

Carence iodée, perturbateurs thyroïdiens et grossesse : conséquences sur le neurodéveloppement

Iodine deficiency, thyroid disrupters and pregnancy: consequences on neuro-development

Françoise Brucker-Davis
Sylvie Hiéronimus

Université Nice Sophia Antipolis, CHU de Nice, service d'endocrinologie, diabétologie, médecine de la reproduction, hôpital l'Archet, Nice, France
<brucker-davis.f@chu-nice.fr>

Résumé. Le bon fonctionnement des voies de signalisation des hormones thyroïdiennes est indispensable à un développement fœtal optimal, en particulier au niveau cérébral. Dès lors, il n'est pas étonnant qu'un apport iodé inadéquat et/ou une exposition à des perturbateurs thyroïdiens (produits de l'environnement susceptibles de perturber l'économie thyroïdienne materno-fœtale à tous ses niveaux) soient responsables d'anomalies cérébrales développementales. Si les effets néfastes de la carence iodée sont classiques et connus depuis longtemps, les risques neurodéveloppementaux liés aux perturbateurs thyroïdiens sont un sujet émergent de santé publique. La vulnérabilité du cerveau pendant le développement fœtal et durant les deux premières années de vie est due à sa croissance forte et rapide, et à la différenciation de cet organe, qui obéit à une chorégraphie bien orchestrée. Ainsi, des fenêtres d'exposition sont définies, avec des effets spécifiques, le plus souvent irréversibles dépendant du « timing » et du type de produit incriminé. La toxicologie des perturbateurs endocriniens diffère de la toxicologie classique par des effets à très faibles doses, suivant des courbes dose-réponse non monotoniques. L'exposition du fœtus et du nourrisson par voie placentaire ou par l'allaitement reflète l'exposition maternelle, à laquelle s'ajoute, après la naissance, une exposition directe de l'enfant. Les preuves expérimentales, *in vitro* et chez l'animal, ainsi que des études épidémiologiques humaines dans le domaine cognitif et comportemental (troubles autistiques, troubles de l'attention/hyperactivité) s'accumulent, devant inciter à des mesures préventives fortes pour cibler les femmes en âge de procréer et les femmes enceintes, afin de protéger les cerveaux des populations à naître.

Mots clés : iode, perturbateurs endocriniens, grossesse, neurodéveloppement

Abstract. Thyroid signalling pathways are mandatory for a harmonious fetal brain development. Thus, it is not surprising that inadequate iodine intake and exposure to thyroid disrupters (environment compounds able to disturb the fetomaternal thyroid economy at all levels) may result in developmental cerebral anomalies. If the deleterious impact of iodine deficiency has long been known, the neurodevelopmental risks linked to thyroid disrupters are an emerging concern. Vulnerability of the developing brain during gestation and the first two years of life is due to the rapid growth and differentiation of this organ, following a precisely timed chronology. Thus are defined windows of exposure with specific, mostly irreversible defects depending on timing of exposure and type of compound. Toxicology of Endocrine Disruptors differentiates itself from classical toxicology with very low dose effects and possibly non monotonic dose-effect responses. Exposure via the placenta and nursing reflects maternal exposure, while after birth, infant's direct exposure is added. Laboratory experimental proofs, as well as human epidemiological studies in the cognitive and behavioral fields (autistic syndromes, Attention Deficit Hyperactivity Disorders) are adding up and should lead to preventive decisions targeting women of reproductive age and pregnant women, to protect the brains of future generations.

Key words: iodine, endocrine disrupters, pregnancy, neuro-development

Médecine
de la **Reproduction**

Tirés à part : F. Brucker-Davis

Les hormones thyroïdiennes sont indispensables à la vie et cruciales pour le développement cérébral. Elles influencent la neurogenèse, la migration neuronale, la différenciation des cellules neuronales et gliales, la myélinisation et la synaptogenèse

[1, 2]. Ces séquences développementales définissent des fenêtres de susceptibilité [3, 4]. Les enjeux neurocognitifs existent dès le premier trimestre de la grossesse, qui est une période de vulnérabilité spécifique puisque le fœtus est entièrement

doi:10.1684/mte.2018.0713

dépendant de la fonction thyroïdienne maternelle à ce stade [5]. Des travaux épidémiologiques récents montrent que des anormalement basses, mais également des valeurs trop hautes, du taux de thyroxine (T4) maternelle en début de grossesse pourraient avoir un effet délétère sur le neurodéveloppement et la morphologie cérébrale de l'enfant [6].

La thyroïde maternelle doit s'adapter au stress que constitue la grossesse [5], en augmentant la synthèse des hormones thyroïdiennes afin de couvrir les besoins fœtaux, qui s'ajoutent à ceux de la mère. Pendant cette période, les besoins en *iode* sont accrus [5]. Il est clairement établi depuis longtemps que la carence en iode est délétère sur le développement neurocognitif [7, 8]. D'autres facteurs environnementaux, naturels ou synthétiques, sont susceptibles de perturber l'homéostasie thyroïdienne [9], et sont dénommés *perturbateurs thyroïdiens (PT)*. Ils entrent dans le cadre plus large des perturbateurs endocriniens environnementaux (PEE), dont le concept est apparu dans les années 1990 [10], et qui constituent un problème émergent en santé publique [11]. Ils méritent donc d'être connus des professionnels de santé impliqués dans la périnatalité.

Carence iodée et grossesse

L'iode est un *oligo-élément essentiel* indispensable à la synthèse des hormones thyroïdiennes. L'iode ne peut être fourni à l'homme que par un apport extérieur, essentiellement dans l'alimentation. Les aliments les plus riches en iode proviennent du milieu marin (algues, mollusques, crustacés et poissons d'origine marine). Dans les pays industrialisés, le lait, les œufs et les produits laitiers constituent la première source d'apport, notamment chez les enfants, de même que le sel enrichi en iode. De nombreux programmes de santé publique ont d'ailleurs fait du sel le principal vecteur d'apport iodé pour éradiquer les carences [12], ce qui est cependant problématique pendant la grossesse, période où on recommande plutôt une baisse des apports sodés.

Les besoins quotidiens en iode varient en fonction des différents âges de la vie et de certaines situations physiologiques comme la grossesse. Les besoins en iode nécessaires pour assurer une fonction thyroïdienne maternelle normale sont estimés à 200-250 µg/j [13] et ceci ne peut le plus souvent être obtenu que par une supplémentation des femmes enceintes par vitamines de grossesse iodées (150 à 200 µg/j), idéalement engagée en période préconceptionnelle [13, 14].

La carence iodée est traditionnellement définie, à l'échelon d'une population de femmes enceintes, par une iodurie inférieure à 150 µg/L ; ce dosage est variable d'un jour à l'autre et n'a pas d'intérêt à l'échelon individuel

[8]. Elle reste la première cause de déficit neurocognitif évitable selon l'Organisation mondiale de la santé (OMS). Dans les situations extrêmes, telles qu'observées dans certains pays en développement, la carence iodée sévère (iodurie < 20 µg/L) peut avoir des conséquences dramatiques, comme un déficit mental profond et irréversible (crétinisme endémique) [15]. Les études d'intervention ont clairement montré que, dans ces situations, une supplémentation iodée avant ou très tôt pendant la grossesse permettait d'éradiquer les nouveaux cas de crétinisme [16] et d'accroître d'une manière générale les scores de développement des jeunes enfants de 10 à 20 % [8].

La situation de carence légère (iodurie comprise entre 100 et 150 µg/L) ou modérée (20 à 100 µg/L) peut être responsable pendant la grossesse de modifications morphologiques thyroïdiennes maternelles et fœtales à type d'hyperplasie et de goitre [8]. Ses conséquences éventuelles sur le développement neurocognitif des enfants demeurent néanmoins discutées dans la littérature [8, 14, 17]. Le bénéfice d'une supplémentation iodée systématique des femmes enceintes à fonction thyroïdienne normale est de fait difficile à appréhender, notamment en raison de la multiplicité des facteurs susceptibles d'impacter le développement neuropsychologique, entre autres les PE [18]. Il a cependant été montré qu'elle est particulièrement bénéfique chez les fumeuses [19]. En France, si la situation s'est améliorée dans la population générale, on observe encore une carence légère chez la majorité des femmes enceintes [20-22], qui milite donc en faveur d'une supplémentation iodée systématique pendant la grossesse. De plus, la carence iodée au cours de la grossesse est susceptible de décompenser une affection thyroïdienne chez les femmes prédisposées aux dysthyroïdies (anamnèse et examen clinique) justifiant un dépistage ciblé dans ces populations.

Perturbateurs thyroïdiens et grossesse

Les PT peuvent être classés en fonction de leur origine, naturelle ou synthétique, (*tableau 1*) et de leur mode d'action (*tableau 2*) [9, 11, 23].

Les PT d'origine naturelle existent dans l'environnement depuis toujours et ont des propriétés goitrigènes connues depuis longtemps. Dans nos populations, le tabac, source de thiocyanate et de cadmium, est le principal PT « naturel », ce qui justifie une aide active au sevrage tabagique pendant la grossesse chez la femme enceinte et son entourage (tabagisme passif).

Les PT synthétiques environnementaux sont au centre de nos préoccupations. Il s'agit de produits de l'industrie phyto-agro-alimentaire ou de produits industriels, déversés en grande quantité dans l'environnement

Tableau 1. Classification des perturbateurs thyroïdiens (liste non exhaustive).

Naturels (substances goitrigènes)	Alimentaires : thiocyanate, glucosides cyanogéniques, disulfides, isoflavones. Tabac : thiocyanate, cadmium
Synthétiques	
<i>Médicamenteux</i>	Intentionnels : antithyroïdiens de synthèse, iode 131, perchlorate, lithium Effets indésirables thyroïdiens non intentionnels : – produits iodés : amiodarone, produits de contraste radiologiques – lithium – immunomodulateurs : interféron, <i>immune check point inhibitors</i> (anti-PD1, anti-CTLA-4) – autres : dihydan
<i>Environnementaux</i>	Pesticides, produits « phytosanitaires » Industriels : polluants organiques persistants, métaux lourds, plastiques Perchlorate (fusées, explosifs) Pollution nucléaire (centrale nucléaire, bombe atomique) <i>Cosmétiques, produits d'hygiène corporelle</i>

Tableau 2. Cibles et mécanismes d'action des perturbateurs thyroïdiens.

Niveau d'action	Produits
Synthèse des hormones thyroïdiennes	
Compétition ou inhibition de la captation d'iode (NIS)	Perchlorate, lithium, phtalates, thiocyanate, bromate, nitrate
Inhibition de l'enzyme TPO	BPA, nonylphénol, amitrole Éthylène thiourée, isoflavones
Inhibition du récepteur à la TSH	DDT, PCB
Transport plasmatique	
TTR (TBG)	PCB, dioxine, PBB, BPA, HCB Phtalates, pentachlorophénol
Métabolisme des hormones thyroïdiennes	
Induction enzymatique hépatique (UDPGT/sulfatase)	PCB, dioxine, perfluorés, BPA PBB, acétochlore
Désiodases tissulaires	PCB, méthoxyclore, plomb, cadmium Perfluorés, dioxine, styrènes, filtres UV
Transport cellulaire	Chlordane, phtalates
Liaison aux récepteurs aux HT	OH-PCB, PBB, BPA, HCB, phénols
Tumorigenèse thyroïdienne	pesticides (acétochlore) Radiations ionisantes
Processus auto-immun	PBDE, méthylcholantrène, furanes, PCB
Set-point hypothalamo-hypophyso-thyroïdien	Tétrabromo-BPA, tributyltine, plomb

La perturbation de l'un de ces points d'impact, documentée de manière expérimentale *in vivo* ou *in vitro*, ne résulte pas forcément en une conséquence clinique dans l'espèce humaine. C'est une indication d'un risque potentiel. NIS : symporteur de l'iode, TPO : thyroperoxydase, BPA : bisphénol A, DDT : dichlorodiphényltrichloroéthane, PCB : polychlorobiphényles, TTR : transthyrétine, TBG : globuline liant la thyroxine, PBB : polybromobiphényles, récepteurs aux HT : récepteurs aux hormones thyroïdiennes, HCB : hexaschlorobenzène, UDPGT : uridine diphosphate glucuronyl transférase

(intentionnellement dans le cas des pesticides) depuis la deuxième partie du xx^e siècle. Ils sont à l'origine d'une modification rapide de notre environnement, sans précédent dans l'histoire de notre planète [10]. Tous

les domaines sont concernés : industrie alimentaire, cosmétiques, pesticides, produits industriels, peintures, solvants, plastiques (phtalates, bisphénol A), métaux lourds, retardateurs de flamme, dioxines (provenant des

incinérateurs), etc. Toutes les voies de contamination sont concernées : orale, respiratoire, cutanée, mais aussi, bien sûr, la voie transplacentaire et l'allaitement – très préoccupantes dans le contexte de périnatalité [24]. Parmi les produits industriels les mieux étudiés, on peut citer les biphényles polychlorés (PCB) et leurs métabolites hydroxylés, les phtalates, les dérivés du dichlorodiphényltrichloroéthane (DDT) [9, 23, 25]. Certains produits comme les PCB et le DDT ont été interdits, en France, depuis les années 1970, pour leur toxicité générale, mais leur caractère persistant, tant au niveau des tissus biologiques que dans l'environnement, fait que les populations actuelles restent très significativement exposées, *in utero* puis *via* l'allaitement maternel, et par consommation d'eau et d'aliments contaminés.

Les mécanismes d'action sont multiples, touchant potentiellement tous les niveaux de l'homéostasie thyroïdienne (tableau 2) [1, 11, 23]. Les règles de la toxicologie classique sont très mal adaptées aux PEE, puisque leurs effets sont très souvent observés à très faible dose, en suivant des courbes non monotoniques, classiquement des courbes en U [26].

Les modalités de l'exposition sont importantes : exposition ponctuelle ou continue, à dose forte ou faible, à des moments clés de vulnérabilité (étapes clés dans le développement du cerveau). Le caractère persistant de certains produits les rend plus dangereux, en particulier pour les substances lipophiles, facilement stockées dans le tissu adipeux. Les co-contaminations avec certains produits peuvent également causer un effet additif voire synergique, connu sous le nom d'« effet cocktail » [23]. De plus, la capacité d'un individu à éliminer les polluants environnementaux dépend du polymorphisme génétique de ses enzymes hépatiques de détoxification [27]. Enfin, la capacité du produit à passer le placenta, la barrière hématoencéphalique ou hémato-méningée rend compte du risque neurocognitif développemental.

Par analogie avec la carence en iode, le souci majeur lors de l'exposition *in utero* à des PT est l'effet sur le développement neurocognitif [2, 3]. En effet, certains PT, tels que les PCB, sont des neurotoxiques connus, ayant fait l'objet de nombreuses études, bien que leur toxicité puisse s'exercer par de multiples mécanismes, thyroïdiens ou non [25, 28-30]. Plusieurs méta-analyses ont été réalisées pour les PCB, qui sont un groupe de produits hétérogènes (209 congénères avec ou sans activité dioxine-like) et qui, globalement, induisent des effets neurotoxiques pléomorphes après exposition *in utero* [2, 28]. Il y a des arguments solides en faveur d'une association négative entre exposition *in utero* aux PCB et fonctions cognitives [28, 31]. Outre une atteinte du fonctionnement cognitif exécutif, des anomalies dans le domaine moteur, de la mémoire de reconnaissance visuelle et du langage verbal ont été rapportées [28, 31], ainsi que des troubles du comportement à type de troubles de l'attention/hyperactivité [32].

Dans une série personnelle, nous avons montré chez les enfants de femmes au bilan thyroïdien normal pendant la grossesse que l'exposition au PCB 118 était associée à un moins bon score de développement du langage (test de Bailey) [18]. Hormis les PCB, bien d'autres classes de produits neurotoxiques ont été rapportées, comme les pesticides ou les métaux lourds [32]. Devant l'augmentation récente et inquiétante de la fréquence de l'autisme et des maladies associées, des facteurs environnementaux sont également suspectés. Une revue récente de la littérature fait état d'associations positives consistantes avec cette hypothèse [33]. Il faudra cependant plus d'études pour retenir un lien concluant.

On voit bien que l'enjeu de l'exposition à des produits PT pendant le développement est celui du pronostic cognitif et comportemental, avec ses aspects à l'échelon individuel mais aussi collectif, puisque des calculs ont été réalisés, qui montrent un impact financier négatif à l'échelon de la société pour chaque point de quotient intellectuel perdu [34]. Cela justifie des décisions politiques, aux échelles nationale et internationale, éclairées par des rapports d'experts ou des prises de position de sociétés savantes [35, 36].

Perspectives et considérations pratiques

Devant les enjeux neurocognitifs, les recommandations devraient inclure, en l'état actuel de nos connaissances :

- une supplémentation iodée, idéalement dès la période préconceptionnelle, comme pour la supplémentation en acide folique ; elle est particulièrement bénéfique chez les fumeuses,
- une aide au sevrage tabagique,
- un dépistage ciblé des maladies thyroïdiennes (par anamnèse et examen clinique),
- des mesures visant à limiter l'exposition « évitable » des femmes enceintes aux PT : cosmétiques, usage domestique des pesticides, travaux de peinture dans la maison, etc. Des conseils d'éducation spécifiques sur l'alimentation et les modes de préparation des aliments pourraient être délivrés, au mieux lors d'une consultation préconceptionnelle.

Liens d'intérêt : Les auteurs déclarent n'avoir aucun lien d'intérêt en rapport avec cet article.

Références

1. Gilbert ME, Rovet J, Chen Z, Koibuchi N. Developmental thyroid hormone disruption: prevalence, environmental contaminants

- and neurodevelopmental consequences. *NeuroToxicol* 2012;33: 842-52.
2. Mughal BB, Fini J-B, Demeneix BA. Thyroid-disrupting chemicals and brain development: an update. *Endoc Conn* 2018;7: R160-86.
 3. Préau L, Fini JB, Morvan-Dubois G, Demeneix B. Thyroid hormone signaling during early neurogenesis and its significance as a vulnerable window of endocrine disruption. *Biochim Biophys Acta* 2015; 1849: 112-21.
 4. Zoeller RT, Rovet J. Timing of thyroid hormone action in the developing brain: clinical observations and experimental findings. *J Neuroendocrinol* 2004; 16: 809-18.
 5. Caron P, Glinoe D. Modifications des paramètres thyroïdiens chez la femme enceinte. *Reprod Hum Horm* 2001; 14: 663-71.
 6. Korevaar TI, Muetzel R, Medici M, et al. Association of maternal thyroid function during early pregnancy with offspring IQ and brain morphology in childhood: a population-based prospective cohort study. *Lancet Diabetes Endocrinol* 2016; 4: 35-43.
 7. Delange F. Iodine deficiency as a cause of brain damage. *Postgrad Med J* 2001; 77: 217-20.
 8. Zimmermann MB. The effects of iodine deficiency in pregnancy and infancy. *Paed Perinat Epidemiol* 2012; 26(suppl 1): 108-17.
 9. Brucker-Davis F. Effects of environmental synthetic chemicals on thyroid function. *Thyroid* 1998; 8: 827-56.
 10. Colborn T, Clement C, eds. *Chemically-induced alterations in sexual and functional development: the wildlife/human connection*. Princeton, New Jersey: Princeton Scientific publishing Co, 1992.
 11. Brucker-Davis F, Hiéronimus S, Fénelich P. Thyroïde et environnement. *Presse Med* 2016; 45: 78-87.
 12. UNICEF, WHO, ICCIDD. *Indicators for assessing iodine deficiency disorders and their control through salt iodization*. Geneva: WHO, 1994.
 13. Andersson M, de Benoist B, Delange F, Zupan J. WHO secretariat on behalf of the participants to the consultation. Prevention and control of iodine deficiency in pregnant and lactating women, and in children less than 2 years of age: conclusions and recommendations of the technical consultation. *Public Health Nutr* 2007; 10: 1606-11.
 14. Robinson SM, Crozier SR, Miles EA, et al. Preconception maternal iodine status is positively associated with IQ but not with measures of executive function in childhood. *J Nutr* 2018; 148: 1-8.
 15. Delange FM. Endemic cretinism. In : Braverman LE, Utiger RD, eds. *The thyroid*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2000.
 16. DeLong GR, Cao X-Y, Jiang X-M, et al. Iodine supplementation of a cross section of iodine-deficient pregnant women: does the human fetal brain undergo metamorphosis?. In : Stanbury JB, Delange F, Dunn JT, Pandav CS, eds. *Iodine in pregnancy*. Delhi: Oxford University Press, 1998.
 17. Gowachirapant S, Jaiswal N, Melse-Boonstra A, et al. Effect of iodine supplementation in pregnant women on child neurodevelopment: a randomized, double blind, placebo-controlled trial. *Lancet Diabetes Endocrinol* 2017; 5: 853-63.
 18. Brucker-Davis F, Ganier-Chauliac F, Gal J, et al. Neurotoxicant exposure during pregnancy is a confounder for assessment of iodine supplementation on neurodevelopment outcome. *Neurotoxicol Teratol* 2015; 51: 45-51.
 19. Hiéronimus S, Ferrari P, Gal J, et al. Relative impact of iodine supplementation and maternal smoking on cord blood thyroglobulin in pregnant women with normal thyroid function. *Eur Thyroid J* 2013; 1: 264-73.
 20. Caron Ph, Glinoe D, Lecomte P, Orgiazzi J, Wémeau JL. Apport iodé en France : prévention de la carence iodée au cours de la grossesse et l'allaitement. *Ann Endocrinol* 2006; 67(2): 81-6.
 21. Orgiazzi J. IDD status in France. *J Endocrinol Invest* 2003; 26: 20-1.
 22. Hiéronimus S, Bec-Roche M, Ferrari P, Chevalier N, Fénelich P, Brucker-Davis F. Statut iodé et fonction thyroïdienne chez 330 femmes de la région niçoise évaluées en deuxième partie de grossesse. *Ann Endocrinol* 2009; 70: 218-24.
 23. Zoeller RT. Environmental chemicals targeting thyroid. *Hormones* 2010; 9(1): 28-40.
 24. Ribas-Fito N, Cardo E, Sala M, et al. Breastfeeding exposure to organochlorine compounds and neurodevelopment in infants. *Pediatrics* 2003; 111(5 pt. 1): 580-5.
 25. Fisher LJ, Seegal RF, Ganey PE, Pessah IN, Kodavanti PRS. Symposium overview: toxicity of non-coplanar PCB. *Toxicol Sci* 1998; 41: 49-61.
 26. Vandenberg LN, Colborn T, Hayes TB, et al. Hormones and endocrine-disrupting chemicals: low-dose effects and non-monotonic dose responses. *Endoc Rev* 2012; 33: 378-455.
 27. Autrup H. Genetic polymorphisms in human xenobiotica metabolizing enzymes as susceptibility factors in toxic response. *Mutat Res* 2000; 464: 65-76.
 28. Boucher O, Muckle G, Bastien CH. Prenatal exposure to PCB: a neuropsychological analysis. *Environ Health Perspect* 2009; 117: 7-16.
 29. Fritsche E, Cline JE, Nguyen N-H, Scanlan TS, Abel J. PCB disturb differentiation of normal human neural progenitor cells: clue of involvement of thyroid hormone receptors. *Env Health Perspect* 2005; 113: 871-6.
 30. Giera S, Bansal R, Ortiz-Toro TM, Taub DG, Zoeller RT. Individual PCB congeners produce tissue- and gene-specific effects on thyroid hormone signalling during development. *Endocrinology* 2011; 152: 2909-19.
 31. Schantz SL, Widholm JJ, Rice DC. Effects of PCB exposure on neuropsychological function in children. *Environ Health Perspect* 2003; 111: 357-76.
 32. Polańska K, Jurewicz J, Hanke W. Review of current evidence on the impact of pesticides, polychlorinated biphenyls and selected metals on attention deficit /hyperactivity disorder in children. *Int J Occup Med Environ Health* 2013; 26: 16-38.
 33. De Cock M, Maas YGH, van de Bor M. Does perinatal exposure to endocrine disruptors induce autism spectrum and attention deficit hyperactivity disorders? Review. *Acta Paediatr* 2012; 101: 811-8.
 34. Bellanger M, Demeneix B, Grandjean P, Zoeller RT, Trasande L. Neurobehavioral deficits, diseases and associated costs of exposure to endocrine-disrupting chemicals in the European Union. *J Clin Endocrinol Metab* 2015; 100: 1256-66.
 35. ANSES: rapport collectif d'expertise. *Méthode d'évaluation des risques sanitaires liés à la présence de substances reprotoxiques et/ou perturbatrices endocriniennes dans les produits de consommation*. ANSES, 2013.
 36. Diamanti-Kandarakis E, Bourguignon J-P, Giudice LC, et al. Endocrine-disrupting chemicals: an Endocrine Society statement. *Endocr Rev* 2009; 30: 293-342.