

# IMPACTS SUR LA SANTÉ DES CONTAMINANTS ENVIRONNEMENTAUX : COHORTE SEPAGES



**Dr Isabelle Pin – PI de la cohorte SEPAGES, Pneumo-pédiatre au CHU de Grenoble-Alpes**  
**Sarah Lyon-Caen – Coordinatrice de la cohorte SEPAGES , Ingénieur de Recherche Inserm**

Equipe d'Epidémiologie Environnementale appliquée à la reproduction et à la santé respiratoire  
dirigée par Rémy Slama  
Inserm U1209 – CNRS –UGA  
Institute for Advanced Biosciences – joint research center



# EFFETS SANITAIRES CERTAINS OU TRÈS PROBABLES DES POLLUANTS ATMOSPHÉRIQUES

## Poumons

- Inflammation
- Stress oxydatif
- Exacerbation de la broncho-pneumopathie chronique obstructive (BPCO), de l'asthme
- Diminution de la fonction respiratoire
- Cancer du poumon

## Cœur

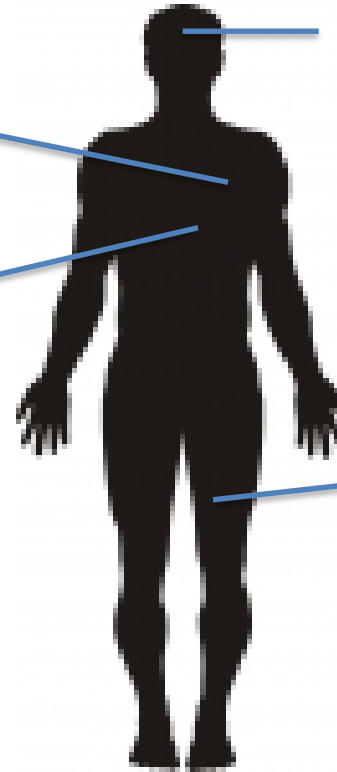
- Altération de la fonction cardiaque
- Stress oxydatif
- Augmentation de l'ischémie cardiaque
- Augmentation du risque d'infarctus

## Cerveau

- Augmentation de l'ischémie cérébrale

## Circulation sanguine

- Coagulation augmentée
- Athérosclérose
- Dysfonction endothéliale
- Hypertension, vasoconstriction



Ces connaissances ont entraîné la mise en place d'une réglementation dans la majorité des pays industrialisés

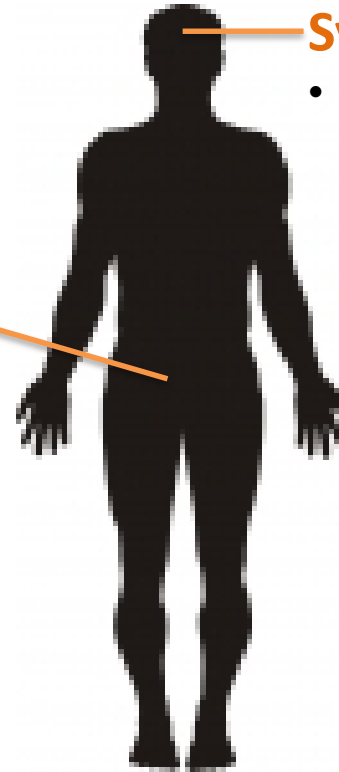
USA à partir de 1950, France et UE à partir de 1970-80

# EFFETS *SUSPECTÉS* DES POLLUANTS ATMOSPHÉRIQUES



## Reproduction et fertilité

- Diminution du poids de naissance et augmentation du risque de petit poids de naissance à terme (Pedersen, Lancet Respiratory Medicine, 2013)
- Augmentation du risque de pré-eclampsie (Pedersen, Hypertension, 2014)
- Mortalité post-natale
- Altération de la spermatogenèse ?
- Diminution de la fertilité des couples ? (Slama, Epidemiology 2013)
- Augmentation du risque de naissance prématurée ? (Giorgis-Allemand, Am J epi 2017)



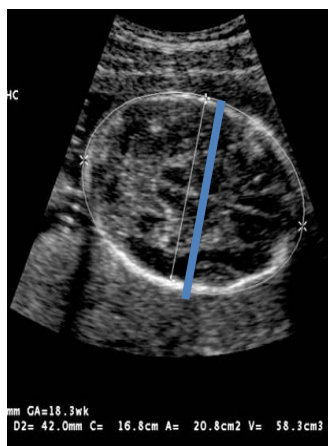
## Système nerveux central

- Neurodéveloppement (après une exposition intra-utérine), trouble du comportement, autisme (Volk, JAMA Ped, 2013; Becerra, EHP, 2013 ; Raz, EHP, 2015)

Des questions qui suscitent un intérêt croissant pour les expositions subies durant la vie fœtale et les premières années de vie.

# ADJUSTED VARIATIONS\* IN BIPARIETAL DIAMETER ASSOCIATED TO MATERNAL BENZENE EXPOSURE (272 non-smoking women, Eden cohort)

Air pollution

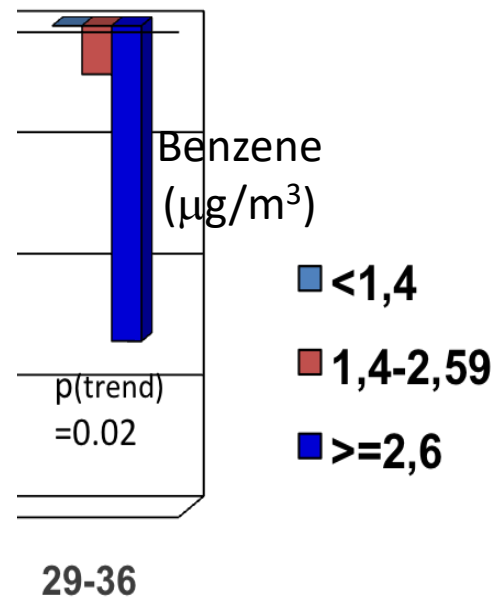


Biparietal diameter, mm  
Reference: exposure < 1.4

0  
-1  
-2



Fetal growth

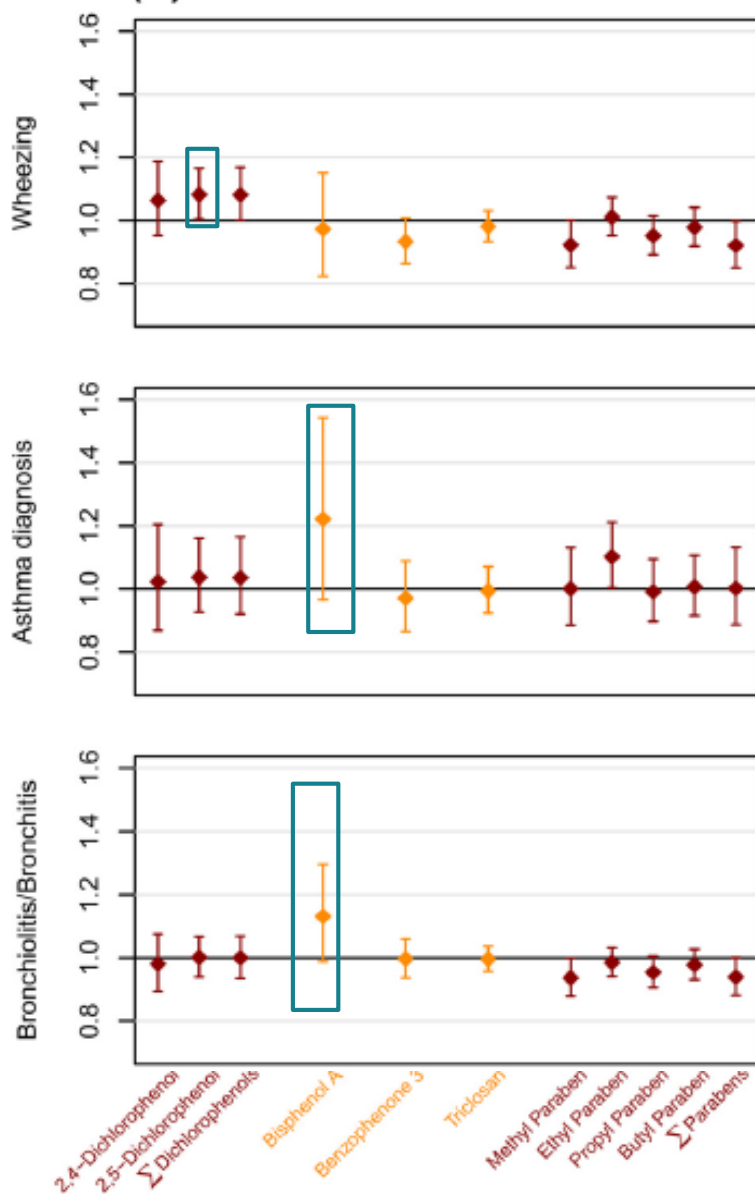


Gestational age at the ultrasound examination (weeks)

\* Adjusted for gestational age, sex of offspring, maternal passive smoking, pre-pregnancy weight, height, parity, education level, month of conception and recruitment centre (3 distinct linear regression models).

(Slama et al, *EHP*, 2009)

# ADJUSTED ASSOCIATIONS\* OF PHENOLS CONCENTRATIONS WITH RESPIRATORY OUTCOMES (587 boys, Eden cohort)



- **2.5 dichlorophenol** pregnancy concentration tended to be associated with an increased incidence of wheeze
- **Bisphenol A** pregnancy concentration tended to be associated with an increased rates of Asthma and of bronchiolitis/bronchitis

\*Adjusted for center, residence area, parental history of asthma/allergies, maternal ethnicity, maximal parental education level, passive or active smoking during pregnancy, postnatal passive smoking, older siblings, child care

- DOHaD
  - Etude, à court et long terme, des effets sur la santé des expositions subies au cours des premières années de vie.
  - Implique de mesurer précisément les expositions dans les premières années de vie (incluant la période de pré-conception)
- Polluants chimiques
  - Beaucoup de produits chimiques actuels ont une courte demi-vie
  - Se baser sur un échantillon biologique pour caractériser l'exposition à ces polluants avec une courte demi-vie entraîne des erreurs de mesures importantes (*Perrier, Epidemiology, 2016*)
- Polluants atmosphériques
  - Le budget espace temps des mères et des enfants a rarement été pris en compte dans les cohortes
  - Les femmes, en Europe et en Amérique, passent en moyenne 70-80% de leur temps à l'intérieur. Les niveaux en intérieur diffèrent parfois de manière très importants avec les niveaux en extérieur (*Avery, EHP, 2010; Ouidir, Env Int. 2015*)

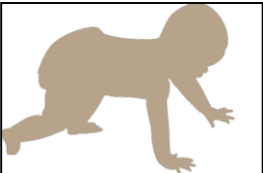
**Recrutement** : cabinets d'échographie de la région grenobloise

## Critères d'inclusion:

- Etre enceinte de maximum 19 SA
- Avoir 18 ans ou plus
- Grossesse unique
- Habiter dans le département de l'Isère à une heure maximum de voiture de Grenoble
- Ne pas envisager de déménager hors de la zone d'inclusion dans les deux premières années de vie de l'enfant
- Prévoir d'accoucher dans l'une des 4 maternités de l'agglomération Grenobloise : Cliniques Belledonne, Mutualiste, des Cèdres, Hôpital Couple Enfant



(n = 484 femmes,  
Grenoble)



---

Naissance



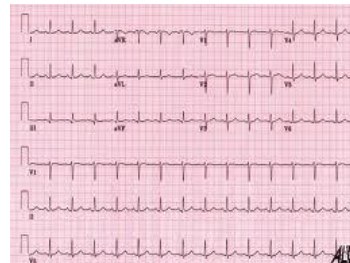
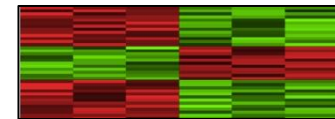
# OBJECTIFS ET DESIGN DE LA COHORTE SEPAGES



Mesures d'expositions à la pollution atmosphérique et aux perturbateurs endocriniens



Delivery



(n = 484 femmes, Grenoble)

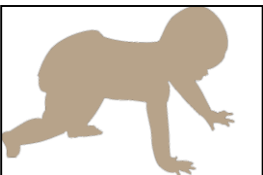
**Mesures échographiques**

**Mesures cardiaques**

**ARN, ADN, biomarqueurs**

**Methylome**  
Expression des gènes, placenta, sang du cordon

Mesures d'expositions à la pollution atmosphérique et aux perturbateurs endocriniens



Naissance

**Test de la fonction**  
(enfant, 2 mois)  
Exhalyzer D from Eco Medics

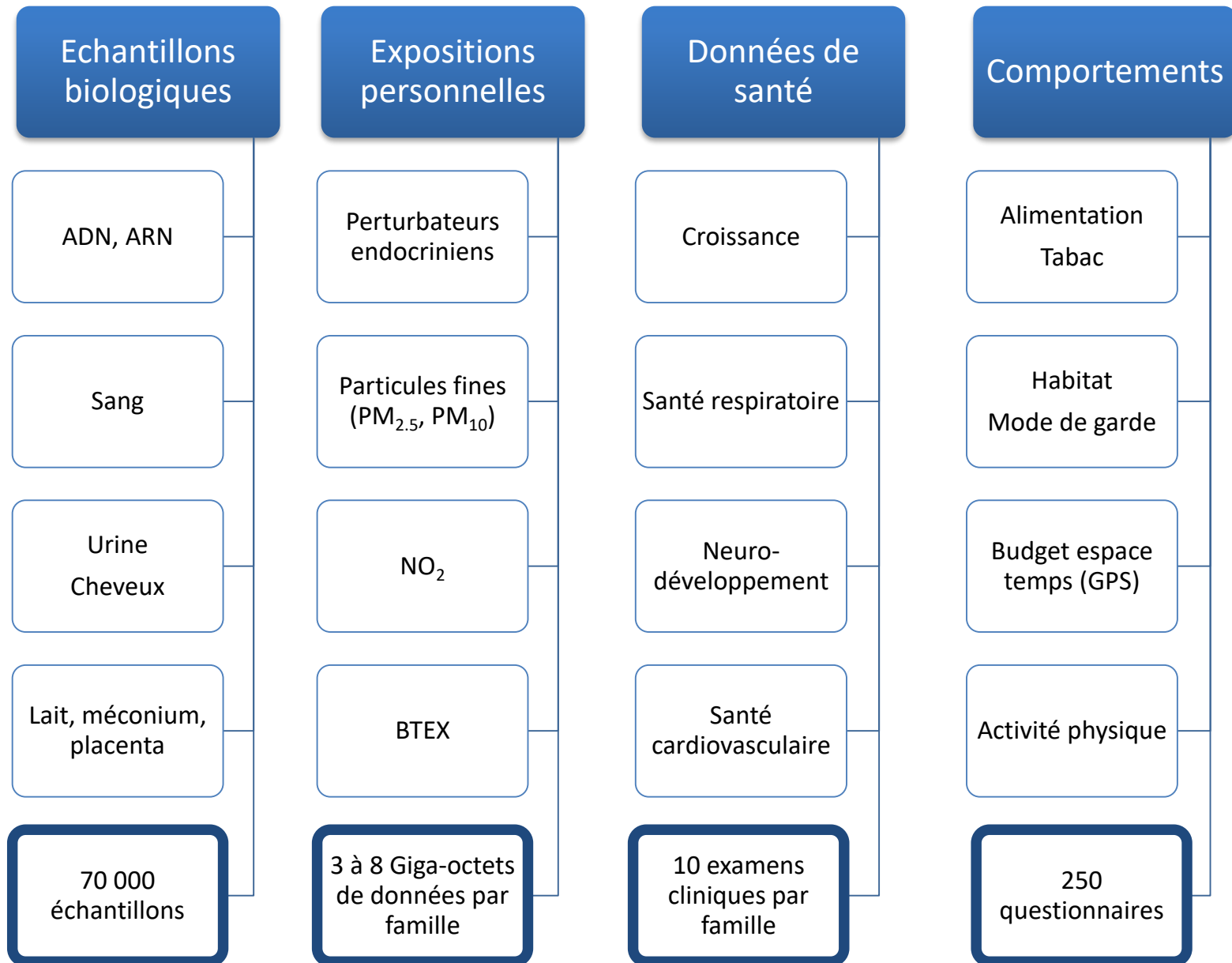
**Croissance post-natal** chaque année :  
examen clinique, questionnaire

**Neuro-development:**  
examen clinique, eye motricity, questionnaires

**ARN, ADN, biomarqueurs**

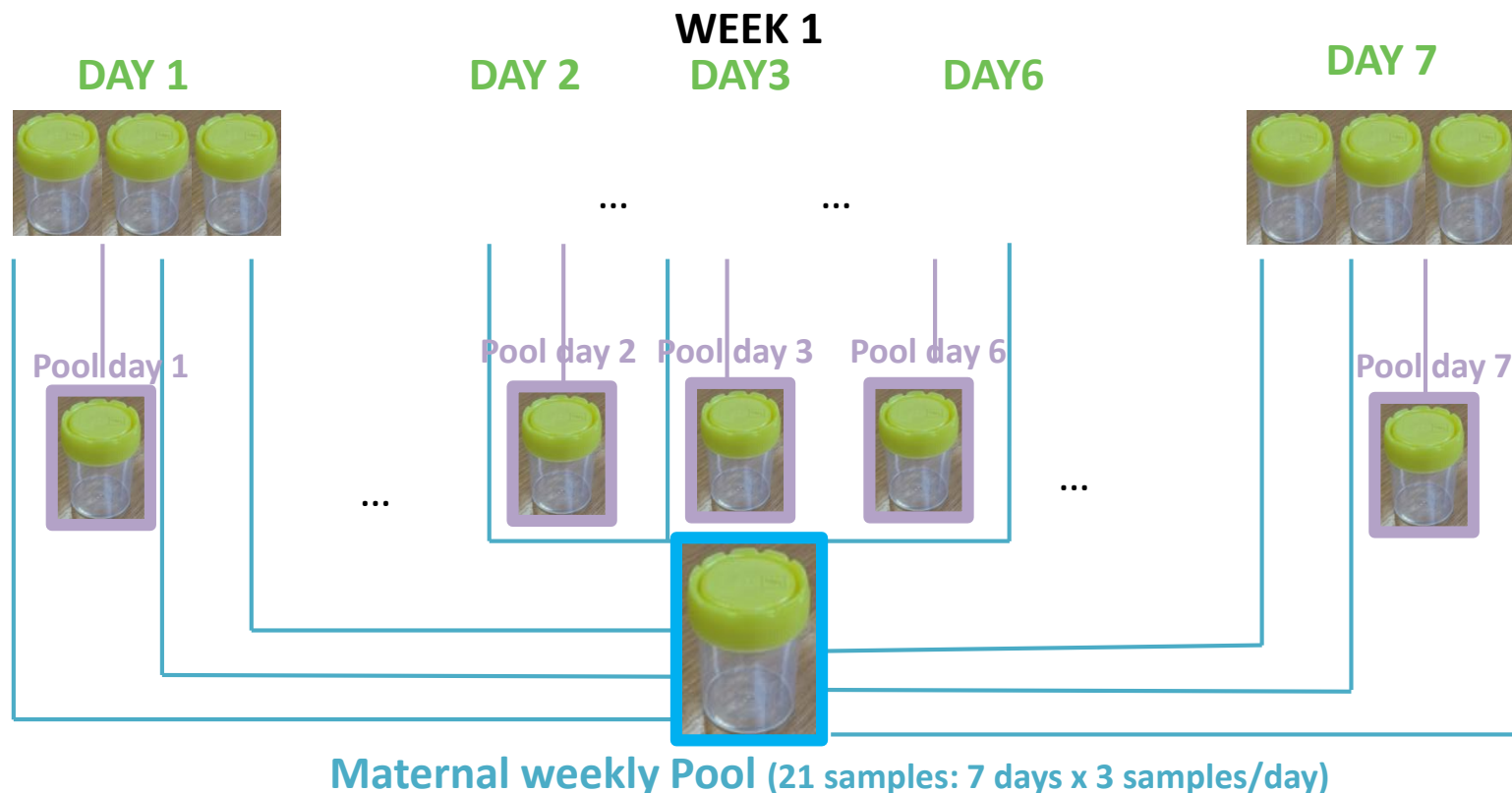


# SEPAGES : UNE PLATEFORME DE RECHERCHE EN SANTÉ ENVIRONNEMENTALE



# MESURES DE L'EXPOSITION AUX POLLUANTS NON PERSISTANTS DANS LA COHORTE SEPAGES

- Entre 60 à 90 échantillons d'urine par famille pour mesurer l'exposition pré et post natale aux perturbateurs endocriniens
- Protocole du pool pour réduire les erreurs de mesures sans trop augmenter le volume d'échantillons d'urine stockés (Perrier, *Epidemiology*, 2016).



**Maternal weekly Pool (21 samples: 7 days x 3 samples/day)**

Weekly pools stored for all women

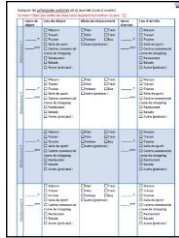
Daily pools and individuals samples stored only for a sub-population

# UNE APPROCHE ORIGINALE POUR MESURES LES EXPOSITIONS AUX POLLUANTS ATMOSPHERIQUES

Expositions de la mère et de l'enfant : mesures personnelles répétées (deux fois une semaine pendant la grossesse et la première année de vie incluant :



GPS



Cahier journalier



Accelerometre



PM<sub>2.5</sub>



Carbone de suie



NO<sub>2</sub>, COV (incl. benzène)

**Budget espace temps**

**Expositions individuelles aux polluants atmosphériques**



Température



UV

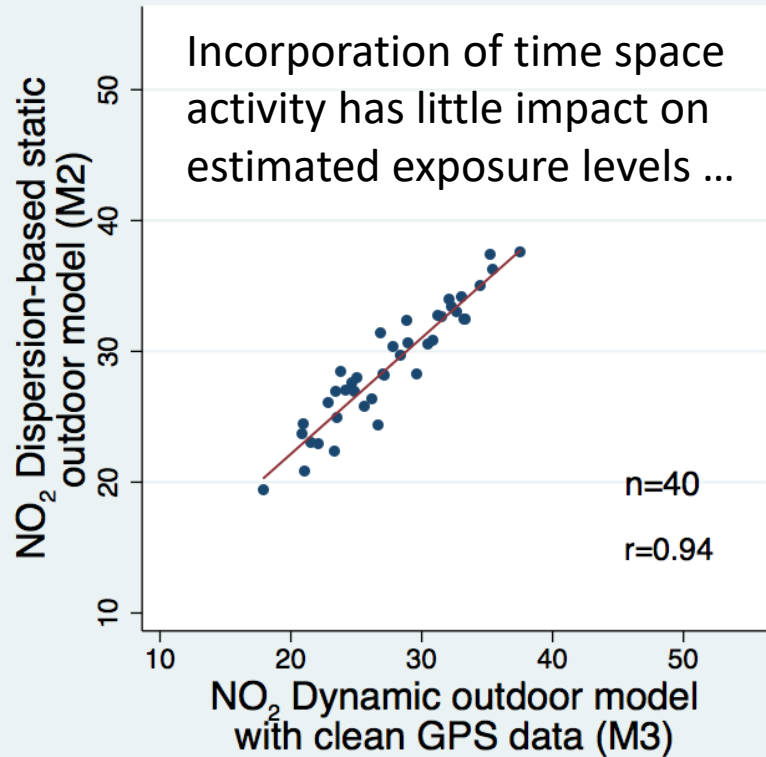


Produits cosmétique et de nettoyage

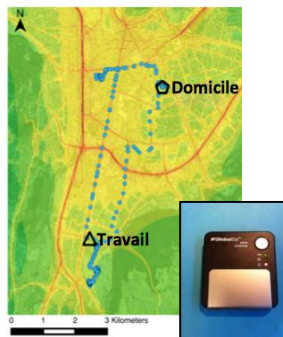
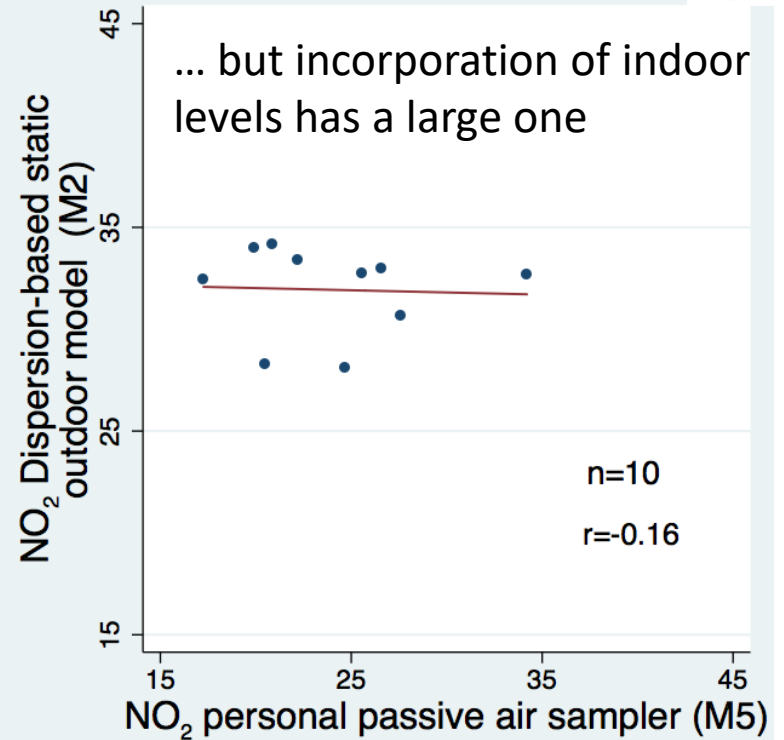
**Expositions individuelles aux autres sources**

# WHY SO MUCH EFFORT? BECAUSE PERSONAL AND OUTDOOR AIR POLLUTION LEVELS ARE POORLY CORRELATED

Incorporation of time space activity has little impact on estimated exposure levels ...



... but incorporation of indoor levels has a large one



# EXAMEN DE LA FONCTION VENTILATOIRE DU NOUVEAU-NÉ

**Questionnaires réguliers** sur la survenue de troubles respiratoires dans l'enfance.

**Examen respiratoire en sommeil naturel** à 6 semaines :

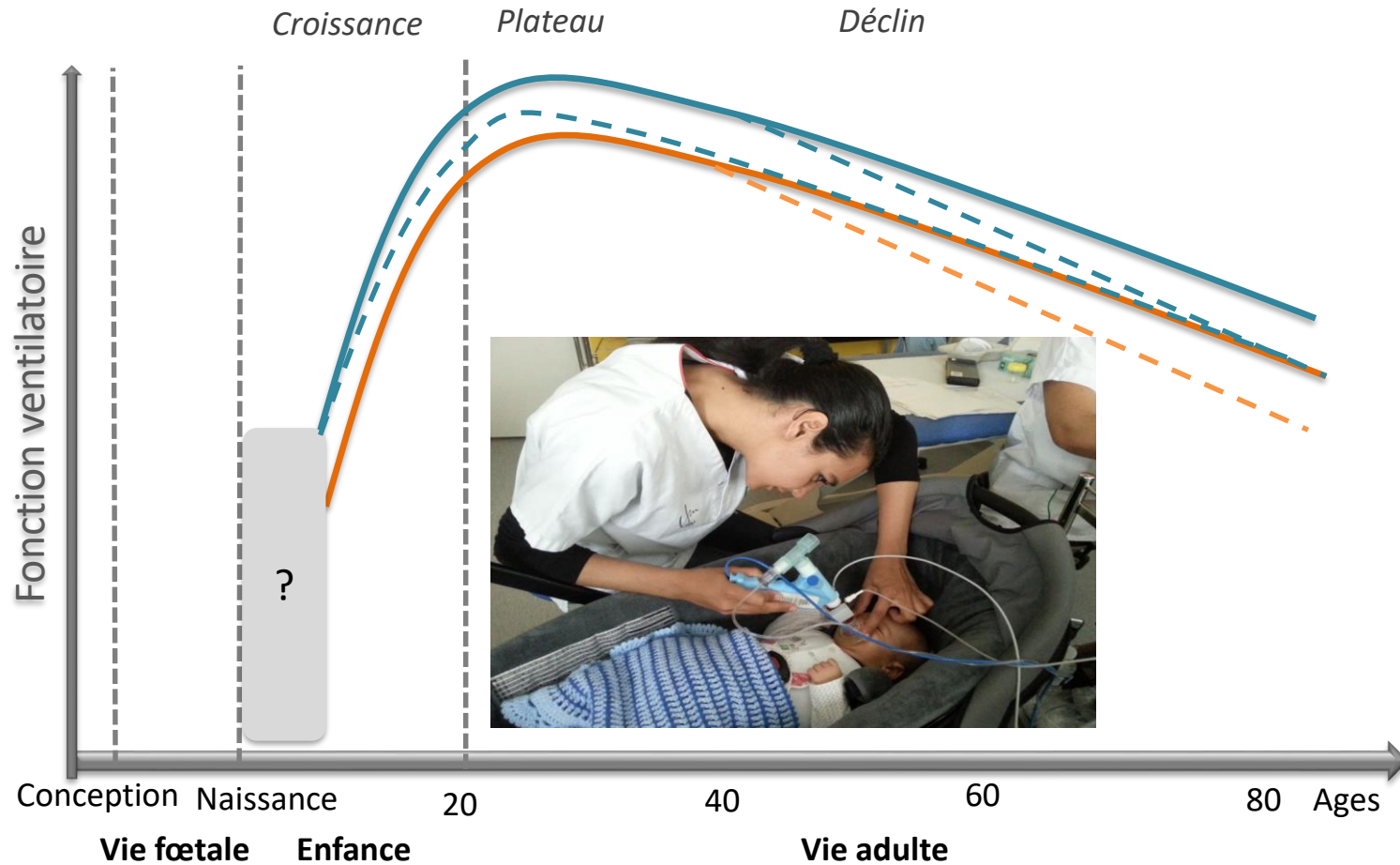
- Mesure des paramètres courants
- Exploration de l'homogénéité de la ventilation = Index de clairance pulmonaire



# APPROCHE VIE ENTIÈRE

L'obstruction bronchique : une composante majeure dans l'asthme

(ERJ 2011; ERJ 2014; AJRCCM 2013; JACI 2009; JACI 2016)





# EXAMEN A TROIS ANS DANS SEPAGES



- **Santé respiratoire**
  - Tests cutanés
  - Mesure de la résistance et de la réactance du système respiratoire par la technique d'oscillations forcées
- **Croissance** : taille poids, périmètre crânien, tension artérielle
- **Neuro-Développement** :
  - Echelle d'intelligence de wechsler pour la période pré-scolaire et primaire (WIPSY – IV)
  - Social Responsiveness Scale (SRS)
  - Behavior Rating Inventory of Executive Function (BRIEF)
  - Occulométrie (au babylab avec des mesures également à un et deux ans)
- **Sang** : 10 ml

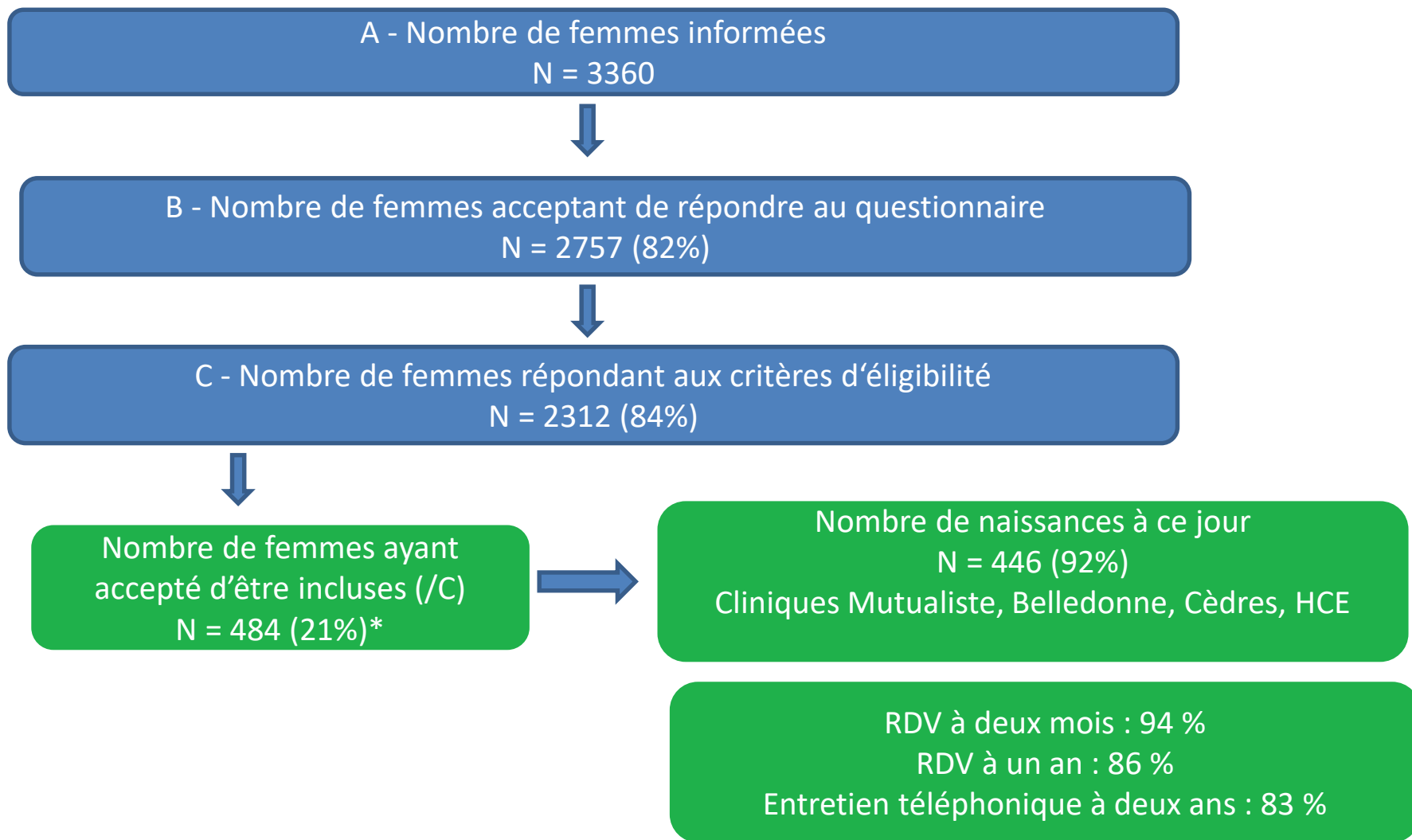


# PREMIERS RÉSULTATS DE LA COHORTE SEPAGES

- Recrutement de population incluse
- PM<sub>2.5</sub>, NO<sub>2</sub>, BTX et poids de naissance
- Santé respiratoire

# RECRUTEMENT DES VOLONTAIRES

(Juillet 2014 à Juillet 2017 – 548 jours de recrutement)



\*25 familles ont abandonné dont 13 au cours de la grossesse, 9 pendant la première année de vie, 1 pendant la deuxième année de vie et 2 pendant la troisième année de vie

# EN QUOI LA VOLONTAIRE SEPAGES EST DIFFERENTE DES FEMMES ENCEINTE VIVANT DANS L'AGGLOMERATION GRENOBLOISE ET EN FRANCE ?

	Femmes incluses dans SEPAGES N = 484	Femmes enceinte vivant dans la région Grenobloise <sup>1</sup> N = 31 693	Femmes enceinte en France <sup>2</sup> N = 14 681
Age moyen (écart type)	32.7 (3.8)	30.4 (5.1)	29.7 (5.3)
Parité, n (%)			
Aucun enfant	45%	44%	43%
1 enfant	45%	36%	41%
2 enfants	9%	13%	5%
3 enfants et +	1%	6%	3%

1- Source : CS8 des enfants nés en 2012 et 2013, domicilié et nés dans les communes SEPAGES reçus au PMI du département de l'Isère

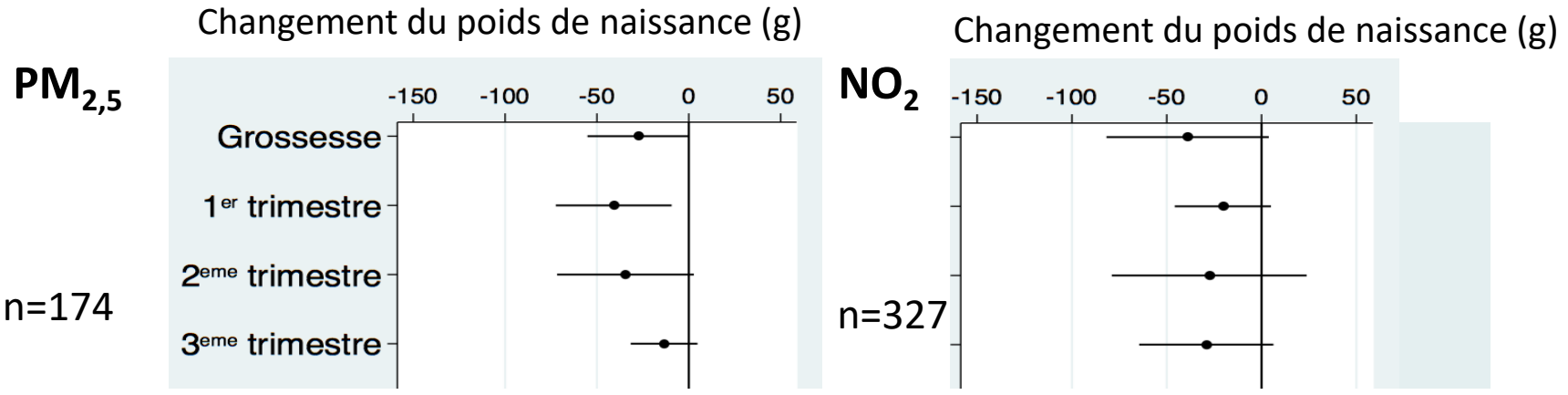
2- Source : Enquête Nationale Périnatale. Mai 2010. Données des femmes françaises de métropole

3- La question n'a pas été posée à toutes les femmes rencontrées dans le cadre de la cohorte SEPAGES

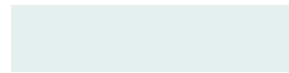
# INTRA-UTERINE PM<sub>2.5</sub> AND NO<sub>2</sub> EXPOSURE AND BIRTH WEIGHT IN SEPAGES



Changement du poids de naissance (g) pour une augmentation de 10 µg/m<sup>3</sup> de PM<sub>2.5</sub> et NO<sub>2</sub>.



Ajustements : poids et taille maternel, parité, sexe de l'enfant, statut tabagique, durée de gestation, niveau d'étude, EDI, niveau d'urbanisation, saison de conception *Ouidir et al. – in press*



# INTRA-UTERINE BENZENE EXPOSURE AND SIZE AT BIRTH IN SEPAGES

Outcome and exposure window	Fully adjusted models <sup>a</sup>		
	n	Change (95% CI) <sup>b</sup>	p
<b>Birth weight</b>			
1 <sup>st</sup> measurement	357	-28 (-55; -1)	0.04
Last measurement	301	10 (-32; 52)	0.64
Pregnancy average	380	-9 (-34; 15)	0.45

•Benzene exposure during the first measurement period was associated with an adjusted birth weight change by -28 g (95% CI, -55; -1), while exposures during the last measurement period and averaged during pregnancy were not clearly associated with birth weight

*First measurement:* Exposure during the first measurement week; *last measurement:* exposure during the measurement week that took place around gestational week 33. Associations with exposure during the intermediate measurement week around gestational week 24 are not reported because of a much lower sample size.

<sup>a</sup> Adjusted for gestational duration (linear and quadratic terms), offspring sex, maternal smoking, parity (3 categories), maternal education, height (continuous) and pre-pregnancy weight

<sup>b</sup> Changes are reported for a 1 µg/m<sup>3</sup> increase in benzene exposure and are reported in grams (birth weight) or mm (head circumference).





# INTRA-UTERINE BENZENE EXPOSURE AND SIZE AT BIRTH IN SEPAGES

Outcome and exposure window	Fully adjusted models <sup>a</sup>		
	n	Change (95% CI) <sup>b</sup>	P
<b>Birth weight</b>			
1 <sup>st</sup> measurement	357	-28 (-55; -1)	0.04
Last measurement	301	10 (-32; 52)	0.64
Pregnancy average	380	-9 (-34; 15)	0.45
<b>Head circumference</b>			
1 <sup>st</sup> measurement	352	-1.7 (-2.6; -0.7)	<5.10 <sup>-4</sup>
Last measurement	312	-0.9 (-1.6; 0.0)	0.04
Pregnancy average	375	-1.2 (-2.0; -0.4)	0.003

• Benzene exposure during the first measurement period was associated with an adjusted birth weight change by -28 g (95% CI, -55; -1), while exposures during the last measurement period and averaged during pregnancy were not clearly associated with birth weight

• Benzene exposures during the first and last measurement periods, as well as averaged during pregnancy, were associated with decreases in head circumference

*First measurement:* Exposure during the first measurement week; *last measurement:* exposure during the measurement week that took place around gestational week 33. Associations with exposure during the intermediate measurement week around gestational week 24 are not reported because of a much lower sample size.

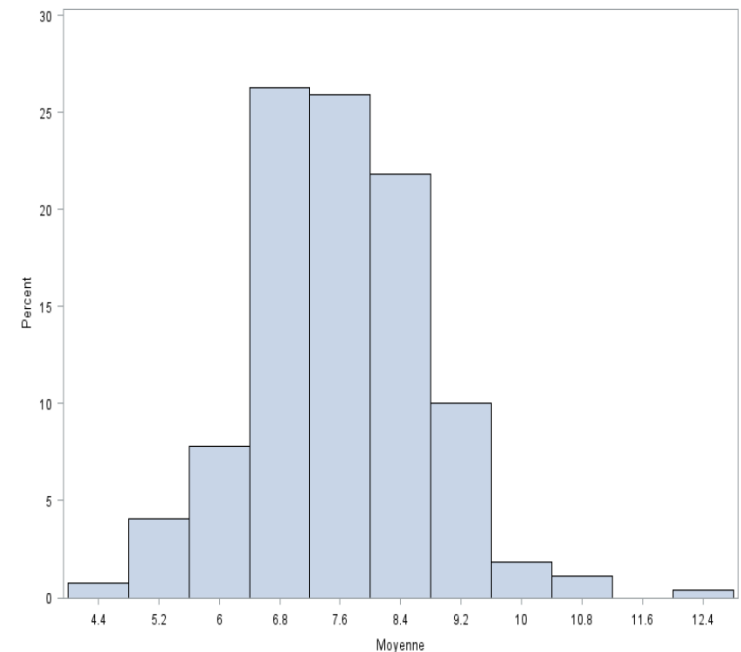
<sup>a</sup> Adjusted for gestational duration (linear and quadratic terms), offspring sex, maternal smoking, parity (3 categories), maternal education, height (continuous) and pre-pregnancy weight

<sup>b</sup> Changes are reported for a 1 µg/m<sup>3</sup> increase in benzene exposure and are reported in grams (birth weight) or mm (head circumference).



# FONCTION VENTILATOIRE DU NOUVEAU-NÉ

- **Une première analyse sur la LCI sur 322 enfants** (682 tests au total) qui ont eu un test avec la technique N2MBW (âge moyen (sd): 49.1 (6.84) jours ; 44.8% filles) indique :
  - **La faisabilité** de la mesure : 270 (83.4%) enfants ont eu au moins un test acceptable et la majorité (65%) ont eu 3 test acceptable .
  - **La fiabilité** de la mesure : le coefficient de variation moyen(sd) = 6.74 (5.25); ICC (95%CI) = 0.75 (0.69, 0.79)
  - **La validité externe de la mesure** : la distribution de la moyenne de la LCI observée dans notre population (moyenne(sd) = 7.58 (1.17)) est similaire à la distribution observée dans d'autres études (6.75(0.57) *Fuchs et al, ERJ 2011* and 7.2(0.4) in *Gray et al, Respiriology 2015*))



# EQUIPE SEPAGES

## EQUIPE TERRAIN



K. Gridel  
Enquêtrice,  
en charge du  
recrutement



M. Marceau  
Infirmière,  
en charge du suivi



S. Lyon-Caen  
Coordinatrice de la  
cohorte



M. Graça  
Enquêtrice en  
charge de la  
coordination  
terrain



E. Charvet  
Sage-Femme,  
en charge du suivi



A. Benlakhryfa  
Attachée de  
Recherche Clinique,  
en charge du suivi



Y. Gioria  
Attaché de  
Recherche Clinique,  
en charge du suivi



J. Quentin  
Attachée de Recherche  
Clinique (50%)  
en charge du suivi de  
l'enfant

## EQUIPE SCIENTIFIQUE



Dr I. Pin, pneumo  
Pédiatre,  
Investigatrice  
principale



R. Slama, directeur de  
recherche  
Responsable  
scientifique



V. Siroux  
chercheur



J. Lepeule  
chercheur



C. Philippat  
chercheur



K. Supernant  
Gestionnaire  
de la base de  
données

# CONCLUSION

- La cohorte SEPAGES est une des premières cohortes à :
  - avoir des mesures personnelles et répétées d'exposition à la pollution atmosphérique dès la conception (hypothèse développementale des maladies)
  - limiter les erreurs de mesures d'exposition aux polluants à courte demi-vie
  - avoir des données de la fonction respiratoire du nouveau-né (en population générale)
- La biobanque SEPAGES pourra aider à mieux comprendre les liens entre « Exposome », marqueurs « omics » et santé des enfants

# REMERCIEMENTS



anses



- Financeurs
- Equipes
  - SEPAGES team and partners, Grenoble: Assia Benlakhryfa, Estelle Charvet, Yoann Gioria, Malorie Graça, Karen Gridel, Wieme Jayar, Muriel Marceau, Marie-Pierre Martin, Joane Quentin
  - Inserm Team of Environmental Epidemiology applied to Reproduction and Respiratory Health (IAB research center): Johanna Lepeule, Marion Ouidir, Claire Philippat, Isabelle Pin, Valérie Siroux, Rémy Slama, Karine Supernant, Céline Vernet,
- Le personnel soignant et les pédiatres des maternités des cliniques Mutualiste, Belledonne, des Cèdres et de l'Hôpital Couple Enfant
- Les familles SEPAGES !

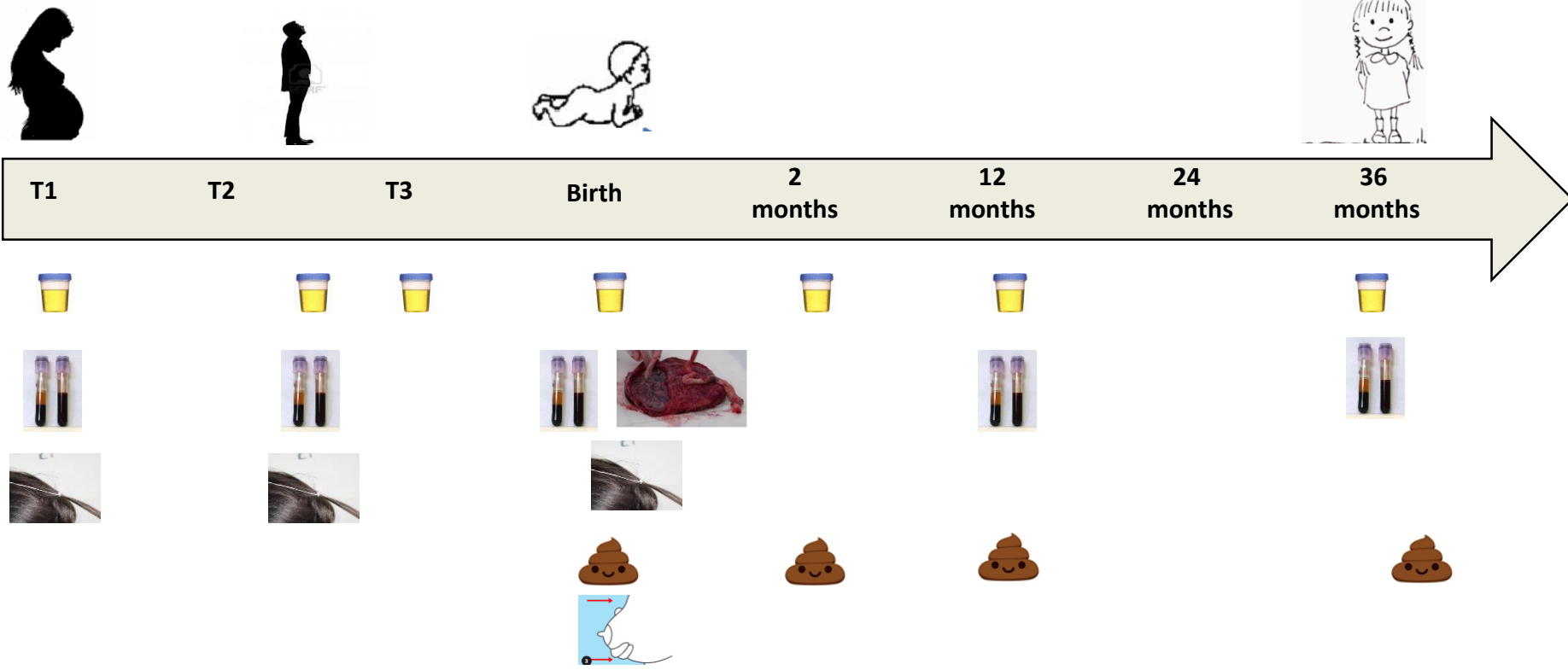


# Fin du diaporama

Autres diapo



# A RICH BIOBANK WITH REPEATED BIOLOGICAL SAMPLES



Biological samples are stored at -80°C in the Centre de Ressources Biologiques of the CHU Grenoble-Alpes

In total **70 000 samples will be stored** in the biobank. There are between 100 and 200 samples per family



# SMOKING, BIRTH WEIGHT AND METHYLATION IN PLACENTA (EDEN COHORT)

## ADN Methylation

n=668

Samples 5mm x 5mm in the middle of the placenta  
Prélevés à la naissance et congelés à -80°C  
450k Illumina beadchip: 426 000 CpG sites



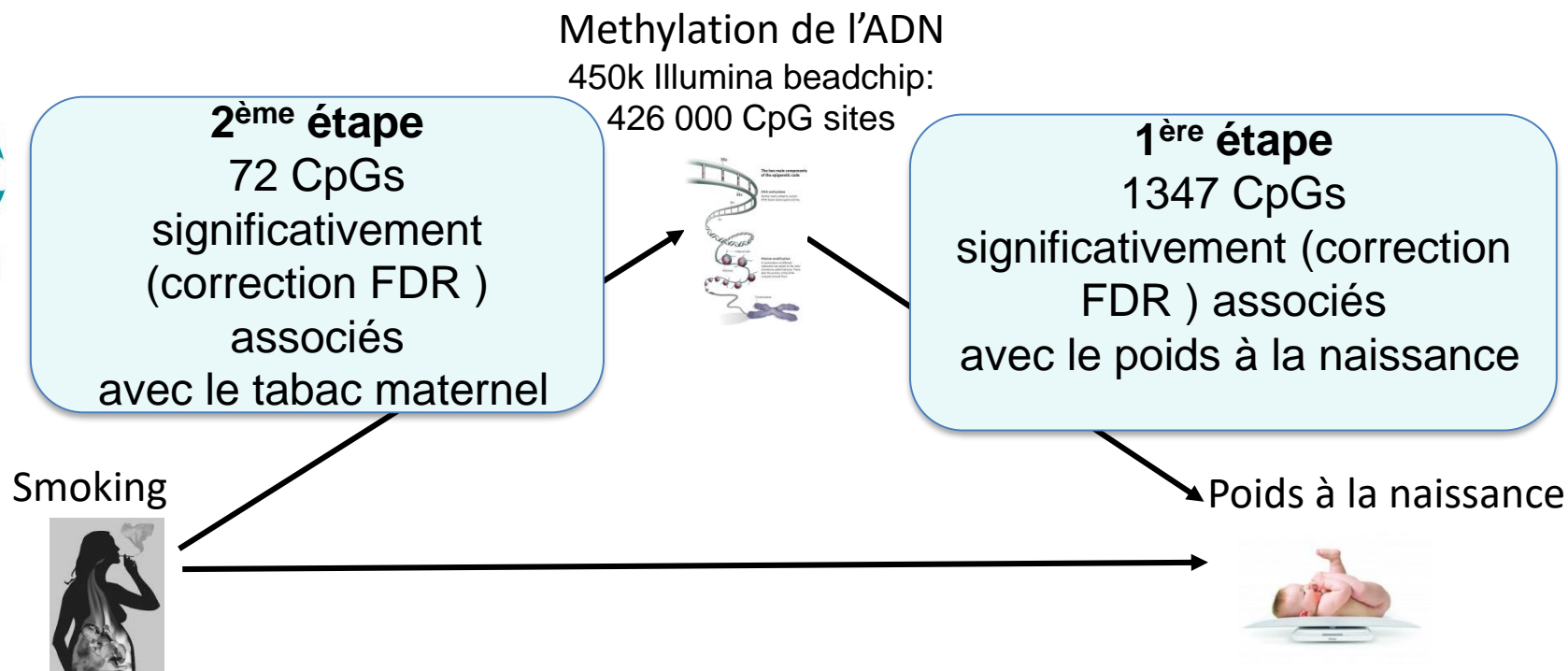
## Tabac et poids à la naissance

**Nombre moyen de cigarettes par jour pendant la grossesse**

Poids à la naissance récupéré dans les dossiers médicaux



# UNE PARTIE DE L'EFFET DU TABAC SEMBLE MÉDIÉ PAR LA METHYLATION DE L'ADN – COHORTE EDEN ( n = 668)

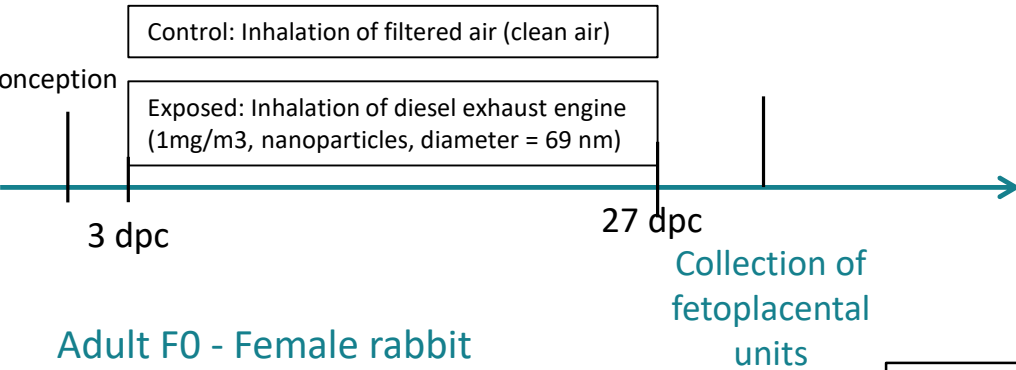


## 3<sup>rd</sup> step

Pour chacun des 72 CpGs, pour l'augmentation d'une cigarette par jour pendant la grossesse :

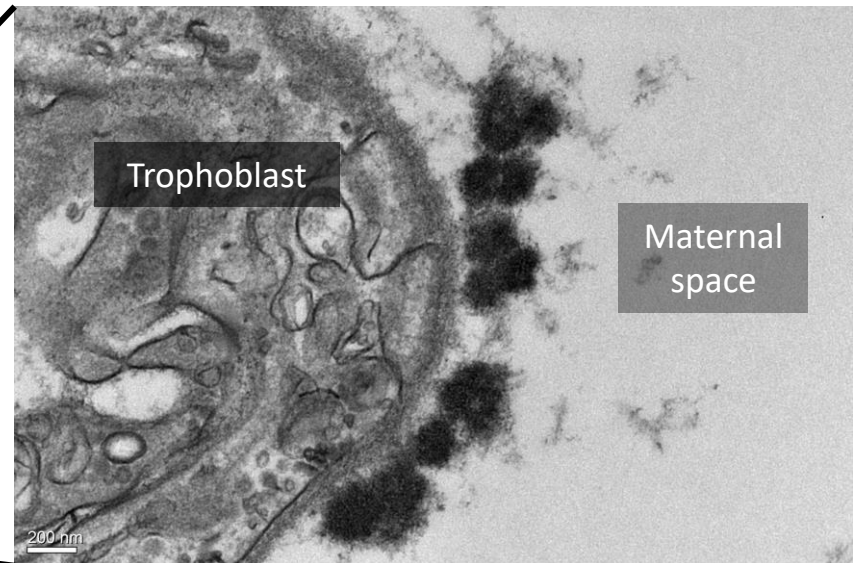
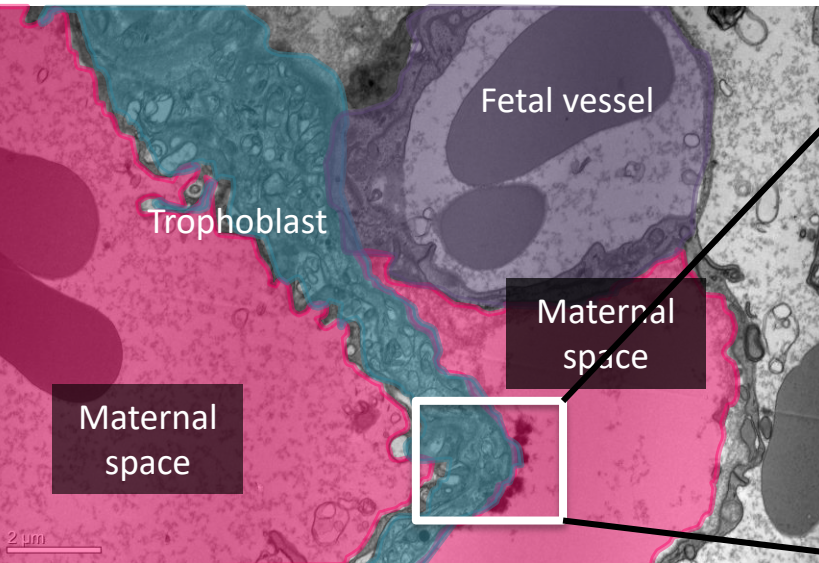
- **Effet total** du tabac sur le poids de naissance : -22g ( $p < 0.05$ )
- **Effet direct** du tabac sur le poids de naissance : -19g ( $p < 0.05$ )
- **Effet indirect** du tabac sur le poids de naissance expliqué par la methylation de l'ADN : -3g ( $p < 0.05$ )

# EFFECTS OF DIESEL ENGINE EXHAUST EXPOSURE IN RABBITS (F0 GENERATION: EXPOSED MOTHERS)



Placenta of exposed mothers

PM translocate to the placenta



# COLLECTING BIOLOGICAL SAMPLES

- **Allow to study intermediate mechanism**
- **Advice from the SEPAGES cohort :**
  - **Supplying** the volunteers with « urine » and « delivery » kits
  - **Training** of each medical team in the maternity ward
  - **Samples delivery** to the biobank by a carrier (biking !) or a SEPAGES fieldworker in cooler
  - **Compensation** for the medical staff in the maternity
  - **Time between sampling and storing** at -80°C too long when samples are collected during the week-end
- **Cost**

# QUESTIONNAIRES ON ENVIRONMENT

- Smoking
- Cleaning products
- Housing
- Diet/nutrition
- Professional exposure
- Pets
- Water consumption
- Noise
- Transport



- Frequency : 1 to 3 times during pregnancy and every 6 to 12 months during childhood
- Self administrated questionnaires : about 80 per family until the child is 3 years old (environment and health)



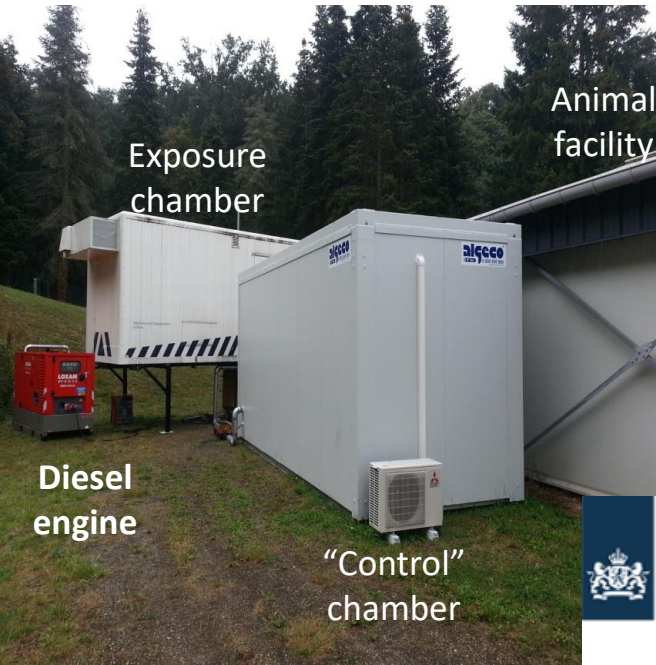
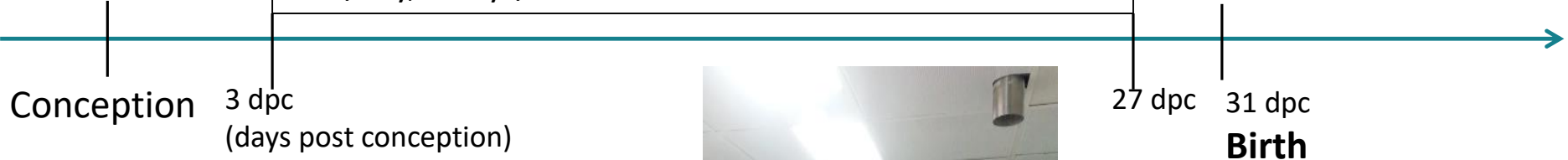
# A controlled experiment of diesel exhaust effects exposure during pregnancy in rabbits



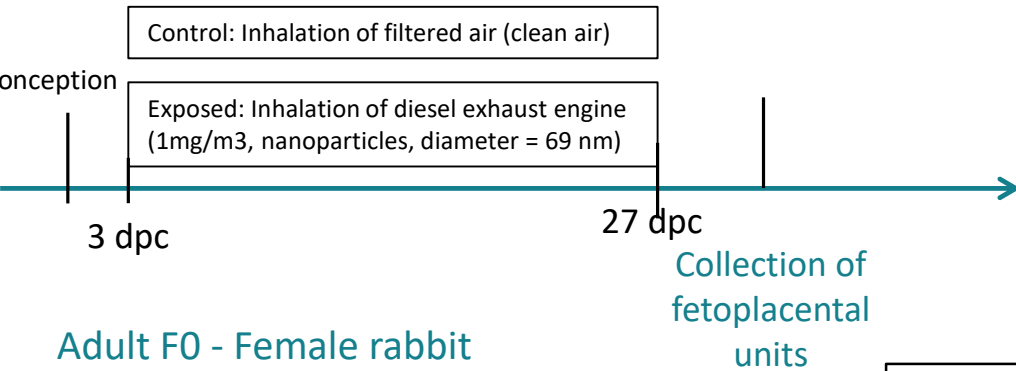
Exposed group : Inhalation of diesel exhaust engine  
(mean,  $1 \text{ mg/m}^3$ , nanoparticles mean diameter = 69 nm)

Control: Inhalation of filtered air (clean air)

2 hr/day, 5 days/week

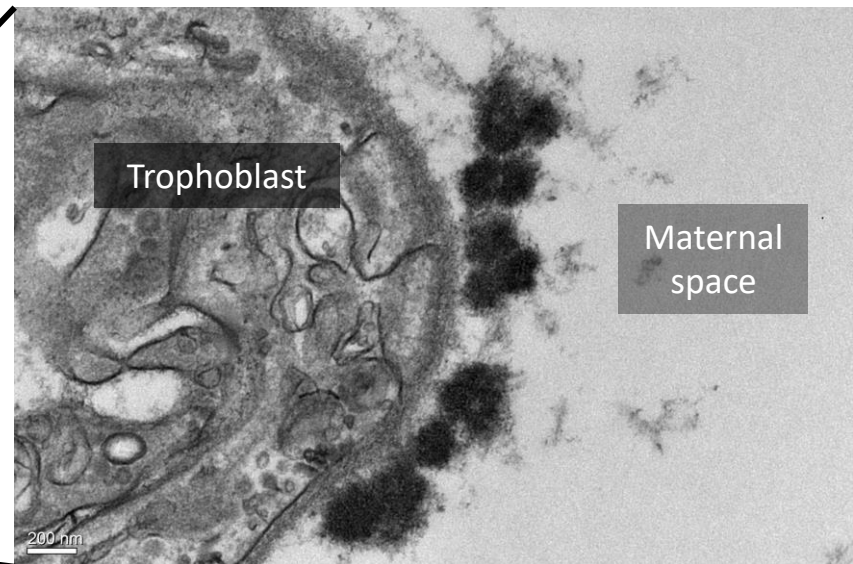
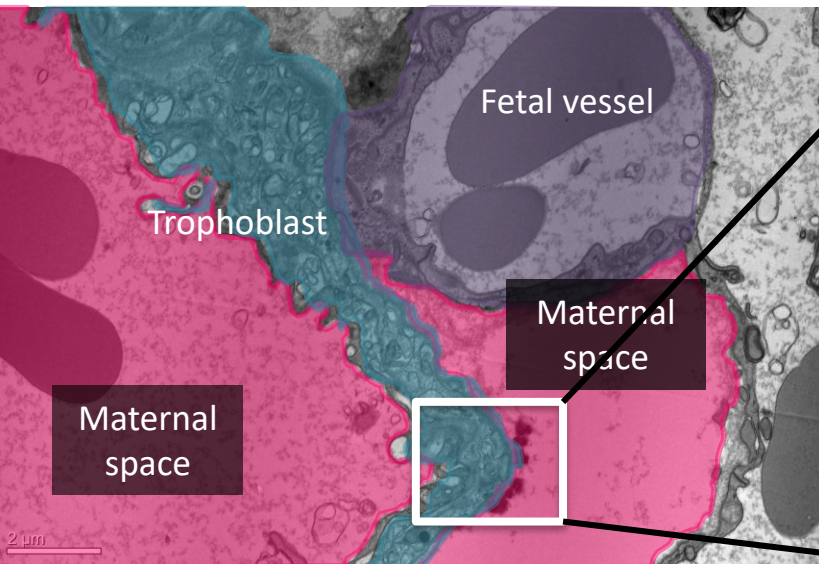


# Effects of diesel engine exhaust exposure in rabbits (F0 generation: exposed mothers)



Placenta of exposed mothers

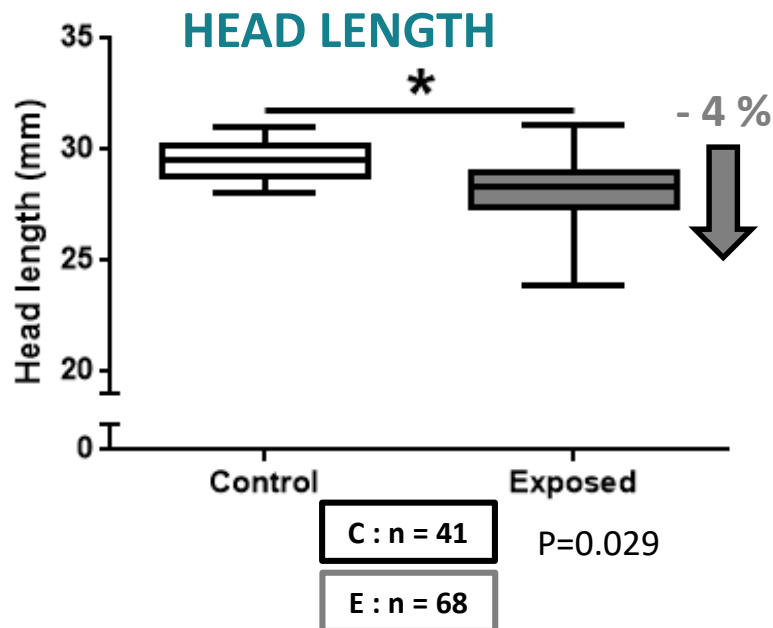
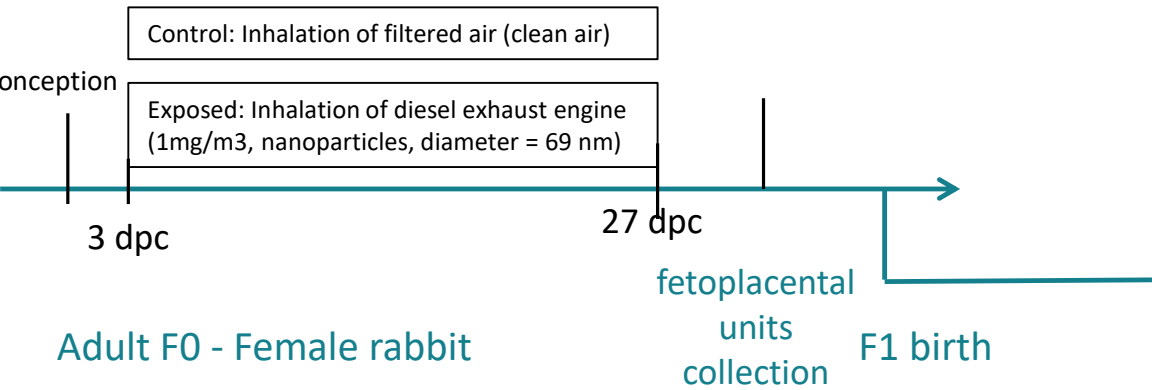
PM translocate to the placenta



Transplacental transfer of Nanoparticles – Pascale Chavatte-Plamer and Sarah Valentino (Valentino et al., *PFT*, in press)

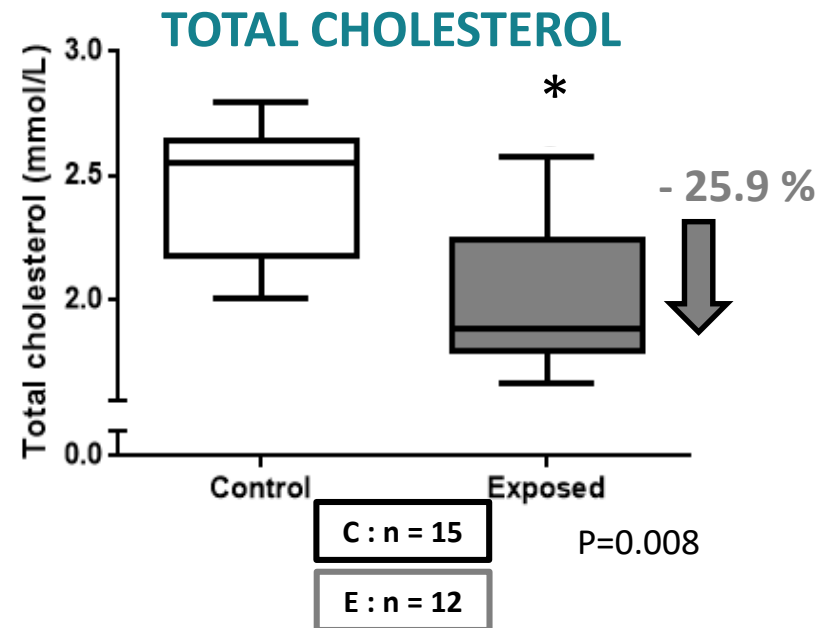
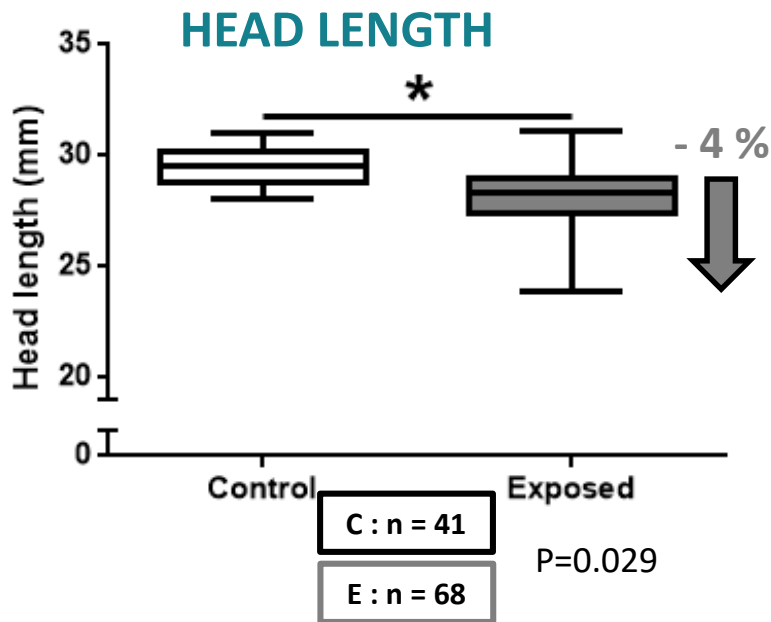
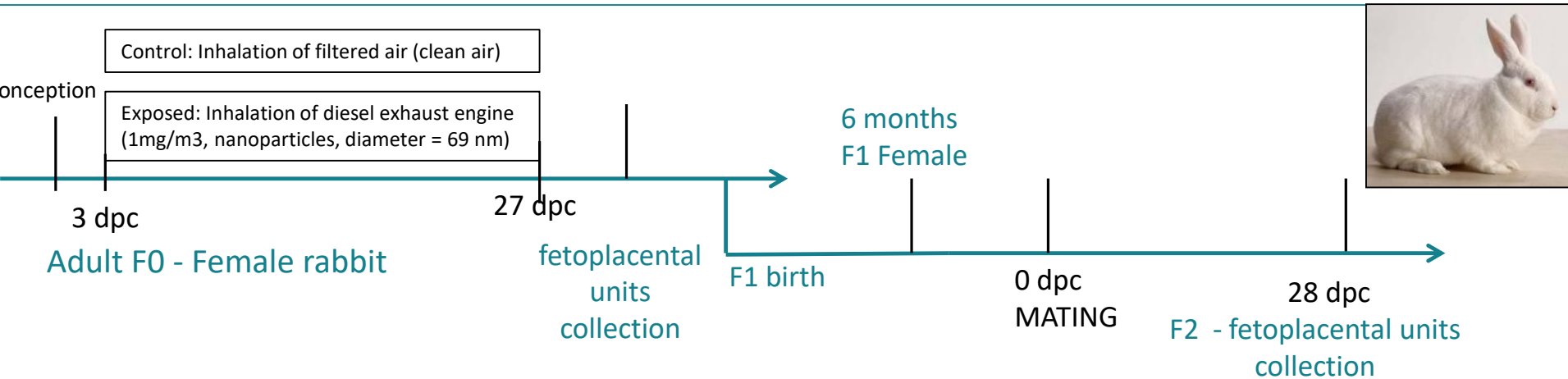


# Longer term effects of diesel engine exhaust exposure in rabbits (F1 generation)

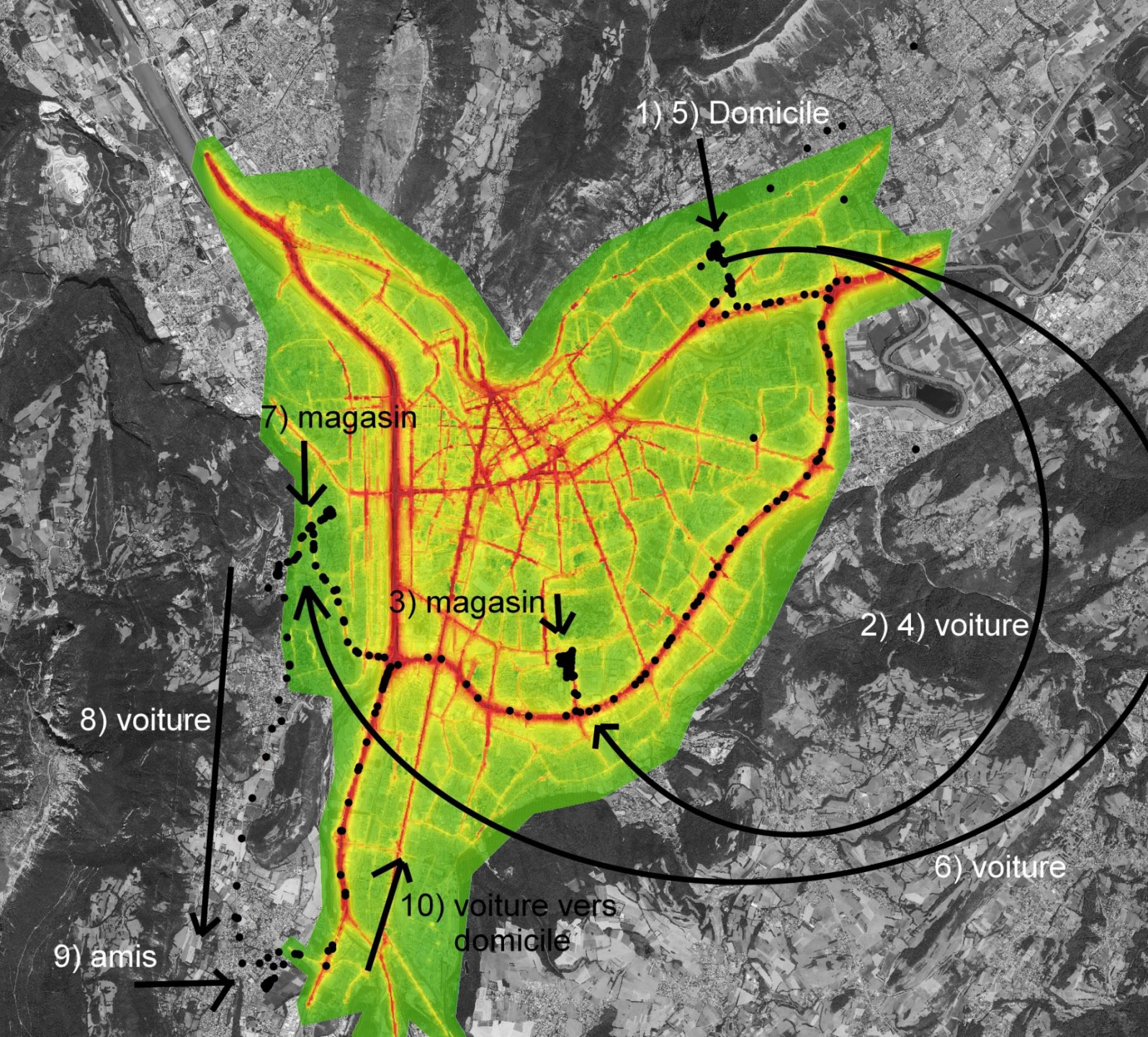


**Transplacental transfer of Nanoparticles** – Pascale Chavatte-Plamer and Sarah Valentino  
(Valentino et al., *PFT*, in press)

# Diesel engine exhaust exposure is associated with changes in cholesterol levels in F2 generation







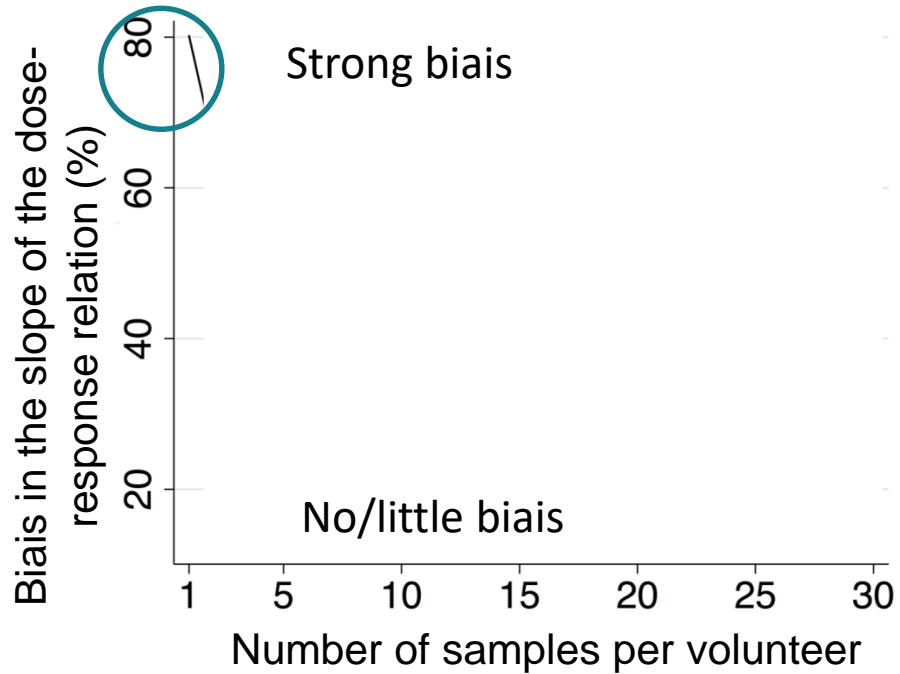
Estimation du budget espace-temps (1 volontaire de l'étude Sepages faisabilité)

Les couleurs indiquent les niveaux de NO<sub>2</sub>.

Modèle Sirane, Air Rhône Alpes

# EFFICIENCY OF THE WITHIN SUBJECT POOLING APPROACH

## Theoretical validation

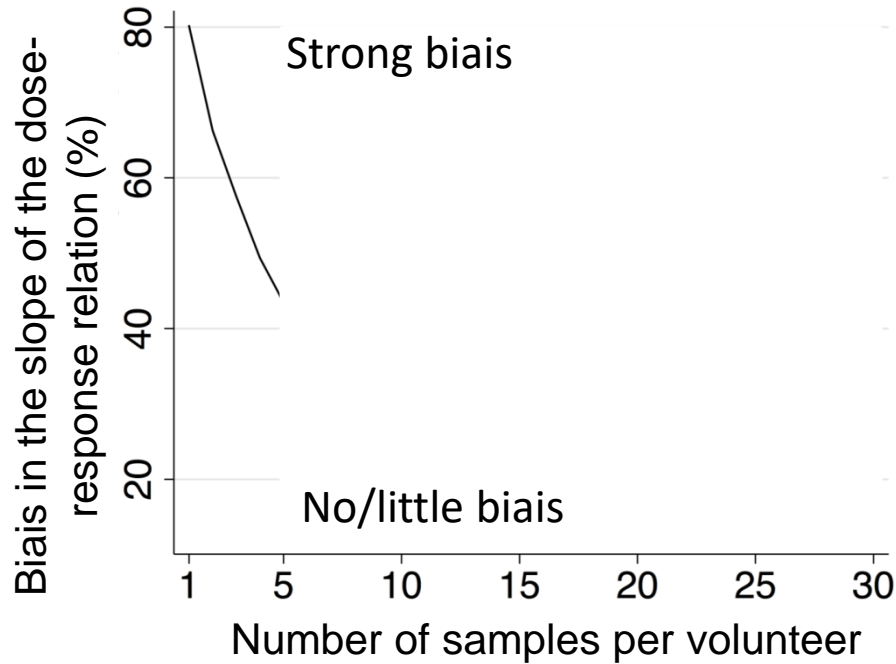


Perrier, Epidemiology 2016



# EFFICIENCY OF THE WITHIN SUBJECT POOLING APPROACH

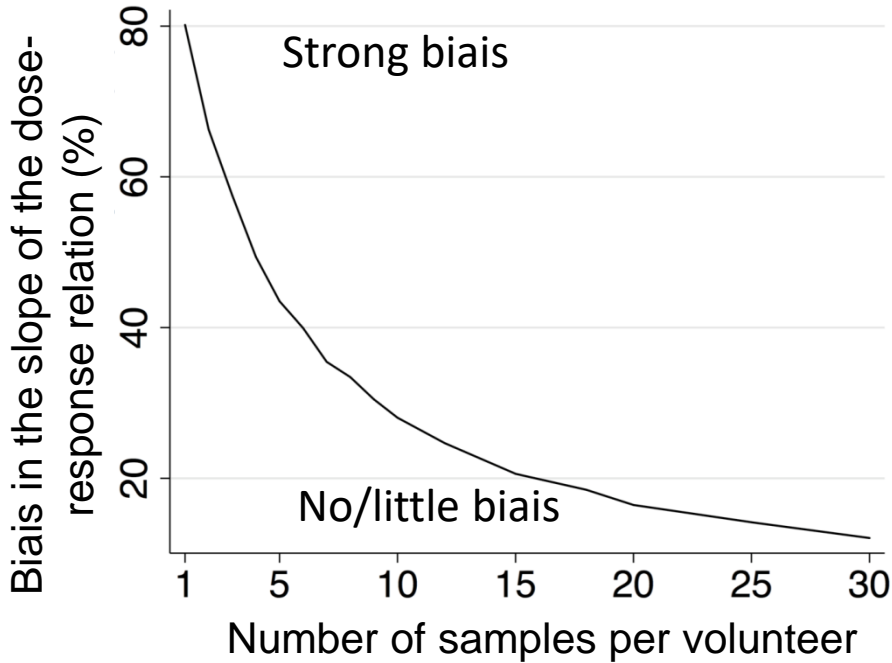
## Theoretical validation



Perrier, Epidemiology 2016

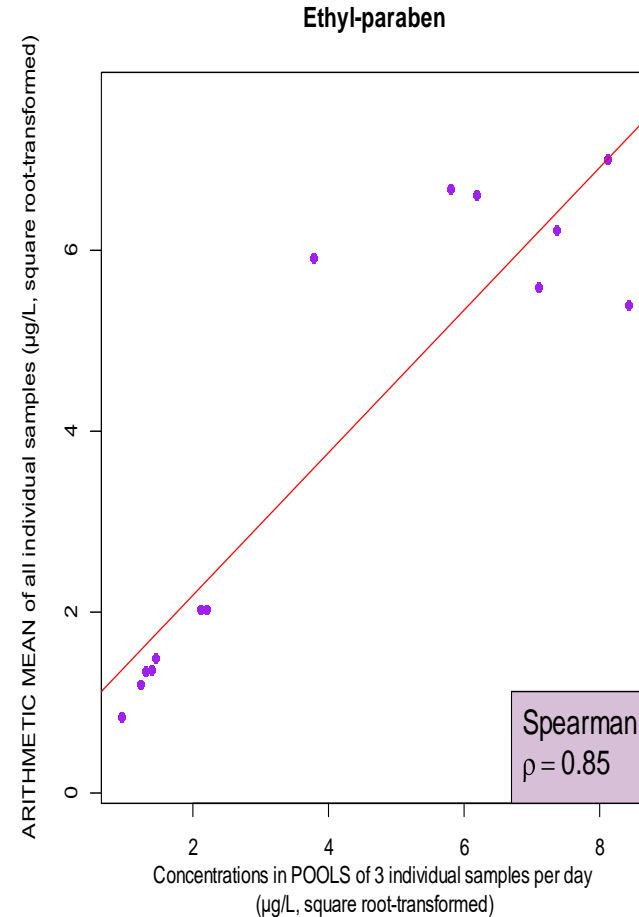
# EFFICIENCY OF THE WITHIN SUBJECT POOLING APPROACH

## Theoretical validation



Perrier, Epidemiology 2016

## Empirical validation



Vernet, 2017, in press

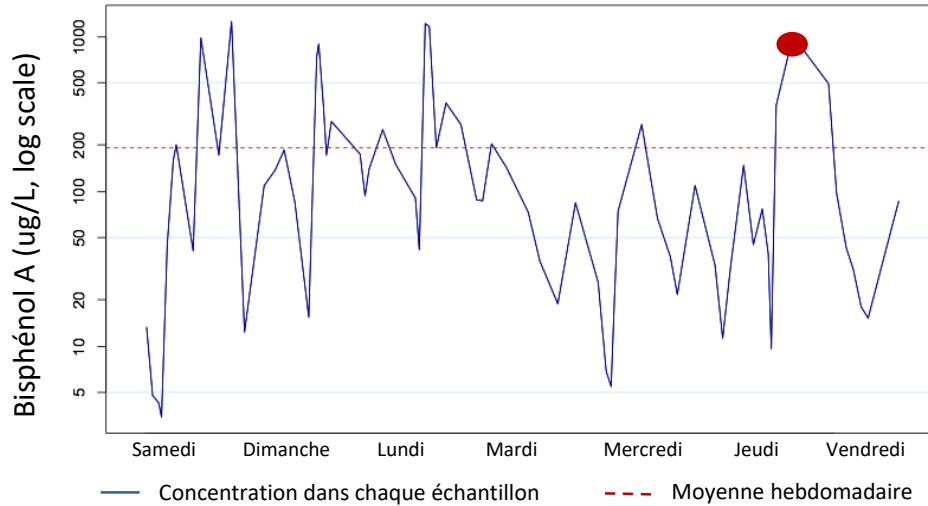


# ENDOCRINE DISRUPTORS : METHODOLOGIC LIMITS

Exposure estimation



X 1



Philippat et al, EHP 2013  
Vernet, Philippat et al. EHP, soumis

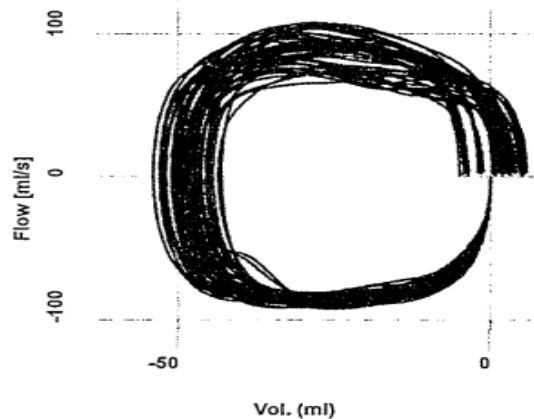
Biais in the  
dose-réponse relation  
Perrier,..., Philippat, Epidemiology 2016



# EXAMEN DE LA FONCTION VENTILATOIRE DU NOUVEAU-NÉ



① Courbes débit-volume  
(Volume courant,  
temps  
inspiratoires et  
expiratoires)



② Test de  
rinçage de l'azote  
à l'O2  
(LCI 2,5% et Capacité  
résiduelle  
fonctionnelle)

