé un tollé de critiques dans la littérature relatives à la sélection de la population, faisant considérer l'étude comme prévention secondaire plutôt que primaire, et du fait des résultats des études de sous-groupes moins défavorables dans le groupe de femmes plus jeunes. Surtout, l'extrapolation des résultats obtenus avec une association donnée à tous les traitements œstroprogestatifs n'a pas tenu compte des différences pharmacologiques fondamentales des molécules utilisées. Par ailleurs, la généralisation des résultats à toutes les populations malgré les facteurs de risque différents d'un continent à l'autre a posé problème à certains scientifiques et praticiens. Aucune classe thérapeutique

n'a connu un tel phénomène d'extrapolation des effets secondaires obtenus avec une molécule donnée à l'ensemble de la classe thérapeutique. De plus, le caractère contrôlé contre placebo est aussi l'objet de critiques pour les raisons déjà explicitées.

En effet, des particularités sont à remarquer, et certaines d'entre elles sont gênantes pour conclure. La moyenne d'âge est élevée à 63 ans, avec 70 % de femmes âgées de plus de 60 ans, donc à plus haut risque d'accident vasculaire ou de cancer du sein. Beaucoup de femmes avaient un surpoids (34 % avaient un IMC (indice de masse corporelle) > 30). Un fort pourcentage d'entre elles (34 %) recevaient un traitement d'HTA. Surtout, beaucoup de femmes avaient déjà été traitées pendant près de cinq à dix ans avant leur inclusion dans l'étude. Ainsi le risque relatif de cancer du sein ramené à cinq ans de traitement est en fait de 1,09. Une autre anomalie de cette étude est le fait que 40,5 % des femmes traitées, et 6,8 % des femmes sous placebo ne l'ont pas été selon une procédure aveugle classique. De plus, 3,5 % des participantes ont été perdues de vue. Enfin les données cognitives et de qualité de vie sont difficiles à interpréter, les unes parce qu'elles s'adressent à une population pauci symptomatique, les autres (WHIMS) parce qu'elles proviennent d'études faites chez des femmes âgées à risque d'AVC, qui dans cette population constitue le risque principal de déclin cognitif.

3.3 Les études EPAT et WELL-HART

Malgré ces résultats, deux études également d'intervention, montrent que, chez des femmes aux artères saines, un effet protecteur vasculaire peut-être observé : les études EPAT et WELL-HART (Hodis *et al.*, 2001 ; Hodis *et al.*, 2003). Ces deux études randomisées contre placebo conduites par Howard Hodis sont très intéressantes :

- l'étude EPAT (Estrogen in the Prevention of Atherosclerosis) a évalué de manière randomisée contre placebo l'impact d'un traitement par 1 mg par jour de 17- β -œstradiol donné pendant deux ans, par voie orale, chez des femmes sans maladie vasculaire connue, sur l'épaisseur intima-media carotidienne. Les résultats montrent une progression inférieure dans le groupe traité par le 17- β -œstradiol par rapport au groupe placebo (0,0017 mm/an contre 0,0036 mm/an chez les contrôles ($p < 0,046$). De manière intéressante, l'effet de l'œstradiol n'est plus visible en cas de prise de statine, la progression étant ralentie de manière identique dans les deux groupes :
- l'étude HART-WELL est globalement la même étude, mais en prévention secondaire : 226 femmes ménopausées avec une sténose coronarienne

(moyenne de 63,5 ans) ont reçu soit 1 mg de 17- β -œstradiol, soit un traitement séquentiel par 17- β -œstradiol et MPA, soit un placebo. Toutes les participantes ont un taux de LDLc similaire < 1,30 g/L sous traitement. L'étude, qui a duré 3,3 ans, a montré que le pourcentage de sténose évalué par deux angiographies était similaire quel que soit le traitement ou en son absence.

Ces résultats complètent ceux de l'étude EPAT, et confirment que les œstrogènes ont bien un effet de protection contre l'athérosclérose débutante chez les femmes aux artères quasiment saines, alors que ce traitement n'a pas d'effet sur l'athérome constitué, voire, comme le suggère la WHI, un effet délétère compte tenu de l'effet pro-inflammatoire, thrombotique, et/ou sur la protéolyse de la plaque.

3.4 L'étude « The Million Women Study » (MWS)

L'étude « The Million Women Study » (MWS) (Beral *et al.*, 1997) est une étude considérable, **observationnelle**, de bien moindre valeur démonstrative que la WHI. Il s'agit d'une étude portant sur 1 084 110 femmes, âgées de 50 à 64 ans, recrutées entre 1996 et 2001. Les femmes ont pris différents types de traitement hormonal : œstrogènes conjugués, MPA, 17- β -œstradiol, Tibolone et différents progestatifs. Il a été observé 9 364 cancers invasifs du sein après une moyenne de surveillance de 2,6 ans, et 637 décès par cancer du sein après 4,1 ans de suivi. Le risque relatif de cancer du sein lié au traitement (tous traitements confondus) est de 1,66 (IC 95 % : 1,58-1,75), et le risque d'en mourir de 1,22. Dans cette étude également, le risque disparaît à l'arrêt du traitement, suggérant une fois de plus un rôle promoteur des œstrogènes, et non pas un effet inducteur. Il existe aussi une forte différence fonction de la **nature** du traitement : le traitement par œstrogène seul, et c'est là une différence importante avec la WHI, est associé avec un risque relatif de 1,30 et la combinaison œstrogène et progestatif à un risque relatif de 2,0. Les risques sont partagés par tous les œstrogènes transdermiques, implantés ou oraux, et le risque est encore accru par l'addition d'un progestatif, quel qu'il soit, et quelle que soit la modalité d'administration : continue ou séquentielle. Ainsi, le traitement par les œstrogènes seuls générerait cinq cancers de plus chez 1 000 femmes traitées pendant dix ans et dix-neuf cancers de plus si un progestatif est associé aux œstrogènes. De plus, il existe sous traitement associant œstrogène et progestatif un risque plus élevé de cancer grave et de formes mettant en jeu le pronostic vital. Il existe ainsi une différence très importante avec les résultats de la WHI, qui ne montre aucun effet du traitement sur l'incidence du cancer du sein avant cinq ans de traitement. En revanche, l'impact délétère du traitement progestatif est également suggéré par cette étude comme par le bras œstrogène seul de la WHI. Toutefois, cette étude a aussi soulevé des controverses, du fait des biais de sélection inhérents à son

caractère d'observation et d'inclusion de femmes à plus haut risque dans une étude de dépistage. Par ailleurs, l'apparition du risque très rapidement après le début de l'étude et son retour au niveau de la population non traitée, à l'arrêt du traitement, suggèrent fortement la détection de cancers pré-existants et non dépistés à l'entrée dans l'étude, ce qui rend difficile toute conclusion sur la part de responsabilité de tel ou tel traitement sur l'augmentation du risque. Très récemment, les mêmes auteurs ont rapporté une augmentation du risque de cancer de l'ovaire chez les utilisatrices de traitement hormonal (incidence de 2,6 pour 1 000 contre 2,2 chez les contrôles (Béral, 2007). Ces données qui suggèrent la responsabilité du traitement dans un décès sur 3 300 utilisatrices, et dont le risque rejoint la population contrôle à l'arrêt du traitement, mérite confirmation.

3.5 L'étude ESTHER

Le risque veineux, longtemps méconnu avec le traitement de la ménopause, est clairement élevé, presque autant qu'avec la contraception orale, encore que les thrombophilies ont été généralement reconnues avant l'âge de la ménopause et exclues du traitement. Il apparaît que le traitement œstrogénique par voie orale représente le risque le plus significatif au regard de l'étude ESTHER (Scarabin *et al.*, 2003 ; Canonico *et al.*, 2007), étude d'observation, où le risque de récurrence de thrombose veineuse est voisin de 1 (0,90) pour la voie transdermique, et atteint 3,5 pour la voie orale. Ceci reflète l'impact hépatique des œstrogènes administrés par la voie orale, même s'il n'est pas aisé de le reconnaître par l'étude des facteurs de coagulation. La voie transdermique serait donc préférable, mais faute d'étude utilisant une méthodologie fondée sur les preuves, on ne peut à ce jour conclure à la totale innocuité thrombo-embolique de la voie transdermique. Une telle étude est en cours et devrait apporter la réponse définitive à ce problème dans les années à venir.

3.6 L'étude E3N-EPIC

Cette étude de cohorte, réalisée en France sous la direction de Françoise Clavel-Chapelon, et publiée en 2005 (Fournier *et al.*, 2005, Fournier *et al.*, 2007) a évalué l'augmentation du risque de cancer du sein dans une cohorte de 70 000 femmes de 52,8 ans traitées pendant 5,8 ans en moyenne et suivies en moyenne 7,7 ans.

L'augmentation du risque de cancer du sein est globalement similaire (risque relatif : 1,2-1,4) à ce qui a déjà été publié. Il est également élevé, mais moins chez les femmes traitées par œstrogènes seuls (risque relatif de 1,4) et beaucoup plus bas, voisin de zéro (risque relatif de 1), chez les femmes traitées par l'association œstrogènes et progestérone naturelle micronisée, contre 1,8 lorsqu'un

progestatif de synthèse y est associé. Dans cette étude, non contrôlée, c'est-à-dire avec un niveau de preuve inférieur à celui des études randomisées contre placebo, les résultats montrent un nombre de cancer de 1 900.

Les conclusions les plus intéressantes de cette grande étude sont :

- les progestatifs de synthèse augmentent de 30 à 50 % le risque de cancer du sein, alors que la progestérone micronisée ne l'augmente pas ;
- le risque de cancer du sein n'apparaît pas lié à la durée chez les 33 % de femmes qui ont utilisé des œstrogènes transdermiques.

Il ne s'agit « que d'une étude de cohorte » qui ne peut donc pas avoir le même impact que les études menées de manière randomisées, contre placebo. Une confirmation de ces résultats est donc absolument nécessaire.

3.7 La mortalité et le traitement hormonal de la ménopause

Dans une méta-analyse récente, Salpeter *et al.*, ont analysé la mortalité inhérente au traitement de la ménopause à partir de 4 993 articles (Salpeter *et al.*, 2004), et à partir de trente études randomisées et contrôlées, comprenant 26 708 femmes ménopausées (d'âge moyen de 62,2 ans dans le groupe traité et 63,4 ans dans le groupe contrôle), traitées pendant 4,5 ans en moyenne. Les résultats montrent un risque très faible de mortalité (Odd Ratio (OR) 0,98). 518 décès ont été observés dans le groupe traité contre 501 dans le groupe contrôle. Pour tous les âges, le traitement n'a eu aucun effet significatif sur la mortalité par pathologie cardiovasculaire ou par cancer, mais semble avoir diminué la mortalité d'autre origine. La conclusion majeure de ce travail est que le traitement hormonal de la ménopause diminue la mortalité des femmes de moins de 60 ans (OR 0,61, IC 0,39-0,95), et n'a aucun effet sur celle des femmes de plus de 60 ans (OR 1,03, IC 0,90-1,18). Dans cette analyse, il n'existe aucune différence en fonction du type de traitement. Là encore, une différence fondamentale est retrouvée selon l'âge des patientes lors de l'initiation des traitements hormonaux et ce à l'instar des résultats de la WHI et de EPAT.

3.8 Les dernières données de 2006 et 2007

(Chen *et al.*, 2006 ; Hsia *et al.*, 2006 ; Grodstein *et al.*, 2006 ; Stefanick *et al.*, 2006 ; Rossouw *et al.*, 2007)

Elles concernent à la fois l'impact du traitement sur le risque cardiovasculaire et sur le risque de cancer du sein. Les résultats sont globalement rassurants.

L'augmentation du risque cardiovasculaire, qui avait fait grand bruit lors de la publication initiale, n'est pas confirmée chez les femmes traitées tôt après la ménopause. Chez ces femmes on ne sait pas si cette protection peut perdurer au-delà de 60 ans.

À la surprise générale, les auteurs de la WHI ont publié le 13 février 2006 (Hsia *et al.*, 2006) une analyse de sous-groupes réévaluant le risque cardiovasculaire chez les participantes de l'étude Estrogène seul (ERT). En 2007, Jacques Rossouw a complété cette analyse avec une évaluation du moment de début du traitement (Rossouw *et al.*, 2007). Il ressort clairement de ces analyses, même si la significativité des résultats n'est pas atteinte, que, comme cela avait été montré dans les études ouvertes, et, dans les études chez le primate.

Ces résultats viennent aussi d'être confirmés par la dernière analyse de la Nurses' Health Study (Grodstein *et al.*, 2006), où le traitement proposé dès l'âge de la ménopause est associé à une réduction significative du risque de maladie cardiovasculaire aussi bien dans le groupe œstrogène seul (RR 0,66, IC 0,54-0,80) que dans le groupe E+P (RR 0,72 IC 0,56-0,92). En réalité, dans cette étude, le traitement hormonal n'est pas associé à une augmentation du risque cardiovasculaire, pourvu qu'il soit initié dans les dix ans qui suivent l'initiation de la ménopause! Ainsi, les œstrogènes, associés ou non à un progestatif, sont protecteurs dans la tranche d'âge 50-59 ans avec une réduction du risque d'environ 40 % (RR 0,63 IC 0,36-1,08), et surtout avec une diminution très significative du risque cardiovasculaire (0,66 IC 0,44-0,97) pour une analyse composite prenant en compte les accidents cardiovasculaires et le nombre de revascularisations coronaires.

Ainsi, tout le bruit fait autour du risque cardiovasculaire accru est fondé sur une analyse imparfaite, reposant sur une étude comprenant surtout des femmes de plus de 63 ans, porteuses de facteurs de risque.

On s'interroge pour comprendre pourquoi ces ré-analyses n'ont pas été faites plus tôt... Curieusement la presse francophone ne s'est pas promptement manifestée après la publication de ces résultats bouleversants.

De même, la ré-analyse du risque de cancer du sein dans le groupe œstrogène seul de la WHI, chez des femmes hystérectomisées, a été publiée le 12 avril 2006 (Stefanick *et al.*, 2006). Cette étude montre que, même si le traitement a nécessité une surveillance mammographique plus rapprochée, il n'existait pas de surrisque de cancer du sein dans ce groupe de femmes jusqu'à 7,1 ans de traitement (RR 0,80, IC 0,62-1,04).

Ces résultats sont à associer à ceux récemment publiés de la Nurses' Health Study (Chen *et al.*, 2006) qui suggèrent que, chez les femmes traitées par

œstrogènes (n = 28 835) seuls, le risque de cancer du sein (essentiellement des cancers hormonodépendants) ne devient significatif qu'au-delà de quinze ans de traitement : le RR de cancer est de 0,96 pour moins de cinq ans de traitement (IC 1,05-1,22), 0,90 pour 5 à 9,9 ans de traitement (0,73-1,12), et 1,06 pour 10 à 14,9 ans de traitement (0,87-1,30) 1,18 pour plus de quinze ans de traitement (0,95-1,48) et 1,42 pour plus de vingt ans (1,13-1,77). De plus, le risque de cancer du sein est observé surtout chez les femmes minces.

Ainsi :

- les œstrogènes peuvent augmenter le risque d'accident vasculaire, probablement chez les femmes plus âgées ou porteuses de facteurs de risque. Le mécanisme des accidents est complexe, dépendant de la dose mais aussi peut-être de la voie d'administration, la voie orale augmentant de manière dose-dépendante le risque thrombotique veineux, mais aussi, peut-être artériel, lorsque les flux artériels sont réduits par des plaques obstructives. Encore que les résultats de la WHI qui confirment l'effet bénéfique du traitement sur le risque artériel, notamment coronaire, sont observés avec un traitement par voie orale. De plus, l'élément fondamental, à l'origine des accidents vasculaires, est la rupture de la plaque, qui se fait par des enzymes spécialisées, des métalloprotéases dont l'activité est accrue par les œstrogènes, indépendamment de leur voie d'administration ;
- le risque cardiovasculaire constitue la cause de décès d'une femme sur deux, contre une femme sur vingt pour le cancer du sein.

Une synthèse de toutes les études ?

Aujourd'hui, il est donc possible de prendre du recul vis-à-vis de cette avalanche de résultats, pour tirer des conclusions qui apparaissent assez claires, et somme toute rassurantes :

- en premier lieu, il est toujours approprié de proposer un traitement aux femmes de plus de 50 ans, donc récemment ménopausées, qui présentent des symptômes du climatère susceptibles d'altérer leur qualité de vie. Il n'en va pas de même pour les femmes de plus de 60 ans chez qui le traitement doit être évité ou proposé de manière limitée dans un contexte bien défini, par un médecin au fait du dossier individuel de la femme ;
- en second lieu, les discussions qui ont suivi la publication des grandes études d'intervention comme les études HERS I et II, et bien sûr la WHI (Women's Health Initiative), sont bien entendu très importantes, mais aussi et surtout salutaires, car elles ont permis de mieux sécuriser l'administration du traitement. Leur interprétation alarmiste, notamment initiale, doit

être maintenant nuancée et nous ne devons traiter que les femmes symptomatiques, qui le demandent, et qui sont dépourvues de facteurs de risque personnel de maladies cardiovasculaires ou de cancer du sein.

Il n'en reste pas moins que les résultats des grandes études, notamment aux États-Unis, laissent planer un doute sur l'avenir des traitements de la ménopause, à ce jour plusieurs milliers de plaintes ont déjà été déposées...

4 | L'os après la ménopause

Le 17- β -œstradiol est le régulateur essentiel du métabolisme osseux, chez l'homme comme chez la femme, et l'administration d'œstrogènes est logique dans une maladie appelée « ostéoporose post-ménopausique ».

4.1 Les faits

4.1.1 Effets sur la densité osseuse

Plus de 300 études ont été publiées sur l'effet osseux du THS, et selon une méta-analyse récente, les patientes traitées ont en moyenne après deux ans une densité supérieure de 6,5 % au rachis et 4 % au col du fémur par rapport aux femmes non traitées. La voie d'administration orale ou cutanée ou nasale n'intervient pas dans cet effet densitométrique. En dehors de l'acétate de noréthistérone, il n'y a pas de preuve d'effet osseux des progestatifs associés. Les déterminants essentiels de la réponse sont l'âge et la dose d'œstrogènes. Chez les femmes les plus jeunes, le bénéfice densitométrique des œstrogènes est le plus faible, sans doute du fait d'un remodelage osseux initial élevé. L'effet-dose et son interprétation sont importants à prendre en considération dans le contexte actuel. La seule étude ayant démontré un effet anti-fracturaire est WHI, donc une dose de 0,625 mg d'œstrogène. Si on admet, compte tenu de leur équivalence d'effet densitométrique, que cette dose correspond à 1 à 2 mg de 17- β -œstradiol par voie orale, 50 μ g de 17- β -œstradiol transdermique, et 1,5 mg de 17- β -œstradiol en gel, on peut douter de l'effet anti-fracturaire des doses faibles d'œstrogène. La seule étude épidémiologique ayant d'ailleurs considéré ce point n'a pas retrouvé d'effet protecteur contre la fracture de l'extrémité supérieure du fémur pour des doses inférieures aux doses recommandées. En moyenne, les femmes recevant des doses faibles (par exemple 25 μ g/j en patch) n'ont pas de perte osseuse, mais compte tenu de l'écart des valeurs individuelles, la proportion de femmes perdant de l'os sous traitement, en particulier au fémur, augmente avec la diminution de la dose.

4.1.2 Effets sur les fractures

L'étude WHI a démontré, et avec un ordre de grandeur comparable, ce que de nombreuses études épidémiologiques avaient observé : l'effet anti-fracturaire du traitement hormonal substitutif. La réduction globale du risque est de 24 % (RR = 0,76 (0,69-0,83)) et la réduction du risque de fracture de l'extrémité supérieure du fémur est de 33 %.

Quatre points méritent d'être soulignés :

- le risque fracturaire des femmes de l'étude WHI est faible (T score moyen - 1,3 au rachis) ;
- dans le sous-groupe des 5 400 femmes âgées de 50 à 59 ans, il a été démontré un effet anti-fracturaire contre les tassements vertébraux cliniques. Il n'a pas été démontré dans ce groupe d'effet significatif pour les autres fractures, peut-être du fait d'un manque de puissance ;
- dans la deuxième partie de l'étude WHI, l'effet protecteur des œstrogènes seuls a été démontré (RR = 0,70 (0,63-0,79)) ;
- il n'existe pas d'effet rémanent du THS, ni sur le plan densitométrique, ni sur le plan anti-fracturaire. Ce point est bien sûr essentiel dans la stratégie thérapeutique.

4.2 Discussion

De manière cohérente avec les données physiologiques, les données cliniques confirment l'effet anti-fracturaire du traitement hormonal substitutif, aux doses classiques. Il n'y a pas d'effet rémanent.

Il existe d'autres traitements anti-ostéoporotiques, ayant démontré un effet anti-fracturaire : le raloxifène réduit le risque de fracture vertébrale de 30 à 50 %, mais n'a pas d'effet sur le risque de fractures périphériques ; les bisphosphonates réduisent le risque de fractures vertébrale et périphérique de 30 à 50 % ; la parathormone (tériparatide), réservée aux femmes ostéoporotiques fracturées, réduit le risque de fracture vertébrale de 50 à 60 % ; le ranélate de strontium réduit le risque de fracture vertébrale de 50 %, et le risque de fracture périphérique de 15 %. Au-delà de ces données d'efficacité, le recul sur ces différents traitements augmente, et en particulier des données publiées existent pour les bisphosphonates à sept et dix ans. Ces données ne permettent pas d'affirmer l'efficacité prolongée de ces traitements compte tenu de leur méthodologie, mais permettent de penser que le risque de toxicité osseuse est minime voire

nul. Ces données permettent de penser qu'il n'est pas dangereux de prescrire un bisphosphonate à une femme de cinquante ans.

La décision thérapeutique dans le domaine de l'ostéoporose repose sur une évaluation multifactorielle du risque de fracture, qui dépend de l'âge, de la densité osseuse, des antécédents personnels et maternels de fracture, et d'autres facteurs de risque, en particulier le poids et le risque de chute. Chez les femmes à haut risque de fracture, le THS vient en deuxième intention après les autres traitements anti-ostéoporotiques, si on admet que sa balance bénéfices/risques est défavorable. En situation de prévention primaire, lorsque le THS est administré en raison de troubles climatériques, on peut considérer la protection osseuse assurée si les doses classiques sont suivies. En cas d'administration de doses inférieures aux doses recommandées, les données montrent que l'effet bénéfique sur les troubles climatériques ne permet pas d'assurer un effet bénéfique osseux. Dans cette hypothèse, un suivi densitométrique des patientes devrait alors être mis en route.

5 | Le bon choix

Le seul traitement efficace des manifestations de la ménopause à ce jour reste le traitement hormonal. Associant un œstrogène oral ou transdermique à un traitement par la progestérone chez les femmes non hystérectomisées, il réduit les symptômes du climatère, améliore la qualité de vie et protège (temporairement) contre la diminution de la masse osseuse.

Ces effets bénéfiques sont contrastés par une augmentation du risque de cancer du sein et éventuellement d'accident cardiovasculaire, première cause de mortalité chez la femme de plus de 50 ans. Ces deux maladies augmentent de manière significative avec l'âge et dépendent aussi de facteurs de risques individuels. Le risque cardiovasculaire, en dehors de cas particuliers, n'est significatif qu'au-delà de 60-65 ans.

Les candidates au traitement : le traitement hormonal peut-être proposé aux femmes symptomatiques qui ne présentent pas de facteurs de risque.

- Informer les femmes : il est maintenant clairement accepté qu'une fois cette sélection faite, les femmes peuvent être traitées, mais uniquement dans le cadre d'un partenariat avec leur médecin, après une information aussi complète que possible sur le rapport bénéfice-risque de ce traitement. Cette information devra si possible bénéficier d'un support écrit.

- Le traitement ne doit être proposé qu'aux femmes **demandeuses** de le prendre, après les avoir informées :
 - du risque de cancer du sein spontané ;
 - du discret surrisque lié au traitement ;
 - de l'absence d'effet protecteur sur le risque cardiovasculaire, surtout chez les femmes de plus de 60 ans ou qui présentent des facteurs de risque ;
 - de l'absence d'effet protecteur démontré sur la peau et l'état cognitif.

En un mot, il faut prévenir la femme que le traitement hormonal n'est pas un traitement antivieillessement mais un traitement des symptômes et un traitement de l'ostéoporose (au moins aussi longtemps qu'il est pris).

- Le traitement doit être individualisé et le rapport bénéfice risque doit être évalué soigneusement chez chaque femme qui souhaite un traitement.
- Les femmes qui n'ont pas de risque particulier peuvent être traitées si elles présentent des symptômes, et si elles le souhaitent, dès l'âge de 50 ans. La durée du traitement n'est pas encore validée. Elle prend en compte le risque de cancer du sein. Au-delà de cinq à sept ans, le traitement est possible, mais doit être décidé en fonction des risques individuels et en concertation avec la patiente.
- Les femmes à risque : il en va différemment chez les femmes qui ont plus de 65 ans et/ou qui ont des facteurs de risque. Le traitement ne peut-être proposé qu'après avoir recherché soigneusement les contre-indications veineuses et métaboliques, et dépisté soigneusement les facteurs de risque cardiovasculaires que nous avons décrits précédemment. L'existence de l'un ou de plusieurs de ces facteurs doit conduire à des examens cardiovasculaires approfondis et le traitement sera discuté au cas par cas.
- Quand débiter le traitement : le traitement doit débiter dès que la ménopause est identifiée et confirmée, c'est-à-dire chez des femmes de 51 ans en moyenne, et pas avant que la ménopause soit installée. Les traitements doivent être commencés tôt après la cessation de la fonction ovarienne, pour éviter la formation des plaques d'athérome qui apparaissent chez la femme après 50 ans et sont susceptibles d'être déstabilisées par les œstrogènes. Si l'on considère que dans la WHI le traitement a été initié après l'âge de 63 ans en moyenne, alors l'augmentation du risque cardiovasculaire n'est pas surprenante.
- Combien de temps peut-il durer ? La durée du traitement doit être minimale, tant que les symptômes du climatère persistent. L'étude WHI a

montré une absence d'augmentation du risque de cancer du sein jusqu'à 5-7 ans de traitement, et même plus dans le groupe de femmes précédemment hystérectomisées. Cette information est toujours sujette à caution et mérite confirmation. Dans l'état actuel des connaissances, les symptômes doivent guider le traitement et sa durée.

- Le rapport bénéfice-risque doit être réévalué chaque année, et les femmes doivent se soumettre à des contrôles réguliers : mammographie tous les 18 mois en l'absence d'anomalies, surveillance annuelle de l'endomètre et de son épaisseur par échographie, surveillance du poids, de la pression artérielle. . .
- Le traitement hormonal doit toujours être associé à une bonne hygiène de vie avec arrêt du tabac, exercice physique, diététique adaptée, et correction du surpoids et de tous les facteurs de risque. Des études animales montrent que, dans certaines espèces comme chez le rongeur, une réduction des apports alimentaires augmente la durée de la vie, et retardera peut-être même l'âge de la ménopause.

6 | Les cas particuliers

- La ménopause précoce. Le traitement de remplacement hormonal est indispensable chez les femmes ovariectomisées jeunes ou présentant une ménopause précoce, c'est-à-dire avant l'âge de quarante ans. Le rapport bénéfice-risque est clairement en faveur du traitement. Les risques discutés précédemment n'apparaîtront qu'après cinquante ans comme chez les autres femmes.
- Les femmes qui ont eu une hystérectomie ne doivent pas recevoir de traitement progestatif.
- Les femmes après 60 ans. Les doses minimales efficaces doivent être utilisées chez toutes les femmes, mais si la femme traitée a plus de 60 ans, le traitement doit être justifié, et la dose doit être de toute façon réduite.
- Que penser de la voie percutanée? Elle est probablement préférable à la voie orale car elle diminue le risque veineux, qui est rappelons-le un risque rare. Les doses faibles d'œstrogènes par voie orale n'ont pas encore été évaluées et il est possible qu'elles soient associées à un risque veineux acceptable, notamment si elles ne sont pas associées à un progestatif de synthèse (Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer, 1997). Le risque artériel est bien sûr le plus important. Il est lié à la prise d'œstrogènes et est en partie ou en totalité indépendant de la voie d'administration. Certains marqueurs sanguins du risque cardiovasculaire

comme la CRP (C-reactive protein) sont corrélés au risque cardiovasculaire. Ils ont un taux élevé dans les traitements par voie orale et normal dans les traitements par voie percutanée. Leur signification est inconnue.

- Les autres molécules. D'autres molécules comme la tibolone sont très efficaces sur les symptômes. On attend la publication des résultats des grandes études contrôlées en cours sur la thrombose veineuse, l'endomètre (THEBES), sur l'ostéoporose (LIFT) et sur le cancer du sein (LIBERATE).

Recommandations

1. Le traitement ne doit être proposé qu'aux femmes **demandeuses** de le prendre, après les avoir **informées aussi complètement que possible de l'état des connaissances sur les bénéfices et les risques du traitement hormonal**.
2. Le traitement ne peut-être proposé qu'après avoir recherché soigneusement les contre-indications d'ordre thrombo-embolique, mais aussi métabolique, en dépistant soigneusement les facteurs de risque cardiovasculaire comme l'HTA, le diabète, une hyperlipidémie, une intoxication tabagique, un surpoids. . .
3. Le traitement doit débuter dès la ménopause identifiée et confirmée, c'est-à-dire chez des femmes de 51 ans en moyenne.
4. Ces recommandations ne s'appliquent pas aux femmes ovariectomisées jeunes ou présentant une ménopause précoce, chez qui le traitement de remplacement hormonal est indispensable. Compte tenu de leur âge, le rapport bénéfice-risque est clairement en faveur du traitement.
5. Le traitement doit être individualisé, et le rapport bénéfice-risque doit être évalué soigneusement chez chaque femme candidate à un traitement.
6. La durée minimale du traitement est de le proposer tant que perdurent les symptômes du climatère, les agences du médicament sont toujours en retrait et proposent une durée de traitement aussi brève que possible. La durée proposée de 5 ans ne repose que sur le sous-groupe de la WHI qui montre une absence d'augmentation du risque de cancer du sein jusqu'à cinq ans de traitement. Le bras œstrogène seul de la WHI et la Nurse Health Study suggère qu'on puisse étendre ce traitement chez les femmes sans facteurs de risque jusqu'à dix ans sous surveillance attentive. Dans l'état actuel des connaissances, les symptômes et la surveillance doivent guider le traitement et sa durée.

7. Le traitement hormonal doit toujours être associé à une hygiène de vie avec arrêt du tabac, exercice physique, diététique adaptée et correction du surpoids et de tous les facteurs de risque.
8. Le rapport bénéfice-risque doit être réévalué chaque année, et les femmes doivent se soumettre à des contrôles réguliers. Dans l'hypothèse d'une interruption du traitement, il paraît nécessaire de l'interrompre progressivement pour vérifier que la diminution de la dose ne s'accompagne pas d'une récurrence notable des symptômes. À l'échelon individuel, en l'absence de facteurs de risque, et à condition d'une surveillance régulière, le traitement pourrait être poursuivi, toujours dans le cadre d'un partenariat informé.
9. La voie transdermique est probablement supérieure à la voie orale pour le traitement œstrogénique, en raison du risque veineux diminué. Les doses faibles d'œstrogènes par voie orale n'ont pas encore été évaluées, il est possible qu'elles soient associées à un risque veineux acceptable. Récemment d'ailleurs, il a été suggéré que les œstrogènes estérifiés sont responsables d'un risque veineux plus faible que celui des œstrogènes conjugués (OR 0,92 contre 1,65), et donc apparemment similaire aux transdermiques selon des études observationnelles (Smith *et al.*, 2004). Quant au risque artériel, compte tenu des données sur l'effet des œstrogènes sur la protéolyse de la plaque d'athérome *via* la transcription des gènes de métalloprotéases, il apparaît œstrogénodépendant, et en partie ou en totalité indépendant de la voie d'administration.
10. Dans l'état actuel des connaissances, les femmes hystérectomisées ne devraient pas recevoir de traitement progestatif, si l'on considère que le but du traitement progestatif est uniquement de protéger l'endomètre.
11. Chez les femmes **non hystérectomisées**, un traitement par la progestérone doit être proposé, la progestérone micronisée semble préférable, comme le suggère l'étude observationnelle E3N. L'administration cyclique, par voie orale voire locale (vaginale), semble supérieure à l'administration continue, en raison du risque mammaire lié au progestatif. De faibles doses de progestatif n'ont pas été évaluées, ni d'ailleurs l'administration endo-utérine de progestatif probablement intéressante.
12. La durée de traitement indispensable par la progestérone ou un progestatif a été évaluée par de nombreuses études suggérant qu'il est nécessaire de traiter 12 à 14 jours par mois pour protéger l'endomètre. En revanche, d'autres modalités de traitements sont actuellement discutées avec des doses plus faibles, de la progestérone naturelle, des voies non orales et des séquences très espacées. Toutes ces propositions méritent de faire l'objet d'études à long terme.

13. Dans les cas de schémas de traitements où la progestérone n'est administrée que de manière séquentielle, chaque deux ou trois mois, schémas dont la sécurité n'a pas été évaluée, une vérification de l'épaisseur de l'endomètre tous les six mois ou chaque année est indispensable pour vérifier que celle-ci reste en deçà de 5 mm.
14. L'utilisation d'autres molécules comme la Tibolone, très efficace sur les symptômes, devra être réévaluée après la publication des résultats des grandes études contrôlées en cours sur la thrombose veineuse (THEBES), sur l'ostéoporose (LIFT) et sur le cancer du sein (LIBERATE).

Les incertitudes

1. La qualité de vie a été très mal évaluée, notamment dans la WHI. Elle doit prendre en compte, bien sûr, les bouffées de chaleur, mais aussi les troubles urinaires, la statique pelvienne, les troubles de l'humeur et du sommeil, les anomalies de la peau. . . Elles doivent être évaluées individuellement. Des études chez des femmes plus jeunes et symptomatiques sont indispensables.
2. L'ostéoporose est constante chez les femmes ménopausées, les œstrogènes diminuent la résorption osseuse, et préviennent les fractures. Cependant, l'effet préventif n'existe que chez les femmes traitées sur une longue période, probablement au-delà de 60 ans. De ce fait, à moins d'un traitement prolongé, leur utilité pour prévenir les fractures est très faible. Cependant, à ce jour, les traitements alternatifs par les diphosphonates n'ont pas été évalués au-delà de six ans. . . L'existence d'une ostéoporose chez une femme de plus de 50 ans, non symptomatique, n'est pas, en tout cas pour le moment, une indication pour un traitement hormonal en première intention. Cette situation reste très discutée.
3. Le risque d'accident vasculaire cérébral : comme le suggère les résultats de l'étude WHI, le risque d'accident vasculaire cérébral semble accru chez les femmes traitées. Une méta-analyse, publiée en 2005, regroupant 28 études a confirmé cette information (Bath, 2005). Malheureusement le poids de l'étude WHI est très important dans cette méta-analyse, et probablement source de biais, comme cela a été montré dans l'évaluation du risque coronarien. Une étude de cohorte suédoise, chez 16 906 femmes n'a pas confirmé ce risque (Li *et al.*, 2006). Il paraît raisonnable de conclure que les femmes à risque vasculaire ne doivent pas recevoir de traitement, comme nous l'avons déjà suggéré.

Perspectives du traitement de la ménopause

Beaucoup reste à apprendre sur le rapport bénéfice-risque du traitement hormonal de la ménopause :

- le risque de cancer du sein avec un traitement par œstrogènes seuls initié chez des femmes de 50 ans ;
- la confirmation du risque délétère ou non de différents progestatifs sur ce même risque ;
- les effets du traitement par la progestérone ou un progestatif vaginal ou endo-utérin ;
- l'efficacité des statines et de l'aspirine sur le risque cardiovasculaire de femmes apparemment normales, traitées dès la ménopause, en comparaison, ou en association, avec le traitement hormonal ;
- le risque thrombotique de la voie transdermique lors d'études d'intervention, en particulier chez des femmes à risque de thrombose, comme les femmes porteuses de la mutation du Facteur V de Leiden (4-5 % de la population) ;
- les effets cognitifs des œstrogènes dans une population plus jeune et traitée au long cours ;
- le rôle éventuel d'une substitution androgénique, qui, d'après une étude randomisée, paraît utile notamment sur la libido, mais reste très mal évaluée à court et surtout à long terme ;
- une étude soigneuse de la qualité de vie, prenant en compte l'effet sur de multiples paramètres : les bouffées de chaleur, mais aussi le sommeil, l'humeur, les troubles urinaires, tout en sachant que de telles études contre placebo ont déjà indiqué des résultats positifs avec certaines associations thérapeutiques ;
- la biodisponibilité des œstrogènes en fonction de l'âge, et l'impact de doses plus faibles, orales ou transdermiques. L'effet sur la réponse au traitement, ou sur les risques mammaires des traitements en fonction des polymorphismes des récepteurs des œstrogènes, ou des enzymes du métabolisme de ces hormones.

Dans l'attente de ces résultats, il paraît utile de faire preuve de circonspection et de dépister les femmes à risque, le traitement semble bénéfique chez les femmes symptomatiques traitées jeunes et pendant cinq à dix ans sans surrisque de cancer du sein. Dans la mesure où le traitement est individualisé et

la surveillance régulière, il n'y a peut-être pas lieu d'arrêter de façon arbitraire le traitement tant que le rapport bénéfice-risque apparaît favorable chez une femme correctement informée.

Quelles sont les perspectives thérapeutiques ? Il ne paraît pas douteux que les modulateurs sélectifs des récepteurs de l'œstradiol (SERM), vont jouer un rôle majeur dans les années à venir. Ils sont, en effet, capables de protéger certains organes de manière tissu-spécifique, par une modulation du recrutement des corépresseurs et des coactivateurs, et donc une régulation de la transcription de manière tissu-spécifique. Pour le moment, nous disposons soit du tamoxifène, lequel est anti-œstrogène au niveau du sein et du cerveau, œstrogénique ailleurs, notamment au niveau de l'utérus, de l'os et du risque cardiovasculaire, en particulier, veineux. Ce médicament est réservé au traitement du cancer du sein pendant cinq ans. Il est inutilisable dans le traitement de la ménopause, dans la mesure où il induit des bouffées de chaleur. La deuxième génération de SERM est constituée par le raloxifène, composé non stéroïdien, comme le tamoxifène, dont l'effet anti-œstrogène porte à la fois sur le sein, l'utérus, et le cerveau. Il est œstrogénique sur l'os, les veines, avec un risque artériel semble-t-il réduit. Ce traitement intéressant n'est guère utilisable en traitement de ménopause, dans la mesure où il induit des bouffées de chaleur, et où il augmente le risque de thromboses veineuses, comme le tamoxifène. Il est cependant très efficace sur l'ostéoporose, en prévenant notamment le risque de fractures vertébrales, c'est d'ailleurs son indication première dans l'autorisation de mise sur le marché. D'autres SERM sont en évaluation, comme le basodoxifène, l'arzofoxifène et le lysofoxifène, ces SERM sont toujours plus spécifiques. Ils sont ainsi capables de protéger le sein, l'utérus et l'os, avec deux problèmes subsidiaires : les bouffées de chaleur, et le risque veineux. Des essais sont actuellement en cours associant SERM et œstrogène, visant à éviter la genèse des bouffées de chaleur. L'impact veineux de cette association est mal connu à ce jour. Le principe de cette association résulte de l'incapacité probable (à démontrer) de l'œstradiol à dissocier la liaison SERM-récepteur dans le sein et l'utérus, tissus où l'effet anti-œstrogène est recherché. De nouveaux SERM encore plus spécifiques sont en développement préclinique, à tropisme mammaire et utérin exclusifs.

En conclusion, le traitement hormonal de la ménopause a déjà subi quatre tremblements de terre, qui ont, l'un après l'autre, bouleversé les habitudes thérapeutiques, tous grâce aux progrès de la méthodologie des essais cliniques :

- la mise en évidence du risque de cancer de l'endomètre chez des femmes traitées au long cours avec un œstrogène seul en 1975 ;
- la constatation du risque augmenté de maladie thrombo-embolique en 1996 ;

- l'augmentation du risque de cancer du sein avec le traitement : 1995, 1997, 2002 et 2003 ;
- l'absence de bénéfice cardiovasculaire (en prévention secondaire en 1998).

Outre le fait que nous devons nous interroger sur les raisons de nos erreurs d'interprétation des données obtenues par diverses méthodologies (méthodologie inadaptée, biais de sélection des femmes traitées, effet de la bonne santé des femmes entrant dans les études), il est certain que nous ne sommes pas au bout de nos surprises. Il n'en reste pas moins que ce traitement hormonal reste le seul traitement symptomatique efficace, et que de ce fait, en dehors des contre-indications flagrantes, ce traitement peut-être proposé pour une période de plusieurs années. Personne ne peut répondre avec certitude sur la durée acceptable de ce traitement. L'utilisation d'un traitement hormonal en prévention reste à démontrer chez les femmes traitées dès l'apparition de la carence œstrogénique et avec une adaptation individuelle du traitement, à moins qu'un impact sérieux sur la qualité de vie ait été mis en évidence de manière individuelle, et à moins que des résultats probants ne soient mis en évidence dans le domaine du cognitif. Ce n'est pas le cas aujourd'hui. Même si le traitement par œstrogènes seuls, prescrits toujours chez les femmes hystérectomisées, peut sous condition être envisagé chez des femmes non hystérectomisées, chez qui il semble potentiellement attractif, ce traitement pourra être pris en considération seulement lorsqu'une méthodologie adaptée et efficace aura été mise au point pour éviter l'hyperplasie de l'endomètre. La durée classique de traitement progestatif mensuel, de douze jours, mérite d'être réévaluée selon des modes d'administration différents. Le temps est au traitement des symptômes et non à la prévention secondaire. La prévention primaire chez des femmes jeunes reste à démontrer. Il est aussi capital de réaliser de nouvelles études, si un financement peut-être identifié de manière transnationale, et à condition que les femmes restent volontaires pour ce type d'étude, ce qui est incertain en raison de l'impact médiatique des grands essais cliniques, ou des résultats déjà acquis. De manière intéressante, c'est aux États-Unis qu'une nouvelle étude d'intervention utilisant un œstrogène transdermique, ou de faibles doses d'œstradiol oral, associé à la progestérone micronisée pendant cinq ans chez 740 femmes récemment ménopausées va débiter (Étude KEEPS). Le critère principal d'évaluation est le rapport *intima media*. Il est possible que cette étude apporte des informations sur une éventuelle protection artérielle chez des femmes sans facteurs de risque, récemment ménopausées. Enfin, dans tous les cas, la vie après la ménopause impose une meilleure hygiène de vie, une diététique appropriée, un exercice physique régulier, et une correction de tous les facteurs de risque cardiovasculaire. Beaucoup reste encore à faire pour établir le rapport bénéfice-risque du traitement de la ménopause. Les médecins se doivent de rester « *on line* » pour être informés des progrès récents, et surtout de leurs confirmations.

Références bibliographiques

- Bath PMW. et Gray LJ. (2005). Association between hormone replacement therapy and subsequent stroke : a metanalysis. *BMJ*, **21** : 1-4.
- Beral V. and the Million Women Study collaborators (1997). Breast cancer and HRT in the Million Women study. *Lancet*, **362** : 419-427.
- Beral V., Million Women Study collaborators, Bull D., Green J. et Reeves G. (2007). Ovarian cancer and hormone replacement therapy in the Million Women Study. *Lancet*, **369** : 1703-1710.
- Canonico M., Oger E., Plu-Bureau G., Conard J., Meyer G., Lévesque H., Trillot N., Barrellier MT., Wahl D., Emmerich J. et Scarabin PY., Estrogen and Thromboembolism risk (ESTHER) Study Group (2007). Hormone therapy and venous thromboembolism among postmenopausal women : Impact of the route of estrogen administration and progestogens : The ESTHER study. *Circulation*, **115** : 840-845.
- Chen WY., Manson JE., Hankinson SE., Rosner B., Holmes MD., Willett WC., et Colditz GA. (2006). Unopposed estrogen therapy and the risk of invasive breast cancer. *Arch Intern Med*, **166** : 1027-1032.
- Collaborative Group on Hormonal factors in Breast Cancer (1997). Breast cancer and hormone replacement therapy : collaborative reanalysis of data from 51 epidemiological studies of 52705 women with breast cancer and 108411 women without breast cancer. *Lancet*, **350** : 1047-1059.
- Coombs NJ., Taylor R., Wilcken N. et Boyages J. (2005). Hormone Replacement therapy and breast cancer : estimate of risk. *BMJ*, **331** : 347-349.
- Fournier A., Berrino F., Riboli E., Avenel V. et Clavel- Chapelon F. (2005). Breast cancer risk in relation to different type of hormone replacement therapy in the E3N-EPIC cohort. *Int J Cancer*, **114** : 448-454.
- Fournier A., Berrino F. et Clavel-Chapelon F. (2007). Unequal risks for breast cancer associated with different hormone replacement therapies : results from the E3N cohort study. *Breast Cancer Res Treat.*, Epub ahead of print.
- Grodstein F., Manson JE. et Stampfer MJ. (2006). Hormone therapy and coronary heart disease : The role of time since menopause and age at hormone initiation. *Journal of Women's Health*, **15** : 35-44.
- HERS (Heart and Estrogen/Progestin Replacement Study) (2002). Herrington DM., Vittinghoff E., Lin F. *et al.*, for the HERS Study Group. Statin therapy, cardiovascular events and total mortality in the Heart and Estrogen/Progestin Replacement Study (HERS). *Circulation*, **105** : 2962-2967.

- HERS II (Heart and Estrogen/Progestin Replacement Study) (2002). Grady D., Herrington D., Bittner V. *et al.*, for the HERS Research Group. Cardiovascular disease outcomes during 6.8 years of hormone therapy : Heart and Estrogen/progestin Replacement Study follow-up (HERS II). *JAMA*, **288** : 49-57.
- Hodis HN., Mack WJ., Azen SP., Lobo RA., Shoupe D., Mahrer PR., Faxon DP., Cashin-Hemphill L., Sanmarco ME., French WJ., Shook TL., Gaarder TD., Mehra AO., Rabbani R., Sevanian A., Shil AB., Torres M., Vogelbach KH. et Selzer RH. (2003). Women's Estrogen-Progestin Lipid-Lowering Hormone Atherosclerosis Regression Trial Research Group. Hormone therapy and the progression of coronary-artery atherosclerosis in postmenopausal women. *N Engl J Med*, **349** (6) : 535-545.
- Hodis HN., Mack WJ., Lobo RA., Shoupe D., Sevanian A., Mahrer PR., Selzer RH., Liu Cr CR., Liu Ch CH. et Azen SP. (2001). Estrogen in the Prevention of Atherosclerosis Trial Research Group. Estrogen in the prevention of atherosclerosis. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Ann Intern Med*, **135** (11) : 939-953.
- Hsia J., Langer RD., Manson JE., Kuller L., Johnson KC., Hendrix SL., Pettinger M., Heckbert SR., Greep N., Crawford S., Eaton CB., Kostis JB., Caralis P. et Prentice R. (2006). Conjugated equine estrogens and coronary heart disease : the Women's Health Initiative. *Arch Intern Med*, **166** : 357-365.
- Li C., Engstrom G., Hedblad B., Berglund G. et Janzon L. (2006). Risk of stroke and hormone replacement therapy a prospective cohort study. *Maturitas*, **54** : 11-18.
- Mendelsohn ME. et Bkana RH. (1999). The protective effects of estrogen on the cardiovascular system. *N Engl J Med*, **340** : 1801-1811.
- Rossouw JE., Prentice RL., Manson JE., Wu LL., Barad D., Barnabei VM., Ko M., La Croix AZ., Margolis KL. et Stefanick ML. (2007). Postmenopausal Hormone Therapy and risk of cardiovascular disease by age and years since menopause. *JAMA*, **297** : 1465-1477.
- Salpeter SR., Walsh JME., Greyber E., Ormiston TM. et Salpeter EE. (2004). Mortality associated with hormone replacement therapy in younger and older women. *A meta-analysis J Gen Intern Med*, **19** : 791- 804.
- Scarabin PY., Oger E. et Plu-Bureau G. (2003). On behalf of the Estrogen and THrombo Embolism Risk (ESTHER) study group. *Lancet*, **362** : 428-432.
- Smith DC., Prentice R., Thompson DJ. et Herrmann WL. (1975). Association of exogenous estrogen and endometrial carcinoma. *N Engl J Med*. **293** (23) : 1164-1167.

- Smith NL., Heckbert SR., Lemaître RN., Reiner AP., Lumley T., Weiss NS., Larson EB., Rosendaal FR. et Psaty BM. (2004). Esterified estrogens and conjugated equine estrogens and the risk of venous thrombosis. *JAMA*, **292** : 1581-1587.
- Soules MR. (2005). Development of a staging system for the menopause transition : A work in progress. *Maturitas*, **12** : 117-120.
- Stefanick ML., Anderson GL., Margolis KL., Hendrix SL., Rodabough RJ., Paskett ED., Lane DS., Hubbell FA., Assaf AR., Sarto GE., Schenken RS., Yasmeeen S., Lessin L. et Chlebowski RT. (2006), for the WHI Investigators. Effects of Conjugated Equine Estrogens on breast cancer and mammography screening in postmenopausal women with hysterectomy *JAMA*, **295** : 1647-1657.
- The WHI steering committee (2004). Effect of conjugated equine estrogen in post-menopausal women with hysterectomy : The WHI randomized controlled trial. *JAMA*, **291** : 1701-1712.
- WHI (Women's Health Initiative) (2002). Rossouw E., Anderson GL., Prentice RL. *et al.* Writing Group for the Women's Health Initiative Investigators Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women : principal results from the Women's Health Initiative randomized controlled trial. *JAMA*, **288** : 321-333.
- Ziel HK. et Finkle WD. (1975). Increased risk of endometrial carcinoma among users of conjugated estrogens. *N Engl J Med*, **293** (23) : 1167-1170.

SOUS-CHAPITRE 2.2

Contraception, état des lieux et nouvelles cibles

PHILIPPE BOUCHARD, FRANCIS ZELIA ET SOPHIE CHRISTIN-MAÎTRE

Résumé

La contraception œstroprogestative, « la pilule », existe depuis 45 ans, et rend des services exceptionnels en permettant aux femmes de décider du moment de leur procréation. Les progrès faits pour rendre la contraception plus efficace et sans effets secondaires sont considérables, et nous disposons actuellement de procédés pour toutes les femmes, y compris pour celles qui présentent des facteurs de risque vasculaires ou mammaires. Le coût de la contraception est aussi devenu très accessible, y compris dans les pays en développement, grâce aux efforts notamment de l'OMS et d'organisations non gouvernementales. Le nombre de grossesses non désirées reste cependant trop élevé, et nous devons poursuivre la recherche pour rendre la contraception encore plus accessible et encore plus facile à prendre. Ce *challenge* reste de taille, en particulier parce que les sources de financement, dans ce domaine, sont rares, dans la mesure où il est trop communément admis que le problème de la contraception est réglé grâce aux nombreuses pilules œstroprogestatives, progestatives, et aux dispositifs intra-utérins sur le marché. La recherche des gènes d'intérêt dans l'ovaire et le testicule doit se poursuivre.

Introduction

La première pilule contraceptive a été mise sur le marché le 11 mai 1960 aux États-Unis et en 1967 en France. Ce traitement aujourd'hui banal, a été le résultat des efforts et de l'obstination d'un groupe de chercheurs et de médecins qui méritent une reconnaissance pour le progrès considérable qu'ils ont apporté aux femmes, et à l'humanité : Gregory Pincus, le leader de la recherche en premier lieu, mais aussi les gynécologues John Rock et Celso-Ramon Garcia, et enfin, les chimistes Russel Marker et Carl Djerassi. Ce petit groupe de chercheurs a, dans l'adversité de la société conservatrice de l'époque, adapté, et modernisé le concept développé par l'Autrichien Ludwig Haberlandt dans les années 1900, selon lequel la progestérone (alors non identifiée), hormone du corps jaune, préparant l'utérus à l'implantation, a un rôle inhibiteur sur la survenue de l'ovulation : l'ovulation ou expulsion de l'œuf par l'ovaire, prêt à être fécondé, est un phénomène évidemment indispensable à la reproduction qui survient mensuellement chez la femme de la puberté à la ménopause, soit 400 fois environ au cours de la vie.

L'enthousiasme initial des premières pilules a été tempéré par la suite par la constatation, faite avec retard, que la prise de contraceptif contenant un œstrogène de synthèse (mestranol puis éthinyl œstradiol), à forte dose, associé au dérivé de la progestérone, augmentait le risque de phlébite, thrombose veineuse, qui elle-même expose au risque potentiellement mortel d'embolie pulmonaire.

De nos jours, les moyens de contraception se sont considérablement améliorés, et les doses d'éthinyl œstradiol, l'œstrogène utilisé dans les pilules, ont été considérablement réduites, certains facteurs de risque génétiques de phlébite ont été reconnus, et d'autres voies d'administrations ont été envisagées.

Ces progrès restent insuffisants, car cette immense avancée qu'est la contraception, reste insuffisamment partagée, malgré une offre croissante. Les femmes qui ont le plus besoin de contraception sont jeunes, mal informées, et vivent principalement dans les pays en développement. C'est bien aussi, et surtout, dans ces pays que se pose, avec ampleur, le risque d'infections sexuellement transmissibles. Les chiffres parlent d'eux-mêmes : 60 % des femmes en âge de procréer dans le monde prennent une contraception, 20 % en Afrique, 72 % en Europe, 69 % en Chine, 66 % en Amérique latine. Face à l'importance de la demande, et à l'inégalité d'accès, il est cependant parfaitement démontré que la maîtrise de la contraception est une des clefs essentielles du développement économique et de la santé de la femme (*Women's health* des Anglo-Saxons). Cette situation va, de plus, empirer, avec, comme l'a montré la conférence du Millenium organisée par l'ONU en 2000, un accroissement prévisible de 50 % de la population d'ici 2050, et évidemment cette augmentation de population

va se faire principalement aux dépens des pays en voie de développement, où justement l'accès des femmes à la contraception est le plus défaillant.

Ainsi, dès à présent, dans le monde, les besoins en contraception sont immenses, et la disponibilité en méthodes contraceptives reste très insuffisante. Outre la faible mise à disposition des femmes des moyens contraceptifs, paradoxalement, dans les pays développés, le taux de grossesses non désirées reste trop élevé : 25 à 30 % des grossesses restent non désirées et presque la moitié d'entre elles surviennent chez des femmes qui utilisent ou sont supposées utiliser une contraception. La moitié des grossesses non désirées sont suivies d'un avortement.

En France, 10 % des grossesses sont non désirées (source Ined) et il y a toujours 220 000 avortements par an dont 10 000 environ chez des mineures ! Aux États-Unis, il y aurait 49 % de grossesses non désirées, James Trussel en évalue le coût annuel à 5 milliards de dollars (ce qui inclut le coût des naissances, des avortements, et des pertes fœtales (Trussel, 2007)). Ce taux élevé de grossesses non désirées traduit un usage incorrect de la contraception, des oublis, ou des échecs. Ces chiffres sont inacceptables, et doivent engager les médecins à plus d'agressivité et d'audace. Il convient de pouvoir bénéficier d'une offre diverse, pour que la femme puisse choisir avec son médecin la méthode efficace la plus adaptée à sa demande. Le rôle de l'industrie pharmaceutique est bien sûr essentiel dans cette recherche de nouveaux procédés, malheureusement ce domaine de la médecine de la reproduction est moins attractif que dans les années 1960-1970, en raison du risque de procès et du médiocre retour sur investissement lié aux politiques de remboursement des assurances maladies.

Il est également nécessaire que les méthodes disponibles, leurs avantages et leurs inconvénients soient enseignés plus efficacement à l'école et à l'université. Ces informations devraient être aisément accessibles, aussi visibles que celles sur le sida qui est aussi un problème majeur de santé publique.

L'accès universel au contrôle des naissances, déjà évoqué à la conférence du Caire de 1994, est une urgence planétaire et un des droits fondamentaux de l'humanité.

1 | Cibles de la contraception

La reproduction est un processus complexe qui implique plusieurs cellules différentes spécialisées, tissus et organes à la fois chez l'homme et chez la femme. Le tableau 2.2-1 regroupe les zones d'intérêt les plus prometteuses pour ces futures cibles.

La croissance et la maturation de l'ovocyte
L'ovulation
L'implantation de l'embryon
La voie de la spermatogenèse
La maturation du sperme
La capacitation du sperme
La mobilité et la chimiotaxie dans le tractus génital féminin
L'interaction sperme-ovocyte

Tableau 2.2-1*Cibles de la contraception.*

2 | La contraception d'aujourd'hui

La contraception hormonale repose sur l'usage d'hormones qui visent à empêcher le développement folliculaire, à prévenir l'ovulation en inhibant le pic de LH hypophysaire, ou à rendre l'utérus inapte à l'implantation. C'est la méthode de contraception réversible la plus utilisée à ce jour dans le monde. Différents modes d'administration sont actuellement disponibles : les comprimés, les patchs transdermiques, les anneaux vaginaux, les implants sous-cutanés, les injections et les dispositifs intra-utérins libérant des hormones. L'objectif de ces nouveaux systèmes de délivrance est à la fois d'essayer de diminuer les effets secondaires et d'améliorer le contrôle du cycle, et surtout, *in fine*, d'augmenter la compliance ; pour ces raisons mais aussi en raison de la diversité de l'offre, parmi les moyens proposés, la femme pourra choisir celui qui lui convient le mieux.

2.1 La contraception œstroprogestative

Elle représente l'essentiel des méthodes utilisées dans le monde, elle est disponible sous forme de comprimés, de patch, et d'anneaux vaginaux. Elle associe un œstrogène de synthèse, l'éthinyl œstradiol, qui inhibe la FSH hypophysaire et donc le développement folliculaire, et, de plus, assure un bon contrôle du cycle, c'est-à-dire une réduction des saignements intempestifs et des règles tous les mois à l'arrêt de chaque plaquette. Le deuxième composant de la pilule est un progestatif de synthèse qui a deux fonctions : celles de bloquer l'ovulation, c'est-à-dire la survenue du pic de LH hypophysaire, et également de transformer l'endomètre et ainsi de réduire les possibilités d'implantation (lévonorgestrel,

gestodène, désogestrel, drospirénone, dianogest, acétate de chlormadinone...). Ainsi, la contraception œstroprogestative :

- agit principalement sur la suppression de l'ovulation par la prévention de la maturation folliculaire et par la suppression du pic préovulatoire de LH ;
- et, plus accessoirement :
 - réduit la pénétrabilité du sperme dans la glaire cervicale,
 - modifie l'endomètre entravant ainsi l'implantation,
 - et, éventuellement altère le transport des spermatozoïdes dans les trompes.

Cette contraception pose cependant un problème important : elle est contre-indiquée chez les femmes à risque pour l'éthinyl œstradiol : lorsqu'il existe une HTA, une obésité, un diabète compliqué, un antécédent de maladie thrombo-embolique ou une susceptibilité génétique de type mutation Leiden (mutation sur le facteur V de la coagulation présente chez presque 5 % de la population française), une hypertriglycémie, ou une intoxication tabagique après 35 ans, et bien sûr un antécédent de cancer hormonodépendant.

La contraception œstroprogestative est aussi disponible sous forme non orale : patch ou anneaux vaginaux. Ces voies alternatives augmentent le choix mais ont les mêmes contre-indications que la voie orale en raison du fait qu'elles contiennent de l'éthinyl œstradiol.

Les patch

Un patch contraceptif associant de l'éthinyl œstradiol et un progestatif, le norgestimate, a été mis sur le marché dans de nombreux pays. Sa durée d'action est de sept jours et la femme met ainsi trois patch de suite au cours du même cycle. L'œstrogène contenu dans ce patch est l'éthinyl œstradiol (EE) et les contre-indications restent les mêmes que celles des pilules combinées, comme l'a récemment rappelé la FDA, agence du médicament américaine, au vu de plusieurs cas de phlébite récemment rapportés sous cette contraception.

Les anneaux vaginaux

Ils sont en gomme souple et se mettent au fond du vagin au début du cycle. La femme le garde trois semaines en place et maîtrise ainsi, elle-même, sa contraception. Ils sont bien acceptés, notamment dans les études faites en Amérique du

Sud, aux États-Unis, et même en Europe où un anneau contraceptif a été récemment mis sur le marché. Le seul anneau commercialisé en France, Nuvaring® reste assez peu utilisé. Il contient de l'éthinyl œstradiol associé à un progestatif, le désogestrel. Les contre-indications restent les mêmes que celles des pilules œstroprogestatives.

Œstroprogestatif et cancer

Le risque propre de la pilule sur le cancer du sein a fait l'objet de nombreuses études. Les femmes qui prennent la pilule s'inquiètent du risque de cancer et ce d'autant plus que le Centre international de recherche sur le cancer (IARC) de l'OMS a récemment classé les pilules œstroprogestatives dans le groupe des médicaments inducteurs de cancer de classe 1. Un certain nombre de femmes s'inquiètent de ce fait, et tendent à réduire la compliance vis-à-vis de la contraception.

- Le risque de cancer du sein a été étudié dans plus de 60 études regroupant plus de 60 000 femmes qui utilisent ou ont utilisé une contraception orale. Une légère augmentation du risque a été observée selon l'étude du Collaborative Group on Hormonal factors in Breast Cancer. Cette légère augmentation du risque est sans rapport avec le bénéfice d'éviter une grossesse non désirée. De plus ce surrisque disparaît quelques années après l'arrêt de la contraception, c'est-à-dire au moment où les femmes atteignent l'âge où la fréquence de survenue du cancer du sein est la plus fréquente.
- Le risque de cancer du col paraît peu influencé par la pilule. C'est la fréquence d'infection à papillomavirus chez les utilisatrices de contraception orale qui en est le facteur déterminant. La mise au point récente d'un vaccin va probablement réduire considérablement le risque de développer ce cancer.
- Deux cancers voient leur risque diminuer grâce à la contraception orale : le cancer de l'endomètre et le cancer de l'ovaire pour lequel l'effet protecteur de la pilule perdure 20 ans après son arrêt. Quant au risque de cancer du foie, il est extrêmement faible.

Le rapport bénéfice-risque de la contraception en général est ainsi très largement positif, en permettant le choix du moment de la grossesse, ce qui représente une extraordinaire avancée médicale et sociétale.

2.2 La contraception progestative

Elle utilise donc des dérivés puissants de la progestérone comme le lévonorgestrel ou le gestodène ou le désogestrel, pour essayer de bloquer l'ovulation et/ou surtout prévenir l'implantation de l'embryon dans l'utérus. Son intérêt est surtout de pouvoir proposer un moyen contraceptif aux femmes qui présentent des contre-indications à l'usage des œstrogènes. Elle est disponible sous forme de comprimés mini- ou macrodosés, ou sous forme d'implant ou d'injection intramusculaire de formes retard :

- les micro (mini) pilules progestatives ont une action contraceptive essentiellement sur l'utérus, par :
 - modification de la glaire cervicale diminuant la pénétrabilité du sperme,
 - diminution de la réceptivité de l'endomètre à l'implantation,
 - réduction de l'ovulation ;
- les macroprogestatifs sont contraceptifs par :
 - inhibition des gonadotrophines hypophysaires,
 - atrophie endométriale,
 - action sur la glaire cervicale ;
- les méthodes non orales.

Les implants de progestatifs

Ils sont sur le principe très attractifs, dans la mesure où ils assurent une contraception très efficace sur plusieurs années (trois ans en moyenne). Le taux cumulé de grossesse est très faible, de l'ordre de 1,5 %. Le pionnier dans ce domaine est le Norplant, composé de six bâtonnets, développé par le Population Council, qui s'est révélé une méthode très efficace mais difficile à mettre en place et à extraire ; la présence de silicone a été aussi l'occasion de nombreux procès qui, bien que perdus, ont abouti à une utilisation confidentielle du produit.

Plus récemment, la compagnie Organon a commercialisé un nouvel implant, l'Implanon®, bâtonnet d'un polymère (EVA) différent du silicone, qui contient un progestatif seul, l'étonogestrel. Il se place habituellement sous la peau de l'avant-bras et a montré une efficacité remarquable, en agissant à la fois sur l'utérus et l'ovulation, les deux cibles de la contraception. Il provoque chez 30 % des utilisatrices des saignements identiques à ceux qui sont observés avec les progestatifs oraux.

Un certain nombre d'incidents sont survenus à la pause ou au retrait du dispositif. Un nouveau dispositif radio-opaque doit être introduit sur le marché prochainement. L'implant progestatif est donc très efficace et dénué de risque cardiovasculaire.

Les injections de contraceptifs retard

L'injection intramusculaire d'un progestatif, le DMPA (depot medroxyprogesterone acetate ou Depoprovera) reste largement utilisée dans le monde puisque les ventes atteignent toujours environ 160 millions de dollars chaque année. Cette méthode efficace utilise une dose considérable d'hormones qui s'accompagne d'effets secondaires peu acceptables, prise de poids et surtout une suppression de la fonction ovarienne avec une carence en œstrogènes, responsable notamment d'ostéoporose.

Les problèmes principaux de l'utilisation des progestatifs seuls sont : leur coût, leur moindre efficacité, et, surtout leur mauvaise tolérance endométriale avec des saignements erratiques peu accessibles à un traitement, car inhérents aux effets physiologiques de la progestérone et aux effets pharmacologiques des progestatifs, sur les gènes de l'angiogenèse, et sur les métallo-protéases de la matrice extracellulaire de l'endomètre.

2.3 Les modulateurs sélectifs des récepteurs de la progestérone (SPRM)

Ils représentent l'espoir essentiel de réaliser une contraception sans œstrogènes.

Stricto sensu, les modulateurs sélectifs des récepteurs de la progestérone associent des agonistes des effets de la progestérone (la progestérone, et les progestatifs) et antagonistes, qui réduisent l'activité transcriptionnelle des isoformes des récepteurs de la progestérone (« antiprogestérones »). De manière intéressante, sans que le mécanisme moléculaire de l'action de ces composés ait été complètement élucidé, ils ont la capacité de bloquer l'ovulation, et de modifier profondément l'endomètre, qui devient inapte à l'implantation, sans altérer le fonctionnement endocrine de l'ovaire et donc sans nécessiter l'adjonction d'œstrogènes.

Le premier antiprogestatif a été découvert en 1980 (mifépristone). Différents régimes de mifépristone ont été testés dans la contraception d'urgence (une seule dose post-coïtale) et en contraception conventionnelle (doses journalière, hebdomadaire ou mensuelle). Dans tous les cas, l'effet contraceptif résulterait

de l'inhibition de l'ovulation et/ou de l'altération de la fonction de l'endomètre, soit des deux à la fois (Chen, 1997).

L'action contraceptive de la mifépristone a été clairement démontrée en contraception d'urgence (Marions *et al.*, 2002). Une dose unique de 10, 50 ou 600 mg semble avoir une efficacité comparable dans la prévention des grossesses avec un délai de prise allant jusqu'à 120 heures (Task Force on Post-ovulatory Methods of Fertility Regulation, 1999). Le mécanisme d'action de la mifépristone en contraception d'urgence dépend du stade du cycle quand elle est administrée. Prise avant l'ovulation, elle inhibe l'ovulation, alors que si elle est prise après, elle agit sur l'endomètre pour empêcher l'implantation.

En administration quotidienne, des doses de mifépristone allant de 10 à 0,1 mg ont été testées. 88 % des volontaires prenant 5 mg/jour ont développé une aménorrhée, sans réduction de la production ovarienne d'œstradiol et, dans le contexte de cette étude, il n'y a pas eu de grossesses décrites (Brown *et al.*, 2002).

L'administration mensuelle a été aussi évaluée. Son facteur limitant est la difficulté de détection du pic de LH car l'horaire d'administration de cette contraception est très critique.

Un essai clinique avec un autre antiprogéstérone, l'ulipristal, en contraception d'urgence a été complété et les résultats sont annoncés brillants, supérieurs à ceux du lévonorgestrel, probablement parce qu'ils inhibent l'ovulation et l'implantation (Creinin *et al.*, 2006).

Bien que les antiprogéstérone aient un effet démontré dans la prévention des grossesses, leur développement a longtemps été freiné par l'opposition des autorités politiques, en raison de l'usage de la mifépristone comme agent abortif dans certains pays. Leur utilisation en contraception d'urgence ne pose pas de problèmes ; par contre, en utilisation continue, il reste à évaluer leur tolérance à long terme, notamment sur l'endomètre, avec l'arrière-pensée d'une possible hyperplasie de l'endomètre, puisque la sécrétion œstrogénique de l'ovaire n'est pas antagonisée par la progéstérone ou un progéstatif...

La contraception d'urgence

En attendant l'usage des antiprogéstérone comme la mifépristone ou l'ulipristal, les méthodes existantes utilisées en association avec une contraception primaire entraînent une réduction du taux de grossesses non désirées (Jones *et al.*, 2002). Actuellement, trois alternatives sont utilisées à travers le monde : le schéma utilisant un œstrogénostatif (dit de Yuzpe), et surtout un progéstatif

seul (lévonorgestrel : Norlevo), et le DIU au cuivre. Les antiprogéstérones sont toujours expérimentaux (le premier d'entre eux devrait être commercialisé en 2009). Le mécanisme d'action de la contraception d'urgence au lévonorgestrel est incertain (Marions *et al.*, 2002) :

- inhibition de l'ovulation : c'est le mécanisme principal ;
- altération du transport des spermatozoïdes ;
- prévention de l'implantation ;
- possible régression du corps jaune.

Le problème essentiel de la contraception d'urgence est bien sur son accessibilité, c'est dire que celle-ci devra être expliquée en détail (et prescrite) lors de la première consultation.

Les dispositifs intra-utérins (DIU)

- Les DIU au cuivre :
 - ils empêchent la fécondation et le transport des spermatozoïdes jusqu'aux trompes utérines (Stanford *et al.*, 2002). Le DIU représente une méthode contraceptive remarquablement efficace, dont on a beaucoup majoré les risques, qui, apparaissent aujourd'hui minimes, et qui permettent son usage éventuel, dans certaines conditions, chez des nullipares.
- Le DIU au lévonorgestrel (Mirena® est remarquablement efficace, pour trois ans, tout en étant fréquemment associé à une aménorrhée, dans les six mois de son utilisation. Il agit en :
 - inhibant l'implantation par décidualisation de l'endomètre et effet sur les glandes endométriales ;
 - créant une barrière à la pénétration des spermatozoïdes par épaissement de la glaire cervicale (Stanford *et al.*, 2002).

Les méthodes locales : elles sont médiocrement efficaces sur le long terme

- les préservatifs masculins et féminins, les diaphragmes, les capes cervicales et les éponges :

- constituent une barrière mécanique,
- protègent également contre les infections sexuellement transmissibles. C'est là leur effet essentiel,
- les diaphragmes, les capes cervicales et les éponges sont efficaces uniquement associés à des spermicides ;
- les spermicides :
 - constituent une barrière chimique,
 - peuvent être utilisés seuls ou en association avec une barrière mécanique.

3 | La contraception du futur

Tous les 5 à 10 ans, une conférence internationale se réunit pour essayer de faire un état des lieux sur les contraceptions utilisées et décider dans quelles directions il apparaît souhaitable d'investir l'argent de la recherche. Régulièrement, pour ne pas dire toujours, ces conférences se trompent. L'Académie des sciences des États-Unis a organisé la dernière en 2003. Ses conclusions ont été plus vagues que les recommandations des conférences antérieures. Elle a incité cependant à développer la recherche sur les gènes et les protéines impliqués dans le contrôle ovarien et testiculaire de la fertilité. La route est encore très longue... Il semble cependant que les objectifs qui doivent être atteints doivent concerner en premier lieu la simplicité d'usage, comme des méthodes mensuelles, ou « longue durée », elles doivent bien entendu aussi améliorer la sécurité d'usage et réduire les effets secondaires.

Les perspectives

Les zones d'intérêt de la recherche fondamentale sont les gènes, les protéines et les enzymes impliqués dans le système de la reproduction. Les nouvelles cibles sont les interactions au niveau des ovaires et des testicules ainsi que les interactions entre spermatozoïdes et ovocytes. Les modulateurs sélectifs des récepteurs de la progestérone, comme nous l'avons vu, et l'immunocontraception représentent des approches futuristes très prometteuses et le développement de la contraception hormonale masculine est maintenant réaliste et utilise des composés et formulations largement utilisés précédemment.

Dans le futur, et face à l'expansion du sida, la contraception doit offrir des bénéfices secondaires, telle une protection contre les infections sexuellement transmissibles.

L'importance du développement de nouvelles contraceptions est incontestable et la collaboration entre les secteurs privé et public est nécessaire afin de mettre sur le marché une contraception efficace et accessible à tous les individus.

Malgré tous les progrès récents, les différentes méthodes de contraception utilisées actuellement ne sont que des variantes des méthodes contraceptives découvertes dans les années soixante lors de la première « révolution de la contraception ». De plus, les progrès dans certains domaines comme l'immunocontraception, que l'on croyait très prometteurs en 1996, ont été minimes.

Alors que les avancées technologiques ont permis d'identifier de nombreuses nouvelles cibles, des défis considérables sont associées au développement des produits finis. Le choix de la cible la plus prometteuse est essentiel pour éviter des dépenses inutiles dans la production de produits pharmaceutiques inefficaces et des efforts sont à faire pour accélérer la recherche pour le développement des produits finis. Les précédentes études sur le développement des produits pharmaceutiques ont souligné le fait que certains types spécifiques de protéines (récepteurs, ligands, enzymes, canaux ioniques ou transporteurs...) sont des candidats plus favorables pour le développement des produits pharmaceutiques. Les modèles de souris infertiles *knock-out* ou *knock-in*, où respectivement certains gènes ont été invalidés ou au contraire surexprimés, permettent d'identifier les protéines prioritairement intéressantes à cibler pour le développement des produits pharmaceutiques. L'étude des dysfonctionnements génétiques responsables d'infertilité est également une source d'informations potentiellement importantes pour définir de nouvelles cibles de la contraception.

3.1 Contraception hormonale masculine

Les nouvelles approches de la contraception masculine à travers l'identification des gènes sous-jacents à la physiologie du testicule, de l'épididyme et de l'interaction sperme-ovocyte, offrent de multiples cibles potentielles pour la contraception. Cependant, l'investissement budgétaire énorme nécessaire pour le développement de nouvelles molécules contraceptives sur les bases des découvertes fondamentales rend peu probable la mise sur le marché d'un nouveau contraceptif issu de cette technologie et assombrit ainsi les perspectives.

En revanche, la contraception hormonale masculine, se basant sur des molécules qui ont été déjà longuement étudiées et utilisées, offre une perspective plus réaliste de développement d'une nouvelle modalité de contraception dans un délai de temps raisonnable. Un tel moyen permettra d'élargir les options contraceptives masculines qui jusqu'à ce jour se limitaient au préservatif et à la vasectomie (Merigiola *et al.*, 2003). Les questionnaires réalisés ces dernières années suggèrent que la majorité des hommes sont désireux de participer au

planning familial et que les femmes dans des relations de couple stables sont (maintenant) prêtes à faire confiance à leurs partenaires pour la contraception.

L'objectif de la contraception hormonale masculine est de supprimer/arrêter la spermatogenèse de manière réversible et d'induire une infertilité temporaire tout en préservant les autres fonctions androgène dépendantes, et ceci sans effets métaboliques secondaires. La FSH ainsi qu'une contraception seuil de testostérone intratesticulaire (LH dépendante) sont critiques pour le maintien d'une spermatogenèse quantitativement suffisante chez l'adulte. D'où la nécessité de supprimer à la fois la FSH et de créer un état de privation de testostérone intratesticulaire pour inhiber la spermatogenèse. Ainsi, cette contraception va créer un état d'hypogonadisme hypogonadotrope iatrogène qui nécessitera l'usage d'androgènes exogènes pour maintenir les fonctions physiologiques extratesticulaires androgénodépendantes. La complexité de cette méthodologie rend l'industrie pharmaceutique dubitative vis-à-vis du développement de ces méthodes.

Trois formulations ont été utilisées dans le développement de la contraception hormonale masculine : la testostérone seule, la testostérone combinée à des progestatifs, et la testostérone combinée aux analogues de la GnRH. La formulation la plus réaliste est l'association androgène progestatif permettant ainsi de réduire la dose d'androgènes et les effets secondaires qui en découlent.

3.1.1 Les combinaisons progestatifs/androgènes

Les progestatifs exogènes peuvent inhiber la sécrétion des gonadotrophines chez l'homme et supprimer ainsi la spermatogenèse. L'intérêt de la combinaison avec un androgène (testostérone) est d'assurer une substitution androgénique pour compenser l'inhibition du contrôle hormonal du testicule, et d'exploiter les effets synergétiques des deux stéroïdes afin de les utiliser à des doses plus faibles, minimisant ainsi les effets secondaires.

L'acétate de cyprotérone

L'effet à la fois antigonadotrope et anti-androgénique est favorable à l'inhibition de la spermatogenèse. Des doses de 25 à 100 mg combinées à l'énanthate de testostérone induisent une suppression plus rapide de la spermatogenèse en comparaison avec la testostérone seule (49 jours contre 98 jours) (Meriggiola *et al.*, 2003).

Les principales limitations de l'acétate de cyprotérone sont la baisse de l'hémoglobine et du poids ainsi que la perturbation du bilan hépatique. Aux doses utilisées, l'effet anti-androgénique ne semble pas créer des effets indésirables.

Le lévonorgestrel

Le lévonorgestrel a été largement étudié en combinaison avec différents androgènes. Initialement une dose quotidienne de 500 μg associée à 100 mg d'éнанthate de testostérone par semaine a entraîné une suppression plus importante de la spermatogenèse (67 % d'azoospermie contre 33 %) (Bebb *et al.*, 1996, Kamischke *et al.*, 2000).

Désogestrel (DSG) et son métabolite actif, l'étonogestrel (ENG)

300 μg de DSG oral en combinaison avec des doses variables d'éнанthate de testostérone ont induit une suppression de la spermatogenèse plus importante. Une baisse du HDL-C de 20-25 % était observée. Une étude multinationale a confirmé que le DSG (150 ou 300 $\mu\text{g}/\text{j}$) en combinaison avec 400 mg de testostérone sous forme d'implants trimestriels peut induire une azoospermie chez tous les patients dans le groupe recevant 300 μg avec une diminution significative du HDL chez les Caucasiens uniquement (Kinniburgh *et al.*, 2002). L'étonogestrel métabolite actif du DSG utilisé sous forme d'implants sous-cutanés est intéressant en contraception masculine aussi. Ainsi, trois bâtonnets d'ENG (68 mg/bâtonnet) ont été étudiés en association avec les implants trimestriels de 400 mg de testostérone (Brady *et al.*, 2004). Les neuf patients sont devenus azoospermes avec un délai variable de 8 à 28 semaines, et un patient a eu une réversibilité partielle de cette azoospermie au bout de 40 semaines.

L'énanthate de noréthistérone (NETE)

L'énanthate de noréthistérone est un progestatif androgénique disponible sous forme de dépôts aqueux utilisés en contraception féminine. 400 mg de NETE avec 1 000 mg de TU administrés toutes les six semaines (Kamischke *et al.*, 2002) ont provoqué une azoospermie chez 92 % des hommes.

En résumé, l'association de progestatifs aux androgènes est plus efficace, et génère moins d'effets secondaires que la testostérone seule (Nieschlag *et al.*, 2003). Toutefois, le nombre réduit de patients étudiés ainsi que les durées courtes de traitement ne permettent pas de comparer les différents régimes utilisés, et leurs effets secondaires méritent également plus d'évaluation.

3.1.2 Les antagonistes de la GnRH

Ils sont très efficaces mais leur coût rend leur usage peu réaliste... Ils suppriment très rapidement les gonadotrophines et produisent des taux élevés

d'azoospermie. Leur potentiel contraceptif est indiscutable avec comme ultime avantage leur rapidité d'action. Cependant leurs inconvénients sont nombreux avec principalement leur prix élevé, leur demi-vie courte et la nécessité d'injections sous-cutanées répétées avec des réactions locales aux sites d'injection. Les antagonistes de la GnRH sont utilisés en association avec la TE pour induire la suppression de la spermatogenèse qui semble pouvoir être maintenue par la testostérone seule (Swerdloff *et al.*, 1998). De nouveaux antagonistes de la GnRH à longue durée d'action sont potentiellement très intéressants en contraception masculine pour l'initiation de la suppression de la spermatogenèse qui sera maintenue par la suite avec de la testostérone seule ou associée à la progestérone.

Des différences ethniques dans la réponse à la suppression de la spermatogenèse par les stéroïdes sexuels ont été observées, les Asiatiques étant meilleurs répondeurs que les Caucasiens (plus de 90 % contre moins de 60 % d'azoospermie respectivement). Les explications potentielles à ces différences incluent des facteurs génétiques (Wang *et al.*, 1998), des facteurs alimentaires et d'environnement (Santner *et al.*, 1998 ; Wang *et al.*, 2005) qui ne sont pas élucidés. Des variations intra-ethniques sont également observées dans la population caucasienne. Des facteurs dépendants et indépendants des gonadotrophines ont été suggérés (Handelsman *et al.*, 1995 ; McLachlan *et al.*, 2004). Certains privilégient le rôle des polymorphismes de l'exon 1 du récepteur des androgènes (nombre de triplets CAG), qui sont associés à une capacité de transactivation variable du message androgénique pour expliquer la variabilité de la réponse au traitement.

3.2 Les méthodes non hormonales de contraception masculine

Plusieurs agents oraux non hormonaux ont été découverts chez l'animal expérimental pour leur interférence avec la spermatogenèse sans réduction des taux de testostérone.

La *lonidamine* a un effet antispermatogénique par exfoliation des cellules germinales de l'épithélium séminal. La *lonidamine* n'a pas été développée en raison de sa toxicité hépatique et rénale. Plus récemment des analogues de *lonidamine* ont été découverts avec un effet similaire au niveau du testicule, mais sans la toxicité hépatique et rénale. Récemment, CY Cheng *et al.* ont rapporté chez le rat l'efficacité du couplage de l'adjudine, une *lonidamine* modifiée, à une FSH mutée, qui permet son accès spécifique aux tubes séminifères (Mruk *et al.*, 2006).

3.3 La chimiotaxie du sperme

Une étude récente indique que le sperme humain a la capacité de détecter et de répondre aux signaux chimiotactiques à travers un récepteur appelé hOR17-4 (Spehr *et al.*, 2003). Ce récepteur appartient à la famille des récepteurs olfactifs (OR) exprimés principalement dans les tissus nerveux du nez.

Il est suggéré que la chimiotaxie du sperme serait une étape critique dans le processus de la fertilisation et que l'inhibition de cette voie de signalisation pourrait éventuellement bloquer la fertilisation et servir de nouvelle modalité de contraception (Spehr *et al.*, 2003).

3.4 Protéines impliquées dans le métabolisme et la maturation des gamètes

Cette approche est très intéressante car potentiellement sans interférence sur l'ovulation et sur la production hormonale ovarienne.

Trois types de protéines sont actuellement à l'étude.

La glycéraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase 2 (GAPDS ou GAPD2)

La GAPDS est une enzyme de la glycolyse qui est exprimée spécifiquement dans les testicules des souris et de l'homme. Les souris mâles invalidées pour GAPDS sont infertiles. Le spermogramme de ces souris montre une mobilité anormale, suggérant qu'une contraception masculine ou féminine qui inhiberait l'activité de la GAPDS empêcherait le spermatozoïde d'arriver à l'ovocyte (Wu *et al.*, 2003).

CKS2

La CKS2 est un des homologues des protéines de liaison de la kinase 1 dépendante des cyclines. Quoique cette protéine soit exprimée dans de nombreux tissus, les souris *knock-out* pour le gène de la CKS2 ont un phénotype normal mais sont infertiles (Spruck *et al.*, 2003). Les cellules germinales des souris mâles et femelles mutées sont bloquées en métaphase de méiose 1, et sont donc incapables de maturation et de fertilisation. Les produits pharmaceutiques dirigés contre CKS2 ou contre d'autres protéines de la méiose interagissant avec CKS2 constituent des contraceptifs potentiels.

La protéine ZAR1 (zygote arrest1)

La protéine ZAR1 est une nouvelle protéine spécifique de l'ovocyte des poissons, rats, souris et de l'espèce humaine (Wu *et al.*, 2003). Le gène *zar1* est membre d'une classe de gènes appelés gènes à effets maternels qui sont exprimés dans l'ovocyte mais qui jouent un rôle après l'ovulation. L'absence de la protéine ZAR1 dans l'ovocyte empêche la fusion des pronuclei mâle et femelle, entravant ainsi le développement (Wu *et al.*, 2003). Ceci provoque une infertilité chez les femelles chez qui le gène *zar1* a été invalidé. Le blocage de la voie des protéines ZAR1 devrait avoir un effet contraceptif.

3.5 Interaction spermatozoïde-ovocyte

Avant la fertilisation, le spermatozoïde doit adhérer et fusionner avec la membrane plasmique de l'ovocyte. Les molécules impliquées dans ces processus constituent donc des cibles potentielles pour le développement de nouvelles méthodes contraceptives. Des recherches ont été faites pour déterminer les protéines à la surface de l'ovocyte ou du spermatozoïde responsables de cette adhésion et de cette fusion. Plusieurs protéines ont été impliquées, et elles fonctionnent dans le cadre de complexes multimériques à la surface des cellules. Les recherches sur d'autres protéines de surface de l'ovocyte ont soulevé l'intérêt de deux voies particulièrement prometteuses :

- la première est celle du glycosylphosphatidylinositol (GPI) membrane anchor ;
- la seconde est celle du CD9, membre de la famille des tétraspanines, qui se lie aux intégrines et facilite la prolifération, la motilité et l'adhésion des cellules.

3.6 Les protéines impliquées dans la mobilité des spermatozoïdes

Les ions calciques ont un rôle majeur dans la régulation de la fonction des spermatozoïdes. Les CatSpers sont une nouvelle famille de protéines, exprimées uniquement dans les cellules germinales masculines et pouvant former des complexes multiprotéiques. Elles régulent l'influx du calcium à l'intérieur des spermatozoïdes et ainsi leur mobilité (Lobley *et al.*, 2003). Ces protéines sont localisées au niveau du flagelle. Une autre protéine, l'AKAP (kinase anchoring protein4) est une composante majeure des flagelles. Les délétions du gène *akap4* entraînent une infertilité chez les souris mâles. Le nombre de spermatozoïdes n'est

pas réduit mais leur motilité progressive est altérée en raison de l'atteinte de la queue.

3.7 Les cytokines impliquées dans l'ovulation et dans l'implantation

Les gènes essentiels à l'ovulation sont encore à élucider, mais l'analyse de l'expression différentielle à travers l'étude des transcrits des ARN ovariens sauvages et déficients en récepteur de la progestérone suggère que des enzymes incluant la cathepsin L et l'ADAMTS1 sont des candidats pour les protéines impliquées dans la dégradation des follicules (Richards *et al.*, 2002). La connaissance des gènes et des protéines associées à l'action de la progestérone en période péri-ovulatoire peut révéler de nouvelles cibles, incluant des enzymes, pour la prévention de l'ovulation sans perturbation de l'activité endocrine ovarienne.

Un nombre de cytokines a également été identifié comme cibles potentielles pour le développement de modalités d'inhibition de l'implantation. Par exemple, le LIF (leukemia inhibitory factor) est essentiel pour l'implantation chez la souris (Bhatt *et al.*, 1991). Plusieurs arguments sont en faveur d'un rôle similaire dans l'espèce humaine (Yue *et al.*, 2000). L'interleukine 11 (IL-11) est intimement impliquée dans la décidualisation chez la souris (et semble avoir le même rôle chez l'homme (Dimitriadis *et al.*, 2002)). Des travaux sont en cours pour le développement d'inhibiteurs qui bloqueraient l'activation des voies de signalisation utérines de l'IL-11 et du LIF.

3.8 Les spermicides

L'épidémie de l'infection par le VIH a été un moteur pour la recherche et le développement des microbicides vaginaux. Différentes formulations de microbicides existent et ont pour effet la prévention de la transmission des infections sexuellement transmissibles. Certains ont également une activité spermicide et de ce fait contraceptive. Plusieurs microbicides sont en période d'essais cliniques pour tester leur efficacité dans la prévention des grossesses et de la transmission des infections sexuellement transmissibles. Les premiers résultats des études en cours notamment en Afrique du Sud sont décevants par le faible pouvoir antiviral des produits testés. Beaucoup de recherche est encore nécessaire. Les protagonistes sont les suivantes :

- **BufferGel** (Carbopol polymer) est un lubrifiant non irritant fait de gel de Carbopol 974P qui est un acide polyacrylique de haut poids moléculaire. Il ne contient pas d'huile ni de détergent et peut être utilisé avec les préservatifs et les diaphragmes en latex. Il maintient l'acidité naturelle du vagin

même en présence de liquide séminal et crée une barrière physique au passage des pathogènes à travers l'épithélium cervical et vaginal. Ce produit est développé par le ReProtect LLC et l'université de John Hopkins avec le support du NICHD ;

- **Savvy** (C31G) est un microbicide formé d'un mélange équimolaire de deux surfactants amphotériques, l'acétyl de bétaine et l'oxyde de myristamine. L'effet microbicide résulte de l'inactivation ou de la destruction des pathogènes en leur ôtant leur couverture externe. Des études cliniques en phase I/II sur l'efficacité et la sécurité de Savvy dans la contraception ont été menées avec succès, et des études en phase III sont en cours pour l'évaluation des effets contraceptifs et des effets de prévention de la transmission du virus HIV, du virus herpes simplex et des infections à Chlamydia et Gonorrhée. Ce produit est développé par Biosyn ;
- **Ushercell** (sulfate de cellulose) est un gel microbicide inhibiteur de l'adsorption. dont les résultats en tant que antiviral viennent d'être annoncés comme négatifs ;
- **Carraguard** est un microbicide à activité antivirale développé par le Population Council actuellement en cours d'étude utilisé seul ou en association avec un antirétroviral.

Le développement d'un microbicide contraceptif représente un défi considérable parce qu'il devrait être à la fois très efficace contre les pathogènes et contre le sperme, sans détruire la flore normale ni les cellules de la muqueuse vaginale. En plus, la mise en évidence de l'efficacité nécessite des essais cliniques multiples chez des populations différentes pour tester simultanément l'efficacité du microbicide en tant que contraceptif, et en tant que protection contre les infections sexuellement transmissibles. Ainsi les essais cliniques sont très longs et très coûteux. L'introduction d'antirétroviraux dans la composition du microbicide apparaît comme nécessaire et devra être testée car c'est la seule option réaliste.

3.9 L'immunocontraception (Delves, 2002)

Le développement des vaccins contraceptifs a débuté dans les années soixante, mais les progrès ont été très lents (Abdennebi-Najar *et al.*, 2003). Trois considérations sont essentielles au succès de cette approche immunologique : la durée d'efficacité des anticorps, la réversibilité de cette contraception et l'éventuelle tératogénicité, pendant les périodes de diminution des taux d'anticorps (WHO, 1975). Plusieurs antigènes ont été proposés comme des cibles potentielles de l'immunocontraception.

3.9.1 Les antigènes de surface des spermatozoïdes

L'objectif de cette immunisation est de produire des anticorps contre des antigènes spécifiques des spermatozoïdes dans le tractus génital de la femme et de bloquer ainsi la fécondation par agglutination des spermatozoïdes. Plusieurs antigènes identifiés lors de l'agglutination naturelle des spermatozoïdes ont été définis : chez le babouin, des essais d'immunisation contre la LDH4, iso-enzyme de la lactate déshydrogénase présente uniquement dans les cellules germinales mâles, ont été partiellement efficaces. D'autres antigènes tels RSA-1, SP10, SP17, TClE-1, PH-20, ont également été déterminés. Néanmoins, aucune de ces études n'a donné de résultats concluants.

3.9.2 Les antigènes ovocytaires

La zone pellucide est le site de reconnaissance de l'ovocyte par les spermatozoïdes. Des antigènes majeurs ZP1, ZP2 et ZP3 sont isolés à partir de la couche glycoprotéique de la zone pellucide. Des essais effectués chez plusieurs espèces montrent que l'immunisation contre certaines de ces protéines engendre une forte inhibition de la liaison ovocyte/spermatozoïde et/ou réduit la fertilité. Des études *in vitro* ont montré que les anticorps anti-ZP3 bloquent la fécondation dans de nombreuses espèces. Cependant, dans la majorité des cas, les vaccins contre les antigènes de la zone pellucide induisent des pathologies ovariennes.

3.9.3 Les hormones de la reproduction

Une première approche visant à inhiber de manière réversible la sécrétion des gonadotrophines est fondée sur la production d'un vaccin anti-GnRH (Delves *et al.*, 2002). Plusieurs études conduites chez les rongeurs et le singe ont montré que l'administration de GnRH associée à une toxine tétanique ou diphtérique provoque l'apparition d'anticorps dirigés contre le GnRH endogène ; il en résulte un blocage de la synthèse des hormones gonadotropes LH et FSH et, par conséquent, une défaillance de la fertilité chez le mâle ainsi que chez la femelle. Cependant, la neutralisation du GnRH réduit également la libido et peut provoquer une ostéoporose chez la femme, ou une perte de poids chez l'homme, résultant de la diminution du niveau des stéroïdes sexuels. Un traitement substitutif s'avérerait nécessaire, rendant l'application de la méthode extrêmement lourde. L'immunisation contre le GnRH a été développée chez les animaux domestiques. Chez l'homme, cette vaccination est aujourd'hui envisagée exclusivement dans le traitement de certains types de cancers hormonodépendants.

L'immunisation contre l'hCG (hormone sécrétée par le chorion au cours de la gestation) responsable du maintien de la gestation précoce chez la femme, a suscité beaucoup d'espoir ces dernières années. Des études réalisées chez

l'animal et chez la femme ont montré son effet sur l'interruption de grossesse. Deux vaccins fondamentaux ont été développés ces dernières années. Une vaccination contre la sous-unité β de l'hCG pourrait présenter des risques de réactions croisées avec la LH, particulièrement si ce vaccin est administré sur une longue période. Afin de pallier ce problème, des expériences de mutagenèse dirigée sur certains acides aminés ont été réalisées. Un mutant (R68 E) est en cours d'étude. L'hormone hCG est présente dans la circulation des femmes à chaque grossesse à des taux extrêmement élevés : en plus de possibles réactions croisées avec les autres hormones gonadotropes, on ne peut exclure un risque de rappel antigénique endogène obérant la restauration de la fertilité. Évidemment, le caractère abortif d'une suppression de la fonction placentaire rend difficile son développement, à supposer que le problème de la stabilité de la réponse immunologique soit atteint.

Stratégies de suppression de la FSH : du fait de son rôle clé dans la gamétogenèse, la FSH pourrait représenter une cible pour la contraception dans les deux sexes (Mclachlan *et al.*, 2002). L'inactivation génétique de la FSH (par KO) chez la souris a pour effet d'interrompre la croissance des ovocytes au stade pré-antral, et chez le mâle de limiter la spermatogenèse. Les femmes et les hommes porteurs de mutations perte de fonction de la FSH β sont infertiles. Une stratégie vaccinale contraceptive contre le récepteur de la FSH a donc été développée, ciblant des régions spécifiques au niveau de la partie N-terminale du récepteur de la FSH. Il s'agit de vaccins peptidiques composés de phages recombinants présentant à leur surface certains peptides du récepteur humain de la FSH. Les séquences peptidiques spécifiques du récepteur ont été choisies. Les effets contraceptifs de ce vaccin recombinant ont été évalués chez des singes mâles adultes et fertiles. Sur une période de plus de deux ans, aucune toxicité ni effets secondaires sur le métabolisme général n'ont été observés. Les effets contraceptifs persistent tant que les taux d'anticorps sont maintenus et l'arrêt du traitement se traduit par un retour à une fertilité normale. L'effet contraceptif a été obtenu sans modification des taux circulants d'androgènes, donc sans modification des comportements psychophysiologiques associés aux stéroïdes sexuels. Il s'agit de la première méthode contraceptive capable d'inhiber totalement la production des spermatozoïdes chez un primate de façon réversible et sans effets secondaires apparents sur le comportement ou le métabolisme général. Des études à long terme et sur un effectif plus important dans les deux sexes devraient donner des informations supplémentaires avant d'envisager un développement clinique (Abdennebi-Najar, 2003).

Conclusion

La recherche pour la contraception se construit sur les bases des progrès de la recherche en biologie de la reproduction. La révolution apportée par

la découverte du génome, du protéome, du lipidome et du glycome a permis d'identifier de nouvelles protéines cibles et leurs gènes régulateurs. Les progrès de l'industrie pharmaceutique ont facilité le développement de moyens contraceptifs ayant des modes d'administration plus adaptés, plus simple et, pour certains, de longue durée. Une contraception à double action, microbicide et contraceptive, qui protégerait contre les infections sexuellement transmissibles devient une nécessité avec la pandémie du VIH. Les femmes doivent être informées vis-à-vis de toutes les modalités possibles et être rassurées vis-à-vis des risques minimes auxquels elles sont exposées. La reconnaissance des femmes à risque, notamment pour la prise d'œstrogènes, est une priorité de la recherche et de l'analyse du génome humain.

Le chemin pour développer de nouvelles contraceptions est long et difficile, pour des raisons qui sont essentiellement économiques, légales et sociales. Les prédictions du temps nécessaire à la mise sur le marché d'un produit en cours d'étude sont aléatoires. Les nouvelles méthodes contraceptives qui seront disponibles très prochainement sont, chez la femme, les antiprogestatifs, et, chez l'homme, la combinaison testostérone-progestatifs. Le vaccin anti-hCG et les spermiostatiques ne pourront être disponibles avant au moins quinze ans (Harper, 2005). La collaboration des secteurs privé et public pourrait accélérer ce développement.

Références bibliographiques

- Abdennebi-Najar L. (2003). Interests and limits of immunocontraception. *Gynecol Obstet & Fertil* ; **31** : 774-777.
- Bhatt H., Brunet LJ. et Stewart CL. (1991). Uterine expression of leukemia inhibitory factor coincides with the onset of blastocyst implantation. *Proc Natl Acad Sci USA*, **8** : 11408-11412.
- Bebb RA., Anawalt BD., Christensen RB., Paulsen CA., Bremner WJ. et Matsumoto AM. (1996). Combined administration of levonorgestrel and testosterone induces more rapid and effective suppression of spermatogenesis than testosterone alone : a promising male contraceptive approach. *J Clin Endocrinol Metab*, **81** : 757-762.
- Brady BM., Walton M., Hollow N., Kicman AT., Baird DT. et Anderson RA. (2004). Depot testosterone with etonogestrel implants result in induction of azoospermia in all men for long-term contraception. *Hum Reprod*, **19** : 2658-2667.
- Brown A., Cheng L., Lin S. et Baird DT. (2002). Daily low-dose mifepristone has contraceptive potential by suppressing ovulation and menstruation : a

- double-blind randomized control trial of 2 and 5 mg per day for 120 days. *J Clin Endocrinol Metab*, **7** (1) : 63-70.
- Chen X. et Xiao B. (1997). Effect of once weekly administration of mifepristone on ovarian function in normal women. *Contraception*, **6** (3) : 175-180.
- Creinin MD., Schlaff W., Archer DF., Wan L., Frezieres R., Thomas M., Rosenberg M. et Higgins J. (2006). Progesterone receptor modulator for emergency contraception: A randomized controlled trial. *Obstet Gynecol*, **108** : 1089-1097.
- Delves P., Lund T. et Roitt I. Anti Fertility vaccines (2002). *Trends Immunology*, **23** : 4.
- Dimitriadis E., Robb L. et Salamonsen LA. (2002). Interleukin 11 advances progesterone-induced decidualization of human endometrial stromal cells. *Mol Hum Reprod*, **8** (7) : 636-643.
- Handelsman DJ., Farley TM., Peregoudov A. et Waites GM. (1995). Factors in nonuniform induction of azoospermia by testosterone enanthate in normal men. World Health Organization Task Force on methods for the regulation of male fertility. *Fertil Steril*, **63** : 125-133.
- Jones RK., Darroch JE. et Henshaw SK. (2002). Contraceptive use among US women having abortion in 2000-2001. *Perspect Sex Reprod Health*, **34** : 294-303.
- Kamischke A., Ploger D., Venherm S., von Eckardstein S., von Eckardstein A. et Nieschlag E. (2000). Intramuscular testosterone undecanoate with or without oral levonorgestrel: a randomized placebo-controlled feasibility study for male contraception. *Clin Endocrinol*, **53** : 43-52.
- Kinniburgh D., Zhu H., Cheng L., Kicman AT., Baird DT. et Anderson RA. (2002). Oral desogestrel with testosterone pellets induces consistent suppression of spermatogenesis to azoospermia in both Caucasian and Chinese men. *Hum Reprod*, **17** : 1490-1501.
- Lobley A., Pierron V., Reynolds L., Allen L. et Michalovich D. (2003). Identification of human and mouse CatSper3 and CatSper4 genes : characterisation of a common interaction domain and evidence for expression in testis. *Reprod Biol Endocrinol*, **1** : 1-53.
- Marions L., Hultenby K. et Lindell I. et al. (2002). Emergency contraception with mifepristone and levonorgestrel : mechanism of action. *Obstet Gynecol*, **100** : 65-71.
- Mruk DD., Wong CH., Silvestrini B. et Cheng CY. (2006). A male contraceptive targeting germ cell adhesion. *Nature Medicine*, **12** : 1323-1328.

- McLachlan RI., O'Donnell L., Meachem SJ., Stanton PG., de Kretser DM., Pratis K. et Robertson DM. (2002). Identification of specific sites of hormonal regulation in spermatogenesis in rats, monkeys, and man. *Recent Prog Horm Res*, **57** : 149-179.
- Meriggiola MC., Farley TM. et Mbizvo MT. (2003). A review of androgen-progestin regimens for male contraception. *J Androl*, **24** : 466-483.
- Nieschlag E., Zitzmann M. et Kamischke A. (2003). Use of progestins in male contraception. *Steroids*, **68** : 965-972.
- Qu J., Nisolle M. et Donnez J. (2000). Expression of transforming growth factor-alpha, EGF, and EGF receptor in follicles of human ovarian tissue before and after cryopreservation. *Fertil Steril*, **74** : 113-121.
- Robb L., Li R., Hartley L., Nandurkar HH., Koentgen F. et Begley CG. (1998). Infertility in female mice lacking the receptor for interleukin 11 is due to a defective uterine response to implantation. *Nat Med*, **4** (3) : 303-308.
- Santner SJ., Albertson B., Zhang GY., Zhang GH., Santulli M., Wang C., Demers LM., Shackleton C. et Santen RJ. (1998). Comparative rates of androgen production and metabolism in Caucasian and Chinese subjects. *J Clin Endocrinol Metab*, **83** : 2104-2109.
- Spehr M., Gisselmann G., Poplawski A., Riffell JA., Wetzel CH., Zimmar RK. et Hatt H. (2003). Identification of a testicular odorant receptor mediating human sperm chemotaxis. *Science*, **299** (5615) : 2054-2058.
- Spruck CH., de Miguel MP., Smith AP., Ryan A., Stein P., Schultz RM., Lincoln AJ., Donovan PJ. et Reed SI. (2003). Requirement of Cks2 for the first metaphase/anaphase transition of mammalian meiosis. *Science*, **300** (5619) : 647-650.
- Stanford J. et Mikolajczyk R. (2002). Mechanism of action of intrauterine devices : update and estimation of postfertilization effects. *Am J Obstet Gynecol*, **187** : 1699-1708.
- Swerdlloff RS., Bagatell CJ., Wang C., Anawalt BD., Berman N., Steiner B. et Bremner WJ. (1998). Suppression of spermatogenesis in man induced by Nal-Glu gonadotropin releasing hormone antagonist and testosterone enanthate (TE) is maintained by TE alone. *J Clin Endocrinol Metab*, **83** : 3527-3533.
- Trussel J. (2007). The cost of unintended pregnancies in the United States. *Contraception*, **75** : 166-167.
- Vogiagis D., Marsh MM., Fry RC. et Salamonsen LA. (1996). Leukaemia inhibitory factor in human endometrium throughout the menstrual cycle. *J Endocrinol*, **148** (1) : 95-102.

- Wang C., Berman NG., Veldhuis JD., Der T., McDonald V., Steiner B. et Swerdloff RS. (1998). Graded testosterone infusions distinguish gonadotropin negative-feedback responsiveness in Asian and white men – a clinical research center study. *J Clin Endocrinol Metab*, **83** : 870-876.
- Wang C., Catlin DH., Starcevic B., Heber D., Ambler C., Berman N., Lucas G., Leung A., Schramm K., Lee PW., Hull L. et Swerdloff RS. (2005). Low-fat high-fiber diet decreased serum and urine androgens in men. *J Clin Endocrinol Metab*, **90** : 3550-3559.
- Wu X., Wang P., Brown CA., Zilinski CA. et Matzuk MM. (2003). Zygote arrest 1 (Zar1) is an evolutionarily conserved gene expressed in vertebrate ovaries. *Biol Reprod*, **69** (3) : 861-867.
- Yue ZP., Yang ZM., Wei P., Li SJ., Wang HB., Tan JH. et Harper MJ. (2000). Leukemia inhibitory factor, leukemia inhibitory factor receptor, and glycoprotein 130 in rhesus monkey uterus during menstrual cycle and early pregnancy. *Biol Reprod*, **63** (2) : 508-512.

Abréviations

- AKAP : A-kinase anchoring protein
AMM : autorisation de mise sur le marché
ARN : acide ribonucléique
AVC : accident vasculaire cérébral
CAG : cytosine-adenine-guanine
DIU : dispositif intra-utérin
DMPA : depot medroxyprogesterone acetate
DSG : désogestrel
ENG : étonogestrel
ER : estrogen receptor
EVA : ethylvinylacetate
FDA : Food and Drug Administration
FSH : follicle-stimulating hormone
GAPDS : glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, spermatogenic
GnRH : gonadotropin proliferators-activated receptor
GPI : glycosylphosphatidylinositol
hCG : human chorionic gonadotrophin
HDLC : high density lipoprotein cholesterol
HIV : human immunodeficiency virus
HTA : hypertension artérielle
LDLC : low density lipoprotein cholesterol
LH : luteinizing hormone

LIF : leukemia inhibitory factor
MPA : medroxyprogesterone acetate
NETE : norethisterone enanthate
OMS : Organisation mondiale de la santé
RR : risque relatif
SERM : selective estrogen receptor modulator
SPRM : selective progesterone receptor modulator
TE : testosterone enanthate
THS : traitement hormonal de substitution
TU : testosterone undecanoate
VIH : virus de l'immunodéficience humaine
ZAR1 : zygote arrest 1

CHAPITRE 3

Obésité et diabète de type 2

JEAN-PAUL RIOU

Résumé

La recherche dans le domaine de l'obésité et du diabète de type 2 a été marquée, durant les quinze dernières années, par quatre événements majeurs :

1. La reconnaissance d'une « explosion » de la fréquence de l'obésité, **maladie de l'adaptation aux changements de l'environnement hygiéno-diététique** (diminution de l'activité physique ; augmentation de la densité alimentaire, diminution du coût des calories). Cette épidémie touche notamment les milieux les plus défavorisés et les enfants. Son apparition, associée au vieillissement de la population, est à l'origine du nombre croissant de patients atteints de diabète de type 2 : 180 millions en 2005 de par le monde, 330 millions prévus en 2025. . .
2. La reconnaissance des **fonctions endocrines du tissu adipeux**. Celui-ci n'apparaît plus comme un simple réservoir énergétique indispensable en cas de famine mais comme un tissu complexe, sécrétant de vraies hormones (leptine, résistine, adiponectine. . .) et aussi des protéines pro-inflammatoires (interleukine δ , *tumor necrosis factor alpha*. . .). Ces dernières sont probablement impliquées dans l'apparition du diabète de type 2 mais aussi dans les complications associées à l'obésité : hypertension artérielle, infarctus du myocarde, cancer de l'utérus et de la prostate.
3. Le contrôle neuro-hormonal de la prise alimentaire et ou de la dépense énergétique a révélé toute sa complexité. Il met en cause des signaux périphériques endocriniens (insuline, leptine, hormones thyroïdiennes, cortisol), métaboliques (glucose, acides gras libres) et digestifs (cholecystokinine, ghréline. . .). Ces signaux sont intégrés au niveau hypothalamique par un réseau complexe de neurones sécrétant peptides orexigènes ou anorexigènes (PYY, MSH, CRF, CART. . .). Tous ces peptides sont maintenant parfaitement caractérisés. Leurs fonctions ont été précisées grâce à de nombreux modèles de souris transgéniques. Des obésités « génétiques » chez l'homme ont été caractérisées notamment en France.
4. Le substratum génétique du diabète de type 2 (90 % de concordance chez les jumeaux homozygotes) est en passe d'être compris. Les diabètes de type MODY (autosomique dominant) sont maintenant définis et phénotypés. Le mécanisme du diabète de type 2 avec obésité androïde, caractérisé par une insulino-résistance majeure et un déficit de l'insulinosécrétion probablement précoce, reste encore mystérieux mais les progrès de la génétique et de l'épigénétique devraient rapidement déboucher sur une compréhension des mécanismes de cette pathologie.

La France, à travers l'Inserm, l'Inra, le CNRS, l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments et produits de santé, l'ANR et les ministères de la Santé et

de la Recherche, a su mettre en place, à la fin des années 1980, une vraie politique associant financement de la recherche, mesures de santé publique (programme national nutrition santé) et plus récemment soutien des réseaux diabète et obésité par la Sécurité sociale.

Ces engagements, au service de l'excellence de la recherche, ont permis à plusieurs équipes (Paris, Lyon, Toulouse, Lille. . .) d'être des leaders mondiaux dans leurs domaines.

Il est proposé que cette politique soit renforcé notamment en :

- créant de petites équipes de pointe en liaison forte avec l'industrie pharmaceutique ;
- lançant un grand projet de prévention primaire de l'obésité androïde chez l'enfant et/ou dans les milieux défavorisés ;
- favorisant des regroupements humains et technologiques sur les thèmes : nutrition, cerveau et imagerie métabolique ;
- toutes ces mesures seront sans effet si les organismes publics impliqués n'arrivent pas à simplifier l'organigramme du financement de la recherche et le travail administratif du chercheur.

Introduction

Le diabète touche environ 180 millions de personnes de par le monde et la majorité d'entre elles présente un diabète de type 2. Ce nombre déjà considérable devrait augmenter à 330 millions d'ici 2025. Cette augmentation spectaculaire de la fréquence du diabète de type 2 est parallèle à l'augmentation alarmante de *l'obésité qui est un facteur de risque majeur de diabète de type 2*. Cette double épidémie est maintenant largement reconnue et les organisations nationales et internationales commencent à prendre en compte les aspects non seulement scientifiques mais aussi économiques et sociétaux de cette pathologie.

Les quelques éléments présentés ci-dessous n'ont pas pour objectifs de présenter une revue exhaustive des recherches en cours dans ce domaine mais plutôt de faire le point sur certains aspects scientifiques et médicaux de la recherche, notamment française qui pourraient favoriser de nouveaux éclairages et susciter, de la part des pouvoirs publics, de nouvelles approches aussi bien scientifiques que médicales, voire économiques et politiques.

1 | L'obésité

1.1 Épidémiologie

L'obésité, définie dans le monde entier comme un indice de masse corporelle (poids/taille (m²)) supérieur ou égal à 30, augmente depuis vingt ans dans presque tous les pays et pas exclusivement les pays riches. En France, 10 % des adultes et 16 % des enfants sont obèses. Cette prévalence reste inférieure à celle des États-Unis (30 %) et à celles des pays de l'ex-Europe de l'Est (20 %). Deux données épidémiologiques nouvelles doivent être soulignées :

- *l'augmentation de la prévalence est surtout importante chez les enfants, conduisant à l'apparition de diabète de type 2 chez l'enfant. Il s'agit là d'une pathologie qui était inexistante il y a seulement vingt ans ;*
- *l'obésité est plus frappante dans les populations les plus défavorisées. Les données épidémiologiques françaises et nord-américaines montrent que la carte de l'obésité et du diabète de type 2 se superpose à la carte de la pauvreté. Cette relation est lourde de sens et témoigne de l'impact des facteurs éducatifs et socio-économiques au point que l'on en vient à se demander si l'obésité ne serait pas d'abord un problème économique avant de devenir un problème métabolique.*

1.2 Une maladie de l'adaptation

La reconnaissance de l'obésité comme une maladie de l'adaptation aux changements de notre environnement (diminution de l'activité physique, augmentation de la densité alimentaire et diminution « du coût des calories ») est très récente.

En France, ce n'est qu'en 1988 que la nutrition est devenue une discipline médicale universitaire à part entière. L'immense majorité des médecins praticiens n'ont eu, actuellement, aucune formation, aucun enseignement digne de ce nom sur cette pathologie, l'obésité, qui est devenue ce jour *la première cause de mortalité aux États-Unis* du fait de son association avec le diabète de type 2, les pathologies cardiovasculaires et le cancer (corps de l'utérus, prostate...). Malgré ce constat sévère, cette pathologie, notamment en France, est heureusement devenue l'objet d'une attention soutenue non seulement des instituts de recherche mais aussi du ministère de la Santé et des leaders socio-économiques des industries agroalimentaires. Plusieurs éléments de nature scientifique ont contribué à cette évolution récente.

1.3 Le tissu adipeux (TA) : un tissu complexe aux fonctions multiples

Jusqu'en 1994, le TA apparaît comme un « organe simple » ayant pour fonction de stocker l'énergie en situation d'abondance et de la libérer en situation de carence énergétique. Depuis cette époque, il est apparu que le tissu adipeux produit des signaux endocriniens et des adipokines, facteurs impliqués non seulement dans la régulation de la prise alimentaire mais aussi dans les pathologies associées à l'obésité : insulino-résistance, syndrome métabolique, athérosclérose.

1.3.1 L'adipocyte : « cellule endocrinienne »

Le rôle « endocrinien » de l'adipocyte a été révélé par la *découverte de la leptine*, identifié par clonage positionnel, comme le produit du gène *Ob* responsable d'une forme monogénique d'obésité chez la souris et chez l'homme. La leptine est une cytokine de 164 AA sécrétée par l'adipocyte dans la circulation sanguine qui agit à distance sur des récepteurs, notamment hypothalamiques. La leptine étant produite proportionnellement à la masse du tissu adipeux, son rôle pourrait être *d'informer le cerveau de l'état des réserves*, où elle exerce un rétrocontrôle négatif de la prise alimentaire et positif de la dépense énergétique. L'identification chez l'animal et chez l'homme *d'obésités monogéniques* par mutation du gène de la leptine ou de son récepteur a définitivement donné ses nouveaux quartiers de noblesse au tissu adipeux. Ce nouveau paradigme apparaît comme l'élément déterminant de la création de plusieurs groupes de recherche française sur les liens entre obésité et génétique (Paris, Lille) et entre obésité et insulino-résistance (Lyon-Toulouse).

Depuis dix ans, les travaux sur l'adipocyte ont conduit à identifier de nombreuses autres fonctions endocriniennes du tissu adipeux. Parmi celles-ci, on peut souligner le rôle du tissu adipeux dans la transformation de la cortisone inactive en hydrocortisone active. Cette interconversion périphérique existe dans le foie mais aussi dans le tissu adipeux, notamment abdominal. Elle est assurée par la 11- β -hydroxystéroïde-déshydrogénase de type 1. Cette enzyme, et les cofacteurs qui lui sont associés, pourraient être impliqués dans la genèse du syndrome métabolique. Les souris KO pour ce gène sont résistantes au diabète de type 2 induit par un régime riche en graisse alors que les souris surexprimant ce gène dans le tissu adipeux abdominal présentent un « hypercorticisme abdominal » avec diabète de type 2 et insulino-résistance sévère. Ces travaux et d'autres, notamment chez l'homme, ont conduit à l'étude qualitative du rôle des différents dépôts de tissu adipeux dans le corps. Il apparaît que *le tissu adipeux*

abdominal, du fait de sa situation et de ses propriétés spécifiques (lipolyse augmentée, production de cytokines, sensibilité à l'insuline) *pourrait jouer un rôle critique dans la genèse du diabète de type 2 associé à l'obésité.*

1.3.2 Adipokines, insulino-résistance et pathologies cardiovasculaires associées à l'obésité

L'injection de *leptine* recombinante chez des souris « lipoatrophiques » ou chez des souris obèses déficientes en leptine, améliore la sensibilité à l'insuline indépendamment de toute variation du poids ou de la prise alimentaire. Cela est en contradiction avec le fait que les patients obèses qui ont une leptinémie augmentée sont insulino-résistants. Il est probable que l'effet insulinosensibilisateur de la leptine est atteint pour des taux d'hormonémie minimale.

L'*adiponectine*, découverte en 1995, est une protéine de 247 acides aminés sécrétés spécifiquement par l'adipocyte mature. Il s'agit du *transcrit le plus abondant de l'adipocyte*. Elle circule sous des formes moléculaires variées, à des concentrations importantes : 5 à 20 mg/l. À l'inverse de la plupart des adipokines, l'expression et les concentrations plasmatiques d'adiponectine sont diminuées dans la situation d'insulino-résistance. Chez les souris, dans les modèles d'insulino-résistance et/ou de diabète de type 2, l'injection d'adiponectine inverse le processus d'insulino-résistance et améliore la tolérance glucidique. Cette action bénéfique s'accompagne d'une forte augmentation de l'oxydation des acides gras dans le muscle squelettique et d'une potentialisation de l'action de l'insuline sur la production hépatique de glucose. Enfin, l'adiponectine possède des propriétés anti-inflammatoires et athérogènes, au moins *in vitro*.

D'autres adipocytokines ont été plus récemment encore impliquées dans la genèse de l'insulino-résistance et des complications cardiovasculaires du diabète de type 2 et de l'obésité androïde. Le tissu adipeux humain produit des quantités importantes d'*IL-6* dont le rôle dans l'insulino-résistance est controversé même si sa concentration plasmatique est corrélée positivement au poids corporel et négativement à la sensibilité à l'insuline. *La résistine et le TNF- α* ont été aussi impliqués sans que leur rôle précis chez l'homme dans la pathogénie du syndrome métabolique ait été démontré.

L'ensemble de ces études a ouvert tout un champ d'investigation sur les relations entre tissu adipeux, système immunitaire et athérome. *La protéine C-réactive* dont la synthèse par le foie est contrôlée en partie par l'interleukine 6 et le TNF- α sécrété par le tissu adipeux, est aujourd'hui clairement reconnue comme un facteur de risque cardiovasculaire. Le type et la localisation du tissu adipeux péri-artériel (presque absent autour des artères des membres supérieurs) pourraient jouer un rôle majeur dans la localisation des phénomènes

athéromatose sur certains vaisseaux. Il apparaît ainsi que le tissu adipeux joue un rôle différent en fonction de sa localisation. De plus, les études très récentes montrent que ce tissu est hétérogène. Les cellules immunocompétentes en son sein commencent à être identifiées, caractérisées et impliquées dans la régulation du métabolisme et des fonctions du tissu adipeux.

L'émergence de ces nouveaux concepts a conduit à réévaluer la notion de « cross-talk » interorganes. Il apparaît ce jour clairement que le métabolisme du tissu adipeux retient sur le métabolisme musculaire indépendamment de la sécrétion d'insuline et de l'intensité de la lipolyse. L'activation du facteur de transcription PPAR γ exprimé quasiment uniquement dans le tissu adipeux, s'accompagne d'une augmentation de la sensibilité à l'insuline du muscle. Le message en retour du muscle vers le tissu adipeux a été aussi clairement démontré sur des modèles de souris KO tissu spécifique du récepteur à l'insuline.

1.4 Relations entre obésité abdominale, pathologies cardiovasculaires et diabète de type 2

Elles ont été parfaitement identifiées au niveau clinique à la fin des années 1940 par l'équipe du professeur J. Vague, précurseur en France des travaux cliniques et scientifiques sur l'obésité. Néanmoins, il a fallu attendre les années 1980 et l'apparition du concept d'insulinorésistance pour que ce syndrome pathologique soit reconnu. On considère classiquement que l'obésité gynoïde, surcharge pondérale de la partie inférieure du corps, est essentiellement source de complications mécaniques : syndrome d'apnée du sommeil, hypertension artérielle pulmonaire avec insuffisance respiratoire, gonarthrose et lombalgies, thromboses veineuses profondes, complications obstétricales... À l'inverse, l'obésité androïde, surcharge pondérale prédominante sur la partie supérieure du corps, notamment l'abdomen, est associée à des complications métaboliques endocriniennes et cardiovasculaires : diabète de type 2, dyslipidémie, hypertension artérielle, insuffisance coronaire, accidents vasculaires cérébraux, infertilité, altération de l'hémostase... Cette nosologie, particulièrement pertinente en pratique médicale quotidienne pour dépister les sujets à risque de diabète et d'HTA par exemple, a été remplacée progressivement par le terme « syndrome métabolique », syndrome regroupant au moins trois critères des complications des obésités androïdes. En fait, plusieurs définitions du syndrome métabolique ont vu le jour sous la pression plus ou moins consciente des épidémiologistes et de l'industrie pharmaceutique. On estime que 10 à 15 % de la population adulte française pourrait rentrer dans l'une ou l'autre des définitions du syndrome métabolique. On voit mal, dans ces conditions, l'industrie pharmaceutique baisser les bras dans la perspective d'un tel marché préventif. On voit aussi assez mal les pouvoirs publics s'engager dans le financement

de thérapeutiques pour une telle population alors que *les mesures hygiéno-diététiques ont fait la preuve de leur efficacité non seulement dans le traitement du diabète de type 2 associé à l'obésité androïde mais aussi dans la prévention de l'évolution de l'obésité androïde vers le diabète de type 2*. Des conflits scientifiques d'envergure ont probablement assez souvent servi d'alibi à des problématiques économiques ayant une toute autre dimension. Ces conflits ont conduit très récemment les autorités diabétologiques nord-américaines et européennes à prendre une position diamétralement opposée en remettant en cause l'intérêt scientifique et clinique du concept de syndrome métabolique. À notre avis, une telle évolution est regrettable pour des raisons médicales et scientifiques. Au niveau médical, le concept d'obésité androïde (et non pas de syndrome métabolique) permet de définir, *par la simple mesure du tour de taille, une entité clinique susceptible de guider utilement les choix du médecin dans la définition d'une stratégie thérapeutique*. Au niveau scientifique, *la caractéristique commune à tous les éléments de l'obésité androïde et/ou du syndrome métabolique est d'être associée à une insulino-résistance*. Plusieurs groupes associant chercheurs et médecins (Paris, Nice, Lyon. . .) d'envergure internationale ont contribué à déchiffrer les mécanismes moléculaires de cette résistance à l'action de l'insuline tant au niveau du muscle qu'au niveau du tissu adipeux. Des modifications profondes de l'état de phosphorylation des protéines impliquées dans la transmission du message insulinique ont été démontrées tant chez l'animal que chez l'homme. Ces altérations biochimiques persistent sur des modèles de cellules musculaires humaines cultivées *in vitro*. La question non résolue à ce jour est de savoir si l'insulino-résistance présente chez l'obèse, et notamment chez l'obèse androïde, est adaptative ou constitutionnelle. Les études chez les apparentés non diabétiques de parents présentant un diabète de type 2 suggèrent que l'insulino-résistance précède durant de longues années l'apparition du diabète suggérant que l'insulino-résistance pourrait être primitive (constitutionnelle ?). Cette hypothèse mériterait d'être confirmée. Il est aussi possible, mais ce n'est pas le paradigme ambiant, que l'insulino-résistance soit, dès le début, une réponse de l'organisme pour protéger les tissus d'un stockage sans fin d'un excès de calories glucidiques et/ou lipidiques. En faveur d'une telle hypothèse, il faut insister sur l'existence d'une hypersensibilité à l'insuline dans la phase précoce de l'obésité chez l'enfant. L'insulino-résistance, dans cette hypothèse, ne deviendrait pathogène que parce qu'elle redirigerait les substrats énergétiques vers le foie et les cellules endothéliales des vaisseaux, favorisant alors la stéatose hépatique et l'athérosclérose.

1.5 Rôle du cerveau dans la régulation de l'appétit et de la dépense énergétique

Le cerveau joue un rôle clé dans la régulation de l'appétit et de la prise alimentaire. Si les cliniciens ont, depuis longtemps, analysé cette évidence

(anorexie mentale, boulimie, obésité secondaire aux effets des neuroleptiques, développement d'antagonistes des récepteurs aux cannabinoïdes pour contrôler le poids corporel), ce n'est que dans les dix dernières années que le rôle central de l'hypothalamus a été, au moins en partie, décrypté. L'hypothalamus reçoit des signaux de la périphérie de nature hormonale et métabolique. Les influx transmis par le nerf vague envoient les informations viscérales telles que la distension gastrique, la mobilité intestinale. Les signaux hormonaux et métaboliques sont multiples (*leptine, insuline, cortisol, ghréline et cholécystokinine, glucose, acides gras*). La clarification des rôles respectifs de chacun des noyaux de l'hypothalamus reste mal élucidée, notamment du fait de la redondance des différents systèmes orexigènes et anorexigènes. Néanmoins, le décryptage de la signalisation leptinique a rapidement progressé du fait de travaux essentiellement nord-américains. La leptine, en se liant à son récepteur, inhibe l'activité des neurones synthétisant deux peptides orexigéniques (neuropeptide Y et agouti related peptide) et active les neurones synthétisant deux peptides anorexigéniques (alpha-melanocyte stimulating hormone : α MSH et cocaine amphetamine related transcript : CART). L'augmentation de la production locale de α MSH stimule le récepteur MC4R qui déclenche un signal d'arrêt de la prise alimentaire tant chez l'homme que chez le rat ou la souris. Les mutations des gènes codant la leptine, le récepteur de la leptine, la proopiomélanocortine (précurseur de l' α MSH), le MC4R, conduisent à une obésité monogénique chez l'animal et chez l'homme. La fréquence significative de cette pathologie dans l'origine de l'obésité morbide a été clairement établie par plusieurs équipes, françaises notamment.

Les signaux hormonaux périphériques sont nombreux. La cholécystokinine diminue la prise alimentaire et agit de façon synergique avec la leptine. La ghréline, sécrétée au niveau de l'estomac et du cerveau, stimule la prise alimentaire et sa sécrétion est inhibée à la suite d'un repas. *L'insuline contrôle, au niveau central, le poids corporel* comme le montre l'obésité (modérée) des souris KO pour le récepteur à l'insuline dans le cerveau. Néanmoins, l'hypoglycémie résultant d'un excès d'insuline (diabète type de 1 sous insuline, insulinome pancréatique) entraîne une faim incoercible et un gain de poids.

Récemment, on a montré que l'augmentation de la néoglucogenèse intestinale secondaire à un régime riche en protéines génère une hyperglycémie, exclusivement portale, qui signale au cerveau *via* le nerf vague de réduire la prise alimentaire. Ces découvertes sur *l'interaction intestin-cerveau dans le contrôle de la prise alimentaire renforcent l'hypothèse d'un rôle crucial de la glycémie portale comme élément central des mécanismes de l'intégration métabolique au niveau cérébral de l'état nutritionnel*.

1.6 Évaluation des politiques scientifiques, de santé publique et des industries agroalimentaires face à l'épidémie d'obésité

Si les chercheurs se sont résolument engagés dans de nouvelles approches d'étude sur l'obésité depuis une quinzaine d'années, l'environnement politico-économique d'organisation de la recherche et des soins a largement favorisé ce mouvement.

L'engagement du ministère de la Recherche et de l'Enseignement supérieur en faveur de la nutrition à la fin des années 1980, sous l'impulsion, notamment, d'équipes parisiennes et lyonnaises, a été un starter efficace *car il s'est immédiatement inscrit dans la durée*. On a pu ainsi rapidement développer l'enseignement de la nutrition et créer progressivement 4 groupements d'intérêt public : centre de recherche en nutrition humaine (Clermont-Ferrand, Lyon, Nantes, Paris). Ce mouvement, fortement soutenu par l'Inra, l'Inserm et les centres hospitalo-universitaires, a été un élément déterminant dans la création d'interfaces médicales et scientifiques entre les biochimistes, les physiologistes, les médecins, les CHU, les vétérinaires et les industries agroalimentaires. La recherche en nutrition a aussi grandement bénéficié de la création de l'Afssaps qui a permis d'insérer les choix médicaux et scientifiques dans l'ensemble du tissu socio-économique national et européen. Plus récemment, l'engagement résolu des acteurs de la recherche et des structures de soins sur l'obésité a débouché sur de grands programmes nationaux : Programme national nutrition santé, réseaux médicaux de soins des obèses et des diabétiques, loi de Santé publique 2004 sur les boissons et aliments sucrés, mobilisation des acteurs des caisses Assurances maladie, programme spécifique de l'Agence nationale de la recherche, création du *Département d'Alimentation humaine à l'Inra* prenant en compte l'aliment, de sa fabrication à son utilisation chez l'homme, et *intégrant les aspects sociétaux et économiques des choix alimentaires des Français*.

L'ensemble de ces actions a permis de structurer quelques pôles forts reconnus au niveau international et contribuant, de façon majeure, aux actions visant à comprendre, soigner et prévenir l'obésité. Il est intéressant de noter que les politiques volontaristes de l'Inra d'un côté et les politiques incitatrices de l'Inserm se sont retrouvées, grâce à quelques personnalités clés dans les deux organismes, pour travailler en commun et promouvoir des recommandations conséquentes dans le domaine de la santé publique. Un tel mouvement a été très contraignant, au bon sens du terme, pour les industries agroalimentaires qui, de plus en plus, intègrent lentement, dans leur politique commerciale, les enjeux de la santé publique.

Cette évolution doit maintenant s'étendre à une dimension européenne qu'il faut à tout prix aborder. La Politique agricole commune a été mise en place pour soutenir le revenu des agriculteurs. La santé des consommateurs n'a donc jamais fait explicitement partie des objectifs de cette politique, malgré ses effets en terme de santé. Il faut maintenant *prendre conscience que les choix de la Pac pèsent lourdement (!) sur les choix alimentaires des consommateurs*. Les choix actuels vont dans le sens d'une réduction du soutien octroyé aux agriculteurs par les prix. Il en résulte que les prix des produits auparavant soutenus (céréales, sucre, lait, beurre et viande bovine) devraient diminuer. Au contraire, les viandes de porc, de volaille, les fruits, les légumes et les huiles végétales n'étaient pas ou peu soutenus via les prix de marché. Ils ne peuvent donc que se renchérir en valeur relative. *Une telle évolution va à l'encontre des attentes santé du Programme national nutrition santé en induisant un renchérissement supplémentaire des fruits et légumes par rapport aux sucres et aux produits laitiers. Ainsi, le levier de la Pac devrait, en prenant en compte ses effets santé, amener les consommateurs à s'orienter plus sur les fruits et légumes que sur les produits laitiers et sucrés.*

2 | Le diabète

2.1 Classification, évolution de la prise en charge et de la recherche

Le diabète est défini par la constatation le matin à jeun de deux glycémies sur sang veineux $\geq 1,27$ g/l. Cette définition, acceptée et reconnue dans le monde entier, regroupe des entités nosologiques très différentes. On distingue schématiquement parmi les 2,5 millions de diabétiques connus en France : le diabète de type 1 (10 %), le diabète de type 2 (80 à 85 %) et le diabète que l'on appelait autrefois intermédiaire (5-10 %).

Nous ne traiterons pas ici du *diabète de type 1* qui résulte de la destruction, par le système immunitaire, des cellules bêta (insulinosécrétrices) des îlots de Langerhans du pancréas. La présence d'une insulite, la détection d'auto-anticorps spécifiques sur coupes de pancréas humain, la caractérisation de lymphocytes T activés contre des antigènes exprimés par la cellule bêta, font de ce diabète 1 une maladie auto-immune dont les mécanismes sont hors du propos de ce rapport centré sur les relations diabète de type 2-nutrition-obésité.

Les diabètes dits « intermédiaires » regroupent plusieurs entités comme les diabètes secondaires (pancréatite, traitement corticoïdes...), les diabètes monogéniques (*Maturity Onset Diabetes of the Youth : MODY*), les diabètes mitochondriaux et les diabètes auto-immuns de l'âge adulte (LADA).

Enfin, *le diabète de type 2* survient, en général, vers 45-50 ans chez des sujets obèses avec une prédominance notable de la surcharge graisseuse au niveau abdominal et/ou viscéral. Sa fréquence devrait augmenter de façon majeure dans les vingt prochaines années du fait du vieillissement de la population et de la persistance d'une iatrogenèse hygiénodététique. De plus, le développement de thérapeutiques préventives dans le domaine cardiovasculaire, de thérapeutiques efficaces sur l'évolution de la néphropathie diabétique, de coordination des soins du diabète entre les médecins praticiens, les spécialistes et les CHU à travers, notamment, les réseaux de soins, contribuent largement à *l'allongement considérable de l'espérance de vie des patients atteints de diabète de type 2*. Cette évolution très perceptible actuellement, devrait conduire à une large réévaluation des stratégies thérapeutiques et de l'organisation des soins en diabétologie dans les établissements publics et privés.

Tous ces états pathologiques ont en commun d'entraîner à long terme, du fait, notamment, de l'hyperglycémie, des complications micro-angiopathiques et macro-angiopathiques graves expliquant que le diabète soit la *première cause de cécité chez l'adulte avant 65 ans* dans les pays développés, la *première cause d'insuffisance rénale après 50 ans*, une cause majeure d'*amputation*, d'*accidents coronariens* et d'*accidents vasculaires cérébraux*.

La prise en compte, par les pouvoirs politiques, de l'importance du diabète de type 2 comme pathologie majeure des années actuelles et à venir est, somme toute, assez récente. Il a fallu attendre 1996 pour que la Direction générale de la santé publie une directive sur l'organisation des soins des diabétiques. Cette directive est loin d'être mise en œuvre dans toutes les régions françaises. En fait, c'est le surcoût médical et social du diabète, surcoût né de la mise en œuvre de thérapeutiques efficaces, qui a contraint les pouvoirs publics à réagir.

Les organismes de recherche tant français qu'euro-péens ou nord-américains ont été longtemps inspirés dans leur politique par une culture endocrinologique et « gènes candidat. » Cette culture a conduit à développer, peut-être à l'excès, des modèles animaux transgéniques ou non, induisant un diabète qui a, le plus souvent (pour le diabète de type 2), peu de points communs avec le diabète de type 2 de l'espèce humaine. Ces travaux ont néanmoins permis de beaucoup mieux cerner les mécanismes génétiques, biochimiques et cellulaires pouvant engendrer une hyperglycémie. On assiste, actuellement, faute de moyen pertinent d'études quantitatives chez l'homme, à une accumulation chez l'animal d'informations scientifiques sur les « diabétogènes » et à un appauvrissement des connaissances vraiment pertinentes sur les mécanismes conduisant au diabète de type 2. La physiologie du diabète de type 2 reste, à ce jour, pour le moins confuse.

2.2 Physiopathologie du diabète de type 2 : le paradigme

Le diabète de type 2 est une maladie multifactorielle résultant de l'interaction de facteurs génétiques et environnementaux. Deux mécanismes sont en cause dans la genèse du diabète de type 2 chez l'homme :

- *une insulino-résistance* qui s'exprime au niveau du muscle et du tissu adipeux par la diminution de l'action stimulatrice de l'insuline sur le transport du glucose et au niveau du foie par une diminution de l'action inhibitrice de l'insuline sur la production hépatique de glucose ;
- *une diminution de l'insulinosécrétion* qui devient, au fil du temps, incapable de compenser l'insulino-résistance.

Classiquement, l'insulino-résistance est première, le défaut insulinosécrétoire secondaire. Nous verrons plus loin que rien n'est moins sûr. Ce schéma explicatif, bien qu'admis globalement depuis vingt ans, n'est pas, aujourd'hui, démontré de façon formelle. Le développement considérable des modèles d'insulino-résistance par KO de très nombreux gènes a contribué de façon majeure à notre compréhension des mécanismes de régulation de la glycémie mais n'a, en rien, permis de confirmer cette physiopathologie du diabète de type 2 chez l'homme. Chacun des éléments de ce dogme sera discuté pas à pas sachant qu'à ce jour, aucune théorie satisfaisante ne permet d'embrasser toute la complexité des mécanismes à l'origine du diabète de type 2.

2.3 Génétique, diabète de type 2 et environnement

L'existence de diabète monogénique autosomique dominant est connue de longue date mais ce n'est que depuis douze ans que plusieurs équipes, notamment françaises, ont identifié les gènes en cause : glucokinase, hepatic nuclear factor 1α , 4α , insulin promotor factor 1, neurogenic differentiating factor 1, peroxisome proliferator activated receptor γ (PPAR γ). Comme souligné ci-dessus, ces gènes ne concernent que 2 à 4 % de l'ensemble des patients présentant un diabète de type 2. Ces travaux ont donné lieu à la prolifération de différentes souris KO chez lesquelles d'innombrables gènes candidat ont été testés. Dans l'immense majorité des cas, aucun de ces gènes ne s'est révélé pertinent pour l'explication du diabète de type 2 chez l'homme.

La contribution de phénomènes génétiques multiples pour expliquer l'insulino-résistance et/ou le déficit insulinosécrétoire est actuellement bien démontrée : concordance beaucoup plus importante du diabète de type 2 chez les jumeaux homozygotes que chez les jumeaux dizygotes, prévalence majeure du diabète

de type 2 dans certains groupes ethniques (Indiens Pimas, îles du Pacifique Sud), diminution de la prévalence du diabète de type 2 dans ces groupes ethniques quand ils sont « métissés ». L'établissement, sur de grands groupes, de l'héritabilité du diabète de type 2 montre clairement que des gènes multiples sont impliqués. Leur nombre et leurs rôles respectifs sont en passe d'être décrits, néanmoins la complexité du problème est considérable : certains gènes peuvent interagir entre eux, certains gènes peuvent contribuer à une anomalie métabolique susceptible d'être diabétogénique dans un seul phénotype, certains gènes ne peuvent être impliqués qu'à l'état homozygote. Enfin, et surtout, la susceptibilité génétique et les facteurs environnementaux (entendu au sens large) peuvent interagir de façon très diverse. Par exemple, l'excès calorique pourrait réguler des gènes impliqués dans la sensibilité à l'insuline et le vieillissement des gènes impliqués dans la sécrétion d'insuline. Du fait du rôle majeur des facteurs environnementaux, des diabètes de type 2 pourraient être essentiellement non génétiques et des diabètes de type 2 pourraient ne pas apparaître chez des individus très « susceptibles » parce qu'ils n'ont pas été exposés à ces facteurs. Les développements très récents de l'épigénétique dans ces études seront peut-être un élément déterminant de la compréhension des mécanismes liant gènes, environnement, hygiéno-diététique et diabète de type 2.

2.4 Insulinorésistance et diabète de type 2

Nous avons abordé son importance dans le chapitre obésité. Il nous faut souligner ici que, bien que l'insulinorésistance soit un phénomène très précoce dans le diabète de type 2, celle-ci peut exister de façon très prononcée sans diabète de type 2 authentique. Les obèses morbides ont une insulinorésistance majeure du muscle et du tissu adipeux alors que le diabète de type 2 n'atteint pas plus de 10 % de ces patients et celui-ci est exceptionnellement sévère. À l'inverse, des patients avec une obésité beaucoup moins sévère mais androïde et une insulinorésistance similaire ont très souvent un diabète de type 2 sévère.

Les modèles de souris transgéniques nous ont appris que les souris avec KO du récepteur à l'insuline dans le muscle présentent une insulinorésistance majeure et une discrète intolérance au glucose. En revanche, les souris KO pour le transporteur du glucose Glut IV, dont l'activité est strictement insulinodépendante, présentent une insulinorésistance et un diabète rapidement sévère.

Il a été récemment démontré qu'au niveau moléculaire, l'insulinorésistance du muscle du patient diabétique de type 2 était spécifique, c'est-à-dire différente de l'insulinorésistance de l'obèse non diabétique. Malheureusement, à ce jour, aucune méthode ne permet de caractériser *in vivo* cette spécificité. En clair, rien, au niveau clinique, ne permet de différencier l'insulinorésistance d'un patient obèse non diabétique de l'insulinorésistance d'un patient présentant une obésité

similaire avec un diabète de type 2. Il faudra probablement encore de longues années pour que l'on puisse caractériser au niveau phénotypique ces différences décelées au niveau cellulaire.

2.5 Insulinosécrétion et diabète de type 2

De nombreux éléments plaident aujourd'hui en faveur d'un rôle précoce, voire initial, d'un déficit insulinosécrétoire dans la genèse du diabète de type 2. La démonstration d'un rôle spécifique et précoce du déficit insulinosécrétoire chez le diabète de type 2 a été longue et difficile pour, au moins, trois raisons :

- le déficit insulinosécrétoire, même à la phase tardive du diabète de type 2, n'est jamais total, c'est-à-dire qu'il persiste toujours une insulinosécrétion basale ;
- le déficit ne porte que sur le couplage entre métabolisme du glucose dans la cellule β et l'insulinosécrétion ;
- sécrétion d'insuline et sensibilité à l'insuline sont intimement couplées et évoluent de façon parallèle avec l'âge sans que le lien en cause dans ce couplage et ce parallélisme soient clairement établis.

Malgré ces difficultés, de nombreux arguments chez l'homme et l'animal permettent d'affirmer que le déficit insulinosécrétoire est probablement initiateur du diabète de type 2. Il est maintenant établi que *la perte du pic précoce d'insulinosécrétion et de sa pulsativité en réponse au glucose est caractéristique de la phase initiale du diabète de type 2*. De plus, *in vitro*, l'exposition chronique des îlots de Langerhans à un excès de glucose et/ou d'acides gras entraîne une diminution de l'insulinosécrétion et une augmentation de l'apoptose. Ces observations ont été à l'origine du concept de « glucolipotoxicité ». Elles expliquent pourquoi les îlots de Langerhans prélevés sur des pancréas de sujets diabétiques de type 2 sécrètent, après deux semaines de culture, moins d'insuline que les îlots de pancréas d'un sujet normal. De nombreux autres arguments, étayant ou contredisant le rôle du déficit insulinosécrétoire, ont permis de mettre en évidence *l'importance de la plasticité de la fonction bêta-cellulaire*. Cette plasticité est non seulement fonctionnelle, mais aussi histologique, chiffrée par le nombre d'îlots et le nombre de cellules β . Cet élément, très clair chez l'animal, pourrait être identifié chez l'homme dans un proche avenir par les développements en cours de l'imagerie fonctionnelle et quantitative des îlots de Langerhans et/ou de la cellule β .

2.6 Complications micro- et macro-angiopathiques du diabète de type 2

La description de l'ensemble de ces complications a été clairement établie par les cliniciens dans les années 1950. Néanmoins, seules les données épidémiologiques des vingt dernières années ont permis de déterminer le retentissement majeur du diabète de type 2 sur les événements cardiovasculaires souvent mortels. Les mécanismes de la glucotoxicité (reins, rétine, nerfs) ont été décryptés avec la mise en évidence d'un rôle important d'un dysfonctionnement mitochondrial et d'une activation de la protéine kinase C.

La morbidité induite par ces complications va probablement beaucoup évoluer dans les années à venir. En effet, durant les vingt dernières années, on a vu, suite aux efforts des sociétés savantes, des pouvoirs publics et de l'industrie pharmaceutique, se développer de nouveaux outils thérapeutiques et une « prise en charge agressive » des diabètes de type 2. Aujourd'hui, on peut affirmer que :

- la glycémie peut et doit être contrôlée par les antidiabétiques oraux et/ou l'insulinothérapie ;
- l'hypertension artérielle peut et doit être contrôlée par les nombreuses familles de médicaments antihypertenseurs ;
- la dyslipidémie et l'athérome peuvent et doivent être contrôlés par les efforts hygiéno-diététiques et/ou les « hypocholestérolémiants » largement disponibles et totalement pris en charge ;
- la néphropathie diabétique peut et doit être arrêtée par la mise en route précoce des inhibiteurs du système rénine-angiotensine.
- les phénomènes de thrombose à l'origine des accidents cardiaques et cérébraux peuvent et doivent être prévenus par l'utilisation de l'aspirine ;
- la rétinopathie proliférante peut et doit être traitée par photocoagulation dès les prémices de son apparition.

Cette déclinaison, peut-être fastidieuse quoique incomplète, devrait permettre de penser que le traitement du diabète de type 2 est, aujourd'hui, maîtrisé. Il n'en est rien et une coordination médicale d'envergure sera nécessaire pendant de longues années pour que les réticences et/ou échappements thérapeutiques soient vaincus.

Parmi les nombreux facteurs d'échec, on peut noter :

- l'extrême difficulté de prendre de façon « *observante* » 15 à 25 comprimés par jour. Le développement d'association thérapeutique est un impératif ;
- le diabète de type 2 touche de plus en plus les populations les plus défavorisées qui n'ont pas, bien souvent pour des raisons culturelles, accès à une *médecine raisonnée, scientifique, souvent éloignée de la préoccupation de son bien-être par le patient* ;
- la mise en œuvre de ces traitements nécessite les efforts coordonnés des médecins référents, des spécialistes (diabétologues, néphrologues, cardiologues, ophtalmologues) dont le nombre est, malheureusement, encore restreint pour de longues années ;
- le coût et l'importance « psychique » de la prise en charge obligera à la définition d'objectifs thérapeutiques successifs négociés pas à pas au fil des ans, entre le patient et son médecin.

Ces perspectives « attractives » devraient contribuer à de nouvelles décisions politiques concernant une thérapie préventive du diabète de type 2 et de l'obésité. Les problématiques des organismes d'assurance maladie, publics ou privés de « prédiction génétique » du diabète et de l'obésité renvoient aux mythes inquiétants de la toute puissance médicale et de la « normalisation » d'un nombre considérable de sujets. Les stratégies d'intervention médicale et raisonnée sur le comportement alimentaire et l'activité physique, bien souvent tenues en échec, doivent être maintenant envisagées sous un angle économique et sociétal plutôt que médical.

2.7 Évaluation des politiques scientifiques, de santé publique et des industries pharmaceutiques

La politique scientifique, dans le domaine de l'obésité et du diabète de type 2, a clairement contribué à l'apparition d'un niveau d'excellence de la recherche française. Tant en termes de quantité que de qualité, la France est dans le groupe des cinq premières nations dans le monde. Les financements additionnels conséquents obtenus grâce aux contrats avec la nouvelle Agence nationale de la recherche contribuent à la création en cours de centres français de plus en plus cohérents. On peut citer, parmi beaucoup d'autres :

- la confirmation de l'envergure des équipes parisiennes dans le domaine de l'obésité morbide, de la génétique et de l'épigénétique de l'obésité, du mécanisme d'action de l'insuline sur le foie et le tissu adipeux, des relations entre poids corporel, consommation alimentaire des Français et

industries agroalimentaires, de l'épidémiologie des maladies cardiovasculaires associées au diabète ;

- le développement des compétences en génétique du diabète de type 2 et de l'obésité à Paris et à Lille et Toulouse ;
- les performances dans le domaine des relations entre dyslipoprotéïnémie et athérome à Paris, Dijon, Lille, Lyon, Marseille ;
- les travaux des équipes autour du CRNH de Lyon sur les mécanismes génétiques de l'insulinorésistance chez l'homme, sur la signalisation cérébrale des signaux post-prandiaux dans la veine porte, les relations obésité-cancer ;
- les travaux des équipes parisiennes et niçoises sur la signalisation insulinoïque et le transport du glucose ;
- les travaux sur la prévention de l'obésité par l'activité physique chez les adolescents de la région strasbourgeoise.

Malgré cette qualité et ce développement significatif de l'activité de recherche, des domaines très importants de la recherche sur le diabète et l'obésité sont absents ou seulement en émergence. On peut citer :

- **la neurophysiologie** du comportement alimentaire étudié dans bien peu d'équipes (Paris et Dijon) ;
- **l'insulinosécrétion** tant au niveau physiologique que biochimique, effectivement maîtrisée par seulement une ou deux équipes à Paris ;
- seulement trois équipes (Paris, Lyon et Strasbourg) qui ont eu la capacité et la compétence suffisantes pour être leader dans trois essais thérapeutiques en relation avec l'obésité, la nutrition et les pathologies cardiovasculaires. Aucune d'entre elles n'est leader dans des essais thérapeutiques de taille européenne ou mondiale.

Au niveau de la santé publique, les actions conjointes de l'Inserm, de l'Inra, des grandes mutuelles, de la Direction générale de la santé, ont contribué, de façon majeure, à la diffusion de messages clairs sur le diabète et l'obésité auprès du grand public et des acteurs de la santé. Ces actions, très conséquentes au niveau financier, doivent être évaluées avec l'ensemble des acteurs par des experts extérieurs afin de *mieux identifier les cibles de la prévention*. Il est possible, voire probable, que le discours raisonnable et raisonné sur la prévention de l'obésité par l'activité physique et une alimentation saine et équilibrée, devra trouver d'autres modes d'expression mettant en jeu, notamment, les mythes et

les symboles inscrits dans la notion de faim, d'appétit, de plaisir alimentaire. Il devra aussi s'inscrire dans les programmes éducatifs dès le plus jeune âge. La nouvelle loi sur la santé publique mettra, peut-être, en place les éléments d'une telle réflexion qui devra impérativement sortir des sentiers battus.

L'industrie pharmaceutique joue et jouera un rôle majeur dans ces évolutions. Elle finance, actuellement, très largement des recherches très ciblées au niveau moléculaire pour trouver le ou les quelques protéines qui pourraient jouer le rôle de chef d'orchestre de la genèse du diabète de type 2. Ce rêve, en relation avec la mondialisation de ces groupes industriels, est peut-être fantasmatique. Il est possible, voire probable, que les thérapeutiques du diabète de type 2 auront à s'adapter aux caractéristiques socioculturelles des patients. Les interactions gènes-nutriments en cours de décryptage et le fond génétique des populations, lui aussi à l'étude, pourraient modifier profondément certaines attitudes thérapeutiques.

Recommandations

- Poursuivre les actions de regroupement des divers EPST sur la problématique obésité et diabète de type 2 avec, pour objectif, de soutenir, d'une part, des *actions de recherche d'envergure européenne* et, d'autre part, de *faire émerger de petites équipes* de pointe sur des stratégies et des hypothèses originales. Il faut noter que la créativité des équipes est souvent modulée, voire bridée, par les choix financiers des industries pharmaceutiques dont les cibles de recherche visent plus souvent une valorisation à court terme qu'un développement original et risqué.
- Définir quelques axes radicalement nouveaux permettant des regroupements thématiques originaux. Parmi ceux-ci, on pourrait insister sur :
 - *nutrition et cerveau* en tirant partie des compétences nationales en neurosciences et en nutrition ;
 - *imagerie métabolique* pour quantifier les cellules bêta, les différents types de dépôts lipidiques, la stéatose hépatique, en combinant les acquis de la biologie cellulaire et les nouveaux outils de l'imagerie par fluorescence *in vivo* chez l'animal et l'homme.
- Proposer des moyens à deux ou trois centres français (avec une aide conséquente des centres hospitaliers, des mutuelles et des organismes de Sécurité sociale), d'organiser et de réaliser *des projets de prévention primaire de l'obésité androïde* dans les populations défavorisées et/ou les apparentés de patients diabétiques de type 2.
- Soutenir la création d'unités mixtes de recherche entre CHU et EPST en gardant le même niveau de recherche de l'originalité et de l'excellence.

- De telles évolutions ne seront pas possibles sans la mise en place de structures administratives communes et simplifiées. La multiplicité incontournable des partenaires dans ces constructions sera certainement source d'une complexité de gestion incompatible avec le bon fonctionnement de groupes de recherche. Là aussi il faut donc inventer.

Références bibliographiques

- Basdevant A., Laville M. et Lerebours E. (2001). *Traité de nutrition clinique de l'adulte*. Médecine Sciences Flammarion, Paris.
- Grimaldi A. (2005). *Traité de diabétologie*. Médecine-Sciences Flammarion, Paris.
- Kahn CR., Weir GC., King GL., Jacobson AM., Moses AC. et Smith R.J. (2005). *Joslin Diabetes Wellitas*. 14th ed. Lippincott Williams and Wilkins.
- Haëffmer N. (2005). *Recherches sur le diabète en France*. Données bases web of Sciences Inserm Paris.
- Kahn R., Buse J., Ferrannini E. et Stern M. (2005). The Metabolic Syndrome: time-for a critical appraisal. *Diabetes Care*, **28** : 2289-2304.

Remerciements

Jean-Paul Riou remercie Martine Laville, Chantal Simon et Hubert Vidal pour la relecture critique de ce rapport.

Abréviations

Afssaps : Agence française de sécurité sanitaire des produits de santé
AgRP : agouti-related protein
CART : cocain and amphetamine related transcript
CRF : corticotrophin-releasing factor
HTA : hypertension artérielle
IL-6 : interleukine 6
LADA : latent autoimmune diabetes in adult
MC4R : récepteur des mélanocortines de type 4
MODY : matyry onset diabetes of the youth
MSH : melanocyte stimulating hormone
PPAR : peroxisome proliferator-activated receptor
PYY : peptide YY
TA : tissu adipeux
TNF : tumor necrosis factor

CHAPITRE 4

Hormones, longévité et vieillissement humain

ÉTIENNE-ÉMILE BAULIEU, YVES LE BOUC, JEAN-CLAUDE SOUBERBIELLE
ET ALEX VERMEULEN

Résumé

Molécules d'information contrôlant en grande partie le fonctionnement de l'organisme, coordonnant ses différentes parties et l'adaptant, avec le système nerveux très souvent, aux conditions de l'environnement, les hormones sont nécessairement impliquées dans les causes et les conséquences qui caractérisent l'extraordinaire accroissement de la durée de la vie humaine que l'on enregistre actuellement.

Leur synthèse et leur métabolisme sont largement déterminés génétiquement. Ils varient avec l'âge, et les circonstances matérielles et mentales de l'existence, et influencent à leur tour les comportements comme les fonctions physiologiques. Parmi la centaine de composés hormonaux actuellement connus, nous décrivons ici les modifications des principaux qui sont produits et sécrétés par les glandes endocrines en commençant par celles des hormones sexuelles synthétisées par les glandes génitales, brusquement arrêtées chez la femme à la « **ménopause** », et déclinant progressivement chez l'homme sans que l'on puisse vraiment décrire en parallèle une « **andropause** » qu'il faille utilement compenser. Les hormones produites par les glandes corticosurrénales sont l'objet d'une dissociation surprenante au cours de l'âge : si la « cortisone » humaine (cortisol) et l'autre composé stéroïdien (dérivé du cholestérol), l'« aldostérone », qui contrôle le métabolisme du sel, ne se modifient pas beaucoup avec le vieillissement, la DHEA (déhydroépiandrostérone) diminue régulièrement et se précise alors un déséquilibre (« **adrénopause** ») dont on analyse ici les conséquences et l'éventuelle correction. Un troisième axe endocrinien dont les principaux composés sont l'hormone de croissance hypophysaire et un composé dont elle stimule la formation dans le foie, l'« IGF-1 » (insulin-like growth factor 1), tend à diminuer d'importance (« **somatopause** ») sans qu'on doive conseiller sa compensation dans un but préventif ou thérapeutique.

Les modifications des hormones de ces trois grands axes interagissent entre elles et avec celles de nombreuses autres molécules endocriniennes pour entraîner des changements caractérisant l'évolution de l'organisme vieillissant. Nous en décrivons trois qui sont particulièrement importantes : la première concerne la diminution de la réactivité de l'organisme à des stimulations généralement extérieures, quelquefois mentales : ce sont les réactions au **stress** et la constitution des réponses adéquates à la survie en bonne forme : le domaine est complexe et des hormones importantes comme le cortisol peuvent jouer des rôles salvateurs et entraîner secondairement des déficits métaboliques sérieux. Un autre ensemble hormonal qui peut être modifié correspond à l'augmentation de la synthèse de graisses et à la diminution de celle des protéines qui surviennent avec l'âge, s'associant à une « résistance à l'effet de l'insuline » dont la production tend à s'élever, constituant une « **maladie métabolique** » dont le diabète

de type 2 est une expression pathologique. Le **système nerveux central** répond aussi aux modifications hormonales, et on y observe le rôle de molécules telles que les « neurostéroïdes » impliqués dans la fonction mnésique et certains comportements selon des mécanismes en cours d'études.

Parmi les **autres** hormones se modifiant avec l'âge, nous traitons ici la mélatonine, les hormones thyroïdiennes et des composés calciotropes (hormone parathyroïdienne et vitamine D préhormonale).

L'exposé se termine par une évaluation globale de la **fragilité** associée au vieillissement et de son **hormonosensibilité**, permettant d'espérer encore des progrès pour faire de l'extension de la longévité en bonne santé physique et mentale un des objectifs biomédicaux les plus importants du nouveau millénaire.

Introduction

De mémoire d'homme, on reconnaît la diversité remarquable de notre vieillissement. Selon l'individu, et chez chaque individu, il peut affecter différemment la force musculaire et la solidité des os, l'aspect de la peau et des phanères, l'ensemble cardiovasculaire, les réseaux de défense immunitaire, le système nerveux anatomiquement et fonctionnellement, etc. En examinant les modalités du vieillissement, on retrouve à la fois le polymorphisme génétique des êtres humains et la variété infinie de l'environnement : les conditions de travail, l'alimentation, les climats, les événements affectifs de tout genre, les comportements. Toutes les composantes de la façon de vieillir peuvent influencer différemment la longévité et ses caractéristiques physiques et mentales. « Bien vieillir », « successful aging », « longévité active », un désir général d'autant plus intense que notre espèce se trouve en prise avec un phénomène extraordinaire, unique dans l'histoire du monde vivant : une augmentation moyenne de la durée de la vie de l'ordre de 50 % en un siècle, et qui ne semble pas devoir s'arrêter, la moitié des enfants nés depuis l'an 2000 dans les pays les plus avancés pouvant atteindre 100 ans. Quel bouleversement ! Le monde en développement semble suivre, alors que la limitation des naissances n'y est pas encore suffisante et que la démographie continue à augmenter – avec quelles conséquences sociales partout, si les personnes âgées ne sont pas en bonne santé physique et mentale ! Et que de difficultés personnelles à prévoir, au point que l'on ne peut souhaiter cette prolongation de l'existence que si nous apprenons à mieux maîtriser des ans de réparables outrages. La meilleure compréhension du rôle des hormones et de leur utilisation (ou de celles d'analogues de synthèse), comme traitements correcteurs s'il le faut, sont au premier rang des efforts à mettre en œuvre pour éviter certaines des conséquences délétères d'une formidable modification du

curus de notre existence. Espérons que la transformation (en bonne santé mentale et physique) active et prolongée de la dernière partie de la vie humaine soit une des caractéristiques les plus importantes du millénaire qui commence.

Le système hormonal inclut au premier chef les composés sécrétés dans la circulation sanguine après leur synthèse par les *glandes endocrines* décrites classiquement : hypophyse, glandes génitales, glandes surrénales, pancréas, thyroïde et parathyroïdes. L'ensemble contrôle une très large fraction des fonctions des organes et des métabolismes. On décrit encore actuellement de nouvelles hormones (dérivé du grec *ωρμειν*, agir), produites par des tissus ne formant pas de glandes anatomiquement définies mais distribuées par le sang comme les produits classiques. On met aussi en évidence depuis peu la production de composés de même structure que les hormones classiques, mais qui agissent au plus près de leur synthèse, sur les cellules voisines (paracrines) ou même celles qui les ont formées (autocrines). Tous ces composés peuvent avoir des activités différentes selon le lieu de leur synthèse et varier au plan quantitatif comme dans leurs effets au long de la vie de l'organisme : l'effet des molécules dépend des circonstances temporelles et environnementales.

Au début de ce chapitre nous analysons les modifications les mieux connues, survenant avec l'âge, de la production et de l'action de plusieurs séries hormonales, leurs conséquences, et ce que l'on peut attendre de « traitements » correcteurs correspondants, qui visent à se rapprocher des normes observées chez l'individu normal encore jeune adulte. Nous commencerons par les changements les plus anciennement rassemblés sous les appellations de ménopause/andropause pour les hormones sexuelles, d'adrénopause pour celles des glandes corticosurrénales (« adrenals ») et de somatopause pour ce qui concerne l'hormone de croissance GH (growth hormone) et le réseau complexe auquel elle participe.

Les effets les plus préjudiciables du vieillissement « normal » – mis à part des affections devenant plus fréquentes au cours de l'âge, comme les cancers, les maladies neurodégénératives et les graves altérations cardiovasculaires – incluent le plus souvent un certain déclin neurosensoriel, un affaiblissement musculaire avec diminution du volume des muscles, une tendance à la perte osseuse et à la fragilisation des os, des modifications du métabolisme des glucides (avec résistance à l'insuline et tendance à l'hyperglycémie) et des lipides (impliqués en particulier dans l'athéromatose). Ces anomalies créent l'état de « frailty » des Anglo-Saxons, fragilité qui rend l'organisme plus susceptible de dysfonctionnements physiques et comportementaux. C'est d'autant plus le cas que se produisent souvent une insuffisance des réponses immunitaires et des troubles cognitifs, l'ensemble diminuant progressivement la compétence de chacun à une vie autonome (d'où l'augmentation coûteuse et souvent attristante des admissions dans des maisons de retraite).

Rassemblant les données de plusieurs ensembles physiologiques, on traitera, dans la deuxième partie de ce chapitre, d'une endocrinologie plus intégrée qui rend compte en partie des difficultés physiques et mentales du vieillissement que l'on espère devenir progressivement plus accessibles à une correction (partiellement au moins) efficace. Il s'agit des phénomènes hormonaux au cours du stress, des modifications métaboliques (le danger de l'obésité et du diabète, l'action de l'insuline), et ceux impliqués dans le vieillissement du système nerveux.

1 | Trois séries hormonales modifiées avec l'âge

1.1 Des changements majeurs de la fonction des gonades et de la reproduction : les hormones sexuelles

Les hormones sexuelles, que sont les œstrogènes, la progestérone et les androgènes, sont de structures stéroïdiennes assez voisines. Présentes dans les deux sexes en proportions inégales, elles subissent des modifications temporelles différentes chez les hommes et les femmes, associées à l'amaigrissement (chez l'homme) ou l'arrêt (chez la femme) de la fonction reproductrice. Il s'ensuit aussi des modifications importantes et complexes de la composition et du fonctionnement de tout l'organisme.

1.1.1 La ménopause

La ménopause est traitée assez brièvement ici, car on trouvera de très importants développements à son sujet dans les chapitres de cet ouvrage écrits par Henri Rochefort (chapitre 1) et Philippe Bouchard (chapitre 2).

La cessation de l'ovulation, et donc de la fonction reproductrice, est le changement essentiel. La ménopause survient à environ cinquante et un ans sans qu'il y ait eu de modification à cet égard depuis un siècle et demi au moins, alors que progressait la durée de vie. Ainsi, la durée de la période post-ménopausique, hypohormonale en matière de stéroïdes sexuels, est maintenant du même ordre que celle qui sépare la puberté de la ménopause, sans que l'on ait à attendre longtemps pour qu'elle devienne plus longue encore. On mesure l'importance croissante d'une prise en charge de cette nouvelle période de la vie des femmes dans un contexte hormonal profondément modifié. L'augmentation cyclique de l'œstradiol circulant, liée au développement ovarien approximativement mensuel depuis la puberté, ne se produit plus, et seul persiste très longtemps un taux permanent très faible d'œstrogènes. La production épisodique de progestérone par le corps jaune cyclique disparaît. On ne sait toujours pas si l'arrêt de l'ovulation et des sécrétions hormonales corrélatives est primitivement d'origine ovarienne, ou si le changement initial se produit du fait d'une altération

« centrale », hypophysaire ou neurohypophysaire, ou si les deux sont indépendamment et simultanément en cause.

Chez de nombreuses femmes, la suppression brusque des œstrogènes s'accompagne souvent de troubles vasomoteurs (bouffées de chaleur, seulement pendant quelques années dans bien des cas), de diminution de la masse musculaire, d'augmentation de la graisse corporelle et de l'amincissement de la peau, qui devient plus sèche. L'insuffisance œstrogénique est aussi fréquemment accompagnée d'ostéoporose, de troubles cardiovasculaires, d'atrophie de la muqueuse vaginale, de tendances dépressives et de modifications de la cognition. Des traitements œstrogéniques de remplacement (ERT : estrogen replacement therapy), différents selon les molécules utilisées, leurs doses, les rythmes d'administration et l'association ou non de progestérone ou d'un dérivé synthétique progestagène, ont été largement utilisés au cours de la deuxième moitié du XX^e siècle. Ils suppriment les bouffées de chaleur, améliorent les défauts cutanés et muqueux et sont efficaces pour prévenir et traiter l'ostéoporose. Des études récentes ont mis en doute ses effets bénéfiques sur l'athérosclérose et les troubles cérébraux (on avait remarqué et interprété de façon excessive un effet de retardation ou d'atténuation de la maladie d'Alzheimer). On a même détecté une augmentation très modeste mais réelle des cancers du sein – en particulier chez des femmes génétiquement à risque (cas familiaux, détection d'un marqueur génétique). Les travaux récents étudient l'utilité possible de nouveaux dérivés de synthèse agissant au niveau des récepteurs nucléaires des œstrogènes et en modulant le fonctionnement de façon différentielle, en particulier selon les organes (« SERM » pour selective estrogen receptor modulators). L'idéal est d'obtenir un effet anti-œstrogène (et donc protecteur contre le cancer) au niveau du sein, et œstrogénique (et donc favorable) au niveau de l'os. Un produit comme le tamoxifène montre une qualité certaine à cet égard, et des études sont en cours avec le raloxifène. Mais les effets sur les lipides et le cerveau restent encore à préciser, et la recherche de composés plus sûrs dans le domaine des progestines (« SPRM » : selective progesterone receptor modulators) est encore à ses débuts. Les recherches fondamentales font intervenir les relations entre structures, métabolisme et effets de nombreux dérivés, en particulier l'activation différentielle des récepteurs de type α et β des œstrogènes et A et B de la progestérone, dans des milieux biologiques distincts que constituent les cellules cibles de types différents exprimant des cofacteurs particuliers de transcription. On trouvera dans le chapitre 2 une revue critique des traitements de la ménopause, dans le chapitre 1 celle des rapports entre cancers et hormones et plus loin dans ce texte certains aspects des effets hormonaux sur le système nerveux, permettant d'essayer de prévenir ou guérir les altérations associées aux différents aspects de la vie après la ménopause. Nous avons essayé de présenter des conclusions réfléchies, prudentes et actives, adaptées aux connaissances actuelles qui, bien entendu, ne manqueront pas d'être encore approfondies.

1.1.2 L'« andropause » (avec Alex Vermeulen)

Chez l'homme vieillissant, les modifications de l'axe hypothalamo-hypophysio-gonadique sont beaucoup plus limitées et moins rapides que chez la femme. Cependant, dans les testicules, le nombre des cellules de Leydig qui produisent de la testostérone (T) diminue, ainsi que le niveau de la sécrétion de testostérone, de base ou après stimulation par la gonadotrophine LH.

La fonction endocrinienne du testicule décline donc avec l'âge. Dans la circulation générale, les androgènes les plus importants sont, avec T, la 5-alpha-dihydrotestostérone (DHT) et l'androstènedione. Quoique la DHT soit plus puissante au niveau moléculaire, l'androgène plasmatique le plus important est bien la T du fait de sa concentration majoritaire. Elle circule dans le plasma principalement liée aux protéines plasmatiques : 40 à 50 % sont liées à la SBP (sex steroid binding plasma protein; encore appelée SHBG : sex hormone binding globulin), 50 % interagissent de manière non spécifique à l'albumine, et 1 à 2 % sont « libres », seulement dissoutes. On considère généralement que la fraction libre et la fraction liée à l'albumine, qui se dissocie dans une large mesure pendant le transit vers les tissus, constituent ensemble la fraction biologiquement active, disponible pour les tissus (BioT). Dans la plupart des tissus, sauf les muscles, la T est transformée en DHT avant de se lier au récepteur des androgènes. La signification clinique du taux de DHT plasmatique est très limitée, car elle ne représente qu'une petite fraction de la DHT qui est formée essentiellement au niveau des cellules cibles sur lesquelles elle agit. L'androstènedione est essentiellement une prohormone dont l'activité dépend de la transformation au niveau des tissus en androgènes actifs. Mentionnons encore que les effets biologiques de la T sont en partie médiés par l'oestradiol qui, chez l'homme, provient pour 80 % de la T circulante ; cette hormone « féminine » est, chez le sujet vieillissant, plus élevée dans le sang (de façon modeste) que chez la femme au même âge.

Alors que chez les adultes jeunes, les taux sanguins de T varient entre 11 et 35 nM (3,2 ng -10 ng/ml), ils diminuent lentement avec l'âge, pour ne plus représenter à soixante-quinze ans que les deux tiers des taux à vingt-cinq ans. Comme les taux de la SBP augmentent avec l'âge, la BioT diminue d'une manière plus prononcée, et à soixante-quinze ans elle est inférieure de moitié à ce qu'on observe à vingt-cinq ans. À tout âge, les variations interindividuelles sont très importantes : au-delà de soixante ans, 20 % des hommes ont des taux se situant dans le tiers supérieur des valeurs chez les jeunes, et plus du quart ont des valeurs en dessous de la limite inférieure des jeunes, ce chiffre étant même plus important pour la BioT. Les taux de DHT ne varient pratiquement pas avec l'âge, et les taux de l'androstènedione diminuent parallèlement à la T. Comme le vieillissement s'accompagne d'une diminution des taux des androgènes et d'une symptomatologie rappelant celle de l'hypogonadisme chez les

jeunes, certains auteurs parlent d'une andropause, en quelque sorte symétrique à la ménopause. Cette terminologie semble inappropriée : en effet, la ménopause signe, chez *toutes* les femmes, la fin de la période fertile et de la sécrétion cyclique des stéroïdes ovariens, alors que chez l'homme la fertilité persiste souvent jusqu'à un âge très avancé, que la diminution des taux des androgènes est lente et que beaucoup d'hommes âgés ont des taux de T dans les limites normales observées chez les jeunes. Un déficit significatif des androgènes ne concerne donc qu'une minorité des hommes âgés.

On peut se poser la question de la conséquence physiologique et de la signification clinique de cette diminution des androgènes. Le vieillissement se caractérisant par le déclin de la plupart des fonctions physiologiques comme le débit cardiaque, la capacité ventilatoire, la clairance rénale, la sécrétion de l'hormone de croissance et de la mélatonine et un certain sédentarisme, on ne peut s'attendre à de fortes corrélations avec les seuls taux de BioT.

Par exemple, en ce qui concerne l'ostéoporose des hommes âgés (après 80 ans), les études transectionnelles donnent des résultats assez divergents, certaines études ne montrant aucune corrélation avec T, d'autres trouvant une faible corrélation négative, moins significative qu'avec les taux des œstrogènes chez la femme. Les études prospectives montrent d'ailleurs une corrélation négative avec l'œstradiol, indépendante de celle d'avec T.

Le vieillissement de l'homme s'accompagne souvent d'une diminution significative de la masse musculaire et d'une augmentation de la masse grasseuse et de la prise de poids. Tous les auteurs trouvent une corrélation négative entre les taux de T et la prise de poids ou la masse grasseuse. On ne sait cependant pas si, le plus souvent, l'hypotestostéronémie est cause ou conséquence de l'obésité. La plupart des auteurs trouvent une association positive du taux de T avec la masse et plus rarement la force musculaire.

Alors que chez les adultes la cholestérolémie totale et le cholestérol associé au LDL sont plus élevés chez l'homme que chez la femme, et que les femmes virilisées (PCO, hirsutisme) ont des taux de cholestérol élevés, la plupart des auteurs trouvent néanmoins, et ce dans toutes les ethnies, une corrélation inverse entre les taux de T, un lipidogramme athérogène, l'athéromatose coronarienne, ou l'épaisseur de l'intima coronarienne. Il semble que chez les hommes âgés, les taux de T modérément abaissés s'accompagnent d'une fréquence accrue d'athéromatose et d'ischémie coronarienne, mais, ici aussi, la causalité n'est pas démontrée.

Sans aucun doute, la baisse de la T joue un rôle dans la diminution de la libido et de l'activité sexuelle des hommes âgés, mais il semble que le taux minimal requis pour une activité sexuelle normale soit assez bas, ~3 ng/ml

(10 nM), et la corrélation entre libido et T est faible. L'impuissance sexuelle, dont la fréquence augmente de façon importante avec l'âge, n'a que rarement une origine hormonale chez l'homme âgé, quoique la T puisse jouer un rôle.

Quant aux effets de la T sur les fonctions cognitives, la plupart des auteurs rapportent une corrélation positive entre les taux de T et la mémoire visuelle ou verbale. Alors que le vieillissement s'accompagne souvent d'un déclin de la qualité de la vie, les rares études disponibles ne révèlent aucune corrélation avec la testostéronémie.

En résumé, on observe souvent chez les hommes âgés une corrélation, réelle mais faible, entre la T plasmatique et les symptômes du vieillissement. Il est évident que les androgènes ne constituent qu'un des multiples facteurs déterminant la symptomatologie observée chez les hommes âgés.

Un « traitement » par les androgènes ? Faut-il croire aux résultats rapportés par Brown-Séquard, à la fin du XIX^e siècle, décrivant un effet remarquable sur l'énergie, la mémoire, l'activité sexuelle chez les hommes à qui il administrait des extraits de testicules d'animaux ? Au-delà des imprécisions cliniques et de l'absence possible d'hormones actives, quel était l'effet « placebo » du traitement préconisé par ce grand professeur au Collège de France ? Pour l'envisager chez l'homme âgé, il faut en tout cas diagnostiquer l'hypogonadisme. Comme il n'existe pas de signe clinique pathognomonique d'une déficience en androgènes chez l'homme âgé, une confirmation biochimique est requise. Mais ce n'est pas sans problème. N'ayant à disposition aucun paramètre pratique de l'action tissulaire des androgènes, on doit se baser sur les taux plasmatiques des androgènes. On ne connaît pas les besoins en androgènes des hommes âgés : sont-ils similaires, supérieurs ou inférieurs aux besoins des jeunes ? Il existe des arguments aussi bien pour une sensibilité accrue aux androgènes que pour une sensibilité diminuée. À défaut d'arguments définitifs et comme des études récentes ont démontré que la réponse à différentes doses d'androgène est similaire chez les personnes âgées et les jeunes, on utilise les mêmes critères de normalité des taux de T qui doivent de plus être établis pour chaque laboratoire. Il ne semble pas indiqué de se baser sur une normalité différente en fonction de l'âge, ce qui impliquerait que le vieillissement normal n'est, par définition, pas accompagné d'un hypogonadisme, ce qui est fort discutable. Il reste que le diagnostic de l'hypogonadisme partiel de l'homme âgé ne peut être retenu qu'en présence de signes cliniques suggestifs et de taux de T inférieur à la normale.

Les effets de l'administration d'androgènes aux personnes âgées ne peuvent être évalués qu'à partir d'études contrôlées en double aveugle et de préférence de longue durée. Une revue de la littérature révèle que dans plusieurs études les sujets incorporés n'étaient pas hypogonadiques, leurs taux de T se situant

dans les limites de la normale. Les études vraiment contrôlées visant à obtenir des taux physiologiques de T et s'étendant sur une période d'au moins un an de traitement ne concernent que quelques centaines de sujets. Le traitement aux androgènes n'a d'effets favorables sur la densité osseuse que chez les hommes dont la testostéronémie était nettement en dessous de la limite normale, mais sa signification clinique en termes de réduction du nombre des fractures n'a pas encore été démontrée.

De même, si le traitement androgène entraîne une augmentation modérée de la masse musculaire et une diminution de la masse graisseuse, essentiellement paraviscérale, plusieurs auteurs n'ont pu démontrer ni un effet sur la force musculaire ni une amélioration de la mobilité ou l'autonomie fonctionnelle ou une diminution du risque des chutes. On accepte actuellement l'idée que l'administration de T ou de ses analogues de synthèse semble n'être très active qu'en association avec un exercice physique approprié.

Alors que chez les personnes âgées, les taux bas de T sont associés à un risque accru d'athéromatose et de maladies cardiovasculaires, l'administration de T ne semble avoir d'effets ni sur l'incidence de maladies cardiovasculaires, ni sur leurs facteurs de risque. Cependant, des doses relativement élevées peuvent entraîner des modifications défavorables des lipides du sang.

Quoique l'administration de T augmente la durée et la rigidité de l'érection, elle semble avoir peu d'effets sur l'activité et l'appétit sexuels car l'athérosclérose, le tabagisme, l'excès d'alcool et les facteurs psychologiques sont prépondérants. En revanche, le traitement semble avoir dans quelques études des effets favorables sur les fonctions cognitives, essentiellement sur la mémoire spatiale et verbale.

En résumé, les effets sérieusement démontrés sur la qualité de la vie semblent peu probants, mais la sensibilité des tests d'évaluation utilisés est peut-être insuffisante.

En ce qui concerne les modalités du traitement aux androgènes, jusqu'à récemment la pratique la plus courante était l'injection intramusculaire de cypionate ou d'œnanthate de testostérone, 250 mg toutes les deux semaines, donnant transitoirement des taux supraphysiologiques de T, suivis d'une diminution lente pour atteindre, après quinze jours, des valeurs à la limite inférieure (ou légèrement en dessous) de la normale. Ces variations des taux sont ressenties comme désagréables par le sujet et d'ailleurs pourraient favoriser des effets secondaires (polycythémie, dyslipidémie. . .). La seule forme galénique active par voie orale est le décanoate de T qui, à la dose de 3×40 mg/j, donne des concentrations de T sanguine dans les limites physiologiques, avec maximum après 3-4 h et durée totale de 6-8 h. Les dérivés synthétiques méthylés en position 17 de la T

sont hépatotoxiques. Récemment des patchs dermiques (certains au niveau scrotal) ont été mis sur le marché ; délivrant ± 5 mg/j de T, ils donnent des taux et des variations nyctémérales physiologiques. Ils provoquent parfois une irritation locale. Une nouvelle forme galénique consiste en un gel à 1 % de T : 2,5 à 10 g appliqués sur les bras ou le ventre permet d'obtenir des concentrations sanguines physiologiques ; le traitement journalier ne provoque pas d'accumulation, et la dose peut être aisément adaptée aux besoins. Rappelons que tout traitement peut avoir de sérieux effets secondaires : stimulation d'un cancer de la prostate (voir chapitre 1), polycythémie, apnée nocturne.

En conclusion, il est bien établi que le vieillissement de l'homme s'accompagne d'un déclin progressif de la BioT, mais il est interindividuellement variable. Étant donné le caractère partiel de cette déficience et la persistance de la fertilité, il est abusif de parler d'andropause. Vu la multiplicité des altérations physiologiques induites par le vieillissement, la signification clinique et le rôle de l'hypogonadisme ne sont pas toujours évidents. Néanmoins, on peut considérer que l'hypotestostéronémie joue au moins un rôle dans certains symptômes, comme l'ostéoporose ou la perte de la masse musculaire. Avant d'entamer un traitement aux androgènes, il faut un diagnostic d'hypogonadisme avéré, pour lequel on se basera sur la clinique et sur les taux de BioT, même si la clinique est peu spécifique et les besoins réels en androgènes des hommes âgés difficiles à définir. Quoique le traitement entraîne une augmentation de la masse osseuse et une amélioration de la composition corporelle, on n'a, jusqu'à présent, pas pu vraiment démontrer des bénéfices cliniques fonctionnels. Vu les effets secondaires potentiels, surtout concernant la prostate et la polycythémie, un contrôle suivi s'impose et on attendra des études plus importantes portant sur plusieurs années avant de préconiser un traitement plus fréquemment prescrit. On souhaite des composés thérapeutiques dissociant les effets anaboliques souhaitables des inconvénients, en particulier au niveau de la prostate, mais il n'y a pas encore de « SARM » (selective androgen receptor modulators), et la notion même d'andropause, du fait de la baisse lente mais relativement limitée de T, restera difficile à définir tant hormonalement que cliniquement.

1.2 Les corticosurrénales : l'adrénopause, une dissociation surprenante (cortisol vs. DHEA)

Les glandes surrénales sont doubles : la partie centrale, *médullosurrénale*, synthétise de l'adrénaline (épinéphrine), dérivé d'un acide aminé, et peut embryologiquement et fonctionnellement être considérée comme une extension du système nerveux sympathique. On ne sait pratiquement rien des modifications éventuelles de la formation d'adrénaline chez l'homme âgé, dont cependant la réponse au stress peut être décisive pour l'organisme. Chez l'animal, elle serait diminuée.

Entourant la médullosurrénale, le cortex surrénalien est bien différent : ses cellules synthétisent toutes des stéroïdes (dérivés du cholestérol). Pour celles de la couche « fasciculaire », c'est le *cortisol* (un « glucocorticostéroïde »), dont les propriétés sont si importantes qu'un défaut peut laisser l'organisme sans réponse adéquate, au niveau de la pression artérielle et du métabolisme des glucides, et entraîner la mort très rapidement. La production corticosurrénalienne de cortisol (de l'ordre de 25 mg par jour chez l'adulte) est sous l'étroite dépendance d'une hormone hypophysaire, l'ACTH (adrenocorticotrophique hormone), dont la synthèse est elle-même contrôlée par un peptide cérébral hypothalamique CRH (corticotropin-releasing hormone). À la séquence fonctionnelle positive incluant successivement le CRH qui accroît la production d'ACTH, qui à son tour augmente la synthèse du cortisol, correspond un rétrocontrôle très efficace, le cortisol régulant négativement les éléments neuro-hypophysaires qui l'ont stimulé et ramenant à l'équilibre antérieur. Chez l'homme et la femme âgés, le taux de cortisol circulant est essentiellement inchangé (ou légèrement augmenté), la production corticosurrénalienne étant un peu diminuée mais compensée par une dégradation métabolique plus faible que chez l'adulte jeune. La régulation rétroactive est globalement semblable à celle des plus jeunes, même si elle semble souvent plus lente à se manifester pleinement. Chez le rat vieillissant, les neurones hippocampiques cibles des corticostéroïdes diminuent en nombre et ont moins de récepteurs, ce qui expliquerait une moindre efficacité de la régulation de *feed-back* de la corticostérone, stéroïde du rongeur correspondant au cortisol chez l'humain (Sapolski, 1986). On trouvera plus loin des informations complémentaires dans le cadre de la réponse au stress.

D'autres cellules corticosurrénales formant une couche « glomérulaire » sécrètent de l'*aldostérone*, autre stéroïde important, dont la régulation de la production est essentiellement indépendante du système hypothalamo-hypophysaire, mais qui répond directement à des variations ioniques du milieu ambiant : c'est l'hormone de rétention du sodium et d'excrétion du potassium, d'où sa désignation comme minéralocorticostéroïde. Son niveau et ses modifications physiologiques semblent pratiquement intacts chez le sujet âgé.

Au contraire, la DHEA (déhydroépiandrostérone), produite par les cellules d'une zone « réticulée », est progressivement très déficitaire chez le sujet âgé. Sa synthèse est très particulière puisque le stéroïde est majoritairement estérifié par l'acide sulfurique (d'où le sulfate de DHEA, DHEA-S) dans les cellules glandulaires et sécrété sous cette forme, ce qui, entre autres, lui donne des caractéristiques très spéciales de métabolisme, avec un taux sanguin très élevé car l'estérification le protège d'une dégradation rapide et diminue donc fortement sa clairance métabolique. Le DHEA-S est de très loin le plus abondant des stéroïdes hormonaux dans le plasma, et, présent dans les deux sexes, il baisse régulièrement au cours de l'âge, diminue de 80 à 90 % chez les personnes âgées pendant leurs 8^e et 9^e décennies. C'est à ce propos que l'on parle

d'adrénopause. Le fait qu'il y ait dissociation des niveaux de DHEA et cortisol au cours de l'âge semble exclure un régulateur central unique de leur production pendant le vieillissement. Contrairement au cortisol, le DHEA-S n'exerce pas de rétrocontrôle négatif sur l'ACTH. Les études expérimentales et cliniques ont indiqué qu'un excès de « corticoïdes » (composés ayant les propriétés du cortisol) est délétère pour le cerveau, en particulier au niveau de l'hippocampe (voir aussi plus loin). Ce serait une des hypothèses pour expliquer la dégradation « normale » de la mémoire si l'on considère que le déséquilibre physiologique cortisol/DHEA engendré par la baisse de la DHEA avec l'âge, crée un hypercortisolisme relatif.

Les propriétés biologiques de la DHEA sont encore insuffisamment connues. Après sa sécrétion, elle se transforme partiellement dans le foie et de nombreux tissus en stéroïdes sexuels, testostérone et œstradiol – ce qui survient aussi après administration de DHEA et inspire à beaucoup de médecins la crainte d'effets de stimulation hormonale analogues à ceux évoqués plus haut pour les stéroïdes gonadiques.

Chez la plupart des animaux de laboratoire (rongeurs, chiens, etc.), on ne trouve pratiquement pas de DHEA circulant dans le sang, très différemment du cas de l'homme et des grands singes anthropoïdes. Cependant, la DHEA est synthétisée dans les glandes stéroïdogènes, surrénales et gonades de tous les animaux étudiés jusqu'à présent, comme intermédiaire de synthèse entre le cholestérol et les hormones sexuelles stéroïdes. Elle ne « sort » pas dans la circulation comme chez l'homme. Cette différence indique-t-elle une propriété encore méconnue de signification évolutionnelle importante ? Est-ce parce que la transformation de la DHEA en hormones sexuelles dans divers tissus permet de compenser le déficit des gonades quand il survient ? Il est en tout cas curieux de noter que l'on trouve de la DHEA synthétisée et active dans le cerveau des animaux comme de l'homme : ce fut le premier « neurostéroïde » (formé dans le système nerveux) à être identifié.

La plupart des études épidémiologiques incluant des dosages de DHEA-S dans le sang pour établir des corrélations avec certains dysfonctionnements et pathologies associés à l'âge sont d'interprétation difficile. Par exemple, les mêmes auteurs ont pu rapporter des corrélations différentes entre morbidité ou mortalité cardiovasculaire et niveau de la DHEA. Ce qui est le plus certain, c'est l'association quasi constante de taux abaissés à un état général très déficient, toutes causes confondues. Peut-on établir une relation de cause à effet précise entre le stéroïde et une pathologie précise ? Récemment, on a démontré chez l'humain les effets bénéfiques de la DHEA (administrée par voie orale) sur l'importance de la masse grasseuse viscérale et cutanée qu'elle tend à réduire, ainsi que sur l'activité de l'insuline en favorisant la sensibilité à l'hormone, ce qui semble confirmer son rôle longtemps soupçonné pour s'opposer au « syndrome

métabolique » qui se développe au cours du vieillissement. Il pourrait en être de même pour un effet sur l'hypertension artérielle pulmonaire secondaire à une situation hypoxique, comme le suggèrent des études expérimentales chez l'animal et l'épidémiologie humaine ; des essais contrôlés chez l'homme sont en cours. Les observations indiquant l'amélioration de la peau mince, sèche et jaunissante après administration par voie générale ou locale de DHEA sont très significatives. Dans un autre domaine, les taux de DHEA ont pu être inversement corrélés à l'impuissance, et son administration fut partiellement correctrice. Ce sont peut-être les résultats sur le bien-être physique et mental, attestés par certaines études portant sur des dépressions qui demanderaient surtout une confirmation généralisée. Chez la femme ménopausée, chez qui pour cause de frigidité ou d'inappétence sexuelle, on propose d'administrer des androgènes, il semble que la DHEA soit un traitement approprié puisqu'elle entraîne une élévation modérée de l'œstradiol et des taux de T physiologique (alors qu'on atteint souvent un niveau de T supraphysiologique en cas d'administration de T). Plus généralement, il semble que la prise de DHEA chez des femmes de 50 ans en période ménopausique, qu'il y ait ou non prise d'œstrogènes par ailleurs, est utile si leur taux de DHEA est bas, si elles ont tendance à être déprimées (*mid-life crisis*), si leur peau s'altère, et s'il n'y a pas de terrain cancéreux (seule contre-indication de principe à respecter à l'heure actuelle). On ne suggère pas pour autant qu'il s'agisse d'une « pilule miracle », d'une pilule « de jeunesse », mais la DHEA est incontestablement souvent utile et, jusqu'alors, sans effet secondaire sérieux démontré.

L'administration orale au long cours chez l'homme n'a jamais révélé d'effets secondaires délétères pourvu que l'on reste à une dose établissant un niveau sanguin du même ordre que celui établi spontanément chez le jeune adulte sain (schématiquement, par voie orale, 50 mg/jour chez les hommes, et 25 mg/jour pour les femmes suffisent). La prudence – on pourrait dire la précaution – incite cependant à surveiller le PSA sanguin (voir chapitre 1 section 6), même s'il n'y a aucune preuve directe certaine d'un effet délétère au niveau de la prostate jusqu'à présent.

Y a-t-il alors indication systématique d'une prise de DHEA chez toutes les personnes dont l'âge a provoqué la baisse notable physiologique de DHEA ? Il semble plus raisonnable de la réserver à ceux qui ont un taux sanguin largement inférieur à celui obtenu en moyenne chez des sujets du même sexe et du même âge, et si l'on observe au moins un des signes de vieillissement accentué, tels que grande fatigue, perte de mémoire, tendance dépressive, peau sèche et jaunie, ou difficultés sexuelles.

Il est intéressant de noter que le contraste entre le taux maintenu de la cortisolemie et l'abaissement de la DHEA est également observé, en dehors du vieillissement, chez le sujet malade/stressé chroniquement, ou récemment soumis à un

accident ou une opération chirurgicale sérieuse. La logique rend légitime l'administration compensatrice de DHEA. Il en est de même au cours de traitements par des corticoïdes afin de tenter de rééquilibrer la balance azotée anabolique, en particulier pour préserver la structure et la fonction des muscles et des os, peut-être aussi pour protéger les systèmes immunitaire et nerveux.

L'importance de l'adrénopause a-t-elle un rapport avec la longévité ? Un travail épidémiologique contrôlé indique cette possibilité chez des hommes de plus de soixante-cinq ans fumeurs ou ayant fumé (valeurs non significatives chez les femmes), chez qui on enregistre un taux bas de DHEA, de la dyspnée et une mortalité plus précoce. Il n'est pas impossible que l'on retrouve ici un rôle de la DHEA au niveau pulmonaire et secondairement cardiaque, comme dans les expériences animales d'hypoxie évoquées plus haut. Il y a même d'impressionnants effets de chémoprévention anticancéreux chez l'animal qui n'ont pas été testés chez l'humain.

On voit qu'il y a encore à faire pour comprendre la signification de cette étrange sécrétion hormonale de DHEA et de son émergence dans le sang chez les primates supérieurs et l'homme.

1.3 Diminution de l'hormone de croissance hypophysaire et de l'IGF-1 : la somatopause (avec Yves Le Bouc)

Rattachée au cerveau par la tige pituitaire et recevant des molécules régulatrices d'origine nerveuse hypothalamique (des releasing factors ou releasing hormones), l'hypophyse antérieure sécrète des protéines hormonales dont plusieurs sont régulatrices du fonctionnement d'autres glandes endocrines, et sont donc souvent appelées « stimulines ». Au cours du vieillissement, LH (luteinizing hormone) et FSH (follicle-stimulating hormone) agissant sur les glandes sexuelles, subissent une élévation correspondant à la diminution du rétrocontrôle négatif exercé par les hormones stéroïdes sexuelles diminuées avec l'âge. L'augmentation de FSH, en particulier, est un signe précoce de la ménopause. Le rythme et les contrôles de l'ACTH (adrenocorticotrophic hormone) sont modifiés.

Le cas de l'hormone de croissance ou somatotrophine (GH pour growth hormone), synthétisée dans des cellules hypophysaires particulières (« somatotropes »), est différent : elle est active à la fois par elle-même et par la stimulation de la synthèse au niveau du foie d'un facteur de croissance IGF-1 (pour insulin-like growth factor 1). Celui-ci se distribue aussi à tout l'organisme et agit sur de nombreuses cellules, du fait de récepteurs assez semblables à ceux de l'insuline. GH diminue notablement avec l'âge, ainsi qu'IGF-1, encore que de façon très inégale selon les sujets : on parle de « somatopause ». Globalement, GH

et IGF-1 ont des effets fondamentaux de type anabolique, logiquement compréhensibles dans le cadre des phénomènes de croissance qu'elle favorise à une autre période de la vie.

La diminution de l'amplitude des oscillations de la sécrétion de GH avec l'âge est largement due à l'affaiblissement du système de signalisation que conduit le peptide hypothalamique *GH-RH* (growth hormone-releasing hormone), stimulateur de la synthèse hypophysaire de GH. Un autre facteur hypothalamique, fonctionnellement opposé au GH-RH, régule négativement la production de l'hormone de croissance dans l'hypophyse : la *somatostatine* (SST). Contrairement à ce que l'on pourrait supposer pour expliquer la diminution de GH survenant avec l'âge, on enregistre alors une diminution de la somatostatine chez les rongeurs comme chez les primates. La complexité de la régulation de la sécrétion de GH est encore attestée par la participation de plusieurs récepteurs de la somatostatine et d'autres peptides contrôlant différemment les métabolismes organiques selon l'âge.

Un récepteur, dénommé *GHS-R*, régule la fréquence et l'amplitude des pulsations de GH, et des ligands synthétiques agonistes stimulent la libération de GH-RH. Un d'entre eux, le MK-0677, provoque un accroissement de la musculature et une augmentation de la masse osseuse. On a récemment découvert un ligand endogène de GHS-R, la ghréline, peptide isolé initialement de la muqueuse de la paroi gastrique et dont les effets sont à considérer dans le cadre de la « maladie métabolique » du vieillissement que nous traitons plus loin, avec ceux d'une autre hormone, la leptine, qui y est opposée fonctionnellement.

La ghréline régule l'activité de GH-RH, stimule la sécrétion de GH, et se montre orexigène. La réponse GH à la ghréline est très diminuée avec l'âge, ce qui pourrait être dû à l'activité inhibitrice des glucocorticostéroïdes sur le GHS-R. L'activation de GHS-R par la ghréline inhibe la production de l'interleukine 6 (IL-6) par les cellules T ; on sait que IL-6 augmente avec l'âge alors que diminuent les hormones qui s'opposent, stéroïdes sexuels et GH/IGF-1. L'augmentation du rapport IL-6/IGF-1 est de mauvais pronostic vital chez les femmes âgées et fragiles. D'autres régulateurs peuvent jouer un rôle : l'adénosine, sans stimuler GH, est également orexigène, et agit aussi *via* le GHS-R. La dopamine diminue avec l'âge dans le cerveau, et l'administration de L-dopa peut rétablir la sécrétion de GH à un niveau « jeune » ; il semble qu'elle puisse être impliquée dans la stimulation de GH par le MK-0677. La complexité est maximum.

Les effets anabolisants au niveau des os, des muscles et de la peau enregistrés chez des enfants que l'on fait grandir par administration de GH, ont naturellement incité à faire des recherches chez les personnes âgées en déficit physiologique de l'hormone. Les effets de GH au niveau du système nerveux, plus récemment découverts, en sont une raison supplémentaire.

En effet, une série d'expériences chez l'animal a démontré une activité neuroprotectrice de GH. Chez la souris, la restauration d'IGF-1 permet d'améliorer le métabolisme de l'amyloïde- β dans le cerveau et on a mis en évidence un rapport de cause à effet entre la baisse de GH/IGF-1 et un déficit cognitif chez l'âgé. Incidemment, ce déficit pourrait être corrigé par la ghréline qui n'aurait pas le potentiel de stimulation cancérogène de l'IGF-1, car elle augmente à la fois l'IGF-1 et sa protéine de liaison IGF-BP3 (binding protein) qui lie (et donc inactive en partie) le facteur de croissance. Les mécanismes par lesquels GH et IGF-1 ont un effet de neuroprotection incluent le développement de la vascularisation du cerveau et la stimulation de la myélinisation. L'administration de GH-RH peut prévenir la baisse de la mémoire chez le rat vieillissant, et c'est pourquoi on a cherché une médication active par la bouche pour stimuler le récepteur correspondant GHS-R.

Les recherches sur l'hormone de croissance sont donc de grande actualité puisqu'elles portent à la fois sur le métabolisme général et l'activité cérébrale. Est-il alors utile d'envisager d'administrer GH (ou IGF-1, ou un autre peptide participant au système GH-IGF-1-ghréline, etc.) pour une meilleure santé chez les personnes âgées ?

La disponibilité de GH rigoureusement identique à l'hormone humaine grâce à la synthèse « biotechnologique » de cette protéine – la première industriellement réussie – a permis l'essai de son administration chez le sujet âgé, normal mais physiologiquement déficitaire en GH. Les résultats cutanés, musculaires et sur le métabolisme des lipides au cours d'essais de trois à six mois ont été appréciés positivement. Cependant, les doses administrées (par injections et coûteuses), qui de toute façon ne reproduisent pas les oscillations (pulses) enregistrées chez le sujet jeune, devaient être excessives puisqu'on a noté de fréquents effets secondaires, avec douleurs articulaires au poignet (syndrome carpien), tendance à l'hyperglycémie, gynécomasties et hypertension artérielle, ce qui n'a pas conduit à définir un traitement convenable, les doses inférieures étant insuffisamment efficaces. D'ailleurs, sur la force musculaire, GH ou IGF-1 ne semblent pas ajouter d'effet à celui d'un bon exercice musculaire. De toute façon, tout ce qui augmente notablement IGF-1 est soupçonné de pouvoir stimuler des tumeurs bénignes et malignes, qui expriment très souvent le récepteur correspondant. On a aussi essayé d'administrer à des personnes âgées des composés stimulant le GH-RH, d'autant que celui-ci permet d'obtenir chez le sujet de soixante-dix ans une réponse rétablissant les valeurs de GH et IGF-1 de jeunes adultes. Jusqu'à présent, les résultats ne sont pas suffisamment probants pour permettre une exploitation massive.

Enfin, et très remarquablement, les recherches sur l'axe GH/IGF-1 posent un problème de fond très important. GH et IGF-1 diminuent avec l'âge, on l'a vu, d'où la tentation restauratrice d'en administrer aux personnes âgées.

Mais toute une série de travaux qui ont trait à la longévité chez des animaux, du nématode *Caenorhabditis elegans* aux petits mammifères, indiquent que la suppression expérimentale de l'activité de type insuline-IGF-1, en particulier en inactivant un récepteur d'IGF-1 très analogue à celui de l'insuline, peut retarder le vieillissement « normal » et entraîner une longévité accrue et en bonne santé ! Le mécanisme semble en partie différent de celui mis en jeu au cours de la restriction calorique qui elle aussi entraîne une augmentation de la longévité (voir plus loin). L'évolution pourrait donc avoir apparemment sélectionné une activité de l'axe somatotrope qui serait stimulé pendant l'enfance et la période pubertaire afin d'induire une croissance staturopondérale et une taille adulte adaptée au milieu environnant. Mais ensuite elle serait limitée dans son activité pour permettre d'augmenter la longévité et la reproduction de l'espèce.

Alors, faut-il contrarier cette sélection naturelle ?

Le domaine reste très ouvert, et en tout cas, à l'heure actuelle, l'administration prolongée d'hormone de croissance ou d'IGF-1 aux sujets âgés ne semble pas indiquée compte tenu des incidents et des incertitudes cités plus haut.

2 | Trois domaines endocrinologiques intégrés en péril – autres hormones

2.1 Le vieillissement de l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien (HPA) et le stress

Il est d'observation commune que la prise d'âge s'accompagne d'une moins bonne adaptation de l'organisme et de ses possibilités réactionnelles aux modifications de l'environnement (la canicule...) et aux besoins aléatoires des comportements physiques et mentaux de la vie quotidienne. De plus, on se demande souvent si un stress prolongé et ses conséquences accélèrent les processus du vieillissement.

La stimulation de l'axe neuro-endocrinien hypothalamus-hypophyse antérieure-corticosurrénales (HPA) est au premier rang des réactions de l'organisme à une situation stressante. Fonctionne-t-il différemment, moins bien, chez le sujet âgé ? L'importance, la répétition ou la prolongation d'une réponse incluant une élévation fréquemment entretenue ou même quasi permanente de glucocorticostéroïdes (cortisol au premier rang) entraîne-t-elle à son tour

des désordres fonctionnels et dégénératifs, en particulier au niveau du système nerveux ? En d'autres termes, la réponse au stress est-elle suffisante chez les sujets âgés et peut-elle être délétère pour l'organisme humain vieillissant.

On a vu plus haut que les glucocorticostéroïdes sont sécrétés par les glandes corticosurrénales sous la commande régulatrice de l'ACTH. Ce dernier est lui-même produit par des cellules spéciales corticotropes antéhypophysaires stimulées par le CRH d'origine hypothalamique arrivant à l'hypophyse par un système veineux porte. La production du CRH hypothalamique est soumise à l'activité nerveuse de l'hippocampe, qui a un rôle physiologique permanent de limitation de la production de CRH. Une série de boucles de rétrocontrôle régule l'amplitude des sécrétions. Le principal produit glucocorticostéroïde final (cortisol chez l'homme) de la séquence hippocampe-hypothalamus-antéhypophyse-corticosurrénales rétrocontrôle négativement chacun des niveaux supérieurs, et l'existence de boucles intermédiaires, comme par exemple l'ACTH rétrocontrôlant lui-même le CRH, n'est pas exclue. Dans l'hippocampe (surtout dans la couche pyramidale de la région CA3a bien étudiée chez le rat), les récepteurs des glucocorticostéroïdes diminuent avec l'âge à la fois du fait du nombre décroissant de neurones dotés de récepteurs et de la réduction de leur nombre par cellule, ce qui semble confirmé chez l'homme. C'est pourquoi on localise au niveau hippocampique la raison d'une modification du rétrocontrôle chez le sujet âgé, entraînant une diminution de la différence entre le taux sanguin de cortisol du matin (moins élevé que chez le jeune) et celui du soir (le nadir vers minuit, qui est augmenté). L'ensemble est responsable d'un taux de cortisol circulant moyen augmenté chez le sujet vieillissant. Cette élévation moyenne est modeste, mais l'effet qui en résulte au niveau nerveux serait responsable en partie de la diminution sélective du volume de l'hippocampe avec l'âge, mise en évidence récemment grâce aux progrès de l'imagerie ; on a mis en évidence également la baisse de la potentialisation à long terme (LTP) des neurones, et la réduction de l'importance des dendrites principalement au niveau de CA3. L'augmentation des glucocorticostéroïdes induite par le stress persiste plus longtemps après l'arrêt de la stimulation chez l'animal âgé, sans que le mécanisme impliqué soit bien compris, mais là encore il y a donc surexposition délétère du tissu nerveux aux corticostéroïdes. On retrouve chez l'âge normal, au cours de la maladie d'Alzheimer (qui atteint l'hippocampe en particulier) et au cours de l'intoxication alcoolique chronique (qui réduit le nombre de neurones hippocampiques), la même tendance à l'hyperactivité de l'axe HPA avec une diminution de la sensibilité au rétrocontrôle négatif exercé par le cortisol. La régulation de l'axe HPA n'est pas simple pour autant, et elle implique d'autres facteurs, d'autant que la suppression chirurgicale de l'hippocampe n'annule pas complètement le rétrocontrôle négatif de l'axe HPA par les glucocorticostéroïdes. Tout ne dépend pas du niveau hippocampique : dans l'amygdale, le CRH baisse au cours de l'âge avec une diminution des comportements d'anxiété. Le CRH, neuroprotecteur contre une agression glutamatergique, peut modifier le système HPA s'il est

hypersécrété de façon prolongée, inhibant en partie les rétrocontrôles négatifs, ce qu'on peut comparer à la situation observée au cours de dépressions majeures et de la schizophrénie. La synthèse des récepteurs des corticostéroïdes peut être modulée par d'autres hormones, par exemple les œstrogènes qui les augmentent dans l'hippocampe et l'amygdale. La réponse du système catécholaminergique est diminuée avec l'âge après un stress aigu. L'arginine vasopressine (AVP) est augmentée chez les personnes âgées, et dans l'ensemble accompagne une élévation de l'ACTH et des corticostéroïdes. Les neurones à AVP du noyau paraventriculaire (PVN) sont plus grands chez les personnes âgées que chez les jeunes, surtout (curieusement) du côté droit du cerveau ; les œstrogènes en régulent l'activité.

Le système sérotoninergique est aussi impliqué dans le fonctionnement du système neuro-endocrinien dans l'hippocampe. Chez le rat âgé, on a mis en évidence l'altération des récepteurs 5-HT_{1A} dont la corticostérone ne peut moduler l'expression comme chez le jeune ; l'adaptation au stress en est altérée.

L'énumération incomplète de ces complexités fait comprendre que la compréhension des mécanismes de réaction au stress ainsi que l'intervention éventuelle d'une thérapeutique sont loin d'être faciles à concevoir. C'est d'autant plus notable qu'il faut encore impliquer l'intervention de mécanismes indirects modifiant *in situ* dans le cerveau le métabolisme des glucocorticostéroïdes actifs au niveau de leur groupe 11- β -hydroxy essentiel, ce qui ne se traduit pas au niveau des concentrations hormonales mesurées dans le sang. L'ensemble s'oriente en général vers une réponse insuffisante au stress et vers le risque de favoriser des lésions neurodégénératives.

Pour comprendre les conséquences de l'élévation relative du cortisol chez l'âgé, il faut tenir compte de ses effets sur le métabolisme des glucides, accroissant les substrats énergétiques aux dépens des formes stockées de l'organisme, tendant à élever la pression artérielle et à inhiber les réponses inflammatoires et immunitaires sans parler des altérations au niveau du système nerveux central que nous venons d'évoquer. Dans la réponse immédiate au stress, l'élévation des glucocorticostéroïdes assure une réponse physique adaptée, reportant en quelque sorte à une période moins stressante la reconstruction anabolique énergétiquement coûteuse. Mais si la réponse catabolique se prolonge, l'évolution peut aboutir à un déficit musculaire, un diabète et une grave insuffisance immunitaire et à l'installation d'une hypertension artérielle. Ainsi, conçoit-on qu'aussi bien le déficit ou l'excès de cortisol pendant le stress puissent avoir des conséquences pathologiques graves, le défaut de déclenchement de la réponse au stress comme sa prolongation étant délétères chacun à sa façon. Il reste qu'à l'axe HPA, il faut obligatoirement ajouter l'hippocampe, à la fois pour son effet sur la régulation des corticostéroïdes et pour les effets cumulatifs de ces stéroïdes à son niveau : la tendance à l'hypersécrétion de cortisol comme la baisse

des récepteurs des corticostéroïdes dans l'hypophyse s'établit progressivement avec l'âge. La cascade menant à une hypersécrétion glucocorticostéroïde mène probablement à prédisposer à des pathologies associées à l'âge, cognitives et tumorales en particulier. À l'opposé, dans le cadre d'une activité modérée et sans prolongation excessive, le glucocorticostéroïde cortisol est utile et même nécessaire pour permettre, y compris chez les sujets âgés, une activité physique et mentale qui s'apparente à celle de la vie de l'adulte jeune : c'est l'effet « permissif » du cortisol (Ingle), essentiel au fonctionnement de nombreux autres systèmes régulateurs (tels les catécholamines); *a contrario*, le déficit en glucocorticostéroïde, qui entraîne une grande fragilité, montre bien l'importance de cette propriété. On en vient à vérifier expérimentalement des notions de bon sens comme le bienfait d'une activité soutenue, suffisamment excitante sans être trop stressante, l'excès étant comme souvent potentiellement délétère.

Les modifications de l'axe HPA prennent évidemment place au sein des modifications physiologiques encore plus globales associées à l'âge. Par exemple, la temporalité du cycle nyctéméral des glucocorticostéroïdes est modifiée avec l'âge. Le cycle est non seulement diminué, mais il est aussi progressivement avancé (ordre de grandeur une à deux heures), comme l'est celui de la température centrale et de la variation de la mélatonine, l'ensemble étant à mettre probablement en rapport avec les modifications du sommeil (plutôt plus fragmenté, avec un réveil plus tôt).

L'altération de fonctions cognitives comme la mémoire serait en rapport avec les modifications physiologiques, que magnifient encore un stress chronique ou l'administration prolongée de doses élevées de corticostéroïdes. Mais les effets des stéroïdes sont nuancés et dépendent de la dose ; par exemple, le déficit de mémoire observé chez le rat surrénalectomisé est atténué par l'administration à dose modérée de corticostérone qui a dans ce cas un effet neuroprotecteur.

Les recherches récentes sur les réponses au stress indiquent qu'à la participation déclenchante des systèmes nerveux autonome (sympathique) et HPA s'ajoute celle de réseaux neuroendocriniens plus complexes. Elles suggèrent également un certain optimisme dans les possibilités de protéger et même d'améliorer le fonctionnement du cerveau chez le sujet âgé. Place doit être faite à d'autres facteurs tels que les acides aminés excitateurs (type acide glutamique), à d'autres composés régulateurs tels que BDNF (brain-derived neurotrophic factor), au rôle des astrocytes, etc. La correction des insuffisances de GH, IGF-1 et stéroïdes sexuels qui s'opposent à certains effets délétères du cortisol sur le muscle, la masse osseuse et les neurones de l'hippocampe pourrait être thérapeutiquement bénéficiaire.

2.2 Complexité hormonale, longévité : insuline, pancréas, « maladie métabolique », tissus graisseux, restriction calorique, autres hormones

On a fait déjà allusion dans ce chapitre (§ 1.3.) et dans d'autres (chapitre 3), à la participation de l'hormone de croissance et de l'insuline dans les régulations métaboliques que l'on traite ci-après.

2.2.1 Altération pancréatique : souvent ignorée, pratiquement toujours impliquée

Au cours du vieillissement, l'altération du pancréas endocrine (cellules β sécrétant de l'insuline) est souvent ignorée, mais pratiquement toujours impliquée (50 % des diabètes ne sont pas diagnostiqués chez les vieillards).

La sécrétion d'insuline¹ tend à baisser avec l'âge (environ 1 % par année), et elle ne s'oppose plus suffisamment à la résistance au fonctionnement de l'hormone, ce qui entraîne une élévation de la glycémie à jeun, même s'il y a augmentation (modeste) du taux circulant d'insuline.

La résistance périphérique accrue à l'activité de l'hormone au cours de l'âge est souvent en rapport avec une alimentation inappropriée (associée à la diminution de l'activité physique), une augmentation de la masse graisseuse et à un déficit musculaire qui, causes et/ou conséquences, entraînent une altération notable du métabolisme du glucose (le diabète de type 2). Régime, exercice, agents hypoglycémisants pris par voie orale et insuline elle-même sont à utiliser souvent conjointement. Il y va de l'évolution rapide de lésions vasculaires, avec hypertension artérielle, lésions cérébrales et oculaires : la participation d'un mécanisme auto-immunitaire à ce diabète de l'âge est actuellement en cours d'études, et pourrait amener à concevoir un nouveau type d'activité thérapeutique.

2.2.2 Maladie métabolique

Une (plusieurs) véritable « maladie métabolique » peut s'installer avec l'âge dont les manifestations associent, en particulier, un diabète de type 2, une hyperlipidémie, de l'athéromatose avec hypertension artérielle, et un excès de dépôts graisseux sous-cutanés et périviscéraux. Les stéroïdes sexuels sont diminués, les glucocorticostéroïdes sont augmentés, et il y a résistance à l'insuline et à la

¹Le mécanisme très conservé dans toutes les espèces, impliquerait une (des) deacetylase(s) de type SIR (silent information regulation), dont le fonctionnement améliore l'activité des cellules β .

leptine. On a décrit une hormone « resistine » (pour résistance à l'insuline), sécrétée par les adipocytes et donc augmentée chez les obèses. Une véritable anorexie peut se développer, entraînant malnutrition et sarcopénie ; sa cause est mal définie et elle ne relève pas d'un effet impliquant l'activité de satiété de la cholécystokinine (CCK). La baisse de la ghréline, due au vieillissement de la muqueuse gastrique, peut contribuer au développement de l'anorexie. Au niveau hypothalamique, le signal orexigène affecte des cellules spéciales, distinctes de celles impliquées dans les circuits du NPY, de POMC, de la dopamine et de la somatostatine. Comme l'administration chronique d'analogues de la ghréline restaure les niveaux de GH et d'IGF-1, on peut suggérer leur utilisation pour le traitement de l'anorexie associée à l'âge, d'autant que la concentration de ghréline est la même chez les sujets âgés de poids normal que chez les jeunes obèses, c'est-à-dire beaucoup plus basse que chez les sujets jeunes normaux. Le niveau bas de ghréline s'accompagne chez les sujets âgés d'une augmentation de celui de l'insuline (en réaction à la résistance à l'insuline) et d'une baisse d'IGF-1 indiquant un défaut de GH. En clinique, jusqu'à présent, les dosages utilisés ne distinguent pas la ghréline active (octanoylée) de la forme désacylée inactive, ce qui rend l'interprétation des corrélations encore très difficile.

La leptine est aussi à considérer quand on étudie ce domaine complexe du métabolisme. Ce peptide est synthétisé dans les adipocytes (cellules graisseuses). La leptine, agissant sur l'hypothalamus, diminue la prise de nourriture et accroît les dépenses énergétiques chez les rongeurs. Ses variations sécrétoires, en particulier circadiennes et ultradiennes, sont à l'inverse de celles de l'ACTH, mais en phase avec celles de la TSH. Le récepteur de la leptine (« Ob-Rb »), comme celui de la ghréline, se situe dans le noyau hypothalamique arqué. Les activités fonctionnelles des deux peptides sont mutuellement antagonistes. Chez l'animal jeune, la leptine diminue la graisse viscérale, mais l'effet est moindre chez les vieux animaux, chez qui la baisse du peptide hypothalamique NPY est peut-être impliquée. Résistance à l'insuline et résistance à la leptine pourraient être liées, sans qu'on sache prévoir si améliorer l'une entraînera l'amélioration de l'autre.

Incidemment, la baisse de la neurosécrétion hypothalamique du peptide NPY, cruciale pour déclencher le pic ovulatoire de LH, semble impliquée dans l'arrêt du cycle ovulatoire. Chez le mâle aussi, le déclin avec l'âge de la production de l'hormone sexuelle testostérone est dû à une diminution des neurones à NPY. Comme la ghréline peut stimuler le GnRH à travers son effet sur les neurones NPY, on peut concevoir les interactions complexes entre l'axe GRH/IGF-1 et le système reproducteur par l'intermédiaire des peptides ghréline, NPY et GnRH. On conçoit que les implications médicales ne soient pas simples à définir, même si le problème est extrêmement courant chez les personnes âgées.

2.2.3 Restriction calorique

Des expériences simples de restriction calorique sont venues à la fois stimuler les débats sur la longévité et compliquer l'interprétation des phénomènes observés physiologiquement.

Diminuer l'apport calorique augmente la longévité chez tous les eucaryotes, de la levure aux mammifères tels que la souris, en passant par le ver nématode *C. elegans* et la mouche drosophile. La santé est préservée chez les sujets étudiés, avec, selon les cas, moins de cancers, de troubles cardiovasculaires et de déficits immunitaires. Chez l'homme, on sait qu'une alimentation trop riche est un facteur de risque pour plusieurs types de cancers, de maladies vasculaires, d'accidents cérébraux et de diabète de type 2. Mais chez les êtres humains en bonne santé, y-a-t-il vraiment avantage à restreindre l'apport calorique par rapport à une alimentation *ad libitum* spontanée ? Curieusement, chez la souris, il suffit de modifier le rythme alimentaire, par exemple en ne l'alimentant qu'un jour sur deux mais sans réduction calorique globale, pour obtenir les mêmes avantages que la restriction calorique permanente (apologie des périodes de jeûne ? ...).

L'hypothèse simple d'une réduction du métabolisme, et donc de la formation diminuée de radicaux oxygènes « réactifs » nuisibles, n'est pas suffisante pour expliquer la longévité accrue, même si les dommages d'origine oxydative font certainement partie du phénotype général du vieillissement. En effet, le métabolisme n'est pas diminué (et même souvent la respiration est augmentée) au cours de la restriction calorique. La réponse à la restriction calorique met en jeu des mécanismes métaboliques bien déterminés, hormonaux en particulier. L'augmentation d'une enzyme importante, l'histone deacetylase sirtuine « SIR2 class III » (chez la levure) ou SIRT1 (chez les mammifères), qui utilise le NAD comme cosubstrat, semble importante pour répondre à la modification calorique des apports en mobilisant des réponses physiologiquement utiles (chez les invertébrés, les produits prolongeant la vie le font en stimulant la sirtuine).

Le vieillissement est surtout caractérisé par l'augmentation de la graisse, stockée en particulier dans les tissus adipeux WAT (white adipose tissue) qui peut en moyenne augmenter de 500 g par an chez les êtres humains à partir de 50 ou 60 ans. Ce tissu produit des hormones, dont certaines sont impliquées dans le développement de la résistance à l'insuline comme le tumor necrosis factor- α (TNF- α) et la résistine. La restriction calorique et l'enzyme SIRT1 s'opposent à l'augmentation liée au vieillissement du (NF)- κ B qui lui-même induit l'expression de TNF- α dans le WAT et stimule la formation de cytokines inflammatoires dans les cellules T. Le WAT produit également de la leptine, déjà citée plus haut, et l'adiponectine. La leptine réduit le niveau des hormones de stress et augmente celui des hormones thyroïdiennes (qui augmentent les dépenses en énergie);

la restriction calorique diminue la leptine. L'adiponectine produite dans le WAT augmente sous le régime de restriction calorique et stimule les réponses à l'insuline (en activant une kinase AMP-régulée : AMPK).

Les effets de la restriction calorique sur la durée de vie passent-ils par les réponses des cellules adipeuses ? Apparemment oui, en partie au moins. Si on supprime par « KO » le fonctionnement du récepteur de l'insuline dans le WAT, les souris minces qui sont obtenues vivent plus longtemps que les souris témoins. Les études indiquent que la diminution de la taille des cellules adipeuses pendant la restriction calorique est importante (alors que la réduction de leur nombre par liposuction peut entraîner une augmentation de taille délétère des cellules restantes). Les dépôts de WAT dans les viscères sont particulièrement importants pour expliquer la résistance à l'insuline et la pathologie du vieillissement.

Le mécanisme par lequel agit la restriction calorique est encore mal connu. Cependant, l'activation de SIRT1 pourrait dans les cellules graisseuses favoriser l'inactivation du récepteur nucléaire PPAR α et donc de protéines qui aident au stockage des lipides. La suite serait un remaniement de la fonction hormonale du tissu graisseux. Chez le macaque rhésus maintenu en restriction calorique, on peut apprécier une diminution de la baisse de la DHEA normalement associée à l'âge, comme si le déclin hormonal était différé : une telle expérience est difficile à réaliser chez l'homme. Les études avec la mélatonine, moins démonstratives, indiquent également sous restriction calorique le report de sa diminution avec l'âge chez le singe.

Un chapitre nouveau s'inscrit actuellement dans le cadre des recherches sur les métabolismes organiques. Il met en jeu le fonctionnement de récepteurs nucléaires « promiscuus », de spécificités moindres que ceux des hormones stéroïdes. En particulier, des dérivés oxygénés du cholestérol, des acides biliaires et des acides gras sont des ligands de ces protéines appelés Liver XR (LXR), CAR (constitutive androstane receptor), PXR (pregnane X receptor), etc. qui, avec les récepteurs de l'acide rétinoïque et de ses dérivés, forment d'importants réseaux dont l'activité influence le développement des syndromes d'inflammation, de la lipogénèse, de l'athéromatose, etc. associés au vieillissement.

2.3 Vieillesse du cerveau : le rôle des hormones

Peut-être rien n'est plus (tristement) emblématique de la prise d'âge que la diminution des facultés cérébrales, mémoire, compréhension, facilité d'élocution, etc. Les tendances dépressives, les troubles du sommeil, les difficultés sensorielles de vue et d'audition viennent souvent contribuer à la fatigue et à l'isolement qui caractérisent trop souvent la dernière partie de la vie. Les conséquences des altérations nerveuses à la suite des accidents d'origine vasculaire, fréquents avec

l'âge, sont redoutables. La crainte des démences, maladie d'Alzheimer au premier rang, que justifient les observations actuelles et les prédictions épidémiologiques évoquant une atteinte de plus de 20 % des sujets de 85 ans et au-delà, est compréhensible. Un effort national de recherche est indispensable, au-delà de toutes les formes d'aides médico-sociales si nécessaires aux personnes atteintes. Que sait-on du rôle des hormones dans tous ces cas et peuvent-elles y remédier ?

Il n'y a pas de diminution importante du nombre des neurones pendant le vieillissement dans plusieurs régions vulnérables telles que le cortex et l'hippocampe, ni même dans une structure-clé comme le noyau de Meynert (NBM : nucleus basalis magnocellularis) au cours de la maladie d'Alzheimer, alors que de nombreux neurones dopaminergiques s'atrophient et perdent leurs marqueurs. Dans l'hypothalamus et ses centres de contrôle de la reproduction qui ne fonctionnent plus bien chez les sujets âgés, le nombre de cellules ne diminue que très peu, comme si les altérations affectaient principalement les synapses. À l'opposé, le subiculum et le gyrus denté de l'hippocampe et les cellules de Purkinje du cervelet subissent des pertes importantes avec l'âge.

Quant aux *cellules gliales*, elles subissent des modifications indépendamment de celles des neurones, contrairement à ce que l'on pensait auparavant. L'activation des astrocytes avec expression exagérée de GFAP (glial fibrillary acidic protein) contribue à diminuer les fonctions synaptiques et la plasticité du cerveau vieillissant, et réciproquement diminuer les niveaux de GFAP dans les astrocytes âgés en culture (par RNAi) restaure la formation de neurites. Les astrocytes peuvent médier certains des effets des œstrogènes et des dérivés progestagènes ; l'œstradiol réprime GFAP dans les astrocytes, ce qui permet une meilleure réponse neuronale après lésion, et la progestérone diminue l'accumulation ou la croissance des astrocytes après choc cérébral. Parallèlement à l'âge chronologique et au déclin cognitif, on a récemment mis en évidence par imagerie, chez l'homme, une diminution de la myéline et la perte de l'intégrité de ses couches circulaires.

La complexité des études en matière de vieillissement cérébral est maximale si on additionne les modifications cellulaires propres à l'âge en général, les modifications d'irrigation sanguine et donc d'oxygénation, celles des nutriments, et les changements d'incitations sensorielles et autres venues du fonctionnement physique et des comportements modifiés avec l'âge. Rien n'est simple dans les relations imposées par la périphérie et son état : le taux sanguin de cholestérol est un exemple. Élevé chez l'individu d'âge moyen, il est néfaste par ses conséquences cérébrovasculaires. Au contraire, chez les sujets âgés, un taux plutôt fort semble protecteur, y compris au niveau cérébral. Avec les hormones en tout cas, on doit à la fois analyser l'influence du cerveau sur leur production comme celle de leurs effets sur les tissus nerveux : cercles vicieux, cercles vertueux, tout

est possible. À côté des réglages en boucle, il y a également des cas de régulations plus autonomes mais qui se modifient aussi avec le temps, l'alimentation et la pathologie, tels que les couplages insuline-glucose et parathyroïdes-calcium qui retentissent à leur tour sur le fonctionnement cérébral.

Le retentissement des déficits des hormones sexuelles sur le cerveau a été beaucoup étudié. Les œstrogènes ont des effets sur le système nerveux qui dépassent largement le contrôle de la fonction reproductrice. Franchissant facilement la barrière hémato-encéphalique, comme tous les stéroïdes hormonaux et les composés apparentés, les œstrogènes agissent dans de nombreuses régions du cerveau (et non pas seulement dans l'hypothalamus), mettant en jeu surtout des récepteurs nucléaires α et β , mais aussi des mécanismes à point de départ membranaires mieux à même d'expliquer des réponses rapides enregistrables électriquement. L'altération du système nigrostriatal cholinergique au cours du vieillissement se répercute au niveau de l'hippocampe, ce qui explique au moins en partie l'altération des fonctions cognitives, mémorisation incluse, souvent associée à la ménopause : les études chez l'animal et les traitements déjà utilisés chez la femme indiquent leur possible réversibilité. L'altération des systèmes monoaminergiques et sérotoninergiques, avec leur tendance aux troubles de l'humeur, quelquefois agressive, est également améliorable, et les œstrogènes permettent souvent un meilleur résultat avec les médicaments qui contrôlent la recapture des neurotransmetteurs (type Prozac). L'état de dépression post-ménopausique souvent décrit comme *mid-life crisis*, est souvent amélioré par des œstrogènes. L'effet souvent satisfaisant de la DHEA sur ce syndrome pourrait en partie être dû à son métabolisme en œstradiol.

Les propriétés de neuroprotection exercées par les hormones œstrogéniques sont de nature différente, et s'exercent, en particulier, au niveau de l'hippocampe. À ce niveau, les expériences chez l'animal, partiellement extrapolables au cas de la femme, indiquent la régulation de la formation de synapses dans l'hippocampe, liée à l'augmentation de neurites dendritiques, à laquelle participe le récepteur glutamergique NMDA (en particulier sa sous-unité NR1). Le déficit de cet effet dendritique par manque d'œstrogènes expliquerait la vulnérabilité de l'hippocampe vieillissant aux altérations suivant des lésions vasculaires et les crises épileptiques.

L'ensemble des données expérimentales suggère cependant que le cerveau vieillissant répond moins bien aux bons effets des œstrogènes. Faut-il alors pour prévenir, atténuer ou retarder l'incidence de la maladie d'Alzheimer, administrer des œstrogènes au début de la période qui suit la ménopause ? Certaines études cliniques le suggèrent, ne serait-ce que par la plus grande fréquence des maladies neurodégénératives, Alzheimer incluse, chez les femmes âgées. En tout cas, si la toxicité de la protéine β -amyloïde est expérimentalement diminuée

par les œstrogènes, aucun résultat positif n'est démontré après leur administration chez des maladies d'Alzheimer installées. Quant à l'effet neuroprotecteur des œstrogènes pour antagoniser ou prévenir la formation d'agents neurotoxiques (par exemple radicaux libres après altération post-hémorragique ou post-infarctus), ce n'est pas démontré cliniquement, malgré certains résultats expérimentaux favorables. La protection pourrait être due à un effet anti-Bcl-2 (un facteur anti-apoptotique). De plus, très récemment, les recherches ont fait une place importante à l'isomère 17-alpha-hydroxy de l'œstradiol, qui aurait une activité sélectivement neurotrope car il n'agit pas *via* les récepteurs classiques ER mentionnés plus haut.

Chez l'homme, les œstrogènes cérébraux se forment par transformation de la testostérone et donc diminuent quand décroît l'hormone testiculaire. Les altérations fonctionnelles nerveuses, souvent semblables à celles de la femme âgée, seraient peut-être diminuées si l'on connaissait un dérivé de type SERM qui aurait des effets cérébraux spécifiques sans avoir d'activité périphérique nuisible. L'activité directe – et non *via* cette transformation en œstrogènes – de la testostérone, est mal connue, bien que des récepteurs des androgènes aient été bien identifiés dans le cerveau. Le sujet n'est pas nouveau : la transplantation des testicules à un chapon fut même une première endocrinologique qui montra à Berthold, dès 1849, un effet hormonal sur l'activité sexuelle et les comportements vocal et agressif propres au mâle. Chez l'homme vieillissant, si la testostérone est vraiment basse (moins de $\sim 3 \mu\text{g/ml}$), l'effet sur l'érection de son administration ou de celle d'un analogue de synthèse est fréquent : il semble que l'hormone ait un effet permissif et il ne sert à rien d'augmenter son niveau au-dessus d'un seuil nécessaire, et cependant suffisant ; le résultat clinique dépend de nombreux facteurs (état général et en particulier vasculaire, contexte psychologique et affectif...).

D'après les expériences sur l'animal, un excès permanent de *glucocorticostéroïdes* peut être préjudiciable au niveau cérébral, et nous avons indiqué plus haut l'hippocampe et l'amygdale comme cibles privilégiées, ce qui favoriserait les troubles de la mémorisation et une tendance à l'anxiété au cours de l'âge. L'altération du fonctionnement corticosurrénalien chez l'homme au cours du vieillissement n'est pas sans analogie avec ce qu'on observe chez toute une catégorie de sujets déprimés (même jeunes), ces dépressions étant souvent d'origine familiale. L'étude des rétrocontrôles indique le déclin d'adaptabilité du système neuronal. D'une façon générale, on tend à passer d'une situation physiologique complexe à un fonctionnement stochastique. Avec l'âge, il y a tendance à la diminution du rétrocontrôle négatif par les glucocorticostéroïdes avec élévation du CRH et de l'ACTH, avance du pic de cortisol matinal et baisse de la DHEA. Ces signes sont particulièrement fréquents et accentués chez les personnes âgées déprimées. La spécificité pathologique n'est pas démontrée, et on retrouve des anomalies hormonales semblables chez des schizophrènes.

Des signes sévères d'anomalies surrénaliennes font craindre des altérations neurodégénératives hippocampiques. Sur le plan thérapeutique, on a rapporté l'effet salvateur de l'anticortisol RU486 dans la dépression psychogène, et celui de la DHEA chez les femmes en crise à la cinquantaine (*mid-life crisis* déjà citée plus haut) et chez les hommes déprimés lors des changements de vie de la soixantaine.

Les effets de la *progestérone* pour faciliter la formation ou la réparation de la myéline (centraux et périphériques) – *via* une stimulation de la lignée oligodendrocytaire plus facilement chez l'animal femelle – conduisent actuellement à des essais expérimentaux réussis pour lutter contre les lésions de la myéline associées à l'âge. Des études sont en cours pour transférer cette notion chez l'humain vieillissant, chez qui les défauts de myélinisation sont un des facteurs de dysfonctionnement nerveux.

La baisse de la DHEA circulante avec l'âge entraîne la baisse de sa concentration dans le cerveau, alors qu'on a montré une activité qui s'oppose à des effets négatifs des glucocorticostéroïdes. On ne sait pas s'il y a diminution de la synthèse de DHEA neurostéroïdienne.

L'activité neuroprotectrice de *GH* et/ou *IGF-1* est bien démontrée chez l'animal, tant sur le métabolisme de l'amyloïde β que sur les déficits cognitifs. Les résultats de traitement par GH-RH ont invité à chercher des molécules stimulant le GHS-R. La ghréline pourrait être utilisée dans ce cadre. Des expériences d'injection de ghréline dans l'hippocampe et l'amygdale ont montré un effet d'amélioration de la mémoire. L'administration de GH/GH-RH n'a pas d'effet démontré d'amélioration sur le sommeil qui, chez l'agé, est caractérisé par des réveils plus nombreux, une diminution des ondes lentes et une augmentation des épisodes de sommeil paradoxal.

Le *pacemaker* (régulateur qui donne le rythme) circadien du noyau supra-chiasmatic (SCN) de l'hypothalamus et contrôle la production de somatostatine, de VIP et d'AVP est altéré dès l'âge adulte, mais on n'évalue pas bien l'importance physiologique des modifications enregistrées.

En conclusion, les connaissances actuelles plaident en faveur de traitements stéroïdiens et autres, dont le succès de neuroprotection ou de traitement semble dépendre en grande partie d'un début aussi précoce que possible, alors qu'il peut être inutile, voire risqué au niveau cérébral s'il est tardif (voir aussi le chapitre 2).

2.4 Autres hormones

Faute d'une vision qui permettrait actuellement de les insérer dans un des autres chapitres, nous réunissons ici trois systèmes hormonaux que nous n'avons pas évoqués ailleurs.

2.4.1 Mélatonine

La mélatonine se forme à partir de l'acide aminé tryptophane, principalement au niveau de la glande pinéale dans le cerveau, et selon plusieurs étapes incluant la synthèse de sérotonine. Sa formation rythmée au sein d'un réseau photo-neuro-endocrinien en fait un véritable indicateur de l'obscurité ressentie : elle augmente à la tombée de la nuit. Chez l'homme, on n'a pas défini avec certitude sa/ses fonction(s), même si son administration aide à rétablir le rythme du sommeil si l'on change de méridiens (le *jet lag* est amélioré chez environ 30 % des personnes). De plus, sa synthèse est probable dans de nombreuses cellules distribuées dans tout l'organisme où elle pourrait assurer des fonctions paracrines indépendantes de la concentration sanguine, et sa présence est importante dans la bile et le liquide céphalorachidien.

Dans le cadre du vieillissement, si la diminution des concentrations sanguines est significative et principalement observée sur le pic nocturne, on n'a pas élucidé son retentissement sur l'organisme. De nombreux travaux expérimentaux chez l'animal et d'observations chez l'homme suggèrent un rôle gérontoprotecteur, antioxydant en particulier, de la mélatonine elle-même et de ses métabolites. Une activité préventive des cancers et même oncostatique a été rapportée chez l'animal, mais dans l'ensemble, les études n'ont pas porté sur d'assez nombreux animaux pendant des durées adéquates et avec des méthodes biochimiques détaillées. Ainsi dans l'ensemble, il n'y a pas matière actuellement à « traiter » le vieillissement avec de la mélatonine.

2.4.2 Anomalies thyroïdiennes : souvent sans conséquence grave

Pour compléter la liste des anomalies hormonales déficitaires pour lesquelles se discutent des supplémentations possiblement utiles, il faut encore citer la fonction thyroïdienne dont l'insuffisance pourrait expliquer plusieurs signes cliniques observés au cours du vieillissement : peau sèche, phanères altérés, modification du tissu conjonctif, ralentissement psychique.

5 à 10 % des femmes de plus de soixante-cinq ans ont dans le sang des taux diminués de *thyroxine* (T₄), et des niveaux corrélativement augmentés de

l'hormone hypophysaire de stimulation de la glande thyroïde, la *thyroestimuline* (TSH) dont la mesure est la plus utile à pratiquer. La raison en est souvent une altération auto-immunitaire de la glande thyroïde, donc plutôt directement pathologique que simplement due à l'âge. Au contraire, le vieillissement à lui seul expliquerait la baisse progressive de la *tri-iodothyronine* (T_3), composé le plus actif au niveau des récepteurs ; elle est probablement due à la diminution du métabolisme de la thyroxine (désiodation $T_4 \rightarrow T_3$). On n'a pas défini avec certitude les conséquences de cet abaissement ni celles d'une administration compensant la baisse enregistrée : on sait que l'augmentation de la fonction thyroïdienne tend à stimuler les oxydations métaboliques, à diminuer l'importance du stockage des lipides, et à accélérer le rythme cardiaque, dangereusement quelquefois, ce qui doit rendre réservé dans l'administration d'hormones thyroïdiennes ou de leurs dérivés, d'autant que les conséquences des anomalies thyroïdiennes liées à l'âge ne sont pas graves généralement.

2.4.3 Vieillesse et hormones calcitropes (avec Jean-Claude Souberbielle)

Le calcium est, avec le phosphore, le principal constituant minéral de l'os. Il a par ailleurs de nombreuses fonctions physiologiques et est fondamental pour la conduction nerveuse, la contraction musculaire, la coagulation et la différenciation cellulaire. Le calcium intracellulaire est également un second messager hormonal majeur. En dehors de certaines conditions pathologiques, la calcémie, et plus précisément la calcémie ionisée, est maintenue stable tout au long de la vie grâce à l'action combinée des hormones calcitropes, l'hormone parathyroïdienne (PTH) et la 1,25-dihydroxyvitamine D [$1,25-(OH)_2D$]. Cette régulation est tellement vitale qu'elle peut être assurée aux dépens du squelette et participer au développement de l'ostéoporose.

La vitamine D, une « prohormone »

La vitamine D doit être considérée comme une prohormone plutôt que comme une vitamine. En effet, la peau peut la synthétiser à partir du 7-déhydrocholestérol sous l'effet de certains rayonnements UVB (longueur d'onde entre 290 et 315 nm). Le statut vitaminiq ue D d'un individu dépend ainsi de son exposition au soleil, tout en sachant que la capacité de la peau à synthétiser la vitamine D diminue avec l'âge (à exposition solaire égale, on produit environ trois fois moins de vitamine D à 80 ans qu'à 20 ans). Qu'elle soit synthétisée par la peau ou apportée par l'alimentation (les sources alimentaires de vitamine D sont toutefois rares) ou la supplémentation médicamenteuse, la vitamine D est transportée par une protéine porteuse dans le sang jusqu'au foie où elle est hydroxylée pour former la 25-hydroxy-vitamine D (25OHD). Cette

hydroxylation n'est pas régulée, c'est-à-dire que plus la quantité de vitamine D synthétisée ou ingérée est importante, plus la quantité de 25OHD formée est grande. La 25OHD a une demi-vie de l'ordre de trois semaines. Dans le rein, une enzyme, la 1-alpha-hydroxylase, permet la transformation de la 25OHD en 1,25-(OH)₂D. Cette hydroxylation rénale est régulée (c'est-à-dire qu'elle dépend des besoins) et est stimulée principalement par la PTH, par une hypophosphatémie ou de faibles apports alimentaires en calcium. La 1,25-(OH)₂D est le métabolite actif de la vitamine D, son dérivé hormonal qui, sécrété par le rein dans le sang, y a une demi-vie de quatre heures environ. Elle agit *via* un récepteur nucléaire, le VDR, et le vieillissement s'accompagne d'une résistance progressive à la 1,25-(OH)₂D. Le rôle le plus important (et le mieux connu) de la 1,25-(OH)₂D est le maintien de l'homéostasie phosphocalcique par augmentation de l'absorption intestinale du calcium et du phosphore, et promotion de la minéralisation osseuse. Produite par le rein, elle passe dans le sang et exerce une véritable activité endocrine sur les cellules intestinales. De plus, la vitamine D agit aussi de manière paracrine : de nombreux tissus possèdent le VDR et la 1-alpha-hydroxylase, et utilisent la 25OHD circulante pour produire de la 1,25-(OH)₂D qui n'agit que localement. Ces actions paracrines pourraient conférer à la vitamine D des effets de protection contre certains cancers et maladies auto-immunes comme le suggèrent des études dites « écologiques » (constatation d'un gradient Nord-Sud dans l'incidence de ces maladies), des études *in vitro* (inhibition de la prolifération de cellules de cancer de prostate par la 1,25-(OH)₂D), des recherches *in vivo* chez l'animal de laboratoire (modèle murin de sclérose en plaques, d'arthrite, ou de diabète de type 1 répondant très favorablement à la 1,25-(OH)₂D) ou épidémiologiques (relation entre l'insuffisance en vitamine D et l'incidence de ces pathologies).

C'est la 25OHD, représentant le stock de vitamine D de l'organisme, qui doit être dosée pour savoir si un patient a ou non une insuffisance en vitamine D. Si les techniques de dosage de la 25OHD sont aujourd'hui fiables et relativement simples (permettant une large utilisation en pratique clinique), les valeurs de référence utilisées habituellement pour interpréter les valeurs mesurées sont à considérer avec prudence. On propose aujourd'hui de définir l'insuffisance en vitamine D par des concentrations de 25OHD pour lesquelles il peut exister des effets délétères pour la santé et en particulier pour l'os (hyperparathyroïdie secondaire, augmentation du niveau de remodelage osseux...), le consensus actuel étant de cibler une concentration de 25OHD entre 75 et 150 nM. On constate alors une fréquence très importante de l'insuffisance en vitamine D, en particulier après soixante ans. En période de faible ensoleillement (novembre à mai) et à nos latitudes, 80 à 90 % des sujets ne recevant pas de supplémentation ont une concentration sérique de 25OHD < 75 nM. On ne peut l'accepter puisque l'on sait que, chez le sujet âgé, l'insuffisance en vitamines D est associée à une augmentation du risque de fractures ostéoporotiques et que des suppléments vitamino-calciques ou vitaminiques D seuls peuvent réduire le risque relatif

de fractures périphériques (même si les conclusions des études d'intervention sont parfois discordantes). L'efficacité de la vitamine D sur le risque de fracture passe incontestablement par une réduction de l'hyperparathyroïdie secondaire, mais aussi par une diminution modeste du risque de chute (expliquée par l'action paracrine de la vitamine D sur les cellules musculaires) démontrée récemment dans plusieurs études d'intervention chez des sujets de plus de 80 ans. Les protocoles de supplémentation peuvent consister en une dose journalière de 800 U de vitamine D2 ou D3, mais, pour optimiser l'observance, il est de plus en plus souvent proposé une administration en une prise unique de 100 000 U de vitamine D3 tous les 2-3 mois. Dans les deux cas, on s'assurera que les apports alimentaires en calcium sont corrects (de l'ordre de 1 200 mg/j). Vu le faible coût d'une telle supplémentation (de l'ordre de 1,5 € tous les 2-3 mois), il est suggéré que des économies de santé pourraient être générées. De nombreux spécialistes considèrent cependant ces doses comme insuffisantes car ne permettant pas d'atteindre les valeurs cibles chez tous les sujets. Il ne faut toutefois pas oublier que la vitamine D est potentiellement toxique (une intoxication par la vitamine D peut exister avec des concentrations sériques de 25OHD > 250 nmol/L) et que l'acceptation d'une supplémentation par des doses très supérieures à celles proposées ci-dessus nécessite des études d'intervention conduites sur des périodes suffisamment longues. Il faut noter enfin que les effets potentiels de la vitamine D sur d'autres maladies (cancers, maladies auto-immunes...) n'ont à ce jour pas encore été démontrés dans des études d'intervention, comme c'est le cas pour la prévention des fractures ostéoporotiques du sujet âgé.

L'hormone parathyroïdienne PTH

La PTH est une hormone peptidique hypercalcémiant et hypophosphatémiant sécrétée par les glandes parathyroïdes en réponse à une baisse de la calcémie ionisée. Avec l'âge, les causes potentielles d'hypocalcémie, principalement la dégradation de la fonction rénale et le déficit vitaminocalcique, deviennent de plus en plus fréquentes. À l'échelon d'une population, il est donc logique que la concentration plasmatique de PTH augmente avec l'âge. À l'échelon individuel cependant, les sujets âgés ayant une fonction rénale normale et un statut vitaminocalcique satisfaisant ont une concentration de PTH identique à celle des sujets jeunes. Depuis la découverte récente de nouvelles formes moléculaires, il faut considérer la PTH comme une polyhormone dont certaines actions ne sont pas encore connues précisément. Même s'ils ne reconnaissent pas les différentes formes moléculaires de la même manière, les dosages de PTH sont fiables pour la pratique clinique. Ils permettent par exemple de diagnostiquer une *hyperparathyroïdie primitive* (HPP) due dans la grande majorité des cas à un adénome parathyroïdien bénin. C'est une pathologie fréquente (après le diabète et les pathologies thyroïdiennes, c'est la plus fréquente des endocrinopathies) dont l'incidence augmente considérablement après cinquante

ans, particulièrement chez la femme ménopausée (environ six femmes pour un homme). L'HPP est le plus souvent asymptomatique, mais peut être responsable d'une lithiase ou d'une ostéoporose (détectée par densitométrie osseuse alors que les clichés RX sont encore négatifs) et peut parfois s'aggraver avec une hypercalcémie menaçante. Alors que dans une hyperparathyroïdie (que celle-ci soit primitive ou secondaire) l'élévation de la PTH est catabolique pour l'os et peut induire ou aggraver une ostéoporose, l'interaction ponctuelle de la PTH avec son récepteur est paradoxalement anabolique pour l'os. Cette propriété est maintenant utilisée en clinique pour traiter des ostéoporoses par une injection SC par jour de PTH synthétique. Ce traitement séquentiel par la PTH (Forsteo®) est aujourd'hui réservé à des ostéoporoses post-ménopausiques sévères avec au moins deux fractures vertébrales.

En résumé, le vieillissement s'accompagne d'une résistance progressive à la 1,25-(OH)₂D et d'une plus grande fréquence de déficits en vitamine D. La supplémentation en vitamine D (accompagnée d'une optimisation des apports calciques alimentaires) permet de réduire le risque relatif de fractures ostéoporotiques périphériques, et peut-être de certains cancers (ce deuxième point reste à démontrer). Le vieillissement s'accompagne également d'une augmentation importante de l'incidence de l'HPP, en particulier chez la femme, justifiant l'intégration du dosage de la calcémie dans les bilans de santé. Le traitement séquentiel par la PTH synthétique a enrichi l'arsenal thérapeutique contre les fractures ostéoporotiques.

3 | Globalement : fragilité du vieillissement, un phénomène hormono-sensible

Comme au cours du vieillissement plusieurs types d'altérations semblent s'additionner, on en déduit qu'il y a de nombreuses façons de vieillir, et qu'il ne peut y avoir qu'incomplétude dans les théories décrivant un mécanisme unique. Il est important de ne pas confondre longévité et vieillissement. La longévité est numériquement évaluée par l'âge et on a suggéré que la longueur des télomères en était une expression biologique. En tout cas, cette numérogénie n'a pas de relation simple avec le vieillissement au sens global du terme et des ensembles hétérogènes peuvent se former. Le vieillissement est fondamentalement stochastique, avec des variantes qui surviennent au hasard au-delà des explications génétiques ou environnementales déjà multiples. Et, comme il y a probablement interaction entre les différents mécanismes qui se déclenchent, la complexité de l'ensemble est nécessairement très grande et différentes approches sont nécessaires pour essayer de comprendre.

3.1 La fragilité et ses critères

Qui n'observe la diminution, de plus en plus importante avec l'âge, de nombreuses fonctions de l'organisme ? Tout se passe comme si celui-ci était victime d'une déstabilisation biologique progressive le rendant moins capable de maintenir l'homéostasie qui lui permet de résister aux influences délétères de l'environnement : elle se traduit par des limitations d'ordre physique, des difficultés cognitives, et prépare à des maladies mettant la vie en danger.

L'ensemble est le plus communément désigné par la communauté biomédicale sous le vocable anglais évocateur de « frailty ». Quand les composantes de la « fragilité » sont réunies, l'affaiblissement est tel qu'on considère comme prochaine l'évolution vers la mort : on se trouve entre l'état normal de l'adulte en bonne santé, et celui de la dépendance totale. Cette condition intermédiaire semble actuellement diminuer de fréquence si on la compare à celle de la mortalité : cette dernière aux États-Unis, depuis les années 1980, a diminué d'environ 1 % alors que celle des infirmités invalidantes a baissé de 2 %. C'est ce que le gérontologue Fries appelle la « compression » de la morbidité, que l'on peut considérer comme une réussite dans la mesure où elle épargne une partie des plus grandes difficultés et souffrances de l'âge à l'individu, son entourage et la société. Il reste que la prévalence de la « frailty » continuera à augmenter avec le vieillissement de la population. Avec les hormones, entre autres moyens, peut-on encore favoriser une meilleure santé aux sujets âgés, et donc diminuer le nombre des « très frêles » ?

La fragilité peut être générale, ou partielle si elle est due à une maladie/infirmité spécifique. Sa généralité implique le plus souvent une sarcopénie (baisse de l'importance et de la fonction des muscles), une diminution conjointe des dépenses énergétiques et de la nutrition, une baisse de l'activité des fonctions cognitives, et souvent des signes de dépression. Parmi les facteurs importants, on peut réunir les éléments d'un syndrome inflammatoire qu'atteste l'augmentation de la protéine réactive C (« CRP »), du fibrinogène et du facteur VIII de coagulation, une tendance à l'hyperglycémie et une élévation de la cytokine IL-6 et du facteur TNF- α (un des marqueurs les plus notables de l'inflammation chez les gens âgés). Le déclin de l'efficacité de la chaîne respiratoire conduit à l'augmentation des radicaux libres, et seul l'exercice réduit le taux du stress oxydatif. Celui-ci stimule la production de plusieurs cytokines, y compris IL-6, l'activation du système NF- κ B jouant un rôle important. Les modifications neuroendocriniennes jouent un rôle important dans cet ensemble avec en particulier la baisse de l'IGF-1 et celle du DHEA-S, alors que persiste la concentration circulante de cortisol ou même son augmentation, dont on redoute qu'il altère l'activité musculaire et le fonctionnement cérébral.

Les grands mécanismes maintenant l'homéostasie incluent les hormones, les réponses immunitaires, le système nerveux autonome et le métabolisme des éléments nutritionnels qui fournit de l'énergie. Parmi les causes de déséquilibre, les éléments du syndrome de défense inflammatoire, si utiles dans le jeune âge dans la lutte contre les infections, peuvent devenir délétères s'ils persistent au cours des années, souvent sans raison ni contrôle reconnu.

Des essais très intéressants, étudiant cliniquement et biologiquement de façon détaillée, des cohortes d'au moins mille sujets, ont tenté de définir un ou des marqueurs du risque biologique cumulatif encouru par des individus ayant le privilège d'avoir une longévité active. En tenant compte du fonctionnement cardiovasculaire, des modifications du métabolisme, de l'ensemble hypophyso-surrénalien et du système nerveux sympathique, et à l'aide de dix paramètres biologiques – dont quatre hormones – on a pu systématiser une accumulation « allostatique » permettant de prévoir le pronostic d'un désordre cardiovasculaire, d'un déficit physique profond, d'un déclin cognitif sérieux, et la mortalité elle-même. Les quatre hormones mesurées sont le sulfate de déhydroépiandrostérone, le cortisol, l'adrénaline (épinéphrine) et la noradrénaline (norépinéphrine). Aucune mesure ne semble fournir un indice valable de prédiction à elle seule. Les six paramètres cardiométaboliques qui définissent, s'ils sont mauvais, un pronostic pessimiste, se mesurent en étudiant les pressions artérielles systolique et diastolique, les lipoprotéines de densité élevée, le cholestérol, l'hémoglobine glycosylée et l'obésité abdominale. Les quatre paramètres hormonaux y ajoutent une indication indépendante. On a beaucoup rapporté que le DHEA-S pouvait être un marqueur valable d'après les études cross-sectionnelles ou longitudinales. Un taux élevé semble favorable en cas de diabète, cancer, maladie cardiaque, et d'hypertension artérielle pulmonaire, et expérimentalement chez le singe, on l'observe au cours de la restriction calorique. La décroissance physiologique de DHEA-S avec l'âge observée chez le macaque rhésus est 2,3 fois plus rapide que chez l'homme, ce qui corrèle avec la longévité plus longue de ce dernier. On peut cependant compliquer et compléter l'ensemble en évoquant souvent des facteurs mal quantifiés, immunitaires, inflammatoires, et de modifications de la coagulation sanguine. Par exemple, la mesure de produits de glycation et de gluco-oxydation au niveau de la peau a été proposée pour servir d'index d'un fonctionnement délétère.

Sur quels critères considérer les modifications hormonales avec l'âge, production et/ou effets, pour proposer éventuellement une correction utile afin de ralentir le vieillissement. Ingram *et al.* s'appuient sur quatre critères : 1. La corrélation de l'anomalie avec l'âge au cours d'études épidémiologiques de « cross-section » ; 2. Les modifications semblables au cours des études « longitudinales » recoupant les résultats des mesures de cross-section ; 3. La stabilité dans le temps des différences individuelles ; 4. La proportionnalité des modifications associées

à l'âge aux différences de durée de vie observées dans différentes espèces (cette comparaison n'est pas toujours possible, évidemment).

3.2 Le vieillissement, un phénotype hormono-sensible

Très généralement, les – ou au moins des – hormones peuvent-elles entraver le déclin des sujets fragiles que sont les personnes âgées ? Sont-elles, si on en stimule la production endogène ou on en administre un supplément en cas de déficit, capables de compenser ce dernier et de retarder l'affaiblissement des fonctions altérées ? Il semble que oui parfois. C'est le cas, vérifié en clinique, de l'effet conservateur/réparateur des œstrogènes au niveau des os ; c'est celui, expérimentalement démontré, de la restitution de la mémoire spatiale abaissée chez des animaux âgés (rats « normaux » de vingt-quatre mois à qui on injecte dans l'hippocampe un « neurostéroïde » déficitaire). Les hormones ainsi utilisables doivent être dépourvues d'effets secondaires délétères : les doses, les voies et le rythme d'introduction, et l'invention de molécules permettant de « dissocier » les réponses selon qu'on les juge bénéfiques ou non, sont à considérer soigneusement. Ce sera d'autant plus difficile que le vieillissement implique souvent (toujours ?) chez les personnes âgées des modifications mal connues du métabolisme des produits administrés, dont les effets peuvent être augmentés, modifiés ou diminués sans que l'on sache bien le contrôler. Ou, autre exemple déjà compliqué chez l'adulte jeune, celui des hormones sexuelles, quand on considère les contrôles et rétrocontrôles hypothalamo-hypophysaires, auxquels il faut ajouter le rôle de peptides récemment étudiés tels l'inhibine, l'activine, etc., qui multiplient les circuits, et dont on sait peu de leur production et de leurs effets au cours de l'âge. À ce propos, des discussions récentes ont évoqué les relations balancées entre reproduction et longévité, comme s'il y avait une alternative métabolique (théorie du « disposable soma » de Kirkwood), mais on ne sait pas actuellement déduire des connaissances sur les hormones, même quand elles sont bien décrites, leurs effets probables sur la durée de vie. Les phénomènes survenant au cours du vieillissement relèvent de processus divers dus à des altérations dans la synthèse de protéines, avec effets des radicaux libres, à des dysfonctionnements des mitochondries, etc. Aucune fonction physiologique ne relève d'un mécanisme unique, et réciproquement aucune hormone n'agit sur un seul mal fonctionnement. On en est encore actuellement à observer plutôt que comprendre. Pas de pilule, *pas d'hormone « magique »* à l'horizon immédiat dans l'immense majorité des cas, même si les progrès dans l'analyse des récepteurs et de la synthèse de ligands à l'activité spécifique permettent de très sérieuses espérances. Pour appréhender sur le plan pratique les difficultés de comprendre et d'utiliser les hormones, il faudra peut-être faire place à une notion théorique inconnue.

On devrait considérer deux façons d'agir bien distinctes des hormones. La première est celle qui définit précisément des cibles initiales, entraînant secondairement d'autres effets souvent multiples et complexes ; dans ce cas il y a un rapport de cause à effet direct *vérifiable quantitativement* de façon simple (« relation dose-effet »). L'autre mécanisme est d'ordre « *permissif* » (Ingle), voulant dire que certains composés hormonaux permettent à des phénomènes biologiques de se dérouler, leur présence étant nécessaire, sans qu'il n'y ait de rapport quantitatif une fois la présence du produit assurée à un niveau minimum donné. Les endocrinologues ont souvent oublié cet aspect modulateur de l'activité de certaines hormones pourtant bien démontrées en physiologie et en thérapeutique. Il s'ensuit qu'il n'est pas besoin (et éventuellement qu'il est dangereux) d'augmenter les doses hormonales : la « réponse » caractéristique en est indépendante une fois atteint le seuil hormonal (voir le cas des androgènes). Ces considérations ne facilitent pas toujours l'utilisation thérapeutique des hormones, mais elles doivent la rendre plus efficace et plus sûre.

3.3 Et la durée de la vie ?

Dans un modèle très éloigné de notre constitution de primate, celui du très petit ver nématode *C. elegans* dont les 959 cellules somatiques bien caractérisées ont déjà permis de remarquables découvertes extrapolables à tous les animaux (ou presque), des travaux récents ont montré que la suppression des cellules germinales (mutation *glp-1*) s'accompagne d'une prolongation significative ($\geq 60\%$) de la durée de la vie ; la découverte d'un taux relativement élevé de prégnénolone chez cet animal et de l'effet de prolongation de la longévité apparemment en bonne santé provoquée par ce stéroïde, indiquent une fois de plus la participation certaine des hormones aux mécanismes de la durée de la vie. Incidemment, chez les vertébrés, la prégnénolone, métabolite direct du cholestérol, n'est pas seulement un composé intermédiaire dans la synthèse des hormones stéroïdes. Des travaux récents sur les neurostéroïdes indiquent un effet de ce composé sur le fonctionnement des microtubules des neurones lui permettant une activité neuroprotectrice. Quelle conservation moléculaire au cours de l'évolution ! D'autre part, la famille des récepteurs nucléaires, qui ont été découverts initialement comme récepteurs des hormones stéroïdes et thyroïdiennes, intervient de façon décisive dans le métabolisme des lipides, tel le groupe des « peroxisome proliferator-activated receptors » (PPAR). Si la possibilité de stocker des ressources énergétiques et de les conserver dans l'optique d'avoir à résister à la famine a donné un avantage sélectif aux animaux, homme inclus, elle ne s'adapte plus à notre vie moderne sédentaire et nous observons à présent les méfaits au cours du vieillissement d'une alimentation trop riche caloriquement, et à l'inverse nous découvrons les bons effets de la restriction calorique sur la longévité. Le rôle de certains PPAR et de leurs ligands, naturels

et pharmacologiques, pour contrôler le métabolisme des lipides et éventuellement allonger la durée de la vie, est un domaine d'actualité en pleine expansion (Evans). Par exemple, une forme active du PPAR δ dans les muscles permet à une souris transgénique de mieux métaboliser des lipides, de courir plus loin et de vivre plus longtemps, à l'opposé d'animaux chez qui le récepteur a été annulé.

On a vu que la restriction calorique accroît la longévité dans toutes les espèces étudiées, de la levure à la souris en passant par les vers et les mouches. C'est ce que fait aussi l'interruption ou la limitation du système complexe de signalisation incluant les réponses à l'insuline et à l'IGF-1 (« IIS »). Les ensembles gouvernés par les cascades de signalisation auxquelles participent des récepteurs membranaires et des récepteurs nucléaires sont étroitement intriqués, et coordonnent les indications issues du métabolisme organique, de l'alimentation et de l'environnement en général – ce qui implique la participation du système nerveux central.

Toutes ces observations conduisent à énoncer une généralité encore mal acceptée : on se laisse aller souvent à trouver des analogies entre la biologie du développement et celle du vieillissement, comme si celui-ci était une sorte de développement inversé. En fait, il ne semble pas que les mécanismes fondamentaux qui sont impliqués soient analogues. Un embryon, un fœtus, un enfant se développent selon un programme manifestement très contrôlé génétiquement, et que l'on peut décrire avec assez de précision de la période intra-utérine jusqu'aux premiers mois et années de la vie : formation de l'appareil génital, fermeture du système cardiaque, tenue de la tête, premiers mots, puberté surviennent en temps et en heures bien délimitées et essentiellement prévisibles. Il n'en est pas de même du vieillissement, avec une remarquable exception que nous avons évoquée, la date de la ménopause, qui ne semble pas avoir évolué avec l'augmentation de la durée de la vie enregistrée depuis deux siècles. Chez les personnes âgées, nous pouvons maîtriser (en partie) l'évènement : l'athérosclérose et l'obésité dépendent beaucoup de la nutrition, la force des muscles diminue plus ou moins selon l'exercice qu'on leur fait faire, l'efficacité intellectuelle est influencée par nos préoccupations et nos efforts cognitifs, etc., avec pour chaque fonction ou altération, à côté des comportements, une participation endocrinienne qui peut permettre une (des) intervention(s) hormonale(s) possible(s) qui mérite(nt) dès à présent d'être envisagée(s) ; dans d'autres cas nous n'y pouvons rien ou presque. On peut faire beaucoup avec les comportements, les régimes alimentaires et les « traitements » hormonaux... mais pas tout !

Recommandations

- Pédagogie généralisée dès le collège sur les comportements qui déterminent l'état de santé futur, y compris au cours du vieillissement.

- Renforcer l'enseignement de gériatrie et de gérontologie en facultés de sciences, de médecine et de pharmacie (hormones, nutrition, paramètres physiques, comportementaux et biologiques).
- Pédagogie médicale concernant les produits et méthodes « antiaging ».
- Recommander la mesure répétée de certains paramètres du vieillissement endocrinologique (FSH chez la femme, testostérone et PSA chez l'homme, DHEA-S, vitamine D et TSH dans les deux sexes).
- Favoriser la recherche fondamentale dans différents domaines (biologie, pharmacologie, instrumentation, sociologie, psychologie...) sur la longévité et le vieillissement (elle n'est pas inscrite dans les domaines sélectionnés par l'ANR!). Insister sur les maladies du cerveau et le rôle des hormones dans l'évolution de la maladie d'Alzheimer.
- Subventionner le réseau de recherches de l'Institut de la longévité et du vieillissement (29, rue Wilhem 75016 Paris - www.gis-longevite.cnrs.fr).
- Subventionner la Fondation « Vivre Longtemps », sous l'égide de la Fondation Caisse d'Épargne pour la Solidarité (9, avenue René Coty 75014 Paris). Programmes centrés sur « hormones et vieillissement ». La fondation bénéficie des mesures fiscales pour les donateurs.

Références bibliographiques

- Ames BN. (2004). Delaying the mitochondrial decay of aging. *Ann NY Acad Sci*, **1019** : 406-411.
- Baulieu EE. et Kelly PA. (eds) (1990). *Hormones*. Hermann Publishers in Arts and Science.
- Baulieu EE., Robel P. et Schumacher M. (eds) (1999). *Neurosteroids*. Humana Press.
- Bilezikian JP. et Potts JT. Jr. (2002). Asymptomatic primary hyperparathyroidism : new issues and new questions – bridging the past with the future. *Journal of Bone and Mineral Research*, **17** : N57-N67.
- Degroot LJ., Jameson JL. et Cutler IS. (eds) (2000). *Endocrinology*, 5th edition. W.B. Saunders Company.
- Evans RM., Barish GD. et Wang YY. (2004). PPARs and the complex journey to obesity. *Nat Med*, **10** : 355-361.
- Finch CE., Robine JM. et Christen Y. (eds) (2002). *Brain and longevity*. Springer-Verlag.

- Flier JS. (2004). Obesity wars : molecular progress confronts an expanding epidemic. *Cell*, **116** : 37-350.
- Hadley EC., Lakatta EG., Morrison-Bogorad M., Warner HR. et Hodes RJ. (2005). The future of aging therapies. *Cell*, **120** : 557-567.
- Ingram DK., Nakamura E., Smucny D., Roth GS., et Lane MA. (2001). Strategy for identifying biomarkers of aging in long-lived species. *Exp Gerontol*, **36** : 1025-1034.
- Johnson TE. (2006). The nematode *Caenorhabditis elegans* in aging research. Éditorial du numéro spécial d'*Experimental Gerontology*, doi : 10 :1016/j.exger.2006.08.002, sous presse.
- Kaufman JM. et Vermeulen A. (2005). The decline of androgen levels in elderly men and its clinical and therapeutic implications. *Endocrine Reviews*, **26** : 833-876.
- Kempermann G., Wiskott L. et Gage FH. (2004). Functional significance of adult neurogenesis. *Curr Opin Neurobiol*, **14** : 186-191.
- Kenyon C. (2005). The plasticity of aging: insights from long-lived mutants. *Cell*, **120** : 449-460.
- Koubova J. et Guarente L. (2003). How does caloric restriction work? *Genes Dev*, **17** : 313-321.
- Kowald A. et Kirkwood TBL. (1996). A network theory of aging : the interactions of defective mitochondria, aberrant proteins, free scavengers in the aging process. *Mut Res*, **316** : 209-236.
- Lamberts SWJ., van den Beld AW. et van der Lely AJ. (1997). The Endocrinology of Aging. *Science*, **278** : 419-424.
- Mazat L., Lafont S., Berr C., Debuire B., Tessier JF., Dartigues JF. et Baulieu EE. (2001). Prospective measurements of dehydroepiandrosterone sulfate in a cohort of elderly subjects: Relationship to gender, subjective health, smoking habits, and 10-years mortality. *Proc Natl Acad Sci USA*, **98** : 8145-8150.
- Medvedev ZA. (1990). An attempt at a rational classification of theories of ageing. *Biol Rev*, **65** : 375-398.
- Morales AJ., Nolan JJ., Nelson JC. et Yen SCC. (1994). Effects of replacement dose of dehydroepiandrosterone in men and women of advancing age. *J Clin Endocrinol Metab*, **78** : 1360-1367.
- Pfaff DW. et collaborateurs (eds) (2002). *Hormones, brain and behavior* (vols. 1 à 5). Academic Press.

- Sapolsky RM., Krey LC. et McEwen BS. (1986). The neuroendocrinology of stress and aging: the glucocorticoid cascade hypothesis. *Endocrine Reviews*, **7** : 284-301.
- Smith RG., Betancourt L. et Sun Y. (2005). Molecular endocrinology and physiology of the aging central nervous system. *Endocrine Reviews*, **26** : 203-250.
- Tatar M., Bartke A. et Antebi A. (2003). The endocrine regulation of aging by insulin-like signals. *Science*, **299** : 1346-1351.

Étienne-Émile Baulieu remercie Dominique Diop pour son inlassable aide éditoriale.

Abréviations

- ACTH : adrenocorticotrophic hormone
AVP : arginine vasopressine
BDNF : brain-derived neurotrophic factor
CAR : constitutive androstane receptor
CCK : cholécystokinine
CRH : corticotropin-releasing hormone
ERT : estrogen replacement therapy
DHEA : déhydroépiandrostérone
DHEA-S : sulfate de déhydroépiandrostérone
DHT : dihydrotestostérone
FSH : follicle-stimulating hormone
GFAP : glial fibrillary acidic protein
GH : growth hormone
GH-RH : growth hormone-releasing hormone
HPA : hypothalamic-pituitary-adrenal
HPP : hyperparathyroïdie primitive
IGF-1 : insulins-like growth factor 1
LH : luteinizing hormone
LTP : potentialisation à long terme
NAD : naphtyl acétamide
NBM : nucleus basalis magnocellularis
NMDA : N-méthyl-D-aspartate
NPY : neuropeptide Y
POMC : proopiomelanocortin
PPAR : peroxisome proliferator-activated receptors
PSA : protéine de stimulation de l'acylation
PTH : hormone parathyroïdienne
PVN : noyau paraventriculaire

PXR : pregnane X receptor
SBP : steroid binding protein
SC : sous-cutané
SCN : noyau suprachiasmatique
SARM : selective androgen receptor modulators
SERM : selective estrogen receptor modulators
SPRM : selective progesterone receptor modulators
SHBG : steroid hormone binding globulin
SIR : silent information regulation
SST : somatostatine
T : testostérone
TSH : thyroestimuline hormone
VIP : vasoactive intestinal peptide
WAT : white adipose tissue

CHAPITRE 5

Perturbateurs hormonaux

JEAN-FRANÇOIS SAVOURET, DENIS BARD ET ANDRÉ PICOT

Résumé

L'endocrinologie est passée en quelques décennies des hormones aux interactions entre hormones et récepteurs, puis aux mécanismes moléculaires du contrôle du métabolisme et de l'expression des gènes. Il fut rapidement observé que des molécules étrangères à la physiologie, les xénobiotiques, pouvaient s'immiscer dans ces équilibres pour les perturber.

Les premiers xénobiotiques identifiés comme perturbateurs hormonaux furent des toxines végétales ou des composés chimiques utilisés par les industries et diverses activités humaines et répandus dans l'environnement au cours de leur utilisation ou de leur élimination incontrôlée. De nombreux exemples de troubles du développement sexuel et de la reproduction causés par ces perturbateurs hormonaux ont été analysés sous l'angle de la toxicologie environnementale et de la pollution. Les effets œstrogéniques des insecticides et des antifongiques sont l'exemple le plus connu. Certains xénobiotiques, comme les dioxines, montrent une aptitude à l'activation de récepteurs « orphelins », aux ligands inconnus, capables de générer leurs propres régulations autant que de perturber celles de couples hormone/récepteur connus.

Un nouveau chapitre s'écrit aujourd'hui avec le double élargissement du concept de perturbation hormonale. D'une part, celle-ci se doit maintenant d'englober toute l'endocrinologie et non plus seulement la reproduction, comme en témoignent les exemples présentés du tabagisme et du diabète. D'autre part, de nouveaux xénobiotiques présents dans l'alimentation, naturellement (phyto-œstrogènes) ou comme additifs autorisés, rejoignent les polluants industriels dans la liste des molécules à surveiller, de par leur utilisation en association, leur consommation parfois massive (soja) et leurs effets biologiques encore incomplètement documentés dans tous les domaines de la physiologie.

Cette liste en augmentation constante a conduit à la création du projet REACH (acronyme anglais pour enregistrement, évaluation et autorisation des produits chimiques), en réponse à l'insuffisance actuelle des connaissances. Ce projet européen permettra l'élimination progressive des produits chimiques les plus dangereux. Les producteurs devront transmettre à une agence centrale européenne un dossier d'enregistrement contenant des données de sécurité sur les substances produites, données proportionnelles aux volumes de production. Le dossier sera évalué par des experts, en particulier pour les substances produites en grande quantité ou qui comportent un risque. Les composés « extrêmement préoccupants » (cancérigènes, toxiques bio-accumulatifs dont les perturbateurs hormonaux) seront éliminés et remplacés par des produits plus sûrs, à moins que l'industrie ne puisse prouver que ces substances aient un intérêt « socio-économique » supérieur aux risques et que ces risques sont contrôlés. REACH

devrait aussi permettre d'optimiser l'application du principe de précaution pour les nouvelles molécules.

Notre équilibre intérieur est donc de plus en plus confronté aux xénobiotiques, que ce soit par la pollution ou les procédés de l'alimentation industrielle. Les possibilités de potentialisation croisée entre polluants et/ou entre polluants et additifs alimentaires autorisés sont pratiquement inconnues. La recherche épidémiologique doit documenter l'exposition générale du public aux xénobiotiques et identifier l'exposition ou la vulnérabilité particulières de certaines populations à risque. La recherche fondamentale doit élucider les mécanismes d'action des xénobiotiques et développer la production de marqueurs, de techniques de détection et de mesure ainsi que d'agents thérapeutiques. Enfin, les pathologies liées aux xénobiotiques industriels doivent être reconsidérées dans le contexte de maladies professionnelles. Tout cela suppose que la science comme la législation agissent au niveau européen et international.

1 | La perturbation hormonale

1.1 Définition

Selon la Commission européenne, un perturbateur hormonal, plus communément appelé perturbateur endocrinien (PE) est une substance étrangère à l'organisme, qui produit des effets pathologiques sur l'organisme ou sur sa descendance, à la suite d'une modification de la fonction hormonale (European Workshop on the Impact of Endocrine Disrupters on Human Health and Wildlife, Weybridge, UK ; 1996, European Union Report EUR17459).

Selon l'Agence américaine de l'environnement (EPA), un perturbateur endocrinien est un agent exogène qui interfère avec la production, la libération, le transport, le métabolisme, la liaison, l'action ou l'élimination des ligands naturels responsables du maintien de l'homéostasie et de la régulation du développement de l'organisme (Kavlock *et al.*, 1996).

Ces définitions sont centrées sur la notion de **xénobiotiques** ou composés étrangers à l'organisme. La définition américaine est restreinte et ne conçoit que la perturbation immédiate des systèmes hormonaux en omettant les effets passant par des voies spécifiques des xénobiotiques ainsi que les effets transgénérationnels.

L'hypothèse des PE est née du recoupement d'études cliniques humaines en toxicologie de la reproduction et de la thyroïde et d'études de l'environnement

sur des anomalies de la reproduction de diverses espèces animales. Dans une étude pionnière, l'analyse de 61 publications de spermogrammes effectuées entre 1938 et 1991 a montré une diminution régulière du nombre de spermatozoïdes (de 113 à 66×10^6 /ml) et du volume de sperme, suggérant une réduction de la fertilité masculine (Carlsen *et al.*, 1992). Ces auteurs associent le phénomène avec l'augmentation concomitante d'autres altérations des gonades mâles (cryptorchidie, hypospadias) et des cancers du testicule. Skakkebaek *et al.* ont proposé de regrouper ces symptômes dans le cadre d'un syndrome de dysgénésie testiculaire, qui résulterait d'une surexposition des cellules de Leydig et de Sertoli à une influence œstrogénique extérieure durant la vie fœtale et les premières années (Skakkebaek *et al.*, 2001). L'insuffisance leydigienne entraînerait une sous-exposition aux androgènes, responsable des troubles de la morphogénèse, tandis que l'atteinte sertolienne conduirait aux cancers du testicule et à l'insuffisance spermatique.

Au fil du temps, se sont ajoutés des résultats mettant en cause des contaminants environnementaux (Longo, 1980), des œstrogènes de synthèse (diéthylstilbestrol, DES), responsable de cancers chez les filles de patientes traitées durant leur grossesse (Clark et Portier, 1979 ; Mattingly et Staffl, 1976) ; enfin d'autres xéno-œstrogènes naturels ou industriels (Waller *et al.*, 1996). Finalement, on associa à ces effets xéno-œstrogènes des pathologies observées au voisinage d'accidents industriels impliquant des hydrocarbures polycycliques aromatiques (HAP), des dioxines et/ou des polyhalogénobiphényles (PHB). Ces composés reconnaissent et activent le récepteur orphelin Ah (aryl hydrocarbon receptor, AhR) mais certains sont aussi génotoxiques ou antithyroïdiens. L'ensemble de ces observations définit la perturbation hormonale qui fait l'objet d'un débat sur sa relation avec la diminution de la fertilité masculine, divers troubles de la reproduction et l'accroissement de la fréquence de cancers dont les cancers du testicule.

Plus de 23 millions de molécules sont répertoriées en 2004, les produits industriels représentent 100 000 composés et 800 à 1 000 nouveaux composés sont introduits chaque année. Pour la plupart, les données d'évaluation du risque sanitaire sont insuffisantes ou inexistantes. Le risque potentiel est encore augmenté par l'existence d'additifs alimentaires pour lesquels il existe très peu de données (Munro *et al.*, 1999).

Les « pesticides » regroupent les insecticides, herbicides et antifongiques tandis que le concept de composés organohalogénés polluants persistants (POP) regroupe une douzaine de molécules dont le danger environnemental est avéré : aldrine, chlordane, DDT, dieldrine, biphényles, dioxines et furanes halogénés, endrine, heptachlore, hexachlorobenzène, mirex et toxaphène.

1.2 Mécanismes de la perturbation hormonale

Il existe deux types d'hormones, peptidiques ou non peptidiques. Ces dernières sont des molécules de taille réduite (300 à 400 angströms), souvent lipophiles qui comprennent des stéroïdes (œstrogènes, progestérone, androgènes, glucocorticoïdes), des acides aminés modifiés (hormones, neuromédiateurs), des lipides (prostaglandines, rétinoïdes. . .) et d'autres molécules complexes (rifampicine).

Les hormones peptidiques et les neuromédiateurs agissent par l'entremise de récepteurs situés à la surface des cellules. Il n'y a pratiquement pas de données décrivant des interactions directes entre xénobiotiques et récepteurs membranaires dans le cadre de la perturbation endocrine. Les hormones lipophiles diffusent à travers la cellule pour interagir avec des récepteurs intracellulaires avec une affinité globalement nanomolaire. Ces récepteurs sont des protéines cytoplasmiques et/ou nucléaires dotées d'un site de liaison saturable et de haute affinité pour un ligand ou des ligands spécifiques. Cette saturabilité permet une compétition entre ligands pour un même récepteur. Le clonage des récepteurs stéroïdiens a montré leur homogénéité structurale et généré le concept d'une superfamille qui regroupe une cinquantaine de récepteurs plus de nombreux récepteurs « orphelins » (Aranda et Pascual, 2001). Ces derniers n'ont pas de ligand physiologique identifié mais on leur connaît des ligands naturels de basse affinité ou des ligands synthétiques.

Les récepteurs nucléaires présentent un domaine central de liaison à l'ADN ainsi que deux domaines d'activation de la transcription aux extrémités N- et C-terminales. Le domaine de liaison à l'ADN se caractérise par deux motifs en boucle stabilisée par un atome de zinc (doigt de zinc), qui interagissent avec les sillons de l'hélice d'ADN. Le premier motif reconnaît spécifiquement la séquence de l'élément de réponse à l'hormone (HRE). Le deuxième motif lie l'ADN de façon non spécifique et stabilise l'interaction. Le domaine de liaison du ligand se situe dans la région C-terminale.

La liaison de l'hormone modifie la structure du récepteur. Cette étape permet de différencier deux types de récepteurs, homo- ou hétérodimériques. Les récepteurs homodimériques (ligands stéroïdiens) sont complexés à des protéines chaperones en l'absence d'hormone et n'ont pas d'affinité pour l'ADN. La liaison de l'hormone provoque la dissociation des protéines chaperones et l'apparition de l'affinité pour l'ADN. Cet ensemble de modifications constitue l'activation (Milgrom *et al.*, 1973). L'interaction des récepteurs activés avec un ou plusieurs HRE présents dans la séquence d'un gène cible conduit au remodelage de la chromatine et à la modulation de la transcription de ce gène. Les récepteurs hétérodimériques (hormones thyroïdiennes, lipides, rétinoïdes. . .) sont associés

au récepteur RXR (récepteur X de l'acide 9-cis rétinolique) agissant comme cofacteur constitutif. Le couple hétéromérique est associé à l'ADN, complexé à des corépresseurs protéiques et à des enzymes qui s'opposent à l'ouverture de la chromatine (histone-désacétylases). Le rôle de l'hormone est alors de dissocier les corépresseurs du complexe qui va recruter des coactivateurs et des histone-acétylases (revue dans Aranda et Pascual, 2001).

Les PE sont aussi de petites molécules lipophiles et leurs effets perturbateurs s'observent à chaque étape du mécanisme d'action des récepteurs. Ils peuvent se lier aux récepteurs, générant une compétition avec l'hormone naturelle. Ils peuvent activer ou inhiber le récepteur au niveau de la machinerie transcriptionnelle, ou induire sa dégradation par le protéasome, provoquant une dysfonction de la voie de signalisation concernée. Les récepteurs « orphelins » (PPAR, PXR, SXR, CAR β et BXR ; figure 5.1) sont aussi des cibles de xénobiotiques perturbateurs. PXR est un récepteur nucléaire hétérodimérique associé à RXR et exprimé dans le foie, l'utérus, l'ovaire et le placenta. Sa concentration augmente dans ces organes (à l'exception du placenta) à la fin de la grossesse, ce qui suggère son implication dans la protection du système foeto-maternel et en fait une cible pour la toxicité périnatale des xénobiotiques (Masuyama *et al.*, 2001).

Les cytochromes P-450 sont une superfamille de mono-oxygénases qui catalysent la phase I (hydroxylation) de la métabolisation des xénobiotiques mais aussi de composés endogènes (stéroïdes). Ils se subdivisent en familles (CYP1, 2, 3...) selon les substrats, puis en sous-familles (CYP 1A, 1B) et enfin en isoenzymes (CYP 1A1, 1A2). La figure 5.1 résume les corrélations entre les cytochromes P-450 responsables du métabolisme des xénobiotiques et les récepteurs hormonaux qui en induisent l'expression.

2 | Les initiatives internationales

En 1992, la Conférence de Rio de Janeiro sur l'Environnement et le développement a défini six programmes dont le Programme international pour la sécurité chimique (IPCS, www.who.int/ipcs/en) qui associe l'Organisation mondiale de la santé, l'Organisation internationale du travail et le programme des Nations unies pour l'environnement. Le Forum international sur la sécurité chimique (IFCS) et le Programme Inter-Organisations pour la gestion sûre des produits chimiques (IOMC) ont été chargés de définir les stratégies de mesure du risque à plusieurs niveaux : définition du risque, identification des produits à risque, adéquation des méthodes de mesure et de criblage, exposition aux taux faibles et effets de synergie par mélange.

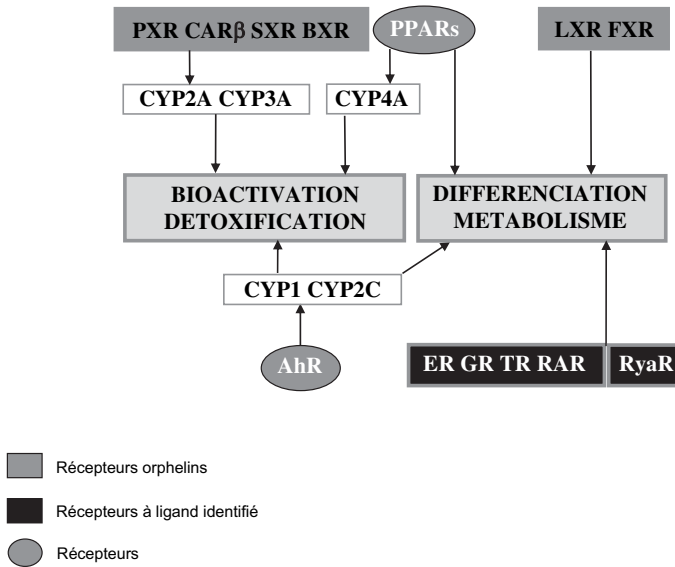


Figure 5.1

Récepteurs cibles des xénobiotiques.

Les récepteurs (PPARs et AhR) sont des récepteurs orphelins, PXR, CAR β , SXR, BXR et LXR, FXR des récepteurs possédant de nombreux substrats sans préséance nette, ER, GR, TR, RAR et RyaR des récepteurs à ligand identifié. Tous sont la cible de xénobiotiques.

AhR : récepteur des HAP (et des dioxines). BXR : récepteur X du benzoate. CAR β : récepteur de l'androstane (activité constitutive). ER : récepteur des œstrogènes. FXR : récepteur X du farnésyl. GR : récepteur des glucocorticoïdes. LXR : Liver X receptor : récepteur des 20/22-oxystérols. PPAR : récepteurs activés par les proliférateurs de peroxyosomes (α , β , γ). RAR : récepteur des rétinoïdes (α , β , γ). PR : récepteur de la progestérone. RyaR : canal calcique sensible à la ryanodine. SXR : steroid and xenobiotic receptor. TR : récepteur des hormones thyroïdiennes (α , β). CYP : cytochrome P-450.

Aux États-Unis, le National Institute of Health a créé le « National Toxicology Program's Center for the Evaluation of Risks to Human Reproduction », chargé d'évaluer la perturbation hormonale. Un programme de détection des PE a été lancé dans le cadre du programme de qualité de la nourriture (Food Quality Protection Act, 1996). L'Agence américaine de l'environnement (EPA) a formé un comité des tests des PE (www.epa.gov/scipoly/oscpendo/edspoverview/edstac.htm) et a lancé en 2002 une campagne de tests pour détecter la perturbation hormonale au niveau de l'axe hypothalamogonadique et de la thyroïde sur le plan du métabolisme et des récepteurs hormonaux.

En Europe, la présence de polluants dans l'environnement fait l'objet d'actions depuis le 4^e Programme commun de recherche et développement (PCRD). Celui-ci comprend un groupe de quatre programmes (Credo, www.credocluster.info/intro.html). Les PCRD suivants ont prolongé ces actions (www.cordis.lu/food/home.html) en y adjoignant divers programmes

de plus petite envergure, de type STREP. Un réseau d'excellence (Cascade, www.cascadenet.org) a été mis en place par le 6^e PCRD. Le 7^e programme annonce les mêmes intentions. Le Conseil européen de l'industrie chimique (Cefic) a lancé le « Long Range Research Initiative », www.cefic-lri.org). Ce programme a pour but de coordonner la recherche publique et privée en matière de santé et environnement et de créer une structure au niveau européen.

Au niveau français, le Comité de la prévention et de la précaution (CPP, ministère de l'Écologie et du Développement durable) publie des rapports réguliers sur le sujet (http://www.ecologie.gouv.fr/article.php3?id_article=1827), de même que l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments (Afssa) qui a notamment publié en 2005 deux rapports sur les populations françaises exposées aux dioxines, PCB et furanes (<http://www.afssa.fr/Ftp/Afssa/25506-25507.pdf>) ainsi que sur la balance risque/bénéfice des phytoestrogènes (<http://www.afssa.fr/ftp/afssa/28468-28469.pdf>). Le groupe Ecrin est une initiative intéressante qui relie l'industrie publique et privée, les acteurs de la recherche et les pouvoirs publics (www.ecrin.asso.fr).

3 | Sources et absorption des xénobiotiques

3.1 Eau

L'eau est une source potentielle d'exposition aux PE. Ces molécules, même lipophiles, peuvent se retrouver dans l'eau par adsorption sur des particules. On trouve, à côté de perturbateurs d'origine industrielle, des produits pharmaceutiques tels qu'antibiotiques, anti-inflammatoires, β -bloquants et hormones (Bendz *et al.*, 2005). Ces dernières comprennent des hormones de synthèse à but thérapeutique ou vétérinaire dont le devenir est mal connu. Les concentrations trouvées vont du ng/L au μ g/L, ce qui peut être significatif dans le cas de produits à forte activité. Une revue récente du Centre international de recherche sur l'eau et l'environnement (Suez Environnement) décrit l'état de la question (Bruchet et Janex-Habibi, 2004). Selon leur usage, ces composés rejoignent une station d'épuration où ils sont partiellement dégradés, ou sont introduits dans l'environnement par ruissellement. On peut les retrouver dans des eaux de surface susceptibles d'être utilisées comme ressources pour l'eau potable. Des observations réalisées sur la faune sauvage ont révélé des anomalies des coquilles d'œuf et des troubles de la reproduction des poissons d'estuaires ou des phoques se nourrissant de poissons contaminés (Sumpter, 1998).

La directive cadre sur l'eau intègre une liste de composés perturbateurs à éradiquer des rejets à l'horizon 2015 (Union européenne, 2000). Cette liste

comprend des œstrogènes, des pesticides, des solvants organiques, des HAP, des biphényles halogénés, des détergents et leurs métabolites, des phthalates, le bisphénol A et certains médicaments et cosmétiques. La dégradation des xénobiotiques par les stations d'épuration conventionnelles est partielle, mais peut être complétée par un traitement de nitrification/dénitrification ou ozonisation. L'oxydation à l'ozone couplée à un traitement d'affinage (adsorption sur charbon ou membranes) est capable d'éliminer la plupart des PE, tels que pesticides ou plastifiants. En revanche, les organohalogénés (PCB, dioxines) et les phthalates requièrent un traitement d'oxydation radicalaire. L'innocuité de cette technique n'est pas certaine en termes des sous-produits générés. Le couplage ultraviolets/eau oxygénée est efficace sur les stéroïdes.

3.2 Alimentation et sources diffuses

L'existence de certains congénères naturels des dioxines (identifiés dans des carrières de kaolin) est l'objet d'un débat, mais la présence des dioxines dans l'environnement est essentiellement liée à leur nature de sous-produits de l'industrie du chlore et à leur production par les incinérateurs industriels. Les dioxines présentes dans les sédiments de la Baltique à partir de 1960 proviennent notamment des rejets des usines de traitement de pâte à papier. L'analyse d'herbiers européens anciens montre clairement deux pics en matière de dioxines : le premier coïncide avec l'apparition des produits chlorés, le second avec l'implantation des incinérateurs. La baisse actuelle d'utilisation de dérivés chlorés suite à leur interdiction, couplée à la fermeture et/ou la mise aux normes des incinérateurs se traduit par une baisse de la contamination environnementale.

Les HAP tels que le benzo(a)pyrène (BaP) sont présents dans la fumée de cigarette, les gaz d'échappement, les émanations des fours industriels, la viande cuite au barbecue et même le lait maternel. Ces composés sont potentiellement plus importants que la dioxine en termes d'exposition des populations, bien que leur affinité pour le récepteur AhR soit 5-10 fois inférieure à celle de la TCDD (voir § 4.5.). La métabolisation de certains hydrocarbures après leur absorption conduit à des composés beaucoup plus toxiques que la molécule originelle, capables de former des adduits covalents avec les bases de l'ADN, conduisant à des mutations par erreur de lecture du nucléotide substitué par l'ADN polymérase. C'est le cas du BaP du tabac et de la 3-nitrobenzantrone des gaz d'échappement de moteurs diesel (Arlt *et al.*, 2004). Ce dernier composé illustre l'évolution rapide des idées dans le domaine, la pollution par les moteurs à combustion étant encore récemment abordée du seul point de vue des émissions particulaires.

La voie alimentaire est la voie prépondérante de contamination. La nature souvent hydrophobe des xénobiotiques fait que les graisses animales en sont la

source principale. Le lait autrefois équivalent à la viande en termes de contamination par les dioxines a fait l'objet de mesures sanitaires strictes en Europe et le maintien en deçà de la limite de 1 à 5 pg/g est maintenant acquis. (Inserm, 2000).

L'influence des barrières physiologiques telles que placentaire et hématoméningée a fait l'objet de quelques études. Le cerveau capte moins de dioxines que les autres organes en dépit de sa concentration en lipides, suggérant que la barrière hématoméningée s'oppose à leur passage (Bachour *et al.*, 1998). Les dioxines et les PCB traversent le placenta (Nau et Bass, 1981). Les xénobiotiques cumulatifs (dioxines, furanes et biphényles halogénés) sont stockés dans la graisse corporelle. Cette charge peut se mobiliser à l'occasion d'une perte de poids soudaine ou de l'allaitement (Lackmann *et al.*, 2004 ; Pohl et Hibbs, 1996). La mobilisation vers le lait maternel inflige une charge corporelle conséquente à l'enfant allaité qui met environ sept ans pour l'éliminer (Kreuzer *et al.*, 1997).

4 | Les familles chimiques de perturbateurs endocriniens

4.1 Pesticides xéno-œstrogènes

On trouve dans cette catégorie des fongicides (alachlore, amitrole, atrazine, bénomyl, acide 2,4,5-trichlorophénoxyacétique (agent orange), tributylétain, vinclozoline) et des insecticides (DDT (1,1-bis (p-chlorophényl)-2, 2,2-trichloroéthane), méthoxychlore, chlordécone, dieldrine, endosulfan, chlordane, toxaphène). Ils sont actifs par eux-mêmes ou par leurs métabolites (Sonnenschein et Soto, 1998).

Ces composés trouvés à des concentrations très faibles dans l'environnement peuvent être œstrogènes vrais ou anti-androgènes. Ils sont capables d'activer les deux types de récepteur aux œstrogènes, ER α et ER β , l'effet résultant étant dépendant du tissu et du gène (Degen *et al.*, 2002). Le DDT et le méthoxychlore perturbent le transport intracellulaire du calcium. Ils inhibent la prolifération cellulaire, inhibent l'expression de plusieurs gènes spécifiques du trophoblaste et induisent son apoptose (Derfoul *et al.*, 2003). L'endosulfan, l'alachlore et la chlordécone sont des ligands compétitifs du récepteur de la progestérone (Vonier *et al.*, 1996). La plupart de ces molécules présentent aussi des effets variés sur d'autres hormones telles que le cortisol, la thyroxine, l'insuline et l'hormone lutéotrope (Rawlings *et al.*, 1998).

Les fongicides de base dicarboximide (vinclozoline), l'herbicide Linuron (analogue de l'anti-androgène flutamide), le métabolite p'p'DDE du DDT, certains pyréthrénoïdes (fenvalérate, perméthrine) et certains organophosphorés (méthylparathion) sont des antagonistes des androgènes (Curtis, 2001). L'atrazine est anti-androgénique et œstrogénique. Les métabolites de la vinclozoline inhibent la production de testostérone par le testicule foetal conduisant à une démasculinisation (revue dans Gray *et al.*, 2001). Le DDT, le méthoxychlore et le lindane diminuent la taille des gonades et la fertilité chez les rongeurs (revue dans Pocar *et al.*, 2003). Les effets négatifs du lindane sur la spermatogenèse, très documentés pour les animaux, le sont beaucoup moins pour l'espèce humaine (Pages *et al.*, 2002).

Certains pesticides (propiconazole, tributylétain) ne lient pas le récepteur des androgènes mais présentent des effets enzymatiques de type anti-aromatase ou anti-5 α -réductase. Le tributylétain est présent dans les peintures de bateau comme anti-mollusque et anti-algue. Il présente un effet de type « imposex », à savoir la superposition des deux types de tractus génital chez les mollusques et la féminisation de poissons mâles (Doering *et al.*, 2002 ; Sumpter, 1998). Les effets sur l'homme ne sont pas documentés.

4.2 Plastifiants et produits industriels divers

Conçu dans les années 1930 en tant qu'œstrogène de synthèse, le bisphénol A, ou 2,2-bis-(4,4'-hydroxyphényl)-propane est aujourd'hui le monomère de base d'un certain nombre de matières plastiques et ciments dentaires. Il est œstrogénique *in vivo* (Nagel *et al.*, 1999), induit des aneuploïdies et forme des adduits covalents à l'ADN chez les rongeurs (Hunt *et al.*, 2003). Il existe une littérature abondante sur le bisphénol A ainsi que sur des composés similaires (p-nonylphénol, 4-tertiocylphénol) mais son analyse suggère que les effets toxiques et génotoxiques sont plus à prendre en considération que les effets œstrogéniques. Le p-nonylphénol est utilisé dans l'industrie (plastiques, détergents). Son utilisation fréquente et sa stabilité ont pour conséquence une contamination croissante des cours d'eau. Les effets œstrogéniques du p-nonylphénol et du 4-tertiocylphénol sont relatés dans un grand nombre de publications utilisant des modèles animaux ou des cultures *in vitro* (revue dans Sonnenschein et Soto, 1998). Leur faible concentration dans l'environnement et leur faible activité ont servi d'argument pour conclure à une absence de risque humain (Bolt *et al.*, 2001 ; Degen *et al.*, 2002), bien qu'une étude récente sur 37 femmes enceintes rapporte des taux sanguins comparables à ceux induisant des effets toxiques dans les modèles animaux (Schonfelder *et al.*, 2002).

Le styrène est utilisé dans la chimie des plastiques. On considère aujourd'hui qu'il n'a aucun effet perturbateur et que les rapports initiaux de tels effets

chez des populations exposées professionnellement étaient dus à des expositions multiples mal analysées et/ou des méthodologies inappropriées (Brown *et al.*, 2000).

Les phosphates de triaryle sont utilisés comme ignifugeants, lubrifiants, et plastifiants. Ils activent de façon variable les récepteurs PXR et CAR β de lignées cellulaires humaines en culture, modulent l'activité du récepteur des androgènes de rat et perturbent le cycle menstruel de ces rongeurs (Latendresse *et al.*, 1995).

Les phthalates (prototype : le DEHP ou phthalate de di-2-éthylhexyle) sont utilisés dans la production de matières plastiques. Ces composés, considérés comme des anti-androgènes indirects agissant sur la stéroïdogenèse, ont été mis en cause dans la survenue de tumeurs (Klaunig *et al.*, 2003) et d'anomalies du tractus génital chez le rat (Gray Jr. *et al.*, 2000). Un panel d'experts du « National Toxicology Program's Center for the Evaluation of Risks to Human Reproduction » américain a publié une série de monographies sur les effets des phthalates (Kavlock *et al.*, 2002). Malgré l'importance de la production industrielle en millions de tonnes et la présence massive de plastiques dans l'environnement humain, ce rapport considère que le risque de perturbation hormonale par les phthalates est minimal, voire nul. Une expertise récente a réitéré ce jugement (McKee *et al.*, 2004) mais ce dernier travail a été sévèrement critiqué pour sa tendance à renforcer l'image inoffensive des phthalates par une sélection orientée des résultats présentés, les phthalates étant un colossal enjeu industriel (Koch *et al.*, 2004). De récents résultats sur une cohorte humaine remettent à l'ordre du jour le risque présenté par les phthalates au niveau des dystrophies génitales (Swan *et al.*, 2005). Une revue récente soutient la nécessité de reconsidérer le problème en l'élargissant sur le plan moléculaire car ces composés sont aussi des ligands des trois récepteurs activés par les proliférateurs de peroxisomes PPAR α , β , γ . Ils sont susceptibles à ce titre d'influer sur les grandes fonctions métaboliques et le diabète (Corton et Lapinskas, 2005).

4.3 Xénobiotiques végétaux et phyto-œstrogènes

Cette famille comprend des mycotoxines, des toxines d'organismes marins, des antibiotiques et des phyto-œstrogènes tels que coumestanes, zéaralénone et polyphénols. Ceux-ci regroupent les isoflavones (génistéine, daidzéine), flavonoïdes (quercétine) et hydroxystilbènes (resvératrol). Des cyanobactéries marines produisent des diphényléthers bromés analogues des PHB (Moore, 1999).

Les phyto-œstrogènes alimentaires sont présents essentiellement dans les légumineuses (génistéine et daidzéine du soja) (Polkowski et Mazurek, 2000). Ils représentent 1 mg/kg de poids par jour chez l'adulte et 5-8 mg/kg chez les nourrissons suite à la consommation de formules lactées au soja (Setchell *et al.*,

1997). Les phyto-œstrogènes sont agonistes des ER α et β *in vitro* et *in vivo* chez l'animal et chez l'homme (revue dans Benassayag *et al.*, 2002). La génistéine apparaît comme le chef de file des phyto-œstrogènes, de par son affinité significative pour ER α (Kd : 100 nM) et sa proportion élevée (65 %) dans les phyto-œstrogènes de soja. Cette affinité peut être préoccupante lorsqu'on sait que les taux plasmatiques de génistéine chez les enfants nourris au lait de soja sont 13 à 22 000 fois supérieurs à leur taux d'œstradiol circulant (Setchell *et al.*, 1998).

L'intérêt pour les phyto-œstrogènes fut initialement basé sur des propriétés observées dans différents modèles *in vitro* et *in vivo* (anticancéreux, antioxydants, hypolipémiants et protecteurs vis-à-vis de l'ostéoporose). La surmédiatisation de ces effets potentiellement bénéfiques a conduit à une augmentation considérable de leur consommation sous la forme de suppléments diététiques auto-administrés sans contrôle. On assiste aujourd'hui à une remise en question de ces effets. La méthodologie des expérimentations initiales est critiquée (Erdman Jr. *et al.*, 2004). Beaucoup apparaissent comme peu reproductibles lors d'essais cliniques ou ne peuvent être attribués à un mécanisme précis (revue dans Sirtori *et al.*, 2005). Les données humaines sont trop limitées et le risque de déclenchement ou d'aggravation de cancers œstrogénodépendants est insuffisamment exploré (Mishra *et al.*, 2003). Néanmoins, une étude sur près de 2 500 personnes montre une corrélation inverse entre la consommation **normale** de flavonoïdes alimentaires et le risque de cancer du sein en Grèce (Peterson *et al.*, 2003).

La situation est rendue complexe par la multiplicité des mécanismes d'action des phyto-œstrogènes : ils sont agonistes des ER α et β (revue dans Benassayag *et al.*, 2002), antagonistes compétitifs du récepteur AhR (revue dans (Zhang *et al.*, 2003)) et inhibiteurs des tyrosine kinases (Dixon et Ferreira, 2002). À haute dose, les phyto-œstrogènes présentent des effets indésirables (pro-oxydants, mutagènes) (revue dans Skibola et Smith, 2000). La quercétine aggrave les tumeurs du rein induites par l'œstradiol chez le hamster et la génistéine perturbe le cycle cellulaire (de Lemos, 2001). La génistéine présente des effets chimioprotecteurs mais ses métabolites oxydés sont génotoxiques (Lutz *et al.*, 2005). Des études *in vivo* sur les rongeurs mettent en cause les phyto-œstrogènes dans des phénomènes de toxicité épigénétique (§ 5.7.).

4.4 Polyhalogénobiphényles

Les polyhalogénobiphényles (PHB) se divisent en polychlorés et polybromés dont les dérivés bromés du bisphénol A. Tous sont des toxiques environnementaux persistants et bioaccumulables. Les dérivés polybromés ont été créés pour

remplacer les PCB toxiques dans les procédés d'ignifugeage mais leurs propriétés perturbatrices se sont avérées comparables. Les PCB sont des huiles synthétiques employées dans l'industrie à de multiples titres (liquides caloporteurs, ignifugeants, isolants, lubrifiants, peintures, encres et plastiques). On estime à 100 000 tonnes la quantité de PCB dans la biosphère, bien qu'ils soient aujourd'hui interdits de fabrication et d'utilisation, au moins dans les pays occidentaux. Les différentes halogénations donnent lieu à 209 congénères de structure coplanaire ou non coplanaire. Les PCB coplanaires lient le récepteur AhR et seront traités avec les autres ligands AhR (§ 4.5.). Les PCB non coplanaires ne lient pas AhR. Tous interfèrent avec la signalisation et le métabolisme des hormones thyroïdiennes. La chaleur dégagée par les incendies convertit les PCB en polychlorodibenzofuranes (PCDF) par époxydation intramoléculaire. Les PCDF ont des propriétés analogues à celles des dioxines.

Les PCB pénètrent facilement dans l'organisme. On trouve des concentrations de 4,7 à 27 $\mu\text{g/L}$ dans le plasma de populations exposées (Inuits) (Ayotte *et al.*, 1997). Ces composés présentent un impact systémique sur la reproduction des animaux. Ils perturbent l'activité aromatasé hypothalamique responsable de la sexuation du cerveau chez les rongeurs et induisent une diminution du nombre de cellules germinales, une embryotoxicité et une diminution de la taille des portées. On observe une diminution de la fécondité chez les bovins mais les études les plus récentes contredisent les relations initiales d'une toxicité des PCB sur la reproduction humaine (Sugiura-Ogasawara *et al.*, 2003). En revanche, les études faites dans le cadre du 4^e PCRD ont conduit à un consensus sur leur toxicité neurologique (http://europa.eu.int/comm/research/endocrine/projects_completed_en.html).

4.5 Les dioxines et autres ligands du récepteur AhR

En 1976, l'explosion de l'usine de pesticides ICMESA de Seveso (Italie) libéra dans l'atmosphère de grandes quantités de dioxines dont la dioxine prototype, dite « de Seveso » : 2, 3, 7, 8-tétrachlorodibenzo-p-dioxine, TCDD. Ces dioxines furent générées par la pyrolyse de trichlorophénols. Deux cohortes ont été définies pour assurer la surveillance épidémiologique de cette population qui fut sévèrement exposée. Le groupe de Bertazzi mène des campagnes biennales depuis les années 1980 (Bertazzi *et al.*, 1989). Ils ont observé une modification du sex ratio en faveur des filles ainsi que des variations progressives de certains risques de pathologies (cancers, diabète) (Pesatori *et al.*, 2003). La cohorte du « Seveso Women's Health Study » comporte 981 femmes résidentes des zones d'exposition les plus contaminées de Seveso et âgées de moins de quarante ans au moment de l'accident. Cette équipe a détecté un lien entre exposition aux dioxines et risque de cancer du sein mais pas d'association avec le risque d'avortement spontané, de faible poids de naissance ou de prématurité

(Eskenazi *et al.*, 2003). Pour une analyse exhaustive sur la TCDD, on se reportera à l'expertise collective Inserm : « Dioxines dans l'environnement » (Inserm, 2000).

Les HAP, les PCB coplanaires et les polychlorodibenzodioxines et furanes (PCDD dont TCDD et PCDF) sont les ligands principaux du AhR. AhR reconnaît plus de 250 ligands dont 75 dioxines, le carbaryl, un carbamate insecticide et l'anthelminthique thiabendazole, mais le ligand naturel de ce récepteur reste inconnu malgré quelques molécules candidates (revue dans Denison et Nagy, 2003). Les ligands AhR ont une affinité pour AhR qui varie entre 2-8 nM (dioxines) et 10-20 nM (HAP) selon les espèces (Collins et Marletta, 1984 ; Perdew et Hollenback, 1990). Un certain nombre de phyto-œstrogènes sont des antagonistes du AhR tels la génistéine ou le resvératrol (Kd 100 nM). Un modulateur physiologique antagoniste a été identifié, le 7-oxocholestérol (Savouret *et al.*, 2001). La toxicité des dioxines diffère selon les espèces et selon les organes.

AhR est cytoplasmique en l'absence de ligand et n'a aucune analogie avec les récepteurs stéroïdiens. Il se caractérise par un domaine N-terminal complexe bHLH-PAS, responsable de la liaison à l'ADN, de l'hétérodimérisation et de la liaison du ligand et des chaperones. Ce domaine définit une famille de transactivateurs qui comprend, outre AhR, son partenaire d'hétérodimérisation nucléaire ARNT (aryl-hydrocarbon receptor nuclear translocator), le facteur de réponse à l'hypoxie HIF1 α et le coactivateur des récepteurs stéroïdiens SRC-1 (Rowlands et Gustafsson, 1997). La partie C-terminale du récepteur AhR contient des régions transactivatrices et une fonction de répression de la transcription (Whitelaw *et al.*, 1994). AhR présente une rare aptitude aux interactions avec d'autres protéines telles que chaperones (HSP90), le répresseur spécifique AhRR, le récepteur des œstrogènes, le corépresseur SMRT, des facteurs et cofacteurs de transcription et des tyrosine kinases (revue dans Carlson et Perdew, 2002). Toutes ces interactions sont susceptibles de générer des effets de perturbation hormonale puisqu'elles concernent des voies de signalisation hormonale.

Après interaction avec son ligand, AhR se libère des chaperones et le complexe migre du cytoplasme vers le noyau. Il s'associe avec ARNT pour réguler l'expression de certains gènes en se liant à l'ADN au niveau de séquences définies, les « dioxin (ou xenobiotic) responsive elements » (DRE, XRE). Ces éléments sont présents dans la séquence des gènes cibles comme les cytochromes P-450 1A et 1B (CYP1A, 1B, mono-oxygénases de phase I) ou les enzymes de la phase II de la détoxification (gluthathione S-transférases, UDP glucuronyl transférase. . .). Les DRE existent aussi sous forme de sites inhibiteurs (iDRE) qui imposent une répression dioxine-dépendante au gène qui les contient (Safe *et al.*, 1998). Les iDRE sont des DRE dont les adénines extrêmes sont remplacées par des cytidines (tableau 5.1). On trouve ces iDRE dans des gènes de la

sphère hormonale (c-fos (Duan *et al.*, 1999) ; pS2 (Gillesby *et al.*, 1997)). Un XRE variant a été identifié dans le gène de la Paraoxonase 1 qui métabolise les pesticides organophosphorés. Ce site ne permet pas la transactivation par la TCDD mais induit une réponse agoniste par les HAP et les polyphénols (tableau 5.1) (Gouedard *et al.*, 2004). Lai *et al.*, ont publié une première série de gènes contenant des DRE et pouvant donc être régulés par les ligands AhR (Lai *et al.*, 1996). Une série plus exhaustive a été définie récemment *in silico*. Les gènes liés à l'inflammation y sont fortement représentés (Inserm 2000).

4.6 Métaux et éléments mixtes

L'arsenic, le cadmium, le plomb, le mercure, l'antimoine, le lithium, le baryum et le chrome présentent des effets œstrogéniques *in vitro* (Choe *et al.*, 2003). Plusieurs études portant sur des employés d'usines utilisant le plomb rapportent des anomalies des taux d'hormone circulantes (prolactine, testostérone, LH, follitropine ou FSH, thyroïdostimuline ou TSH) (revue dans Baccarelli *et al.*, 2000).

Le cadmium est présent dans les déchets industriels et la fumée de tabac. Il présente des effets contradictoires sur la synthèse de la progestérone en fonction des doses et du tissu étudié (Henson et Chedrese, 2004). Une exposition aiguë (3 à 5 mg/kg) provoque une forte baisse des taux circulants de progestérone et d'œstradiol (Piasek *et al.*, 1996). Le cadmium se lie au récepteur des œstrogènes et l'active *in vivo* et *in vitro*. Il augmente le développement de l'utérus et de la glande mammaire chez l'animal ovariectomisé, avec induction du récepteur de la progestérone (Johnson *et al.*, 2003). Le cadmium induit aussi l'expression de pS2 dans des lignées de cancer du sein (Garcia-Morales *et al.*, 1994). Cependant, le cadmium apparaît comme un facteur de risque de l'ostéoporose par sa compétition avec le calcium (revue dans Hu, 2000). L'arsenic est utilisé comme insecticide. Il inhibe réversiblement l'expression de ER α et son activité transcriptionnelle sur des gènes-cibles tels que pS2 (Garcia-Morales *et al.*, 1994). L'arsenic interagit avec le récepteur des glucocorticoïdes à doses subtoxiques (0,3-3,3 μ M) et diminue son activité transactivatrice (Kaltreider *et al.*, 2001).

5 | Cibles et mécanismes d'action

5.1 Synthèse et transport des hormones

Divers pesticides (aldicarbe, méthomyl, métribuzine) augmentent la thyroxine (T4) circulante et induisent une hyperthyroïdie chez le rat (Porter *et al.*, 1993).

DRE	T	N	G	C	G	T	G	A/G	G/C	A
iDRE	C	N	G	C	G	T	G	A/G	G/C	C
Pon1-XRE	C	G	G	C	G	G	G	G	C	C
Bax-XRE	G	G	G	C	G	T	G	G	T	G
DRE iDRE Pon1-XRE Bax-XRE										
TCDD : (2,3,7,8-tétrachlorodibenzo(p)dioxine)	+	-	-	-						
PCDD (polychlorodibenzodioxines)	+	-	-	-						
PCDF (polychlorodibenzofuranes)	+	-	-	-						
Benzo(a)pyrène	+	-	+							+
dibenz(a, h)anthracène	+									
diméthyl 7, 12 benzanthracene	+									
3-méthyl-cholanthène	+	-	+							+
indolo(3, 2-b)carbazole	+									
3,2-diindolylméthane	+									
PCB (polychlorobiphényles)										
mono-ortho	-									
di-ortho	-									
co-planaire	+									
Quercétine	+		+							
7, 8-alpha-naphtoflavone	-/+									
7, 8-bêta-naphtoflavone	+									
Resveratrol	-	-	+							

Tableau 5.1

Sites AND et ligands du récepteur AhR.

Les nucléotides en rouge divergent du DRE (dioxine responsive element) canonique. Le site Pon-1 (Gouedard et al., 2004) et le site Bax (Matikainen et al., 2001) sont qualifiés de XRE (xenobiotic responsive element) car leur spécificité exclut la dioxine. Les signes + signifient transactivation, les signes -, transrépression, l'absence de signe indique l'absence de données. L' α -naphthoflavone est antagoniste jusqu'à 10^{-6} M et agoniste au-delà de 10^{-5} M.

Une étude de l'EPA montre que sur 240 pesticides testés, 24 (alachlor, amitrole, fipronil, mancozeb, pyréthrinés, toxaphène, etc.) induisent l'apparition de cancers folliculaires de la thyroïde chez les rongeurs (Hurley, 1998). Seul l'aceto-chlor apparaît authentiquement mutagène. Les autres composés interfèrent avec la synthèse et/ou le catabolisme des hormones thyroïdiennes (T4 ; triiodothyronine, T3) et perturbent l'homéostasie de la glande (hypertrophie cellulaire, hyperplasie). La seule étude disponible chez les humains porte sur le mancozeb et ne retrouve pas les résultats obtenus chez les rongeurs (Nordby *et al.*, 2005).

Certains fongicides (propiconazole, triadimefon, myclobutanil) augmentent le taux de cancers de la thyroïde chez la souris par un mécanisme inconnu.

Les métabolites hydroxylés des PCB sont inhibiteurs de la T2 sulfotransférase. La sulfatation des hormones thyroïdiennes régule le niveau d'hormone libre chez le fœtus, ce qui pourrait expliquer l'impact des PHB sur le développement thyroïdien du fœtus (Schoor *et al.*, 1998). Les PCB influencent le transport des hormones thyroïdiennes en liant la protéine de transport des rongeurs (transthyrétrine) mais pas le transporteur humain (Lans *et al.*, 1994). Ils inhibent l'œstradiol-sulfotransférase et induisent une disponibilité accrue de l'œstradiol dans les tissus, conduisant à des effets œstrogéniques. Les PHB perturbent la synthèse des hormones hypophysaires ce qui retient sur la reproduction des rongeurs et des animaux d'élevage (revue Gray *et al.*, 2001 et le rapport du 4^e PCRD, http://europa.eu.int/comm/research/endocrine/projects_completed_en.html). Ils perturbent la stéroïdogénèse au niveau des androgènes (Cooke *et al.*, 1998) et du cortisol (DiBartolomeis *et al.*, 1987). Ils inhibent la transcription du cytochrome P450_{scc}, ce qui diminue la stéroïdogénèse chez le rat (Moore *et al.*, 1991).

Un certain nombre de pesticides (propiconazole, kétoconazole, tributylétain) et d'organochlorés perturbent la fonction androgénique par des effets enzymatiques de type anti-aromatase ou anti-5 α -réductase.

Des travaux *in vitro* sur les cellules de la granulosa humaine en culture ont rapporté des effets de la TCDD sur la stéroïdogénèse (Pieklo *et al.*, 2000), les voies de régulations des protéine-kinases (Enan *et al.*, 1998), la prolifération cellulaire et le transport du glucose (Enan *et al.*, 1992). Tous ces paramètres sont inhibés par la TCDD qui se présente comme un inhibiteur pléiotropique de la prolifération de ces cellules. Un effet proapoptotique a été également rapporté (Heimler *et al.*, 1998). L'acide perfluorodécanoïque, un surfactant présent dans les lubrifiants, perturbe la stéroïdogénèse au niveau du cytochrome P450_{scc} en inhibant le récepteur mitochondrial des benzodiazépines indispensable au transport du cholestérol (Papadopoulos *et al.*, 1997).

La situation dans les populations humaines est beaucoup moins claire. La littérature rapporte des effets négatifs des dioxines et des PCB sur l'ensemble de l'axe hypothalamogonadique, la stéroïdogénèse leydigienne et la morphologie cellulaire (Schultz *et al.*, 2003). Ces études décrivent des effets sur l'induction du CYP 1A1, la spermatogénèse et/ou les taux d'hormones circulantes sans proposer de mécanisme.

5.2 Liaison directe aux récepteurs nucléaires

Les xéno-œstrogènes lient et activent les récepteurs aux œstrogènes ($ER\alpha$, β) en se fixant sur le site de liaison de l'hormone naturelle, ce qui conduit aussi à des effets de compétition. Les fongicides de base dicarboximide, le pp'DDE, des pyréthrénoïdes et des organophosphorés sont des antagonistes du récepteur des androgènes et le Linuron est un analogue structural de l'anti-androgène flutamide (Curtis, 2001). Les PCB présentent une forte analogie structurale avec les hormones thyroïdiennes. Ils lient les récepteurs thyroïdiens (McKinney *et al.*, 1987) et inhibent leur interaction avec le coactivateur SRC1 (Iwasaki *et al.*, 2002). Les hydroxy-PCB les plus aptes à imiter les hormones thyroïdiennes ont des K_d voisins de 20-50 μM pour le récepteur $T3\alpha$, contre 10 nM pour l'hormone naturelle. Les dérivés méthane-sulfonyles des PCB, produits par la voie mercapturique, sont aussi des antagonistes compétitifs du récepteur des glucocorticoïdes (Johansson *et al.*, 1998) mais les implications en pathologie humaine ne sont pas connues. L'endosulfan, l'alachlore et la chlordécone lient le récepteur de la progestérone, activité mise en cause dans leurs effets (Vonier *et al.*, 1996). Les phthalates lient les récepteurs PPAR (Corton et Lapinskas, 2005 ; Maloney et Waxman, 1999), d'autres sont des antagonistes du récepteur des androgènes de rat (Barlow *et al.*, 2003). Les phosphates de triaryle lient PXR et $CAR\beta$ (Honkakoski *et al.*, 2004).

5.3 Interférences entre AhR et récepteurs nucléaires

Les ligands AhR sont anti-œstrogènes (revue dans Safe et Wormke, 2003). On distingue des effets transcriptionnels directs dus à des sites iDRE présents dans des gènes œstrogéno-dépendants et des effets d'interférence entre AhR et le récepteur $ER\alpha$ (Safe *et al.*, 1998) ou le facteur Sp1 (Wang *et al.*, 1998). Une interaction directe entre AhR et ER a été rapportée, qui conduit à la destruction des deux protéines dans le protéasome (Wormke *et al.*, 2003).

Par ces interférences multiples, la TCDD inhibe la transcription des gènes cibles de l'œstradiol tels que $ER\beta$ (Kietz *et al.*, 2004), le récepteur de la prolactine (Lu *et al.*, 1996), le récepteur de la progestérone (Harper *et al.*, 1994), la

cathepsine D (Krishnan *et al.*, 1995) et l'activateur tissulaire du plasminogène (Gierthy *et al.*, 1987).

Des expériences sur des primates ont suggéré que les perturbateurs endocriniens jouent un rôle dans l'endométriose, une maladie gynécologique d'étiologie inconnue dont la fréquence est en augmentation (Rier *et al.*, 1993). Un mécanisme a été proposé impliquant la levée par la TCDD des effets inhibiteurs de la progestérone sur l'expression des métalloprotéases matricielles (Bruner-Tran *et al.*, 1999). Dans l'espèce humaine, une seule étude épidémiologique suggère un impact de la pollution par les ligands AhR sur la fréquence de l'endométriose (Koninckx *et al.*, 1994).

La dioxine exerce des effets pléiotropiques sur la vitamine A, tant au niveau de son métabolisme qu'au niveau de l'expression de gènes rétinoïdes-dépendants (revue dans Nilsson et Hakansson, 2002). Les souris invalidées pour AhR présentent une altération du métabolisme hépatique de la vitamine A (Andreola *et al.*, 1997). Il a été récemment montré que le AhR activé par la TCDD séquestre le corépresseur SMRT ce qui permet l'activation de RAR α en l'absence de ligand (Widerak *et al.*, 2005). À l'inverse, certains rétinoïdes modulent des gènes sensibles à la TCDD (Gambone *et al.*, 2002).

5.4 Variations inter-espèces – Données génétiques et populations à risque

L'adéquation des modèles animaux à l'homme s'avère souvent discutable. L'existence d'importantes variations inter-espèces sur le plan de la réactivité des récepteurs hormonaux aux perturbateurs endocriniens doit être prise en compte dans l'interprétation des résultats (Honkakoski *et al.*, 2004 ; Thomas, 2000). Les PCB lient la protéine de transport des hormones thyroïdiennes des rongeurs mais pas la « Thyroid Binding Globulin » humaine (Lans *et al.*, 1994). Les rats et les souris sont sensibles aux dioxines sur le plan de la cancérogenèse hépatique tandis que ces tumeurs n'apparaissent pas chez le hamster, les bovins et les humains. Cette différence est corrélée avec l'expression de la 7-hydroxycholestérol déshydrogénase qui transforme le 7-hydroxycholestérol en 7-oxocholestérol lequel est antagoniste du AhR (Savouret *et al.*, 2001).

De nombreux auteurs ont évoqué une influence génétique sur les effets des xénobiotiques, notamment par le polymorphisme des enzymes de la détoxification, qu'il s'agisse des cytochromes P-450 de phase I ou des enzymes de conjugaison de phase II (glutathion-S-transférases ; N-acétyl transférase ; UDP-glucuronyltransférases ou sulfotransférases (pour revue : Daly, 2003). L'absence de la glutathion-S-transférase M1 ainsi que le génotype acétyleur lent de la NAT2 sont associés à une sensibilité accrue aux effets du tabac (Norppa, 2004).

Les personnes qui manipulent professionnellement ces substances à effet perturbateur sont particulièrement exposées. Toutefois, une revue récente reprenant les données épidémiologiques disponibles sur les travailleurs de l'industrie les juge insuffisantes en termes de taille des populations étudiées et de variété de paramètres (Pilliere, 2002).

À côté des populations à risque, il existe des périodes à risque : la vieillesse, la grossesse et la période fœtale. Les données humaines sont très rares. Certains auteurs s'attachent à définir des modèles toxicocinétiques spécifiques des âges « fragiles » de la vie (Clewel *et al.*, 2002). Il faut signaler le faible nombre d'études portant sur la population historiquement la plus exposée, à savoir la population de la péninsule indochinoise à l'époque de la deuxième guerre du Vietnam. Rappelons que le défoliant « agent orange » (ou 2, 4, 5, T), utilisé pour révéler le tracé des routes militaires dans la jungle, était contaminé par la TCDD. Une seule étude portant sur trente femmes rapporte que les deux tiers ont eu des enfants handicapés ou ont subi des fausses couches (Le et Johansson, 2001).

5.5 Morphologie cellulaire

Les xénobiotiques perturbent aussi la morphologie cellulaire, notamment au niveau des jonctions communicantes. Ce sont des structures organisées de la membrane cellulaire constituées de protéines dites « connexines ». Elles permettent le passage de petites molécules d'une cellule à l'autre et maintiennent l'assemblage des cellules entre elles. L'idée émerge actuellement selon laquelle une dislocation de ces jonctions pourrait être associée au processus de cancérogenèse (Yamasaki *et al.* 1999). Les xéno-œstrogènes, suspectés de jouer un rôle dans la survenue des cancers testiculaires, sont effectivement délétères sur la structure et les protéines des jonctions communicantes des cellules de Leydig (Fiorini *et al.*, 2004 ; Mograbi *et al.*, 2003). Les ligands AhR altèrent la structure des jonctions communicantes *in vivo* et *in vitro* dans divers types cellulaires d'une façon comparable aux xéno-œstrogènes et pourraient ainsi induire ou favoriser des cancers. C'est le cas des dioxines (Legare *et al.*, 2000) et des PCB (Bager *et al.*, 1997).

Les ligands AhR sont de puissants inducteurs de la chloracné. Cette éruption acnéiforme s'observe à la suite d'une altération des processus de différenciation des cellules basales des glandes sébacées et des kératinocytes (Berkers *et al.*, 1995). Dans tous les accidents industriels où ces composés ont été impliqués, la chloracné fut considérée comme le symptôme spécifique majeur de l'intoxication et fut observée chez la majorité des personnes exposées (Suskind, 1985). Récemment la chloracné fut la manifestation spectaculaire de l'empoisonnement criminel par la dioxine d'un candidat à la présidence de l'Ukraine.

5.6 Maturation des cellules germinales

Les données disponibles pour les PCB sont essentiellement animales et descriptives et l'extrapolation à l'espèce humaine est difficile. Ils pourraient agir par altération des mécanismes de polyadénylation de certains ARN messagers maternels (connexines) stockés dans le cytoplasme (Brevini-Gandolfi *et al.*, 1999) et/ou par perturbation de la redistribution des granules corticaux (Pocar *et al.*, 2003).

Des expériences *in vivo* ont démontré un effet toxique direct du benzo(a)pyrène et d'autres ligands AhR sur les oocytes (Miller *et al.*, 1992). Plus récemment, le groupe de Tilly a montré que l'activation de AhR par les HAP dans les oocytes de souris conduit à la transactivation du gène Bax et provoque l'apoptose des oocytes. Ce mécanisme pourrait être à l'origine de la ménopause précoce des femmes tabagiques. La TCDD ne reproduit pas ces effets car elle est incapable d'induire la transactivation du gène Bax par les DRE atypiques différant de l'élément canonique (Matikainen *et al.*, 2001). Ces résultats sont à rapprocher des observations faites sur des oocytes issus de femmes tabagiques (oocytes surnuméraires après fertilisation *in vitro*) qui montrent davantage de Caryotypes anormaux (Zenzes *et al.*, 1997).

Un grand nombre d'études animales abordent les effets de la TCDD sur la fertilité mais on manque de données humaines (Pocar *et al.*, 2003). Le groupe de Bertazzi a observé une modification du sex ratio en faveur des filles dans sa cohorte de Seveso (Pesatori *et al.*, 2003). Les ligands AhR perturbent la spermatogénèse animale (Simanainen *et al.*, 2004 et revue dans Wissing, 1998). La TCDD diminue la sensibilité de la LH aux mécanismes de rétrocontrôle (Mably *et al.*, 1992) et inhibe l'ovulation induite chez le rat par le sérum de jument gravide : les ovules restent bloqués dans les follicules qui ne s'ouvrent pas et un grand nombre de follicules sont manquants (Son *et al.*, 1999).

5.7 Effets *in utero* et épigénèse

Les perturbateurs endocriniens, en particulier les PCB et xéno-œstrogènes, sont logiquement susceptibles d'agir sur le développement animal et humain au cours de l'embryogenèse et de la vie fœtale. Paradoxalement, les dernières revues sur le sujet restent indécises sur l'importance de ces effets (Brevini *et al.*, 2005 ; Vidaeff et Sever, 2005). Les PHB ne semblent pas en cause dans les avortements à répétition (Sugiura-Ogasawara *et al.*, 2003).

Un nouveau corpus d'études explore l'impact des PE (essentiellement DES, xéno-œstrogènes et phyto-œstrogènes) au niveau de la toxicité épigénétique.

Ce mécanisme est basé sur une perturbation de la méthylation des histones de la chromatine qui perdure sur plusieurs générations et provoque des effets pathologiques dans la descendance non exposée d'individus ayant été exposés, même en dehors d'une grossesse (revue dans Anway *et al.*, 2005). Un tel mécanisme impliquant la chaperone HSP90 du récepteur ER est proposé pour le DES (Ruden *et al.*, 2005).

6 | La controverse sur la perturbation endocrine

À la suite du travail initial de Carlsen *et al.* (Carlsen *et al.*, 1992) sur l'altération de la spermatogenèse, un grand nombre d'auteurs ont rapporté des discordances dans les analyses et leurs résultats (revue dans Saidi *et al.*, 1999). S. Safe (Safe, 1995) incrimine la méthodologie des études épidémiologiques et rapporte que si les statistiques démographiques montrent des variations de la fréquence d'hypospadias et de cryptorchidie avant 1985, le taux de ces affections n'a pas changé depuis lors et la cryptorchidie a même diminué. Dans cette même période, la fréquence du cancer du testicule a augmenté dans la plupart des pays sans qu'un lien avec la pollution industrielle soit démontré. Si l'on considère deux pays scandinaves voisins, la fréquence basse observée en Finlande et la fréquence haute observée au Danemark ne sont pas explicitées. Les analyses de la contamination par les pesticides organohalogénés ne montrent pas de différence entre malades atteints de cancer du sein et cas contrôles. En raison de leur activité généralement inférieure d'un facteur 1 000 ou plus à celle de l'œstradiol, les xéno-œstrogènes industriels représentent 0,000 002 5 % de la consommation quotidienne de phyto-œstrogènes alimentaires. Plus récemment, Safe (Safe *et al.*, 2002) a conclu que : « *... les données actuelles ne soutiennent pas l'hypothèse d'un rôle significatif des xéno-œstrogènes industriels ou agricoles... la diminution de la fertilité masculine est un fait acquis mais mineur et de peu de poids vis-à-vis des progrès généraux en santé publique... les produits pharmaceutiques contenant des œstrogènes et des progestagènes n'ont pas d'impact significatif sur la fertilité de la descendance...* ».

Safe, Foster et Witorsch (Foster, 2003 ; Witorsch, 2002) ne nient pas l'existence de la perturbation hormonale mais ils considèrent qu'elle a été exagérée par des méthodologies imparfaites. Ils mettent en doute l'implication des xéno-œstrogènes industriels.

La directive européenne relative aux eaux destinées à la consommation humaine (article 15, 3-11-1998) considère qu'« il n'existe pas de preuves suffisantes permettant d'établir... des valeurs paramétriques en ce qui concerne les produits chimiques responsables de dérèglements endocriniens, mais que l'inquiétude croît quand aux effets potentiels... sur la santé humaine ». Si les

études COMPREHEND et LOES ont montré qu'une partie conséquente des effluents en Europe ont de réels effets œstrogéniques sur les poissons, le rapport LOES indique que rien ne permet d'affirmer que les polluants à effet PE sont prépondérants parmi d'autres facteurs environnementaux possibles. Le 6^e PCRD s'efforce de faire la lumière sur ces incertitudes.

La corrélation entre dioxines et cancer du sein dans la population de Seveso est particulièrement intrigante. Le groupe d'Eskenazi a récemment trouvé dans cette population une augmentation du risque de cancer du sein corrélée avec la concentration sérique de TCDD (Warner *et al.*, 2002). Ces résultats contrastent avec ceux de Bertazzi qui n'a jamais détecté cette tendance depuis le début des analyses (Bertazzi *et al.*, 1989). Une revue récente décrit quelques cohortes montrant un lien entre dioxines et cancer du sein mais les résultats sont jugés peu significatifs (Kogevinas, 2001).

7 | La détection des perturbateurs endocriniens

7.1 Les méthodes de détection

La traduction, en terme de risque sanitaire, des études et des tests biomoléculaires *in vitro* et *in vivo* reste problématique. Le passage des données mécanistiques à l'effet physiopathologique est aussi d'une grande difficulté. Il y a aujourd'hui un accord général sur le fait que les données *in vitro* n'ont pas d'autre valeur que de criblage et qu'elles ne peuvent servir à l'estimation du risque. Les connaissances apportées par les études toxicologiques « classiques » chez l'animal restent le corpus essentiel sur lequel se fondent les évaluations de risques de la perturbation hormonale pour l'homme.

Il faut aussi améliorer les méthodes de mesure et d'en développer de nouvelles, simples à mettre en œuvre, transportables sur le terrain et économiques. La mesure des dioxines par chromatographie gazeuse couplée à la spectrographie de masse revenant à environ 1 000 euros par dosage, des campagnes de grande envergure sont peu envisageables et le développement de tests biologiques économiques est une nécessité.

On trouve, à côté des tests *in vivo* classiques des fonctions hormonales, des tests de détection des xéno-œstrogènes basés sur des hépatocytes de poisson (Bennetau-Pelissero *et al.*, 2004), sur des levures (test YES) (Fidler *et al.*, 2000) ainsi que des tests de détection des ligands AhR basés sur des lignées stables de cellules de souris exprimant un gène rapporteur sous contrôle d'un site DRE (Musk *et al.*, 1996). L'EPA a lancé en 2002 une triple campagne de tests :

1) *in vitro* par liaison des composés aux récepteurs ER et AR et modulation de gènes rapporteurs, 2) *ex vivo* par stéroïdogénèse sur explants de tissus et 3) *in vivo* par des tests utéro-trophiques (injections sous-cutanées de rats ovariectomisés ou prépubères), test de modulation de la puberté chez le rat, test de pseudo-déclenchement de l'activité gonadique chez le poisson et test de métamorphose des amphibiens (pour les effets thyroïdiens). Cet ensemble sera complété par des tests transgénérationnels (Gray Jr. *et al.*, 2002).

Les récepteurs orphelins (PXR, SXR, CAR β , BXR) pourraient présenter un intérêt dans la détection des xénobiotiques. Lee *et al.* (Lee *et al.*, 2003) ont utilisé le système SXR sous la forme d'un gène rapporteur LacZ couplé au promoteur du gène du cytochrome CYP3A4 sensible à SXR pour observer une modulation par la rifampicine et le bisphénol A.

L'approche par les animaux-vigie semble prometteuse. Elle consiste à réaliser des amphibiens transgéniques exprimant un gène rapporteur codant pour une protéine fluorescente de méduse sous le contrôle d'un promoteur minimal et d'éléments de réponse à différentes hormones permettant de varier la cible du test (de Luze *et al.*, 1993). En remplaçant le promoteur minimal par un promoteur tissu-spécifique il est possible d'obtenir des informations sur la tissu-spécificité des effets. Ces animaux placés dans une eau à tester permettraient d'estimer directement la quantité de PE présents. Ceci est à rapprocher du « bio-monitoring » qui propose l'utilisation de végétaux pour détecter les contaminations environnementales.

7.2 L'interprétation des données

Les critères d'interprétation classiques sont le NOAEL (*no observed adverse effect level*) : dose pour laquelle on n'observe pas d'effet toxique et le NHEL (*no hormonal effect level*) : dose pour laquelle on n'observe pas d'effet hormonal (Bolt *et al.*, 2001). Au niveau européen, les programmes d'analyse de la perturbation endocrine par les pesticides et les plastifiants ont conduit à l'élaboration d'un concept nouveau : la marge de sécurité basée sur l'hygiène (HBMOS : *hygiene-based margin of security*), une évolution de la marge de sécurité (MOS). Le HBMOS intègre d'une part l'exposition et d'autre part la puissance de l'action des divers xénobiotiques et se calcule comme le quotient de la prise quotidienne de composé par l'activité relative de ces composés déterminée chez le rongeur. Les plastifiants xéno-œstrogènes sont présents dans l'alimentation à une dose moyenne de 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ par jour. Au vu des données européennes disponibles, la prise quotidienne de p-nonylphénol est estimée à un maximum de 2 $\mu\text{g}/\text{kg}$, celle de bisphénol A de 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ et celle de l'octylphénol apparaît négligeable. Avec un facteur d'activité œstrogénique estimé à 1 pour le bisphénol

A et à 40 000 pour le 17α -éthynyl-œstradiol, le HBMOs du bisphénol A est autour de 1 000 et celui du p-nonylphénol entre 250 et 500.

L'utilité des outils statistiques actuels est reconnue, mais leur valeur est discutable pour les molécules persistantes, auquel cas la comparaison des taux plasmatiques des composés est un meilleur témoin de l'exposition. Il y a aujourd'hui un consensus pour reconnaître que ce sont justement ces molécules à effet cumulatif qui posent les problèmes les plus sérieux. La demi-vie dans la graisse corporelle humaine peut aller jusqu'à 8-12 ans pour la TCDD, 6 ans pour le DDT. Pour les composés œstrogéniques, la demi-vie plasmatique est de 4-8 heures pour l'œstradiol et les phyto-œstrogènes et trois jours pour le DES (revue dans Degen *et al.*, 2002). De plus, si les effets hormonaux procèdent par quanta limités, voire par pics transitoires, les xénobiotiques sont souvent résistants à la métabolisation et/ou la dégradation, ce qui les rend persistants. Cette activité constante pourrait devenir significative en dépit de sa faiblesse, autant par sa grande durée, que par sa capacité à perturber des mécanismes cycliques telles que le cycle cellulaire ou le cycle menstruel.

8 | Quelques voies de recherche

Il faut tenir compte de l'actuel élargissement du concept de perturbation. D'une part, les xénobiotiques alimentaires (phyto-œstrogènes, additifs) rejoignent les polluants industriels dans la liste des molécules à surveiller, d'autre part la perturbation hormonale doit englober toute l'endocrinologie et non plus seulement la reproduction comme en témoignent les deux exemples du tabagisme et du diabète.

8.1 Le tabagisme : un modèle de perturbation hormonale générale

Les revues récentes sur la perturbation hormonale mentionnent systématiquement le tabagisme (Bonde et Storgaard, 2002 ; Sharara *et al.*, 1998). La fumée de cigarette contient en effet des dioxines dont la TCDD et des HAP dont le benzo(a)pyrène (Bilimoria et Ecobichon, 1980 ; Muto et Takizawa, 1989) et la charge due à l'ensemble des ligands AhR peut aller jusqu'à 0,05 mg/kg. Ces composés induisent CYP1A1 dans la plupart des organes (Bartsch *et al.*, 1992 ; Gurtoo *et al.*, 1983 ; Mattison et Thorgeirsson, 1978 ; Stegeman *et al.*, 1995). CYP 1A1 catalyse la mono-oxydation des hydrocarbures procarcinogènes. Leurs produits d'oxydation (comme le benzo(a)pyrène-diol-époxyde) sont

responsables de la formation d'adduits covalents. Cette mono-oxydation est elle-même toxique : une fraction de l'oxygène activé est relarguée sous forme de superoxyde ou d'eau oxygénée, capables de dommage oxydatif sur l'ADN (Park *et al.*, 1996). Ces deux mécanismes peuvent provoquer des cancers lorsque les mutations se situent dans les gènes de suppresseurs de tumeurs comme p53.

Dans les cellules endothéliales, la stimulation de la production de radicaux oxygénés provoque des lésions membranaires et la peroxydation des lipides qui favorisent la formation d'athérome (Toborek *et al.*, 1995). Il a été proposé que les ligands AhR pourraient aussi être athérogènes en perturbant le métabolisme de l'acide arachidonique (Rifkind *et al.*, 1990), puisque l'acide arachidonique et les eicosanoïdes sont des substrats de CYP1A1. Ces données concourent à la mise en cause du tabagisme dans l'occurrence de l'ischémie cardiaque (revue dans Boyle, 1997).

Les ligands AhR augmentent l'expression de divers enzymes et cytokines pro-inflammatoires (interleukine 1β , prostaglandine H2 synthase, cyclooxygénase 2 et TNF- α (revue dans Vrzal *et al.*, 2004). Le tabagisme est un facteur de risque de l'ostéoporose dans les deux sexes et il existe une corrélation entre tabagisme et diminution de la densité osseuse ou risque de fracture (Grisso *et al.*, 1997 ; Johansson et Mellstrom, 1996). La relation entre tabagisme et ostéoporose n'est pas pleinement explicitée : les ligands AhR du tabac pourraient exercer un triple effet négatif sur l'os : 1) anti-œstrogénique direct ; 2) perturbateur direct sur le tissu osseux qui contient du AhR (Abbott *et al.*, 1995) ; 3) perturbateur des fonctions ovariennes dont la stéroïdogenèse. Les femmes qui fument font une ménopause plus précoce (Mattison et Thorgeirsson, 1978).

8.2 Ligands AhR et diabète

Certains aspects du diabète, comme la néphropathie diabétique, sont favorisés par le tabagisme (revue dans Eliasson, 2003). Les PCB augmentent le stress oxydatif et la peroxydation des lipides dans les cellules endothéliales en culture, phénomène qui pourrait être le mécanisme des lésions cellulaires et du rôle athérogène de ces molécules. Ces composés agissent sur la vasculature et provoquent des perturbations métaboliques conduisant à l'insulinorésistance. La TCDD inhibe la différenciation adipocytaire (Alexander *et al.*, 1998) et le transport du glucose dans le tissu adipeux (Enan et Matsumura, 1994).

Sur le plan épidémiologique, Bertazzi *et al.*, rapportent dès 1998 un « excès » de cas de diabète dans la population féminine de Seveso. Ce lien entre dioxine et diabète a été confirmé par leurs études ultérieures et par des études sur des anciens combattants du Viêtnam et des travailleurs exposés (Bertazzi *et al.*, 1998 ; Bertazzi *et al.*, 2001 ; Henriksen *et al.*, 1997 ; Vena *et al.*, 1998).

Une corrélation a été rapportée entre le diabète et un polymorphisme du CYP1A1 (Wang *et al.*, 2002). Les résultats des prochaines enquêtes épidémiologiques détermineront si ces données correspondent à un pic passager ou à une tendance à long terme, comme pour l'association diabète/tabagisme (Muhlhauser, 1994).

8.3 Les possibilités thérapeutiques

Le développement de moyens thérapeutiques de protection contre les PE devrait trouver sa place à côté des techniques de détection et de prévention. Les recherches sur les anti-oxydants se sont avérées décevantes. L' α -tocophérol (vitamine E) lie et active PXR, qui est responsable de l'induction de certains cytochromes par la rifampicine et d'autres antibiotiques. Cela pourrait stimuler la détoxification des xénobiotiques empruntant la même voie (Traber, 2004).

Le resvératrol a été récemment démontré comme un antagoniste compétitif du AhR (Casper *et al.*, 1999). Il inhibe les effets de la TCDD sur l'induction des gènes cibles (CYP 1A1, promoteur du virus HIV-1, interleukine 1 β). Le resvératrol exerce un effet protecteur *in vivo* contre l'activation du AhR par le benzo(a)pyrène sur l'os et les cellules germinales (Revel *et al.*, 2003 ; Singh *et al.*, 2000). L'impact des molécules polycycliques et/ou halogénées (pollution et tabac) dans la perturbation hormonale ayant lieu par le biais majoritaire du AhR, le resvératrol pourrait permettre de prévenir ces effets.

Recommandations

Au niveau institutionnel, les premières constatations d'instances comme le CEFIC montrent la place négligeable de la France dans les structures internationales, en particulier européennes, décrites au paragraphe 2 « Initiatives internationales » (5 projets sur 185). Il importe de remédier à cet état de fait en adaptant les organismes français au fonctionnement européen.

Au niveau scientifique et épidémiologique il serait souhaitable de :

- **tenir compte de l'actuel élargissement** du concept de perturbation hormonale qui est en constante évolution. D'une part, les xénobiotiques alimentaires (phyto-œstrogènes, additifs) rejoignent les polluants industriels dans la liste des molécules à surveiller, d'autre part la perturbation hormonale doit englober toute l'endocrinologie et non plus seulement la reproduction, comme en témoignent les deux exemples du tabagisme et du diabète ;

- **soutenir la recherche épidémiologique** (particulièrement sur les populations féminines). Évaluer spécifiquement la vulnérabilité ou l'exposition particulière de certaines fractions de la population. Une insuffisance de distinction entre population globale et population à risque pourrait être un facteur d'erreur dans l'appréciation de la perturbation hormonale. Il semble approprié de faire rentrer l'étude de la perturbation hormonale dans l'analyse des risques professionnels. En cas d'anomalie, celle-ci pourrait être recherchée dans la population générale. Il faut tenir compte du fait que les effets allégués sur le risque de cancers peuvent être le résultat d'expositions passées à des produits qui ne sont plus utilisés. Les effets à court délai de latence comme l'atteinte de la fertilité peuvent aussi bien résulter de produits anciens persistants que de ceux d'utilisation actuelle ;
- **revoir et développer les méthodes d'analyse**, chimiques ou biologiques. Ce n'est pas la toxicité des contaminants environnementaux qui est sujette à débat, mais la réalité de sa traduction sous la forme d'une perturbation hormonale chez l'animal et l'homme. Cela requiert **un renforcement de la recherche fondamentale** visant à élucider les mécanismes d'action des xénobiotiques et développer la production de marqueurs, de techniques de détection et de mesure ainsi que d'agents thérapeutiques ;
- **documenter les expositions du public aux perturbateurs endocriniens**, ce qui suppose un effort important de caractérisation de la contamination des milieux (air, eau, aliments) susceptibles d'être des vecteurs d'exposition. Il faudrait établir les mesures à prendre pour minimiser l'impact des phyto-œstrogènes alimentaires (soja) si les évaluations épidémiologiques le justifient. Une norme d'apports alimentaires recommandés pourrait être établie ;
- **discuter des modalités d'application du principe de précaution** pour les nouvelles molécules. Les études de toxicité préalables à une autorisation de mise sur le marché de nouvelles molécules pourraient comporter des tests spécifiques d'activité endocrinienne. En cas de positivité, une étude bénéfice/risque devrait être obligatoire. Alternativement, on pourrait admettre la création d'une nouvelle catégorie de « perturbateurs hormonaux » à côté des trois classiques (cancérogènes, mutagènes, reprotoxiques) et que tout nouveau produit montrant ce type d'activité doive par principe se voir refuser son autorisation de mise sur le marché, comme c'est le cas au niveau de l'Union européenne pour les produits mutagènes.

Remerciements

Les auteurs remercient les personnes qui suivent pour leur aide et/ou leurs documents.

Dr Robert Barouki, Inserm, Paris
Mr Jacques Desarnauts, ex-Président de l'Action Chimie-Écologie du groupe Ecrin.
Dr André Guillozou, Inserm, Rennes
Dr Marie-Laure Janex-Habibi, Suez Environnement - Cirsee, Le Pecq
Dr Bernard Jegou, Inserm, Rennes
Mme Myriam Leveugle, groupe Ecrin
Pr Edwin Milgrom, Hôpital et Faculté de médecine du Kremlin-Bicêtre, U. Paris XI
Dr Jean-François Régnier, Atofina.

Références bibliographiques

- Abbott BD. *et al.* (1995). Developmental expression of two members of a new class of transcription factors: I. Expression of aryl hydrocarbon receptor in the C57BL/6N mouse embryo. *Dev Dyn*, **204** : 133-143.
- Alexander DL. *et al.* (1998). Aryl-hydrocarbon receptor is an inhibitory regulator of lipid synthesis and of commitment to adipogenesis. *J Cell Sci*, **111** : 3311-3322.
- Andreola F. *et al.* (1997). Aryl hydrocarbon receptor knockout mice (AHR-/-) exhibit liver retinoid accumulation and reduced retinoic acid metabolism. *Cancer Res*, **57** : 2835-2838.
- Anway MD. *et al.* (2005). Epigenetic transgenerational actions of endocrine disruptors and male fertility. *Science*, **308** : 1466-1469.
- Aranda A. et Pascual A. (2001). Nuclear hormone receptors and gene expression. *Physiol Rev*, **81** : 1269-1304.
- Arlt VM. *et al.* (2004). DNA adducts and mutagenic specificity of the ubiquitous environmental pollutant 3-nitrobenzanthrone in *Muta Mouse*. *Environ Mol Mutagen*, **43** : 186-195.
- Ayotte P. *et al.* (1997). PCBs and dioxin-like compounds in plasma of adult Inuit living in Nunavik (Arctic Quebec). *Chemosphere*, **34** : 1459-1468.
- Baccarelli A. *et al.* (2000). Occupational and environmental agents as endocrine disruptors: experimental and human evidence. *J Endocrinol Invest*, **23** : 771-781.
- Bachour G. *et al.* (1998). Species and organ dependence of PCB contamination in fish, foxes, roe deer, and humans. *Arch Environ Contam Toxicol*, **35** : 666-673.

- Bager Y. *et al.* (1997). The ability to alter the gap junction protein expression outside GST-P positive foci in liver of rats was associated to the tumour promotion potency of different polychlorinated biphenyls. *Chem Biol Interact*, **103** : 199-212.
- Barlow NJ. *et al.* (2003). Quantitative changes in gene expression in fetal rat testes following exposure to di(n-butyl) phthalate. *Toxicol Sci*, **7** : 431-441.
- Bartsch H. *et al.* (1992). Carcinogen metabolism in human lung tissues and the effect of tobacco smoking: results from a case-control multicenter study on lung cancer patients. *Environ Health Perspect*, **98** : 119-124.
- Benassayag C. *et al.* (2002). Phytoestrogens as modulators of steroid action in target cells. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, **777** : 233-248.
- Bendz D. *et al.* (2005). Occurrence and fate of pharmaceutically active compounds in the environment, a case study: Hoje River in Sweden. *J Hazard Mater*, **122** : 195-204.
- Bennetau-Pelissero C. *et al.* (2004). Screening for oestrogenic activity of plant and food extracts using in vitro trout hepatocyte cultures. *Phytochem Anal*, **15** : 40-45.
- Berkers JA. *et al.* (1995). Interactive effects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin and retinoids on proliferation and differentiation in cultured human keratinocytes: quantification of cross-linked envelope formation. *Arch Toxicol*, **69** : 368-378.
- Bertazzi PA. *et al.* (1998). The Seveso studies on early and long-term effects of dioxin exposure: a review. *Environ Health Perspect*, **106 Suppl 2** : 625-633.
- Bertazzi PA. *et al.* (2001). Health effects of dioxin exposure: a 20-year mortality study. *Am J Epidemiol*, **153** : 1031-1044.
- Bertazzi PA. *et al.* (1989). Ten-year mortality study of the population involved in the Seveso incident in 1976. *Am J Epidemiol*, **129** : 1187-1200.
- Bilimoria MH. et Ecobichon DJ. (1980). Responses of rodent hepatic, renal and pulmonary aryl hydrocarbon hydroxylase following exposure to cigarette smoke. *Toxicology*, **15** : 83-89.
- Bolt HM. *et al.* (2001). Comparative assessment of endocrine modulators with oestrogenic activity: I. Definition of a hygiene-based margin of safety (HB-MOS) for xeno-oestrogens against the background of European developments. *Arch Toxicol*, **74** : 649-662.
- Bonde JP. et Storgaard L. (2002). How work-place conditions, environmental toxicants and lifestyle affect male reproductive function. *Int J Androl*, **25** : 262-268.

- Boyle P. (1997). Cancer, cigarette smoking and premature death in Europe: a review including the Recommendations of European Cancer Experts Consensus Meeting, Helsinki, October 1996. *Lung Cancer*, **17** : 1-60.
- Brevini TA. *et al.* (2005). Effects of endocrine disruptors on developmental and reproductive functions. *Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord*, **5** : 1-10.
- Brevini-Gandolfi TA. *et al.* (1999). Changes in poly(A) tail length of maternal transcripts during in vitro maturation of bovine oocytes and their relation with developmental competence. *Mol Reprod Dev*, **52** : 427-433.
- Brown NA. *et al.* (2000). A review of the developmental and reproductive toxicity of styrene. *Regul Toxicol Pharmacol*, **32** : 228-247.
- Bruchet A. et Janex-Habibi ML. (2004). Endocrine disruptors in environmental and drinking waters: a review. *Techniques Sciences Methodes*, **4** : 81-90.
- Bruner-Tran KL. *et al.* (1999). The Potential Role of Environmental Toxins in the Pathophysiology of Endometriosis. *Gynecol Obstet Invest*, **48 Suppl S1** : 45-56.
- Carlsen E. *et al.* (1992). Evidence for decreasing quality of semen during past 50 years. *Bmj*, **305** : 609-613.
- Carlson DB. et Perdeu GH. (2002). A dynamic role for the Ah receptor in cell signaling? Insights from a diverse group of Ah receptor interacting proteins. *J Biochem Mol Toxicol*, **16** : 317-325.
- Casper RF. *et al.* (1999). Resveratrol has antagonist activity on the aryl hydrocarbon receptor: implications for prevention of dioxin toxicity. *Mol Pharmacol*, **56** : 784-790.
- Choe S-Y. *et al.* (2003). Evaluation of estrogenicity of major heavy metals. *Science Total Environment*, **312** : 15-21.
- Clark LC. et Portier KM. (1979). Diethylstilbestrol and the risk of cancer. *N Engl J Med*, **300** : 263-264.
- Clewell HJ. *et al.* (2002). Review and evaluation of the potential impact of age- and gender-specific pharmacokinetic differences on tissue dosimetry. *Crit Rev Toxicol*, **32** : 329-389.
- Collins S. et Marletta MA. (1984). Carcinogen-binding proteins. High-affinity binding sites for benzo[a]pyrene in mouse liver distinct from the Ah receptor. *Mol Pharmacol*, **26** : 353-359.

- Cooke GM. *et al.* (1998). Effects of in utero and lactational exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) on serum androgens and steroidogenic enzyme activities in the male rat reproductive tract. *J Steroid Biochem Mol Biol*, **67** : 347-354.
- Corton JC. et Lapinskas PJ. (2005). Peroxisome proliferator-activated receptors: mediators of phthalate ester-induced effects in the male reproductive tract? *Toxicol Sci*, **83** : 4-17.
- Curtis LR. (2001). Organophosphate antagonism of the androgen receptor. *Toxicol Sci*, **60** : 1-2.
- Daly AK. (2003). Pharmacogenetics of the major polymorphic metabolizing enzymes. *Fundam Clin Pharmacol*, **17** : 27-41.
- de Lemos ML. (2001). Effects of soy phytoestrogens genistein and daidzein on breast cancer growth. *Ann Pharmacother*, **35** : 1118-1121.
- de Luze A. *et al.* (1993). Thyroid hormone-dependent transcriptional regulation of exogenous genes transferred into *Xenopus* tadpole muscle in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA*, **90** : 7322-7326.
- Degen GH. *et al.* (2002). Integration of mechanistic data in the toxicological evaluation of endocrine modulators. *Toxicol Lett*, **127** : 225-237.
- Denison MS. et Nagy SR. (2003). Activation of the aryl hydrocarbon receptor by structurally diverse exogenous and endogenous chemicals. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, **43** : 309-334.
- Derfoul A. *et al.* (2003). Estrogenic endocrine disruptive components interfere with calcium handling and differentiation of human trophoblast cells. *J Cell Biochem*, **89** : 755-770.
- DiBartolomeis MJ. *et al.* (1987). Altered regulation of adrenal steroidogenesis in 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-treated rats. *Biochem Pharmacol*, **36** : 59-67.
- Dixon RA. et Ferreira D. (2002). Genistein. *Phytochemistry*, **60** : 205-211.
- Doering DD. *et al.* (2002). Effects of butyltins on human 5alpha-reductase type 1 and type 2 activity. *Steroids*, **67** : 859-867.
- Duan R. *et al.* (1999). Transcriptional activation of c-fos protooncogene by 17beta-estradiol: mechanism of aryl hydrocarbon receptor-mediated inhibition. *Mol Endocrinol*, **13** : 1511-1521.
- Eliasson B. (2003). Cigarette smoking and diabetes. *Progress in Cardiovascular Diseases*, **45** : 405-413.

- Enan E. *et al.* (1998). Use of c-Src and c-Fos knockout mice for the studies on the role of c-Src kinase signaling in the expression of toxicity of TCDD. *J Biochem Mol Toxicol*, **12** : 263-274.
- Enan E. *et al.* (1992). TCDD (2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-P-dioxin) causes reduction in glucose uptake through glucose transporters on the plasma membrane of the guinea pig adipocyte. *J Environ Sci Health B*, **27** : 495-510.
- Enan E. et Matsumura F. (1994). Significance of TCDD-induced changes in protein phosphorylation in the adipocyte of male guinea pigs. *J Biochem Toxicol*, **9** : 159-170.
- Erdman JW. Jr. *et al.* (2004). Not all soy products are created equal: caution needed in interpretation of research results. *J Nutr*, **134** : 1229S-1233S.
- Eskenazi B. *et al.* (2003). Maternal serum dioxin levels and birth outcomes in women of Seveso, Italy. *Environ Health Perspect*, **111** : 947-953.
- Fidler AE. *et al.* (2000). Screening the foods of an endangered parrot, the kakapo (*Strigops habroptilus*), for oestrogenic activity using a recombinant yeast bioassay. *Reprod Fertil Dev*, **12** : 191-199.
- Fiorini C. *et al.* (2004). Sertoli cell junctional proteins as early targets for different classes of reproductive toxicants. *Reproductive Toxicology*, **18** : 413-421.
- Foster WG. (2003). Do environmental contaminants adversely affect human reproductive physiology? *J Obstet Gynaecol Can*, **25** : 33-44.
- Gambone C.J. *et al.* (2002). Unique property of some synthetic retinoids: activation of the aryl hydrocarbon receptor pathway. *Mol Pharmacol*, **61** : 334-342.
- Garcia-Morales P. *et al.* (1994). Effect of cadmium on estrogen receptor levels and estrogen-induced responses in human breast cancer cells. *J Biol Chem*, **269** : 16896-16901.
- Gierthy JF. *et al.* (1987). Suppression of estrogen-regulated extracellular tissue plasminogen activator activity of MCF-7 cells by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Cancer Res*, **47** : 6198-6203.
- Gillesby BE. *et al.* (1997). Identification of a motif within the 5' regulatory region of pS2 which is responsible for AP-1 binding and TCDD-mediated suppression. *Biochemistry*, **36** : 6080-6089.
- Gouedard C. *et al.* (2004). Dietary polyphenols increase the paraoxonase-1 gene expression by an AhR-dependent mechanism. *Mol Cell Biol*, **24** : 5209-5222.

- Gray LE. Jr. *et al.* (2000). Perinatal exposure to the phthalates DEHP, BBP, and DINP, but not DEP, DMP, or DOTP, alters sexual differentiation of the male rat. *Toxicol Sci*, **58** : 350-365.
- Gray LE. Jr. *et al.* (2002). Xenoendocrine disrupters-tiered screening and testing. Filling key data gaps. *Toxicology*, **181-182** : 371-382.
- Gray LE. *et al.* (2001). Effects of environmental antiandrogens on reproductive development in experimental animals. *Hum Reprod Update*, **7** : 248-264.
- Grisso JA. *et al.* (1997). Risk factors for hip fracture in men. Hip Fracture Study Group. *Am J Epidemiol*, **145** : 786-793.
- Gurtoo HL. *et al.* (1983). Population distribution of placental benzo(a)pyrene metabolism in smokers. *Int J Cancer*, **31** : 29-37.
- Harper N. *et al.* (1994). Inhibition of estrogen-induced progesterone receptor in MCF-7 human breast cancer cells by aryl hydrocarbon (Ah) receptor agonists. *Mol Cell Endocrinol*, **104** : 47-55.
- Heimler I. *et al.* (1998). Dioxin perturbs, in a dose- and time-dependent fashion, steroid secretion, and induces apoptosis of human luteinized granulosa cells. *Endocrinology*, **139** : 4373-4379.
- Henriksen GL. *et al.* (1997). Serum dioxin and diabetes mellitus in veterans of Operation Ranch Hand. *Epidemiology*, **8** : 252-258.
- Henson MC. et Chedrese PJ. (2004). Endocrine disruption by cadmium, a common environmental toxicant with paradoxical effects on reproduction. *Exp Biol Med (Maywood)*, **229** : 383-392.
- Honkakoski P. *et al.* (2004). Effects of triaryl phosphates on mouse and human nuclear receptors. *Biochem Pharmacol*, **67** : 97-106.
- Hu H. (2000). Exposure to metals. *Prim Care*, **27** : 983-996.
- Hunt PA. *et al.* (2003). Bisphenol A exposure causes meiotic aneuploidy in the female mouse. *Curr Biol*, **13** : 546-553.
- Hurley PM. (1998). Mode of carcinogenic action of pesticides inducing thyroid follicular cell tumors in rodents. *Environ Health Perspect*, **106** : 437-445.
- Inserm (2000). *Dioxines dans l'environnement : Quels risques pour la santé?* Inserm, Paris.
- Iwasaki T. *et al.* (2002). Polychlorinated biphenyls suppress thyroid hormone-induced transactivation. *Biochem Biophys Res Commun*, **299** : 384-388.

- Johansson C. et Mellstrom D. (1996). An earlier fracture as a risk factor for new fracture and its association with smoking and menopausal age in women. *Maturitas*, **24** : 97-106.
- Johansson M. et al. (1998). Interactions between methylsulfonyl PCBs and the glucocorticoid receptor. *Environ Health Perspect*, **106** : 769-772.
- Johnson MD. et al. (2003). Cadmium mimics the in vivo effects of estrogen in the uterus and mammary gland. *Nat Med*, **9** : 1081-1084.
- Kaltreider RC. et al. (2001). Arsenic alters the function of the glucocorticoid receptor as a transcription factor. *Environ Health Perspect*, **109** : 245-251.
- Kavlock R. et al. (2002). NTP Center for the Evaluation of Risks to Human Reproduction: phthalates expert panel report on the reproductive and developmental toxicity of di-n-octyl phthalate. *Reprod Toxicol*, **16** : 721-734.
- Kavlock RJ. et al. (1996). Research needs for the risk assessment of health and environmental effects of endocrine disruptors: a report of the U.S. EPA-sponsored workshop. *Environ Health Perspect*, **104 Suppl 4** : 715-740.
- Kietz S. et al. (2004). The Ah receptor inhibits estrogen-induced estrogen receptor beta in breast cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun*, **320** : 76-82.
- Klaunig JE. et al. (2003). PPARalpha agonist-induced rodent tumors: modes of action and human relevance. *Crit Rev Toxicol*, **33** : 655-780.
- Koch HM. et al. (2004). NTP center for the evaluation of risks to human reproduction reports on phthalates: addressing the data gaps. *Reprod Toxicol*, **18** : 759-760 ; author reply 761-754.
- Kogevinas M. (2001). Human health effects of dioxins: cancer, reproductive and endocrine system effects. *Hum Reprod Update*, **7** : 331-339.
- Koninckx PR. et al. (1994). Dioxin pollution and endometriosis in Belgium. *Hum Reprod*, **9** : 1001-1002.
- Kreuzer PE. et al. (1997). 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) and congeners in infants. A toxicokinetic model of human lifetime body burden by TCDD with special emphasis on its uptake by nutrition. *Arch Toxicol*, **71** : 383-400.
- Krishnan V. et al. (1995). Molecular mechanism of inhibition of estrogen-induced cathepsin D gene expression by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) in MCF-7 cells. *Molecular Cellular Biology*, **15** : 6710-6719.
- Lackmann GM. et al. (2004). Organochlorine compounds in breast-fed vs. bottle-fed infants: preliminary results at six weeks of age. *Sci Total Environ*, **329** : 289-293.

- Lai ZW. *et al.* (1996). Identification of Dioxin-Responsive Elements (Dres) in the 5' regions of Putative Dioxin-Inducible Genes. *Chem Biol Inter*, **100** : 97-112.
- Lans MC. *et al.* (1994). Different competition of thyroxine binding to transthyretin and thyroxine-binding globulin by hydroxy-PCBs, PCDDs and PCDFs. *Eur J Pharmacol*, **270** : 129-136.
- Latendresse JR. *et al.* (1995). Toxic effects of butylated triphenyl phosphate-based hydraulic fluid and tricresyl phosphate in female F344 rats. *Vet Pathol*, **32** : 394-402.
- Le TN. et Johansson A. (2001). Impact of chemical warfare with agent orange on women's reproductive lives in Vietnam: a pilot study. *Reprod Health Matters*, **9** : 156-164.
- Lee MR. *et al.* (2003). An in vitro bioassay for xenobiotics using the SXR-driven human CYP3A4/lacZ reporter gene. *Int J Toxicol*, **22** : 207-213.
- Legare ME. *et al.* (2000). 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin alters hippocampal astroglia-neuronal gap junctional communication. *Neurotoxicology*, **21** : 1109-1116.
- Longo LD. (1980). Environmental pollution and pregnancy: risks and uncertainties for the fetus and infant. *Am J Obstet Gynecol*, **137** : 162-173.
- Lu YF. *et al.* (1996). Inhibition of prolactin receptor gene expression by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in MCF-7 human breast cancer cells. *Arch Biochem Biophys*, **332** : 35-40.
- Lutz WK. *et al.* (2005). Different types of combination effects for the induction of micronuclei in mouse lymphoma cells by binary mixtures of the genotoxic agents MMS, MNU, and genistein. *Toxicol Sci*, **86** : 318-323.
- Mably TA. *et al.* (1992). In utero and lactational exposure of male rats to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. 2. Effects on sexual behavior and the regulation of luteinizing hormone secretion in adulthood. *Toxicol Appl Pharmacol*, **114** : 108-117.
- Maloney EK. et Waxman DJ. (1999). trans-Activation of PPARalpha and PPARgamma by structurally diverse environmental chemicals. *Toxicol Appl Pharmacol*, **161** : 209-218.
- Masuyama H. *et al.* (2001). The expression of pregnane X receptor and its target gene, cytochrome P450 3A1, in perinatal mouse. *Mol Cell Endocrinol*, **172** : 47-56.
- Matikainen T. *et al.* (2001). Aromatic hydrocarbon receptor-driven Bax gene expression is required for premature ovarian failure caused by biohazardous environmental chemicals. *Nat Genet*, **28** : 355-360.

- Mattingly RF. et Staff A. (1976). Cancer risk in diethylstilbestrol-exposed offspring. *Am J Obstet Gynecol*, **126** : 543-548.
- Mattison DR. et Thorgeirsson SS. (1978). Smoking and industrial pollution, and their effects on menopause and ovarian cancer. *Lancet*, **1** : 187-188.
- McKee RH. *et al.* (2004). NTP center for the evaluation of risks to human reproduction reports on phthalates: addressing the data gaps. *Reprod Toxicol*, **18** : 1-22.
- McKinney J. *et al.* (1987). Polychlorinated biphenyls and related compound interactions with specific binding sites for thyroxine in rat liver nuclear extracts. *J Med Chem*, **30** : 79-86.
- Milgrom E. *et al.* (1973). Acidophilic activation of steroid hormone receptors. *Biochemistry*, **12** : 5198-5205.
- Miller MM. *et al.* (1992). The effect of benzo(a)pyrene on murine ovarian and corpora lutea volumes. *Am J Obstet Gynecol*, **166** : 1535-1541.
- Mishra SI. *et al.* (2003). Phytoestrogens and breast cancer prevention: what is the evidence? *Am J Obstet Gynecol*, **188** : S66-70.
- Mograb B. *et al.* (2003). Aberrant Connexin 43 endocytosis by the carcinogen lindane involves activation of the ERK/mitogen-activated protein kinase pathway. *Carcinogenesis*, **24** : 1415-1423.
- Moore BS. (1999). Biosynthesis of marine natural products: microorganisms and macroalgae. *Nat Prod Rep*, **16** : 653-674.
- Moore RW. *et al.* (1991). 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin inhibits steroidogenesis in the rat testis by inhibiting the mobilization of cholesterol to cytochrome P450_{sc}. *Toxicol Appl Pharmacol*, **109** : 85-97.
- Muhlhauser I. (1994). Cigarette smoking and diabetes: an update. *Diabet Med*, **11** : 336-343.
- Munro IC. *et al.* (1999). A procedure for the safety evaluation of flavouring substances. Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. *Food Chem Toxicol*, **37** : 207-232.
- Murk AJ. *et al.* (1996). Chemical-activated luciferase gene expression (CALUX): a novel in vitro bioassay for Ah receptor active compounds in sediments and pore water. *Fundam Appl Toxicol*, **33** : 149-160.
- Muto H. et Takizawa Y. (1989). Dioxins in cigarette smoke. *Arch Environ Health*, **44** : 171-174.

- Nagel SC. *et al.* (1999). Developmental effects of estrogenic chemicals are predicted by an in vitro assay incorporating modification of cell uptake by serum. *J Steroid Biochem Mol Biol*, **69** : 343-357.
- Nau H. et Bass R. (1981). Transfer of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) to the mouse embryo and fetus. *Toxicology*, **20** : 299-308.
- Nilsson CB. et Hakansson H. (2002). The retinoid signaling system: a target in dioxin toxicity. *Crit Rev Toxicol*, **32** : 211-232.
- Nordby KC. *et al.* (2005). Indicators of mancozeb exposure in relation to thyroid cancer and neural tube defects in farmers' families. *Scand J Work Environ Health*, **31** : 89-96.
- Norppa H. (2004). Cytogenetic biomarkers and genetic polymorphisms. *Toxicol Lett*, **149** : 309-334.
- Pages N. *et al.* (2002). Reproductive toxicity of lindane. *J Soc Biol*, **196** : 325-338.
- Papadopoulos V. *et al.* (1997). Peripheral benzodiazepine receptor in cholesterol transport and steroidogenesis. *Steroids*, **62** : 21-28.
- Park JY. *et al.* (1996). Induction of cytochrome P4501A1 by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin or indolo(3,2-b)carbazole is associated with oxidative DNA damage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **93** : 2322-2327.
- Perdew GH. et Hollenback CE. (1990). Analysis of photoaffinity-labeled aryl hydrocarbon receptor heterogeneity by two-dimensional gel electrophoresis. *Biochemistry*, **29** : 6210-6214.
- Pesatori AC. *et al.* (2003). Short- and long-term morbidity and mortality in the population exposed to dioxin after the "Seveso accident". *Ind Health*, **41** : 127-138.
- Peterson J. *et al.* (2003). Flavonoid intake and breast cancer risk: a case-control study in Greece. *Br J Cancer*, **89** : 1255-1259.
- Piasek M. *et al.* (1996). Biomarkers of heavy metal reproductive effects and interaction with essential elements in experimental studies on female rats. *Arh Hig Rada Toksikol*, **47** : 245-259.
- Pieklo R. *et al.* (2000). 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin alters follicular steroidogenesis in time- and cell-specific manner. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*, **108** : 299-304.
- Pilliere F. (2002). In Documents pour le Médecin du Travail, Nr 92. INRS, ed., INRS, Paris, p. 337-352.

- Pocar P. *et al.* (2003). The impact of endocrine disruptors on oocyte competence. *Reproduction*, **125** : 313-325.
- Pohl HR. et Hibbs BF. (1996). Breast-feeding exposure of infants to environmental contaminants: a public health risk assessment viewpoint: chlorinated dibenzodioxins and chlorinated dibenzofurans. *Toxicol Ind Health*, **12** : 593-611.
- Polkowski K. et Mazurek AP. (2000). Biological properties of genistein. A review of in vitro and in vivo data. *Acta Pol Pharm*, **57** : 135-155.
- Porter WP. *et al.* (1993). Groundwater pesticides: interactive effects of low concentrations of carbamates aldicarb and methomyl and the triazine metribuzin on thyroxine and somatotropin levels in white rats. *J Toxicol Environ Health*, **40** : 15-34.
- Rawlings NC. *et al.* (1998). Effects of the pesticides carbofuran, chlorpyrifos, dimethoate, lindane, triallate, trifluralin, 2,4-D, and pentachlorophenol on the metabolic endocrine and reproductive endocrine system in ewes. *J Toxicol Environ Health A*, **54** : 21-36.
- Revel A. *et al.* (2003). Resveratrol, a natural aryl hydrocarbon receptor antagonist, protects lung from DNA damage and apoptosis caused by benzo[a]pyrene. *J Appl Toxicol*, **23** : 255-261.
- Rier SE. *et al.* (1993). Endometriosis in rhesus monkeys (*Macaca mulatta*) following chronic exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Fundam. Appl Toxicol*, **21** : 433-441.
- Rifkind AB. *et al.* (1990). Arachidonic acid metabolism by dioxin-induced cytochrome P-450: a new hypothesis on the role of P-450 in dioxin toxicity. *Biochem Biophys Res Commun*, **172** : 1180-1188.
- Rowlands JC. et Gustafsson JA. (1997). Aryl hydrocarbon receptor-mediated signal transduction. *Crit Rev Toxicol*, **27** : 109-134.
- Ruden DM. *et al.* (2005). Hsp90 and environmental impacts on epigenetic states: a model for the trans-generational effects of diethylstilbestrol on uterine development and cancer. *Hum Mol Genet*, **14** (1) : R149-155.
- Safe S. *et al.* (1998). Ah receptor agonists as endocrine disruptors: antiestrogenic activity and mechanisms. *Toxicol Lett*, **102-103** : 343-347.
- Safe S. et Wormke M. (2003). Inhibitory aryl hydrocarbon receptor-estrogen receptor alpha cross-talk and mechanisms of action. *Chem Res Toxicol*, **16** : 807-816.
- Safe SH. (1995). Environmental and dietary estrogens and human health: is there a problem? *Environ Health Perspect*, **103** : 346-351.

- Safe SH. *et al.* (2002). Problems for risk assessment of endocrine-active estrogenic compounds. *Environ Health Perspect*, **110 Suppl 6** : 925-929.
- Saidi JA. *et al.* (1999). Declining sperm counts in the United States? A critical review. *J Urol*, **161** : 460-462.
- Savouret JF. *et al.* (2001). 7-ketocholesterol is an endogenous modulator for the Aryl hydrocarbon Receptor. *J Biol Chem*, **276** : 3054-3059.
- Schonfelder G. *et al.* (2002). Parent bisphenol A accumulation in the human maternal-fetal-placental unit. *Environ Health Perspect*, **110** : A703-707.
- Schultz R. *et al.* (2003). Expression of aryl hydrocarbon receptor and aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator messenger ribonucleic acids and proteins in rat and human testis. *Endocrinology*, **144** : 767-776.
- Schuur AG. *et al.* (1998). In vitro inhibition of thyroid hormone sulfation by hydroxylated metabolites of halogenated aromatic hydrocarbons. *Chem Res Toxicol*, **11** : 1075-1081.
- Setchell KD. *et al.* (1997). Exposure of infants to phyto-oestrogens from soy-based infant formula. *Lancet*, **350** : 23-27.
- Setchell KD. *et al.* (1998). Isoflavone content of infant formulas and the metabolic fate of these phytoestrogens in early life. *Am J Clin Nutr*, **68** : 1453S-1461S.
- Sharara FI. *et al.* (1998). Environmental toxicants and female reproduction. *Fertil Steril*, **70** : 613-622.
- Simanainen U. *et al.* (2004). Adult 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) exposure and effects on male reproductive organs in three differentially TCDD-susceptible rat lines. *Toxicol Sci*, **81** : 401-407.
- Singh SU. *et al.* (2000). Inhibition of dioxin effects on bone formation in vitro by a newly described aryl hydrocarbon receptor antagonist, resveratrol. *J Endocrinol*, **167** : 183-195.
- Sirtori CR. *et al.* (2005). Phytoestrogens: end of a tale? *Ann Med*, **37** : 423-438.
- Skakkebaek NE. *et al.* (2001). Testicular dysgenesis syndrome: an increasingly common developmental disorder with environmental aspects. *Hum Reprod*, **16** : 972-978.
- Skibola CF. et Smith MT. (2000). Potential health impacts of excessive flavonoid intake. *Free Radic Biol Med*, **29** : 375-383.
- Son DS. *et al.* (1999). 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) blocks ovulation by a direct action on the ovary without alteration of ovarian steroidogenesis: lack of a direct effect on ovarian granulosa and thecal-interstitial cell steroidogenesis in vitro. *Reprod Toxicol*, **13** : 521-530.

- Sonnenschein C. et Soto AM. (1998). An updated review of environmental estrogen and androgen mimics and antagonists. *J Steroid Biochem Mol Biol*, **65** : 143-150.
- Stegeman JJ. *et al.* (1995). Induction of cytochrome P4501A1 by aryl hydrocarbon receptor agonists in porcine aorta endothelial cells in culture and cytochrome P4501A1 activity in intact cells. *Mol Pharmacol*, **47** : 296-306.
- Sugiura-Ogasawara M. *et al.* (2003). PCBs, hexachlorobenzene and DDE are not associated with recurrent miscarriage. *Am J Reprod Immunol*, **50** : 485-489.
- Sumpter JP. (1998). Reproductive effects from oestrogen activity in polluted water. *Arch Toxicol Suppl*, **20** : 143-150.
- Suskind RR. (1985). Chloracne, "the hallmark of dioxin intoxication". *Scand J Work Environ Health*, **11** : 165-171.
- Swan SH. *et al.* (2005). Decrease in anogenital distance among male infants with prenatal phthalate exposure. *Environ Health Perspect*, **113** : 1056-1061.
- Thomas P. (2000). Chemical interference with genomic and nongenomic actions of steroids in fishes: role of receptor binding. *Mar Environ Res*, **50** : 127-134.
- Toborek M. *et al.* (1995). Exposure to polychlorinated biphenyls causes endothelial cell dysfunction. *J Biochem Toxicol*, **10** : 219-226.
- Traber MG. (2004). Vitamin E, nuclear receptors and xenobiotic metabolism. *Arch Biochem Biophys*, **423** : 6-11.
- Union européenne (2000). Directive 2000/60/CE du Parlement européen et du Conseil du 23 octobre 2000 établissant un cadre pour une politique communautaire dans le domaine de l'eau. *J Off Comm Europ*, **L 327** : 0001-0073.
- Vena J. *et al.* (1998). Exposure to dioxin and nonneoplastic mortality in the expanded IARC international cohort study of phenoxy herbicide and chlorophenol production workers and sprayers. *Environ Health Perspect*, **106** (2) : 645-653.
- Vidaeff AC. et Sever LE. (2005). In utero exposure to environmental estrogens and male reproductive health : a systematic review of biological and epidemiologic evidence. *Reprod Toxicol*, **20** : 5-20.
- Vrzal R. *et al.* (2004). Aromatic hydrocarbon receptor status in the metabolism of xenobiotics under normal and pathophysiological conditions. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*, **148** : 3-10.

- Waller CL. *et al.* (1996). Ligand-based identification of environmental estrogens. *Chemical Research in Toxicology*, **9** : 1240-1248.
- Wang F. *et al.* (1998). Functional and physical interactions between the estrogen receptor Sp1 and nuclear aryl hydrocarbon receptor complexes. *Nucleic Acids Res*, **26** : 3044-3052.
- Wang XL. *et al.* (2002). Effect of CYP1A1 MspI polymorphism on cigarette smoking related coronary artery disease and diabetes. *Atherosclerosis*, **162** : 391-397.
- Warner M. *et al.* (2002). Serum dioxin concentrations and breast cancer risk in the Seveso Women's Health Study. *Environ Health Perspect*, **110** : 625-628.
- Whitelaw ML. *et al.* (1994). Identification of transactivation and repression functions of the dioxin receptor and its basic helix-loop-helix/PAS partner factor Arnt: inducible versus constitutive modes of regulation. *Mol Cell Biol*, **14** : 8343-8355.
- Widerak M. *et al.* (2005). The aryl hydrocarbon receptor activates the retinoic acid receptor α through SMRT antagonism. *Biochimie*, **88** : 387-397.
- Wissing M. (1998). Dioxins : current knowledge about health effects. *Rev Med Brux*, **19** : A367-371.
- Witorsch RJ. (2002). Endocrine Disruptors: Can Biological Effects and Environmental Risks Be Predicted? *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, **36** : 118-130.
- Wormke M. *et al.* (2003). The Aryl Hydrocarbon Receptor Mediates Degradation of Estrogen Receptor α through Activation of Proteasomes. *Mol Cell Biol*, **23** : 1843-1855.
- Zenzes MT. *et al.* (1997). Effects of cigarette smoking and age on the maturation of human oocytes. *Hum Reprod*, **12** : 1736-1741.
- Zhang S. *et al.* (2003). Flavonoids as aryl hydrocarbon receptor agonists/antagonists: effects of structure and cell context. *Environ Health Perspect*, **111** : 1877-1882.

Abréviations

- ADN : acide désoxyribonucléique
Afssa : Agence française de sécurité sanitaire des aliments
AhR : aryl hydrocarbon receptor
AR : androgen receptor

ARNT : aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator
bHLH-PAS : domaine basique/Hélice/boucle (Loop) /Hélice-domaine Per/ARNT/Sim
BXR : benzoate X receptor
CAR β ₃ constitutive androstane receptor
CEPIC : Conseil européen de l'industrie chimique
CIRSEE : Centre international de recherche sur l'eau et l'environnement
CYP 1A1 : cytochrome P-450 1A1
CYP 450sc : enzyme de coupure de la chaîne latérale du cholestérol
DDT : dichlorodiphényltrichloroéthane
DEHP : di-2-éthylhexyl-phtalate
DES : diéthylstilbestrol
DRE : dioxin responsive element
EPA : Environmental Protection Agency
ER : estrogen receptor
FSH : follicle-stimulating hormone
FXR : farnesoid X receptor
GR : récepteur des glucocorticoïdes
HAP : hydrocarbures aromatiques polycycliques
HRE : hormone response element
HB MOS : hygiene-based margining of security
IFCS : Intergovernmental forum on chemical safety
IOMC : Programme interorganisation pour la gestion saine des produits chimiques
IPCS : Programme international de sécurité chimique
Kd : constante d'affinité
LDL : low density lipoproteins
LH : luteinizing hormone
LXR : liver X receptor
MOS : margining of security
NH EL : no hormonal effect level
 μ g : microgramme
 μ M : micromolaire
nM : nanomolaire
NOAEL : no observed adverse effect level
PCB : polychlorobiphényles
PCDD : polychlorodibenzodioxines
PCDF : polychlorodibenzofuranes
PCRD : Programme commun de recherche et développement
PE : perturbateur endocrinien
pg : picogramme
PHB : polyhalogénobiphényles
POP : polluant organohalogéné persistant
PPAR : peroxisome proliferator activated receptor
PR : progesterone receptor
PXR : pregnane X receptor

RAR : retinoic acid receptor
ROS : reactive oxygen species
RXR : récepteur X de l'acide 9-cis rétinoïque
RyaR : canal calcique sensible à la ryanodine
SMRT : silencing mediator of retinoic acid and thyroid hormone receptor
STREP : Specific Targeted Research Project
SXR : steroid and xenobiotic receptor
TCDD : 2,3,7,8-tétrachlorodibenzoparadioxine
TR : récepteur des hormones thyroïdiennes
TSH : thyroïdostimuline
XRE : xenobiotic responsive element

CHAPITRE 6

L'utilisation des hormones en élevage : les développements zootechniques et les préoccupations de santé publique

ALAIN PARIS, FRANÇOIS ANDRÉ, JEAN-PHILIPPE ANTIGNAC, MICHEL BONNEAU, CHRISTIAN BRIANT, ALAIN CARATY, YVES CHILLIARD, YVES COGNIE, YVES COMBARNOUS, JEAN-PIERRE CRAVEDI, CLAUDE FABRE-NYS, ADRIANA FERNANDEZ-SUAREZ, ALEX FOSTIER, PATRICE HUMBLLOT, VINCENT LAUDET, BRUNO LE BIZEC, BERNARD LEOEUF, ISABELLE LOUVEAU, BENOÎT MALPAUX, FRANÇOISE MARTINAT-BOTTE, MARIE-CHRISTINE MAUREL, MARIA-TERESA PELICER-RUBIO, NICOLE PICARD-HAGEN, LOUIS PINAULT, GAUD PINEL, CLAIRE PONSART, MARIE-AGNÈS POPOT, PHILIPPE SCHMIDELY, PIERRE-LOUIS TOUTAIN ET DANIEL ZALCO

Résumé

L'utilisation des hormones en élevage a contribué durant ces quarante dernières années à modifier en profondeur les performances zootechniques, tant en production de viande que de lait, ou même en élevage piscicole. Pour ce faire, différentes stratégies se sont progressivement dessinées. À un niveau très intégré, la maîtrise des cycles de reproduction des femelles et leur synchronisation au sein des troupeaux, l'induction de l'ovulation combinée ou non à une stimulation ovarienne, le dessaisonnement de l'activité sexuelle dans certaines espèces, voire l'induction des comportements sexuels, font appel à des traitements hormonaux complexes, mais dont l'utilisation reste limitée dans le temps à certaines « fenêtres » de sensibilité physiologique. Ces traitements utilisent aussi bien des stéroïdes sexuels que les hormones gonadotropes ou les facteurs de stimulation de la synthèse de ces hormones et des prostaglandines suivant des protocoles maintenant bien ajustés à l'espèce et au contexte d'élevage considérés. L'objectif principal est de pouvoir améliorer la prolificité des troupeaux, d'accélérer la diffusion du progrès génétique et d'optimiser l'utilisation de la ressource alimentaire durant les pleines périodes de production de viande ou de lait ou d'allaitement et de croissance des jeunes. À l'opposé, l'augmentation de la vitesse de croissance des animaux ou de la production laitière en élevage bovin-lait repose sur un traitement chronique et relativement simple des individus, ceci jusqu'à la fin de la période d'engraissement des animaux ou jusqu'au tarissement des femelles. Les traitements anabolisants en élevage bovin reposent sur l'utilisation quasi exclusive de stéroïdes naturels ou de synthèse de type progestagène ou de type androgène en association à des œstrogènes, qui sont administrés le plus souvent sous forme d'implants, plus rarement par voie orale. Des traitements par β -agonistes administrés par voie orale peuvent aussi se faire. L'hormone de croissance peut aussi être utilisée en élevage porcin pour améliorer les performances de croissance des animaux. La stimulation de la production laitière en élevage bovin est obtenue par l'utilisation d'hormone de croissance recombinante. Les traitements anabolisants ou la stimulation de la production laitière permettent d'obtenir un gain de l'ordre de 10-15 %.

La palette d'utilisation des hormones est large et se fait, dans les zones économiques où elles sont utilisées, dans un cadre réglementaire strict. Leurs analogues n'ayant pas reçu d'autorisation légale d'utilisation sont donc prohibés, les utilisations frauduleuses étant de plus en plus rares compte tenu des moyens techniques lourds mis en œuvre pour les détecter de façon non ambiguë. Dans l'Union européenne, seules quelques hormones stéroïdiennes et peptidiques et des prostaglandines sont autorisées pour la maîtrise de la reproduction des espèces domestiques. En revanche, les substances pouvant être utilisées pour améliorer la croissance des animaux ou la production laitière en élevage bovin y sont interdites. Certaines de ces interdictions sont d'ailleurs l'objet de litige

entre l'Union européenne et les États-Unis ou le Canada, la première arguant du fait que l'innocuité des résidus retrouvés dans les produits animaux destinés à la consommation humaine n'est pas démontrée, notamment parce qu'elle s'appuie sur des données toxicologiques très anciennes et, pour certaines d'entre elles, largement caduques au regard des connaissances scientifiques actuelles, les seconds, au contraire, plaidant l'absence de données nouvelles inquiétantes qui inviteraient alors à reconsidérer en profondeur les expertises toxicologiques réalisées par le passé.

Les pratiques agricoles sont à l'heure actuelle largement interrogées quant au lien, avéré ou non, qu'elles peuvent avoir avec une qualité des produits agricoles que certains consommateurs jugent comme médiocre, voire dégradée. D'autres considérations de nature économique et sociologique rendent encore plus difficile l'analyse fine de ces pratiques. C'est dans ce contexte complexe que la recherche de nouvelles stratégies visant à contrôler la physiologie des animaux devra être réfléchie de façon à garantir tout à la fois la « durabilité » économique, écologique et sociale des systèmes de production, la qualité de vie des éleveurs et la qualité des produits animaux offerts aux consommateurs.

Introduction

Durant les cinquante dernières années, les performances des élevages des pays industrialisés n'ont cessé de s'améliorer. De fait, l'accès des populations aux protéines animales a été considérablement facilité par le développement sans précédent des filières agro-industrielles réalisé dans le même temps. Ce développement s'est traduit par une amélioration rapide de l'état sanitaire des troupeaux et un progrès continu de leurs performances zootechniques. Dans l'arsenal des technologies utilisées pour les améliorer, les méthodes de contrôle de la physiologie des animaux d'élevage ont été très tôt mises au service des acteurs des filières concernées.

Pourtant, les crises sanitaires, telles celle de l'ESB apparue dans les années 1990, ont rappelé que la vigilance vis-à-vis de certaines pratiques zootechniques restait de mise. Elles ont fait évoluer les procédures d'expertise réalisées à l'échelon national et européen. Si certaines pratiques relatives à l'utilisation des hormones en élevage ne soulèvent pas de difficulté auprès des consommateurs européens, telles celles qui concernent la maîtrise de la reproduction en élevage, d'autres, au contraire, ne sont plus acceptées depuis de très nombreuses années. Sont ainsi visées l'utilisation d'anabolisants ou d'hormone de croissance qui, dans un contexte de production autosuffisante, parfois excédentaire, de viande ou de lait, ne sont plus considérées comme justifiées. Dans les pays développés, les préoccupations de santé publique et de traçabilité ont pris

le pas sur le souci d'assurer la sécurité des apports alimentaires car les années de pénurie sont loin derrière nous.

Ce point spécifique sur l'innocuité des hormones anabolisantes et autres promoteurs de croissance fait l'objet de divergences de vues profondes entre l'Union européenne (UE) et les pays d'Amérique du Nord et l'Australie. Le litige est maintenant porté devant l'Organisation mondiale du commerce (OMC) qui doit statuer sur le bien-fondé de la position de l'UE qui, au nom du « principe de précaution », a interdit depuis 1988 toute utilisation des hormones pour la production de lait ou de viande, et qui en a strictement encadré l'usage pour la maîtrise de la reproduction et la production d'embryons. Cette attitude européenne est motivée au plan scientifique. En effet, selon certaines expertises, l'innocuité vis-à-vis de la santé du consommateur des résidus d'hormones retrouvés dans les denrées d'origine animale ne serait pas absolument garantie, des doutes persistant quand à l'interprétation de certains faits sur lesquels repose l'évaluation toxicologique de ces hormones. Dans le texte qui suit, un rappel des pratiques zootechniques, de leur justification au plan physiologique et des éléments permettant de mieux préciser l'évaluation des risques pour la santé du consommateur des résidus d'hormones retrouvés dans les produits animaux sont présentés¹.

1 | Les maîtrises de la physiologie des animaux d'élevage

1.1 La croissance et l'engraissement

1.1.1 La croissance et le développement des tissus d'intérêt zootechnique

La croissance peut être définie comme la succession des variations de masse, de forme, de structure et de composition chimique de l'organisme. Le tissu musculaire et le tissu adipeux blanc sont les deux tissus les plus importants en termes d'intérêt zootechnique puisqu'ils constituent la partie comestible de la viande.

La masse de muscle est déterminée par le nombre et la taille des fibres musculaires qui le constituent. Les processus de prolifération, de différenciation et de croissance cellulaire qui déterminent la masse musculaire sont sous

¹Cette synthèse réalisée à l'initiative de l'Académie des sciences est publiée dans sa version longue dans la revue *Inra – Productions animales* (Paris et al., 2006), ceci en accord avec les éditeurs des revues susnommées.

la dépendance de facteurs myogéniques (Myo D, myogénine, Myf 5 et MRF4), d'hormones et de facteurs de croissance tels que les IGF, FGF et TGF- β . Un facteur de la famille du TGF- β , la myostatine ou GDF-8, agit comme inhibiteur de la croissance du muscle squelettique.

Le tissu adipeux blanc existe sous forme de dépôts localisés dans différents sites anatomiques sous-cutanés, intermusculaires et périviscéraux. Il existe aussi sous une forme diffuse constituée de cellules plus ou moins isolées comme dans le muscle squelettique. Dans la plupart des espèces, le tissu adipeux se met en place avant la naissance, mais l'augmentation de la masse adipeuse se produit essentiellement après la naissance par accroissement de la taille et/ou du nombre d'adipocytes. L'augmentation de leur nombre dépend de la différenciation des préadipocytes en adipocytes, sous l'influence de plusieurs hormones et facteurs de croissance comme l'IGF-I et l'hormone de croissance (GH, aussi appelée somatotropine, ST).

Les hormones de l'axe somatotrope (GH et IGF) et les stéroïdes anabolisants jouent un rôle central dans la croissance, favorisant le dépôt de muscle au détriment du tissu adipeux.

L'axe somatotrope implique la GH, l'IGF-I et l'IGF-II, leurs récepteurs (RGH et RIGF) et plusieurs protéines de liaison spécifiques (GHBP, IGFBP). La sécrétion et la synthèse de la GH par les cellules somatotropes de l'adénohypophyse sont sous le contrôle du système nerveux central *via* deux peptides hypothalamiques, l'un inhibiteur, la somatostatine ou SRIF (somatotropin release-inhibiting factor), l'autre stimulateur, le GH-RH (growth hormone-releasing hormone). L'hypothèse selon laquelle l'action de la GH est relayée par l'IGF-I plasmatique d'origine hépatique a longtemps été admise, mais la production d'IGF-I par de nombreux autres organes et tissus, la présence du récepteur à la GH et à l'IGF-I dans de nombreux types cellulaires et l'existence de plusieurs IGFBP indiquent que des interactions multiples sont possibles au niveau de ce système. La plupart des études décrivant les actions de la GH ne permettent pas de distinguer les effets propres de la GH de ceux relayés par l'IGF-I.

Les stéroïdes anabolisants (androgènes, œstrogènes et, indirectement, progestagènes²) ont un effet direct sur la croissance en favorisant le dépôt de protéines (Meyer, 2001). Androgènes et œstrogènes se lient aux récepteurs présents dans le tissu musculaire mais aussi dans le foie, le rein, le rumen et l'épithélium intestinal, le tissu osseux et au niveau hypothalamo-hypophysaire. Ils ont aussi un effet indirect en stimulant la sécrétion de GH et d'IGF-I. Les glucocorticoïdes, stéroïdes d'origine surrénalienne, ont au contraire un rôle inhibiteur sur la synthèse des protéines et favorisent le catabolisme des acides aminés.

²Les progestagènes sont aussi désignés sous les termes « gestagènes » ou « progestines ».

1.1.2 Utilisation des hormones pour le contrôle de la croissance : aspects généraux

De nombreux promoteurs de croissance peuvent être utilisés pour améliorer les performances de croissance des animaux domestiques et manipuler le rapport tissu maigre/tissu gras. La GH et les hormones sexuelles ont été les plus étudiées. Des agonistes des récepteurs β -adrénergiques, structurellement proches de l'adrénaline ou de la noradrénaline, ont aussi été proposés, ainsi que des anti-thyroïdiens.

Ces promoteurs sont utilisés après la naissance, selon des modalités qui dépendent de l'espèce considérée, de l'état physiologique de l'animal et du type de production. La GH est considérée comme un agent de répartition efficace chez les porcs tandis que les β -agonistes sont plus efficaces chez les ruminants. Les stéroïdes anabolisants naturels (œstradiol, testostérone, progestérone) ou de synthèse (zéranol, acétate de trenbolone, acétate de mélengestrol) sont utilisés essentiellement en élevage bovin. L'usage de ces différents produits est actuellement interdit dans l'Union européenne.

1.1.3 Stéroïdes

En tant qu'anabolisants, les androgènes sont réputés être moins actifs chez les bovins ou les ovins que chez l'homme, traduisant une concentration en récepteurs aux androgènes dans le muscle plus faible (Meyer, 2001). La trenbolone fait partie des stéroïdes anabolisants les plus efficaces, du fait de ses propriétés de liaison de type agoniste au récepteur des androgènes et de type antagoniste au récepteur des glucocorticoïdes.

Parmi les œstrogènes, l'œstradiol et le zéranol (α -zéaralanol) sont les deux seules molécules utilisables en élevage. Les stilbènes, en particulier le DES, sont partout interdits.

Parmi les progestagènes, la progestérone peut être utilisée comme anabolisant en association à un œstrogène, l'œstradiol ou son dérivé benzoate. À l'heure actuelle, les mécanismes biochimiques pouvant expliquer un effet direct de la progestérone sur le métabolisme sont inconnus. L'acétate de mélengestrol (MGA), un progestagène de synthèse, peut être utilisé comme additif à l'alimentation des génisses. En supprimant l'œstrus, il permet d'avoir des animaux plus calmes avec une meilleure croissance. Il aurait aussi un effet direct sur la croissance en stimulant la production d'œstrogènes d'origine ovarienne. Au contraire de l'acétate de médroxyprogestérone (MPA), le MGA ne peut être

considéré comme un agoniste partiel des androgènes, la liaison au récepteur des androgènes étant négligeable.

Chez le porc, l'association trenbolone-œstradiol améliore l'efficacité alimentaire et la vitesse de croissance et réduit le dépôt de gras des mâles castrés. Cependant, ces résultats ne sont pas clairement confirmés chez des mâles entiers ou des femelles recevant la même préparation ou une préparation équivalente associant progestérone et œstradiol.

Chez les ruminants, l'utilisation d'anabolisants stéroïdiens accélère la croissance, modifie la composition corporelle et la rétention azotée. De nombreux facteurs animaux (âge, sexe, etc.) ou d'élevage (nature de l'alimentation, type et dose d'hormones, fréquence des traitements) déterminent la variation de réponse à ces traitements (Schmidely, 1993).

L'amélioration de la vitesse de croissance est de l'ordre de 15 à 20 %. Chez les bovins mâles non castrés, les œstrogènes sont moins efficaces que les associations œstrogènes/androgènes. Chez les bovins femelles, les associations œstrogènes/androgènes ou les androgènes seuls sont plus efficaces que les œstrogènes seuls. Chez les bovins ou ovins mâles castrés, la hiérarchie d'efficacité est la suivante : œstrogènes < œstrogènes/progestagènes < androgènes < androgènes/œstrogènes. L'effet du traitement est d'autant plus marqué que les performances initiales sont faibles (Schmidely, 1993). L'amplitude de réponse est également largement déterminée par le niveau d'alimentation des animaux et par la teneur en protéines de la ration qui doivent être suffisants pour soutenir le surcroît de croissance.

La conformation musculaire et le pourcentage de muscle dans les carcasses sont légèrement accrus, surtout par les associations œstrogènes/androgènes, mais les effets quantitatifs restent faibles. L'état d'engraissement est généralement réduit par toutes les préparations chez les bovins castrés, alors que chez les mâles entiers, les œstrogènes utilisés seuls accroissent l'adiposité.

Dans l'Union européenne, l'utilisation des stéroïdes anabolisants est interdite depuis 1988.

1.1.4 Hormones peptidiques

La disponibilité depuis le début des années 1980 de grandes quantités de GH-RH ou de GH recombinante a permis d'en étudier les effets dans différentes productions animales. À dose administrée équivalente, l'action du GH-RH sur les performances de croissance est plus faible que celle de la GH. L'administration de GH accélère fortement la croissance du muscle au détriment du dépôt de tissu

adipeux. Dans ce dernier tissu, la GH s'oppose à l'action de l'insuline, ce qui entraîne une diminution de l'incorporation du glucose et une réduction de la lipogenèse, la lipolyse étant assez peu affectée. Il en résulte une augmentation des concentrations sanguines en glucose et insuline. Ces conditions physiologiques, à caractère catabolique et diabétogène, favorisent le métabolisme énergétique des tissus musculaire et osseux.

C'est chez le porc que l'administration de GH a les effets les plus marqués sur la croissance. Une forme de GH porcine recombinante (rpGH ou rpST) est disponible commercialement (Reporcin®). Elle est autorisée en Australie et dans quelques pays d'Asie, d'Amérique centrale ou d'Amérique du Sud. La plupart des données disponibles proviennent d'études où les animaux reçoivent des injections intramusculaires car il n'existe pas à ce jour de système d'implant adapté au porc. En dépit d'une diminution de l'ingéré alimentaire (2-22 %), une accélération de la croissance (jusqu'à 47 %) et une amélioration de l'efficacité alimentaire (3-38 %) sont observées chez les porcs traités par la pGH. L'adiposité des carcasses est fortement réduite : de 7 à 44 %, avec une augmentation concomitante de la proportion de muscle (de 2 à 23 %). De façon plus générale, la pGH favorise le développement de tous les tissus riches en protéines (muscle, peau et os) au détriment du tissu adipeux. L'amplitude des effets de la pGH varie avec la dose administrée. L'ingéré alimentaire et le dépôt de gras décroissent linéairement avec la dose. En revanche, le gain de poids et l'efficacité alimentaire ne progressent plus au-delà de 100 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{jour}$. L'administration de GH à doses élevées entraîne des problèmes sanitaires, en particulier le développement d'ulcères gastro-œsophagiens. L'amélioration des performances apportée par la pGH est d'autant plus grande que le potentiel de croissance musculaire de l'animal (lié au génotype ou au sexe) est plus faible.

Dans l'Union européenne, l'utilisation de la GH recombinante comme promoteur de croissance y est interdite.

1.1.5 β -agonistes

Les effets de l'adrénaline et de la noradrénaline, libérées lors de l'activation du système orthosympathique, sont expliqués par l'activation des récepteurs adrénergiques (AR). Les α -AR sont associés à la contraction des muscles lisses. Il existe 2 sous-types principaux de β -AR, le β_1 -AR (stimulation cardiaque) et le β_2 -AR (relaxation de la musculature lisse). Les β -agonistes stimulent préférentiellement les β_2 -AR. Ils inhibent la lipogenèse et stimulent la lipolyse dans le tissu adipeux. Ils accroissent la synthèse et diminuent la dégradation des protéines.

C'est chez les ruminants que les β -agonistes exercent leur effet de répartition avec le plus d'efficacité, mais ils sont également actifs chez le porc. La voie

d'administration habituelle des β -agonistes utilisés en élevage est la voie orale, en mélange avec l'aliment. Les effets obtenus sont principalement une amélioration de l'efficacité alimentaire (de 10 à 25 %), une augmentation du poids relatif de la carcasse et celle du rendement en viande (accrétion de muscles aux dépens du tissu adipeux). Les doses nécessaires pour obtenir ces effets zootechniques correspondent environ à dix fois la dose indiquée en thérapeutique vétérinaire. Outre le fait que les viandes des animaux traités sont plus dures, l'usage des β -agonistes en élevage soulève des problèmes relatifs à l'activité pharmacologique des résidus chez le consommateur qui peuvent activer les β_1 -AR, même s'il s'agit d'agonistes préférentiels des β_2 -AR.

Actuellement, les seules molécules dont l'utilisation est autorisée en élevage sont la lactopamine, qui dispose d'une autorisation de mise sur le marché pour les États-Unis chez le porc (Paylean®) et les bovins (Optaflex™), et le zilpatérol qui est autorisé au Mexique et en Afrique du Sud, uniquement chez les bovins (Zilmax™). Lorsque le clenbutérol ou des analogues structuraux sont utilisés, illégalement, on suppose qu'une courte période sans traitement est observée au cours des derniers jours de vie de l'animal, pour permettre l'élimination de la majeure partie des résidus de β -agoniste présents dans les tissus.

1.1.6 Anti-thyroïdiens de synthèse (ATS)

Les ATS ou thyrostatiques perturbent les différents métabolismes contrôlés par les hormones thyroïdiennes, entraînant une diminution du métabolisme basal des lipides et des glucides et de la consommation en oxygène, une meilleure utilisation des réserves énergétiques, une rétention d'eau extracellulaire élevée (myxœdème) ainsi qu'un ralentissement du transit intestinal. Les ATS ne sont pas véritablement des anabolisants car ils n'entraînent aucune élévation de l'accrétion protéique.

Les ATS provoquent une prise de poids des animaux traités, processus inversé dès l'arrêt du traitement car il n'y a pas d'augmentation de la masse musculaire proprement dite ; il s'agit principalement d'un processus de rétention d'eau par les tissus musculaires et sous-cutanés. La qualité de la viande s'en trouve amoindrie. On peut de plus penser que la présence de résidus de ces substances dans la viande est susceptible de présenter pour le consommateur un risque carcinogène et tératogène. De nombreux ATS, puissants et peu onéreux, sont aisément accessibles illégalement et peuvent être utilisés frauduleusement, quelque temps avant l'abattage, chez les animaux de boucherie.

1.2 La reproduction

La fonction de reproduction se met en place chez les mammifères au moment de la puberté. Les individus acquièrent durant cette période un format adulte sous l'action du système somatotrope (GH/IGF-I) et des stéroïdes anabolisants d'origine gonadique (androgènes et œstrogènes). C'est cette stature quasi adulte qui permet l'expression des comportements sexuels, la maturation des gamètes et, après fécondation, le déroulement de la gestation, de la mise-bas et de l'allaitement du ou des jeunes. Chez certaines espèces, le caractère saisonnier de l'activité sexuelle participe aux stratégies d'adaptation aux variations de la disponibilité alimentaire.

Les contrôles endocriniens des différentes phases caractérisant la fonction de reproduction sont nombreux mais peu sont réellement accessibles à une maîtrise zootechnique simple, ce qui conduit à utiliser les traitements hormonaux.

1.2.1 La fonction de reproduction

Chez le jeune impubère, l'absence de sécrétion pulsatile de GnRH (*gonadotropin releasing hormone*) explique le défaut de stimulation hormonale des gonades. Pendant la période pubertaire, la sécrétion pulsatile de la GnRH se met en place progressivement, induisant la sécrétion des gonadotropines (hormone lutéinisante, LH, et hormone folliculo-stimulante, FSH) qui stimulent les sécrétions de stéroïdes (testostérone, œstradiol). Enfin, le rétrocontrôle positif des gonadotropines par l'œstradiol, qui permet la décharge ovulante de LH, se met en place chez les femelles.

Chez les mâles, la spermatogenèse est régulée de façon complexe par des signaux endocrines et paracrines. Elle est stimulée par la LH et la FSH. La LH stimule la production de testostérone par les cellules de Leydig. Celle-ci diffuse vers les cellules de Sertoli qui possèdent des récepteurs à la FSH et à la testostérone et interviennent dans le contrôle de la spermatogenèse.

L'activité ovarienne se déroule de façon cyclique tant que l'ovulation n'est pas suivie de la fécondation. Le cycle œstrien correspond à la succession de la phase folliculaire où les follicules destinés à ovuler sont recrutés et sélectionnés, et de la phase lutéale qui couvre l'ovulation, la mise en place et la régression du corps jaune. Il est associé à une évolution parallèle et coordonnée de profils hormonaux qui reflètent le « dialogue endocrinien » entre ovaires et système nerveux central. Pendant la phase folliculaire, l'augmentation de la fréquence des pulses de LH aboutit à un pic de sécrétion folliculaire d'œstradiol, qui déclenche la décharge ovulante de gonadotropines qui marque le début de la phase lutéale. Durant la phase lutéale, le follicule ayant ovulé se transforme en corps jaune

qui sécrète de la progestérone qui inhibe la libération pulsatile de LH. En fin de phase lutéale, l'endomètre sécrète de la prostaglandine $F_{2\alpha}$ ($PgF_{2\alpha}$) qui induit la régression du corps jaune (lutéolyse), ce qui permet d'initier un nouveau cycle. Dans cette succession de phases physiologiques, plusieurs points peuvent être soumis à un contrôle endocrinien exogène.

Il existe chez les petits ruminants des variations saisonnières de l'activité sexuelle plus ou moins marquées selon les races. Ces variations sont contrôlées par la photopériode via la sécrétion de mélatonine par la glande pinéale selon un rythme jour/nuit bien défini. Les taux plasmatiques diurnes sont faibles, les taux nocturnes sont élevés. La mélatonine agit sur l'hypothalamus pour contrôler la fréquence de libération de GnRH, ce qui modifie la fréquence de libération de la LH et donc l'activité des gonades.

1.2.2 Utilisation des hormones pour la maîtrise de la reproduction : aspects généraux

La maîtrise de la reproduction vise à optimiser la productivité des troupeaux et mieux répondre aux exigences temporelles des marchés. Les traitements utilisés permettent :

- de programmer et synchroniser la période de mise-bas, pour s'ajuster aux disponibilités fourragères (ovins transhumants), au système d'élevage (équins et période administrative de monte) ou à la demande de la consommation (caprins laitiers), pour simplifier le travail de gestion du troupeau (regroupement des agnelages par exemple) et trouver ainsi un meilleur équilibre entre productivité, adaptation au marché et vie familiale ;
- de diminuer les périodes improductives liés aux anœstrus saisonniers chez les ovins et les caprins, à l'anœstrus postpartum chez les bovins ;
- d'optimiser la taille de la portée chez les espèces polytoques ;
- d'accélérer le progrès génétique, en particulier dans le cadre de l'insémination artificielle, qui, en limitant les mouvements d'animaux entre élevages, est en outre un des piliers de la politique sanitaire.

De nombreux traitements sont disponibles pour maîtriser la reproduction des mammifères domestiques et leur indication dépend de l'espèce considérée, de l'état physiologique et du type de production (Chemineau *et al.*, 1996). Les principales familles de molécules utilisées comprennent les stéroïdes, les hormones peptidiques gonadotropes, les prostaglandines et la mélatonine. Les traitements visent particulièrement à :

- contrôler l'expression des comportements sexuels (androgènes et œstrogènes);
- bloquer la sécrétion des hormones gonadotropes et donc l'ovulation (progestagènes, œstrogènes);
- réguler la croissance folliculaire et provoquer l'ovulation (œstrogènes, hormones gonadotropes);
- induire la lutéolyse pour réduire la durée de vie du corps jaune (œstrogènes, prostaglandines);
- dessaisonner l'activité sexuelle (mélatonine).

L'expression du comportement sexuel mâle chez les mammifères dépend en grande partie de la présence de stéroïdes gonadiques. La castration provoque une diminution jusqu'à, éventuellement, la disparition de l'activité sexuelle. À l'inverse, il est possible chez un animal castré ou hypogonadique de stimuler l'expression du comportement sexuel par une administration chronique de stéroïdes pendant plusieurs semaines. Chez les mâles de la plupart des espèces : cerf, bœuf, verrat, taureau, la testostérone peut être remplacée par l'œstradiol qui est efficace à des concentrations dix fois moindres alors que la 5α -dihydrotestostérone, le métabolite de la testostérone actif sur le tractus génital, est le plus souvent inefficace sur le comportement sexuel. Que le comportement soit stimulé par un traitement par la testostérone ou par l'œstradiol, l'effet dépend de la dose mais il existe une valeur « plateau » au-delà de laquelle aucun effet additionnel n'est obtenu.

L'administration en continu de progestagènes bloque l'ovulation qui ne pourra intervenir qu'à l'arrêt du traitement. Au niveau du système nerveux central, ils réduisent la fréquence des pulses de GnRH, ce qui entraîne une accumulation de FSH dans les cellules hypophysaires gonadotropes et inhibe la survenue d'un pic de LH. Ces effets nécessitent une imprégnation préalable du système nerveux par l'œstradiol. Par rétrocontrôle négatif de la sécrétion de FSH, l'œstradiol induit une régression folliculaire qui conduit à la naissance et à la croissance d'une nouvelle vague folliculaire. Utilisé en association avec des progestagènes, il permet ainsi d'éviter que ne persiste le follicule dominant comme lorsque les progestagènes sont utilisés seuls ou avec des prostaglandines, ce qui conduit alors à l'ovulation d'un ovocyte trop âgé et subfertile. Ces traitements combinés sont utilisés dans la synchronisation des chaleurs, mais aussi dans les traitements de superovulation réalisés pour la collecte et le transfert d'embryons.

Chez la vache, le traitement par l'œstradiol provoque une augmentation synchronisée de la sécrétion d'œstradiol endogène et du pic de LH déclenchant

l'ovulation d'un follicule nouvellement recruté. Ainsi, une dose faible d'œstradiol administrée après le retrait d'un progestagène réduit l'intervalle entre l'œstrus et l'ovulation et provoque l'ovulation chez des femelles préalablement en anœstrus.

La GnRH et les hormones glycoprotéiques gonadotropes d'origine hypophysaire (LH, FSH) ou placentaire (equine chorionic gonadotropin, eCG) permettent de mimer les événements endocriniens du cycle sexuel conduisant à l'induction de l'œstrus et de l'ovulation. On utilise des hormones de synthèse (GnRH et ses agonistes) ou des hormones natives extraites du plasma (eCG commercialisée sous les noms de Synchronpart PMSG[®] et Chronogest PMSG[®]) ou d'hypophyses (FSH, LH). Plusieurs laboratoires ont essayé de produire des hormones recombinantes (eCG, FSH), mais sans succès, les produits recombinants étant actifs *in vitro* mais pas *in vivo*.

PgF_{2α} et ses analogues induisent la lutéolyse, permettant ainsi la croissance terminale des follicules ovariens, ils sont utilisés le plus souvent en association avec un traitement progestatif. PgF_{2α} induit l'activité 20α-hydroxystéroïde déshydrogénase, considérée comme un marqueur de la lutéolyse, la transcription des caspases 1 et 3 qui interviennent dans l'apoptose, et la sécrétion d'endothéline qui inhiberait la production de progestérone. L'endothéline est un puissant vasoconstricteur, de même que l'angiotensine produite par le corps jaune sous stimulation par PgF_{2α}. Ces facteurs renforceraient l'action de PgF_{2α} sur la régression lutéale.

L'administration de mélatonine permet de mimer l'exposition à des jours courts. Administrée après au moins deux mois de jours longs, elle avance le début de la saison sexuelle de la brebis et augmente le taux d'ovulation, améliorant ainsi la prolificité. L'utilisation de la mélatonine peut également être combinée à des traitements lumineux pour induire une activité à contre-saison.

1.2.3 Contrôle hormonal de la venue en puberté

L'âge à la puberté dépend essentiellement de facteurs génétiques et environnementaux. Les restrictions alimentaires retardent l'âge à la puberté, même si le développement du système nerveux central et des gonades se poursuit. En pratique, la mise en place de l'aptitude des individus à se reproduire offre peu de prise à une manipulation hormonale.

1.2.4 Contrôle hormonal de la fonction de reproduction chez les mâles

Chez les animaux de rente, le contrôle hormonal de la production de sperme ne fait pas l'objet de recherches à visée appliquée. Celles-ci portent plutôt sur le contrôle de la maturation des spermatozoïdes dans l'épididyme et les modes de dilution et de conservation du sperme.

Même si l'administration de stéroïdes restaure le comportement sexuel chez les animaux castrés, elle est en général inefficace pour augmenter la libido d'animaux entiers peu actifs, ceux-ci présentant naturellement des teneurs plasmatiques de stéroïdes supérieures aux valeurs plateaux (cf. plus haut).

Chez la plupart des mammifères, il est possible d'induire artificiellement un comportement de type mâle chez les femelles par des traitements stéroïdiens similaires à ceux pratiqués pour restaurer le comportement sexuel chez les castrats (cf. plus haut). De tels traitements ont été utilisés chez les bovins ou les ovins pour aider à la détection de l'œstrus ou pour stimuler l'activité sexuelle de femelles en anœstrus. De telles femelles sont aussi efficaces que des mâles tout en étant plus faciles à manipuler.

1.2.5 Contrôle hormonal de la fonction de reproduction chez les femelles

La maîtrise hormonale des cycles a pour but principal de synchroniser les chaleurs et l'ovulation des individus d'une même population. Ceci est obtenu :

- en bloquant l'ovulation avec des progestagènes qui inhibent la décharge préovulatoire de GnRH à l'origine de la décharge ovulante de LH. Le recours à $\text{PgF}_{2\alpha}$ ou ses analogues qui induisent une régression du corps jaune permet de limiter la durée d'administration des progestagènes. On utilise de façon complémentaire les œstrogènes pour leurs propriétés lutéolytiques ou lutéotrophiques selon l'espèce et le stade du cycle considérés ;
- en déclenchant l'ovulation par l'administration d'hormones gonadotropes après arrêt du traitement bloquant l'ovulation.

Chez les **petits ruminants**, l'induction et la synchronisation hormonale des chaleurs et des ovulations associent un traitement progestagène sous forme d'éponge vaginale (Chronogest[®] et Synchropart[®]) afin de maîtriser la durée de la phase lutéale à une injection intramusculaire de l'hormone gonadotrope

eCG en fin de traitement pour obtenir une synchronisation de l'ovulation. Chez les femelles non cycliques, ce traitement progestagène-eCG permet l'expression d'un comportement d'œstrus accompagné d'ovulation(s) et le développement normal du ou des corps jaunes induits. Chez la chèvre, une faible dose de $\text{PgF}_{2\alpha}$ deux jours avant le retrait de l'éponge, associée à une réduction de la durée du traitement progestagène, améliore la fertilité.

La fertilité après l'œstrus induit est identique à celle obtenue après un œstrus naturel. Toutefois, certaines femelles soumises à plusieurs traitements successifs développent une réponse immunitaire anti-eCG qui entraîne un retard dans l'apparition de l'œstrus et du pic préovulatoire. Même si le moment de l'insémination artificielle (IA) est retardé, la fertilité reste normale.

En France, les éleveurs de brebis laitières sont les principaux utilisateurs des traitements hormonaux de contrôle de l'œstrus pour faciliter la mise en place de l'insémination artificielle dans un programme d'amélioration génétique de ces races : 50 % du cheptel laitier, soit 650 000 brebis, sont inséminées chaque année. La fertilité est de 65 % de mises bas après une seule insémination programmée après le retrait de l'éponge vaginale. Dans les races à viande, plus des deux tiers des brebis adultes « désaisonnées » d'avril à juillet sont mises en lutte après traitement hormonal, soit 15 % du cheptel de 5,3 millions de brebis. Dans le monde, on estime à 4 ou 5 millions le nombre de brebis mises en reproduction après traitement hormonal.

Chez les caprins laitiers, on observe depuis quelques années une utilisation accrue des traitements hormonaux pour déplacer la date de mise bas, et donc la production de lait, à une période favorable à la vente du lait ou des fromages. Environ 15 % du cheptel français qui compte 1 million de têtes est concerné.

Chez **les porcins**, les femelles reproductrices sont le plus souvent conduites en bandes, ce qui impose que les cochettes de renouvellement viennent en chaleur en même temps que les truies déjà présentes dans la bande. La synchronisation des chaleurs des cochettes pubères est obtenue par administration d'un progestagène (altrenogest, Régumate®) par voie orale pendant dix-huit jours. Le traitement, qui peut commencer à n'importe quel moment du cycle, empêche la croissance des follicules mais n'a aucune influence sur la durée de vie des corps jaunes. À l'arrêt du traitement, une phase folliculaire commence et 95 % des cochettes viennent en œstrus entre le 4^e et le 7^e jour post-traitement. Les œstrus induits sont plus fertiles que les naturels et aboutissent à une prolificité accrue grâce à une augmentation du taux d'ovulation alors que la survie foetale reste inchangée. 82 % des éleveurs français utilisent ce traitement pour introduire les cochettes dans les bandes. Ce traitement progestagène peut également être utilisé pour éviter les retards d'œstrus après le tarissement des truies.

Chez **les bovins**, la synchronisation des chaleurs est obtenue par administration simultanée d'un œstrogène et de progestagènes, soit injection intramusculaire de valérate d'œstradiol associée à un implant auriculaire de progestagène (norgestomet) ou capsules intravaginales de benzoate d'œstradiol avec une spirale en silastic imprégnée de progestérone. Ces traitements sont utilisés principalement dans les troupeaux de femelles allaitantes utilisant l'insémination artificielle à des fins d'amélioration génétique. Ils sont aussi pratiqués chez les génisses et, dans une moindre mesure, chez les vaches laitières en anœstrus.

Chez **les équins**, les traitements hormonaux peuvent être utilisés en complément de manipulations de la photopériode (cf. plus bas) pour avancer la reprise de l'activité ovarienne au printemps et mieux maîtriser le moment de l'ovulation quand la jument est cyclée. Deux types de traitements sont disponibles :

- la synchronisation des chaleurs, soit par des progestagènes associés ou non aux œstrogènes, administrés par voie orale (altrenogest) ou à l'aide de dispositifs intravaginaux (PRID®), soit par administration de PgF_{2α}. L'association des deux types de traitements en renforce l'efficacité. Il n'existe pas de données statistiques nationales sur l'utilisation de ces produits. En 2003, les haras nationaux ont synchronisés les chaleurs de 840 juments avec du Regumate® (altrenogest). La fertilité de fin de saison était de 78 % avec une moyenne de 1,7 cycles utilisés par jument ;
- l'induction de l'ovulation par injection intraveineuse d'hCG (Chorulon®) ou d'un analogue de la GnRH.. L'administration d'hCG, effectuée lorsque le follicule dominant atteint la taille préovulatoire, déclenche l'ovulation chez 75 à 85 % des juments. Associée au suivi ovarien par échographie transrectale, cette technique permet une programmation rationnelle des inséminations. L'administration répétée d'hCG entraîne la formation d'anticorps, associée à une baisse d'efficacité. Plusieurs injections d'analogues de la GnRH (buséreliné, Réceptal®) espacées de douze heures, à partir du moment où le follicule dominant atteint la taille préovulatoire, conduisent à un taux d'ovulation de 83 %. Un implant sous-cutané à libération de courte durée (deslorelin, Ovuplant®), administré quand le follicule dominant atteint 35 mm de diamètre, permet d'obtenir 90 % d'ovulations mais, du fait d'une libération trop prolongée, il induit une interruption de cyclicité de plusieurs mois.

1.2.6 Traitements hormonaux visant à dessaisonner la reproduction

La pose d'implants de mélatonine (Regulin®, Melovine®) permet de mimer l'exposition à des jours courts et de stimuler l'activité de reproduction des brebis

et des chèvres de la même façon que des jours courts, c'est-à-dire après une période de latence d'environ cinquante jours. La mélatonine, administrée après une période d'au moins deux mois de jours longs (jours longs naturellement croissants de printemps), avance le début de la saison sexuelle de la brebis. Chez les races originaires de l'Europe du Nord, ayant une saison de reproduction très marquée à partir de septembre, la mélatonine permet d'avancer de 1 à 1,5 mois le début de la saison sexuelle. Elle augmente aussi le taux d'ovulation et la prolificité. Chez les races « peu saisonnées » comme la Mérinos, ce traitement peut être appliqué avec succès pendant toute la période d'œstrus. L'utilisation de mélatonine peut également être combinée à celle de jours longs artificiels pour induire une activité à contre-saison. Le principe consiste à imposer une période minimale de deux mois de jours longs pendant l'hiver, suivie par un traitement par la mélatonine pendant le printemps, afin d'aboutir à une activité sexuelle en fin de printemps-début d'été. Ces mêmes traitements permettent d'avancer la puberté chez les jeunes béliers nés à l'automne et provoquent une reprise importante de l'activité spermatogénétique et la production d'une semence utilisable pour l'insémination artificielle chez les béliers adultes.

Chez la jument, qui présente un œstrus saisonnier entre les mois d'octobre et avril, on peut avancer la reprise de l'activité ovarienne au printemps par administration d'un traitement photopériodique. On applique alors des traitements de synchronisation et d'induction d'ovulation (cf. plus haut).

1.3 La production d'embryons

La production et le transfert d'embryons ne peuvent se réaliser sans une maîtrise efficace de la stimulation ovarienne et de la fécondation des espèces concernées. Cette technique appartient à l'ensemble des techniques de reproduction utilisées en élevage dans le cadre de l'amélioration génétique des cheptels. Elle permet une diffusion plus rapide des gènes des reproducteurs d'élite et garantit une protection sanitaire élevée. Son coût se raisonne dans un contexte économique concurrentiel où la plus-value obtenue par la production de géniteurs est importante : 95 % des taureaux laitiers mis en testage proviennent d'embryons transplantés.

La superovulation représente la première étape de la technique de production d'embryons *in vivo*. Elle est suivie de l'insémination des femelles donneuses, de la collecte des embryons et de leur transplantation chez des femelles receveuses dont l'œstrus a été préalablement synchronisé.

Chez **les bovins**, la superovulation est obtenue après un traitement à base d'hormones gonadotropes, FSH porcine (FollitropinND, StimufolND) ou ovine (OvagenND) de préférence à l'eCG. On obtient en moyenne 5,5 embryons

viables par collecte avec la pFSH. En France, environ 6 000 donneuses sont collectées chaque année et 30 000 embryons sont transplantés.

Le nombre d'ovulations obtenues après superovulation dépend à la fois du nombre de follicules stimulés susceptibles d'ovuler et du taux d'ovulation. Ces deux composantes sont très variables, dépendant à la fois de facteurs génétiques, zootechniques, physiologiques (liés à la donneuse) et des modalités de la superovulation. La présence d'un follicule dominant au début du traitement de superovulation diminue le nombre de follicules stimulés et par conséquent le nombre d'embryons collectés et viables. Il n'existe pas à l'heure actuelle de méthode économiquement acceptable permettant de pallier cette difficulté.

Les recherches actuelles visent à améliorer le taux d'ovulation via un meilleur contrôle du déclenchement du pic préovulatoire de LH. Les traitements utilisés associent progestagènes et FSH ou GnRH (Deslorelin®) et LH.

Chez **les ovins et caprins**, comme chez les bovins, le traitement de superovulation est mis en place directement à la fin du traitement progestatif et comprend six injections de pFSH réparties sur trois jours et administrées en doses décroissantes. L'ajout de pLH en concentrations constantes au cours du traitement ou en concentrations croissantes lors des deux dernières injections de pFSH contribue à améliorer l'efficacité des traitements. Comme chez les bovins, la variabilité de la réponse ovarienne est considérable, en partie à cause des différences dans le nombre et la taille des follicules présents sur l'ovaire au moment du traitement, la présence d'un ou de deux gros follicules dominants étant très préjudiciable.

Pour s'affranchir de cette difficulté, une première stratégie consiste à administrer de la GnRH ou un analogue, la buséreline (RéceptalND ou CystorélineND) en une injection unique afin d'induire de façon synchrone un pic de sécrétion des gonadotropines endogènes. Cette méthode donne des résultats très variables selon qu'un follicule dominant est présent ou non au moment de l'injection, tant chez les ovins que chez les caprins. Elle reste cependant la seule méthode possible utilisée pour la production de zygotes maturés *in vivo* dans le cadre de la transgénèse ou du clonage. La stratégie visant à éliminer les gros follicules « inhibiteurs » par un traitement long avec un agoniste ou un antagoniste (Antarélix, TeverelixND) de la GnRH afin de ne stimuler que les petits follicules au moment du traitement par FSH donne de bons résultats chez les ovins, mais pas chez les caprins.

L'efficacité des traitements hormonaux peut être altérée chez les ovins et les caprins par une réponse immunitaire humorale contre la pFSH. L'utilisation de FSH ovine permet de circonvier ce problème.

1.4 La production laitière

1.4.1 La fonction de lactation

Les différentes étapes de la mise en place et du maintien de la fonction mammaire sont sous étroit contrôle hormonal.

La mammogénèse dépend dans un premier temps des sécrétions hormonales durant les cycles ovariens. Durant la phase folliculaire, les œstrogènes favorisent la croissance des canaux mammaires. Durant la phase lutéale, la progestérone stimule la mise en place du système lobulo-alvéolaire, tout en inhibant la mise en place d'une activité sécrétoire. Ces actions s'amplifient ensuite durant la gestation, du fait de la sécrétion d'œstrogènes et de progestérone par l'unité fœto-placentaire. Le système lobulo-alvéolaire se développe rapidement à partir du sixième mois de gestation et se substitue progressivement au tissu adipeux mammaire.

La lactogénèse ou montée laiteuse est déclenchée par l'augmentation des œstrogènes et la chute brutale de la progestérone, qui entraînent des décharges de glucocorticoïdes, de prolactine et de GH. Les cellules épithéliales s'hypertrophient et acquièrent les structures spécifiques d'une activité sécrétoire intense

La galactopoïèse (entretien de la sécrétion lactée) dépend en premier lieu d'une vidange régulière du lait, permise par la sécrétion réflexe d'ocytocine par l'hypophyse. Par ailleurs, la prolactine, la GH, les glucocorticoïdes et l'insuline sont indispensables au bon fonctionnement des cellules sécrétrices de lait. Il semble toutefois que, chez les ruminants, seule la GH soit limitante pour maximiser le potentiel sécrétoire.

1.4.2 Stimulation de la production laitière par l'hormone de croissance : aspects généraux

La GH stimule l'activité sécrétoire et/ou la durée de vie des cellules mammaires. Elle exerce aussi des effets de type diabétogène qui augmentent la disponibilité en glucose pour la mamelle. L'animal mobilise dans un premier temps ses lipides corporels, puis, après quelques semaines, augmente son niveau d'ingestion pour adapter la fourniture des nutriments nécessaires à la mamelle et à la néoglucogénèse hépatique, puis au rétablissement des réserves corporelles (Chilliard *et al.*, 2001).

Les recherches sur les effets galactopoïétiques de la GH chez la vache laitière se sont très fortement intensifiées au cours des années 1980, du fait de

la production semi-industrielle de rbGH, puis de la mise au point de formes à action prolongée (rbGH retard) qui ont suscité de très nombreuses études de longue durée et sur de grands effectifs de vaches.

Dans l'Union européenne, l'utilisation de la rbGH en élevage laitier est interdite.

1.4.3 Effets de la GH sur les performances laitières

Avec des injections journalières de rbGH, la réponse varie de +2,8 à +5,6 kg de lait/j. L'injection de la forme retard de rbGH tous les 14 ou 28 jours donne des résultats inférieurs. Les résultats sont très variables entre troupeaux ou essais. La réponse très rapide de la production laitière (+4,5 kg/j) s'amenuise au cours du temps jusqu'à +2,5 kg/j après 30 semaines de traitement. Au total, la production laitière annuelle est accrue de 10 à 30 %.

La composition du lait ne varie pas en moyenne sur de longues périodes. Toutefois, dans le cas d'injections mensuelles, on assiste à une augmentation transitoire de la production laitière et du taux butyreux alors que le taux protéique diminue.

1.4.4 Conséquences sur la reproduction

Initiées avant la fécondation, les injections de GH dégradent clairement la fécondité et/ou la fertilité des animaux, tout particulièrement chez les primipares. Cet effet défavorable est lié essentiellement au déséquilibre du bilan énergétique de l'animal pendant les premières semaines de traitement, en cohérence avec les effets déjà connus de la sous-nutrition sur la fonction de reproduction. En revanche, un traitement initié après la fécondation n'a aucun effet sur la mortalité embryonnaire, le taux d'avortements ou le poids du veau à la naissance et n'induit pas de difficulté particulière au vêlage suivant.

1.4.5 Conséquences sur l'état sanitaire des animaux

Les vaches traitées à la GH présentent une légère tendance à l'acidose et à une baisse de l'albuminémie, comme chez toutes les vaches hautes productrices mobilisant leurs réserves corporelles. Il n'y a pas de déviations métaboliques marquées (acétonémie, stéatose hépatique, fièvre vitulaire). Le traitement par la GH ne semble pas augmenter la fréquence des pathologies infectieuses, mais les mammites sont plus fréquentes et le nombre de cellules somatiques du lait plus élevé. Les études, peu nombreuses, sur les effets à long terme du traitement

par la GH, ne rapportent pas de modification du taux de réforme des animaux, mais il y a davantage de problèmes de boiteries.

1.4.6 Conséquences sur l'aptitude du lait à la transformation et à la consommation

Les modifications de la composition du lait déjà mentionnées n'altèrent que faiblement et temporairement l'aptitude du lait à la transformation et n'ont aucun effet sur les qualités organoleptiques des produits transformés. À différentes reprises au début des années 1990, diverses organisations gouvernementales américaines, auxquelles se sont jointes des organisations mondiales (FAO, OMS), ont conclu à l'innocuité vis-à-vis des consommateurs des produits laitiers provenant de vaches traitées par la rbGH. Par ailleurs, les risques d'augmentation de pathologies liées à des infections virales latentes, comme le suggèrent certaines observations *in vitro*, ne seraient pas nuls (Chilliard *et al.*, 2001).

1.4.7 Éléments de conclusion

L'utilisation de la GH pour stimuler la production laitière est efficace et sans problèmes majeurs sur des animaux sains et indemnes d'infections latentes, correctement alimentés, ne recevant pas de traitements médicamenteux, et si le traitement débute après la fécondation. Le traitement des vaches primipares demande une attention particulière sur les plans nutritionnels et de la reproduction. Deux points demandent encore des vérifications : l'effet éventuel de la GH sur la vitesse d'élimination des xénobiotiques par le foie, et ses effets éventuels sur le réveil d'infections latentes par des virus ou autres agents infectieux pathogènes. De plus, il n'existe pas à ce jour de méthode utilisable en pratique pour tracer les produits laitiers provenant d'animaux ayant reçu de la GH.

Le risque technique est apparu suffisamment faible aux autorités américaines pour autoriser dès 1993 l'utilisation commerciale de la rbGH aux États-Unis. Cette autorisation n'a pas été accordée dans l'Union européenne pour plusieurs raisons socio-économiques. Dans un système avec quotas laitiers, la rentabilité de l'utilisation de la rbGH est limitée. Dans un contexte de libre production, elle accélérerait la disparition d'une partie des éleveurs, favorisant ainsi la désertification de certaines zones rurales. Elle dégraderait l'image positive des produits laitiers dans l'esprit des consommateurs, dans un contexte général d'inquiétude devant « l'artificialisation » de l'agriculture. En cas de libéralisation complète des échanges mondiaux, les pays utilisant le traitement hormonal pour produire du lait à moindre coût bénéficieraient toutefois d'un avantage significatif dans leur compétition avec les producteurs européens.

1.5 La croissance et la reproduction des poissons

Une grande partie des espèces de poissons faisant aujourd'hui l'objet d'une production intensive ne se reproduisent pas spontanément en captivité. Dans des situations de blocage, les traitements hormonaux permettent d'assurer des conditions de reproduction compatibles avec la pratique d'une aquaculture commerciale (Zohar et Mylonas, 2001).

L'obtention naturelle de gamètes est possible pour les espèces de poissons représentant aujourd'hui la majorité de la production piscicole mondiale (cyprinidés, salmonidés, tilapias) mais seulement dans un environnement optimal, ce qui n'est pas toujours assuré. Par ailleurs, la diversification de la production piscicole conduit à mettre en élevage de nouvelles espèces dont la reproduction n'est pas obtenue spontanément. Enfin, les schémas d'amélioration génétique tendent à privilégier une reproduction sous contrôle d'individus sélectionnés et la fécondation *in vitro* (Fostier et Chevassus, 1991).

Les traitements hormonaux peuvent aussi être utilisés pour obtenir des populations monosexes ou stimuler la croissance des poissons.

1.5.1 Contrôle hormonal de la reproduction

Les traitements hormonaux sont essentiellement utilisés pour l'induction de ponte : ovulation chez la femelle et spermiation chez le mâle (Jalabert *et al.*, 1999).

Les traitements à base d'extraits bruts d'hypophyses tendent à disparaître au profit d'extraits plus ou moins purifiés, mais la relative spécificité des gonadotropines chez les poissons ainsi que leur coût limitent leur champ d'application. Plusieurs espèces répondent de manière satisfaisante à l'hCG qui, cependant, peut devenir inefficace chez des animaux traités à plusieurs reprises en raison des anticorps produits.

D'une manière générale, les traitements par des stéroïdes ne font pas l'objet d'applications à grande échelle en raison de résultats hétérogènes ou de protocoles délicats à mettre en œuvre.

La GnRH ou ses analogues sont les hormones actuellement les plus utilisées pour induire la maturation sexuelle car elles sont faciles à obtenir par synthèse et donc de coût relativement faible, et peuvent être utilisées très largement car la structure des GnRH varie peu d'une espèce à l'autre. Ces traitements sont administrés par injection intrapéritonéale, parfois en association à un inhibiteur de

la dopamine. En effet, la dopamine hypothalamique bloque la sécrétion d'hormone gonadotrope chez certaines espèces. Des implants capables de délivrer des GnRH sur des périodes de plusieurs semaines ont été développés.

D'un point de vue pratique, des préparations pharmaceutiques vétérinaires associant GnRH et anti-dopamine sont disponibles et couramment utilisées. Par ailleurs, un analogue de la GnRH, le Gonazon[®], vient d'être mis sur le marché européen avec, à notre connaissance, la seule autorisation officielle disponible pour l'utilisation de ce type de produit chez les poissons.

1.5.2 Utilisation des hormones pour le sexage

Il est parfois intéressant d'utiliser des populations monosexes quand l'un des sexes présente des caractéristiques de croissance plus favorables. Une méthode directe de contrôle du sexe consiste à exposer les alevins à des stéroïdes sexuels, œstrogènes ou androgènes. Les stéroïdes sont généralement administrés dans l'aliment mais des traitements par balnéation peuvent aussi être efficaces. Dans le cas d'espèces à déterminisme XX/XY comme les salmonidés, on peut aussi opérer une inversion sexuelle hormonale de femelles en mâles par administration de 17α -méthyltestostérone dans l'aliment. Ces néomâles, qui sont des femelles génétiques (XX), ont une descendance monosexue femelle. Plus lourd que la méthode directe, ce procédé donne de meilleurs résultats et évite que les poissons destinés à la consommation soit exposés à des traitements hormonaux. La 17α -méthyltestostérone est autorisée en Europe pour cette seule application.

1.5.3 Contrôle hormonal de la croissance

Les androgènes, les hormones thyroïdiennes et l'hormone de croissance ont des effets anabolisants chez les poissons, améliorant la croissance et l'efficacité alimentaire. Les androgènes, en particulier la 17α -méthyltestostérone, sont plus actifs chez le poisson que chez les mammifères. La GH mammalienne ou de poisson a des effets particulièrement nets chez les téléostéens comme les salmonidés et les cyprinidés (McLean et Devlin, 2000). Elle est généralement administrée par injection ou sous forme d'implants, mais son absorption intestinale pourrait être suffisante pour envisager une administration par voie orale. La GH peut aussi avoir un effet favorable sur la smoltification, phénomène spécifique aux salmonidés migrateurs lors du passage des juvéniles de l'eau douce à l'eau de mer. Le recours à ces anabolisants en élevage reste interdit dans les pays de l'Union européenne.

2 | L'évaluation et la gestion des risques toxicologiques éventuels liés à l'utilisation des hormones en élevage

L'éventail des traitements hormonaux présenté dans la première partie est large et leur complexité variable. Il peut s'agir d'un traitement ponctuel (injection de prostaglandines), d'un traitement limité dans le temps (implant ou spirale de progestagène), d'un traitement chronique sur plusieurs semaines ou plusieurs mois employant une ou plusieurs substances comme dans le cas des traitements anabolisants ou, enfin, d'un ensemble de traitements intégrés dans une séquence précise destinée à maîtriser plusieurs « fenêtres » physiologiques successives comme c'est le cas dans les traitements de superovulation et de production d'embryons. Pour toutes ces hormones, une évaluation toxicologique est réalisée avant toute mise sur le marché, afin d'en garantir l'innocuité pour le consommateur eu égard à la présence possible de résidus de ces substances ou de leurs métabolites dans les produits animaux. Dans le cas des petites molécules, une expertise toxicologique approfondie est conduite, semblable à celle réalisée pour les médicaments. Pour les hormones peptidiques, compte tenu de leur taille et de leur dégradation quasi complète au cours de la digestion, l'évaluation toxicologique ne peut être réalisée suivant les mêmes règles. Seule leur détection dans les matrices biologiques (excréta, tissus) est réalisée. Le contrôle de leur utilisation peut néanmoins s'appuyer sur des observations indirectes.

2.1 L'évaluation toxicologique des substances utilisées

2.1.1 Les petites molécules

Les règles de l'expertise toxicologique

Ces règles ont été clairement définies au niveau du JECFA, un comité mixte d'experts de la FAO et de l'OMS qui, deux fois par an, statue en matière de résidus d'additifs alimentaires ou de médicaments vétérinaires, de contaminants ou de substances toxiques d'origine naturelle dans les aliments. En ce qui concerne les molécules à évaluer, elles intègrent des **données analytiques**, les concentrations résiduelles du composé parent ou ses métabolites dans les produits animaux consommés, des **données métaboliques**, à savoir les voies de biotransformation du composé parent et l'identification des principaux métabolites présents dans les tissus cibles, ceux destinés à la consommation, ces métabolites comptant pour plus de 10 % de l'ensemble des résidus mesurés quantitativement, par radiométrie le plus souvent. Ces règles intègrent aussi les **données de toxicité**

acquises sur plusieurs espèces animales (murines ou canines, primates, etc.) qui ont été exposées à un traitement aigu ou chronique du composé parent, si nécessaire d'un de ses métabolites majeurs, et qui ont trait à la caractérisation des impacts évalués en matière de toxicologie de la reproduction, de tératogénicité, d'immunotoxicité et d'allergénicité, de génotoxicité, de cancérogénicité et de neurotoxicité. Dans un deuxième temps, l'expertise conduite sur les hormones intègre des données propres aux populations susceptibles d'être exposées par voie alimentaire afin de définir les facteurs de sécurité à appliquer, un facteur 100 ou 1 000 le plus souvent, et déterminer, à partir des données de toxicité acquises chez l'espèce la plus sensible, les valeurs dites sans effet (en anglais : « no observed effect level » ou NOEL) et donc une dose journalière admissible (DJA ou en anglais ADI pour « admissible daily intake »). Des simulations d'exposition fondées sur une consommation journalière de résidus du composé parent ou du métabolite le plus abondant³ qui sont présents dans une ration-type⁴ permettent ensuite de définir des limites maximales en résidus (LMR) dans les tissus consommables et, par voie de conséquence, les délais d'attente nécessaires, c'est-à-dire les périodes sans traitement (en anglais « withdrawal period »), pour que les animaux présentent des valeurs résiduelles tissulaires inférieures aux LMR définies plus haut (Arnold, 2004).

Pour les composés ayant une activité hormonale, cette démarche s'appuie sur une hypothèse forte : les experts toxicologues considèrent que les effets hormonaux n'apparaissent qu'à partir d'un certain seuil en deçà duquel aucun effet biologique n'existe réellement. C'est sur cette hypothèse admise par de nombreux experts que les autorités américaines ou des instances internationales comme le JECFA se fondent depuis près de vingt-cinq ans pour garantir, après expertise, l'innocuité des résidus d'hormones retrouvés dans les tissus consommés. Ce point de vue concernant les effets de seuil des hormones stéroïdiennes n'est cependant pas partagé par toute la communauté scientifique (Sheehan, 2006).

Les œstrogènes

Ces composés hormonaux, qu'ils soient naturels comme l'œstradiol ou de synthèse comme l'éthinyl-œstradiol, le diéthylstilbestrol, l'hexestrol ou le zéranol,

³Les données de toxicité pour le métabolite majeur et représentant plus de 10 % des résidus du tissu cible doivent être disponibles s'il est utilisé comme résidu « marqueur ». Le plus souvent, c'est le composé parent qui est pris comme résidu marqueur.

⁴La ration-type est définie pour un consommateur standard de 60 kg ingérant quotidiennement une ration qui comprend du muscle (300 g), du foie (100 g), du rein (50 g), du gras (50 g) et le cas échéant des œufs (100 g) et du lait (1,5 l). Les facteurs de sécurité qui permettent de diviser la valeur de NOEL sont justifiés par la faible taille de l'échantillon-test définissant la valeur de NOEL, la variabilité interindividuelle, en particulier si on considère la fraction de la population pouvant être la plus sensible, et la variabilité interspèce.

agissent à de faibles concentrations (5-100 ppt) en comparaison des autres stéroïdes (ppb). Seuls l'œstradiol et le zéranol peuvent être utilisés comme œstrogènes dans des implants d'anabolisants, là où leur autorisation est effective, c'est-à-dire en dehors de l'Union européenne et de plusieurs pays d'Amérique latine. L'autorisation dans l'Union de l'utilisation de l'œstradiol pour la maîtrise de la reproduction prend fin en octobre 2006.

En ce qui concerne l'œstradiol, les données de métabolisme chez les ruminants, en particulier les bovins, qui ont été obtenues au cours de ces vingt-cinq dernières années sont maintenant bien consolidées. Il n'existe pas chez les bovins implantés avec des préparations contenant de l'œstradiol d'étape d'hydroxylation du noyau stéroïdique, que ce soit en position 2 ou 4 pour former des catéchols œstrogènes, ou en position 6β ou 16α . La principale voie d'inactivation de la molécule est l'oxydation en œstrone par l'activité 17β -hydroxystéroïde-déshydrogénase puis l' α -réduction de la cétone en position 17 en œstradiol- 17α . Cette dernière étape métabolique a lieu chez les ruminants essentiellement au niveau des érythrocytes. Secondairement, l'œstradiol et l'œstradiol- 17α peuvent subir une conjugaison à l'acide glucuronique en position 3, seule ou doublée d'une conjugaison à un glycoside (glucose, rhamnose ou xylose) de la fonction alcool en position 17.

Une famille de métabolites de l'œstradiol importante au plan de l'évaluation toxicologique est constituée par les esters d'acides gras à longue chaîne qui sont biosynthésés par l'activité acyl-coenzyme A : œstradiol-acyltransférase. Ces esters en position 17 forment une classe particulière de pro-œstrogènes ; l'acylation protège l'œstradiol du métabolisme et en permet le transport via les lipoprotéines jusqu'aux tissus cibles. La forme hormonale active est obtenue après hydrolyse des esters par les estérases. La proportion d'esters est la plus importante dans le tissu adipeux, l'oléate étant le dérivé majeur de cette classe d'œstrogènes suivi par les dérivés saturés (palmitate, stéarate). Ces dérivés sont aussi retrouvés dans le foie, le muscle et le rein. Une part significative de l'œstradiol-17-palmitate est absorbée de façon inchangée au niveau de la barrière intestinale et se retrouve dans la circulation lymphatique, ce qui lui permet d'échapper à la dégradation métabolique hépatique mais pose de ce fait un certain nombre de questions sur les évaluations du potentiel hormonal résiduel des tissus destinés à la consommation provenant d'animaux traités avec des implants d'anabolisants à base d'œstradiol, les résidus d'esters étant mesurés à des teneurs significatives (10-30 ppt) (Maume *et al.*, 2003). Dans le test utéro-trophique réalisé sur rates juvéniles, le potentiel hormonal de l'œstradiol-17-stéarate administré par voie orale est environ dix fois celui de l'œstradiol (Paris *et al.*, 2001).

Les estimations de teneurs résiduelles tissulaires en œstradiol, œstradiol- 17α , œstrone et leurs conjugués ont fait l'objet d'innombrables travaux, les plus

aboutis étant ceux obtenus récemment par Maume *et al.* (2003) par spectrométrie de masse à haute résolution couplée à la chromatographie en phase gazeuse. Ce dosage atteint les mêmes sensibilités que les dosages conventionnels effectués par radio-immunologie (RIA). Une stratégie d'extraction et de purification adaptée a permis de réaliser le dosage simultané de l'œstradiol et de l'œstradiol-17 α dans les différentes classes de métabolites. Les concentrations tissulaires résiduelles en œstradiol libre et conjugué sont en moyenne inférieures à 10-15 pg/g de tissu chez les animaux non traités, peu de différence existant entre les différents tissus (tableau 6.1), une augmentation nette des teneurs résiduelles apparaissant chez les animaux traités : entre 30 et 50 pg/g. Chez ces animaux implantés, les teneurs en œstrone sont du même ordre de grandeur que celles en œstradiol, quel que soit le tissu analysé. Celles en esters d'œstradiol sont aussi comparables à celles en œstradiol mais ne sont mesurées que dans le foie et le tissu adipeux. Le traitement par implant entraîne une grande variabilité dans les résidus tissulaires. L'œstradiol-17 α , le résidu majeur retrouvé dans le foie, présente des concentrations très variables qui oscillent entre 0,22 et 4,16 ng/g. Ce composé présente une activité faible de liaison aux récepteurs aux œstrogènes mais peut subir les mêmes étapes d'hydroxylation que l'œstradiol ou l'œstrone, notamment celles qui les transforment en catéchols.

La recherche de résidus de catéchol œstrogènes, libres, transformés en dérivés O-méthylés ou conjugués à l'acide glucuronique ou au glutathion, a représenté un enjeu important dans l'expertise toxicologique de l'œstradiol. En effet, ces dérivés catéchol sont auto-oxydables et peuvent former secondairement des adduits aux macromolécules, en particulier l'ADN. Sur modèle animal, en particulier le hamster doré de Syrie, les dérivés 4-hydroxylés sont fortement mutagènes au contraire des 2-catéchols (Cavalieri *et al.*, 1997 ; Liehr, 2000). Compte tenu de la faible stabilité de ces composés, c'est au travers de la capacité de formation des catéchols chez le consommateur, en particulier à partir de l'œstradiol-17 α ingéré, qu'il faut envisager l'évaluation du risque toxicologique que représentent ces résidus, au-delà des seules propriétés hormonales retenues par les instances internationales d'évaluation comme le comité joint d'experts de la FAO et de l'OMS (rapports JECFA 1987 et JECFA 1999, SCVPH 2002).

Longtemps utilisé comme anabolisant, le diéthylstilbestrol (DES) est interdit, du fait des risques toxiques importants que cette molécule présente. Ils sont en partie expliqués par ses propriétés métaboliques, en particulier la capacité à former des dérivés catéchols qui sont à l'origine de la formation d'adduits à l'ADN et *in fine* de mutations.

Le zéranol est une molécule d'hémisynthèse utilisée comme anabolisant, seule ou associée à des androgènes. Les résidus sont retrouvés majoritairement dans le foie : entre 0,3 et 1,2 ppb. Les métabolites majeurs du zéranol correspondent à des produits d'oxydoréduction excrétés sous forme de conjugués glucuronide

ou sulfate. Des produits issus d'une oxydation par des cytochromes P-450 ont été détectés mais non identifiés. Les tests de génotoxicité du zéranol sont négatifs. *In vitro*, cette molécule présente des propriétés de disruption endocrinienne significative pour certains gènes qui ne recoupent que partiellement les effets induits par l'œstradiol (Leffers *et al.*, 2001).

Les androgènes

La testostérone est utilisée dans des implants d'anabolisants. Le métabolite majeur chez les bovins est l'épitéstostérone. Un produit de réduction sur le cycle A en position 5β a aussi été repéré. Les connaissances en matière de métabolisme de cette molécule chez les ruminants restent faibles, l'essentiel des efforts ayant été développé sur les stéroïdes de synthèse, en particulier ceux prohibés. Tous ces efforts organisés autour du contrôle et de la détection de fraudes reposent sur l'utilisation de méthodes spectrophysiques extrêmement sensibles telles que la spectrométrie de masse multidimensionnelle, à haute résolution ou isotopique.

Les teneurs en testostérone sont inférieures à 0,2 ppb dans le foie des animaux implantés (tableau 6.1). Elles sont comparables dans le muscle. Aucune donnée quantitative sur les résidus de métabolites de la testostérone et leurs conjugués présents dans les tissus n'a été publiée.

L'acétate de trenbolone, un androgène de synthèse sous forme ester, est métabolisé chez les bovins suivant le même schéma que l'œstradiol ou la testostérone, une oxydation de la fonction alcool en 17β de la trenbolone pour donner la triendione, puis une réduction en 17α pour donner la trenbolone- 17α , résidu majeur retrouvé dans le foie des animaux implantés. Les autres métabolites pouvant attester des propriétés électrophiles de la molécule ou de ses dérivés hydroxylés n'ont pas été identifiés formellement.

Les résidus en trenbolone dans le foie d'animaux implantés varient entre 0,18 et 0,76 ppb, en fonction du temps de relargage de l'implant. Celles mesurées dans le muscle oscillent entre 0,18 et 0,28 ppb (tableau 6.1).

Les tests de génotoxicité effectués sur la trenbolone sont globalement négatifs (Metzler et Pfeiffer, 2001). Néanmoins le lien entre métabolisation et augmentation de la quantité d'adduits formés sur l'ADN n'a pu être établi, encore moins la caractérisation structurale de ces adduits.

Molécules	Application zooteknique/ phase physiologique	Résidus tissulaires (en pg/g ou en ng/g) ¹				
		Résidus majeurs	Foie	Rein	Muscle	Tissu adipeux
Œstradiol	Veaux, génisses, bouvillons témoins ²	Œstradiol	11 (5-53) ³	2 (8-70)	5 (3-35)	(5-50)
		Œstradiol-17 α Œstradiol-esters Œstrone	0-5 15 20 (170-198) ⁵	5-10 (23-166)	ND ND 6	ND ND 23
Œstradiol	Veaux, génisses, bouvillons implantés	Œstradiol	50 (5-1650) ³	47 (6,4-589)	25 (11-280)	40 (9,3-358)
		Œstradiol-17 α Œstradiol-esters Œstrone	220 (294-4158) 20-25 57 (73-284)	133 2-5 (34-144)	ND ND (3-72)	1-3 35 (29-149)
Œstradiol	Vache : - phase folliculaire - phase lutéale	Œstradiol Œstrone	23	13,5	30,8	11 28,4
		Œstradiol Œstrone	14,3	15,1	18,9	8 25,9
Œstradiol	Vache en gestion : - 120 jours - 240 jours	Œstradiol Œstrone	13,3 18,2	82,5 85,3	118 156	48,1 1283
		Œstradiol Œstrone	32,7 145	1027 142	274 523	67,5 2786

Tableau 6.1
Concentrations résiduelles tissulaires des différentes hormones et composés apparentés de faible poids moléculaire utilisés comme anabolisants (d'après Paris et al., 2006).

Molécules	Application zootechnique/ phase physiologique	Résidus tissulaires (en pg/g ou en ng/g) ¹				
		Résidus majeurs	Foie	Rein	Muscle	Tissu adipeux
Zéranol	Vaches, veaux, bouvillons implantés	Zéranol	0,35-1,21	0,08-0,22	0,01-0,73	0,06-0,22
			0,016-0,196	0,228-0,588	0,031-0,360	0,032-1,258
Testostérone	Taureau		0,75	2,78	0,54	10,95
			0,05 0,27	1,51 4,01	0,27 0,42	0,59 0,69
Trenbolone	Bouvillons implantés	Testostérone	0,19-0,76 0,80-4,02	0,13-0,39 0,12-0,18	0,18-0,28 0,01-0,02	0,26-0,85 0,03-0,06
		Trenbolone Trenbolone-17 α	0,16-0,92	0,11-2,80	0,23-0,77	3,20-8,66
Progesterone	Bouvillons, veaux implantés	Progesterone	3,4	6,2	10,1	239,0
		Vache en gestation				

¹ Les teneurs en résiduels sont exprimées en pg/g (ppb) pour les œstrogènes et en ng/g (ppt) pour les autres molécules.

² Valeurs de résidus d'œstrogènes libres et conjugués.

³ Entre parenthèses, les valeurs minimales et maximales.

Tableau 6.1
Suite.

Les progestagènes

Cette famille de composés est essentiellement utilisée dans les techniques de maîtrise de la reproduction. Les produits utilisés sont la progestérone, le norgestomet, l'acétate de fluorogestone (FGA), l'acétate de mélangestrol (MGA), l'acétate de médroxyprogestérone (MPA), l'altrenogest (Regumate®). Certains de ces composés tels la progestérone et le MGA peuvent aussi être utilisés comme anabolisants.

Pour la plupart de ces composés, le foie est considéré comme le tissu cible au plan du métabolisme, c'est-à-dire celui qui accumule le plus de résidus après traitement. Cependant, compte tenu de leur faible polarité, le tissu adipeux stocke aussi une quantité significative de résidus de ces molécules qui peut être supérieure à celle retrouvée dans le foie.

La progestérone est le composé dont le métabolisme est le mieux connu. Dans le foie de bovins, les métabolites identifiés correspondent à des dérivés réduits sur le cycle A (3α , 5β) et/ou sur la cétone en position 20, hydroxylés et conjugués à l'acide glucuronique. Les résidus hépatiques de progestérone, implantée en association avec du benzoate d'œstradiol chez des jeunes bovins, varient entre 0,16 et 0,92 ppb. Des teneurs comparables sont retrouvées dans le muscle ; elles sont près de dix fois inférieures à celles retrouvées dans le tissu adipeux (tableau 6.1). En comparaison, les concentrations tissulaires retrouvées chez la vache gravide sont très nettement supérieures.

Les connaissances en matière de métabolisme d'autres composés ont pu être réactualisées du fait de réévaluations toxicologiques conduites récemment. Cependant, l'accès à cette information extrêmement utile n'est guère possible puisque ces données ne sont pas publiées. Seuls des résumés de rapports d'expertise disponibles auprès de l'EMA, l'agence européenne d'évaluation des médicaments, permettent d'avoir des indications en matière de métabolisme. Pour les autres molécules n'ayant pas été réexaminées, les données anciennes n'ont pas été complétées.

Pour le norgestomet, la modification de la chaîne en 17β , l'élimination du groupe acétyle en 17α ou la réduction de la cétone en position 20 ont été décrites dans l'espèce bovine.

Pour le MGA, les résidus se stockent préférentiellement dans le tissu adipeux. De nombreux métabolites hydroxylés ont été repérés dans le foie de bovins. Ils peuvent être formés à partir de fractions subcellulaires hépatiques mais aucun n'a été formellement identifié. La formation de composés hydroxylés à partir du FGA par des hépatocytes de moutons est aussi signalée mais les identifications

structurales manquent. Les données concernant le métabolisme du MPA sont encore plus fragmentaires.

Pour l'altrenogest, des conjugués à l'acide glucuronique ou au glutathion ont été décrits chez les espèces porcine et équine. Sept et quatorze jours après arrêt du traitement, la majorité des résidus hépatiques se retrouve sous forme de métabolites liés, c'est-à-dire de composés non extractibles qui ont perdu vraisemblablement et de façon irréversible, toute propriété hormonale, point qui reste mal étayé au plan expérimental.

Pour l'ensemble des progestagènes autorisées sur le marché qui sont décrites ci-dessus, aucune ne présente de caractère génotoxique ou tératogène. Aucune propriété carcinogène n'a été suspectée au vu de leurs caractéristiques métaboliques. Pour le norgestomet, le FGA, le MGA et l'altrenogest, les teneurs résiduelles retrouvées dans les carcasses doivent être inférieures aux LMR : celles-ci varient entre 0,2 et 1 ppb. Pour le MPA, aucune LMR n'a été définie réglementairement.

Les corticostéroïdes

Certains corticostéroïdes peuvent être utilisés frauduleusement comme possibles promoteurs de croissance. Certains composés utilisés en thérapeutique vétérinaire comme anti-inflammatoires ont néanmoins reçu une autorisation de commercialisation. Ce sont par exemple la bétaméthasone, la dexaméthasone, la méthylprednisolone ou la prednisolone pour lesquelles les LMR varient entre 0,75 et 10 ppb.

Les étapes de métabolisation des glucocorticostéroïdes naturels impliquent une oxydo-réduction en position 11. À ceci s'ajoutent les étapes conduisant à une réduction des cétones en position 3 et 20 et de la double liaison entre les carbones 4 et 5 ou d'une hydroxylation en 6β . Cette dernière étape est plus fréquemment retrouvée pour les corticostéroïdes de synthèse. La conjugaison à l'acide glucuronique semble prépondérante chez les bovins. Toutefois, la position de conjugaison ne semble pas avoir été déterminée précisément.

Comme pour les androgènes de synthèse, un arsenal de méthodes analytiques très sensibles, qui permettent une détection de l'ordre de la dizaine de ppt, a été progressivement élaboré pour traquer, à partir de matrices urinaires et tissulaires, les utilisations frauduleuses, certaines pouvant être détectées très longtemps après leur utilisation effective. Les méthodes les plus en pointe utilisent la spectrométrie de masse couplée à la chromatographie liquide et mettent en œuvre plusieurs modes d'ionisation. La détection en mode négatif semble

la plus appropriée pour réaliser des analyses multirésidus des composés sous forme native, conjuguée ou estérifiée.

Les prostaglandines

Plusieurs prostaglandines telles que la $\text{Pgf}_{2\alpha}$, le cloprostenol, l'alfaprostol, le tiaprost, le 17-phényl-trinor PGE_2 , le fluprostenol ou le fenprostalene sont utilisées dans un cadre réglementaire pour la maîtrise du cycle ovarien. Les analogues substitués de $\text{Pgf}_{2\alpha}$ sont métabolisés plus lentement que $\text{Pgf}_{2\alpha}$ et sont donc éliminés moins rapidement que la forme naturelle. Néanmoins, tous ces composés présentent des demi-vies faibles ou relativement faibles. Ils sont éliminés quasi complètement par voies urinaire ou fécale.

Aussi les teneurs résiduelles sont-elles négligeables dans le muscle et le tissu adipeux 24 h après administration et inférieures aux limites de détection des méthodes utilisées. Les résidus retrouvés dans le foie et le rein varient entre 0,1 et 2-3 ppb suivant les substances considérées.

Ces substances ne sont pas génotoxiques, ni tératogènes, ni immunotoxiques. Elles ne présentent pas de risque pour la reproduction, hormis les propriétés abortives qui sont à la base de certaines de leurs indications en médecine vétérinaire et nécessitent des précautions d'emploi (interdiction de manipulation sans protection par les femmes enceintes) et les propriétés bronchoconstrictives qui conduisent à en interdire aussi la manipulation sans protection par les sujets asthmatiques ou insuffisants respiratoires.

Les β -agonistes

Bien que mimant les actions de l'adrénaline ou de la noradrénaline, ces molécules synthétiques n'en subissent pas les étapes, rapides, de dégradation. En effet, les β -agonistes ne possèdent pas la structure catéchol propice à une prise en charge par la catéchol-O-méthyltransférase (COMT) ni la fonction amine primaire de la chaîne latérale, laquelle, transformée par substitution en amine secondaire avec un encombrement stérique conséquent, protège de fait la molécule d'une transformation par l'activité monoamine oxydase (MAO). Aussi, les principales étapes de métabolisation de ces composés sont la glucurono- ou la sulfoconjugaïson. La plupart des molécules de cette famille sont utilisées frauduleusement, sauf la ractopamine et le zilpatérol, utilisés comme promoteurs de croissance hors de l'Union européenne et pour lesquelles peu de données de biotransformation sont disponibles.

En revanche, le métabolisme du clenbutérol, principale molécule utilisée frauduleusement, a été étudié de façon poussée chez le rat et le taurillon. Les étapes principales de biotransformation sont l'oxydation de la fonction amine primaire présente sur le cycle en hydroxylamine, en équilibre chimique avec le nitroso- et le nitro-clenbutérol (Zalko *et al.*, 1997), la formation d'un conjugué N-sulfate éliminé par voie fécale, et l'oxydation de la chaîne latérale dont les produits peuvent être secondairement conjugués à la glycine. Ces dérivés modifiés sur la chaîne latérale ne présentent pas d'activité biologique au contraire de l'hydroxylamine qui conserverait une activité β -agoniste équivalente à celle du clenbutérol en plus d'être susceptible de former des adduits aux macromolécules du fait de sa réactivité chimique.

Le contrôle de l'utilisation frauduleuse de ces composés, totalement interdits dans l'Union européenne, fait suite à des intoxications de consommateurs liées à la présence de résidus de ces composés dans les produits animaux. Des symptômes tels que tachycardie, crampes musculaires ou tremblements évoquaient les propriétés de composés se liant aux récepteurs adrénergiques. Ce contrôle, mis en place au début des années 1990, a dû résoudre des difficultés inhérentes à la détection de très faibles quantités de substances, celles-ci étant très efficaces chez les bovins, à la multiplicité des substances employées, bon nombre d'analogues du clenbutérol étant facilement synthétisés chimiquement, ce qui pouvait encourager à une fraude élargie, et à leur élimination très rapide de l'organisme. Le dépistage s'appuie sur des méthodes analytiques sensibles telles les techniques ELISA ou RIA, les dosages fondés sur une liaison aux récepteurs spécifiques ou encore les techniques de détection par spectrométrie de masse qui, particulièrement sensibles, atteignent des sensibilités voisines du ppt. Un certain nombre de procédures de validation et un suivi analytique encadrent ces contrôles.

Concernant la ractopamine, l'une des deux molécules utilisées de façon réglementaire en dehors de l'Union européenne (en élevage bovin ou porcin aux États-Unis), les LMR proposées au niveau du JECFA sont de 10 ppb pour le muscle et le tissu adipeux et de 40 et 90 ppb pour le foie et le rein respectivement. Pour l'instant, aucune donnée réglementaire validée par les instances internationales n'est disponible pour le zilpatérol.

Les ATS

Les ATS ont fait l'objet de nombreuses études pharmacocinétiques. Leur absorption est très rapide, tout comme leur élimination, essentiellement par voie urinaire chez la vache. Ces composés s'accumulent dans la thyroïde mais n'y sont pas métabolisés. Le métabolisme de ces substances reste assez mal connu,

les principales étapes décrites pour le tapazole ou le propylthiouracile étant celles de la glucuronocoujugaison.

Comme pour les β -agonistes, les risques de toxicité pour la santé du consommateur étant parfaitement établis, ces composés totalement interdits comme promoteurs de croissance en élevage font l'objet de contrôles très poussés, les techniques analytiques utilisées étant extrêmement sensibles et spécifiques de ces molécules. La détection de ces substances par spectrométrie de masse couplée à une étape de chromatographie liquide permet actuellement d'atteindre des détections de l'ordre de 20 ppb dans la thyroïde (De Wasch *et al.*, 2001).

L'impact environnemental

Les métabolites des promoteurs de croissance (anabolisants ou autres) sont excrétés par voie urinaire et fécale et se retrouvent concentrés dans les lisiers qui seront ensuite épandus sur les cultures. La question se pose de savoir avec quel délai les activités hormonales ainsi libérées dans l'environnement peuvent disparaître, éventuellement quel impact physiologique elles peuvent avoir sur des espèces extrêmement sensibles. Ainsi, les pouvoirs publics, au cours de la dernière décennie, ont intégré au niveau réglementaire les problèmes liés aux éventuelles conséquences pour les espèces animales mais aussi pour l'homme que représenterait la dissémination de substances toxiques dans l'environnement, tout particulièrement les hormones stéroïdiennes.

Ces études sont encore balbutiantes et nombre de problèmes analytiques doivent être résolus pour obtenir des données fiables. Des tests réalisés *in vitro* signalent une activité œstrogénique ou androgénique significative dans des eaux de rivière en aval de *feedlots* où sont engraisés des bouillons implantés avec des anabolisants stéroïdiens (Soto *et al.*, 2004).

Une étude plus analytique montre des temps de demi-disparition de la trenbolone dans les lisiers de l'ordre de 270 jours (Schiffer *et al.*, 2001). Après épandage, la disparition dans le sol se fait assez rapidement ; la présence de résidus est détectée après 8 jours mais plus après 30 jours. En ce qui concerne la stabilité du MGA dans le sol, elle est nettement plus élevée : elle est supérieure à cinq mois.

Aucune donnée de stabilité dans l'environnement n'est disponible en ce qui concerne les autres promoteurs de croissance.

2.1.2 Les hormones peptidiques

Plusieurs hormones peptidiques peuvent être utilisées pour moduler le statut physiologique des animaux d'élevage, que ce soit pour en maîtriser la reproduction (LH, FSH, eCG), améliorer les performances de croissance (rpST) ou exploiter pleinement le potentiel de production laitière en élevage bovin (rbST). Seule, la somatotropine est utilisée de façon chronique et la recherche de son utilisation éventuelle, interdite dans l'UE, a fait l'objet de travaux importants en chimie analytique et en pharmacologie au cours de ces dernières années.

La détection des hormones peptidiques

Deux types de méthodes de détection de l'utilisation de GH recombinantes ont été développés : les méthodes immunologiques et les méthodes spectrométriques. Les méthodes mettant en œuvre un dosage ELISA ont permis de détecter la GH dans le plasma à des concentrations de l'ordre de 10 à 20 ng/ml (Scippo *et al.*, 1997) mais pas dans les tissus ou dans le lait, la sensibilité de détection n'étant pas suffisante. Plus problématique est la difficulté de distinguer par ces méthodes les formes naturelles et recombinantes qui ont des structures primaires et secondaires très voisines. Les méthodes de détection en spectrométrie de masse qui utilisent les modes d'ionisation douce (électrospray ou désorption MALDI) sont en revanche très efficaces pour résoudre les problèmes de sensibilité et de spécificité de détection (Pinel *et al.*, 2004) mais butent encore sur les difficultés de préparation des matrices à analyser (extraction, purification, concentration). Aucune harmonisation des procédures analytiques mises en place pour rechercher les formes recombinantes de GH dans le lait ou le plasma n'a encore vu le jour.

La détection de l'utilisation de la GH par la recherche d'effets induits

Dans un souci d'augmenter la pression de contrôle, la recherche de bio-indicateurs d'un traitement à la GH dont la mesure pourrait se faire à un faible coût s'est développée en parallèle de celles, analytiques, de la détection directe des formes recombinantes. En effet, la biosynthèse hépatique de l'IGF-I et des protéines de transport des IGF est sous le contrôle de la GH et la détection de variations de leur concentration pourrait, indirectement, témoigner d'un traitement par la GH.

En élevage bovin, des estimations des taux sériques et tissulaires en IGF-I ont été réalisées par dosage radio-immunologique. La très forte variabilité des teneurs et la multiplicité des facteurs entrant en interaction avec la GH pour

contrôler la biosynthèse de l'IGF-I rendent pour l'instant très difficile cette recherche indirecte de traitement par la GH.

En élevage équin, cette recherche est cruciale pour détecter d'éventuelles fraudes en compétition hippique. Au contraire de la situation en élevage bovin, les travaux menés en élevage équin semblent prometteurs et la recherche de valeurs plasmatiques en IGF-I dépassant 860 ng/ml a été proposée dans le cadre du contrôle antidopage chez les chevaux (Popot *et al.*, 2002).

Impact du traitement par la GH sur les capacités de détoxification des animaux

La GH induit des effets prononcés sur les capacités de détoxification hépatique des animaux de laboratoire (Wiwi et Waxman, 2004) ou du porc en engraissement chez lequel les activités d'hydroxylation (cytochromes P450), de glucurono- (UDPGT) ou sulfoconjugaison (ST) et de conjugaison au glutathion (GST) sont réduites au tiers ou à la moitié des activités normales (Paris, non publié). Si ces résultats biochimiques se trouvaient être confirmés au plan pharmacocinétique, cela signifierait que, chez le porc traité à la pGH, les capacités d'élimination des xénobiotiques, en particulier les médicaments vétérinaires, seraient fortement diminuées. Pour l'instant, ce point reste à préciser et l'interdiction totale de l'utilisation des somatotropines recombinantes dans l'UE permet de rassurer le consommateur européen sur l'absence d'éventuels dépassements, après un délai d'attente inchangé, des concentrations en résidus tissulaires de médicaments vétérinaires, dûment autorisés par ailleurs, qui ne manqueraient pas d'apparaître si cette pratique d'élevage ne devait plus être interdite. Ce seraient les posologies, les délais d'attente, les profils de résidus de ces xénobiotiques qu'il faudrait alors réexaminer (Chilliard *et al.*, 2001).

2.2 Le cadre réglementaire

L'utilisation des hormones en élevage est soumise à un cadre réglementaire strict, organisé aux niveaux européen et nationaux. À cette organisation réglementaire, s'ajoutent les expertises scientifiques menées au niveau international pour évaluer l'innocuité des substances pouvant être utilisées et déterminer les paramètres techniques à la base des contrôles effectués sur le terrain. Enfin, les relations avec les pays tiers permettent de garantir au consommateur européen que les importations de denrées d'origine animale en provenance de ces différents pays ne présentent pas de risque sanitaire, en particulier en ce qui concerne la sécurité chimique.

2.2.1 Le cadre européen

Un canevas réglementaire organise l'utilisation en élevage des substances à effet hormonal (œstrogènes, androgènes, progestagènes) ou thyrostatique ainsi que les substances β -agonistes. Il est transcrit dans la directive 96/22/CE modifiée par la directive 2003/74/CE. Toutes ces substances sont classées dans deux annexes. L'annexe I contient les substances pharmacologiquement actives pour lesquelles une LMR a été définie. L'annexe II contient l'ensemble des substances interdites d'utilisation avec, dans la liste A, les ATS, les stilbènes et leurs dérivés, et, dans la liste B, l'œstradiol et ses dérivés et les β -agonistes. L'annexe III complète ces deux annexes et contient la liste des substances interdites provisoirement, en particulier les androgènes, gestagènes et les substances à effet œstrogénique. La directive prévoit que certains États membres peuvent déroger à l'interdiction des substances figurant dans les annexes II (liste B) et III pour quelques indications thérapeutiques ou zootechniques sous réserve que ces substances entrent dans la composition de médicaments vétérinaires ayant reçu une autorisation de mise sur le marché (AMM) et que les contrôles analytiques des résidus soient disponibles.

Le contrôle de l'utilisation frauduleuse de ces substances est ancien ; il remonte à l'usage du DES en élevage. Il est organisé au niveau réglementaire dans tous ses aspects : substances contrôlées, plans d'échantillonnage, laboratoires intervenants, matrices, etc. Quatre laboratoires communautaires de référence (LCR) désignés par la Commission européenne se répartissent les différentes familles de substances et de contaminants. Ils jouent un rôle déterminant dans l'évolution des méthodes analytiques, leur harmonisation, leur validation, et peuvent être sollicités en cas de différend entre deux laboratoires nationaux de référence (LNR).

2.2.2 Le cadre national

Les directives européennes sont transposées en droit national pour devenir effectives dans chaque État membre. En France, plusieurs réglementations relatives à la santé publique et à la détection des fraudes sont codifiées dans le Code de la santé publique et le Code rural.

Pour tout ce qui concerne les denrées d'origine animale, le contrôle de ces substances est placé sous la responsabilité du ministère de l'Agriculture, plus particulièrement la Direction générale de l'alimentation (DGAL), et, pour tout ce qui concerne l'alimentation animale et les produits transformés, il est placé sous la responsabilité du ministère des Finances, plus particulièrement la Direction

générale de la consommation, de la concurrence et de la répression des fraudes (DGCCRF).

La DGAL organise au travers du réseau des LNR les plans de contrôle de l'utilisation de ces substances. Un appui logistique est obtenu auprès des directions départementales des services vétérinaires (DSV) et des laboratoires départementaux d'analyse (LDA) agréés par le ministère de l'Agriculture. Des mesures relatives à l'assurance-qualité ont été prises qui permettent de mieux garantir la fiabilité des résultats d'analyse obtenus. La mission des LNR est aussi de faire progresser les méthodes analytiques utilisées dans les LDA en exerçant une activité de recherche en chimie analytique très poussée. Ils servent aussi de recours analytique en cas de litige.

2.2.3 Les relations entre l'Union européenne et les pays tiers

Les principaux pays producteurs de produits animaux ont mis en place des procédures de contrôle de l'utilisation de produits à activité hormonale ou de promoteurs de croissance. Mais celles-ci sont encore extrêmement variables et elles ne garantissent pas la possibilité de détecter leur mauvais usage ou leur utilisation illégale. Il est donc de la responsabilité de chaque État membre de s'assurer que l'importation de produits animaux de pays extérieurs à l'Union européenne respecte les dispositions des directives européennes définissant ces usages et ces contrôles.

Au niveau international, la commission du Codex alimentarius a défini depuis plus d'une dizaine d'années des LMR propres pour les résidus des différentes substances autorisées ainsi qu'un certain nombre d'exigences techniques à respecter dans la définition des plans de contrôle à organiser dans chaque État. Les pays représentés au sein du Mercosur (Argentine, Brésil, Paraguay et Uruguay) ainsi que le Chili ont fait évoluer récemment leur réglementation. Les programmes de contrôle que ces pays ont définis s'appuient sur un système voisin du système américain de l'USDA et des critères relatifs aux LMR définis par le JECFA et le Codex alimentarius (Fernandez-Suarez, 2004).

L'Union européenne définit vis-à-vis des pays tiers les critères de qualité des produits animaux exprimés en termes de résidus de substances qui doivent être contrôlées aussi strictement qu'à l'intérieur de l'Union européenne. Ceci représente de fait un encouragement à une évolution raisonnée des politiques nationales en matière de contrôles (liste des substances, LMR, plans de contrôle, méthodes analytiques, liste des laboratoires d'analyse et niveau d'agrément, politique d'assurance-qualité). À cette politique européenne définissant les conditions des échanges internationaux examinées sous l'angle de la qualité des

produits alimentaires se greffe une politique d'accompagnement et d'évolution des pratiques nationales définies en matière du contrôle de la qualité de ces produits, ceci grâce à un effort de formation important soutenu par l'Union européenne.

2.3 L'évolution des contrôles

2.3.1 L'évolution des pratiques

Les analyses communautaires conduites en matière de détection de l'utilisation illégale des substances à activité hormonale constituent une base d'informations précieuse pour juger l'évolution des pratiques frauduleuses. Le nombre de cas positifs évolue peu actuellement. Il est en très net recul en comparaison de la situation qui prévalait au début des années 1990. Les molécules retrouvées sont des stéroïdes et des β -agonistes. Cette diminution apparente pourrait s'expliquer ainsi :

- toutes les substances utilisées ne sont pas retrouvées compte tenu de leur élimination rapide et les procédures analytiques restent inopérantes ;
- la sensibilité de détection des molécules connues est insuffisante ;
- un recours à des molécules naturelles est effectué, qu'il est difficile de prouver avec les méthodes analytiques disponibles ;
- un recours à des cocktails de molécules pharmacologiquement actives met en défaut les méthodes de détection, rendues insuffisamment sensibles compte tenu de cet effet de dilution des molécules ;
- un recours à des doses faibles de molécules de familles différentes qui agissent en synergie ;
- un recours possible à des molécules de structures inconnues qui agissent en tant qu'analogues ou dont l'usage n'était plus d'actualité.

Toutes ces situations constituent autant de points d'entrée motivant des recherches analytiques extrêmement originales qui intègrent obligatoirement les performances instrumentales sans cesse en progrès. Ces renouvellements méthodologiques concernent aussi bien les stéroïdes de synthèse ou naturels, les stéroïdes extraits de plantes ou d'insectes que les β -agonistes.

De nouvelles stratégies pharmacologiques ont été découvertes, en particulier les traitements visant à stimuler la production de somatotropine *via* l'administration d'oligopeptides analogues du GH-RH, appelés GHRP (growth hormone

releasing peptide). Ainsi, des gains de performance laitière ou de croissance ont été montrés expérimentalement. La question de leur utilisation illégale en élevage se pose aussi pour les sécrétagogues de synthèse, non peptidiques, actuellement utilisées en médecine humaine, qui pourraient avoir des effets zootechniques exacerbés.

2.3.2 L'évolution des méthodes analytiques

Deux types de problèmes persistent concernant la détection des traitements frauduleux. Ce sont ceux relatifs à la détection des molécules naturelles, principalement les stéroïdes, et ceux relatifs à la détection de molécules inconnues.

Dans le premier cas, des méthodes analytiques plus sophistiquées que celles utilisées actuellement sont en cours de développement. Elles reposent sur l'utilisation de la spectrométrie de masse de rapport isotopique sachant que la proportion de carbone 13 dans les molécules diffère selon que celles-ci sont synthétisées chimiquement ou biologiquement, les précurseurs chimiques ou les substrats étant marqués différemment. La détection de cas positifs intègre en outre des données physiologiques concernant les taux de production des hormones qui sont normalement trouvés chez les espèces domestiques.

En ce qui concerne la détection de molécules inconnues, plus largement de manipulations physiologiques frauduleuses, un recours à l'utilisation de méthodes d'exploration globale du fonctionnement des organismes pourrait s'avérer efficace pour augmenter la pression de contrôle et détecter l'utilisation de tel ou tel type de traitement anabolisant, voire certaines associations de traitements. Ces méthodes ne cherchent pas à révéler directement la signature chimique des molécules suspectées, mais bien à en révéler la signature métabolique ou physiologique en analysant grâce à des métriques statistiques les déviations qui existent entre ce qui fait l'objet du contrôle et les références dites « normales ». Ces démarches qui reposent sur des méthodes telles que la métabonomique, la protéomique ou la transcriptomique sont indirectes. Elles nécessitent la construction de bases de données de référence et leur exploitation par des outils bio-informatiques et statistiques. Leur qualité informationnelle devra être validée avant d'être utilisée sur le terrain. Les résultats de recherche obtenus récemment dans le domaine de la détection des disruptions métaboliques chez des bovins traités par des anabolisants sont encourageants (Dumas *et al.*, 2005). Un changement d'échelle, coûteux, devra néanmoins être opéré pour que cette démarche visant à rechercher des suspicions de traitement puisse entrer un jour en application.

2.3.3 L'évolution des réglementations

L'évolution de la réglementation européenne en matière de contrôle de l'usage des substances hormonales intègre de nouveaux paramètres pouvant être utilisés pour organiser les plans de contrôle. Elle intègre aussi les progrès techniques réalisés en matière de détection et les nouveaux usages ou les possibilités d'utiliser de nouvelles substances ayant une activité hormonale.

Les progrès réalisés en matière de contrôle des substances à activité hormonale devront aussi mieux tenir compte des possibilités d'harmonisation des procédures utilisées dans les différents pays afin d'en mieux garantir la qualité. Ainsi, la décision 2002/657 définit-elle pour les substances interdites le concept de MPRL, c'est-à-dire la limite minimale de performance requise qui correspond à une concentration fixée administrativement que tout laboratoire de contrôle doit être capable de dépister et de confirmer. Quelques MPRL ont été publiées (EC 2003/81). Ces données permettront de façon plus objective, grâce à des essais comparatifs, d'organiser l'harmonisation des différents laboratoires européens.

Conclusions et recommandations

Pour des raisons économiques multiples, tout particulièrement l'ouverture et la dérégulation progressive des marchés agricoles dans et hors l'Union européenne, mais aussi pour des raisons sociales liées à la déprise agricole, pour des raisons sociologiques comme par exemple les interrogations des consommateurs sur la qualité jugée médiocre des aliments, résultat obligé d'une agriculture intensive, les filières animales sont actuellement confrontées à la nécessité d'analyser leur positionnement et de redéfinir de nouvelles stratégies pour garantir un « développement plus durable », une traçabilité des produits, et reconquérir la confiance des consommateurs.

C'est dans ce contexte complexe qu'il faut replacer les débats sur l'innocuité avérée, probable, hypothétique, ou contestée des hormones présentes à des niveaux résiduels qui peuvent sembler faibles dans les tissus animaux au regard des taux de production d'hormones admis chez le consommateur. Cependant, une synthèse rédigée en 2002 par le comité scientifique vétérinaire en charge des affaires de santé publique au niveau de la Commission européenne (SCVPH) résume les principales interrogations scientifiques encore patentes en matière d'expertise de ces faibles niveaux résiduels (SCVPH, 2002). Dans ses conclusions, il réaffirme que le risque pour le consommateur des résidus d'anabolisants autorisés hors UE, à savoir l'œstradiol, le zéranol, la testostérone, l'acétate de trenbolone, la progestérone et l'acétate de mélangestrol, ne peut être considéré

comme nul. La molécule la plus problématique est, paradoxalement, une molécule naturelle, l'œstradiol, maintenant interdite dans l'UE, dont les métabolites de type catéchol sont génotoxiques et pour laquelle la présence de résidus de type ester n'avait jamais fait l'objet d'expertise ciblée lors de l'évaluation, ancienne, de cette hormone utilisée comme anabolisant.

Dans une réévaluation récente de l'impact hormonal de ces résidus, les valeurs tissulaires de résidus en œstradiol retrouvés chez un animal implanté qui seraient consommés dans un régime type par un individu de 60 kg s'élèveraient à environ 20 ng/j (Daxenberger *et al.*, 2001). Les teneurs circulantes en œstradiol chez le garçon impubère (Klein *et al.*, 1994 ; Paris *et al.*, 2002), la cible vraisemblablement la plus sensible dans la population (Andersson et Skakkebaek, 1999), et son taux de production chez l'enfant sont connues de façon très imprécise. Il est donc difficile d'établir les consommations maximales admissibles nécessaires pour atteindre 1 % du taux de production de cette hormone par l'ingestion de viande. Cependant, à partir des teneurs circulantes les plus faibles (Klein *et al.*, 1994), des simulations montrent qu'une consommation de 10 g de viande provenant d'animaux traités suffirait à atteindre la valeur admissible, cette consommation atteignant 50 g de viande si elle provient d'animaux non traités (Daxenberger *et al.*, 2001 ; Aksglaede *et al.*, 2006). Des calculs comparables effectués à partir des teneurs circulantes trouvées chez le garçon impubère par Paris *et al.* (2002) montrent que cette valeur limite de consommation de viande provenant d'animaux traités est atteinte à 350 g. Compte tenu des connaissances actuelles en endocrinologie, des moyens analytiques à notre disposition qui sont sans commune mesure avec ceux utilisés dans les années 1970 et 1980, période durant laquelle les données de référence ont été produites et qui seules servent à l'exercice de l'expertise réglementaire, enfin des interrogations sur le rôle des disrupteurs endocriniens dans certaines perturbations physiologiques bien établies, il semble nécessaire, pour clarifier le débat, d'obtenir des données précises en ce qui concerne :

- les valeurs de production des œstrogènes chez l'enfant, plus particulièrement le garçon impubère ;
- leurs concentrations circulantes avant et au début de la puberté avec des méthodes spectrophysiques dûment validées ;
- la clairance métabolique des œstrogènes chez cette population cible.

Ces nouvelles données devront en outre servir de base à une modélisation des effets physiologiques pour étayer ou rejeter l'hypothèse d'absence d'effet de seuil en ce qui concerne les hormones stéroïdiennes ou leurs analogues (Sheehan, 2006).

Le risque génotoxique est maintenant bien documenté en ce qui concerne les catéchols œstrogènes (Liehr, 2000 ; Cavalieri et Rogan, 2004). Ce risque vaut aussi pour les résidus de l'œstradiol retrouvés chez les bovins, tout particulièrement l'œstradiol-17 α , métabolite majeur de l'œstradiol, qui seront transformés en catéchols après ingestion. Mais cette donnée n'a pas encore été réellement prise en compte dans les évaluations toxicologiques. Les propriétés d'alkylation de la trenbolone qui forme dans des proportions importantes des résidus liés aux macromolécules dans les tissus mériteraient, elles aussi, d'être réexaminées dans une perspective de génotoxicité ou d'immunotoxicité mieux ciblée.

Les points de vue divergents entre spécialistes des événements cellulaires caractérisant la carcinogenèse et des facteurs qui en sont à l'origine, tous étayés par des faits expérimentaux établis, montrent bien toute la difficulté qu'il y a à conduire une expertise complexe quand certaines questions sur des mécanismes biochimiques fondamentaux ne sont toujours pas résolues. En la matière, les travaux récents de Bhat et de son équipe soulignent dans un modèle d'étude précis, celui du cancer rénal du hamster de Syrie, la nécessaire implication des phénomènes accompagnant la formation de dérivés catéchols d'une part et de la stimulation du récepteur aux œstrogènes à l'origine de la promotion tumorale d'autre part (Bhat *et al.*, 2003). Cette double implication peut varier en fonction du modèle d'étude auquel on se réfère.

Fin 2006, l'œstradiol dont l'usage n'était permis dans l'Union européenne qu'à des fins de maîtrise de la reproduction dans des protocoles de traitement qui l'associait aux progestagènes a été interdit. Seules, les progestagènes, les prostaglandines, certains corticostéroïdes continueront d'être utilisés dans un cadre réglementaire strict, les stéroïdes anabolisants, les promoteurs de croissance, la somatotropine restant interdits. Dans le domaine du contrôle de la reproduction, des alternatives à certains traitements hormonaux sont possibles. De la même manière, les performances zootechniques telles que la production laitière ou la croissance des animaux sont fortement dépendantes du potentiel génétique, des conditions d'alimentation, de l'état sanitaire et de l'environnement physique mais aussi économique des exploitations agricoles. C'est plus sur ces différents facteurs que certaines marges de progression des élevages pourront être obtenues que sur le seul recours à une « manipulation » de la physiologie des animaux de rente dont l'éventail des possibilités d'intervention semble encore pouvoir s'élargir si l'on considère les modes d'action de certains peptides impliqués dans le contrôle de l'axe gonadotrope ou somatotrope ou dans le contrôle de la prise alimentaire mais dont la place doit nécessairement être réfléchié relativement au système de production lui-même.

Références bibliographiques

- Aksglaede L., Juul A., Leffers H., Skakkebaek NE. et Andersson AM. (2006). The sensitivity of the child to sex steroids: possible impact of exogenous estrogens. *Human Reprod. Update*, **12** : 341-349. Epub 3 May 2006. doi : 10.1093/humupd/dml018.
- Andersson AM. et Skakkebaek NE. (1999). Exposure to exogenous estrogens in food: possible impact on human development and health. *Eur J Endocrinol*, **140** : 477-485.
- Arnold D. (2004). Risk Assessments for substances without ADI/MRL – an overview. Joint FAO/WHO Technical Workshop on Residues of Veterinary Drugs without ADI/MRL, Bangkok, Thaïlande, 24-26 August 2004. <http://www.fao.org/docrep/008/y5723e/y5723e0d.htm#bm13>.
- Bhat HK., Calaf G., Hei TK., Loya T. et Vadgama JV. (2003). Critical role of oxidative stress in estrogen-induced carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA*, **100** : 3913-3918.
- Cavalieri EL., Stack DE., Devanesan PD., Todorovic R., Dwivedy I., Higginbotham S., Johansson SL., Patil KD., Gross ML., Gooden JK., Ramanathan R., Cerny RL. et Rogan EG. (1997). Molecular origin of cancer: catechol estrogen-3,4-quinones as endogenous tumor initiators. *Proc Natl Acad Sci USA*, **94** : 10937-10942.
- Cavalieri EL. et Rogan EG. (2004). A unifying mechanism in the initiation of cancer and other diseases by catechol quinones. *Ann NY Acad Sci*, **1028** : 247-257.
- Chemineau P., Cognié Y. et Heyman Y. (1996). Maîtrise de la reproduction des mammifères d'élevage. *Inra Prod Anim*, Hors série, 5-15.
- Chilliard Y., Lerondelle C., Disenhaus C., Mouchet C. et Paris A. (2001). Recombinant growth hormone: potential interest and risks of its use for bovine milk production. Renaville R., Burny A. (eds). *Biotechnology in animal husbandry*. Kluwer Academic Publishing, Dordrecht, The Netherlands, p. 65- 97.
- Daxenberger A., Ibarreta D. et Meyer HDD. (2001). Possible health impact of animal oestrogens in food. *Human Reprod Update*, **7** : 340-355.
- De Wasch K., De Brabander HF., Impens S., Van De Wiele M. et Courtheyn D. (2001). Determination of mercaptobenzimidazol and other thyrostat residues in thyroid tissue and meat using high-performance liquid chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr A*, **912** : 311-317.

- Dumas ME., Canlet C., Vercauteren J., André F. et Paris A. (2005). Homeostatic signature of anabolic steroids in cattle using ^1H - ^{13}C HMBC NMR metabolomics. *J Proteome Res*, **4** : 1493-1502. Epub 12 August 2005. doi : 10.1021/pr0500556.
- Fernandez-Suarez A. (2004). South America's regulatory framework for the control of residues of veterinary drugs. Working paper. *Joint FAO/WHO Technical workshop on Residues of Substances without ADI/MRL in Food*. Bangkok, 24-28 August 2004, pp 57-64. <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/008/y5723e/y5723e00.pdf>.
- Fostier A. et Chevassus B. (1991). Génétique et reproduction des salmonidés. *Biofutur*, **106** : 31-34.
- Jalabert B., Breton B., Fostier A., Le Gac F. et Loir M. (1999). Bases physiologiques de la reproduction chez les poissons. *Pisc Fr*, **133** : 5-12.
- JECFA, Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (1987). *Toxicological evaluation of certain veterinary drug residues in food*. 32nd Meeting, Rome, 15-23 June 1987, p. 122-151.
- JECFA, Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (1999). *Toxicological evaluation of certain veterinary drug residues in food*. 52nd Meeting, Rome, 2-11 February 1999, p. 44-126.
- Jouanin I., Debrauwer L., Fauglas G., Paris A. et Rathahao E. (2002). Adduction of catechol estrogens to nucleosides. *Steroids*, **67** : 1091-1099.
- Klein KO., Baron J., Colli MJ., McDonnell DP. et Cutler GB. (1994). Estrogen levels in childhood determined by an ultrasensitive recombinant cell bioassay. *J Clin Invest*, **94** : 2475-2480.
- Leffers H., Naesby M., Vendelbo B., Skakkebaek NE. et Jorgensen M. (2001). oestrogenic potencies of zeranol, oestradiol, diethylstilboestrol, bisphenol-A and genistein: implications for exposure assessment of potential endocrine disrupters. *Hum Reprod*, **16** : 1037-1045.
- Liehr JG. (2000). Is estradiol a genotoxic mutagenic carcinogen? *Endocr Rev*, **21** : 40-54.
- Maume D., Le Bizec B., Pouponneau K., Deceuninck Y., Solere V., Paris A., Antignac JP. et André F. (2003). Modification of 17 beta-estradiol metabolite profile in steer edible tissues after estradiol implant administration. *Anal Chim Acta*, **483** : 289-297.
- McLean E. et Devlin RH. (2000). Application of biotechnology to enhance growth of salmonids and other fish. Recent advances in marine biotechnology. Fingerman M. and Nagabhushanam M. (eds). *Science Publishers*, 17-55.

- Meyer HHD. (2001). Biochemistry and physiology of anabolic hormones used for improvement of meat production. *APMIS*, **109** : 1-8.
- Metzler M. et Pfeiffer E. (2001). Genotoxic potential of xenobiotic growth promoters and their metabolites. *APMIS*, **109** : 89-95.
- Paris A., Goutal I., Richard J., Bécrot A. et Guéraud F. (2001). Uterotrophic effect of a saturated fatty acid 17-ester of estradiol-17 β administered orally to juvenile rats. *APMIS*, **109** : 365-375.
- Paris A., André F., Antignac JP., Bonneau M., Briant C., Caraty A., Chilliard Y., et al. (2006). Hormones et promoteurs de croissance en productions animales : de la physiologie à l'évaluation du risque. *Inra-Productions Animales*, **19** : 149-240.
- Paris F., Servant N., Térouanne B., Balaguer P., Nicolas JC. et Sultan C. (2002). A new recombinant cell bioassay for ultrasensitive determination of serum estrogenic bioactivity in children. *J Clin Endocrinol Metab*, **87** : 791-797.
- Pinel G., André F. et Le Bizec B. (2004). Discrimination of recombinant and pituitary-derived bovine and porcine growth hormones by peptide mass-mapping. *J Agric Fd Chem*, **52** : 407-414.
- Popot MA., Bobin S., Bonnaire Y., Pirens G., Delahaut P., Lyazhi F. et Tabet JC. (2002). IGF-I concentrations measured by ELISA, IRMA and HPLC/ESI-MS. *Determination of a threshold value in horse plasma*. Proc. 15th Int. Conf. Racing Analysts and Veterinarians, Orlando, USA, p. 76-83.
- Schiffer B., Daxenberger A., Meyer K. et Meyer HHD. (2001). The fate of trenbolone acetate and melengestrol acetate after application as growth promoters in cattle: environmental studies. *Environ Health Perspect*, **109** : 1145-1151.
- Scippo ML., Degand G., Duyckaerts A. et Maghuin-Rogister G. (1997). Identification des vaches laitières traitées à la somatotropine bovine. *Ann Méd Vét*, **141** : 381-390.
- Schmidely P. (1993). Revue bibliographique quantitative sur l'utilisation des hormones anabolisantes à action stéroïdienne chez les ruminants en production de viande. I. Performances zootechniques. *Ann Zoot*, **42** : 433-359.
- SCVPH (2002). Opinion of the scientific committee on veterinary measures relating to public health on review of previous SCVPH opinions of 30 April 1999 and 3 May 2000 on the potential risks to human health from hormone residues in bovine meat and meat products. http://europa.eu.int/comm/food/fs/sc/scv/outcome_en.html, 10 April 2002.

- Sheehan DM. (2006). No-threshold dose-response curves for nongenotoxic chemicals: findings and applications for risk assessment. *Env Res*, **100** : 93-99.
- Soto AM., Clalabro JM., Prechtl NV., Yau AY., Orlando EF., Daxenberger A., Kolok AS., Guilette LJ., Le Bizec B., Lange IG. et Sonnenchein C. (2004). Androgenic and estrogenic activity in water bodies receiving cattle feedlot effluent in eastern Nebraska, USA. *Environ Health Perspect*, **112** : 346-352.
- Wiwi CA. et Waxman DJ. (2004). Role of hepatocyte nuclear factors in growth hormone-regulated, sexually dimorphic expression of liver cytochromes P450. *Growth Factors*, **22** : 79-88.
- Zalko D., Debrauwer L., Bories G. et Tulliez J. (1997). Evidence for a new and major metabolic pathway clenbuterol involving in vivo formation of an N-hydroxyarylamine. *Chem Res Toxicol*, **10** : 197-204.
- Zohar Y. et Mylonas CC. (2001). Endocrine manipulations of spawning in cultured fish: from hormones to genes. *Aquaculture*, **197** : 99-136.

Abréviations

- ADI : admissible daily intake
AMM : autorisation de mise sur le marché
ATS : anti-thyroïdiens de synthèse
COMT : catéchol-O-méthyltransférase
DES : diéthylstilbestrol
DJA : dose journalière admissible
eCG : equine chorionic gonadotropin
ESB : encéphalopathie spongiforme bovine
FGA : acétate de flurogestone
FGF : fibroblast growth factor
FSH : follicle-stimulating hormone
GH : growth hormone
GDF-8 : myostatine
GHBP : growth hormone binding protein
GH-RH : growth hormone releasing hormone
GnRH : gonadotropin releasing hormone
IA : insémination artificielle
IGF : insulin-like growth factor
IGFBP : insulin-like growth factor binding protein
LDA : laboratoire départemental d'analyse
LCR : laboratoire communautaire de référence
LH : luteinizing hormone
LMR : limite maximale en résidus

LNR : laboratoire national de référence
MAO : monoamine oxydase
MGA : acétate de mélangestrol
MPA : acétate de médroxyprogestérone
NOEL : no observed effect level
rbGH : recombinant bovine growth hormone
RIA : radio-immunologie
RIGF : receptor insulin-like growth factor
rpST : recombinant porcine somatotropin
ST : somatotropine
SRIF : somatotropin release inhibiting factor
TGF- β : transforming growth facteur beta

Groupe de lecture critique

COMPOSITION DU GROUPE DE LECTURE CRITIQUE

Académie nationale de médecine

Professeur René MORNEX

Membre de l'Académie nationale de médecine

Académie vétérinaire de France

Henri BRUGÈRE

Professeur à l'École nationale vétérinaire d'Alfort – Membre et secrétaire général de l'Académie vétérinaire de France

Agence française de sécurité sanitaire des aliments (Afssa)

Marie-Hélène LOULERGUE

Directrice adjointe de l'évaluation des risques nutritionnels et sanitaires

Agence française de sécurité sanitaire des produits de santé (Afssaps)

Anne CASTOT

Chef du Département de la surveillance du risque, du bon usage et de l'information sur les médicaments

Conférence des présidents d'université (CPU)

Dominique FELLMANN

Professeur des universités-praticien hospitalier – Faculté de médecine et de pharmacie de Besançon

Direction générale de la santé

Yves COQUIN

Directeur de projet à la Direction générale de la santé

Institut de veille sanitaire

Rosemary ANCELLE-PARK

Médecin épidémiologiste

Les entreprises du médicament (LEEM)

Chrystel JOUAN-FLAHAULT

Directeur médical à la direction des affaires scientifiques, pharmaceutiques et médicales

Les membres du Groupe de lecture critique, désignés par le président ou le directeur général de leur établissement, ont examiné le texte du rapport puis, au cours d'une réunion qui s'est tenue à l'Académie des sciences le 23 avril 2007, ont entendu la présentation de M. Edwin Milgrom, animateur du groupe de travail, et se sont exprimés.

Ils ont formulé des remarques, dont certaines ont été intégrées, avec leur accord, dans le rapport ; trois commentaires font l'objet de contributions signées des auteurs : elles sont présentées ci-après.

COMMENTAIRE DE L'ACADÉMIE VÉTÉRINAIRE DE FRANCE

Henri Brugère

Secrétaire général

Dès le milieu du XX^e siècle, la disponibilité des stéroïdes et des principes à activités gonadotropes ont conduit à des utilisations vétérinaires, pour répondre aux besoins de la thérapeutique individuelle des animaux de rente et compagnie. Simultanément se développaient des applications zootechniques visant à produire des denrées d'origine animale plus abondantes et de meilleure qualité, dans le contexte d'un encadrement réglementaire encore très succinct. Puis, l'introduction des stéroïdes dans le domaine de la contraception féminine, la disponibilité des progestagènes, la progestérone et ses analogues, ont apporté les premières possibilités de contrôle de la fonction génitale femelle à l'échelle des troupeaux, pour regrouper inséminations et mises bas. Peu de temps après, l'arrivée quasi simultanée des prostaglandines et des peptides hypothalamiques apporta finalement tous les moyens de la maîtrise de la reproduction dans les effectifs. Le développement des méthodes de transplantation embryonnaire ouvrait aussi la voie d'une facilitation de la diffusion des caractères génétiques de haut niveau, et rendait possible la prophylaxie des maladies transmissibles par le lavage des embryons.

Parallèlement, les usages de stéroïdes naturels ou artificiels comme « outils d'aide aux productions » (= facteurs de croissance ou anabolisants) s'étaient considérablement développés, reposant sur des molécules dont certaines avaient fait l'objet d'évaluations toxicologiques poussées, et avaient acquis un gage de crédibilité en termes de sécurité pour le consommateur. Mais l'évolution des conditions socio-économiques, la présence de surplus dans les productions agricoles, le souci croissant des consommateurs pour la santé justifiaient de ne plus recourir, en Europe, à ces moyens, tandis qu'outre-Atlantique, la recherche soutenue de la rentabilité économique conduisait à conserver et même à généraliser l'usage des hormones comme facteurs de croissance ; la majorité des protocoles repose, en Amérique du Nord, sur l'usage unique ou en association, d'œstrogènes et au tout premier rang du 17 β -œstradiol (E2). Cette différence de conception fut à l'origine d'un conflit, la « guerre du bœuf », dans le cadre de l'Organisation mondiale du commerce (OMC). Le refus d'importer de la viande « hormonée » en provenance des États-Unis eut comme effet de frapper l'Europe

de sanctions économiques, cette dernière n'ayant pas d'arguments autres que ce qui pouvait être considéré comme un protectionnisme déguisé.

Mais les recherches entreprises par l'Union européenne ont conduit, dans la période 2000-2002, à démontrer le risque carcinogène de E2, et à consolider la position d'interdiction des viandes hormonées. Les travaux expérimentaux ont aussi abouti à ce que l'Agence internationale de recherche sur le cancer (IARC) classe cette molécule dans la liste des agents avérés comme carcinogènes pour l'homme (rappelons que la méthode d'évaluation implique la confrontation des données expérimentales, biologiques et épidémiologiques). Il est certain que tous les anabolisants potentiels ne sont pas de nature œstrogénique, mais leur autorisation reste cependant suspendue à la double condition d'une sécurité sanitaire indiscutable et d'une justification socio-économique.

L'utilisation des hormones en élevage a donc deux visages. L'un est celui d'une aide indispensable à la gestion de la reproduction, à l'amélioration de la qualité génétique et sanitaire des troupeaux. L'autre, plus discutable, est entaché des erreurs d'évaluation faites dans le passé, des usages frauduleux qui n'ont jamais totalement disparu, de la recherche irréflective du profit, des craintes irraisonnées des consommateurs, dont la gestion la plus logique aboutit actuellement au sein de l'Union européenne à une interdiction pure et simple.

On doit donc être bien informé que le seul usage possible des hormones en élevage est celui de la maîtrise de la reproduction et du traitement de ses troubles, et qu'il ne peut se faire que dans le cadre réglementaire strict de la pharmacie vétérinaire. Les hormones ont ici le statut de médicaments : elles ont fait l'objet d'une autorisation de mise sur le marché (AMM) reposant sur de solides dossiers d'évaluation et comportant des spécifications relatives à leur usage (indications, posologie, etc.) et à la sécurité du consommateur (temps d'attente garantissant l'absence de résidus dans les denrées). La gestion administrative du médicament vétérinaire est placée sous la responsabilité du ministère chargé de l'Agriculture, qui intervient, au sein de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments (Afssa), par l'Agence nationale du médicament vétérinaire (ANMV).

De plus, les hormones n'étant pas autorisées pour les usages de type « facteurs de croissance », l'administration se trouve *ipso facto* en charge de devoir surveiller leur absence dans les denrées animales, qu'il s'agisse de défauts de respect des règles d'utilisation des hormones comme médicaments, ou de fraudes à l'importation, ou encore d'utilisations frauduleuses sur le territoire européen. La détection de première ligne incombe aux contrôles faits par les Services Vétérinaires à l'abattoir, aux frontières, ou sur le terrain (foires, marchés, élevages). Des contrôles analytiques sont opérés sur suspicion ou par sondage. Ils comportent la recherche non seulement des molécules les plus probables en

Europe, mais aussi de celles qui ont reçu une autorisation sur d'autres continents, particulièrement en Amérique du Nord. Les fraudeurs dépiétés à cette occasion sont pénalisés par le fait que leurs animaux sont retirés de la consommation. Ils font aussi l'objet de poursuites judiciaires.

COMMENTAIRE DE LA CONFÉRENCE DES PRÉSIDENTS D'UNIVERSITÉ

Dominique Fellmann

Professeur des universités-praticien hospitalier

Le thème choisi est particulièrement attractif par son actualité, sa profonde intrication non seulement avec des problématiques liées à la santé des populations, mais aussi avec des questionnements scientifiques plus fondamentaux et des préoccupations environnementales dans leurs aspects culturels, sociaux et techniques.

Je souscris totalement à l'orientation thématique sélectionnée et j'admire la façon dont elle replace l'endocrinologie en position centrale dans l'analyse de dysfonctionnements de natures très variées. Si elle a connu des périodes de gloire, cette discipline a pu sembler céder le pas, dans un passé récent, à des sciences apparemment plus prometteuses (biologie moléculaire, génomique et post-génomique. . .).

Le sujet est immense et ce rapport ne peut bien évidemment être exhaustif. Les auteurs ont judicieusement choisi des illustrations dans des domaines variés, explorés de manière approfondie. On peut toujours trouver dans l'un ou l'autre chapitre des passages moins précis, voire des éléments conceptuels tus, mais ces remarques ponctuelles ne sauraient remettre en question la qualité remarquable du travail effectué dont le caractère pédagogique justifierait une très large diffusion.

COMMENTAIRE DU LEEM

Chrystel Jouan-Flahault

Directeur médical

Progrès thérapeutique et sciences du vivant Attractivité de la France

Les entreprises du médicament souhaitent réaffirmer, à l'instar des auteurs de ce rapport, l'importance cruciale du développement et du soutien des sciences du vivant en France. En effet, ce secteur d'activités revêt aujourd'hui une importance stratégique majeure et doit à ce titre figurer au rang de priorité nationale pour les décideurs de notre pays.

Au regard de cet impératif, la situation de la recherche thérapeutique, en France, est actuellement préoccupante. En effet, si le médicament a longtemps été un élément du rayonnement scientifique et médical français, notamment dans le domaine de l'hormonothérapie, et si la France s'est longtemps située au deuxième rang mondial des « découvreurs de médicaments », sa place est aujourd'hui beaucoup plus modeste puisqu'elle ne figure plus qu'au sixième voire septième rang dans ce classement.

Quelles pistes pour agir ? Des mesures importantes ont d'ores et déjà été prises récemment dans le cadre du Conseil stratégique des industries de santé en faveur notamment des études cliniques, des pôles de compétitivité, du crédit impôt recherche, et de la propriété intellectuelle.

Cependant un véritable projet de société doit être mis en place pour assurer l'innovation de demain en matière de santé. Il est urgent de mobiliser les différents acteurs concernés, scientifiques, professionnels de santé, gestionnaires et politiques, et de faire fructifier les atouts que notre pays possède dans ce domaine avec une recherche publique de haut niveau, une recherche clinique structurée, des infrastructures en développement, et l'opportunité de partenariats constructifs et productifs entre les secteurs public et privé.

Ainsi la France ne pourra-t-elle occuper la place à laquelle elle peut prétendre dans la compétition internationale du progrès médical que si elle fait de

l'ensemble des sciences du vivant une priorité clairement identifiée, si elle augmente l'effort de recherche publique, si elle investit dans les infrastructures et les plates-formes pluridisciplinaires, si elle facilite le renforcement de la recherche privée et la création d'entreprises de haute technologie, et si elle fait évoluer le cadre législatif et réglementaire avec la révision de la loi de bioéthique.

Cet objectif est, pour les entreprises du médicament, un enjeu majeur car la recherche thérapeutique doit être un des leviers de l'économie de la santé et de l'excellence de notre recherche sur le territoire national.

Présentation à l'Académie
des sciences

par Michel Le Moal

Membre de l'Académie des sciences

- 3 juillet 2007 -

Un groupe de travail composé de Philippe Bouchard, Alain Paris, Jean-Paul Riou, Henri Rochefort, Jean-François Savouret et coordonné par Étienne-Émile Beaulieu et Edwin Milgrom a rédigé un document ayant pour titre « *Hormones, santé publique et environnement* ». Les auteurs ont souhaité montrer la place tout à fait particulière qu'occupent les transmissions hormonales, d'une part dans le cadre général de la santé des populations, et d'autre part comme sites d'action des agents délétères créés par les activités humaines ou déversés dans notre environnement. Le document de travail en ma possession est constitué de 6-7 chapitres et il est accompagné de 7 analyses critiques provenant de spécialistes reconnus du domaine, certains travaillant à l'interface des sciences biologiques et de la société. La thématique est actuelle et attractive par sa pluridisciplinarité. Les auteurs sont parvenus d'une manière très pédagogique à placer l'endocrinologie en position centrale pour ce qui concerne certains des grands problèmes de nos sociétés ainsi que pour des pathologies graves en progression constante.

En raison de l'importance et de l'actualité des questions traitées, ce travail collectif vient à point nommé.

Avant de résumer les grandes lignes de l'ouvrage, je crois bon de rappeler quelques-uns des aspects de nature cellulaire et moléculaire des signalisations hormonales, qui constituent le fil rouge reliant les différents chapitres du document. L'endocrinologie a été à la pointe de grandes découvertes réalisées au cours des dernières décennies en biologie et médecine et j'en mentionnerai trois :

- les mécanismes de signalisation aux niveaux intercellulaire, cellulaire et moléculaire ;
- la caractérisation de la famille des récepteurs couplés aux protéines G (plus de 800 entités correspondant à 3 % de nos gènes, cibles de près d'un quart des 100 médicaments les plus utilisés) ;
- la famille des récepteurs nucléaires, premiers régulateurs transcriptionnels caractérisés, purifiés, clonés chez les mammifères, modèles pour l'étude des mécanismes de la transcription des gènes (15 à 20 % des prescriptions médicamenteuses concernent des agonistes ou antagonistes de ces récepteurs). Ces découvertes, parmi de nombreuses autres, ont fécondé les autres disciplines, au premier rang desquelles je mettrais les neurosciences.

Le document s'ouvre par une *introduction*, présentée par Edwin Milgrom. Elle a de nombreux mérites dont celui de préciser quelques concepts avec une grande clarté. J'en citerai deux.

Le premier concerne la complexité des récentes découvertes à l'interface génome-protéines. L'auteur nous rappelle que de nombreux ligands physiologiques, et partant de nouvelles fonctions, restent à découvrir sur la base d'un nouveau paradigme. Les progrès dans le séquençage du génome humain ont débouché sur la caractérisation d'un certain nombre de gènes et, au-delà, de protéines dont les homologues de séquence ont permis de découvrir que ces dernières étaient des récepteurs hormonaux dont les ligands physiologiques étaient inconnus. À partir de ces récepteurs, on a ainsi secondairement découvert des molécules ayant les fonctions d'hormones et dans certains cas des systèmes de régulations complets précédemment ignorés, et, en conséquence, de nouvelles fonctions physiologiques. Cette procédure a été à l'œuvre, par exemple pour l'obésité et les fonctions gonadotropes. Les données récentes de la littérature analysées par l'auteur débouchent sur des situations paradoxales et complexes : ainsi les récepteurs hormonaux – et certaines protéines – font partie de familles de protéines auxquelles appartiennent des récepteurs de ligands de nature non hormonale *sensu stricto*, mais également des protéines non récepteurs.

Le second situe les adaptations résultant des transmissions hormonales dans l'évolution même de nos sociétés. Edwin Milgrom nous rappelle que les systèmes hormonaux, lesquels ont permis aux organismes de s'adapter, sont le résultat d'une longue évolution. Phylogénétiquement, les gènes ancestraux des récepteurs et des hormones (ou des enzymes de synthèse) ont évolué de manière indépendante. Le hasard des mutations aurait produit la rencontre d'un futur récepteur avec ce qui deviendra son ligand, cette combinaison étant sélectionnée dans la mesure où elle s'avérait favorable. La liaison aurait été renforcée par des mutations sélectives et les duplications des gènes produisent de nombreux couples récepteurs – ligands. Or, les changements rapides et profonds de notre environnement physique et social, en raison de nos propres actions, mettent ces mécanismes adaptatifs endocriniens, neuroendocriniens et nerveux en porte-à-faux et il en résulte des pathologies nouvelles. Ces pathologies sont devenues des problèmes majeurs de santé publique. Elles ont mobilisé des voies de recherche exposées dans l'ouvrage dont je voudrais brièvement présenter les différentes parties.

Le premier chapitre, sur les *cancers hormonodépendants*, a été rédigé par une équipe de neuf spécialistes animée par Henri Rochefort. Certains stéroïdes sexuels stimulent la division cellulaire et, en raison de l'activation d'oncogènes, ou de la perte de gènes suppresseurs, certains cancers peuvent apparaître. Henri Rochefort traite essentiellement des cancers du sein et de la prostate. Une femme sur neuf sera atteinte, 40 000 nouveaux cas par an, incidence doublée en 10 ans et de même 40 % des hommes de plus de 70 ans sont atteints. L'environnement, le mode de vie, l'alimentation, etc., sont des éléments déterminants. Après de longs développements théoriques sur la cancérogenèse hormonale, Henri Rochefort examine en détail les relations entre cancer du sein et l'effet

promoteur de tumeurs des hormones ovariennes. Les aspects génétiques (minoritaires, 5 à 10 %) sont bien analysés. La recherche thérapeutique, basée sur la recherche fondamentale, évolue et des molécules ciblées sur des voies métaboliques nouvelles sont à l'épreuve et même une chimio-prévention est à l'étude. Les recherches sur le cancer prostatique ont également fait des progrès ; des facteurs endocriniens (androgènes) et inflammatoires sont en cause. Les auteurs détaillent aussi les facteurs de risque, dont les pesticides, et rapportent que les acides gras oméga 3 et les antioxydants seraient protecteurs. Enfin, le chapitre analyse les relations entre la recherche fondamentale, la clinique et l'épidémiologie et les auteurs soulignent la lenteur des progrès en médecine contrastant avec l'explosion des connaissances fondamentales, domaine dans lequel la France est bien placée. La prévention est le maître mot des recommandations. Il reste à mieux comprendre les étiologies et les mécanismes initiaux de la cancérogenèse et surtout les facteurs individuels de risque et à trouver les marqueurs prédictifs. Au total, une excellente mise au point, savante et pédagogique, sur un problème majeur de santé publique.

Les deux chapitres suivants, coordonnés par Philippe Bouchard (PU-PH à St Antoine), concernent d'une part « *La contraception, états des lieux, les nouvelles cibles* » et d'autre part « *La réévaluation des modalités et de la place du traitement de la ménopause* ». Ces questions sont au carrefour de la recherche la plus pointue, de la société et de la culture. Le chapitre sur la contraception présente l'histoire des méthodes et les progrès actuels, et bien sûr les modalités d'action physiologiques des moyens proposés. Les inégalités selon les pays et en particulier le drame des régions en développement sont analysés. Des perspectives nouvelles concernent la contraception masculine et ici les recherches s'orientent vers les combinaisons progestatifs/androgènes, les interactions avec le métabolisme, la mobilité et la maturation des gamètes, les spermicides, l'immunocontraception. Il est rappelé que le développement de ces recherches est parfois difficile pour des raisons sociales, légales et économiques et il nécessite la collaboration des secteurs publics et privés. L'autre chapitre concerne la ménopause, période de la vie qui succède à l'épuisement du capital folliculaire ovarien et survient de nos jours à 51 ans en moyenne. Autrement dit, en raison de l'espérance de vie, un tiers de la vie féminine se passe sans hormone sexuelle, oestrogènes en particulier. Les conséquences de ce changement, au niveau du bien-être et de la santé, sont bien connues. Parmi les symptômes, variés, inégalement présents selon les personnes, les auteurs insistent sur la diminution de la masse osseuse et de l'effet protecteur cardiovasculaire. L'ostéoporose post-ménopausique est traitée longuement dans le rapport. Les traitements des symptômes de la ménopause ont évolué, car on ne parle plus de remplacement hormonal, mais ils sont limités dans le temps en raison notamment du risque de cancer du sein. Ce chapitre nous offre aussi une analyse actualisée des faits et controverses et en particulier des leçons à tirer des grandes études épidémiologiques récentes. Les recommandations, détaillées, qui terminent le chapitre insistent sur la personnalisation du

traitement, lequel n'est jamais sans risque, et de l'importance de l'information et du suivi par des contrôles réguliers. En effet, les auteurs nous rappellent en conclusion que les spécialistes ont dû gérer il y a 30 ans la mise en évidence de l'accroissement des cancers de l'endomètre, il y a 10 ans le risque accru de maladies thrombo-emboliques, et plus récemment l'augmentation des cancers du sein.

Le chapitre sur « *Obésité et diabète de type 2* », rédigé par Jean-Paul Riou, (PU-PH à l'hôpital Laënnec), est également d'une grande actualité et illustre bien les relations entre fonctions endocrines et société. Le texte, assez court, relativement conceptuel, est clair et percutant. L'auteur nous informe sur l'explosion de la fréquence de l'obésité, maladie de l'adaptation aux changements de l'environnement hygiéno-diététique. Ces changements concernent l'augmentation de la densité alimentaire, la réduction du coût des calories et de l'activité physique. L'obésité est à l'origine des diabètes de type 2 : 180 millions en 2005, 330 en 2025. Cet énorme problème de santé publique (une des premières causes de mortalité aux États-Unis) touche les jeunes et les milieux défavorisés. Il faut rappeler que la prévalence chez l'enfant, en France, dépasse les 16 % ; 30 % des individus sont caractérisés comme obèses aux États-Unis et 2 millions de sujets sont atteints de diabète de type 2 en France. Le chapitre fait le point sur les aspects les plus récents de la recherche sur l'obésité et sur les liens entre obésité et diabète. Les recherches sur le tissu adipeux ont montré qu'il a des fonctions multiples en particulier endocrines, avec la leptine (qui informe le cerveau de l'état des réserves) et de nombreuses adipokines. Le rôle du cerveau ne se réduit pas aux seules informations de niveau hypothalamique, la glycémie portale y a un rôle plus général. Les auteurs émettent le souhait que les recherches sur les mécanismes du diabète de type 2, avec obésité androïde, insulino-résistance, déficit précoce de sécrétion d'insuline, mobilisent un plus grand nombre de laboratoires en particulier en France où la recherche est bien représentée mais doit être fédérée et s'intégrer aux projets européens. Il faut d'une part une association plus grande avec les neurosciences et l'imagerie métabolique et d'autre part harmoniser les fonctionnements socio-politiques.

Le chapitre « *Hormones, longévité et vieillissement humain* » a été rédigé par un groupe de travail coordonné par Étienne-Émile Baulieu. Cette revue générale est très dense. Les auteurs ont fait des choix et ont concentré leurs analyses sur l'évolution avec l'âge de trois grands systèmes hormonaux : les hormones sexuelles synthétisées par les glandes génitales, avec chez la femme l'arrêt brutal et la ménopause, et chez l'homme un déclin lent et progressif, que d'aucuns ont appelé andropause mais ne nécessitant pas de traitement. Le deuxième système étudié concerne les hormones produites par les glandes corticosurrénales mais la cortisone et l'aldostérone sont peu modifiées. Il n'en est pas de même de la déhydroépiandostérone (DHEA) aboutissant à une « adrénopause », et nous

savons le rôle de leader mondial que joue le laboratoire d'Étienne-Émile Baulieu dans le domaine. Enfin le troisième système, celui de l'hormone de croissance hypophysaire, et l'*Insulin Like Growth Factor 1*. Son importance fonctionnelle se réduit avec l'âge mais ici encore une compensation thérapeutique n'est pas nécessaire. Les auteurs rappellent par ailleurs que chez l'animal des données récentes ont montré une altération des rétrocontrôles des hormones corticotropes à partir de l'hippocampe et de l'amygdale avec réduction de la neurogenèse dans l'hippocampe. En fait ces grands domaines endocriniens ou neuroendocriniens (car ils sont intégrés aux fonctions nerveuses) jouent un rôle dans l'apparition de fragilités (« *frailness* ») liées au vieillissement. Ce concept est très intéressant. Avec l'âge, les individus sont porteurs d'une dérégulation d'un grand nombre de systèmes physiologiques avec parfois une dominante de l'une ou de l'autre ou des fragilités sélectives. Cette fragilité est très certainement un phénomène hormonosensible, créant un déplacement global des diverses régulations, des points d'équilibre homéostatiques, vers plus d'allostasie qui implique un déséquilibre plus global, intersystémique. Les auteurs rappellent qu'il y a d'énormes différences interindividuelles. Nous sommes ici dans une science complexe et nouvelle, mal enseignée, mal coordonnée au plan de la recherche, même pas inscrite dans les domaines sélectionnés par l'ANR.

Les deux derniers chapitres illustrent bien les relations entre hormones, environnement et santé publique. Le chapitre sur les « *Perturbateurs hormonaux* » a été coordonné par Jean-François Savouret, directeur de recherche à l'Inserm. Il concerne ces molécules exogènes, étrangères à la physiologie, appelées xénobiotiques, qui s'immiscent dans les régulations endocriniennes en agissant aux niveaux moléculaires pour les perturber. On y trouve les toxines végétales, les pesticides, les additifs alimentaires, toute une série de composés chimiques résultant des activités humaines et industrielles, répandus dans l'environnement, l'eau, l'alimentation, souvent mal éliminés. Il en résulte des perturbations hormonales, mais aussi neurologiques. L'endocrinotoxicologie est devenue une science moderne et fort complexe. Les auteurs démontrent la subtilité des actions de ces molécules exogènes : ainsi les célèbres dioxines activent des récepteurs dits orphelins, sans ligands connus et génèrent des régulations qui vont perturber des systèmes hormonaux connus. Certaines de ces molécules peuvent être cancérigènes. Ces auteurs insistent sur la nécessité de l'épidémiologie, du développement d'une recherche fondamentale spécialisée et bien évidemment de l'information. Pour le dernier chapitre, Alain Paris, directeur de recherche à l'Inra, a coordonné un groupe de collègues pour une très claire mise au point sur le développement des méthodes zootechniques, de ce qui serait une zootechnie hormonale, et sur les répercussions de ces méthodes pour la santé publique. Les auteurs décrivent les conséquences de la maîtrise de la physiologie des animaux d'élevage et les techniques utilisées, le plus souvent hormonales, dans les domaines de la croissance, l'engraissement, la reproduction, les transferts d'embryons, la production laitière et aussi tout ce domaine en explosion qu'est la

pisciculture intensive. Ici encore les auteurs analysent et évaluent la question des risques toxicologiques résultant de l'usage des hormones en élevage. Les méthodes légales de contrôle et de la maîtrise des conséquences semblent toujours en retard au regard de l'inventivité des pratiques frauduleuses. Les recommandations portent également sur la mise en œuvre de stratégies garantissant un développement plus durable et une traçabilité des produits, ceci dans un environnement scientifique et industriel où les contestations et les divergences sont nombreuses.

Au niveau des recommandations générales, Étienne-Émile Beaulieu et Edwin Milgrom insistent sur le maintien de la position très forte de notre pays pour la recherche en endocrinologie fondamentale. Il faudrait par contre multiplier les ensembles regroupant l'excellence en biologie moléculaire avec des centres d'études structurales tridimensionnelles des protéines. Des actions incitatives dans le domaine de la reproduction féminine sont nécessaires. Enfin il existe un retard considérable en épidémiologie des cancers hormonodépendants, de même pour la prévention primaire de l'obésité, et enfin pour l'évaluation des effets des xénobiotiques. La recherche sur les troubles du vieillissement et la physiopathologie de la fragilité n'est pas au niveau souhaitable.

Pour conclure, ce rapport, par ses thèmes et contenus, devrait avoir un très large impact auprès des enseignants et des étudiants, les biologistes et les médecins, et de tous les collègues intéressés par les rapports entre biologie, environnement et société. Il vient à point nommé car un tel éclairage nous manquait.