



# Associations entre les expositions environnementales et les issues de grossesse d'une part et la méthylation de l'ADN placentaire d'autre part

Émilie Abraham

## ► To cite this version:

Émilie Abraham. Associations entre les expositions environnementales et les issues de grossesse d'une part et la méthylation de l'ADN placentaire d'autre part. Médecine humaine et pathologie. Université Grenoble Alpes, 2016. Français. NNT : 2016GREAS018 . tel-01691724

HAL Id: tel-01691724

<https://theses.hal.science/tel-01691724>

Submitted on 24 Jan 2018

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

## THÈSE

Pour obtenir le grade de

### **DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ GRENOBLE ALPES**

Spécialité : **Modèles, méthodes et algorithme en biologie,  
santé et environnement**

Arrêté ministériel : 7 août 2006

Présentée par

### **Émilie ABRAHAM**

Thèse dirigée par **Johanna LEPEULE et Rémy SLAMA**

Préparée au sein de l'**Unité mixte Inserm-CNRS-UGA, U1209,  
Institut pour l'avancée de biosciences**

Dans l'**École Doctorale  
« Ingénierie pour la santé, la Cognition et l'Environnement »**

### **Associations entre les expositions environnementales et les issues de grossesse d'une part et la méthylation de l'ADN placentaire d'autre part**

Thèse soutenue publiquement le **21 Octobre 2016**, devant le jury  
composé de :

#### **M. Rémy SLAMA**

Directeur de Recherche – Inserm, Grenoble (Directeur de thèse)

#### **Mme Johanna LEPEULE**

Chargée de Recherche – Inserm, Grenoble (Co-Directrice de thèse)

#### **Mme Séverine DEGUEN**

Enseignante Chercheur – EHESP, Rennes (Rapporteur)

#### **M. Gianluca SEVERI – Président du jury**

Directeur de Recherche – Inserm, Villejuif (Rapporteur)



## **REMERCIEMENTS**

J'exprime tout d'abord mes remerciements à mes deux rapporteurs, le Docteur Gianluca Severi et le Docteur Séverine Deguen, qui ont accepté de lire, d'analyser et de critiquer mon travail de thèse.

J'adresse mes remerciements évidemment à mon directeur de thèse, le Docteur Rémy Slama, et à ma co-directrice de thèse, le Docteur Johanna Lepeule, pour m'avoir donné l'opportunité de réaliser une thèse au sein de leur équipe sur un sujet particulièrement riche et intéressant. Je remercie également Johanna pour l'opportunité qu'elle m'a donnée, grâce à ses contacts, d'effectuer un séjour de 4 mois à la Harvard School of Public Health à Boston.

Pour cette même occasion je remercie très chaleureusement le Professeur Joel schwartz de m'avoir accueilli dans son département de recherche à l'université d'Harvard et pour notre collaboration qui fut très enrichissante. Je le remercie également ainsi que sa femme Ronnie de m'avoir accueillie chez eux. Merci pour leur gentillesse, leur disponibilité et leurs conseils personnels et scientifiques. Merci de l'avoir permis une intégration complète dans la vie américaine ; ce fut une aventure tellement appréciable et extraordinaire autant sur le plan personnel que professionnel. Je n'oublierai jamais. Bien sûr, je tiens à remercier tout particulièrement Marie-Abèle Bind, pour avoir rendu mon aventure américaine inoubliable : une très belle rencontre ! Merci pour ta joie de vivre, ton naturel, ta gentillesse, tous tes conseils scientifiques et autres, tes encouragements et tout ce qu'on a pu partager à Boston city.

Je remercie La Fondation de France et l'AVIESAN d'avoir permis le financement et donc la réalisation de ma thèse. Merci également à la Région Rhône-Alpes pour m'avoir accordé une bourse permettant mon séjour aux US.

Je souhaite remercier l'équipe de biologie pour notre sympathique collaboration et plus particulièrement merci à Sophie Rousseaux pour nos échanges et ses nombreux conseils en matière de biologie.

Je remercie tous les membres de mon équipe pour tous les échanges partagés pendant ces trois années de thèse. Je pense particulièrement à Lise Giorgis-Allemand et Céline Vernet, je ne vous remercierais jamais assez pour tout ce que vous avez fait pour moi. Merci aussi à Jennifer Fontana, petite dernière arrivée mais pas des moindres, merci pour ta fraîcheur, ta gentillesse et ton soutien. Un GRAND merci à mes deux piliers : Karine Supernant et Lydiane Agier : merci les filles pour votre soutien sans faille, merci d'être si entières et sincères, merci pour la richesse de nos discussions, nos débats, nos sessions coup de gueule, nos fou-rires, nos encouragements mutuels, merci pour nos agréables moments passés ensemble. J'ai tellement appris grâce à vous tant personnellement que professionnellement.

Je tiens à remercier également toutes les personnes et ami(e)s qui de près comme de loin ont contribué à cette réussite. MERCI de m'avoir accompagnée, aidée et soutenue tout au long de cette folle aventure de thèse. Merci à ma team Badminton avec une mention particulière à Marion Perrin, merci à toi d'avoir toujours été là dans les bons comme dans les mauvais moments ! Un grand merci à mes deux grandes et merveilleuses amies les Aurelie's pour m'avoir écoutée, encouragée et re-boostée à chaque moment important.

Milles Mercis pour toutes ces belles amitiés qui se sont créées ! Je sais à quel point j'ai de la chance d'être si bien entourée et d'avoir des amis tels que vous.

Enfin, mais surtout, un IMMENSE merci à toute ma famille qui m'a toujours soutenue et encouragée. Merci pour tous les bons moments passés en famille qui m'ont permis de bien me ressourcer. Merci profondément à mon père et à ma mère pour leur amour et leur soutien inconditionnels. Merci à ma petite sœur Alice que j'aime tant et qui, malgré la grande distance qui nous sépare, a toujours été à mes côtés : MercouX pour ton soutien moral infaillible.

MERCI !



## VALORISATIONS

### ARTICLE SOUMIS

**Abraham E**, Chevrier C, Giorgis Allemand L, Auffray A, Agier L, Pierre F, Kaminski M, Heude B, Charles M-A, Cordier S, Slama R, Lepeule J. Associations between meteorological conditions during pregnancy and birth weight, preterm birth and gestational duration, in two mother-child cohorts. *[Soumis à Environment Health Perspective]*

### ARTICLE EN PRÉPARATION

**Abraham E**, Agier L, Giorgis-Allemand L, Tost J, Vaiman D, Schwartz J, Siroux V, Slama R, Lepeule J. Pregnancy exposure to air pollution and weather conditions on placental DNA methylation: an epigenome-wide association study.

### COMMUNICATIONS ORALES INTERNATIONALES

**Abraham E**, Giorgis-Allemand L, Tost J, Vaiman D, Heude B, Forhan A, Charles M-A, Slama R, Lepeule J, and the Eden study group. Effects of air pollution during pregnancy on placental DNA methylation in a set of CpGs associated with fetal growth. *27<sup>th</sup> Conference of the International Society for Environmental Epidemiology*. August 30<sup>th</sup> to September 3<sup>rd</sup>, 2015 São Paulo, Brazil.

Lepeule J, **Abraham E**, Giorgis-Allemand L, Tost J, Vaiman D, Heude B, Forhan A, Charles M-A, Slama R, and the Eden study group. Placental DNA methylation is associated with birth weight and maternal smoking: an epigenome-wide association study. *27<sup>th</sup> Conference of the International Society for Environmental Epidemiology*. August 30<sup>th</sup> to September 3<sup>rd</sup>, 2015 São Paulo, Brazil.

**Abraham E**, Bind MA, Giorgis-Allemand L, Tost J, Galineau J, Hulin A, Slama R, Lepeule J, and the EDEN study group. Air pollution and temperature on associations with DNA methylation in a mother-child cohort: an epigenome-wide analysis using penalization methods. *28<sup>th</sup> Conference of the International Society for Environmental Epidemiology*. September 1 to 3<sup>rd</sup>, 2016 Rome, Italy.

## COMMUNICATIONS AFFICHÉES INTERNATIONALES

**Abraham E**, Giorgis-Allemand L, Tost J, Vaiman D, Heude B, Forhan A, Charles M-A, Slama R, Lepeule J, and the Eden study group. Effects of air pollution during pregnancy on placental DNA methylation in a set of CpGs associated with fetal growth. *2<sup>nd</sup> Early Career Researchers Conference on Environmental Epidemiology*. 2–3 November, 2015 Utrecht, The Netherlands.

**Abraham E**, Giorgis-Allemand L, Tost J, Vaiman D, Heude B, Forhan A, Charles M-A, Slama R, Lepeule J, and the Eden study group. Effects of air pollution during pregnancy on placental DNA methylation: an epigenome-wide association study. *2<sup>nd</sup> Early Career Researchers Conference on Environmental Epidemiology*. 2–3 November, 2015 Utrecht, The Netherlands.

**Abraham E**, Giorgis-Allemand L, Tost J, Vaiman D, Heude B, Forhan A, Charles M-A, Slama R, Lepeule J, and the Eden study group. Effects of air pollution during pregnancy on placental DNA methylation: an epigenome-wide association study. *27<sup>th</sup> Conference of the International Society for Environmental Epidemiology*. August 30<sup>th</sup> to September 3<sup>rd</sup>, 2015 São Paulo, Brazil.

**Abraham E**, Siroux V, Giorgis-Allemand L, Tost J, Vaiman D, Heude B, Forhan A, Charles M-A, Slama R, Lepeule J, and the Eden study group. Maternal smoking during pregnancy and placental DNA methylation. *1<sup>st</sup> ISEE-Europe Young Researchers Conference on Environmental Epidemiology*. October, 20<sup>th</sup>–21<sup>st</sup>, 2014 Barcelona, Spain.

## RÉSUMÉ SCIENTIFIQUE

**Abraham E**, Chevrier C, Giorgis-Allemand L, Auffray A, Thiébaut Georges O, Pierre F, Kaminski M, Charles M-A, Cordier S, Slama R, Lepeule J. Effects of climate conditions on fetal growth and length of gestation. *26<sup>th</sup> Conference of the International Society for Environmental Epidemiology*. August, 25<sup>th</sup>–28<sup>th</sup>, 2014 Seattle, USA.

## TABLE DES MATIÈRES

<b>Remerciements .....</b>	<b>1</b>
<b>Valorisations .....</b>	<b>4</b>
<b>Table des matières.....</b>	<b>6</b>
<b>Liste des principales abréviations .....</b>	<b>8</b>
<b>Liste des tableaux.....</b>	<b>10</b>
<b>Liste des figures.....</b>	<b>12</b>
<b>INTRODUCTION GÉNÉRALE .....</b>	<b>14</b>
1.    La pollution atmosphérique.....	19
1.1.    Définitions et sources .....	19
1.2.    Les polluants.....	19
1.3.    Surveillance et réglementation .....	20
1.4.    Estimation des niveaux de polluants .....	21
1.5.    Facteurs saisonniers et météorologiques influant sur les concentrations en PM <sub>10</sub> et en NO <sub>2</sub> .....	22
2.    Les conditions météorologiques.....	22
2.1.    Définitions et unités de mesure .....	23
2.2.    La saisonnalité .....	25
2.3.    Normes/surveillance .....	26
3.    Issues de grossesse .....	26
3.1.    Définition.....	26
3.2.    Prévalence des issues de grossesse défavorables .....	28
3.3.    Principaux facteurs de risque.....	29
3.4.    Effets de la pollution de l'air sur les issues de grossesse .....	30
3.5.    Effets des conditions météorologiques sur les issues de grossesse .....	30
4.    Épigénétique et rôle potentiel de la méthylation de l'ADN comme biomarqueur des expositions .....	32
4.1.    L'épigénétique, définition .....	32
4.2.    Les mécanismes épigénétiques .....	33
4.3.    La méthylation de l'ADN .....	34
4.4.    Facteurs environnementaux et méthylation de l'ADN .....	36
4.5.    Évaluation des données de large dimension de la méthylation de l'ADN .....	38
<b>OBJECTIF ET STRUCTURE DE LA THÈSE .....</b>	<b>39</b>

<b>CHAPITRE I : POPULATION ET ÉVÈNEMENTS D'INTÉRÊTS .....</b>	<b>43</b>
1.    Les cohortes.....	45
1.1. PELAGIE.....	45
1.2. EDEN.....	46
2.    Les évènements d'intérêts .....	47
2.1. Les issues de grossesse .....	47
2.2. Les expositions environnementales .....	47
2.3. La méthylation de l'ADN .....	50
<b>CHAPITRE II : EXPOSITIONS ENVIRONNEMENTALES ET ISSUES DE GROSSESSE..</b>	<b>53</b>
1.    Résumé Article 1: Association between meteorological conditions and birth weight, preterm birth and gestational duration in two mother-child cohorts.....	57
2.    Version intégrale de l'article 1 .....	59
<b>CHAPITRE III : EXPOSITIONS ENVIRONNEMENTALES ET MÉTHYLATION DE L'ADN.....</b>	<b>100</b>
<b>Partie A - Approche Agnostique.....</b>	<b>104</b>
1.    Résumé Article 2: Impact of pregnancy exposure to atmospheric pollution and meteorological conditions on placental DNA methylation : an epigenome-wide association study .....	106
2.    Version intégrale de l'article 2 .....	110
<b>Partie B - Approche avec « <i>a priori</i> » .....</b>	<b>151</b>
1.    Introduction .....	153
2.    Méthodes .....	154
2.1. Méthodes d'identification des gènes .....	154
2.2. Analyses d'association .....	155
3.    Résultats .....	156
3.1. Méthode 1 .....	156
3.2. Méthode 2 .....	158
4.    Conclusion.....	160
<b>DISCUSSION GÉNÉRALE.....</b>	<b>161</b>
1.    Résumé et apport de la thèse .....	163
2.    Aspects méthodologiques.....	166
3.    Conclusion et perspectives .....	173
<b>RÉFÉRENCES.....</b>	<b>176</b>

## **LISTE DES PRINCIPALES ABREVIATIONS**

ADN : Acide Désoxyribonucléique

CpG : Cytosine–phosphate–Guanine

DOHaD : Developmental Origins of Health and Disease

EWAS : Epigenome Wide Association Study

FDR : False Discovery Rate

FWER : Family-Wise Error Rate

IMC (BMI) : Indice de Masse Corporelle

IC (CI) : Intervalle de Confiance

LINE-1 : Long Interspersed Nucleotide Element 1

NO<sub>2</sub> : Dioxyde d'azote

OMS (WHO) : Organisation Mondiale de la Santé

PM<sub>10</sub> : Particules en suspension avec un diamètre aérodynamique inférieur à 10 µm

SA : Semaine d'Aménorrhée

EU : European Union



## **LISTE DES TABLEAUX<sup>1</sup>**

Tableau 1. Comparaison des échelles de température pour les valeurs importantes, dans les conditions de pression standard .....	23
Tableau 2. Distribution du niveau de méthylation, n=8 357 CpGs. ....	156
Tableau 3. CpGs significativement associés à l'exposition prénatale au NO <sub>2</sub> (n=668, EDEN). 158	
Tableau 4 : Distribution du niveau de méthylation, n=6 837 CpGs. ....	158
Tableau 5. CpGs significativement associés à l'exposition prénatale au NO <sub>2</sub> (n=668, EDEN). 159	

<sup>1</sup> *Cette liste ne prend pas en compte les tableaux présentés dans les articles.*



## LISTE DES FIGURES<sup>2</sup>

Figure 1. Température moyenne saisonnière en °C (normale 1981 - 2010) (© Météo-France, fond de carte IGN) .....	25
Figure 2. Schéma de la méthylation.....	35
Figure 3: Schéma – Rôle entre la méthylation et l'expression des gènes.....	35
Figure 4. Localisation du domicile des femmes et des stations mesurant les paramètres météorologiques.....	48
Figure 5. Localisation du domicile des femmes et des stations mesurant les paramètres météorologiques en Bretagne.....	49
Figure 6. Niveaux de concentration en NO <sub>2</sub> à Poitiers et à Nancy estimés à partir du modèle de dispersion, 2005. ....	50
Figure 7. Processus de sélection des CpGs selon l'approche avec « a priori ». .....	155
Figure 8. Histogramme des niveaux moyens de méthylation de sites CpG (A) et distribution des niveaux de méthylation selon la moyenne et l'écart-type (B) .....	157
Figure 9 : Histogramme des niveaux moyens de méthylation de sites CpG (A) et distribution des niveaux de méthylation selon la moyenne et l'écart-type (B) .....	159

<sup>2</sup> Cette liste ne prend pas en compte les figures présentées dans les articles.



## **INTRODUCTION GÉNÉRALE**



Comprendre les relations entre les conditions environnementales et la santé est un enjeu majeur de santé publique pour les sociétés modernes. De nombreux facteurs environnementaux tels que la pollution atmosphérique, la pollution de l'eau, les conditions météorologiques, la consommation de tabac, le régime alimentaire, contribuent de façon significative en tant que facteurs de risque de morbidité et de mortalité à l'échelle mondiale (OMS a). À l'heure actuelle, le changement climatique et la pollution atmosphérique (ou pollution de l'air) sont au cœur des préoccupations environnementales (OMS b).

Historiquement, la pollution atmosphérique a considérablement crû du fait de la révolution industrielle. De nos jours, les principales sources de pollution proviennent du trafic routier et du chauffage domestique. L'air que nous respirons est un mélange complexe de polluants visibles, comme la poussière et la suie, et invisibles en majorité, comme les petites particules et les gaz. Si la qualité de l'air dépend de l'émission de substances polluantes par différentes sources, elle dépend aussi du climat et notamment des facteurs météorologiques (température, humidité, vent, précipitations...). Ces derniers influencent effectivement la dispersion des polluants ou leur précipitation (cas de la pluie). De plus, certains polluants de l'air tels les particules ou l'ozone agissent sur le changement climatique ; et à l'inverse, les changements climatiques ont un effet sur la dispersion des polluants. Les problématiques de la pollution atmosphérique et du changement climatique, pourtant très liées, sont très souvent étudiées séparément en épidémiologie environnementale. En effet, comme pour la pollution atmosphérique, les origines du changement climatique proviennent d'une part de sources naturelles, mais également et surtout des activités humaines qui ne cessent de s'accroître et d'évoluer (Bernstein et al. 2013). Du fait de ces interactions, il apparaît ainsi pertinent d'en étudier les effets conjoints.

L'exposition à la pollution de l'air aux niveaux actuels est néfaste pour la santé humaine. Selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) et l'Agence Européenne pour

l'Environnement (AEE), la pollution de l'air causerait la mort prématuée de 7 millions de personnes dans le monde chaque année, dont 600 000 en Europe et plus de 40 000 en France (Guerreiro et al. 2015 ; OMS b, Santé publique France 2016<sup>1</sup>). La pollution atmosphérique augmente également l'incidence d'un large éventail de maladies, comme les maladies respiratoires et cardio-vasculaires ou le cancer du poumon. Ses effets se manifestent sur la santé à court et long terme (Künzli et al. 2000 ; Prüss-Üstün and Corvalán 2006). La pollution peut également avoir des conséquences sur le développement du fœtus et la santé du nouveau-né (Laaidi et al. 2011). Des études ont mis en évidence le lien entre une exposition maternelle aux polluants de l'air au cours de la grossesse et un faible poids de naissance, une restriction de la croissance fœtale ou encore un risque élevé de prématurité (Pedersen et al. 2013 ; Slama et al. 2008 ; Stieb et al. 2012).

Même si la littérature sur les effets du changement climatique sur la santé est encore limitée, les effets directs et indirects du changement climatique sur la santé sont déjà perceptibles aujourd'hui, comme le souligne le dernier rapport du Groupe d'experts intergouvernemental sur l'évolution du climat (Bernstein et al. 2013). De plus, des études suggèrent que la variabilité et la modification du climat sont responsables de décès et de nombreuses maladies comme les maladies cardio-vasculaires et infectieuses (Patz et al. 2003 ; Woodward et al. 2014). Les répercussions de ces changements climatiques constituent donc une nouvelle menace importante pour la santé publique à l'échelle mondiale (Intergovernmental Panel on Climate Change and Edenhofer 2014).

Dans un contexte de changement climatique, l'augmentation attendue de la fréquence et de l'intensité des événements météorologiques extrêmes ont suscité un intérêt croissant à évaluer si les facteurs météorologiques – étroitement lié à la pollution atmosphérique – pourraient

---

<sup>1</sup> <http://www.santepubliquefrance.fr/Accueil-Presse/Tous-les-communiques/Impacts-sanitaires-de-la-pollution-de-l-air-en-France-nouvelles-donnees-et-perspectives>

affecter la santé humaine à plus ou moins long terme, en particulier chez les femmes enceintes et le fœtus (Howson et al. 2012 ; Meehl and Tebaldi 2004 ; WHO 2012). En effet, la période fœtale est une des périodes les plus vulnérables de la vie humaine en raison de la prolifération cellulaire rapide, la différenciation et la croissance. La survie, la croissance et le développement optimal du fœtus nécessitent une interaction complexe entre la mère, le fœtus et le placenta. L'environnement intra-utérin joue un rôle essentiel dans la « programmation » du fœtus et également pour les issues de santé et de maladie tout au long de la vie (Banister et al. 2011 ; Koukoura et al. 2012 ; Yurdakök 2013).

Enfin, il paraît incontournable aujourd’hui de s’intéresser aux issues de grossesse, car celles-ci contribuent pour une part importante à la mortalité et la morbidité périnatales. D’autre part, elles peuvent jouer un rôle non négligeable dans l’apparition de maladies dans l’enfance et chez l’adulte.

Dans ces travaux de thèse, nous nous sommes intéressés à ces deux problématiques étroitement liées agissant réciproquement l’une sur l’autre que sont la pollution atmosphérique et les conditions météorologiques incluant la température et l’humidité relative dans le contexte de la grossesse.

*Dans la suite de cette partie, nous abordons les différentes notions et les concepts qui vont être utilisés tout au long des études de cette thèse ; dont les principaux points sont la pollution, le climat et les issues de grossesse. Cette partie se terminera sur la présentation d’un mécanisme biologique potentiellement impliqué dans les effets de l’environnement sur les issues de grossesse : les mécanismes épigénétiques. Brièvement, les marques épigénétiques sont toutes modifications non codées par la séquence d’ADN, et pouvant induire une régulation de l’expression des gènes correspondants.*

## 1. La pollution atmosphérique

### 1.1. Définitions et sources

Toute contamination, naturelle ou anthropogénique de l'air ambiant est appelée pollution atmosphérique (ou pollution de l'air extérieur par opposition à l'air intérieur). L'OMS définit cette dernière comme « la contamination de l'environnement intérieur ou extérieur par un agent chimique, physique ou biologique qui modifie les caractéristiques naturelles de l'atmosphère » ou bien comme « limitée aux situations où l'atmosphère extérieure ambiante contient des matières dans des concentrations telles qu'elle est nocive pour l'homme et son environnement ».

La pollution atmosphérique est la résultante de multiples sources. On distingue les polluants primaires principalement émis par des sources naturelles (comme une éruption volcanique), par des combustibles fossiles (pétrole, gaz naturel et charbon), la production d'énergie, l'agriculture intensive, industries extractives, métallurgiques et chimiques, la circulation routière et aérienne, incinération des ordures ménagères et des déchets industriels ; puis les polluants secondaires qui se forment dans l'air suite à des réactions chimiques et qui incluent notamment l'ozone<sup>2</sup>.

### 1.2. Les polluants

Les principaux polluants atmosphériques néfastes pour la santé se présentent sous forme de gaz et de particules respirables. Parmi les gaz, on distingue essentiellement l'ozone ( $O_3$ ), les oxydes d'azotes ( $NO_x$ ) incluant le monoxyde d'azote ( $NO$ ) et le dioxyde d'azote ( $NO_2$ ), le dioxyde de soufre ( $SO_2$ ) et le monoxyde de carbone ( $CO$ ). Les particules respirables ou bien particules fines (PM, abréviation du terme anglais particulate matter) consistent en un

---

<sup>2</sup> Source : <http://www.airparif.asso.fr/pollution/differents-polluants/>

mélange hétérogène de particules solides et liquides en suspension de l'air. À eux, s'ajoutent d'autres polluants chimiques tels que les métaux lourds (Plomb) et les composés organiques volatils (COV) qui comprennent différents produits nocifs comme les BTEX (benzène, toluène, éthylbenzène, xylène), les HAM (hydrocarbures aromatiques monocycliques) et les HAP (hydrocarbures aromatiques polycycliques) (Elichegaray et al. 2009).

Dans ces travaux de thèse, nous nous sommes intéressés spécifiquement à l'effet du dioxyde de carbone ( $\text{NO}_2$ ) et des particules ayant un diamètre aérodynamique inférieur à 10  $\mu\text{m}$  ( $\text{PM}_{10}$ ) sur les issues de grossesse. Les raisons principales étaient la disponibilité de ces polluants dans notre population d'étude et l'importance des effets de l'exposition à ces polluants sur la santé. En effet, le  $\text{NO}_2$  est très irritant pour l'appareil respiratoire et les  $\text{PM}_{10}$ , matières particulaires dont la taille est inférieure à 10  $\mu\text{m}$ , peuvent atteindre système pulmonaire causant des troubles respiratoires et même atteindre le système cardio-vasculaire (Elichegaray et al. 2009).

### **1.3. Surveillance et réglementation**

La surveillance de la qualité de l'air est réalisée dans le cadre réglementaire défini par la Loi sur l'Air et l'Utilisation Rationnelle de l'Énergie du 30 décembre 1996 (LAURE). La LAURE fixe comme objectif « le droit à chacun de respirer un air qui ne nuise pas à sa santé » et fonde les conditions de la surveillance de la qualité de l'air et de l'information du public en France. Cette loi confie aux Associations Agréées de Surveillance de la Qualité de l'Air (AASQA) la mise en œuvre de la surveillance de la qualité de l'air et l'information du public dans les territoires. Depuis 1996, cette surveillance est notamment obligatoire pour le dioxyde d'azote ( $\text{NO}_2$ ) et les particules fines ( $\text{PM}_{10}$  et  $\text{PM}_{2.5}$ ).

Pour améliorer la qualité de l'air, il est nécessaire d'agir sur les sources de pollutions. Des recommandations sur la qualité de l'air ont été mises en place par l'OMS au niveau mondiale.

Les concentrations limites recommandées sont respectivement de 40 et 20 µg/m<sup>3</sup> en moyenne annuelle pour le NO<sub>2</sub> et les PM<sub>10</sub> (WHO 2005<sup>3</sup> : guidelines, *values recommended*).

En Europe, les recommandations sur la qualité de l'air sont réglementées par la directive européenne 2008/50/CU du 21 mai 2008 nommée la directive pour la qualité de l'air ambiant et un air pur pour l'Europe. Ces recommandations suivent les valeurs limites de l'OMS pour le NO<sub>2</sub>, mais pas pour les PM<sub>10</sub>. En effet, la valeur limite à respecter pour les PM<sub>10</sub> est de 40 µg/m<sup>3</sup> en moyenne annuelle (EC directive 2008/50/CU<sup>4</sup> : limits values).

#### **1.4. Estimation des niveaux de polluants**

Différentes méthodes peuvent être utilisées pour estimer l'exposition aux polluants de l'air. Comme l'écrit Johanna Lepeule : « Un des grands défis en épidémiologie environnementale est l'estimation de l'exposition individuelle, du fait de la forte variation spatio-temporelle des polluants et de l'influence des comportements individuels sur l'exposition personnelle. L'erreur de mesure sur l'exposition peut être source de biais important dans l'estimation des effets de la pollution de l'air sur la santé »<sup>5</sup>. Jusqu'à aujourd'hui, beaucoup d'études ont estimé l'exposition à la pollution de l'air à l'aide de données provenant des stations permanentes de mesure de la qualité de l'air les plus proches du domicile des sujets (modèle dit « station »). En revanche si ces données fournissent une excellente résolution temporelle (mesures horaires), la densité spatiale est limitée, due à la faible densité des stations, et sont ainsi susceptibles d'entraîner d'importantes erreurs de mesure de l'exposition. La modélisation des expositions à la pollution de l'air est en pleine évolution. Récemment, des modèles à résolution spatiale fine ont été développés : modèles de dispersion (incluant des données d'émissions, de météorologie et de configuration du bâti), modèles géostatistiques

---

<sup>3</sup> <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs313/en/>

<sup>4</sup> <http://ec.europa.eu/environment/air/quality/standards.htm>

<sup>5</sup> Lepeule J, Caini F, Marquis N, Hulin A, Galineau J, Navel V, et al. 2012. Effets de l'exposition maternelle à la pollution atmosphérique sur le déroulement de la grossesse : résultats de la cohorte mère-enfant eden. *Pollut. Atmos.* 72–79.

(interpolation spatiale entre plusieurs points de mesure), et modèles de régression (land-use regression, prédition des concentrations en un lieu donné à partir des caractéristiques du terrain et du trafic) (Nieuwenhuijsen et al. 2006).

### **1.5. Facteurs saisonniers et météorologiques influant sur les concentrations en PM<sub>10</sub> et en NO<sub>2</sub>**

Les concentrations en NO<sub>2</sub> et PM<sub>10</sub> varient selon le facteur saisonnier et donc des conditions météorologiques. En effet, le froid diminue la volatilité de certains gaz tandis que la chaleur est favorable à la formation photochimique de l'ozone. Par ailleurs, on constate également une augmentation des concentrations de ces polluants lors de températures froides, due notamment à une augmentation de sources d'émission telle que le chauffage.

## **2. Les conditions météorologiques**

Cette dernière décennie, il y a eu un intérêt croissant pour le changement climatique et notamment son impact sur l'augmentation et/ou l'évolution des évènements météorologiques (fréquence et intensité). Parmi les facteurs météorologiques, on distingue principalement la pression atmosphérique, la température, l'humidité, le vent, les précipitations et les nuages.

*Dans ces travaux de thèse, nous nous sommes intéressés plus particulièrement deux facteurs météorologiques : la température et l'humidité relative. Ces deux facteurs sont décrits en détail dans les sections suivantes.*

## 2.1. Définitions et unités de mesure

Selon Météo France<sup>6</sup>, **la température ( $T^{\circ}$ )** se définit comme suit : « Il existe différentes significations de la température. En effet, sa perception varie d'un individu à l'autre et selon les conditions atmosphériques (vent, humidité...). L'organisation météorologique mondiale (OMM) définit la température de l'air (ou température ambiante) comme la température mesurée par un thermomètre ou sonde exposés à l'air dans un endroit à l'abri du rayonnement solaire direct. Le thermomètre est généralement placé à 1,5 m du sol dans un abri ajouré. On parle de température ressentie ou éolienne pour exprimer la température lorsque l'on prend en compte la vitesse du vent. La température ressentie peut également dépendre de l'humidité de l'air et du rayonnement solaire ».

Il existe différentes unités de mesure pour la température telles que le kelvin (K), le degré Celsius ( $C^{\circ}$ ) et le degré Fahrenheit ( $^{\circ}F$ ). En France et dans la majorité des pays, l'unité de mesure utilisée est le degré Celsius ( $^{\circ}C$ ) où  $0^{\circ}C$  correspond au point de congélation de l'eau, et  $100^{\circ}C$  au point d'ébullition de l'eau, sous les conditions standard de pression.

**Tableau 1. Comparaison des échelles de température pour les valeurs importantes, dans les conditions de pression standard.**

	Kelvin	Celsius	Fahrenheit
<b>Zéro absolu</b>	0 K	-273,15°C	-459,67°F
Température de <b>fusion</b> de l'eau	273,15 K	0°C	32°F
Température d' <b>ébullition</b> de l'eau	373,15 K	100°C	212°F

Toujours selon Météo France<sup>7</sup>, **l'humidité** se définit comme suit : « En météorologie, l'humidité désigne la quantité de vapeur d'eau contenue dans l'air. La vapeur d'eau est l'une des formes que l'eau – indispensable à la vie – peut prendre sur terre. La vapeur d'eau est

<sup>6</sup> Source : <http://www.meteofrance.fr/prevoir-le-temps/observer-le-temps/parametres-observees/température>

<sup>7</sup> Source : <http://www.meteofrance.fr/prevoir-le-temps/observer-le-temps/parametres-observees/humidite>

absolument transparente et invisible. On quantifie l'humidité de l'air de deux manières : l'humidité absolue et l'humidité relative.

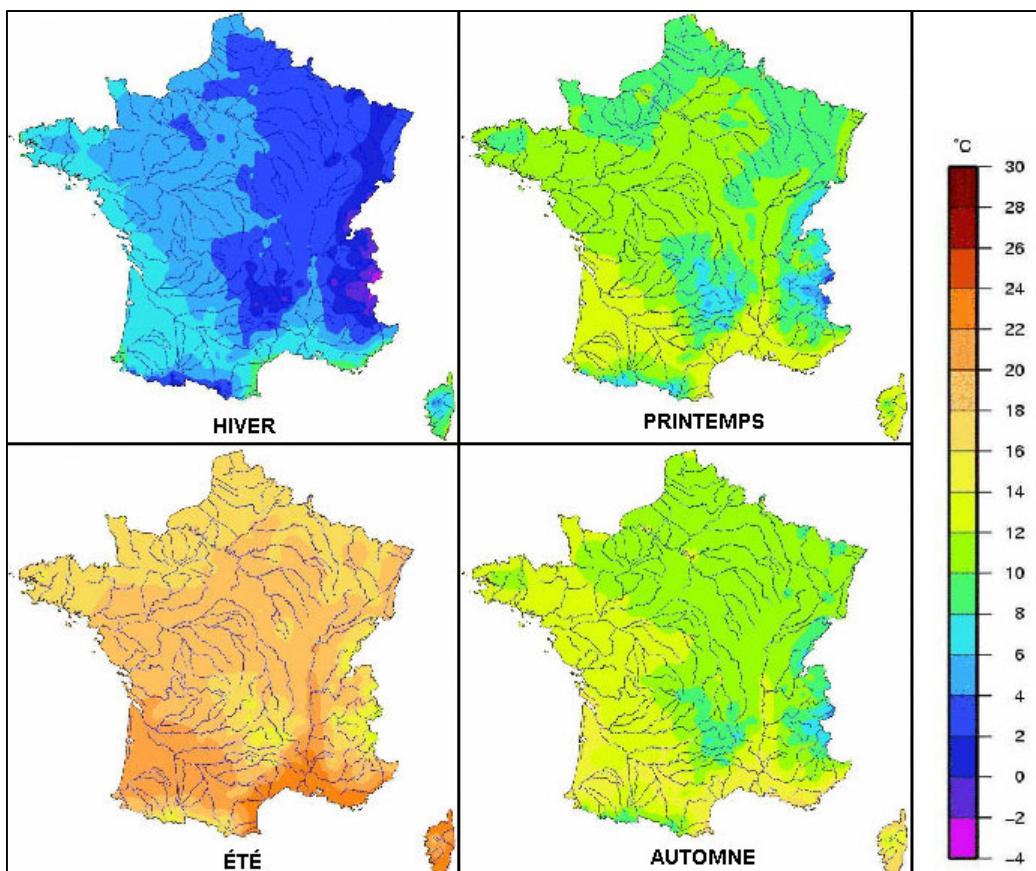
**L'humidité absolue** désigne la quantité de vapeur d'eau contenue dans l'air. Elle s'exprime en gramme d'eau par mètre cube d'air ( $\text{g}/\text{m}^3$ ). Cette quantité est invariante, elle n'est pas soumise aux variations de la température. En effet, l'air est un mélange d'air sec et de vapeur d'eau et un mètre cube d'air contient toujours quelques grammes de vapeur d'eau. Cette masse de vapeur d'eau ne change pas si la température du volume d'air change (sous réserve qu'il n'y ait pas condensation, à savoir de transformation d'une partie de la vapeur d'eau en eau liquide).

**L'humidité relative** désigne la quantité de vapeur d'eau contenue dans l'air en comparaison à la quantité maximum de vapeur d'eau qu'il peut contenir à une température donnée. C'est cette donnée que mesurent les météorologues. L'humidité relative s'exprime en pourcentage. 100 % correspondent à un air saturé en vapeur d'eau (risque de nuage, pluie, brouillard, rosée ou givre), 0 % à un air parfaitement sec (cette valeur d'humidité relative n'est jamais atteinte dans la nature, pas même dans les déserts). Plus l'air est chaud, plus il peut contenir d'eau sous forme vapeur. Inversement, quand l'air se refroidit la vapeur condense et forme des gouttelettes d'eau liquide : on dit que le seuil de la saturation augmente avec la température. L'humidité relative d'une masse d'air varie donc avec la température de l'air. Lorsque la température augmente, en journée, l'humidité relative diminue, alors que le contenu en eau de la masse d'air – l'humidité absolue – reste inchangé. Un taux d'humidité de 10 à 20 % correspond à un air très sec, trop sec pour le confort de l'organisme. Inversement, lorsque les températures chutent, en cours de nuit, l'humidité relative augmente et peut atteindre la saturation soit une humidité relative de

100 %. À 30 °C, l'air peut contenir jusqu'à 30g/m<sup>3</sup> d'eau sous forme de vapeur, soit 10 fois plus qu'à -5 °C. L'humidité est mesurée à l'aide d'un hygromètre ».

## 2.2. La saisonnalité

La météorologie suit des cycles particuliers tels que les saisons, mais aussi des cycles pouvant durer des mois voire même des années. La température moyenne varie selon les saisons comme le montre la Figure 1 avec des températures plus élevées en été et plus faibles en hiver. Selon météo France, on observe globalement la même chose pour l'humidité avec, un taux moyen d'humidité plus élevé en été et plus faible en hiver.



**Figure 1.** Température moyenne saisonnière en °C (normale 1981 - 2010) (© Météo-France, fond de carte IGN)

### **2.3. Normes/surveillance**

Pour effectuer les mesures, les services météorologiques respectent des normes strictes définies par l'Organisation météorologique mondiale. Ces observations, réalisées dans des conditions semblables partout dans le monde, peuvent ainsi être échangées, comparées et intégrées dans les modèles de prévision du temps. En France, les facteurs météorologiques sont mesurés par 554 stations météo réparties sur l'ensemble du territoire français. Ces stations mesurent de façon automatique les paramètres de température et d'humidité sous abri. Les mesures sont effectuées régulièrement et transmises toutes les 6 minutes, toutes les heures ou une fois par jour selon les paramètres et les besoins du centre Météo-France. Ce dernier les diffusera sur différentes bases selon l'usage qui en sera fait (aéronautique, climatologie, prévision immédiate, etc.) et sur le système d'information de l'Organisation météorologique mondiale (OMM)<sup>8</sup>.

Comme écrit sur le site Wikipédia, « Beaucoup reste à faire pour comprendre et paramétrier les événements météorologiques. Comme mentionné précédemment, les équations qui régissent l'atmosphère sont pour le moins complexes et certaines données sont difficiles à obtenir dans certains cas »<sup>9</sup>.

## **3. Issues de grossesse**

### **3.1. Définition**

Différentes mesures sont utilisées pour décrire la santé périnatale du fœtus et du nouveau-né à la naissance. Ces mesures réalisées pendant ou après la grossesse que l'on nomme généralement issues de grossesse permettent d'identifier la morbidité et la mortalité actuelle et future de l'enfant. On distingue entre autres des mesures relatives à la croissance fœtale ou la durée de gestation (Slama et al. 2014 ; Wilcox 2010).

---

<sup>8</sup> Source : Météo France

<sup>9</sup> Source : <https://fr.wikipedia.org/wiki/M%C3%A9t%C3%A9orologie>

### 3.1.1. La croissance fœtale

La croissance fœtale est mesurable grâce à diverses échographies de contrôle effectuées au cours de la grossesse pendant lesquelles plusieurs éléments sont mesurés comme le diamètre bipariétal, les périmètres crânien et abdominal et la longueur fémorale. Ces mesures permettent d'évaluer grâce aux « déviations standard » ou aux percentiles, si le fœtus a une croissance normale ou non. La croissance fœtale est donc le reflet d'un développement sein. Dans les études épidémiologiques, le poids du bébé à la naissance est couramment utilisé comme marqueur *a posteriori* de la croissance fœtale puisqu'il est facilement mesurable et fiable. Selon Claire Philippat, « Auparavant, le poids de naissance (en continu) était analysé indépendamment de la durée de gestation rendant difficile la distinction entre un faible poids de naissance due à une restriction de la croissance fœtale et un faible poids de naissance due à la prématurité. Désormais, dans les études sur les effets des facteurs environnementaux sur la croissance fœtale, le poids de naissance est corrigé pour l'âge gestationnel. En plus d'un faible poids de naissance, différentes métriques sont aussi utilisées : un petit poids à la naissance défini comme selon l'OMS comme un poids <2500 g à la naissance, un très petit poids à la naissance (<1500 g), un petit poids pour l'âge gestationnel (poids de naissance inférieur au 10<sup>e</sup> percentile suivant les courbes de références de poids pour un âge gestationnel et sexe donné) et un retard de croissance intra-utérin (nouveau-né caractérisé par une croissance insuffisante du fœtus compte tenu de son potentiel génétique) »<sup>10</sup>. Toutefois, d'autres paramètres anthropométriques à la naissance peuvent être utilisés, par exemple le périmètre crânien et la longueur du nouveau-né, fournissant des informations complémentaires.

<sup>10</sup> Philippat Claire, « Utilisation des biomarqueurs d'exposition en épidémiologie environnementale ; application à l'étude des effets des expositions intra-utérines aux phénols et aux phtalates sur la croissance pré- et post-natale, Thèse de doctorat en Ingénierie pour la santé, la cognition, l'environnement, sous la direction de Remy Slama et de Isabelle Pin, Grenoble, 2013.

### **3.1.2. La durée de gestation et la prématurité**

La durée de gestation ou âge gestационnel correspond au nombre de semaines écoulées depuis la date des dernières règles déclarées par la femme enceinte. L'unité est en semaine d'aménorrhée (SA). Le terme théorique de la grossesse est de 40 SA révolues.

La prématurité est quant à elle définie par une durée de gestation strictement inférieure à 37 semaines d'aménorrhées (soit avant le 279e jour de grossesse). On distingue notamment deux autres seuils pour identifier le degré de sévérité de la prématurité : la grande prématurité (naissance entre la 28e et la 32e SA) et la très grande prématurité (naissance avant la 28 SA) (Althabe et al. 2012 ; Goldenberg et al. 2008)

*Nous détaillerons ci-dessous différentes informations relatives aux trois issues de grossesse que nous avons choisies d'étudier dans ces travaux de thèse : la croissance fœtale (poids de naissance), la durée de gestation et la prématurité.*

### **3.2. Prévalence des issues de grossesse défavorables**

D'après l'UNICEF, en 2004, environ 20 millions de nourrissons sont nés avec un faible poids de naissance dans le monde chaque année, représentant environ 15 % de l'ensemble des naissances (Wardlaw 2004). En France, la prévalence de faible poids de naissance se situait autour de 7 % (Wardlaw 2004).

D'après l'OMS, près de 15 millions de bébés naissent prématurément dans le monde chaque année, ce qui représente plus d'un bébé sur 10 (Blencowe et al. 2013). En France, il y a environ 820 000 naissances par an dont 6,6 % sont prématurées (Blondel et al. 2011).

### 3.3. Principaux facteurs de risque

Les origines de la survenue d'une issue de grossesse indésirable sont multifactorielles : facteurs génétiques, fœto-maternels, comportementaux, socioéconomiques, ethniques et environnementaux (Barker 2006 ; Dadvand et al. 2011 ; Goldenberg et al. 2008). Si les mécanismes biologiques suspectés dans la cause des différentes issues de grossesse peuvent être différents, de nombreux déterminants sont communs à l'ensemble de ces issues (Bertin 2015). Un aperçu succinct et non exhaustif de ces déterminants sera donné ci-dessous.

Parmi les facteurs génétiques, on distingue le sexe de l'enfant : ce dernier a été en effet associé avec la croissance fœtale (Valero De Bernabé et al. 2004). Différentes caractéristiques maternelles ont été associées à une augmentation du risque de prématurité et à une altération de la croissance fœtale comme l'âge de la mère, la parité, un indice de masse corporelle (IMC) élevé, une hypertension artérielle et un risque de pré-éclampsie. Plusieurs facteurs de comportements maternels ont été associés à des issues de grossesses indésirables telles que la consommation de tabac et d'alcool pendant la grossesse, une alimentation non équilibrée ou le niveau d'étude (Berkowitz et al. 1998 ; Moutquin 2003). Parmi les facteurs environnementaux, plusieurs études suggèrent un effet délétère de l'exposition maternelle aux pesticides (Philippat et al. 2012 ; Rauch et al. 2012), aux polluants atmosphériques (Glinianaia et al. 2004 ; Stieb et al. 2012) et plus récemment aux événements météorologiques sur les issues de grossesse (Beltran et al. 2014 ; Strand et al. 2011).

*Ci-dessous les liens entre les issues de grossesse et nos facteurs environnementaux d'intérêts seront détaillés.*

### **3.4. Effets de la pollution de l'air sur les issues de grossesse**

Ces dernières années, de nombreuses études se sont intéressées à l'effet de la pollution de l'air sur les issues de grossesse (Bosetti et al. 2010 ; Glinianaia et al. 2004 ; Pedersen et al. 2013 ; Shah et al. 2011 ; Slama et al. 2008 ; Srám et al. 2005 ; Stieb et al. 2012 ; van den Hooven et al. 2012). Selon la revue réalisée par Bosetti et al. 2010, plusieurs études ont rapporté un risque accru de naissances prématurées en lien avec une exposition aux PM<sub>10</sub> : deux pendant la grossesse entière (Brauer et al. 2008 ; Xu et al. 1995), deux au cours du 1<sup>er</sup> et 3<sup>e</sup> trimestre de grossesse (Huynh et al. 2006 ; Ritz et al. 2000), quatre au cours du 1<sup>er</sup> trimestre uniquement (Bobak 2000 ; Hansen et al. 2006 ; Leem et al. 2006 ; Ritz et al. 2007). Plusieurs études ont également suggéré une diminution du poids de naissance en association avec une exposition aux PM<sub>10</sub> pendant la grossesse (Chen et al. 2002), au 1<sup>er</sup> trimestre (Yang et al. 2003), au 3<sup>e</sup> trimestre (Salam et al. 2005 ; Bell et al. 2007).

Concernant l'exposition prénatale au NO<sub>2</sub>, deux récentes études ont montré une association positive et significative avec le risque de naissances prématurées (Olsson et al. 2012 ; Wu et al. 2011) et 1 récente étude a montré une association négative et significative avec le poids de naissance (Panasevich et al. 2016).

### **3.5. Effets des conditions météorologiques sur les issues de grossesse**

Récemment, plusieurs études ont montré que l'exposition maternelle à des événements météorologiques spécifiques pendant la grossesse était associée à des résultats naissances indésirables (examinés par Beltran et al. 2014 ; Strand et al. 2011). La plupart de ces études ont porté sur les naissances prématurées et leur relation avec la température ambiante sur les fenêtres d'exposition à court terme pendant la grossesse, généralement jours ou semaines avant l'accouchement. Ils ont rapporté principalement un risque accru d'accouchement

prématuré avec une température élevée (Basu et al 2010 ; Schifano et al 2013 ; Strand et al 2012 ; Vicedo-Cabrera et al 2014). Une étude récente menée en Chine a examiné des expositions plus longues pendant la grossesse et a rapporté que la haute température moyenne sur l'ensemble de la grossesse a été associée à un risque accru d'accouchement prématuré (He et al. 2015). Une autre étude en Grèce a montré que la température moyenne au cours du mois de l'accouchement a été associée à une réduction de l'âge gestationnel (Flouris et al. 2009). Relativement peu d'études ont examiné l'association entre le poids de naissance et la température ambiante pendant la grossesse. Leurs résultats sont variables. Une vaste étude en Irlande et une plus petite en Turquie ont signalé une augmentation du poids de naissance en association avec une augmentation de la température au cours du deuxième trimestre de la grossesse (Elter et al 2004 ; Murray et al. 2000). En revanche, une étude en Écosse a suggéré une diminution du poids de naissance lorsque les femmes ont été exposées à des températures élevées dans le premier trimestre de la grossesse (Lawlor et al. 2005). Dans une étude récente dans le Massachusetts, Kloog et al. (2015) ont rapporté que la température moyenne au cours du dernier trimestre de la grossesse a été associée à une diminution du poids de naissance.

Un autre facteur météorologique d'intérêt est l'humidité relative, mais la littérature sur son association avec les résultats de la grossesse a reçu moins d'attention. Strand et al. (2012) et He et al. (2015) ont ajusté sur l'humidité relative lorsqu'ils étudiaient l'association de la température avec les résultats de la grossesse, mais l'effet potentiel de l'humidité relative n'a pas été signalé. Deux autres études ont porté sur les effets néfastes de la température apparente, un indice combinant température et l'humidité, et ont trouvé une association significative avec l'accouchement prématuré et un âge gestationnel réduit (Dadvand et al 2011 ; Lajinian et al. 1997).

*Les mécanismes biologiques possibles qui pourraient expliquer les associations entre pollution de l'air, paramètres météorologiques, et les issues de grossesse défavorables semblent complexes et sont encore mal connus, mais des hypothèses existent. Plusieurs études ont suggéré que l'induction d'un stress oxydatif ou d'une inflammation systémique pourrait jouer un rôle important sur la prématureté et la croissance fœtale (Kannan et al. 2006 ; Lin et al. 2016 ; Slama et al. 2008 ; Vadillo-Ortega et al. 2014). Une autre hypothèse est qu'en affectant les mécanismes épigénétiques, les expositions environnementales pourraient influencer l'expression de certains gènes et de ce fait influencer le développement et la croissance fœtale (Foley et al. 2009 ; Waterland and Michels 2007).*

#### **4. Épigénétique et rôle potentiel de la méthylation de l'ADN comme biomarqueur des expositions**

##### **4.1. L'épigénétique, définition**

*« La branche de la biologie qui étudie les relations de cause à effet entre les gènes et leurs produits, faisant apparaître le phénotype », Waddington CH.*

*« L'épigénétique a toujours été l'ensemble de ces choses bizarres et merveilleuses que la génétique ne sait pas expliquer. » Barlow D.*

*« L'ADN ne fait que porter le code génétique. L'épigénétique donne les moyens à la cellule de l'interpréter le mieux possible », Artymiuk P.*

Autant de définitions pour tenter de définir ce phénomène étrange qu'est l'épigénétique. C'est au milieu du XIXe siècle que le terme « *épigénétique* » est apparu pour combler la brèche entre l'inné et l'acquis. Ce terme a été utilisé pour décrire les évènements qui ne pouvaient pas être expliqués par la génétique (Goldberg et al. 2007 ; Holliday 2006). Il est redéfini par Conrad Waddington, biologiste anglais, en 1942 en attribuant ce terme à l'étude des influences de l'environnement sur l'expression des gènes. L'épigénétique se définit aujourd'hui par l'étude des changements modifiant l'expression des gènes ayant lieu sans altération de la séquence de l'ADN (Berger et al. 2009). Pour reprendre une métaphore utilisée par Thomas Jenuwein (spécialiste de biologie moléculaire et d'épigénétique), on peut sans doute comparer la distinction entre la génétique et l'épigénétique à la différence entre l'écriture d'un livre et sa lecture : « la génétique renvoie à l'écriture des gènes » et « l'épigénétique renvoie à la lecture des gènes ».

## 4.2. Les mécanismes épigénétiques

Toutes les cellules d'un organisme (présentent au sein d'un même individu) possèdent *a priori* le même code génétique et le même nombre de gènes. Pourtant au cours de leur différenciation, les cellules vont acquérir des profils d'expression spécifiques d'un tissu et exprimer les gènes nécessaires à leurs fonctions : « même si elles contiennent la même information, elles n'en font visiblement pas toutes le même usage »<sup>11</sup>. Selon Vanille Greiner, « L'existence d'épigénomes distincts justifie le fait qu'un même génotype peut générer différents phénotypes. En d'autres termes, ce sont les modifications épigénétiques, héritables lors des divisions cellulaires et réversibles, qui régissent ainsi le destin d'une cellule, en

---

<sup>11</sup> Source : <http://www.inserm.fr/thematiques/genetique-genomique-et-bioinformatique/dossiers-d-information/epigenetique>

régulant l'expression de ses gènes sans affecter la séquence de l'ADN (Berger et al. 2009) »<sup>12</sup>.

On distingue différents types de mécanismes épigénétiques qui vont entraîner des modifications dans l'architecture de la chromatine, support de l'information épigénétique : les modifications post-traductionnelles des histones, les ARNs non – codants et la méthylation de l'ADN (Cao-Lei et al. 2013). Un grand nombre d'acteurs régulent ces mécanismes. Ils sont capables d'écrire, de lire ou d'effacer ces modifications et vont ensemble coopérer pour inhiber ou activer l'expression de gènes spécifiques.

La méthylation de l'ADN constitue sans doute le mécanisme le mieux décrit à l'heure actuelle et le plus pertinent à envisager à l'échelle d'une cohorte épidémiologique (Jones 2012 ; Li and Reinberg 2011). Les travaux de thèse ont porté sur ce mécanisme.

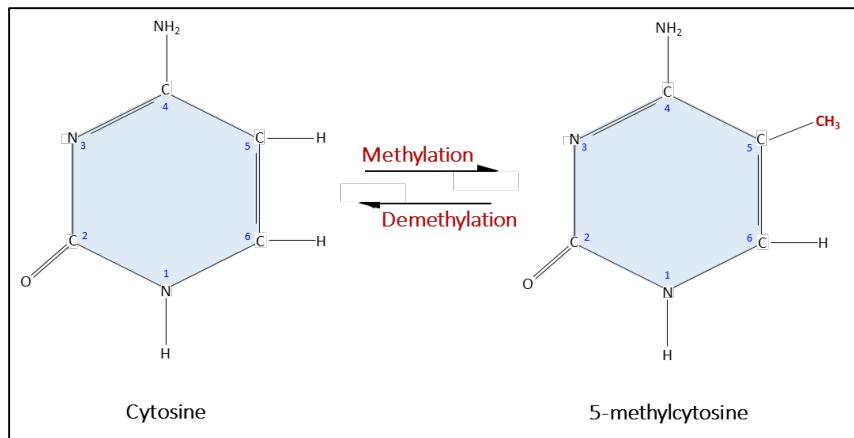
### **4.3. La méthylation de l'ADN**

Modification réversible de l'ADN génomique, la méthylation de l'ADN consiste en l'addition d'un groupement de méthyle ( $\text{CH}_3$ : 1 atome de Carbone lié à 3 atomes d'Hydrogène) à l'extrémité du carbone 5 d'une cytosine (c'est-à-dire au niveau de l'atome de carbone en 5<sup>e</sup> position du cycle d'une cytosine) généralement au niveau d'une séquence 5'-Cytosine-Phosphate-Guanosine appelée « dinucléotide CpG » ou « site CpG » (Egger et al. 2004) (Figure 2). Les sites CpG sont répartis de manière non aléatoire sur le génome et selon une structure particulière. On distingue les CpGs « island » (régions enrichies environ de 60 à 70% de sites CpG), les CpGs « shores » (régions moins enrichies en sites CpG qui s'étendent de part et d'autre de la région CpG island) et les CpGs « shelves » (régions encore moins

---

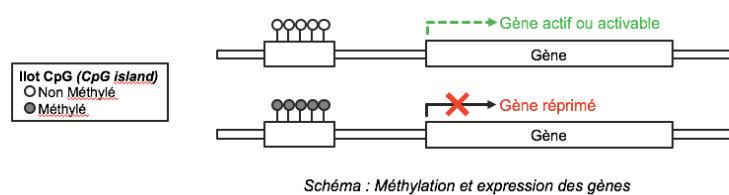
<sup>12</sup> Grenier Vanille, « Epigénétique et methylation de l'AND : Etude des mécanismes d'interaction du domaine SRA de UHRF1 avec l'ADN hémi-méthylé », Thèse de doctorat en Sciences du Vivant, sous la direction de Yves Mely et Christian Bronner, Strasbourg, 2012.

enrichies en sites CpG que les CpGs shores qui s'étendent au-delà des régions CpG shores) (Lander et al. 2001).



**Figure 2. Schéma de la méthylation**

La méthylation de l'ADN est impliquée dans de nombreux processus biologiques tels que la régulation de la transcription des gènes, la formation et la maintenance de la chromatine, le développement et d'autres processus fondamentaux. Elle constitue un élément clé de la régulation épigénétique de l'expression des gènes. Si l'une de ces fonctions principales est de pouvoir réguler l'expression des gènes, les mécanismes par lesquels la méthylation régule l'expression génique sont encore mal compris. En règle générale, une forte méthylation d'une région riche en CpG (i.e. *CpG island*) est associée à un état répressif (non exprimé) stable du gène. La relation entre méthylation et expression du gène peut être schématisée comme ci-dessous (Figure 3) :



**Figure 3. Schéma – Rôle entre la méthylation et l'expression des gènes.**

Inversement, un niveau faible de méthylation d'une région riche en CpG (i.e. *CpG island*) engendre une forte expression et donc une activation du gène correspondant. cela n'est

cependant pas toujours vérifié. En effet, selon Aïssi (2015), des études ont démontré qu'une hyperméthylation peut être associée à une augmentation de l'expression du gène (Gutierrez-Arcelus et al. 2013 ; van Eijk et al. 2012). Par ailleurs, il est suggéré que la position du site CpG dans le gène a une importance. En effet, la méthylation de l'ADN des sites CpG au niveau de la région promotrice d'un gène est généralement associée avec l'extinction du gène tandis que dans le corps du gène ou dans la région 3' UTR cela induirait une activation du gène (Grundberg et al. 2013 ; Jjingo et al. 2012).<sup>13</sup>

#### **4.4. Facteurs environnementaux et méthylation de l'ADN**

Le profil de méthylation de l'ADN d'un individu est susceptible de subir des modifications induites par des facteurs environnementaux tout au long de la vie. Plusieurs études ont suggéré des altérations de la méthylation de l'ADN en association avec la pollution de l'air (Baccarelli et al. 2009 ; Bellavia et al. 2013 ; Bind et al. 2014 a, 2015 ; Madrigano et al. 2011 ; Panni et al. 2016). La plupart de ces études ont été réalisées chez l'adulte et portaient sur des approches gènes-candidats ou méthylation globale. Dans leur récente étude, Panni et al. 2016, ont utilisé une approche du génome entier pour étudier les associations entre la méthylation de l'ADN dans le sang de l'adulte et la pollution ; et ont identifié plusieurs sites CpG associés aux PM. Dans le contexte de la grossesse et plus spécifiquement des issues de grossesse, il existe très peu de littérature. Une étude, basée sur des échantillons buccaux provenant d'enfants, a reporté des changements de méthylation pour trois gènes NOS en association avec une exposition aux particules. À ce jour, seulement deux études ont étudié les effets de la pollution de l'air pendant la grossesse sur la méthylation de l'ADN (Gruzieva et al. 2016 ; Janssen et al. 2013). Janssen et al. 2013 ont reporté une

---

<sup>13</sup> Aïssi Dylan, « Épidémiologie épigénétique de biomarqueurs du risque cardio-vasculaire : intérêt de l'étude de la méthylation de l'ADN à partir d'échantillons sanguins », Thèse de doctorat en Santé Publique – génétique statistique, sous la direction de David-Alexandre Tregouet, Paris Saclay, 2015.

diminution de la méthylation globale placentaire en association avec une exposition aux particules en début de grossesse et sur la grossesse entière. Gruzieva et al. (2016) ont quant à eux reporté une association significative entre l'exposition au NO<sub>2</sub> pendant la grossesse et une modification de la méthylation dans des gènes liés à la mitochondrie.

Dans le contexte des expositions intra-utérines, le placenta représente un tissu pertinent pour l'étude des altérations de la méthylation de l'ADN. En effet, tout au long du développement in utero, le placenta joue un rôle clé dans le contrôle de la croissance et le développement, mais il est aussi le principal lieu d'échanges materno-fœtaux (Koukoura et al. 2012). Ce tissu éphémère pourrait refléter l'exposition cumulée de la mère pendant la grossesse, et donc l'exposition du nouveau-né depuis sa conception. De plus, il apparaît particulièrement pertinent de s'intéresser aux marques épigénétiques au cours de la grossesse pour deux raisons : 1) il s'agit d'une période d'intense remodelage épigénétique (Foley et al. 2009) qui va déterminer le patrimoine épigénétique de l'enfant et conditionner son risque vis-à-vis de certaines pathologies, et 2) le placenta est un tissu pertinent qui reflète l'environnement du fœtus pendant la vie intra-utérine et qui est relativement facile à recueillir. Des modifications dans la fonction placentaire sont susceptibles de conduire à des altérations de la croissance fœtale (Banister et al. 2011 ; Koukoura et al. 2012).

Bien qu'il s'agisse d'un champ très prometteur, le rôle de l'exposition à la pollution atmosphérique pendant la période fœtale dans les variations d'expression génétique du placenta n'a été, à ce jour, que très peu étudié. Concernant les conditions météorologiques, une étude chez les hommes âgés s'est intéressée à la relation entre température, humidité relative et méthylation de l'ADN et a reporté une diminution de la méthylation pour *LINE-1* et une augmentation de la méthylation pour *Alu* (Bind et al. 2014 b). À notre connaissance, aucune étude n'a à ce jour étudié les associations entre une exposition prénatale aux conditions météorologiques et la méthylation de l'ADN.

#### **4.5. Évaluation des données de large dimension de la méthylation de l'ADN**

L'utilisation de marqueurs épigénétiques en épidémiologie est un champ très prometteur qui pose des défis en termes d'approche biologique, métrologique, épidémiologique et biostatistique. Jusqu'à présent, les deux approches principalement utilisées pour analyser des données de méthylation de l'ADN consistaient en une approche dite « gènes spécifiques » (ou « gènes candidats ») et une approche de méthylation globale reposant principalement sur l'analyse de séquences répétées (« repetitive elements » en anglais). La première approche consiste à supposer l'implication d'un gène dans un quelconque effet *a priori* et de tester son association avec une exposition ou une maladie/pathologie afin de confirmer ou non cette implication *a posteriori*. Cette approche présente le défaut de ne pouvoir cibler et analyser que les gènes connus dont la fonction est évidemment connue et qui présente un rapport *a priori* évident avec la pathologie. Elle ne permet donc pas de découvrir de nouvelles voies possibles. Il en est de même pour la seconde approche.

L'identification de nouvelles voies biologiques nécessite d'utiliser des approches agnostiques dites « génome entier ». Les phénomènes épigénétiques ont suscité beaucoup d'intérêts depuis 2010 avec l'apparition de puces de haute densité permettant d'étudier la méthylation de l'ADN à grande échelle, donnant lieu aux études d'associations épigénome entier ou Epigenome-Wide Association Study (EWAS) en anglais. Cette approche EWAS consiste à tester l'association entre la méthylation de l'ADN tout au long du génome et les facteurs environnementaux. Cette approche prometteuse pour la découverte de nouveaux mécanismes biologiques est en plein essor et requiert de nombreux challenges principalement dans les outils et méthodes statistiques.

## **OBJECTIF ET STRUCTURE DE LA THÈSE**



De manière globale, il semble que l'exposition à certains facteurs environnementaux puisse modifier l'environnement intra-utérin au cours de périodes critiques du développement. Cela peut entraîner des changements permanents dans la structure du fœtus, la physiologie et le métabolisme qui favorisent d'abord la survie, et plus tard, prédisposent ces sujets à une maladie chronique dans l'enfance ou à l'âge adulte. Cette hypothèse est définie à travers la DOHaD (« Developmental Origins of Health and Diseases ») selon laquelle une partie des troubles de santé de l'enfant et de l'adulte trouve son origine dans les expositions environnementales subies durant le développement (Barker 2004, 2007, 1995, 2006 ; Gluckman et al. 2008).

L'objectif principal de ces travaux de thèse a été d'étudier dans un premier temps les associations entre l'exposition prénatale aux facteurs météorologiques et les issues de grossesse défavorables, et, dans un second temps, d'évaluer l'effet potentiel des facteurs météorologiques et des polluants atmosphériques pendant la grossesse sur la méthylation de l'ADN placentaire.

Plus précisément, notre premier objectif (traité dans le chapitre II) visait à répondre à la question :

- Est-ce que les conditions météorologiques pendant la grossesse peuvent être associées à des conséquences néfastes sur la durée de gestation, la prématurité et le poids des nouveau-nés ?

Si des études ont montré des effets de la pollution sur des issues de grossesse indésirables et suggéré également des effets similaires pour les conditions météorologiques, les mécanismes sous-jacents qui pourraient expliquer ces effets restent encore très peu connus. Les mécanismes épigénétiques semblent constituer une piste intéressante dans l'identification de ces processus. Ce qui conduit à évaluer si les mécanismes épigénétiques, tels que la

méthylation de l'ADN, pourraient être influencés par ces expositions environnementales pendant la grossesse. D'où notre seconde question principale (traitée dans le chapitre III) :

- L'exposition maternelle aux polluants de l'air ou conditions météorologiques peut-elle être associée des modifications épigénétiques ?

Nos travaux de thèse se sont appuyés sur deux cohortes françaises mères-enfants EDEN (2003-2006) et PELAGIE (2002-2006). Ces cohortes avaient pour but général d'identifier les déterminants pré- et post- nataux du développement et de la santé pendant la grossesse, à la naissance et dans l'enfance. Les femmes, incluses en début de grossesse, étaient issues de 3 zones géographiques (Poitou-Charentes, Lorraine et Bretagne).

---

Ce manuscrit s'articule autour de trois chapitres :

- Dans le premier chapitre, nous présentons la population d'étude et les évènements d'intérêts en vue de bien comprendre le cadre de cette étude. Nous y décrivons les méthodes et matériels utilisés, les cohortes, les données recueillies et produites au cours de ce travail.
- Ensuite, dans le deuxième chapitre, nous présentons les résultats de l'étude sur les liens entre les conditions météorologiques pendant la grossesse et trois issues de grossesse défavorables.
- Dans le dernier chapitre, nous présentons le rôle potentiel de la méthylation de l'ADN placentaire comme biomarqueur des expositions fœtales à la pollution atmosphérique et aux conditions météorologiques. Dans un premier sous-chapitre, nous présenterons une approche agnostique et dans un deuxième sous-chapitre, nous présenterons une approche avec une hypothèse *a priori* intégrant des connaissances biologiques.

Enfin, nous terminerons par une discussion générale et un regard réflexif sur le travail réalisé.

---

## **CHAPITRE I :**

### **POPULATION ET ÉVÈNEMENTS D'INTÉRÊTS**



*L'objectif de ce chapitre est de présenter la population d'étude ainsi que les événements d'intérêts sur lesquels reposent les travaux de cette thèse. La population étudiée était issue de deux cohortes françaises mère-enfant ayant un design similaire : la cohorte EDEN (Etude des Déterminants pré et postnatals du développement et de la santé de l'ENfant) et la cohorte PELAGIE (Perturbateurs endocriniens : Etude Longitudinale sur les Anomalies de la Grossesse, l'Infertilité et l'Enfance). Ces deux cohortes avaient pour même but d'étudier les effets des événements survenus pendant la vie fœtale sur le développement, la santé à la naissance et dans l'enfance. Les femmes étaient recrutées pendant leur grossesse puis suivies, ainsi que leur enfant au moins jusqu'à leur 5<sup>ème</sup> anniversaire. Les chapitres concernant la méthylation de l'ADN reposent uniquement sur un échantillon de la cohorte EDEN, les données n'étant pas disponibles dans la cohorte PELAGIE.*

## **1. Les cohortes**

Ces cohortes ont été approuvées par tous les comités d'éthique pertinents et toutes les femmes participantes ont donné par écrit un consentement éclairé pour leur propre participation et celle de leur progéniture. Toutes les données ont été recueillies selon des procédures standardisées et des séances de formation pour les enquêteurs ont été organisées.

### **1.1. PELAGIE**



Le recrutement des femmes enceintes s'est effectué avant 19 semaines d'aménorrhées, dans les cabinets de gynécologues ou échographistes de Bretagne (Ille et Vilaine, Finistère et Côtes d'Armor) ayant souhaité participer à l'étude. Au total, 3421 femmes enceintes ont été recrutées entre avril 2002 et février 2006. Des informations sur les caractéristiques

socioéconomiques et sociodémographiques, la consommation de tabac et d'alcool, l'alimentation, les antécédents médicaux et les mesures anthropométriques ont été recueillies à partir d'un auto-questionnaire fourni à l'inclusion. Les informations médicales sur le déroulement de la grossesse (hypertension, diabète gestationnel...), la naissance (mode d'accouchement...) et l'état de santé du nouveau-né (âge gestationnel, paramètres anthropométriques...) ont été obtenues à partir des dossiers médicaux réalisés par les sages-femmes et le pédiatre (Chevrier et al. 2011).

## 1.2. EDEN



Le recrutement des femmes enceintes s'est effectué avant 24 semaines d'aménorrhées, dans les maternités des Centres Hospitalo-Universitaires (CHU) de Nancy depuis septembre 2003 et de Poitiers depuis février 2003. Pour les deux centres, le recrutement s'est terminé fin 2006 avec l'inclusion de 2002 femmes (1034 femmes pour Nancy et 968 pour Poitiers). Des informations sur les caractéristiques socioéconomiques et sociodémographiques, la consommation de tabac et d'alcool, l'alimentation, les antécédents médicaux et les mesures anthropométriques, ont été collectées par entretien au cours de la grossesse puis par auto-questionnaire en suites de couches. Les informations sur le déroulement de la grossesse (hypertension, diabète gestationnel...), la naissance (mode d'accouchement...) et la santé de l'enfant (âge gestationnel, paramètres anthropométriques...) ont quant à elles été obtenues à partir d'examens cliniques ou des dossiers médicaux. Enfin, les critères d'exclusion étaient des antécédents de diabète, une grossesse multiple, une incapacité à parler français et l'intention d'accoucher en dehors de l'hôpital universitaire ou de sortir de la zone d'étude au cours des trois prochaines années (Heude et al. 2015).

*Dans le but de réaliser une étude combinant les données de ces deux cohortes très similaires, une étape d'homogénéisation sur le codage des variables a été nécessaire.*

## **2. Les événements d'intérêts**

### **2.1. Les issues de grossesse**

Dans ce travail, nous nous sommes intéressés à trois différentes issues de grossesse disponibles dans les deux cohortes : ***le poids du bébé à la naissance*** (en gramme), ***la durée de gestation*** (en SA) et ***la prématurité*** (< 37 SA révolues).

### **2.2. Les expositions environnementales**

L'adresse exacte du domicile des femmes a été recueillie à l'accouchement dans EDEN et à l'inclusion dans PELAGIE puis géocodée avec un système d'information géographique.

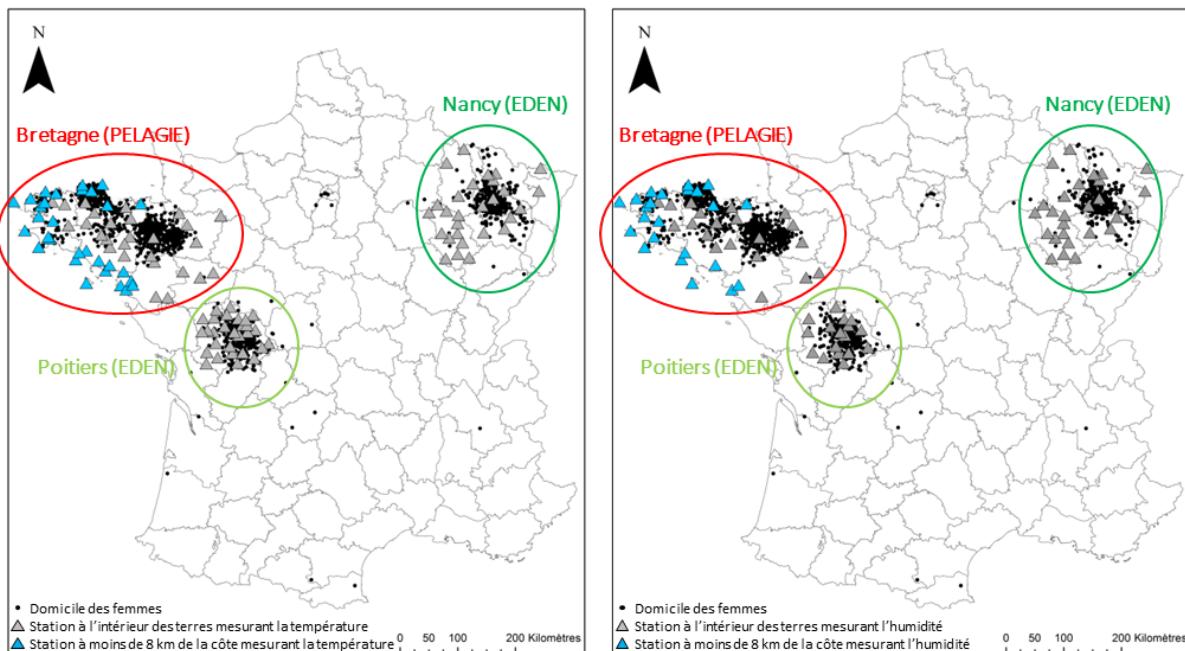
#### ***2.2.1. Les facteurs météorologiques***

Des données quotidiennes de température (en °C) et d'humidité relative (en %) ont été obtenues à partir de la « Publithèque » de Météo France. Ces paramètres météorologiques sont mesurés par des stations météo reparties sur l'ensemble du territoire français.

Pour chaque paramètre météorologique, nous avons calculé la distance entre les stations mesurant le paramètre d'intérêt et le domicile de chaque femme. Pour chaque femme, la station la plus proche de son domicile mesurant le paramètre d'intérêt lui a été attribuée (Figure 1). Nous avons fixé une limite maximale de 40 km entre le domicile et la station. Ainsi, des données manquantes ont été attribuées aux femmes vivant à plus de 40 km de la station la plus proche de leur domicile (n=17). La zone côtière océanique, définie comme le

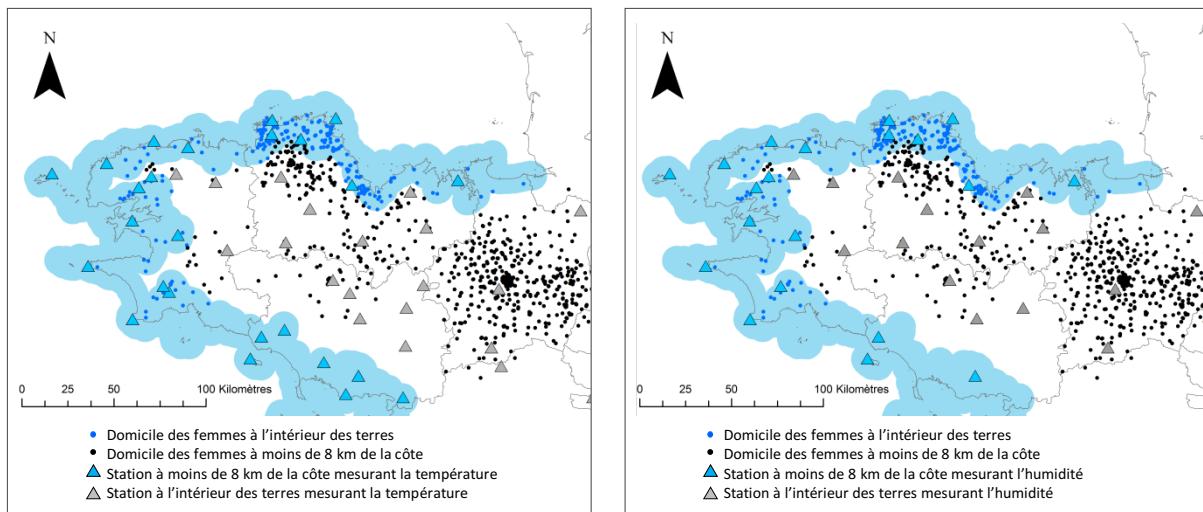
terrain situé à moins de 8 km de la côte, est soumise à des influences météorologiques spécifiques.

Les femmes de la cohorte PELAGIE vivant dans les zones côtières ont été assignées la station météorologique la plus proche se trouve dans la zone côtière (Figures 3 et 4).



**Figure 4. Localisation du domicile des femmes et des stations mesurant les paramètres météorologiques.**

Pour chaque femme, nous avons ensuite calculé la température et l'humidité relative moyennes auxquelles elle était exposée durant différentes fenêtres de temps au cours de la grossesse. Nous nous sommes ainsi intéressés à des fenêtres d'expositions à moyen terme (chaque trimestre de la grossesse et la grossesse entière) et à court terme (jours, semaines et mois précédent l'accouchement). Pour chaque fenêtre d'exposition, au moins 75 % des données devaient être disponibles. Dans le cas contraire, l'exposition était manquante pour la fenêtre d'exposition en question.

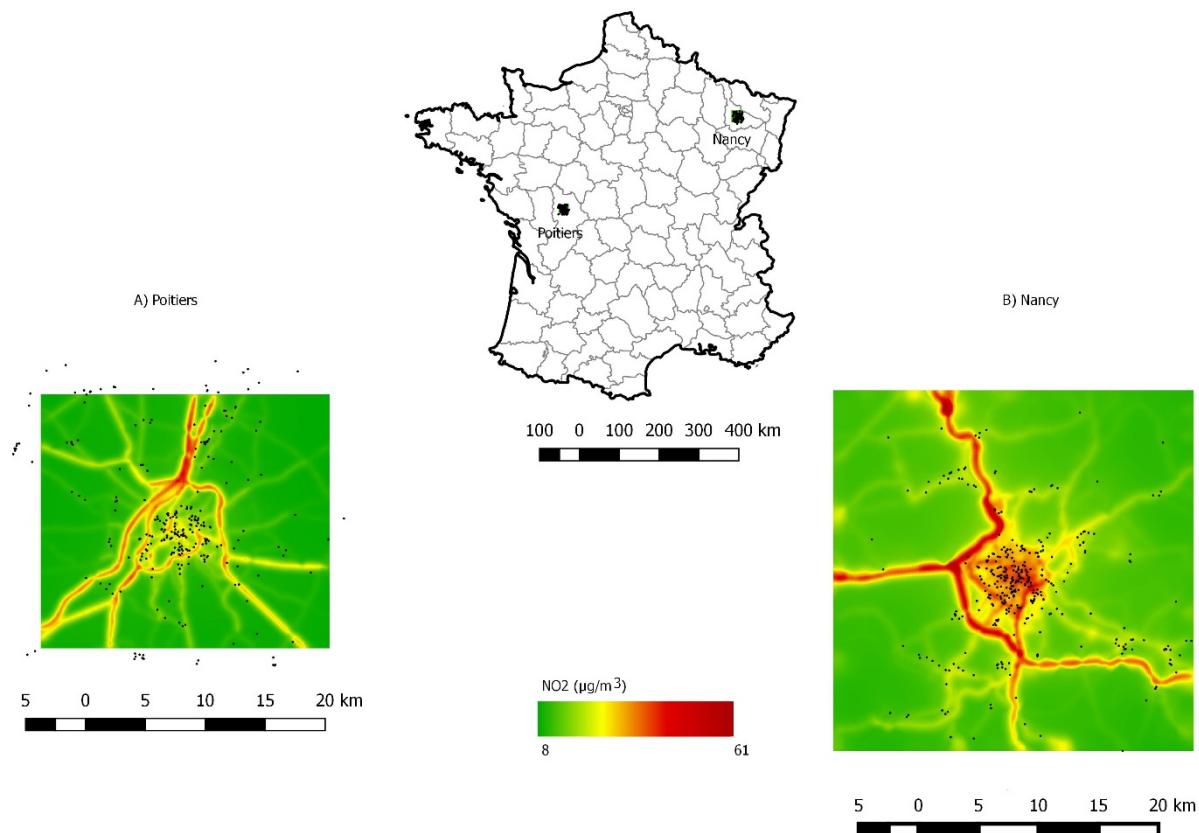


**Figure 5. Localisation du domicile des femmes et des stations mesurant les paramètres météorologiques en Bretagne.**

### 2.2.2. *Les polluants de l'air*

Les données sur les expositions aux polluants de l'air étaient disponibles uniquement pour la cohorte EDEN. Les niveaux de concentration en  $\text{NO}_2$  et  $\text{PM}_{10}$  ont été estimés à l'adresse du domicile des femmes à l'aide d'un modèle de dispersion implémenté sous le logiciel ADMS-Urban (Sellier et al. 2014). Ce modèle prend en compte des données sur les émissions des polluants, l'occupation des sols, le relief, les conditions météorologiques, la configuration des bâtis à proximité des routes et les réactions chimiques dans l'atmosphère pour modéliser la dispersion des polluants. Il fournit des estimations horaires à l'adresse exacte du domicile des femmes. Les fenêtres de temps au cours de la grossesse ont été calculées de même façon que pour celles des paramètres météorologiques : à court terme (jours, semaines et mois précédent l'accouchement) et à plus long terme au cours de la grossesse (chaque trimestre de la grossesse et la grossesse entière). Les changements d'adresse en cours de grossesse ont été pris en compte en estimant une moyenne des niveaux d'exposition à chaque adresse dans la

période correspondante, pondérée par la durée de résidence à chaque domicile. Ce modèle a été mis en œuvre avec la même méthodologie pour les deux centres : Poitiers et Nancy.



**Figure 6. Niveaux de concentration en NO<sub>2</sub> à Poitiers et à Nancy estimés à partir du modèle de dispersion, 2005.**

### 2.3. La méthylation de l'ADN

Les données méthylation sont issues des analyses des échantillons de placenta qui ont été prélevés à l'accouchement pour 1301 femmes de la cohorte EDEN. Les prélèvements placentaires ont été réalisés selon une procédure standardisée (protocole et film expliquant la procédure à suivre) par la sage-femme ou le technicien de l'étude présent à la maternité. Le placenta a été épongé, et des échantillons d'environ 5 mm x 5 mm ont été réalisés dans le centre de la galette placentaire, en prenant soin d'éviter les zones de nécrose et de ne prélever que les villosités fœtales. Les prélèvements obtenus ont été placés dans des cryotubes

étiquetés avec l'identifiant EDEN de la femme, puis congelés à -80 °C et stockés dans les biothèques ciblées pour l'étude (Hôpital de Nancy et Poitiers).

L'extraction de l'ADN placentaire a été effectuée principalement par la société QIAGEN. L'ADN a été extrait pour 668 couples mère-enfant pour lesquels des données de pollution avec le modèle de dispersion étaient disponibles, et un équilibrage sur le sexe de l'enfant et le centre de l'étude a été réalisé de manière aléatoire. Les ADN ont ensuite été envoyés au Centre National de Génotypage (CNG, Jorg Tost, partenaire du projet) en France, pour la réalisation des analyses de méthylation. La puce Illumina 450K (Infinium HumanMethylation450 BeadChip) a été utilisée pour évaluer les niveaux de méthylation dans les échantillons de placenta (Illumina, San Diego, CA, USA). Environ 480 000 sites de méthylation sont ainsi mesurés sur l'ensemble du génome. Au total, 9 plaques incluant 64 puces ont été utilisées. Ces plaques ont été analysées en 4 groupes. Nous avons reproduit plusieurs échantillons pour déterminer si le groupe, la plaque, et la puce avaient un effet sur le niveau de méthylation obtenu. Le ratio garçons/filles a été équilibré pour chaque puce. Des contrôles méthylés/non-méthylés ont été réalisés (1 par plaque). Les contrôles ont bien fonctionné. Les filles avaient globalement des niveaux de méthylation différents des garçons. Les niveaux de méthylation de chaque site CpG (*Cytosine–phosphate–Guanine*) ont été normalisés selon la méthode décrite par Touleimat and Tost (2012). Après les étapes de contrôle qualité et de normalisation, 426 049 sites CpG étaient disponibles pour les analyses statistiques.

La méthylation globale des séquences *Alu* et *LINE-1* a été quantifiée par pyroséquençage.

Aucune différence significative dans les niveaux de méthylation n'a été détectée entre les centres de Nancy et Poitiers, ni selon le groupe, la plaque et la puce (test de Student).



## **CHAPITRE II :**

### **EXPOSITIONS ENVIRONNEMENTALES ET ISSUES DE GROSSESSE**



*L'objectif de ce chapitre était d'évaluer l'effet de l'exposition maternelle à la température et à l'humidité relative pendant la grossesse sur différentes issues de grossesse défavorables dans les cohortes mère-enfant EDEN et PELAGIE. Cette étude fait l'objet d'un premier article pour lequel j'ai réalisé une partie du data-management, les analyses statistiques et la rédaction du papier. Après un résumé en français, le chapitre présente l'intégralité de l'article soumis dans le journal Environmental Health Perspective, le 23 juin 2016.*



## **1. Résumé Article 1: Association between meteorological conditions and birth weight, preterm birth and gestational duration in two mother-child cohorts.**

### **1.1. Introduction**

Plusieurs études récentes ont indiqué que l'exposition maternelle à des conditions météorologiques spécifiques, comme par exemple des températures plus élevées, serait associée à des issues de grossesse défavorables telles qu'un plus petit poids à la naissance ou encore un risque de naissance prématurée plus élevé. Dans le contexte de changement climatique, il est essentiel de mieux caractériser l'impact des conditions météorologiques sur ces issues de grossesse, en particulier l'effet de la température encore débattue et l'effet de l'humidité relative rarement étudiée à ce jour. Cette étude avait donc pour objectif d'évaluer les associations entre la température et l'humidité relative moyennées sur différentes fenêtres d'exposition pendant la grossesse et trois issues de grossesse : le poids de naissance, la durée de gestation et les naissances prématurées, dans les cohortes EDEN et PELAGIE.

### **1.2. Méthodes**

L'exposition maternelle à la température (en °C) et à l'humidité relative (en %) a été moyennée sur des périodes à court et moyen terme pendant la grossesse : jours (0 à 9) et semaines (1 à 6) précédant l'accouchement puis chaque trimestre de grossesse et la grossesse entière. Les associations avec le poids de naissance et la durée de gestation ont été évaluées à l'aide de modèles de régression linéaire. Pour la naissance prématurée, un modèle de Cox à risque proportionnel avec variable dépendante du temps a été utilisé. Tous les modèles étaient ajustés simultanément sur la température (T) et l'humidité relative (HR) ainsi que sur les facteurs de confusions potentiels identifiés à partir d'une revue de la littérature. La linéarité de la relation entre les paramètres météorologiques et les évènements d'intérêts a été étudiée en utilisant des splines pénalisées.

### 1.3. Résultats

Au total, 5185 couples mère-enfant ont été inclus dans cette analyse. Environ la moitié des nouveau-nés étaient des garçons, plus de deux tiers des mères étaient âgées de 25 à 35 ans. Le poids moyen à la naissance était de 3350 grammes ( $\pm 530$ ), la durée de gestation moyenne était de 40 semaines ( $\pm 2$ ) et 231 nouveau-nés (4 %) étaient prématurés. Pour l'ensemble des mères de l'étude Eden-Pélagie, la température moyenne et le taux d'humidité relative moyen au cours de la grossesse étaient respectivement de 11,6 °C ( $\pm 2,1$ ) et 79,1 % ( $\pm 4,2$ ). Un poids de naissance plus faible a été associé avec une augmentation de 5 °C de la température sur le trimestre 3 de la grossesse (-38 grammes, IC 95 % : -73, -3). Un poids de naissance plus faible a également été associé avec une augmentation de 10 % de l'humidité relative sur la grossesse entière (-77 grammes, IC 95 % : -125, -28) ; bien que moins significatives, les associations avec les trimestres de grossesse étaient consistantes. Une diminution de la durée de gestation a été associée avec une température moyenne supérieure à 16°C (p-valeur=0.01). Aucune association significative n'a été mise en évidence pour les naissances prématurées.

### 1.4. Conclusion

Cette étude est, à notre connaissance, la première à évaluer l'effet simultané et distinct de la température et de l'humidité relative pendant la grossesse sur le poids de naissance, la durée de gestation et la prématurité. La densité spatio-temporelle élevée du réseau de surveillance de Météo France au cours de la période d'étude nous a permis d'obtenir une large gamme de fenêtres d'exposition à plus ou moins long terme pendant la grossesse ; ajouter à cela l'utilisation de méthodes statistiques prenant en compte la corrélation temporelle de ces fenêtres d'expositions nous a également permis de distinguer l'effet propre de chacune. Les résultats de cette étude soulignent que l'exposition à des niveaux de température et d'humidité plus élevés pendant des périodes à moyen terme de la grossesse est associée à un poids à la naissance plus faible.

## **2. Version intégrale de l'article 1**

### **Meteorological conditions and birth weight, preterm birth and gestational duration in two French mother-child cohorts**

Emilie Abraham<sup>a</sup>, Cécile Chevrier<sup>b</sup>, Lise Giorgis-Allemand<sup>a</sup>, Annick Auffray<sup>c</sup>, Lydiane Agier<sup>a</sup>, Fabrice Pierre<sup>d</sup>, Monique Kaminski<sup>e</sup>, Barbara Heude<sup>f</sup>, Marie-Aline Charles<sup>f</sup>, Sylvaine Cordier<sup>b</sup>, Rémy Slama<sup>a</sup>, Johanna Lepeule<sup>a</sup>.

<sup>a</sup> Inserm-CNRS-Univ. Grenoble-Alpes (U1209), IAB, Team of Environmental Epidemiology applied to Reproduction and Respiratory Health, Grenoble, France; <sup>b</sup> Inserm, U1085, Research Institute in Environmental and Occupational Health (IRSET), University of Rennes 1, Rennes, France; <sup>c</sup> Météo France, Bron, France; <sup>d</sup> Service de Gynécologie-Obstétrique, Centre Hospitalier Régional de Poitiers, France; <sup>e</sup> Inserm U1153, Obstetrical, Perinatal and Pediatric Epidemiology Research Team, Research Center for Epidemiology and Biostatistics Sorbonne Paris Cité (CRESS), Paris Descartes University, Paris, France; <sup>f</sup> Inserm U1153, Early Origins of Child Health and Development team, Research Center for Epidemiology and Biostatistics Sorbonne Paris Cité (CRESS), Paris Descartes University, Villejuif, France.

**Address for correspondence to** Emilie Abraham, IAB – Inserm U1209, Site Santé - Allée des Alpes, 38700 La Tronche. Telephone: +33 4 76 54 94 66 / Fax: +33 4 76 54 94 13. E-mail: emilie.abraham@inserm.fr

**Acknowledgments:** This work was supported by the Fondation de France. The EDEN cohort has been funded by Foundation for Medical Research (FRM), National Agency for Research

(ANR), National Institute for Research in Public Health (IRESP: TGIR cohorte santé 2008 program), French Ministry of Health (DGS), French Ministry of Research, Inserm Bone and Joint Diseases National Research (PRO-A) and Human Nutrition National Research Programs, Paris-Sud University, Nestlé, French National Institute for Population Health Surveillance (InVS), French National Institute for Health Education (INPES), the European Union FP7 programmes (FP7/2007-2013, HELIX, ESCAPE, ENRIECO, Medall projects), Diabetes National Research Program (through a collaboration with the French Association of Diabetic Patients (AFD)), French Agency for Environmental Health Safety (now ANSES), Mutuelle Générale de l'Education Nationale (MGEN), French National Agency for Food Security, and the French-speaking association for the study of diabetes and metabolism (ALFEDIAM). Funders had no influence of any kind on analyses or result interpretation. We thank the midwife research assistants (L. Douhaud, S. Bedel, B. Lortholary, S. Gabriel, M. Rogeon, and M. Malinbaum) for data collection and P. Lavoine for checking, coding, and entering data. The PELAGIE cohort has been funded by Inserm, French Ministry of Health (DGS), French Ministry of Labor (DRT), French National Institute for Population Health Surveillance (InVS), National Agency for Research (ANR), French Agency for Environmental Health Safety (ANSES), and French Ministry of Ecology. We are grateful to the participants and the staff of the maternity hospitals and clinics.

We acknowledge the commitment of the EDEN mother-child cohort study group: I. Annesi-Maesano, JY. Bernard, J. Botton, MA. Charles, P. Dargent-Molina, B. de Lauzon-Guillain, P. Ducimetière, M. de Agostini, B. Foliguet, A. Forhan, X. Fritel, A. Germa, V. Goua, R. Hankard, B. Heude, M. Kaminski, B. Larroque, N. Lelong, J. Lepeule, G. Magnin, L. Marchand, C. Nabet, F. Pierre, R. Slama, MJ. Saurel-Cubizolles, M. Schweitzer, O. Thiebaugeorges.

**Competing financial interests:** The authors declare they have no actual or potential competing financial interests.

## Highlights

- We used the closest monitoring station to women's home address to measure maternal exposure during pregnancy in 5,185 mother-child couples.
- We found a significant decrease in birth weight in association with an exposure to temperature over the third trimester of pregnancy.
- We observed a decreasing pattern in the association between birth weight and relative humidity for all trimesters of pregnancy, and a significant association when exposure over the whole pregnancy was considered.
- We observed no strong evidence association between meteorological conditions and gestational duration and preterm birth.

## ABSTRACT

**Background:** The effect of temperature and humidity during pregnancy on birth outcomes remains debated. In the light of the consequences of climate change on local weather, it is crucial to better understand the impact of such meteorological conditions.

**Objectives:** To investigate the association between birth outcomes and maternal exposure to temperature and relative humidity over various exposure windows during pregnancy

**Methods:** We relied on 5,185 mother-child dyads, enrolled at pregnancy (2002-2006), in the French EDEN and PELAGIE cohorts. Ambient temperature (°C) and relative humidity (%) measured by routine monitors were averaged over short-term (weeks and days before delivery) and long-term (trimesters and whole pregnancy) exposure windows. Meteorological exposures, simultaneously including temperature and relative humidity, were associated with birth weight (in grams) and gestational duration (in weeks) using linear regression and with preterm birth risk (<37 gestational weeks) using Cox proportional hazard models with time-varying exposures. We used the Frisch Waugh equations and distributed lag models to identify the critical windows of exposures.

**Results:** Mean temperature over the third trimester of pregnancy was negatively associated with birth weight: average birth weight decreased by 38g (95% confidence interval, CI: -73, -3) for a 5°C increase in exposure. A 10% increase in relative humidity during the whole pregnancy was associated with an average birth weight decrease of 77 g (95% CI: -125, -29). Gestational duration significantly decreased when average temperature during pregnancy was higher than 16°C (non-linear relationship, p-value=0.01). No evidence association was found between the exposures and Preterm birth.

**Conclusions:** We highlighted that mean temperature and relative humidity during medium-term pregnancy exposures were associated with lower birth weight.

**Keywords:** mother-child cohorts, weather, pregnancy exposure, DOHaD.

## INTRODUCTION

The increased frequency and intensity of extreme meteorological events due to climate change have raised interest in identifying whether meteorological factors could affect human health (Meehl and Tebaldi 2004; WHO and WMO 2012). Weather changes can have serious health consequences on cardiovascular function, infectious diseases and overall mortality (Patz et al. 2003; Woodward et al. 2014). Pregnant women, their developing fetuses, and children constitute the most vulnerable populations regarding health risk posed by climate change (Rylander et al. 2013). Adverse pregnancy outcomes have long-term health impact with higher risks of respiratory and cardiovascular diseases or neurodevelopmental disorders later in life (Barker 2006; Gibson 2007; Kramer 2003; Marlow et al. 2005; McIntire and Leveno 2008; WHO 2012). It is therefore important to describe the relationship between meteorological conditions and pregnancy outcomes to better understand and respond to the potential health threat of climate change.

Studies have indicated that meteorological conditions during pregnancy were associated with birth outcomes (reviewed by Beltran et al. 2014; Strand et al. 2011). However, results are inconsistent. Most studies have focused on preterm birth (i.e. birth before 37 completed weeks of gestation) and its relationship with ambient temperature over short-term exposure windows during pregnancy, typically days or weeks before delivery. Some reported an increased risk of preterm birth with high temperature (Basu et al. 2010; Schifano et al. 2013; Strand et al. 2012; Vicedo-Cabrera et al. 2014) while others did not show any significant association (Lee 2008, Wolf 2012). As for birth weight, the few studies that examined its association with ambient temperature during pregnancy reported discordant results regarding the direction of the association and the critical exposure windows identified (Elter et al. 2004; Murray et al. 2000, Lawlor et al. 2005, Kloog et al. (2015). Such heterogeneity across study results can be attributed to multiple sources. The main one might be the diversity of

geographic regions investigated by these studies. Exposure to ambient temperature varies greatly depending on the climate, the local habits and the vulnerability of the population. Therefore, the health risk can differ between regions across the globe and need to be estimated in different climates. Methodological differences in conducting the studies are also a source of results inconsistency.

Another meteorological factor of interest is the humidity, which is strongly related to temperature. Previous studies have used different indices accounting for both temperature and humidity (Dadvand et al. 2011; Lajinian et al. 1997, Kent et al. 2013; Porter et al. 1999, Strand et al. 2012 and He et al. 2015) but the specific effect of humidity was not reported.

We aimed to evaluate the association between mutually-adjusted ambient temperature and relative humidity estimated over short- and long-term exposure windows during pregnancy and birth weight, gestational duration and preterm birth. We relied on the EDEN and PELAGIE mother-child cohorts conducted in regions of France with temperate or maritime climates. We used methods that account for the correlation among exposure at different times of the pregnancy to help identify critical windows of susceptibility.

## METHODS

### Study population

We considered two French mother-child cohorts, EDEN (study of pre- and postnatal determinants of the child's development and health) and PELAGIE (Endocrine Disrupters: A longitudinal study of pregnancy abnormalities, infertility and child health), which share a similar design (Chevrier et al. 2011; Heude et al. 2015). In EDEN, 2,002 pregnant women were recruited during prenatal care visits in the maternity wards of the university hospitals of Poitiers and Nancy (France), before their 24<sup>th</sup> week of gestation, between September 2003 and January 2006. In PELAGIE, 3,421 pregnant women were recruited during prenatal care visits to gynecologists, obstetricians, or ultrasonographers before their 19<sup>th</sup> week of gestation, between April 2002 and February 2006 in Brittany (France). The present study included singleton live births for which data on birth weight and gestational duration were available, corresponding to 5,202 mother–child pairs (1,896 in EDEN and 3,306 in PELAGIE). Sex of the newborn, maternal age, maternal smoking during pregnancy, height, pre-pregnancy weight, educational level, and parity were collected, by interview during pregnancy and questionnaire after birth in EDEN, and by questionnaire during pregnancy and from hospital medical records (sex of the newborn) in PELAGIE. These cohorts were approved by relevant ethics committees and participating women gave informed written consent for their own and their offspring participation.

### Birth Outcomes

Birth weight (in grams) was extracted from the maternity records. Gestational duration (in weeks) was estimated using the date of the last menstrual period, collected at recruitment in both cohorts. Preterm birth was defined as birth occurring before 37 completed weeks of gestation.

## Meteorological exposure assessment

Hourly ambient temperature (in °C) and relative humidity (in %) were obtained from the French national reference center of *Météo France* (Supplemental Material, Figure S1) and averaged over short-term (each day from 0 to 9 and each week from 1 to 6 before delivery) and long-term (each trimester of pregnancy and the whole pregnancy) exposure windows. Home addresses of the women, at delivery for EDEN and at inclusion for PELAGIE, were geocoded. For each woman, we used the meteorological station nearest to her home address. Women living more than 40 km away from a meteorological station were excluded (n=17). The oceanic coastal area, defined as the land located at less than 8 km from the coast, is subject to specific meteorological influences. Women living in coastal areas were assigned the nearest meteorological station located in the coastal area (Supplemental Material, Figure S1).

## Statistical methods

### ***General strategy***

All models were simultaneously adjusted for temperature and relative humidity. For the 3 outcomes under study (birth weight, gestational duration, preterm birth), we examined the association with long-term exposure windows (trimesters and whole pregnancy) to temperature and relative humidity. In order to assess the specific effect of exposure during each trimester of pregnancy, the regression models explaining birth outcomes included exposure during the 1<sup>st</sup>, 2<sup>nd</sup> and 3<sup>rd</sup> trimester. Since exposures during such time windows were somewhat highly correlated (Supplemental Material, Table S1), we used an approach based on residuals defined by Frisch Waugh and applied by Bell et al. (2007) in the context of air pollution exposure, to remove the correlation between variables representing exposures. The exposure covariates included in the regression models explaining birth outcomes were:

a)  $Temperature_{i,1}$ : exposure to temperature over trimester 1 for woman  $i$  (reference trimester); b) residuals  $\hat{e}_{i,2}$  of the regression model  $Temperature_{i,2} = \beta_1 + \beta_2 Temperature_{i,1} + e_{i,2}$ , representing exposure to temperature over trimester 2 adjusted for exposure over trimester 1; c) residuals  $\hat{e}_{i,3}$  of the regression model  $Temperature_{i,3} = \beta_3 + \beta_4 Temperature_{i,1} + \beta_5 Temperature_{i,2}$ , representing exposure to temperature over trimester 3 adjusted for exposure over trimesters 1 and 2. We repeated this analysis using each trimester as the initial reference trimester (i.e., trimester 1).

We tested for non-linear relationship between the meteorological covariates and the birth outcomes using penalized cubic splines. The smoothing parameter was chosen by Generalized Cross Validation, an approximation of the Akaike criterion (Wood and Augustin 2002). All regression models explaining birth outcomes were adjusted for the following covariates selected from the literature: maternal age (<25, 25-29, 30-34, >35 years), maternal height, pre-pregnancy weight (using a "broken stick model" with a knot at 60kg (Slama and Werwatz 2005)), sex of the newborn, parity (0, 1, 2, >3 children), maternal smoking during pregnancy (0, 1-5, 6-10, >11 cigarettes/day), level of education (no school, < high school,  $\geq$  high school +2 years), season and year of conception, and study center (Nancy, Poitiers and Brittany). In addition to the analyses conducted on pooled data from the two cohorts, we stratified on study center (Nancy, Poitiers, Brittany). We additionally tested the interaction of sex, study center and season with each meteorological factor, as well as the interaction between temperature and relative humidity (tested in tertile). The statistical significance of the exposure was tested at 5% level and the interactions were tested at a 20% level.

***Specificities for modeling each birth outcome***

For birth weight, we fitted linear regression models. In addition to adjusting for the factors listed above, we adjusted for gestational age using a linear and a quadratic term to account for non-linearity of fetal growth during gestation (Slama et al. 2008).

For gestational duration, we fitted linear regression models. Exposure during the whole pregnancy and the third trimester were calculated from conception to the 37<sup>th</sup> week of gestation for term births, and until delivery for preterm births.

For preterm birth, we used a Cox proportional hazards model with gestational age in days as the time axis to estimate the association between meteorological factors and preterm delivery risk. Exposure windows were considered as time-varying variables. The whole pregnancy and 3<sup>rd</sup> trimester were censored at 37 weeks of gestation as no preterm delivery could occur afterwards. We hypothesized that short-term exposures such as days and weeks preceding the birth could trigger the delivery; days and weeks of exposure were tested in separate models.

The model used was:

$$\lambda_i(t) = \lambda_0(t) \exp[\beta'E_i(t) + \gamma'C_i],$$

where  $t$  is the gestational age,  $\lambda_0(t)$  is the unspecified baseline hazard function,  $E_i(t)$  is the matrix of time-dependent exposure variables and  $C_i$  is the matrix of time-independent covariates. For short-term exposures (day 0 to 9 and week 1 to 6 before delivery), we implemented a constrained distributed-lag model to account for the correlation among the exposures at different lags and help identify critical windows of susceptibility (Lepeule et al. 2006; Schwartz 2000):

$$\lambda_i(t) = \lambda_0(t) \exp[\beta'E_i(t) + \gamma'C_i + \sum_{l=0}^L \alpha_l P_{il}(t)],$$

where  $P_{il}$  represented the values of temperature and relative humidity at time lag  $l$  with  $l = 1, \dots, L$  and  $l$  being the number of lag times for the meteorological covariates ( $l=0$  to 9 for days and  $l=1$  to 6 for weeks).  $\alpha_l$  indicated the magnitude of the effect of temperature and

relative humidity. We assumed that  $\alpha_l$  followed a second-degree polynomial function:  $\alpha_l = \sum_{d=0}^2 \theta_d l^d$ . Therefore,  $\alpha_l$  was the smoothed estimate of the effect of exposure on lag  $l$ , and their sum,  $\text{I}=\sum_0^L \alpha_l$ , was the overall effect of exposure over the entire lag period.

Sensitivity analyses on term birth weight were conducted in order to assess whether the results were driven by the smaller birth weight of preterm babies. Preterm babies are subject to shorter duration of exposure to meteorological factors during the whole pregnancy and the 3<sup>rd</sup> trimester; we performed a sensitivity analysis excluding preterm births to assess whether the results were driven by preterm births. For gestational duration and preterm birth, we repeated our analyses excluding babies born by planned caesarean section (caesarean section before labor).

Statistical analyses were performed using the SAS (version 9.3; SAS Institute Inc, Cary, NC) and the R (version 3.0.1) statistical softwares.

## RESULTS

**Population.** Among the 5,202 mother-child couples 5,185 were living within 40km from a meteorological station. Fifty-one percent of the offspring were male, more than half of the participating mothers (59%) had a high school degree or higher, 72% were aged between 25 and 35 years, 27% reported smoking during pregnancy (Table 1). On average ( $\pm SD$ ), birth weight was 3,350 ( $\pm 503$ ) grams and gestational age was 40 ( $\pm 2$ ) weeks; 231 babies (4%) were born preterm (Table 1).

**Meteorological conditions.** Among our population, 50% of women had a distance less than 10 km between her home and the station measuring the meteorological parameter. On

average ( $\pm SD$ ), mean temperature during whole pregnancy was  $11.6^{\circ}\text{C}$  ( $\pm 2.1$ ) and mean relative humidity was 79.1% ( $\pm 4.2$ ) (Table 2). A description of exposures according to the study center is shown in Supplemental Material, Table S2 and S3. Levels of temperature and relative humidity were less variable in PELAGIE than Poitiers and Nancy. Temperature and relative humidity were moderately correlated over all exposure windows ( $|r| \leq 0.68$ , Supplemental Material, Table S1, S4 and S5). However, trimesters 1 and 3 of temperature were strongly correlated ( $|r|=0.90$ ) as well as daily and weekly exposure were strongly correlated ( $|r|>0.70$ ).

**Meteorological conditions and birth weight.** The spline regression showed no evidence of deviation from linearity for temperature and relative humidity with respect to birth weight. For a  $5^{\circ}\text{C}$  increase in mean temperature over the 1<sup>st</sup> trimester, mean birth weight was increased by 35 grams (95% confidence interval, CI: -3, 72), while mean birth weight decreased by 32 grams (95% CI: -65, 2) and 38 grams (95% CI: -73, -3) for a  $5^{\circ}\text{C}$  increase in mean temperature during the 2<sup>nd</sup> and 3<sup>rd</sup> trimesters of pregnancy, respectively. As for relative humidity, a 10% increase over the whole pregnancy average was associated with a lower birth weight by 77 grams (95% CI: -125, -28.5); although less statistically significant, the results for each of the 3 trimesters of pregnancy were consistent with a negative association with birth weight (Table 3). The results by study center are consistent with those from the main analysis in terms of beta values for all exposure windows (Supplemental Material, Table S6). The association between relative humidity during the whole pregnancy and decreased birth weight seemed stronger in Poitiers and Nancy, which experienced a higher variability in such exposure compared to Brittany, which has a maritime climate with high humidity levels. Results of sensitivity analyses restricted to term birth weight were consistent with the main results, although the p-values slightly increased (Supplemental Material, Table S7).

**Meteorological conditions and gestational duration.** We observed an inverted U-shaped relationship ( $p\text{-value}=0.01$ ) with an inflection point around 12°C between mean temperature during the whole pregnancy and gestational duration; above 16°C, increase in temperature was statistically significantly associated with a shorter gestational duration (Figure 1). Results by center showed similar patterns in Poitiers and Brittany, which have the same maritime climate, while results in Nancy exhibited a different pattern and showed a significant increase in gestational duration associated with increased relative humidity over trimester 2 (Supplemental Material, Table S6).

Results from the sensitivity analyses excluding births from planned caesarean sections were consistent with the main analysis (Supplemental Material, Table S8, and Figure S2). When we excluded preterm births, the relationship between mean temperature during pregnancy and gestational duration was no longer significant (Supplemental Material, Table S7), which suggests that preterm births were driving this association.

**Meteorological conditions and preterm birth.** Our main results indicated a non-linear relationship between the mean relative humidity over the 3<sup>rd</sup> trimester and during the 4<sup>th</sup> week preceding the birth and the risk of preterm birth ( $p\text{-value}=0.03$ ,  $p\text{-value} = 0.02$  respectively, Figure 2); above 90%, an increase in relative humidity was statistically significantly associated with an increased risk of preterm. Temperature and relative humidity from day 0 to 9 before delivery were not significantly associated with the risk of preterm birth (Supplemental Material, Figure S3. A). Regarding study center results, we found no evidence of significant association between preterm birth and the medium-term exposures (Supplemental material Table S8) and the short-term exposures (results not shown).

In sensitivity analyses excluding births from planned caesarean section, the association between relative humidity over the 3<sup>rd</sup> trimester and the risk of preterm birth did not maintain. No significant association was found with daily exposures (results not shown).

For all birth outcomes and exposure windows, none of the interactions tested (sex, study center, season, and interaction between temperature and relative humidity) were statistically significant (results not shown).

## **DISCUSSION**

We investigated simultaneously the association of temperature and relative humidity, with birth weight, gestational duration and preterm birth in two French mother-child cohorts including 5,185 births between 2001 and 2006. The high spatio-temporal density of the Météo-France monitoring network during the study period provided us with a range of short-to long-term exposure windows, which combined to methods accounting for the temporal correlation of such data, allowed us to disentangle the effect of each exposure window. Increased mean temperature over the third trimester of pregnancy was statistically significantly associated with a lower birth weight. We observed a decreasing pattern in the association between birth weight and relative humidity for all trimesters of pregnancy, which was confirmed by a statistically significant association when exposure over the whole pregnancy was considered. Non-linear relationships were observed with a statistically significant decrease in gestational duration when temperature during pregnancy was above 16°C. Non-linear relationships were observed with a statistically significant higher risk of preterm birth when relative humidity was above 90% during the 4<sup>th</sup> week before birth. No evidence of association of either temperature or relative humidity during days preceding

delivery and preterm birth risk was observed. No evidence of heterogeneous associations according to the sex of the baby, the study center or the season of conception was found.

No study has reported the influence of humidity on birth weight and very few have focused on ambient temperature (reviewed by Strand et al. 2011; Kloog et al. 2015). In Turkey, an increased temperature (daily mean range: 6; 23 °C) during the second trimester was associated with a higher birth weight (Elter et al. 2004). In Scotland, an increased temperature (weekly mean range about -14; 12 °C) in the 1<sup>st</sup> trimester was associated with a lower birth weight, while the association was opposite for the 3<sup>rd</sup> trimester (Lawlor et al. 2005). In that study, mean temperature exposure was available for the middle 10 days of each trimester and the correlation between temperature at 1<sup>st</sup> and 3<sup>rd</sup> trimester was 0.8. In contrast with these findings, we observed (daily mean range -4; 30°C) a positive linear association of birth weight with the mean temperature during the 1<sup>st</sup> trimester and a negative linear association with the mean temperature during the 2<sup>nd</sup> and 3<sup>rd</sup> trimester; A 5°C increase in temperature during the second or third trimester was associated with a lower birth weight by 32 and 38 grams, respectively. Deschênes et al. (2009) in the U.S. (daily mean range greater than -4; 30°C) showed similar results on 37 million singleton births from 1972-1988. In Massachusetts, U.S. (range of mean daily temperature -12; 35 °C), Kloog et al. (2015) found that a 8.6°C increase in temperature over the 3<sup>rd</sup> trimester was associated with lower birth weight by 16.7 grams. These somewhat heterogeneous results between studies may arise from the different geographic regions where the studies were conducted. Pregnant women acclimatization to temperature changes may depend on the climate they are used to, which might explain differences between geographical regions in the association between temperature and health. The lack of homogeneity in the literature can also be due to differences in the study design, available data and statistical methods. As suggested by Strand et al. (2011) in their review, we considered a non-linear relationship between birth weight and

temperature, we included important potential confounders such as humidity and maternal smoking, which is usually not accounted for in studies based on registry data, and we accounted for the correlation of exposure windows throughout the pregnancy, which, to our knowledge, has not been considered so far. Regarding relative humidity, we found a significant association during whole pregnancy with decrease in birth weight. When we conducted the analysis by study center, we also found significant negative association between humidity and birth weight for the 3 centers.

Most of studies on the effects of temperature on preterm birth risk focused on short-term exposures before delivery (reviewed by Beltran et al. 2014; Strand et al. 2011). These studies have mainly reported an increase of preterm birth risk with higher temperature. A case-crossover study in California (weekly mean range 11-34°C) found a 8.6% increased risk of preterm birth every 5.6°C increase in apparent temperature averaged over 6 days before delivery (Basu et al. 2010). In Australia (monthly mean range 15-25°C), Strand et al. (2012) examined the possible effect of temperature over the four-week before delivery and reported that mean temperatures above 21°C increased the preterm birth risk. In Rome (daily min-max range -5; 40), Schifano et al. (2013) found that exposure to elevated temperatures during the last 3 days before delivery was associated with an increased risk of preterm birth during the warm season. Our results showed an increased risk of preterm birth associated with a higher relative humidity during the 4<sup>th</sup> week before birth, but did not show any short-term effect of temperature. Two large studies with similar temperature range to ours, conducted in London, UK and two German states, did not find any association between preterm birth risk and temperature estimated at birth, the week and month before birth and the first trimester of pregnancy (Lee et al. 2008; Wolf and Armstrong 2012). Relative humidity has been addressed in very few studies (He et al. 2015; Strand et al. 2012) and its specific effect has not been reported. Some studies have looked at apparent temperature, index combining

temperature and relative humidity, (Basu et al. 2010; Dadvand et al. 2011) or other index incorporating humidity (Kent et al. 2013), but they do not allow to disentangle the effect of each meteorological factor.

Since there is no strong a priori regarding the most biologically relevant period for effects of temperature and relative humidity on preterm birth, we investigated short-term exposures but also longer-term exposure windows. As for temperature, we observed a non-linear association indicating a significantly shorter gestational duration when the mean temperature over pregnancy increased over 16 °C; the preterm birth risk was also increased in association with the mean temperature during pregnancy but not significantly. Consistent with our results, He et al. (2015) in China (daily mean range 5-35°C) reported a U-shaped relationship between preterm birth and mean temperature over pregnancy. In addition, a recent study conducted in Massachusetts (daily mean range -12-35°C) using models with a high spatio-temporal resolution to predict air temperature exposure, reported a shorter gestational age with an increase in temperature over the whole pregnancy (Kloog et al. 2015).

Physiological or biological mechanisms, that could explain the possible effects of temperature and relative humidity on birth weight, are largely unclear but some hypotheses exist. It is likely that pregnant women may be more susceptible to changes in temperature and humidity due to the extra physical and mental strain. Increases in fat deposition and internal heat production during pregnancy due to fetal growth and metabolism limit the ability of pregnant women to mitigate heat stress (Strand et al. 2011; Wells and Cole 2002). However, it is unclear how this feature leads to reduced birth weight. In addition, several studies have suggested that in particularly sensitive people (elderly or young children) the variations in temperature and humidity, and in particular for high levels, influence cardiovascular function which is already highly solicited during pregnancy (Kalkstein and Greene 1997; McGeehin and Mirabelli 2001; Schwartz 2005). If such an effect also exists in pregnant women, this

stress of the cardiovascular system could then alter the maternal-fetal exchanges and ultimately slow down the growth of the fetus. In addition, low levels can affect human physiology and lead for instance to dehydration (especially in nasal cavity and upper respiratory tract) and can also promote the spread of ambient pollutants. High levels of humidity can affect respiratory health by promoting the spread of bacteria, fungi and mites (Barreca 2009). Therefore, there are some potential underlying pathways through which weather conditions may affect birth outcomes, which need to be further explored.

One limit of our study includes the fact that we do not account for the subjects' time-space activity, nor the indoor levels, nor for the presence of air conditioning, or the mismatch between indoor and outdoor exposure. A study conducted in Boston showed that the indoor and outdoor temperatures were well correlated during the warmer months but not during the cold months. A similar exposure error is expected for relative humidity (Nguyen et al. 2014). Yet, we expect this exposure error to be smaller than in the Boston study as our temperatures are less variable and air conditioning is not as common in France as it is in Boston. Information on maternal changes of residence during pregnancy could not be taken into account. Finally, although we evaluated numerous exposure durations and periods, multiple testing corrections were not employed. Thus, the type I errors are not controlled and the results should be considered with caution.

To our knowledge, no previous study has estimated the specific effect of exposure at each trimester of pregnancy correcting for the apparent effect of the other trimesters; the method we used allowed to estimate the specific effect of each window more efficiently than in models including all trimester-specific variables without accounting for their correlation. For shorter exposure windows, we used constrained distributed lag models to account for the correlation. The likelihood of giving birth increases with increasing gestational age and pregnancies ending in preterm delivery have shorter exposure periods than longer

pregnancies; not accounting for these shorter exposures might results in biased results. We addressed this issue by using a Cox model with time-dependent exposures to study the risk of preterm birth. Other strengths of our study include the fact that our study area is covered by a large number of monitors of *Météo France* and that the exposure misclassification was minimized on the one hand by limiting the distance to the stations for women was less than 40km and secondly by attributing to women living within 8 km from the coast, the stations are also within 8 km of the coast. Although the sample size may seem small compared to others studies on this topic, the design of these cohorts allows a better precision on exposure data as well as covariates and information on study subjects. This is particularly the case for variables such as smoking or season of conception. The prospective cohorts allow to reduce selection bias.

## **CONCLUSION**

In this prospective study, we found evidence suggesting that maternal exposures to relative humidity during whole pregnancy and temperature during late pregnancy may be linearly associated with reduced birth weight. As well, we found evidence suggesting that maternal exposure to high relative humidity during late pregnancy may increase the risk for preterm birth. Given serious health implication of these birth outcomes, and the context of global warming, further research on the potential impact of extreme meteorological factors on adverse birth outcomes are needed in order to take preventive measures regarding the exposure of women pregnant to meteorological factors.

## REFERENCES

- Barker DJP. 2006. Adult consequences of fetal growth restriction. *Clin. Obstet. Gynecol.* 49: 270–283.
- Barreca A. 2009. Climate Change, Humidity, and Mortality in the United States.
- Basu R, Malig B, Ostro B. 2010. High ambient temperature and the risk of preterm delivery. *Am. J. Epidemiol.* 172:1108–1117.
- Bell ML, Ebisu K, Belanger K. 2007. Ambient Air Pollution and Low Birth Weight in Connecticut and Massachusetts. *Environ. Health Perspect.* 115:1118–1124.
- Beltran AJ, Wu J, Laurent O. 2014. Associations of Meteorology with Adverse Pregnancy Outcomes: A Systematic Review of Preeclampsia, Preterm Birth and Birth Weight. *Int. J. Environ. Res. Public. Health* 11:91–172.
- Chevrier C, Limon G, Monfort C, Rouget F, Garlantézec R, Petit C, et al. 2011. Urinary Biomarkers of Prenatal Atrazine Exposure and Adverse Birth Outcomes in the PELAGIE Birth Cohort. *Environ. Health Perspect.* 119:1034–1041.
- Dadvand P, Basagaña X, Sartini C, Figueras F, Vrijheid M, de Nazelle A, et al. 2011. Climate extremes and the length of gestation. *Environ. Health Perspect.* 119:1449–1453.
- Darrow LA, Strickland MJ, Klein M, Waller LA, Flanders WD, Correa A, et al. 2009. Seasonality of birth and implications for temporal studies of preterm birth. *Epidemiol.* Camb. Mass 20:699–706.
- Deschênes O, Greenstone M, Guryan J. 2009. Climate Change and Birth Weight. *Am. Econ. Rev.* 99:211–217.
- Elter K, Ay E, Uyar E, Kavak ZN. 2004. Exposure to low outdoor temperature in the midtrimester is associated with low birth weight. *Aust. N. Z. J. Obstet. Gynaecol.* 44:553–557.
- Flouris AD, Spiropoulos Y, Sakellariou GJ, Koutedakis Y. 2009. Effect of seasonal programming on fetal development and longevity: links with environmental temperature. *Am. J. Hum. Biol. Off. J. Hum. Biol. Counc.* 21:214–216.
- Gibson AT. 2007. Outcome following preterm birth. *Best Pract. Res. Clin. Obstet. Gynaecol.* 21:869–882.
- He J-R, Liu Y, Xia X-Y, Ma W-J, Lin H-L, Kan H-D, et al. 2015. Ambient Temperature and the Risk of Preterm Birth in Guangzhou, China (2001-2011). *Environ. Health Perspect.*
- Heude B, Forhan A, Slama R, Douhaud L, Bedel S, Saurel-Cubizolles M-J, et al. 2015. Cohort Profile: The EDEN mother-child cohort on the prenatal and early postnatal determinants of child health and development. *Int. J. Epidemiol.*

- Kalkstein LS, Greene JS. 1997. An evaluation of climate/mortality relationships in large U.S. cities and the possible impacts of a climate change. *Environ. Health Perspect.* 105: 84–93.
- Kloog I, Melly SJ, Coull BA, Nordio F, Schwartz JD. 2015. Using Satellite-Based Spatiotemporal Resolved Air Temperature Exposure to Study the Association between Ambient Air Temperature and Birth Outcomes in Massachusetts. *Environ. Health Perspect.* 123:1053–1058.
- Kramer MS. 2003. The Epidemiology of Adverse Pregnancy Outcomes: An Overview. *J. Nutr.* 133: 1592S–1596S.
- Lajinian S, Hudson S, Applewhite L, Feldman J, Minkoff HL. 1997. An association between the heat-humidity index and preterm labor and delivery: a preliminary analysis. *Am. J. Public Health* 87: 1205–1207.
- Lawlor DA, Leon DA, Davey Smith G. 2005. The association of ambient outdoor temperature throughout pregnancy and offspring birthweight: findings from the Aberdeen Children of the 1950s cohort. *BJOG Int. J. Obstet. Gynaecol.* 112:647–657.
- Lee SJ, Hajat S, Steer PJ, Filippi V. 2008. A time-series analysis of any short-term effects of meteorological and air pollution factors on preterm births in London, UK. *Environ. Res.* 106:185–194.
- Lepeule J, Rondeau V, Filleul L, Dartigues J-F. 2006. Survival Analysis to Estimate Association between Short-Term Mortality and Air Pollution. *Environ. Health Perspect.* 114:242–247.
- Marlow N, Wolke D, Bracewell MA, Samara M. 2005. Neurologic and Developmental Disability at Six Years of Age after Extremely Preterm Birth. *N. Engl. J. Med.* 352:9–19.
- McGeehin MA, Mirabelli M. 2001. The potential impacts of climate variability and change on temperature-related morbidity and mortality in the United States. *Environ. Health Perspect.* 109: 185–189.
- McIntire DD, Leveno KJ. 2008. Neonatal mortality and morbidity rates in late preterm births compared with births at term. *Obstet. Gynecol.* 111:35–41.
- Meehl GA, Tebaldi C. 2004. More intense, more frequent, and longer lasting heat waves in the 21st century. *Science* 305:994–997.
- Murray LJ, O'Reilly DP, Betts N, Patterson CC, Davey Smith G, Evans AE. 2000. Season and outdoor ambient temperature: effects on birth weight. *Obstet. Gynecol.* 96: 689–695.
- Nguyen JL, Schwartz J, Dockery DW. 2014. The relationship between indoor and outdoor temperature, apparent temperature, relative humidity, and absolute humidity. *Indoor Air* 24:103–112.

- Patz JA, Githeko AK, Hussein S, Confalonieri U, de Wet N. 2003. Climate Change and Human Health - Risk and Responses. In Climate Change and Infectious Diseases, Vol. Chapter 6 of, pp. 103–132, World Health Organization, Geneva, Switzerland.
- Rylander C, Odland JØ, Sandanger TM. 2013. Climate change and the potential effects on maternal and pregnancy outcomes: an assessment of the most vulnerable — the mother, fetus, and newborn child. *Glob. Health Action* 6.
- Schifano P, Lallo A, Asta F, De Sario M, Davoli M, Michelozzi P. 2013. Effect of ambient temperature and air pollutants on the risk of preterm birth, Rome 2001–2010. *Environ. Int.* 61:77–87.
- Schwartz J. 2000. The distributed lag between air pollution and daily deaths. *Epidemiol. Camb. Mass* 11: 320–326.
- Schwartz J. 2005. Who is sensitive to extremes of temperature?: A case-only analysis. *Epidemiol. Camb. Mass* 16: 67–72.
- Slama R, Darrow L, Parker J, Woodruff TJ, Strickland M, Nieuwenhuijsen M, et al. 2008. Meeting report: atmospheric pollution and human reproduction. *Environ. Health Perspect.* 116:791–798.
- Slama R, Werwatz A. 2005. Controlling for continuous confounding factors: non- and semiparametric approaches. *Rev. D'épidémiologie Santé Publique* 53 Spec No 2: 2S65-80.
- Strand LB, Barnett AG, Tong S. 2012. Maternal exposure to ambient temperature and the risks of preterm birth and stillbirth in Brisbane, Australia. *Am. J. Epidemiol.* 175:99–107.
- Strand LB, Barnett AG, Tong S. 2011. The influence of season and ambient temperature on birth outcomes: A review of the epidemiological literature. *Environ. Res.* 111:451–462.
- Vicedo-Cabrera AM, Iñiguez C, Barona C, Ballester F. 2014. Exposure to elevated temperatures and risk of preterm birth in Valencia, Spain. *Environ. Res.* 134:210–217.
- Wells JCK, Cole TJ. 2002. Birth weight and environmental heat load: a between-population analysis. *Am. J. Phys. Anthropol.* 119:276–282.
- Wolf J, Armstrong B. 2012. The Association of Season and Temperature with Adverse Pregnancy Outcome in Two German States, a Time-Series Analysis. *PLoS ONE* 7:e40228.
- Wood SN, Augustin NH. 2002. GAMs with integrated model selection using penalized regression splines and applications to environmental modelling. *Ecol. Model.* 157: 157–177.

- Woodward A, Smith KR, Campbell-Lendrum D, Chadee DD, Honda Y, Liu Q, et al. 2014. Climate change and health: on the latest IPCC report. *Lancet Lond Engl.* 383:1185–1189.
- World Health Organization and World Meteorological Organization. 2012. *Atlas of Health and Climate*. WHO Press; Geneva, Switzerland.
- World Health Organization. 2012. In: M.o.D., PMNCH, and Save the Children, *Born Too Soon: The Global Action Report on Preterm Birth*. Howson C.P., Kinney M.V., Lawn J.E., editors. WHO; Geneva, Switzerland.

**Table 1.** Characteristics of the study population from the French EDEN and PELAGIE mother-child cohorts (2001-2006).

Characteristics	Mean ± SD / N (%)		
	Overall (n=5,185)	PELAGIE (n=3,306)	EDEN (n=1,879)
Birth weight (grams)	3,349 ± 503	3,390 ± 493	3,272 ± 513
Gestational duration (weeks of amenorrhea)	40 ± 2	40 ± 2	40 ± 2
Preterm birth (< 37 weeks)			
No	4,954 (96)	3,182 (96)	1,772 (94)
Yes	231 (4)	124 (4)	107 (6)
Sex of offspring			
Male	2,659 (51)	1,673 (51)	986 (52)
Female	2,525 (49)	1,632 (49)	893 (48)
Missing value	1 (0)	1 (0)	0 (0)
Maternal age (years)			
< 25	771 (15)	394 (12)	377 (20)
25-29	2,031 (39)	1,339 (41)	692 (37)
30-34	1,687 (33)	1,121 (34)	566 (30)
≥ 35	679 (13)	435 (13)	244 (13)
Missing value	17 (0)	17 (1)	0 (0)
Maternal height (cm)	164 ± 6	164 ± 6	163 ± 6
Maternal pre-pregnancy weight (kg)	61 ± 12	60 ± 12	62 ± 13
Maternal Education			
<high school	1148 (22)	616 (19)	532 (28)
High school	950 (18)	615 (18)	335 (18)
≥ High school +2 years	3,038 (59)	2,058 (62)	980 (52)
Missing value	49 (1)	17 (1)	32 (2)
Maternal smoking during pregnancy			
0	3,741 (72)	2,347 (71)	1,394 (74)
1-5 cigarettes/day	645 (12)	441 (13)	204 (11)
6-10 cigarettes/day	521 (10)	339 (10)	182 (10)
≥10 cigarettes/day	239 (5)	145 (5)	94 (5)
Missing value	39 (1)	34 (1)	5 (0)
Parity			
Nulliparous	2,297 (44)	1,466 (45)	831 (44)
1 child	1,914 (37)	1,224 (37)	690 (37)
2 children	757 (15)	501 (15)	256 (14)
≥ 3 children	203 (4)	104 (3)	99 (5)
Missing value	14 (0)	11 (0)	3 (0)
Mode of delivery			
Vaginal	4,246 (82)	2,670 (81)	1,576 (84)
Unplanned caesarean section	259 (5)	92 (3)	167 (9)
Planned caesarean section	605 (12)	472 (14)	133 (7)
Missing value	75 (1)	72 (2)	3 (0)
Season of conception			
Winter	1,280 (25)	850 (26)	430 (23)
Spring	1,194 (23)	792 (24)	402 (21)
Summer	1,446 (28)	892 (27)	554 (30)
Autumn	1,265 (24)	772 (23)	493 (26)
Year of conception			
2002	717 (14)	640 (19)	77 (4)
2003	1,972 (38)	1,207 (37)	765 (41)
2004	1,553 (34)	1,068 (32)	685 (36)
2005	743 (14)	391 (12)	352 (19)
Center			
Brittany	3,306 (64)		
Poitiers	923 (18)		
Nancy	956 (18)		

Abbreviation: SD = standard deviation.

**Table 2.** Descriptive statistics of maternal exposure to meteorological conditions during the whole pregnancy and the three trimesters of pregnancy, in EDEN and PELAGIE (2001-2006), n= 5,185.

	n	Mean ± SD	5 <sup>th</sup> percentile	95 <sup>th</sup> percentile	IQR
Mean temperature (°C)					
Whole pregnancy	5,169	11.6 ± 2.1	7.9	15.0	3.3
Trimester 1	5,169	11.7 ± 4.9	4.8	19.6	8.6
Trimester 2	5,167	11.3 ± 5.1	4.0	19.6	9.0
Trimester 3	5,162	11.6 ± 5.2	3.6	19.7	9.1
Mean relative humidity (%)					
Whole pregnancy	5,169	79.1 ± 4.2	71.7	84.7	6.1
Trimester 1	5,169	79.1 ± 6.9	68.2	87.1	11.2
Trimester 2	5,167	79.3 ± 6.9	68.4	87.3	12.0
Trimester 3	5,162	78.9 ± 6.9	68.2	87.4	11.7

Abbreviation: SD = standard deviation, IQR = interquartile range

**Table 3.** Adjusted<sup>a</sup> association between mean temperature (°C) (for a 5°C increase) and relative humidity (%) (for a 10% increase) at various pregnancy exposure windows and birth weight, gestational duration and preterm birth, in EDEN and PELAGIE (2001-2006).

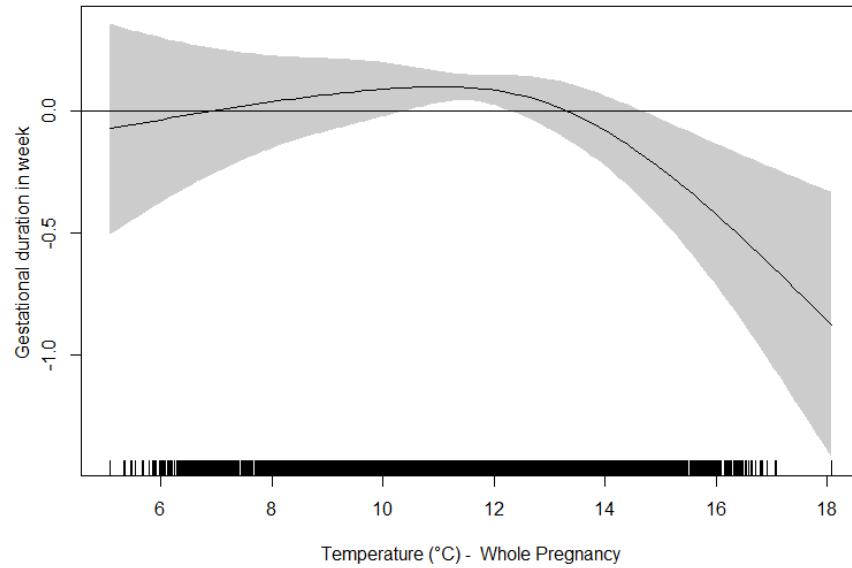
Exposure window Meteorological factor	Birth weight (grams)		Gestational duration (weeks)		Preterm birth	
	n=5185		n=5185		n=5185	
	β (95% CI)	p-Value	β (95% CI)	p-Value	RR (95% CI)	p-Value
Whole pregnancy	<b>n=5,003</b>		<b>n=5,003</b>		<b>n=5,003</b>	
Mean temperature	-50.9 (-115.1, 13.3)	0.12	NA*		1.33 (0.73, 2.45)	0.35
Mean relative humidity	-76.8 (-125.0, -28.5)	<0.01	-0.06 (-0.27, 0.15)	0.55	1.17 (0.68, 2.04)	0.57
Trimester 1 <sup>b</sup>	<b>n=4,996</b>		<b>n=4,996</b>		<b>n=4,996</b>	
Mean temperature	34.8 (-2.6, 72.1)	0.07	0.09 (-0.06, 0.25)	0.23	1.09 (0.62, 1.94)	0.76
Mean relative humidity	-18.1 (-58.4, 22.2)	0.38	-0.06 (-0.23, 0.11)	0.52	1.12 (0.68, 1.97)	0.65
Trimester 2 <sup>b</sup>	<b>n=4,996</b>		<b>n=4,996</b>		<b>n=4,996</b>	
Mean temperature	-31.8 (-65.2, 1.7)	0.06	-0.06 (-0.20, 0.08)	0.38	1.14 (0.76, 1.71)	0.53
Mean relative humidity	-34.0 (-72.4, 4.3)	0.08	0.08 (-0.08, 0.24)	0.34	0.88 (0.55, 1.42)	0.61
Trimester 3 <sup>b</sup>	<b>n=4,996</b>		<b>n=4,996</b>		<b>n=4,996</b>	
Mean temperature	-38.1 (-72.9, -3.2)	0.03	-0.10 (-0.23, 0.04)	0.17	1.02 (0.64, 1.63)	0.94
Mean relative humidity	-26.4 (-61.6, 8.8)	0.14	-0.12 (-0.26, 0.02)	0.09	NA*	

<sup>a</sup> All models were adjusted for maternal age, maternal height, pre-pregnancy weight, sex of the newborn, parity, maternal smoking, level of education, season and year of conception, and study center (and gestational age for birth weight using linear and quadratic terms).

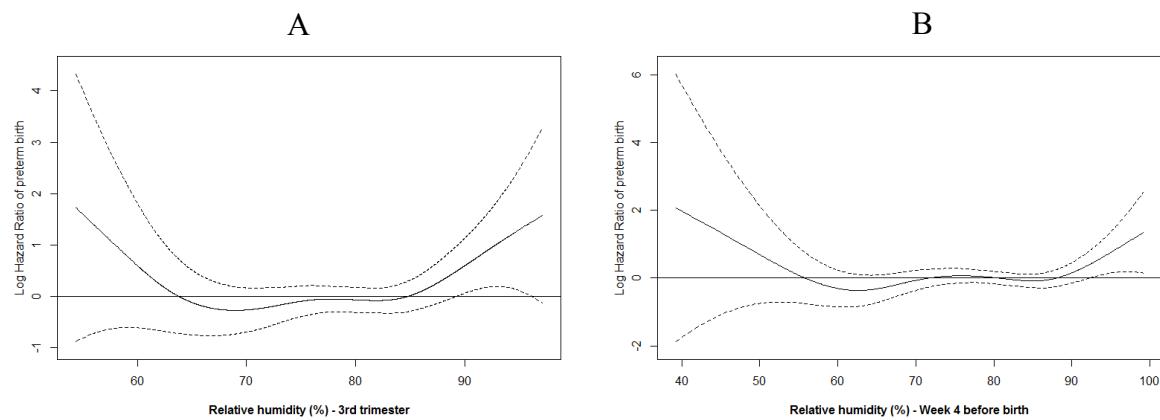
\* Not applicable in the context of a non-linear relationship (see Figure 1).

<sup>b</sup> Adjusted for exposure at other trimesters of pregnancy

## FIGURES



**Figure 1.** Estimated concentration-response function and 95% confidence interval between gestational duration and mean temperature over the whole pregnancy in the EDEN and PELAGIE mother child cohorts (2001-2006), using penalized splines.



**Figure 2.** Estimated concentration-response function and 95% confidence interval between preterm birth and mean relative humidity (A) over the third trimester of pregnancy and (B) over the 4th week before delivery in the EDEN and PELAGIE mother child cohorts (2001-2006), using penalized splines.

## **Supplemental Material**

### **Meteorological conditions and birth weight, preterm birth and gestational duration in two French mother-child cohorts.**

Emilie Abraham, Cécile Chevrier, Lise Giorgis-Allemand, Annick Auffray, Lydiane Agier, Fabrice Pierre, Monique Kaminski, Barbara Heude, Marie-Aline Charles, Sylvaine Cordier, Rémy Slama, Johanna Lepeule

#### **Table of contents**

**Figure S1.** Location of mothers' residences and location of meteorological stations measuring ambient air temperature (A) and relative humidity (B), in the EDEN and PELAGIE mother child cohorts (2001-2006), n=5,185.

**Table S1.** Pearson coefficients of correlation between temperature and relative humidity at medium-term exposure windows in the EDEN and PELAGIE mother-child cohorts (2001-2006), n=5,185.

**Table S2.** Descriptive statistics of maternal exposure to meteorological conditions during the whole pregnancy and each trimester of pregnancy in the EDEN and PELAGIE mother-child cohorts (2001-2006), n=5,185.

**Table S3.** Descriptive statistics of maternal exposure to meteorological conditions for short-term exposures during pregnancy in the EDEN and PELAGIE mother-child cohorts (2001-2006), n=5,185.

**Table S4.** Pearson coefficients of correlation between temperature and relative humidity at weekly exposure windows in the EDEN and PELAGIE mother-child cohorts (2001-2006), n=5185.

**Table S5.** Pearson coefficients of correlation between temperature and relative humidity at daily exposure windows the EDEN and PELAGIE mother-child cohorts (2001-2006), n=5,185.

**Table S6.** Adjusted<sup>a</sup> association between mean temperature (°C) (for a 5°C increase) and relative humidity (%) (for a 10% increase) and birth weight, gestational duration and preterm birth at various pregnancy exposure windows by study center, in EDEN and PELAGIE (2001-2006).

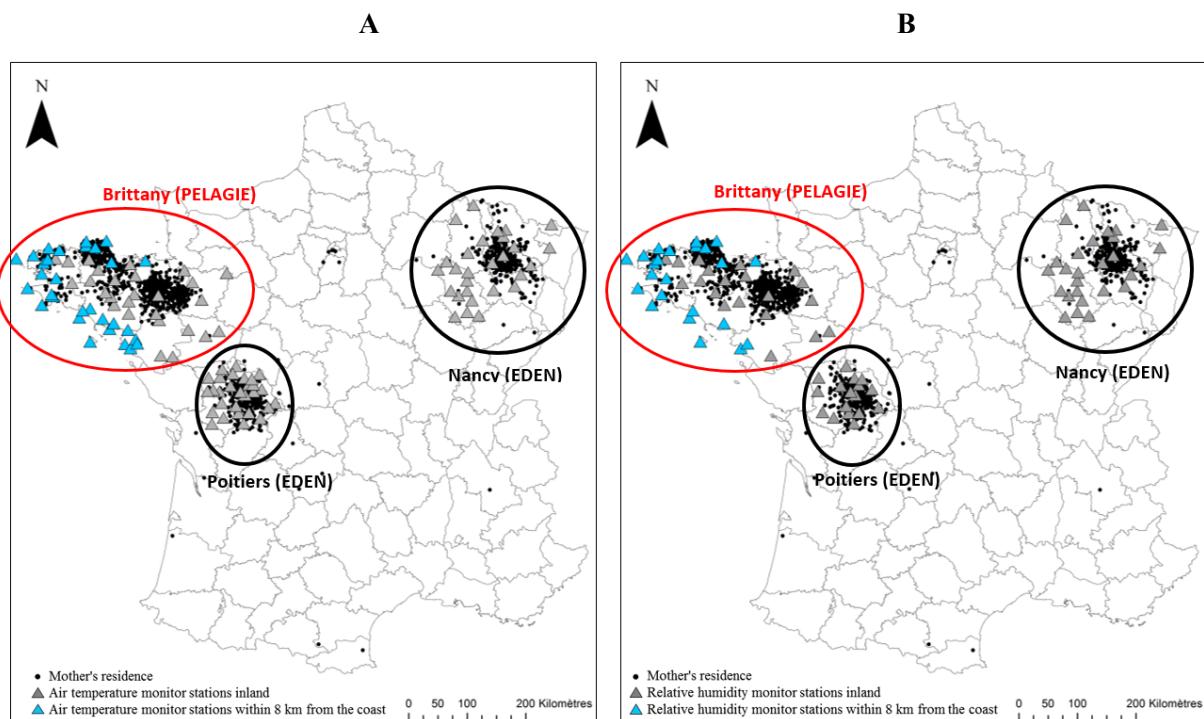
**Table S7.** Adjusted<sup>a</sup> association between mean temperature (°C) (for a 5°C increase) and relative humidity (%) (for a 10% increase), and birth weight and gestational duration at various pregnancy exposure windows when excluding preterm delivery, in the EDEN and PELAGIE mother child cohorts (2001-2006), n= 5,185.

**Table S8.** Adjusted<sup>a</sup> association between mean temperature (°C) (for a 5°C increase) and relative humidity (%) (for a 10% increase), and gestational duration and preterm birth at various pregnancy exposure windows when excluding planned caesarean section, in the EDEN and PELAGIE mother child cohorts (2001-2006), n= 5,185.

**Figure S2.** Estimated concentration-response function and 95% confidence interval between gestational duration and mean temperature over the whole pregnancy in the EDEN and PELAGIE mother child cohorts (2001-2006) when excluding planned caesarean section, using penalized splines.

**Figure S3.** Estimated effect and 95% confidence intervals of (A) a 5°C increase in temperature and (B) a 10% increase in relative humidity on the relative risk (RR) of preterm birth using a Cox proportional hazard model with a second-degree polynomial distributed-lag model adjusted for covariates, in EDEN and PELAGIE mother-child cohorts (2001-2006), n=5,185.

**Figure S4.** Estimated concentration-response function and 95% confidence interval between gestational duration and mean humidity over the trimester 1 in the EDEN and PELAGIE mother child cohorts (2001-2006) when excluding planned caesarean section, using penalized splines.



**Figure S1.** Location of mothers' residences and location of meteorological stations measuring ambient air temperature (A) and relative humidity (B), in the EDEN and PELAGIE mother child cohorts (2001-2006), n=5,185.

**Table S1.** Pearson coefficients of correlation among temperature and relative humidity at long-term exposure windows in the EDEN and PELAGIE mother-child cohorts (2001-2006), n=5,185.

	Pregnancy	Temperature				Relative humidity		
		trimester 1	Trimester 2	Trimester 3		Pregnancy	trimester 1	Trimester 2
<b>Temperature</b>								
Whole pregnancy	1	.10	.94	.18				
1 <sup>st</sup> trimester		1	-.02	<b>-.90</b>				
2 <sup>nd</sup> trimester			1	.17				
3 <sup>rd</sup> trimester				1				
<b>Relative humidity</b>								
Whole pregnancy	-.55	.16	-.48	-.36	1	.50	.82	.48
1 <sup>st</sup> trimester	-.47	-.67	-.41	.53		1	.18	-.34
2 <sup>nd</sup> trimester	-.65	.42	-.68	-.57			1	.31
3 <sup>rd</sup> trimester	.21	.60	.28	-.68				1

All p-values were below 5.10<sup>-5</sup>.

**Table S2.** Descriptive statistics of maternal exposure to meteorological conditions during the whole pregnancy and each trimester of pregnancy in the EDEN and PELAGIE mother-child cohorts (2001-2006), n=5,185.

	PELAGIE – Brittany					EDEN – Poitiers					EDEN – Nancy				
	n	Mean±SD	5th percentile	95th percentile	IQR	n	Mean±SD	5th percentile	95th percentile	IQR	n	Mean±SD	5th percentile	95th percentile	IQR
<b>Temperature (°C)</b>															
Pregnancy	3,293	11.9±1.8	7.1	18.1	2.9	921	12.1±2.2	8.9	15.5	3.8	956	9.9±2.3	6.8	13.5	4.0
Trimester 1	3,293	11.9±4.2	4.4	20.8	7.7	921	11.3±5.5	5.1	20.8	9.7	956	11.5±6.2	2.7	20.5	12.2
Trimester 2	3,293	11.9±4.6	3.4	20.8	8.4	919	12.0±5.5	4.8	20.8	11.0	956	8.9±5.7	1.0	18.3	9.7
Trimester 3	3,288	11.9±4.5	3.5	22.0	8.2	919	13.1±5.6	4.9	20.8	11.4	956	9.2±6.2	0.8	18.7	11.8
<b>Relative Humidity (%)</b>															
Pregnancy	3,292	79.9±4.3	69.2	89.5	6.8	921	77.3±3.9	70.5	83.4	5.4	956	78.0±3.1	73.6	83.2	4.8
Trimester 1	3,292	79.9±6.1	68.0	92.5	9.7	921	78.5±8.0	66.2	91.1	13.8	956	76.6±7.7	62.2	87.7	12.7
Trimester 2	3,292	79.9±6.3	67.5	92.8	10.4	919	76.9±8.0	65.2	90.5	13.2	956	79.4±7.1	68.2	88.2	12.6
Trimester 3	3,287	79.9±6.4	66.5	92.7	10.5	919	76.3±7.8	64.9	89.8	12.6	956	78.1±6.6	68.1	88.1	11.1

Abbreviation: SD = standard deviation, IQR = interquartile range

**Table S3.** Descriptive statistics of maternal exposure to meteorological conditions for short-term exposures during pregnancy in the EDEN and PELAGIE mother-child cohorts (2001-2006), n=5,185.

		Mean ± SD	5 <sup>th</sup> percentile	95 <sup>th</sup> percentile	IQR
<b>Mean value of temperature (°C)</b>					
Overall	Week 1	11.4±6.4	1.0	21.4	9.9
	Day 0	11.3±6.8	0.2	22.2	10.0
PELAGIE – Brittany					
	Week 1	11.8±5.3	3.8	20.5	8.0
	Day 0	11.7±5.7	12.9	21.3	8.0
EDEN – Nancy					
	Week 1	8.6±7.2	-1.3	20.5	12.1
	Day 0	8.6±7.6	-2.6	21.5	12.6
EDEN – Poitiers					
	Week 1	13.2±6.7	2.7	22.8	11.7
	Day 0	13.3±7.1	1.3	24.1	11.0
<b>Mean value of relative humidity (%)</b>					
Overall	Week 1	78.9±9.1	62.6	91.4	13.6
	Day 0	79.1±11.1	59.0	95.0	16.0
PELAGIE – Brittany					
	Week 1	80.1±8.0	65.0	91.3	11.1
	Day 0	80.2±10.3	84.0	95.0	14.0
EDEN – Nancy					
	Week 1	79.2±8.9	63.7	91.3	14.1
	Day 0	78.9±11.1	59.0	95.0	17.0
EDEN – Poitiers					
	Week 1	75.6±10.8	56.4	92.9	16.1
	Day 0	76.0±12.7	54.0	96.0	19.0

Descriptive statistics of exposures during week 2 to 6 and days 1 to 9 were very close to week 1 and day 0.

**Table S4.** Pearson coefficients of correlation between temperature and relative humidity at weekly exposure windows in the EDEN and PELAGIE mother-child cohorts (2001-2006), n=5,185.

	Temperature						Relative Humidity					
	W 1	W 2	W 3	W 4	W 5	W 6	W 1	W 2	W 3	W 4	W 5	W 6
<b>Temperature</b>												
W 1	1	0.88	0.82	0.79	0.76	0.70	-0.57	-0.58	-0.60	-0.61	-0.61	-0.61
W 2		1	0.88	0.82	0.79	0.75	-0.50	-0.57	-0.57	-0.59	-0.60	-0.60
W 3			1	0.89	0.82	0.79	-0.45	-0.49	-0.56	-0.57	-0.59	-0.60
W 4				1	0.89	0.82	-0.42	-0.45	-0.49	-0.56	-0.56	-0.59
W 5					1	0.89	-0.36	-0.42	-0.45	-0.49	-0.56	-0.57
W 6						1	-0.27	-0.36	-0.42	-0.45	-0.49	-0.56
<b>Relative Humidity</b>												
W 1							1	0.73	0.66	0.67	0.64	0.54
W 2								1	0.73	0.66	0.67	0.64
W 3									1	0.73	0.66	0.66
W 4										1	0.73	0.66
W 5											1	0.73
W 6												1

All p-values were below  $10^{-3}$ . W1 to 6: exposure of the week 1 to 6 before delivery.

**Table S5.** Pearson coefficients of correlation between temperature and relative humidity at daily exposure windows the EDEN and PELAGIE mother-child cohorts (2001-2006), n=5,185.

	Temperature									Relative Humidity											
	D0	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7	D8	D9	D0	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7	D8	D9	
<b>Temperature</b>																					
D0	1	0,95	0,89	0,85	0,83	0,81	0,79	0,78	0,77	0,76	-0,45	-0,45	-0,46	-0,45	-0,45	-0,44	-0,43	-0,42	-0,42	-0,42	
D1		1	0,95	0,89	0,85	0,83	0,81	0,79	0,78	0,77	-0,42	-0,45	-0,45	-0,45	-0,45	-0,44	-0,43	-0,43	-0,42	-0,42	
D2			1	0,95	0,89	0,85	0,83	0,81	0,79	0,78	-0,41	-0,42	-0,45	-0,45	-0,45	-0,45	-0,44	-0,43	-0,42	-0,42	
D3				1	0,95	0,89	0,85	0,83	0,81	0,79	-0,40	-0,40	-0,42	-0,45	-0,44	-0,45	-0,45	-0,44	-0,43	-0,42	
D4					1	0,95	0,89	0,85	0,83	0,81	-0,39	-0,40	-0,40	-0,42	-0,45	-0,44	-0,45	-0,44	-0,43	-0,43	
D5						1	0,95	0,89	0,85	0,83	-0,39	-0,39	-0,40	-0,40	-0,42	-0,44	-0,44	-0,45	-0,44	-0,44	
D6							1	0,95	0,89	0,85	-0,38	-0,39	-0,39	-0,40	-0,42	-0,44	-0,44	-0,45	-0,44	-0,44	
D7								1	0,95	0,89	-0,38	-0,38	-0,39	-0,40	-0,40	-0,41	-0,44	-0,44	-0,45	-0,45	
D8									1	0,95	-0,38	-0,38	-0,38	-0,39	-0,40	-0,41	-0,44	-0,44	-0,44	-0,44	
D9										1	-0,38	-0,38	-0,38	-0,38	-0,39	-0,39	-0,40	-0,41	-0,41	-0,44	-0,44
<b>Relative Humidity</b>																					
D0											1	0,74	0,57	0,52	0,48	0,46	0,44	0,44	0,44	0,44	
D1												1	0,74	0,58	0,52	0,48	0,46	0,45	0,44	0,44	0,44
D2													1	0,74	0,58	0,52	0,49	0,46	0,45	0,44	0,44
D3														1	0,74	0,58	0,52	0,48	0,46	0,45	
D4															1	0,74	0,58	0,52	0,48	0,46	
D5																1	0,74	0,57	0,52	0,48	
D6																	1	0,74	0,57	0,52	
D7																		1	0,74	0,57	
D8																			1	0,74	
D9																				1	

All p-values were below  $10^{-3}$ . D0 to 9: exposure of the day 0 to 9 before delivery.

**Table S6.** Adjusted<sup>a</sup> association between mean temperature (°C) (for a 5°C increase) and relative humidity (%) (for a 10% increase) and birth weight, gestational duration and preterm birth at various pregnancy exposure windows by study center, in EDEN and PELAGIE (2001-2006).

	EDEN				PELAGIE	
	Poitiers (n=923)		Nancy (n=956)		Bretagne (n=3,306)	
<b>BIRTH WEIGHT</b>						
Exposure window Meteorological factor	β (95% CI)	p-Value	β (95% CI)	p-Value	β (95% CI)	p-Value
Whole pregnancy						
Mean temperature	-72.4 (-211.7, 66.9)	0.31	-114.9 (-258.1, 28.2)	0.12	-10.2 (-99.5, 79.0)	0.82
Mean relative humidity	<b>-135.5 (-271.1, 0.1)</b>	<b>0.05</b>	<b>-187.9 (-342.7, -33.1)</b>	<b>0.02</b>	<b>-57.5 (-116.5, 1.5)</b>	<b>0.06</b>
Trimester 1 <sup>b</sup>						
Mean temperature	46.4 (-55.7, 148.4)	0.37	48.1 (-44.8, 141)	0.31	<b>53.7 (-5.4, 101.9)</b>	<b>0.03</b>
Mean relative humidity	-41.4 (-136.8, 54.1)	0.40	-18.6 (-129.8, 92.7)	0.74	2.6 (-56.3, 51.2)	0.92
Trimester 2 <sup>b</sup>						
Mean temperature	-38.1 (-119.3, 43.1)	0.36	<b>-83.2 (-171.9, 5.5)</b>	<b>0.07</b>	-13.5 (-58.4, 31.4)	0.56
Mean relative humidity	-28.8 (-120.5, 62.9)	0.54	<b>-156.2 (-279.4, -33.0)</b>	<b>0.01</b>	-39.6 (-90.5, 11.4)	0.13
Trimester 3 <sup>b</sup>						
Mean temperature	-50.6 (-146.6, 45.4)	0.30	-53.8 (-143.5, 35.8)	0.24	<b>-53.8 (-99.2, -8.3)</b>	<b>0.02</b>
Mean relative humidity	-75.2 (-169.1, 18.8)	0.12	-8.6 (-124.1, 106.9)	0.88	-24.8 (-72.6, 23.0)	0.31
<b>GESTATIONAL DURATION</b>						
Exposure window Meteorological factor	β (95% CI)	p-Value	β (95% CI)	p-Value	β (95% CI)	p-Value
Whole pregnancy						
Mean temperature	-0.31 (-0.92, 0.30)	0.32	0.18 (-0.42, 0.77)	0.56	-0.11 (-0.50, 0.23)	0.52
Mean relative humidity	-0.40 (-1.02, 0.22)	0.21	0.25 (-0.43, 0.93)	0.47	-0.08 (-0.32, 0.16)	0.51
Trimester 1 <sup>b</sup>						
Mean temperature	-0.03 (-0.48, 0.42)	0.90	0.37 (-0.05, 0.80)	0.08	0.09 (-0.10, 0.29)	0.34
Mean relative humidity	-0.21 (-0.64, 0.22)	0.34	<b>0.66 (0.15, 1.16)</b>	<b>0.01</b>	-0.20 (-0.42, 0.02)	0.08
Trimester 2 <sup>b</sup>						
Mean temperature	-0.09 (-0.44, 0.27)	0.62	0.32 (-0.07, 0.72)	0.10	-0.12 (-0.30, 0.06)	0.18
Mean relative humidity	0.01 (-0.41, 0.42)	0.98	0.31 (-0.25, 0.87)	0.27	0.08 (-0.13, 0.29)	0.44
Trimester 3 <sup>b</sup>						
Mean temperature	-0.01 (-0.39, 0.40)	0.98	0.21 (-0.59, 0.16)	0.27	-0.14 (-0.31, 0.04)	0.13
Mean relative humidity	-0.16 (-0.55, 0.24)	0.43	-0.08 (-0.59, 0.44)	0.77	-0.13 (-0.31, 0.04)	0.14
<b>PRETERM BIRTH</b>						
Exposure window Meteorological factor	RR (95% CI)	p-Value	RR (95% CI)	p-Value	RR (95% CI)	p-Value
Whole pregnancy						
Mean temperature	2.44 (0.76, 7.80)	0.13	0.90 (0.25, 3.27)	0.88	1.25 (0.49, 3.16)	0.64
Mean relative humidity	1.60 (0.42, 6.14)	0.49	0.60 (0.11, 3.37)	0.56	1.43 (0.71, 2.88)	0.32
Trimester 1 <sup>b</sup>						
Mean temperature	2.39 (0.71, 8.06)	0.16	0.45 (0.11, 1.78)	0.25	0.95 (0.42, 2.13)	0.90
Mean relative humidity	1.65 (0.63, 4.32)	0.31	0.43 (0.12, 1.58)	0.20	1.15 (0.55, 2.38)	0.71
Trimester 2 <sup>b</sup>						
Mean temperature	0.94 (0.38, 2.31)	0.89	0.90 (0.37, 2.20)	0.81	1.22 (0.66, 2.25)	0.53
Mean relative humidity	0.69 (0.24, 1.93)	0.47	0.66 (0.15, 2.88)	0.58	0.91 (0.46, 1.81)	0.79
Trimester 3 <sup>b</sup>						
Mean temperature	1.51 (0.58, 3.88)	0.40	0.62 (0.26, 1.71)	0.36	0.90 (0.44, 1.83)	0.77
Mean relative humidity	1.12 (0.49, 2.55)	0.79	1.21 (0.37, 3.92)	0.75	1.45 (0.81, 2.58)	0.21

<sup>a</sup> All models were adjusted for maternal age, maternal height, pre-pregnancy weight, sex of the newborn, parity, maternal smoking, level of education, season and year of conception, and study center (and gestational age for birth weight using linear and quadratic terms). <sup>b</sup> Adjusted for exposure at other trimesters of pregnancy

**Table S7.** Adjusted<sup>a</sup> association between mean temperature (°C) (for a 5°C increase) and relative humidity (%) (for a 10% increase), and birth weight and gestational duration at various pregnancy exposure windows when excluding preterm delivery, in the EDEN and PELAGIE mother child cohorts (2001-2006), n= 5,185.

<b>Exposure window</b> <b>Meteorological factor</b>	<b>Birth weight (grams)</b> <b>n=4954</b>		<b>Gestational duration (weeks)</b> <b>n=4954</b>	
	<b>β (95% CI)</b>	<b>p-Value</b>	<b>β (95% CI)</b>	<b>p-Value</b>
Whole pregnancy	<b>n=4,784</b>		<b>n=4,784</b>	
Mean temperature	-38.37 (-106.29, 29.56)	0.27	-0.03 (-0.23, 0.17)	0.77
Mean relative humidity	-69.37 (-118.92, -19.82)	<0.01	0.01(-0.15, 0.17)	0.90
Trimester 1 <sup>b</sup>	<b>n=4,784</b>		<b>n=4,784</b>	
Mean temperature	34.2 (-3.8, 72.1)	0.08	0.06 (-0.07, 0.19)	0.35
Mean relative humidity	-20.8 (-61.8, 20.2)	0.32	-0.07 (-0.2, 0.07)	0.30
Trimester 2 <sup>b</sup>	<b>n=4,784</b>		<b>n=4,784</b>	
Mean temperature	-29.4 (-63.6, 4.8)	0.09	-0.03 (-0.14, 0.08)	0.59
Mean relative humidity	-29.0 (-68.2, 10.2)	0.15	0.09 (-0.05, 0.22)	0.20
Trimester 3 <sup>b</sup>	<b>n=4,784</b>		<b>n=4,784</b>	
Mean temperature	-35.7 (-71.3, 0.01)	0.05	-0.07 (-0.18, 0.05)	0.25
Mean relative humidity	-24.1 (-60.4, 12.1)	0.19	-0.05 (-0.16, 0.06)	0.39

<sup>a</sup>All models were adjusted for maternal age, maternal height, pre-pregnancy weight, sex of the newborn, parity, maternal smoking, level of education, season and year of conception, and center (and gestational age for birth weight using linear and quadratic terms).

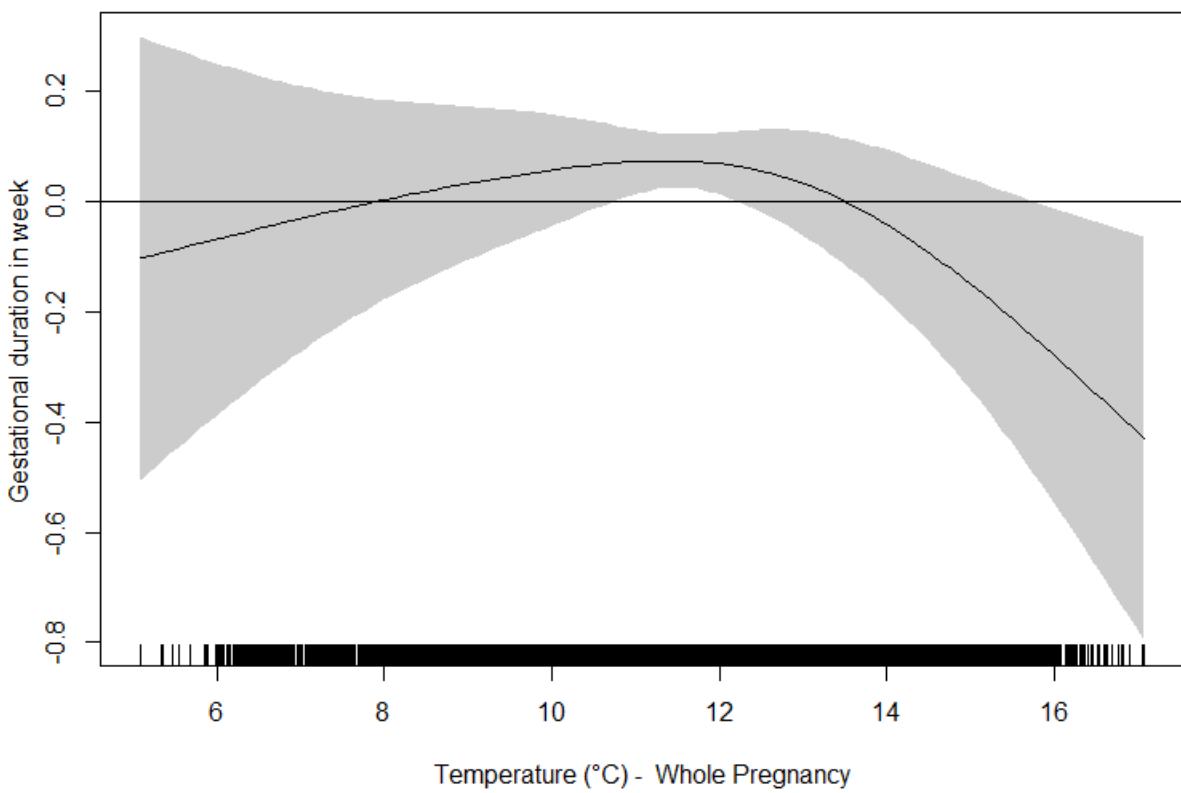
**Table S8.** Adjusted<sup>a</sup> association between mean temperature (°C) (for a 5°C increase) and relative humidity (%) (for a 10% increase), and gestational duration and preterm birth at various pregnancy exposure windows when excluding planned caesarean section, in the EDEN and PELAGIE mother child cohorts (2001-2006), n= 5,185.

Exposure window Meteorological factor	Gestational duration (weeks) n=4580		Preterm birth n=4580	
	β (95% CI)	p-Value	RR (95% CI)	p-Value
Whole pregnancy	n=4,423		n=4,423	
Mean temperature	NA*		1.28 (0.61, 2.73)	0.51
Mean relative humidity	-0.05 (-0.24, 0.15)	0.66	1.13 (0.57 2.22)	0.72
Trimester 1 <sup>b</sup>	n=4,421		n=4,421	
Mean temperature	0.03 (-0.13, 0.18)	0.73	1.25 (0.63, 2.47)	0.53
Mean relative humidity	NA*		1.36 (0.75, 2.45)	0.31
Trimester 2 <sup>b</sup>	n=4,421		n=4,421	
Mean temperature	-0.05 (-0.19, 0.08)	0.43	1.16 (0.72, 1.87)	0.54
Mean relative humidity	0.12 (-0.03, 0.28)	0.13	0.79 (0.45, 1.37)	0.40
Trimester 3 <sup>b</sup>	n=4,421		n=4,421	
Mean temperature	-0.04 (-0.18, 0.09)	0.56	1.00 (0.56, 1.77)	0.99
Mean relative humidity	-0.06 (-0.20, 0.08)	0.38	1.11 (0.69, 1.78)	0.64

<sup>a</sup>All models were adjusted for maternal age, maternal height, pre-pregnancy weight, sex of the newborn, parity, maternal smoking, level of education, season and year of conception, and study center.

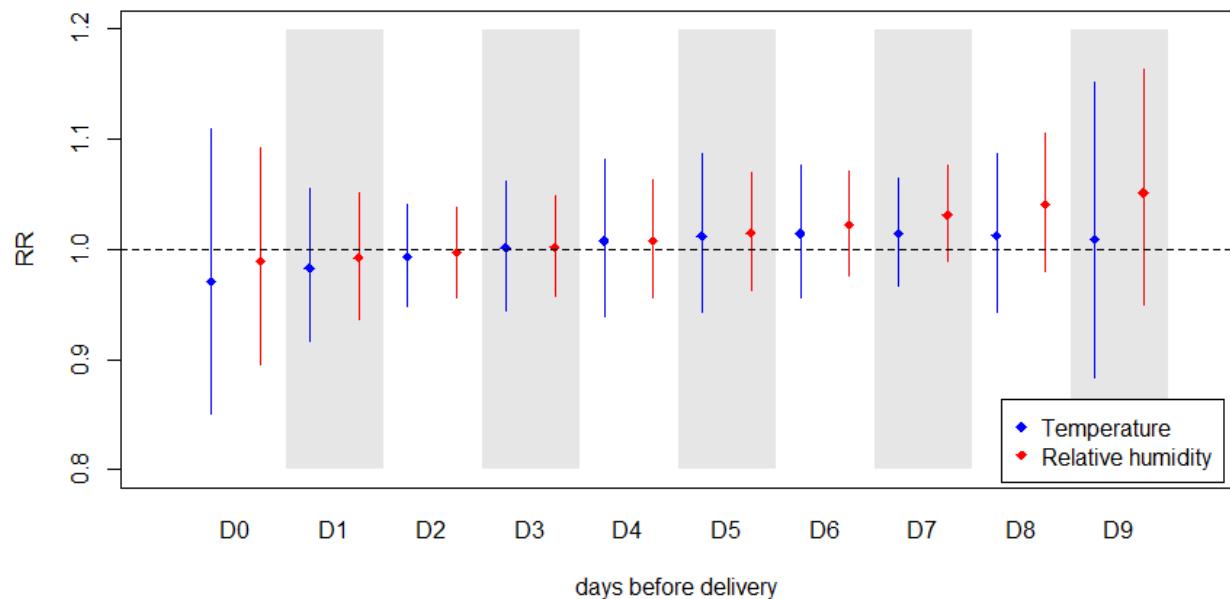
\*Not applicable in the context of a non-linear relationship.

<sup>b</sup>Adjusted for exposure at other trimesters of pregnancy

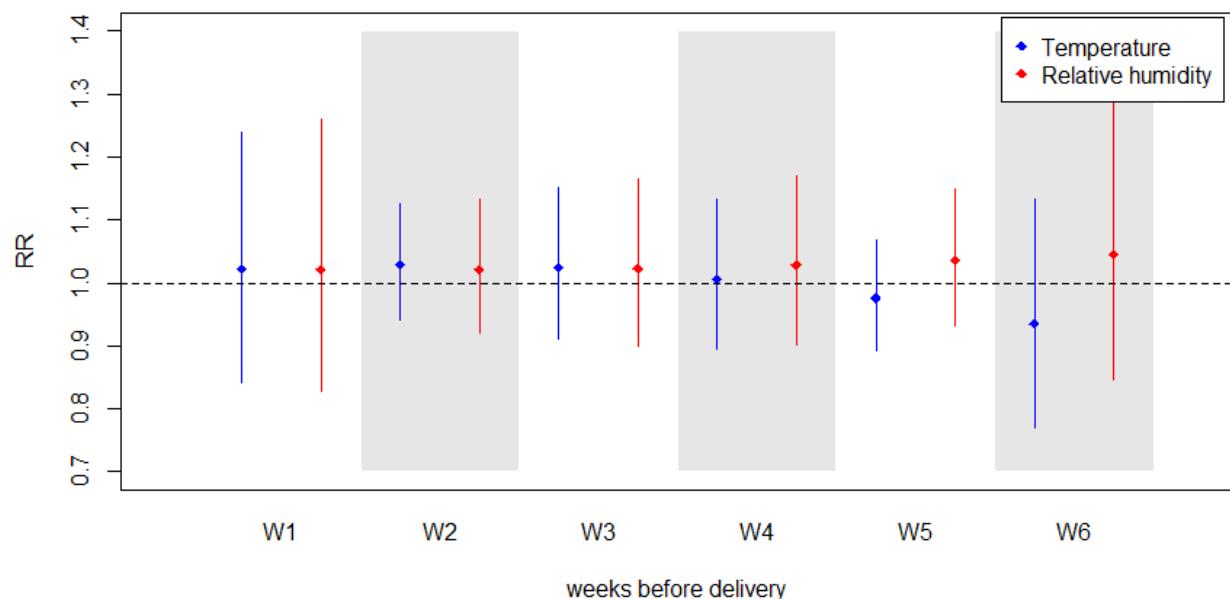


**Figure S2.** Estimated concentration-response function and 95% confidence interval between gestational duration and mean temperature over the whole pregnancy in the EDEN and PELAGIE mother child cohorts (2001-2006) when excluding planned caesarean section, using penalized splines.

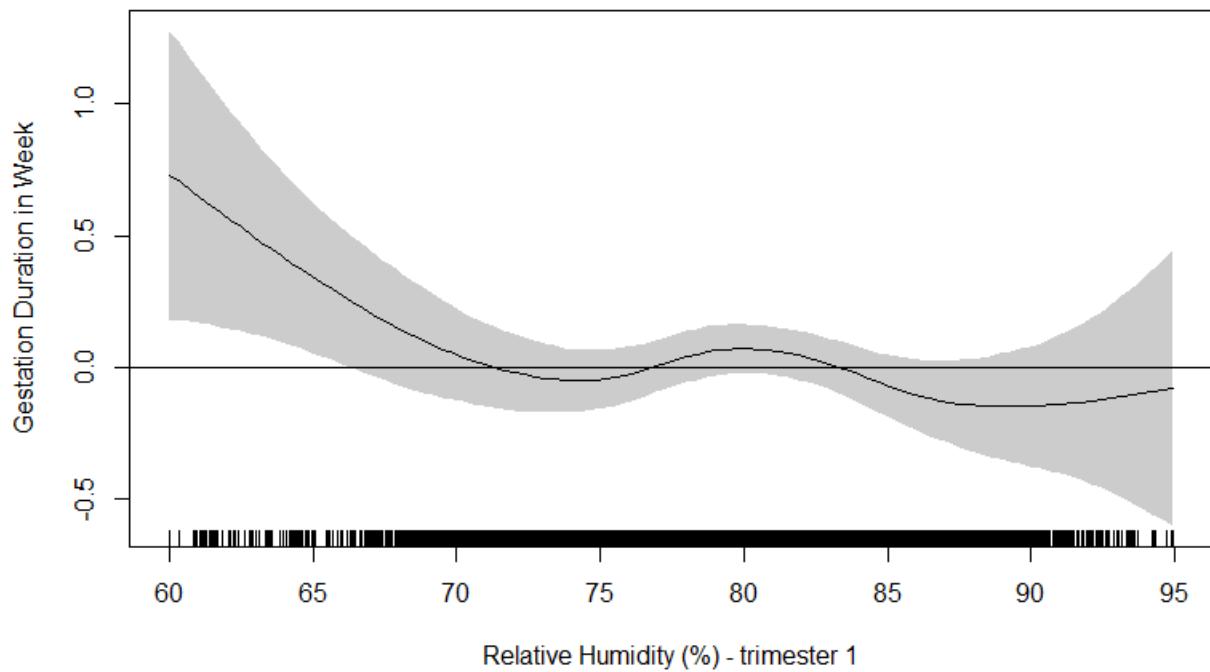
A)



B)



**Figure S3.** Estimated effect and 95% confidence intervals of (A) a 5°C increase in temperature and (B) a 10% increase in relative humidity on the relative risk (RR) of preterm birth using a Cox proportional hazard model with a second-degree polynomial distributed-lag model adjusted for covariates, in EDEN and PELAGIE mother-child cohorts (2001-2006), n=5,185.



**Figure S4.** Estimated concentration-response function and 95% confidence interval between gestational duration and mean humidity over the trimester 1 in the EDEN and PELAGIE mother child cohorts (2001-2006) when excluding planned caesarean section, using penalized splines.

### **CHAPITRE III :**

### **EXPOSITIONS ENVIRONNEMENTALES ET MÉTHYLATION DE L'ADN**



*Ce chapitre, dont l'objectif était d'étudier le potentiel rôle de la méthylation de l'ADN placentaire comme potentiel biomarqueur aux expositions environnementales, se divise en deux sous-parties. La première partie présente les travaux portant sur les effets des expositions prénatales à la pollution de l'air et aux conditions météorologiques sur la méthylation de l'ADN. Ces travaux sont basés sur une approche agnostique et font l'objet d'un deuxième article en cours de préparation pour une soumission au journal Environment International pour lequel j'ai réalisé le data-management, les analyses statistiques et la rédaction du papier. La deuxième partie porte sur la même problématique, mais se base sur une approche originale avec a priori basée sur des connaissances biologiques, et sera quant à elle présentée sous forme classique. Ces analyses ont porté uniquement sur la cohorte EDEN pour laquelle les données de méthylation étaient disponibles.*



## **Partie A**

### **Approche agnostique**



## **1. Résumé Article 2: Impact of pregnancy exposure to atmospheric pollution and meteorological conditions on placental DNA methylation: an epigenome-wide association study.**

### **1.1. Introduction**

Si des études ont montré une association entre la pollution de l'air, les conditions météorologiques et différentes issues de grossesse défavorables, les mécanismes biologiques qui pourraient expliquer ces associations sont encore peu connus. Les marques épigénétiques, telles que la méthylation de l'ADN, seraient susceptibles de porter la mémoire des expositions environnementales précoces de la vie et d'être associées à des problèmes de santé à plus ou moins long terme. Au sein de la cohorte EDEN, nous avons exploré si l'exposition aux polluants ( $PM_{10}$  et  $NO_2$ ) et aux conditions météorologiques (température et humidité relative) pendant la grossesse était associée à des modifications de méthylation de l'ADN dans le placenta notamment à l'aide d'une étude à l'échelle du génome entier.

### **1.2. Méthodes**

Des échantillons de placenta centraux ont été collectés à l'accouchement pour 1301 femmes de la cohorte EDEN. Nous avons restreint nos analyses aux 668 femmes pour lesquels les données sur l'exposition à la pollution de l'air étaient disponibles. La méthylation de l'ADN a été analysée en utilisant la puce Illumina 450K. Les expositions maternelles aux polluants (estimées à l'aide d'un modèle de dispersion) et aux conditions météorologiques (obtenues à partir de la Publithèque de Météo France) ont été moyennées sur différentes fenêtres d'exposition : jour 1 à 3 précédent l'accouchement, la semaine et le mois précédent l'accouchement puis chaque trimestre de grossesse et la grossesse entière. Nous avons regardé l'association entre ces expositions environnementales et la méthylation globale (les éléments répétés Alu et LINE1 et la méthode GAMP) d'une part puis la méthylation de chacun des 426

049 sites CpGs mesurés par la puce Illumina. Pour cela, des modèles de régression linéaire robustes, ajustés sur les potentiels facteurs de confusion et sur les facteurs techniques (groupe, plaque et puce), ont été mis en place. Enfin, la multiplicité des tests a été corrigée à l'aide de la méthode de correction de Benjamini-Hochberg de la famille de FDR (False Discovery Rate).

### **1.3. Résultats**

Les concentrations moyennes de NO<sub>2</sub> et PM<sub>10</sub> pendant la grossesse (25e-75e percentile) étaient de 20.0 (15.9-23.7) and 19.0 (12.9-24.8) µg/m<sup>3</sup> respectivement. Les niveaux moyens de température et d'humidité relative pendant la grossesse (25e-75e percentile) étaient de 10.9 (9.0-12.9) °C and 77.1 (74.9-79.5) % respectivement. Aucune association significative n'a été observée entre la méthylation de l'ADN et les conditions météorologiques. Après l'application de la correction FDR de tests multiples, l'exposition aux PM<sub>10</sub> et de NO<sub>2</sub> au cours du premier trimestre de la grossesse a été associée à une plus faible méthylation de l'ADN à un site CpG situé dans le corps du gène *ADARB2* (chromosome 10) et l'exposition au NO<sub>2</sub> au cours du deuxième trimestre a été associée à une plus faible méthylation de l'ADN à un site CpG situé dans le corps du gène *ADORA2B* (chromosome 17).

### **1.4. Discussion**

À notre connaissance, notre étude est la première à étudier l'association entre méthylation de l'ADN dans le tissu placentaire et l'exposition prénatale et les expositions prénatales aux polluants et aux conditions météorologiques, en utilisant des données de l'épigénome entier. Nos résultats suggèrent une diminution de méthylation sur certains gènes en association avec l'exposition aux polluants atmosphériques en début de grossesse. Ces résultats coïncident en termes de fenêtre d'exposition avec les deux précédentes études sur les effets de l'exposition aux polluants de la mère pendant la grossesse sur la méthylation de l'ADN ; la première étude

reportant une méthylation globale plus faible dans le placenta en association avec une exposition aux PM<sub>2.5</sub> pendant le trimestre 1 et la deuxième reportant une méthylation plus faible pour LINE1 dans le sang de l'enfant en association avec une exposition aux PM<sub>10</sub> et O<sub>3</sub> pendant le trimestre 1. Le premier trimestre de grossesse pourrait donc être une fenêtre particulièrement sensible à l'exposition des polluants atmosphériques sur la méthylation de l'ADN placentaire.



## **2. Version intégrale de l'article 2**

# **Impact of pregnancy exposure to atmospheric pollution and meteorological conditions on placental DNA methylation: a combined agnostic and a priori study**

Abraham Emilie<sup>1</sup>, Agier Lydiane<sup>1</sup>, Giorgis-Allemand Lise<sup>1</sup>, Tost Jörg<sup>2</sup>, Galineau Julien<sup>3</sup>, Hulin Agnès<sup>4</sup>, Siroux Valérie<sup>1</sup>, Vaiman Daniel<sup>5</sup>, Charles Marie-Aline<sup>6</sup>, Heude Barbara<sup>6</sup>, Forhan Anne<sup>6</sup>, Schwartz Joel<sup>7</sup>, Chuffart Florent<sup>8</sup>, Khochbin Saadi<sup>8</sup>, Rousseaux Sophie<sup>8</sup>, Slama Rémy<sup>1</sup>, Lepeule Johanna<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Inserm-CNRS-Univ. Grenoble-Alpes (U1209), IAB, Team of Environmental Epidemiology applied to Reproduction and Respiratory Health, Grenoble, France; <sup>2</sup> Laboratory for Epigenetics and Environment, Centre National de Genotypage, CEA – Institut de Génomique, Evry, France; <sup>3</sup> Air Lorraine, Nancy, France; <sup>4</sup> ATMO Poitou-Charentes, La Rochelle, France; <sup>5</sup> Genomics, Epigenetics and Physiopathology of Reproduction, Institut Cochin, U1016 Inserm –UMR 8104 CNRS – Paris-Descartes University, Paris; <sup>6</sup> Inserm U1153, Early Origins of Child Health and Development team, Research Center for Epidemiology and Biostatistics Sorbonne Paris Cité (CRESS), Paris Descartes University, Villejuif, France; <sup>7</sup> Department of Environmental Health, Harvard T.H. Chan School of Public Health, Boston, Massachusetts, USA. <sup>8</sup> CNRS UMR 5309; INSERM U1209; Université Grenobles-Alpes, IAB, team Epigenetics and Cell Signaling.

**Address for correspondence:** Emilie Abraham, IAB – Inserm U1209, Site Santé - Allée des Alpes, 38700 La Tronche.

Telephone: +33 4 76 54 94 66 – E-mail: emilie.abraham@inserm.fr

**Running title:** Environmental prenatal exposure and placental DNA methylation

**Competing Financial Interests:** The authors declare they have no actual or potential competing financial interests.

**Acknowledgments:** This work was made possible thanks to a grant from the Fondation de France. This work was also supported by AVIESAN (Alliance nationale pour les sciences de la vie et de la santé), the Région Rhône-Alpes, EPAP (ANR) and the ERC. The EDEN cohort has been funded by Foundation for Medical Research (FRM), National Agency for Research (ANR), National Institute for Research in Public Health (IRESP: TGIR cohorte santé 2008 program), French Ministry of Health (DGS), French Ministry of Research, Inserm Bone and Joint Diseases National Research (PRO-A) and Human Nutrition National Research Programs, Paris-Sud University, Nestlé, French National Institute for Population Health Surveillance (InVS), French National Institute for Health Education (INPES), the European Union FP7 programmes (FP7/2007-2013, HELIX, ESCAPE, ENRIECO, Medall projects), Diabetes National Research Program (through a collaboration with the French Association of Diabetic Patients (AFD)), French Agency for Environmental Health Safety (now ANSES), Mutuelle Générale de l'Education Nationale (MGEN), French National Agency for Food Security, and the French-speaking association for the study of diabetes and metabolism (ALFEDIAM). Funders had no influence of any kind on analyses or result interpretation. SK team projects are supported by INCa (RPT13001CCA), ANR EpiSperm3, Fondation pour la Recherche Médicale, Fondation ARC “Canc’air” project (RAC16042CLA), Plan Cancer (CH7-INS15B66) and Plan Cancer (ASC16012CSA).

We thank the midwife research assistants (L. Douhaud, S. Bedel, B. Lortholary, S. Gabriel, M. Rogeon, and M. Malinbaum) for data collection and P. Lavoine for checking, coding, and entering data. We acknowledge the commitment of the EDEN mother-child cohort study group: I Annesi-Maesano, JY Bernard, J Botton, M-A Charles, P Dargent-Molina, B de Lauzon-Guillain, P Ducimetière, M de Agostini, B Foliguet, A Forhan, X Fritel, A Germa, V Goua, R Hankard, B Heude, M Kaminski, B Larroque, N Lelong, J Lepeule, G Magnin, L Marchand, C Nabet, F Pierre, R Slama, MJ Saurel-Cubizolles, M Schweitzer, O Thiebaugeorges.

## ABSTRACT

**Background:** Epigenetic marks such as DNA methylation, may bear the memory of early life environmental exposures, but the evidence is limited in humans. We investigated whether atmospheric pollutants, temperature and humidity during pregnancy were associated with altered placental DNA methylation. **Methods:** In 668 placenta samples from the EDEN mother-child cohort, genome-wide DNA methylation was analyzed using the Illumina450K BeadChip. Ambient nitrogen dioxide ( $\text{NO}_2$ ) and particulate matter ( $\text{PM}_{10}$ ) concentrations from a dispersion model as well as temperature and relative humidity from the closest monitor were estimated at the home address and averaged over various time windows during pregnancy. We used robust linear regression models adjusted for relevant covariates and technical effects to study the association between environmental pregnancy exposures and each CpG methylation level. P-values were corrected for false discovery rate **Results:**  $\text{PM}_{10}$  and  $\text{NO}_2$  average during pregnancy were (25<sup>th</sup>-75<sup>th</sup> percentile) 20.0 (15.9-23.7) and 19.0 (12.9-24.8)  $\mu\text{g}/\text{m}^3$  respectively. Temperature and relative humidity average during pregnancy were (25<sup>th</sup>-75<sup>th</sup> percentile) 10.9 (9.0-12.9) °C and 77.1 (74.9-79.5) %, respectively. No significant association of DNA methylation was found with weather conditions. Exposure to  $\text{PM}_{10}$  and  $\text{NO}_2$  during the first trimester of pregnancy was associated with lower DNA methylation at one CpG site located in *ADARB2* and exposure to  $\text{NO}_2$  during the second trimester was associated with lower DNA methylation at another CpG site located in *ADORA2B*. This gene codes for adenosine receptor A2B, which has a role in placental development and possibly in the pathophysiology of preeclampsia. **Conclusions:** Our findings suggest a lower level of methylation on *ADARB2* and *ADORA2B* genes in association with exposure to air pollutants in early pregnancy. To our knowledge, this is the first study to investigate the association between air pollution and placental DNA methylation using epigenome-wide data in humans.

## INTRODUCTION

Epidemiological studies have reported that exposure to air pollution during pregnancy is associated with adverse birth outcomes (van den Hooven et al. 2012, reviewed e.g. by Shah et al. 2011; Stieb et al. 2012). More recently, other studies have reported similar adverse effects of high- or low-ambient temperatures during pregnancy, these being extreme or not (Strand et al. 2012; reviewed e.g. by Beltran et al. 2014; Strand et al. 2011). Adverse birth outcomes, including preterm birth and lower birth weight, are associated with higher morbidity and mortality on the short and long term (Kramer 2003).

Epigenetic marks control gene expression, and epigenetic modifications at birth could reflect early life environmental exposures. They are thus likely to bear the memory of these early life exposures and to be associated with health in the short and long terms (Foley et al. 2009; Koukoura et al. 2012; Waterland and Michels 2007). One of the best studied epigenetic marks is DNA methylation which refers to the addition of a methyl group on cytosine bases (Bollati and Baccarelli 2010; Hou et al. 2012; Jirtle and Skinner 2007).

Previous studies in elderly have reported changes in global DNA methylation levels and gene-specific methylation patterns in association with exposure to air pollution (Baccarelli et al. 2009; Bind et al. 2014a; Madrigano et al. 2011) and to temperature and relative humidity (Bind et al. 2014b). In a crossover trial, Bellavia et al. (2013) found that short exposure to particulate matter induced a global (repetitive-element: *Alu*) and gene specific (*TLR4*) DNA hypomethylation in adult blood of non-smokers. A recent genome-wide analysis in adult blood has identified several CpG (cytosine–phosphate–guanine) sites, in or close to *NSMAF*, *C1orf212*, *MSGN1*, *NXN*, associated with particulate matter concentration (Panni et al. 2016). The literature on the potential effect of air pollution and temperature on changes in DNA methylation patterns in newborns or children has received little attention so far. A study

analyzing buccal samples from children reported methylation changes in three nitric oxide synthase genes in association with exposure to particulate matter (Breton et al. 2012). A recent meta-analysis investigated the association between maternal NO<sub>2</sub> exposure during pregnancy and epigenome-wide DNA methylation in cord blood and identified epigenome-wide significant associations for 3 CpG sites in mitochondria-related genes (*LONP1*, *HIBADH* and *SLC25A28*) (Gruzieva et al. 2016).

In the context of pregnancy outcomes, the placenta represents a relevant tissue for studying the DNA methylation patterns. Indeed, throughout *in utero* development, the placenta plays a key role in controlling growth and development, but it is also the place of maternal-fetal exchanges (Koukoura et al. 2012). This short-lived tissue may finally reflects the accumulated exposition of the mother during the pregnancy, and thus the exposition of the newborn since its conception. Only one study has investigated the effect of air pollution during pregnancy on global placental DNA methylation levels and reported a lower methylation associated with exposure to particulate air pollution in early pregnancy and over the whole pregnancy (Janssen et al. 2013). However, to our knowledge, no study has to date investigated the relationship between exposure to meteorological conditions during pregnancy and methylation patterns (either epigenome-wide or gene specific) in placental tissue.

Within the EDEN mother-child cohort, we investigated whether ambient concentrations of atmospheric pollutants (particulate matter with aerodynamic diameter  $\leq 10 \mu\text{m}$  (PM<sub>10</sub>), nitrogen dioxide (NO<sub>2</sub>)) and ambient levels of temperature and relative humidity averaged over different exposure windows throughout the pregnancy were associated with changes in placental DNA methylation using an epigenome-wide association study (EWAS).

## MATERIAL AND METHODS

### Study population

The EDEN mother-child cohort aims at assessing prenatal and postnatal determinants of child growth, development, and health. Between 2003 and 2006, 2002 pregnant women were recruited in two French university hospitals (Nancy and Poitiers) before 24 weeks of gestation. Exclusion criteria were multiple pregnancies, pre-pregnancy diabetes, French illiteracy, and planned move outside the region in the following 3 years. The detailed study protocol was published in Heude et al. (2015).

Using a standardized procedure, placenta samples were collected at delivery for 1301 women, by the midwife or the technician of the study. The placenta was mopped, and samples of around 5mm x 5mm were carried out in the center of the placenta, on the fetal side. The placenta samples were immediately frozen at -80°C and stored in the biobanks of the study. Among the 806 women for whom data on exposure to air pollution during pregnancy were available, we restricted our study to 668 women randomly selected.

The EDEN cohort received approval from the ethics committee (CCPPRB) of Kremlin Bicêtre and from the French data privacy institution “*Commission Nationale de l’Informatique et des Libertés*” (CNIL). Written consent was obtained from the mother for herself and for the offspring at birth.

### Placental DNA methylation assessment

The DNA methylation analysis was performed by The Centre National de Génotypage (CNG, Evry, France). The DNA samples were plated onto plates with 96-well or 48-well. In total, nine plates including 64 chips were used. These plates were analyzed in 4 batches. The ratios for sex (boy/girl) and recruitment center (Poitiers/Nancy) were balanced for each chip. We

have replicated several samples to assess whether the batch, the plate, and the chip had an effect on the estimated level of methylation. No significant differences in methylation levels were detected between the centers of Nancy and Poitiers or by group, plate and chip (Student test). The Illumina's Infinium HumanMethylation450 BeadChip, representing over 485.000 individual CpG site, was used to assess levels of methylation in placenta samples following the manufacturer's instructions (Illumina, San Diego, CA, USA). Raw signals of 450K BeadChips were extracted using the GenomeStudio® software (v2011.1, Illumina). The DNA methylation level of each CpG was calculated as the ratio of the intensity of fluorescent signals of the methylated alleles over the sum of methylated and unmethylated alleles ( $\beta$  value). All samples passed initial quality control and had on average more than 98 % of valid data points (detection p-value <0.01), A refined version of the Subset Quantile Normalization (SQN) pipeline (Touleimat and Tost 2012) including a revised annotation file (Price et al. 2013) was used for data processing, correction and normalization. Intensity values were corrected for potential biases in fluorescent dye intensity and background corrected using the *lumi* R package (Du et al. 2008) as implemented in the SQN pipeline. Probes potentially influenced by SNPs underlying the entire sequence of the probe (+1 or + 2 bases depending on the Infinium probe type) that are present in the EUR population of the 1000 Genome project (<http://www.1000genomes.org>) at a frequency of more than 5% were removed from the analysis. Probes previously reported to map to several genomic regions were removed (Chen et al. 2013). The SQN pipeline uses the intensity signals of high-quality (i.e. low detection p-value) Infinium I probes as “anchors” to estimate a reference distribution of quantiles for probes in a biologically similar context based on the annotation file (Touleimat and Tost 2012). This reference was then used to estimate a target distribution of quantiles for InfII probes as a means to provide an accurate normalization of InfI/InfII probes and correct for the shift between the two types of Infinium probes. SQN is performed for each individual

separately. A principal component analysis as well as a hierarchical clustering were applied and showed no overall difference in the methylation patterns across participants samples and control samples, so that a quantile normalization was performed for between sample normalization. After quality control and normalization steps, 426,049 CpG sites were available for statistical analyses. Methylation beta values ranged from 0 to 1. Beta values were used in all subsequent analyses.

Global methylation was also evaluated by measuring methylation of repetitive Alu elements (*Alu*) and long interspersed nucleotide elements 1 (*LINE-1*) using a previously published pyrosequencing methylation assay (Yang et al. 2004).

### **Environmental exposures assessment**

**For atmospheric pollution**, NO<sub>2</sub> and PM<sub>10</sub> hourly concentrations were modeled at the women's home addresses using the quasi-Gaussian Atmospheric Dispersion Modeling System (ADMS) Urban 3.1 (Cambridge Environmental Research Consultants, Cambridge, United Kingdom) (Sellier et al. 2014). This model was implemented with the same methodology for both cities of Poitiers and Nancy.

**For meteorological exposure**, ambient temperature (T, in °C) and relative humidity (RH, in %) were obtained from the French national reference center of *Météo France*. These parameters are measured daily by meteorological stations located across the entire French territory. For each woman, the meteorological station nearest to her home address at recruitment was used.

Because the most biologically relevant time period for the effect of air pollution and weather conditions on methylation is not known, we considered different exposure windows throughout pregnancy over which we averaged levels of NO<sub>2</sub>, PM<sub>10</sub>, T and RH: day 1, 2 and

3 before delivery, one week before delivery, one month before delivery, each trimester of pregnancy and the whole pregnancy.

## STATISTICAL METHODS

### Global methylation analysis.

We examined the impact of environmental exposures on the overall methylation level over the entire genome using two approaches:

**1 – Repetitive elements analysis.** We used a linear regression to study the association between air pollution, meteorological conditions and *Alu* and *LINE-1* methylation levels. All analyses were adjusted for the following covariates selected *a priori*: child sex, parity (0, 1,  $\geq 2$  children), maternal age at end of education ( $\leq 18$ , 19-20, 21-22, 23-24,  $\geq 25$  years), season of conception, study center (Poitiers and Nancy), maternal body mass index ( $\text{kg}/\text{cm}^2$ ), maternal age (years), maternal smoking during pregnancy (daily average number of cigarettes) and gestational duration (weeks). We additionally adjusted for technical factors of the methylation measurements: batch, plate and chip.

We tested (1) the simultaneous effect of weather conditions - temperature and humidity - (using restricted cubic splines (Harrell FE 2001)) on *Alu* and *LINE-1*, adjusting for covariates; (2) the association with each air pollutant (as a continuous variable, with the same considered exposure windows) adjusting for weather conditions (temperature and humidity, with restricted cubic spline effects) and for covariates.

**2 – Global analysis of methylation profiles (GAMP).** We additionally conducted a global analysis of DNA methylation data. This method, described by Zhao et al. (2015), allows to test whether exposure changes the overall profile or distribution of CpG measurements for a given subject instead of examining the effect of individual CpGs. Briefly,

each individual's methylation profile is characterized by approximating the density function or the cumulative distribution function (CDF) of the methylation distribution using B-splines basis functions. The B-spline coefficients are used to represent each individual overall methylation distribution. A variance component score test, which naturally accommodates the correlation between B-spline coefficients, was computed and we tested its association with the continuous exposure, resulting in a single p-value being generated.

### **Genome-wide placental methylation analysis.**

Epigenome wide association studies (EWAS) were performed to test the association between air pollution, weather conditions and site-specific genome-wide methylation levels. In this method, a robust linear regression model, which accounts for potential outliers and heteroscedasticity in the data (Fox and Weisberg 2011), was fitted for each CpG site.

Multiple testing was accounted for by applying a Benjamini and Hochberg False Discovery Rate (FDR) correction to the p-values that were obtained (Benjamini and Hochberg 1995). This correction is predominantly used in EWAS since CpG sites in close proximity are likely to be linked. Bonferroni threshold (threshold at  $1.2 \times 10^{-7}$ ) was also tested for a comparison although this method assumes independence between all CpG sites.

We used the same approach described for repetitive elements analysis by testing (1) the simultaneous effect of weather conditions (temperature and humidity) and (2) the effect with each air pollutant (as a continuous variable, with the same considered exposure windows) adjusting for weather conditions (temperature and humidity). For each exposure windows, we used the following models:

$$(1) Y_{ij} = \beta_0 + f(\beta_1, \text{Temperature}_i) + f(\beta_2, \text{Humidity}_i) + \beta_z^T Z_i + \varepsilon_{ij},$$

$$(2) Y_{ij} = \beta_0 + \beta_1 \text{Pollutant}_i + f(\beta_2, \text{Temperature}_i) + f(\beta_3, \text{Humidity}_i) + \beta_z^T Z_i + \varepsilon_{ij},$$

Where  $Y_{ij}$  is the methylation measurement for the given CpG  $j$  for subject  $i$ ,  $f(\beta_2, Temperature_i)$  is a restricted cubic spline (Harrell FE 2001) for temperature,  $f(\beta_2, Humidity_i)$  is a restricted cubic spline for humidity,  $Z_i$  is the set of covariates and  $\varepsilon_i$  is the random error.

The statistical significance of the exposure was tested at 5% level. All analyses were performed using statistical software R, Version 3.0.1.

## RESULTS

### Descriptive statistics

Table 1 summarizes the characteristics of the study population. On average, the participating mothers were 29 years old, with a pre-pregnancy BMI of 22.9 kg/m<sup>2</sup>. About half of the newborns (52%) were male. The average ( $\pm SD$ ) gestational duration was 40 ( $\pm 2$ ) weeks and 32 pregnancies (5%) had a duration between 28 and 36 gestational weeks. Median air pollution and meteorological whole pregnancy levels varied by season of conception ( $p < 10^{-3}$ ) and study center ( $p < 10^{-3}$ ).

Figure 1 displays the distribution of the environmental exposure levels averaged over several exposure windows. As expected, the longer the exposure window, the less variable the exposures. PM<sub>10</sub> and NO<sub>2</sub> were strongly and positively correlated across exposure windows (correlation ranged from 0.74 to 0.84). Temperature and relative humidity were strongly and negatively correlated by exposure windows (correlation ranged from -0.70 to -0.81). NO<sub>2</sub> was moderately correlated with temperature and relative humidity ( $|r|=0.15$  to 0.60) and PM<sub>10</sub> was weakly correlated with temperature and relative humidity ( $|r|=0.002$  to 0.37), (Supplemental Material, Table S1).

The distribution of average methylation levels by CpG site was bimodal, with a peak around 0.025 and another around 0.925 (Figure 2). Hypomethylated and hypermethylated CpG sites had a weak variability while a higher variability in methylation levels was observed for moderately methylated CpG sites (Supplemental Material, Figure S1).

### **Exposures and global DNA methylation**

We found no statistically significant association of environmental exposures with both of *Alu* and *LINE-1* methylation levels, nor with the overall profile or distribution of CpG measurements across individuals (p-values $\geq$ 0.17, Table 2).

### **Meteorological conditions and genome-wide placental methylation**

We tested in the same model the effect of temperature and relative humidity on CpG sites adjusted for known covariates. The EWAS revealed no significant association after correcting for multiple testing for any exposure windows, whether with FDR or Bonferroni (results not shown).

### **Atmospheric pollutants and genome-wide placental methylation**

We independently tested the effect of each air pollutant adjusted for weather conditions and for known covariates. Using FDR correction, we identified one CpG methylation site (cg13885156 – *ADARB2* gene – Chromosome 10) that was significantly associated with both NO<sub>2</sub> and PM<sub>10</sub> exposures over the first trimester of pregnancy, with a decrease of methylation level ( $\beta=-0.32$ ,  $p=1.04\times 10^{-7}$  and  $\beta=-0.89$ ,  $p=6.21\times 10^{-8}$ , respectively) for a 10 µg/m<sup>3</sup> increase in exposure (Figure 3.A, B; Supplemental Material, Table S2). We also identified one CpG methylation site (cg17580614 – *ADORA2B* gene – Chromosome 17) that was significantly associated with NO<sub>2</sub> exposure over the trimester 2 of pregnancy, with a decrease of methylation level ( $\beta=-0.41$ ,  $p=5.51\times 10^{-8}$ ) for a 10 µg/m<sup>3</sup> increase in exposure (Figure 3.C;

Table 3). No other significant association was found for any of the exposure windows (see supplementary Table S3 – S4 for a list of the CpGs with the lowest p-values). Similar results were found when applying the Bonferroni correction for multiple testing.

## DISCUSSION

To the best of our knowledge, we present here the results of the first genome-wide study analyzing site-specific DNA methylation changes in placenta in relation to in utero exposure to PM<sub>10</sub>, NO<sub>2</sub>, temperature and relative humidity. While no significant association was found with weather conditions (temperature and humidity), we identified two CpGs whose methylation was significantly lower with increased in air pollutants concentrations. Prenatal exposure to PM<sub>10</sub> and NO<sub>2</sub> in the first trimester of pregnancy was associated with a lower methylation at cg13885156, located in the body of *ADARB2* (*Shore (S)*). Exposure to NO<sub>2</sub> in the second trimester of pregnancy was associated with a lower DNA methylation at cg17580614, located in the body of *ADORA2B* (*Island*).

These two genes are protein-coding genes. The expression of *ADORA2B* gene (Adenosine A<sub>2</sub>b Receptor) has already been found associated with hypoxia and pre-eclampsia in pregnant women (Acurio et al. 2014). A genome-wide analysis of the DNA methylation profile, in placentas from pregnancies with severe preeclampsia (PE), reported an aberrant patterns of DNA methylation in preeclampsia which may be involved in the pathophysiology of PE (Jia RZ et al. 2012). In the same way, Darashchonak et al. (2014a, 2014b) suggested that adenosine receptor A<sub>2</sub>B has a role in placental development and possibly in the pathophysiology of PE. In both mice and humans, it has also been suggested that elevated placental adenosine signaling via excessive *ADOAR2B* signaling inducing placental impairment contributes to the pathogenesis of PE, to small fetuses, small placentas and fetal growth restriction (Iriyama et al. 2015). Regarding the *ADARB2* gene, his involvement in

placenta has not been studied to date. However, this gene may play a regulatory role in RNA editing and it has been involved in metabolic disorders in adult such as abdominal circumference, body mass index, serum triglyceride level, and serum adiponectin level (Oguro et al 2012).

There is a growing evidence of the potential involvement of epigenetic mechanisms in the relationships between environmental exposures and adverse health outcomes. However, the previous studies on the effects of air pollution on methylation were mainly focused on adults and little is known about the effect of air pollution or climate conditions on DNA methylation in prenatal life. These previous studies on adults have suggested significant changes in DNA methylation levels after exposure to particulate matters in repetitive elements or in gene specifics (Baccarelli et al. 2009, Madrigano et al. 2011, Bellavia et al. 2013, bind et al. 2014a) and more recently in genome-wide analysis (Panni et al. 2016). Regarding prenatal air pollution exposures, only two studies focused on their effects on global methylation in placenta (Janssen et al. 2013) and on repetitive elements in newborn bloodspots (Breton et al. 2016). Fetal life is crucial period requiring deeper investigations as it is believed to impact the development of the fetus, but also potentially on the longer term the childhood and adulthood disease phenotypes (Konkel 2016). Besides, the placenta is a central organ in the mother-child exchanges throughout pregnancy. It plays an important role to support intrauterine fetal growth by facilitating the transfer of nutrients and oxygen from the mother to the fetus and by removing fetal waste products. Impairment in placental development and function could contribute to diseases in childhood or adulthood.

In our study, we found no significant association between NO<sub>2</sub> and PM<sub>10</sub> pollutants and Alu and LINE1 methylation. Although not comparable because exposure and population were different, in a study on elderly men (n=719), exposure to PM<sub>2.5</sub> for a 7-day moving average was associated with significantly lower LINE1 methylation (Baccarelli et al. 2009). Janssen

et al. 2013, using placenta tissue (n=240), reported that exposure to PM<sub>2.5</sub> over the first trimester was significantly associated with global lower methylation; no association was found over the second and the third trimesters. In the same way, Breton et al. 2016 reported a significant association between prenatal exposure to PM<sub>10</sub> and O<sub>3</sub> in the first trimester and lower DNA methylation in LINE1, although it was measured in newborn bloodspots (n=459) rather than in placenta tissue. These two last findings parallel our own results found with the EWAS approach; we observed a lower placental DNA methylation at specific CpG sites in association with an increase in PM<sub>10</sub> and NO<sub>2</sub> exposure over the first trimester of pregnancy. This is consistent with the Breton's hypothesis which suggests that the first trimester may be the most sensible in utero exposure window in the association between air pollutants and DNA methylation.

Although our study is the first to study the association between air pollution exposure during pregnancy and genome-wide DNA methylation in placenta tissue; a recent study investigated the effect of fine particulate matter air pollution DNA methylation relying on blood samples in adults and elderly men using a EWAS. They reported a significant association between 12 CpG sites and PM concentration (one for 2-day average, one for 7-day and ten for 28-day); among them, 9 sites expressed increased methylation (Panni et al. 2016).

In our study, no significant association was found between temperature and relative humidity exposure during pregnancy and placental DNA methylation. While such associations between prenatal exposures to temperature or relative humidity and placental DNA methylation have not been previously examined, one study investigated the effects of these two exposures on specific genes and repetitive elements methylation in elderly men blood (Bind et al. 2014b). They reported that ambient temperature was associated with genes related to coagulation, inflammation, cortisol, and metabolic pathway and relative humidity was associated with

LINE-1 hypomethylation and Alu hypermethylation. We did not investigate DNA methylation at specific genes.

The strengths were the use of placenta tissue which is easy to collect, non-invasive and may allow a good reproducibility of our study as exposures affecting its development are supposedly more easily fully measured; the possession of a large range of relevant covariates including many health and individual information collected early in pregnancy. In terms of exposure measurement, air pollution exposures were estimated individually relying on home addresses of the women using a dispersion model and meteorological factors. This study has limitations. We did not account for the time activity patterns of the subjects, nor for the indoor versus outdoor exposure.

## **CONCLUSION**

In conclusion, in this epigenome-wide study, we have identified a lower level of placental DNA methylation at very specific loci in association with higher exposure to air pollution in early pregnancy. Whether the observed associations potentially bear long-term consequences on the health of the child (or possibly future generations) remains to be further investigated. Future studies are warranted to confirm the observed associations and their potential to mediate the effect of prenatal exposure to air pollution on fetal development and health pregnancy outcomes.

## REFERENCES

- Acurio J, Troncoso F, Bertoglia P, Salomon C, Aguayo C, Sobrevia L, Escudero C. Biomed Res Int. 2014.
- Baccarelli A, Wright RO, Bollati V, Tarantini L, Litonjua AA, Suh HH, et al. 2009. Rapid DNA Methylation Changes after Exposure to Traffic Particles. Am. J. Respir. Crit. Care Med. 179:572–578.
- Bellavia A, Urch B, Speck M, Brook RD, Scott JA, Albetti B, et al. 2013. DNA Hypomethylation, Ambient Particulate Matter, and Increased Blood Pressure: Findings from Controlled Human Exposure Experiments. J. Am. Heart Assoc. Cardiovasc. Cerebrovasc. Dis. 2.
- Beltran AJ, Wu J, Laurent O. 2014. Associations of Meteorology with Adverse Pregnancy Outcomes: A Systematic Review of Preeclampsia, Preterm Birth and Birth Weight. Int. J. Environ. Res. Public. Health 11:91–172.
- Benjamini Y, Hochberg Y. 1995. Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. J. R. Stat. Soc. Ser. B Methodol. 57: 289–300.
- Bind M-A, Lepeule J, Zanobetti A, Gasparrini A, Baccarelli AA, Coull BA, et al. 2014a. Air pollution and gene-specific methylation in the Normative Aging Study. Epigenetics 9:448–458.
- Bind M-A, Zanobetti A, Gasparrini A, Peters A, Coull B, Baccarelli A, et al. 2014b. Effects of temperature and relative humidity on DNA methylation. Epidemiol. Camb. Mass 25:561–569.
- Bollati V, Baccarelli A. 2010. Environmental Epigenetics. Heredity 105:105–112.
- Breton CV, Salam MT, Wang X, Byun H-M, Siegmund KD, Gilliland FD. 2012. Particulate Matter, DNA Methylation in Nitric Oxide Synthase, and Childhood Respiratory Disease. Environ. Health Perspect. 120:1320–1326.
- Breton CV, Yao J, Millstein J, Gao L, Siegmund KD, Mack W, et al. 2016. Prenatal Air Pollution Exposures, DNA Methyl Transferase Genotypes, and Associations with Newborn LINE1 and Alu Methylation and Childhood Blood Pressure and Carotid Intima-Media Thickness in the Children’s Health Study. Environ. Health Perspect.
- Chen Y, Lemire M, Choufani S, Butcher DT, Grafodatskaya D, Zanke BW, et al. 2013. Discovery of cross-reactive probes and polymorphic CpGs in the Illumina Infinium HumanMethylation450 microarray. Epigenetics 8:203–209.
- Darashchonak N, Koepsell B, Bogdanova N, von Versen-Höynck F. BMC Pregnancy Childbirth. 2014 Jan 3; 14:2.

- Darashchonak N, Sarisin A, Kleppa MJ, Powers RW, von Versen-Höynck F. Placenta. 2014 Sep; 35(9):763-71. doi: 10.1016/j.placenta.2014.06.369. Epub 2014 Jun 26.
- Du P, Kibbe WA, Lin SM. 2008. lumi: a pipeline for processing Illumina microarray. Bioinforma. Oxf. Engl. 24:1547–1548; doi:10.1093/bioinformatics/btn224.
- Escudero C, Celis C, Saez T, San Martin S, Valenzuela FJ, Aguayo C, Bertoglia P, Roberts JM, Acurio J. Placenta. 2014 Mar; 35(3):207-15. doi: 10.1016/j.placenta.2014.01.007. Epub 2014 Jan 29.
- Foley DL, Craig JM, Morley R, Olsson CA, Olsson CJ, Dwyer T, et al. 2009. Prospects for epigenetic epidemiology. Am. J. Epidemiol. 169:389–400; doi:10.1093/aje/kwn380.
- Fox J, Weisberg S. 2011. Robust regression in R. In An R Companion to Applied Regression, Thousand Oaks, CA:Sage.
- Harrell FE. 2001. Regression modeling strategies: with applications to linear models, logistic regression, and survival analysis. New York: Springer.
- Heude B, Forhan A, Slama R, Douhaud L, Bedel S, Saurel-Cubizolles M-J, et al. 2015. Cohort Profile: The EDEN mother-child cohort on the prenatal and early postnatal determinants of child health and development. Int. J. Epidemiol.
- Hou L, Zhang X, Wang D, Baccarelli A. 2012. Environmental chemical exposures and human epigenetics. Int. J. Epidemiol. 41:79–105.
- Iriyama T, Sun K, Parchim NF, Li J, Zhao C, Song A, Hart LA, Blackwell SC, Sibai BM, Chan LN, Chan TS, Hicks MJ, Blackburn MR, Kellems RE, Xia Y. Circulation. 2015 Feb 24; 131(8):730-41. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.114.013740. Epub 2014 Dec 23.
- Janssen BG, Godderis L, Pieters N, Poels K, Kiciński M, Cuypers A, et al. 2013. Placental DNA hypomethylation in association with particulate air pollution in early life. Part Fibre Toxicol 10: 1–11.
- Jia RZ, Zhang X, Hu P, Liu XM, Hua XD, Wang X, Ding HJ. Int J Mol Med. 2012 Jul; 30(1):133-41. doi: 10.3892/ijmm.2012.983. Epub 2012 Apr 25.
- Jirtle RL, Skinner MK. 2007. Environmental epigenomics and disease susceptibility. Nat. Rev. Genet. 8:253–262.
- Konkel L. 2016. Lasting Impact of an Ephemeral Organ: The Role of the Placenta in Fetal Programming. Environ. Health Perspect. 124.
- Koukoura O, SIFAKIS S, SPANDIDOS DA. 2012. DNA methylation in the human placenta and fetal growth (Review). Mol. Med. Rep. 5:883–889.
- Kramer MS. 2003. The Epidemiology of Adverse Pregnancy Outcomes: An Overview. J. Nutr. 133: 1592S–1596S.

- Madrigano J, Baccarelli A, Mittleman MA, Wright RO, Sparrow D, Vokonas PS, et al. 2011. Prolonged exposure to particulate pollution, genes associated with glutathione pathways, and DNA methylation in a cohort of older men. *Environ. Health Perspect.* 119:977–982.
- Oguro R, Kamide K, Katsuya T, Akasaka H, Sugimoto K, Congrains A, Arai Y, Hirose N, Saitoh S, Ohishi M, Miura T, Rakugi H. A single nucleotide polymorphism of the adenosine deaminase, RNA-specific gene is associated with the serum triglyceride level, abdominal circumference, and serum adiponectin concentration. *Exp Gerontol.* 2012 Feb; 47(2):183-7.
- Panni T, Mehta AJ, Schwartz JD, Baccarelli AA, Just AC, Wolf K, et al. 2016. A Genome-Wide Analysis of DNA Methylation and Fine Particulate Matter Air Pollution in Three Study Populations: KORA F3, KORA F4, and the Normative Aging Study. *Environ. Health Perspect.*
- Price EM, Cotton AM, Lam LL, Farré P, Embery E, Brown CJ, et al. 2013. Additional annotation enhances potential for biologically-relevant analysis of the Illumina Infinium HumanMethylation450 BeadChip array. *Epigenetics Chromatin* 6:4.
- Sellier Y, Galineau J, Hulin A, Caini F, Marquis N, Navel V, et al. 2014. Health effects of ambient air pollution: do different methods for estimating exposure lead to different results? *Environ. Int.* 66:165–173.
- Shah PS, Balkhair T, Knowledge Synthesis Group on Determinants of Preterm/LBW births. 2011. Air pollution and birth outcomes: a systematic review. *Environ. Int.* 37:498–516.
- Stieb DM, Chen L, Eshoul M, Judek S. 2012. Ambient air pollution, birth weight and preterm birth: a systematic review and meta-analysis. *Environ. Res.* 117:100–111.
- Strand LB, Barnett AG, Tong S. 2012. Maternal exposure to ambient temperature and the risks of preterm birth and stillbirth in Brisbane, Australia. *Am. J. Epidemiol.* 175:99–107.
- Strand LB, Barnett AG, Tong S. 2011. The influence of season and ambient temperature on birth outcomes: A review of the epidemiological literature. *Environ. Res.* 111:451–462.
- Touleimat N, Tost J. 2012. Complete pipeline for Infinium® Human Methylation 450K BeadChip data processing using subset quantile normalization for accurate DNA methylation estimation. *Epigenomics* 4:325–341.
- van den Hooven EH, Pierik FH, de Kluizenaar Y, Willemsen SP, Hofman A, van Ratingen SW, et al. 2012. Air pollution exposure during pregnancy, ultrasound measures of fetal growth, and adverse birth outcomes: a prospective cohort study. *Environ. Health Perspect.* 120:150–156.

- Waterland RA, Michels KB. 2007. Epigenetic epidemiology of the developmental origins hypothesis. *Annu. Rev. Nutr.* 27:363–388.
- Yang AS, Estécio MRH, Doshi K, Kondo Y, Tajara EH, Issa J-PJ. 2004. A simple method for estimating global DNA methylation using bisulfite PCR of repetitive DNA elements. *Nucleic Acids Res.* 32:e38.
- Zhao N, Bell DA, Maity A, Staicu A-M, Joubert BR, London SJ, et al. 2015. Global Analysis of Methylation Profiles From High Resolution CpG Data. *Genet. Epidemiol.* 39:53–64.



**Table 1.** Characteristics of the covariates in the EDEN study population (n=668), and median air pollution and meteorological exposure over the whole pregnancy period per class of categorical covariates.

<b>Characteristics</b>	<b>mean±SD</b>	<b>N (%)</b>	<b>Median individual exposure averaged over the whole pregnancy</b>			
			<b>All</b>	<b>T<sup>a</sup></b>	<b>RH<sup>b</sup></b>	<b>NO<sub>2</sub><sup>c</sup></b>
<b>Center</b>						
Poitiers		287 (43)	12.20	77.26	12.19	15.64
Nancy		380 (57)	9.80	77.21	23.42	23.36
<b>Sex of offspring</b>						
Male		349 (52)	10.64	77.43	17.13	20.62
Female		318 (48)	11.13	76.80	17.43	21.51
<b>Parity</b>						
0		301 (45)	11.26	77.27	16.96	20.74
1		252 (38)	10.49	77.41	17.29	21.24
≥2		114 (17)	10.98	76.83	17.43	21.17
<b>Maternal education (year)</b>						
≤18		131 (20)	10.81	77.23	17.40	20.62
19-20		114 (17)	11.15	77.48	15.78	17.52
21-22		152 (23)	10.95	77.08	16.83	21.19
23-24		144 (22)	10.99	76.75	18.23	21.25
≥25		126 (19)	10.70	77.81	18.83	21.38
<b>Season of conception</b>						
January – March		143 (21)	13.54	73.84	14.59	17.14
April – June		153 (23)	12.26	77.34	18.62	21.65
July – September		188 (28)	8.67	80.12	19.35	21.98
October – December		183 (27)	10.10	76.71	16.87	20.47
<b>BMI<sup>e</sup> (kg/cm<sup>2</sup>)</b>	22.9±4.2		-	-	-	-
<b>Maternal age (year)</b>	28.9±5.1		-	-	-	-
<b>Maternal smoking*</b>	1.7±3.5		-	-	-	-
<b>Gestational duration (weeks)</b>	39.8±1.7		-	-	-	-

<sup>a</sup> T= Temperature

<sup>b</sup> RH= Relative humidity

<sup>c</sup> NO<sub>2</sub>= Nitrogen dioxide

<sup>d</sup> PM<sub>10</sub>= Particulate matter smaller than 10 μm

<sup>e</sup> BMI= prepregnancy Body Mass Index

\*Number of cigarette per day during pregnancy

**Table 2.** Results of global methylation association with prenatal exposure to NO<sub>2</sub>, PM<sub>10</sub>, Temperature and relative humidity, with repetitive elements (Alu and LINE-1) analysis and GAMP analysis.

	Alu*		LINE-1*		GAMP – p-value	
	$\beta$ (se)	p	$\beta$ (se)	p	TestCDFs <sup>1</sup>	Densities <sup>2</sup>
<b>NO<sub>2</sub></b>						
Whole pregnancy	0.02 (0.05)	0.73	-0.06 (0.13)	0.64	1	0.534
Trimester 1	0.02 (0.04)	0.72	-0.01 (0.13)	0.96	1	0.430
Trimester 2	0.02 (0.05)	0.63	-0.08 (0.12)	0.54	0.966	0.349
Trimester 3	0.01 (0.04)	0.85	-0.08 (0.13)	0.52	1	1
Month before birth	-0.02 (0.04)	0.72	-0.07 (0.12)	0.56	1	1
Week before birth	-0.04 (0.03)	0.17	-0.10 (0.10)	0.29	0.641	0.766
<b>PM<sub>10</sub></b>						
Whole pregnancy	0.03 (0.15)	0.84	-0.35 (0.41)	0.39	0.530	0.385
Trimester 1	-0.01 (0.12)	0.90	-0.12 (0.36)	0.73	0.341	0.330
Trimester 2	0.13 (0.11)	0.24	-0.30 (0.31)	0.34	0.587	0.522
Trimester 3	-0.05 (0.11)	0.63	-0.16 (0.30)	0.59	0.1	1
Month before birth	-0.02 (0.09)	0.81	0.15 (0.23)	0.51	1	0.637
Week before birth	-0.04 (0.05)	0.47	-0.03 (0.14)	0.83	0.817	0.729
<b>Temperature</b>						
Whole pregnancy	-0.03 (0.33)	0.92	0.001 (0.83)	0.99	0.996	1
Trimester 1	-0.12 (0.15)	0.43	-0.20 (0.39)	0.61	0.929	0.213
Trimester 2	0.05 (0.15)	0.76	0.02 (0.38)	0.95	0.937	0.583
Trimester 3	0.02 (0.13)	0.90	0.02 (0.39)	0.96	0.699	0.070
Month before birth	-0.04 (0.11)	0.66	0.11 (0.30)	0.72	1	0.333
Week before birth	-0.03 (0.08)	0.74	0.07 (0.22)	0.73	0.824	0.620
<b>Relative humidity</b>						
Whole pregnancy	-0.01 (0.17)	0.95	0.20 (0.44)	0.65	0.386	0.307
Trimester 1	-0.04 (0.09)	0.61	0.04 (0.23)	0.85	0.295	0.078
Trimester 2	-0.02 (0.10)	0.89	0.37 (0.27)	0.17	0.360	0.242
Trimester 3	0.03 (0.09)	0.77	-0.25 (0.26)	0.32	0.451	0.290
Month before birth	0.04 (0.06)	0.51	-0.08 (0.19)	0.67	0.930	1
Week before birth	0.03 (0.04)	0.43	0.06 (0.13)	0.64	1	0.885

<sup>1</sup>-Tests whether the CDFs of the observed methylation distributions for each individual are associated with an exposure variable.

<sup>2</sup>-Tests whether the densities of the observed methylation distributions for each individual are associated with an exposure variable.

\* Models were adjusted for child sex, maternal parity, age at end of education, body mass index, age, smoking during pregnancy, season of conception, study center, and gestational duration. We additionally adjusted for technical factors of the methylation measurements: batch, plate and chip.

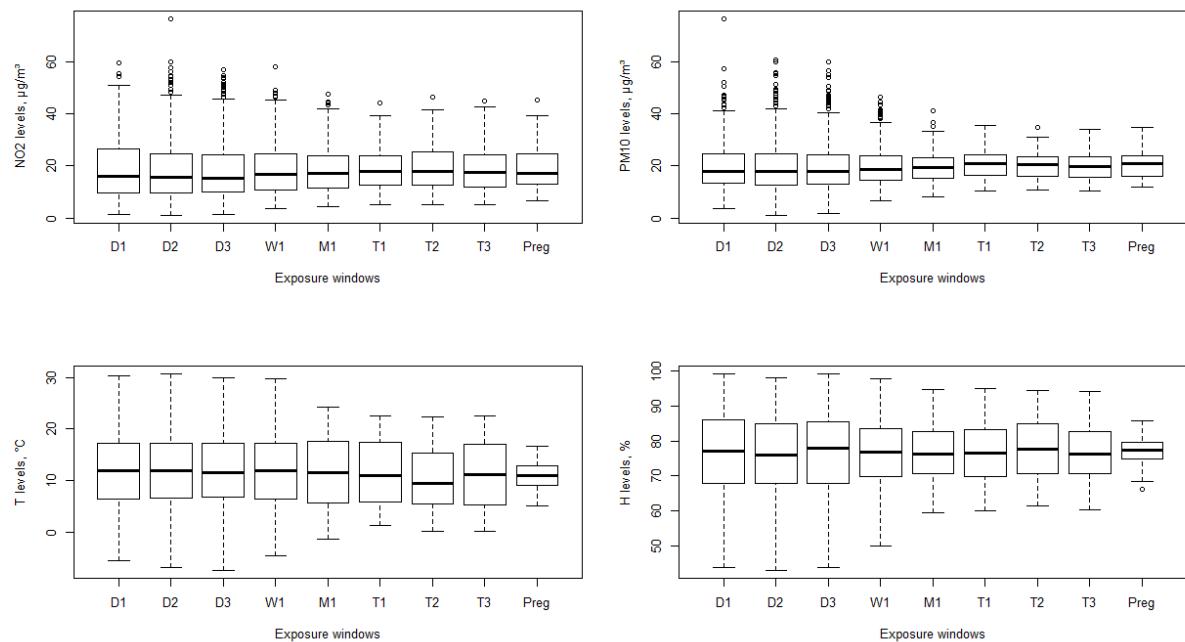
**Table 3.** Differentially methylated CpG sites associated with the *ADORA2B* gene (chromosome 17) in relation to NO<sub>2</sub> exposure over the second trimester (n=668 pregnant women from EDEN cohort).

UCSC Reference Gene Group	Location	Name	Mean methylation % (SD)	Regression β <sup>a</sup>	p-value <sup>b</sup>	FDR <sup>c</sup>
TSS200	Island	cg00443276	15.2 (19.5)	-0.012	0.026	0.720
		cg03729431	15.1 (19.8)	-0.018	0.029	0.728
TSS200	Island	cg05916671	18.9 (23.8)	-0.023	0.030	0.730
TSS200	Island	cg06960824	19.5 (25.9)	-0.018	0.037	0.741
Body	Shore (S)	cg07563400	34.3 (12.5)	-0.044	4.04x10 <sup>-7</sup>	0.068
1stExon	Island	cg07651906	21.5 (17.3)	-0.033	0.009	0.656
TSS1500	Shore (N)	cg07677850	85.1 (05.5)	-0.002	0.503	0.944
Body		cg08008254	95.8 (01.0)	2.65x10 <sup>-4</sup>	0.663	0.967
Body		cg08826152	36.9 (08.1)	0.006	0.265	0.887
TSS1500	Shore (N)	cg10235170	65.0 (08.7)	0.002	0.676	0.969
<b>Body</b>	<b>Island</b>	<b>cg17580614</b>	58.6 (13.8)	<b>-0.041</b>	<b>5.51x10<sup>-8</sup></b>	<b>0.023</b>
3'UTR		cg17716037	95.2 (01.5)	-5.48x10 <sup>-4</sup>	0.531	0.948
TSS1500	Island	cg19245381	24.6 (17.6)	-0.023	0.091	0.802
		cg20504533	18.4 (24.3)	-0.015	0.036	0.740
TSS200	Island	cg20959872	14.8 (17.9)	-0.011	0.041	0.748
Body		cg21501163	94.0 (01.5)	-7.50x10 <sup>-4</sup>	0.471	0.938
TSS200	Island	cg22087450	19.8 (23.6)	-0.013	0.064	0.778
Body	Shelf (S)	cg23353570	79.6 (07.0)	0.002	0.527	0.947
TSS200	Island	cg23694114	17.5 (24.4)	-0.013	0.033	0.736

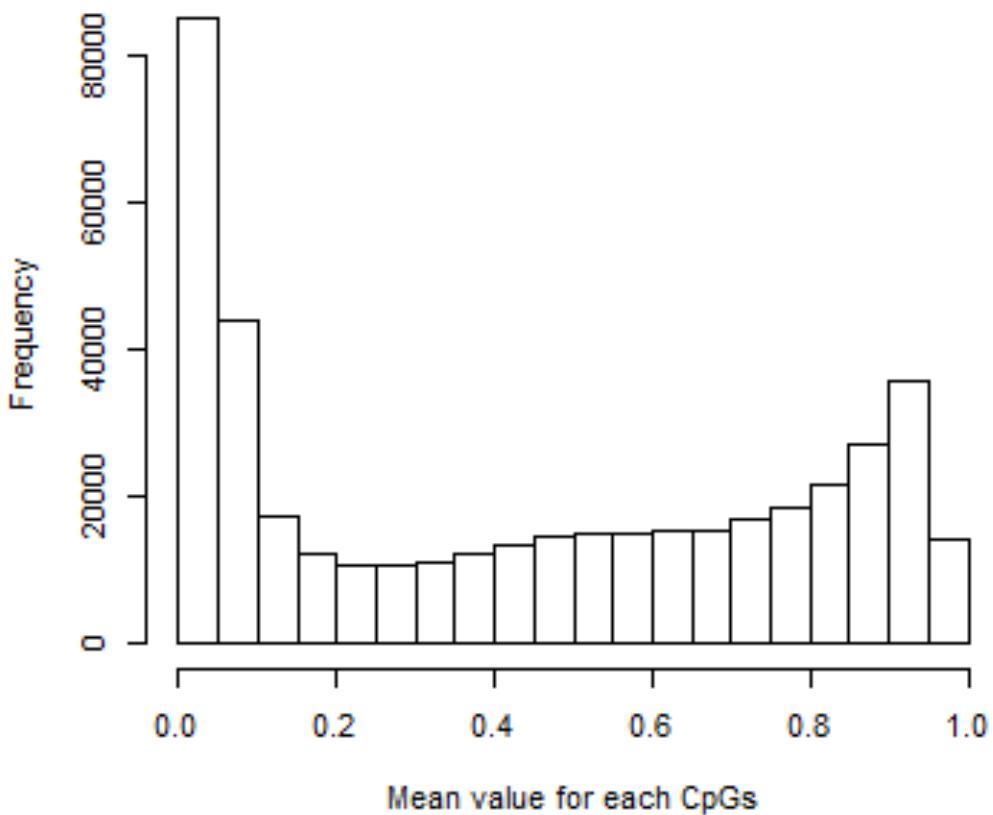
<sup>a</sup> Estimated difference in methylation for a 10 µg/m<sup>3</sup> increase adjusted for child sex, parity, maternal age at end of education, season of conception, study center, maternal body mass index (kg/cm<sup>2</sup>), maternal age (years), maternal smoking during pregnancy (daily average number of cigarettes) and gestational duration (weeks); batch, plate and chip.

<sup>b</sup> P-values, Bonferroni significance level at 1.2x10<sup>-7</sup>.

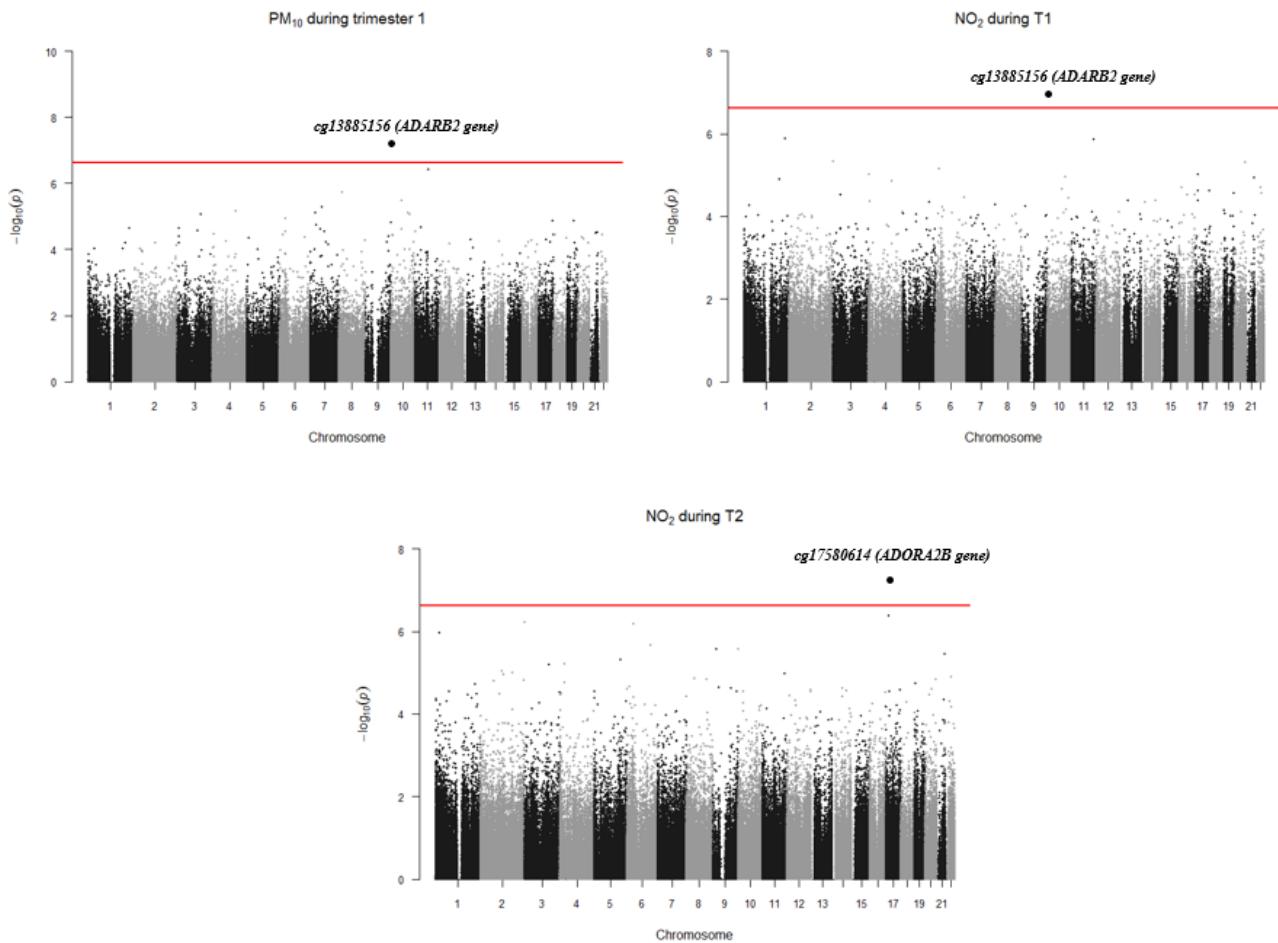
<sup>c</sup> FDR: False discovery Rate with Benjamini-Hochberg method, significance level at 0.05, (correction for the 426,049 tests).

**FIGURES**


**Figure 1.** Boxplots of individual exposure average over several exposure windows for the environmental exposures NO<sub>2</sub> (A), PM<sub>10</sub> (B), temperature (C) and relative humidity (D). (D1, 2, 3 = Day 1, 2, 3 before delivery; W1 = Week before delivery; M1 = Month before delivery; T1, 2, 3 = Trimester 1, 2, 3 and Preg =whole pregnancy).



**Figure 2.** Histograms of DNA methylation levels in our data averaged per CpG site.



**Figure 3.** Manhattan plots of p-values obtained by performing an EWAS for which we identified significant CpG sites: PM<sub>10</sub> (A) and NO<sub>2</sub> (B) over the first trimester, NO<sub>2</sub> over the second trimester of pregnancy (C). Dots correspond to p-values for each of the CpG methylation sites ( $n=426,049$  CpG sites assessed on  $n=668$  women). Red lines correspond to the FDR threshold.



## **SUPPLEMENTAL MATERIAL**

# **Impact of pregnancy exposure to atmospheric pollution and meteorological conditions on placental DNA methylation: an epigenome-wide association study**

Abraham Emilie, Agier Lydiane, Giorgis-Allemand Lise, Tost Jörg, Galineau Julien, Hulin Agnès, Siroux Valérie, Vaiman Daniel, Charles Marie-Aline, Heude Barbara, Forhan Anne, Schwartz Joel, Chuffart Florent, Khochbin Saadi, Rousseaux Sophie, Slama Rémy, Lepeule Johanna.

### **Table of contents**

**Table S1.** Spearman correlation for air pollution and weather variables (n=668).

**Figure S1.** Distribution of level methylation according to the mean and the standard deviation.

**Table S2.** CpG sites differentially methylated in placenta located in *ADARB2* gene (chromosome 17) in relation to PM<sub>10</sub> and NO<sub>2</sub> exposure over the first trimester (n=668).

**Table S3.** Top 20 CpGs from the epigenome-wide analysis of the association between prenatal PM<sub>10</sub> exposure and placental DNA methylation (n=668 pregnant women from EDEN cohort).

**Table S4.** Top 20 CpGs from the epigenome-wide analysis of the association between prenatal NO<sub>2</sub> exposure and placental DNA methylation (n=668 pregnant women from EDEN cohort).

Table S1. Spearman correlation for air pollution and weather variables (n=668).

	NO2 P	NO2 T1	NO2 T2	NO2 T3	PM10 P	PM10 T1	PM10 T2	PM10 T3	T - P	T - T1	T - T2	T - T3	H - P	H - T1	H - T2	H - T3
<b>NO2 P</b>	1	0,863	0,957	0,861	0,836	0,781	0,808	0,783	-0,433	0,094	-0,342	-0,285	<b>0,154</b>	-0,090	0,241	0,034
<b>NO2 T1</b>		1	0,768	0,538	0,737	0,740	0,718	0,624	-0,376	-0,365	-0,246	0,191	-0,062	<b>0,248</b>	-0,065	-0,337
<b>NO2 T2</b>			1	0,791	0,775	0,701	0,789	0,704	-0,595	0,176	-0,546	-0,372	0,338	-0,047	<b>0,436</b>	0,016
<b>NO2 T3</b>				1	0,734	0,654	0,657	0,783	-0,157	0,461	-0,101	-0,598	0,121	-0,471	0,270	<b>0,443</b>
<b>PM10 P</b>					1	0,961	0,941	0,937	-0,365	0,040	-0,234	-0,250	-0,064	-0,185	0,095	0,010
<b>PM10 T1</b>						1	0,854	0,868	-0,301	<b>0,002</b>	-0,183	-0,179	-0,149	-0,208	0,043	-0,021
<b>PM10 T2</b>							1	0,811	-0,422	-0,018	-0,286	-0,208	0,001	-0,053	<b>0,076</b>	-0,039
<b>PM10 T3</b>								1	-0,309	0,140	-0,193	-0,334	-0,033	-0,277	0,157	<b>0,101</b>
<b>T - P</b>									1	0,092	<b>0,941</b>	0,163	-0,700	-0,416	-0,675	0,351
<b>T - T1</b>										1	-0,064	<b>-0,924</b>	0,297	-0,814	0,545	0,814
<b>T - T2</b>											1	0,217	-0,731	-0,334	-0,779	0,306
<b>T - T3</b>												1	-0,454	0,716	-0,646	-0,788
<b>H - P</b>													1	0,222	<b>0,829</b>	0,170
<b>H - T1</b>														1	-0,150	<b>-0,764</b>
<b>H - T2</b>															1	0,192
<b>H - T3</b>																1

In yellow are the ones jointly included in the regression models.

P=entire pregnancy

T1, T2, T3=Trimester 1, 2, 3

T=Temperature and H=Relative humidity

Figure S1. Distribution of level methylation (beta values) according to the mean ( $M$ ) and the standard deviation (SD).

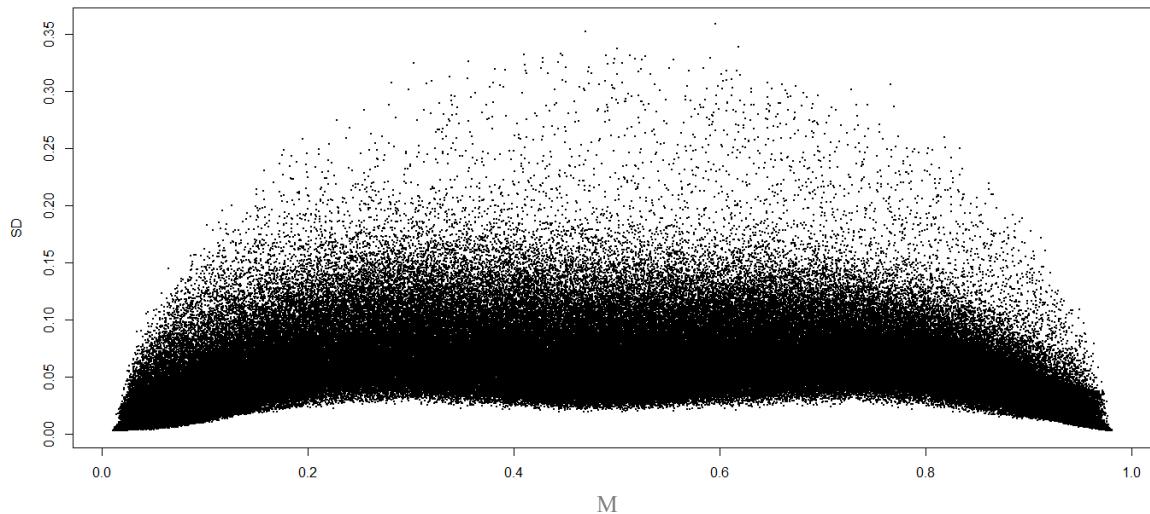


Table S2. Placental CpG sites differentially methylated located in *ADARB2* gene (chromosome 10) in relation to PM<sub>10</sub> and NO<sub>2</sub> exposure over the first trimester (n=668 pregnant women from Eden Cohort).

UCSC Reference Gene Group	Location	Name	Mean methylation % (SD)	PM <sub>10</sub>			NO <sub>2</sub>		
				β <sup>a</sup>	p-value <sup>b</sup>	FDR <sup>c</sup>	β <sup>a</sup>	p-value <sup>b</sup>	FDR <sup>c</sup>
Body		cg00075956	43.69 (8.53)	6.81E-02	6.63E-01	0.9999	2.69E-02	6.56E-01	0.9813
Body		cg00363080	48.04 (15.67)	-1.58E-01	6.17E-01	0.9999	-7.25E-02	4.87E-01	0.9681
		cg00467420	42 (11.03)	-2.51E-01	2.39E-01	0.9999	-7.04E-02	3.53E-01	0.9527
Body		cg00513169	48 (8.26)	-3.20E-02	8.16E-01	0.9999	-2.26E-02	6.59E-01	0.9817
Body		cg00525288	65.42 (13.81)	-3.03E-01	2.58E-01	0.9999	-1.70E-01	9.68E-02	0.8939
Body		cg00525508	85.15 (8.39)	-2.42E-01	1.30E-01	0.9922	-6.02E-02	3.24E-01	0.9488
Body	Shore (N)	cg00615654	76.51 (10.25)	-8.92E-02	6.42E-01	0.9999	-2.03E-02	7.78E-01	0.9889
Body		cg00972313	60.87 (10.59)	-4.13E-01	4.43E-02	0.9569	-1.43E-01	3.92E-02	0.8536
Body		cg01277072	66.14 (10.16)	-8.30E-02	6.50E-01	0.9999	-9.45E-03	8.90E-01	0.9949
Body		cg01341216	78.09 (11.32)	2.96E-01	1.29E-01	0.9920	1.08E-01	1.58E-01	0.9156
Body	Shore (S)	cg01364755	48.22 (16.9)	-2.08E-01	4.75E-01	0.9999	7.61E-02	4.92E-01	0.9688
Body	Island	cg01561194	6.92 (0.98)	1.67E-02	3.39E-01	0.9999	1.77E-03	7.92E-01	0.9898
3'UTR	Shore (N)	cg02027800	61.74 (12.08)	-6.07E-02	8.05E-01	0.9999	-5.13E-02	5.72E-01	0.9758
Body		cg02059512	46.76 (4.97)	3.83E-03	9.63E-01	0.9999	5.17E-03	8.67E-01	0.9940
Body	Shelf (S)	cg02069524	57.14 (7.83)	1.69E-01	2.28E-01	0.9999	2.94E-02	5.97E-01	0.9773
Body		cg02088470	89.3 (6.7)	-1.36E-01	9.70E-02	0.9807	-4.95E-02	1.22E-01	0.9040
Body	Shelf (S)	cg02204442	46.34 (6.56)	1.48E-01	1.77E-01	0.9984	3.81E-02	3.46E-01	0.9510
Body	Island	cg02224138	25.67 (6.51)	-1.01E-01	4.06E-01	0.9999	8.65E-03	8.44E-01	0.9929
TSS1500	Island	cg02270183	3.6 (2.49)	1.67E-02	4.49E-01	0.9999	1.61E-03	8.24E-01	0.9922
Body		cg02380151	53.15 (6.19)	-4.82E-02	6.29E-01	0.9999	-4.86E-02	2.17E-01	0.9290
Body		cg02445968	31.47 (5.95)	5.10E-02	6.14E-01	0.9999	4.17E-02	2.84E-01	0.9435
Body		cg02560863	49.69 (9.31)	-2.46E-01	1.89E-01	0.9984	3.36E-02	6.05E-01	0.9778
TSS1500	Shore (S)	cg02609848	9.59 (6.58)	-1.12E-01	1.70E-01	0.9984	-4.41E-02	1.38E-01	0.9098
Body	Shelf (S)	cg02697989	39.76 (3.75)	4.58E-03	9.42E-01	0.9999	-6.45E-03	7.95E-01	0.9900
Body		cg02726524	92.89 (3.8)	3.68E-03	9.34E-01	0.9999	6.12E-03	6.85E-01	0.9834
Body		cg02851212	82.23 (7.36)	-9.54E-02	4.85E-01	0.9999	-1.35E-02	7.79E-01	0.9889
Body		cg02887530	11.92 (3.62)	9.10E-03	8.93E-01	0.9999	7.07E-03	7.66E-01	0.9882
TSS200	Island	cg02899206	9.35 (6.2)	9.33E-03	8.62E-01	0.9999	-4.05E-03	8.50E-01	0.9933
Body		cg02924954	52.2 (4.15)	5.85E-02	4.59E-01	0.9999	1.13E-02	6.94E-01	0.9841
Body		cg03079937	76.08 (11.97)	-1.23E-01	5.60E-01	0.9999	-1.08E-01	1.75E-01	0.9188
Body		cg03152899	54.69 (7.34)	8.72E-02	5.32E-01	0.9999	-5.68E-02	2.78E-01	0.9425
Body	Island	cg03183215	45.73 (5.59)	7.86E-02	4.66E-01	0.9999	4.84E-03	9.03E-01	0.9958
Body		cg03213833	70.22 (10.14)	-6.30E-02	7.47E-01	0.9999	-1.65E-02	8.26E-01	0.9923
Body		cg03277925	53.4 (9.5)	-3.61E-02	8.25E-01	0.9999	1.89E-02	7.56E-01	0.9880
TSS200	Island	cg03410436	15.03 (7.29)	-7.42E-02	4.73E-01	0.9999	-4.71E-02	1.82E-01	0.9206
Body		cg03462714	58.09 (13.68)	-2.82E-01	2.63E-01	0.9999	-9.47E-02	3.08E-01	0.9471
Body		cg03480068	34.71 (9.08)	-6.43E-02	7.16E-01	0.9999	-6.54E-02	3.03E-01	0.9468
Body		cg03678558	62.77 (12.41)	1.04E-01	6.70E-01	0.9999	1.85E-02	8.44E-01	0.9929
Body		cg03717931	62.49 (10.88)	2.38E-01	1.92E-01	0.9989	5.24E-02	4.62E-01	0.9657
Body	Shelf (N)	cg03754605	60.84 (9.43)	-8.19E-02	6.42E-01	0.9999	-1.39E-01	4.26E-02	0.8554
Body	Shelf (S)	cg04009446	83.52 (9.34)	-1.52E-01	3.68E-01	0.9999	-1.18E-01	6.44E-02	0.8718
Body		cg04012681	11.14 (3.3)	-4.74E-03	9.38E-01	0.9999	-1.89E-02	3.93E-01	0.9579
Body	Shelf (N)	cg04089420	28.03 (8.06)	-3.17E-01	8.58E-03	0.8811	-7.34E-02	1.05E-01	0.8971
Body	Shelf (S)	cg04245026	40.45 (8.46)	-1.62E-01	2.63E-01	0.9999	-1.07E-01	5.71E-02	0.8672

### Chapitre III : Partie A - Approche agnostique

Body	Shore (S)	cg04271617	31.4 (7.73)	-1.22E-01	4.20E-01	0.9999	-6.44E-02	2.62E-01	0.9384
Body		cg04278975	48.54 (7.62)	-1.05E-01	4.64E-01	0.9999	1.54E-02	7.61E-01	0.9881
Body		cg04344021	52.46 (4.45)	-1.50E-02	8.39E-01	0.9999	-1.41E-02	6.19E-01	0.9787
Body		cg04401038	12.4 (9.34)	-1.64E-01	2.27E-01	0.9999	-5.37E-02	3.08E-01	0.9471
Body		cg04513549	19.13 (6.94)	2.27E-02	8.66E-01	0.9999	2.28E-03	9.65E-01	0.9986
Body	Shelf (S)	cg04525441	59.61 (12.16)	-3.12E-01	1.11E-01	0.9857	-6.04E-02	4.20E-01	0.9610
Body	Shelf (S)	cg04636331	73.18 (12.67)	-4.02E-01	1.09E-01	0.9851	-1.18E-01	2.34E-01	0.9333
Body		cg04724406	48.13 (6.5)	-1.14E-03	9.93E-01	0.9999	-1.34E-02	7.58E-01	0.9881
Body		cg04855826	65.25 (8.44)	1.17E-01	4.63E-01	0.9999	-1.06E-02	8.60E-01	0.9936
Body		cg04887078	71.28 (7.57)	-1.73E-01	2.34E-01	0.9999	-8.90E-02	9.11E-02	0.8920
Body		cg04910505	84.57 (10.13)	-1.75E-01	2.98E-01	0.9999	-7.13E-02	2.18E-01	0.9293
Body		cg04930661	29.72 (9.23)	2.42E-01	2.03E-01	0.9999	1.17E-01	1.01E-01	0.8955
Body		cg04941831	49.48 (6.89)	9.06E-02	4.54E-01	0.9999	-1.97E-02	6.50E-01	0.9809
Body	Island	cg04976075	22.76 (5.07)	-1.95E-02	8.54E-01	0.9999	-3.85E-03	9.21E-01	0.9965
Body		cg04992974	70.18 (15.66)	6.37E-01	3.42E-02	0.9464	1.66E-01	1.31E-01	0.9070
Body		cg05043025	40.16 (10.52)	1.35E-01	4.76E-01	0.9999	4.51E-02	4.98E-01	0.9696
Body	Shore (S)	cg05230927	64.42 (8.92)	1.43E-01	3.98E-01	0.9999	8.69E-02	1.49E-01	0.9137
Body		cg05248655	46.54 (9.82)	-2.49E-01	1.46E-01	0.9970	6.42E-03	9.29E-01	0.9970
Body	Shore (S)	cg05289540	40.16 (8.14)	-5.13E-02	6.94E-01	0.9999	-3.48E-03	9.50E-01	0.9978
		cg05307923	11.59 (5.43)	-5.45E-02	4.27E-01	0.9999	-4.93E-03	8.45E-01	0.9929
Body		cg05407757	72.15 (14.68)	1.79E-01	5.44E-01	0.9999	3.92E-02	7.11E-01	0.9850
Body		cg05431532	39.32 (5.59)	9.76E-02	3.49E-01	0.9999	1.93E-02	6.05E-01	0.9778
Body	Shore (N)	cg05441518	52 (13.15)	-1.26E-01	6.04E-01	0.9999	-3.24E-02	7.23E-01	0.9857
Body	Shore (S)	cg05483559	51.59 (6.94)	-2.44E-01	3.03E-02	0.9389	-9.61E-02	3.01E-02	0.8424
Body		cg05506270	45.49 (10.14)	-2.80E-02	8.72E-01	0.9999	-3.93E-02	5.90E-01	0.9767
Body		cg05541367	63.28 (8.13)	-1.58E-01	2.12E-01	0.9999	1.63E-02	7.44E-01	0.9871
Body		cg05570367	85.94 (9.03)	1.15E-02	9.50E-01	0.9999	-3.99E-02	5.16E-01	0.9711
Body	Island	cg05595753	48.11 (5.51)	-2.48E-02	7.91E-01	0.9999	-3.50E-02	2.95E-01	0.9455
Body	Island	cg05630272	9.03 (3.73)	-7.17E-02	1.62E-01	0.9983	-1.36E-02	4.75E-01	0.9670
Body		cg05721751	83.52 (10.34)	-1.40E-01	4.91E-01	0.9999	-9.09E-02	1.96E-01	0.9229
Body		cg05750078	68.9 (10)	-1.04E-01	6.14E-01	0.9999	-5.21E-02	4.68E-01	0.9661
Body		cg05810886	38.78 (6.99)	-5.40E-03	9.69E-01	0.9999	-2.31E-02	6.38E-01	0.9802
Body		cg05818501	31.5 (16.64)	8.99E-01	2.40E-03	0.8205	2.74E-01	1.34E-02	0.8082
Body		cg06028247	63.85 (13.04)	-1.64E-01	5.03E-01	0.9999	-8.08E-02	3.50E-01	0.9519
Body		cg06083652	35.02 (4.65)	-2.40E-02	7.83E-01	0.9999	2.24E-04	9.94E-01	0.9998
Body	Shore (N)	cg06182978	65.9 (12.52)	3.06E-01	1.96E-01	0.9994	9.21E-02	3.09E-01	0.9472
Body	Island	cg06328674	86.17 (6.64)	-1.35E-01	1.99E-01	0.9999	-5.63E-02	1.48E-01	0.9137
Body	Shore (N)	cg06385202	22.64 (6.21)	-8.04E-02	5.09E-01	0.9999	-2.71E-02	5.69E-01	0.9756
Body		cg06403156	42.5 (12.97)	1.30E-01	5.74E-01	0.9999	-3.10E-02	7.50E-01	0.9873
Body		cg06422309	22.69 (5.69)	-1.31E-01	2.14E-01	0.9999	-4.21E-02	2.67E-01	0.9394
Body	Shore (S)	cg06563471	37.3 (6.28)	1.74E-02	8.72E-01	0.9999	-5.06E-03	9.04E-01	0.9959
TSS200	Island	cg06730723	13.71 (5.57)	1.56E-02	8.01E-01	0.9999	1.42E-02	5.37E-01	0.9734
Body		cg06764387	74.38 (10.15)	-3.22E-02	8.61E-01	0.9999	-5.95E-03	9.29E-01	0.9970
Body		cg06837068	38.98 (7.94)	-5.03E-02	7.21E-01	0.9999	-3.51E-02	5.19E-01	0.9716
Body	Island	cg07025949	26.18 (14.03)	-1.73E-01	5.27E-01	0.9999	-1.32E-01	1.93E-01	0.9229
Body		cg07081418	90.12 (5.39)	2.61E-02	7.55E-01	0.9999	-1.87E-02	5.37E-01	0.9734
Body	Shore (S)	cg07137277	72.45 (14.35)	1.79E-01	5.24E-01	0.9999	1.56E-01	1.43E-01	0.9124
Body	Island	cg07156138	74.39 (11.23)	-3.63E-01	1.09E-01	0.9848	-1.06E-01	2.30E-01	0.9328
Body	Shelf (N)	cg07162000	37.34 (15.69)	2.58E-01	3.90E-01	0.9999	1.96E-01	9.29E-02	0.8934

### Chapitre III : Partie A - Approche agnostique

Body		cg07215869	76.98 (10.93)	4.50E-01	4.41E-02	0.9564	3.53E-02	6.43E-01	0.9804
Body		cg07308975	32.47 (7.44)	1.33E-04	9.99E-01	0.9999	5.90E-02	2.51E-01	0.9360
Body	Island	cg07356555	63.43 (5.28)	1.59E-01	9.36E-02	0.9806	2.45E-02	5.11E-01	0.9705
Body		cg07488920	64.15 (12.5)	-1.92E-01	3.67E-01	0.9999	3.68E-02	6.82E-01	0.9833
Body	Shore (S)	cg07568644	39.38 (5.39)	1.18E-01	2.03E-01	0.9999	-4.06E-02	2.70E-01	0.9404
Body		cg07660114	43.95 (8.04)	5.55E-02	6.72E-01	0.9999	-1.10E-02	8.22E-01	0.9920
Body	Shore (N)	cg07728307	51.34 (7.46)	9.14E-02	5.73E-01	0.9999	1.61E-02	7.89E-01	0.9898
Body	Shore (N)	cg07815694	48.61 (5.13)	6.42E-02	5.51E-01	0.9999	2.75E-02	4.68E-01	0.9661
Body		cg07869405	61.56 (9.34)	1.95E-02	9.18E-01	0.9999	-2.61E-02	7.15E-01	0.9850
Body	Shore (S)	cg07928363	60.42 (6.48)	1.25E-01	2.93E-01	0.9999	9.37E-04	9.82E-01	0.9994
Body		cg08218646	29.87 (8.27)	-7.74E-02	6.15E-01	0.9999	-9.37E-03	8.72E-01	0.9942
Body	Island	cg08227227	21.17 (6.03)	-1.62E-01	1.91E-01	0.9988	-5.35E-02	2.25E-01	0.9316
Body		cg08284873	43.69 (3.78)	-6.91E-02	2.98E-01	0.9999	-3.27E-02	1.83E-01	0.9208
Body	Island	cg08302300	54.64 (5.03)	-2.13E-02	8.09E-01	0.9999	1.02E-02	7.57E-01	0.9881
Body		cg08442149	82.78 (11.51)	-2.27E-01	2.66E-01	0.9999	-6.97E-02	3.68E-01	0.9543
Body	Island	cg08643855	41.27 (4.12)	9.41E-02	1.90E-01	0.9986	8.38E-03	7.59E-01	0.9881
Body	Shelf (S)	cg08668359	60.74 (14.43)	2.33E-01	3.59E-01	0.9999	2.23E-02	8.17E-01	0.9916
Body		cg08678202	63.88 (11.22)	-1.99E-01	3.83E-01	0.9999	-1.16E-01	1.81E-01	0.9205
3'UTR	Shore (N)	cg08944086	66.23 (12.28)	3.79E-02	8.66E-01	0.9999	-1.59E-01	7.45E-02	0.8817
Body	Shelf (N)	cg08971562	26.15 (6.7)	-2.49E-03	9.84E-01	0.9999	-3.79E-02	3.95E-01	0.9579
Body	Shelf (N)	cg08978835	57.2 (12.84)	-7.15E-02	7.50E-01	0.9999	-7.59E-02	3.67E-01	0.9543
Body		cg09045305	86.58 (5.55)	-3.74E-02	7.15E-01	0.9999	-2.45E-02	4.76E-01	0.9673
3'UTR	Shelf (N)	cg09105442	39.54 (4.28)	6.30E-02	3.67E-01	0.9999	2.04E-02	4.36E-01	0.9627
Body	Shelf (S)	cg09251910	46.96 (10.52)	2.36E-02	9.07E-01	0.9999	-2.68E-02	7.28E-01	0.9860
Body		cg09316607	27.87 (6.97)	1.75E-02	9.01E-01	0.9999	2.72E-02	5.78E-01	0.9759
Body		cg09326084	59.03 (9.36)	-8.75E-02	6.58E-01	0.9999	-6.45E-02	3.53E-01	0.9526
Body	Shore (N)	cg09394001	89.9 (5.72)	6.38E-02	4.32E-01	0.9999	1.33E-02	6.57E-01	0.9815
Body		cg09514185	38.91 (7.7)	-1.60E-01	2.35E-01	0.9999	-9.81E-03	8.45E-01	0.9929
Body	Shore (N)	cg09952232	46.74 (6.37)	-1.01E-01	3.77E-01	0.9999	-4.10E-02	3.45E-01	0.9509
Body		cg10041069	50.84 (9.55)	-5.98E-02	7.55E-01	0.9999	-7.19E-02	3.02E-01	0.9466
Body		cg10292584	52.31 (12.9)	6.27E-02	7.98E-01	0.9999	3.40E-02	7.05E-01	0.9847
Body	Shore (S)	cg10435021	70.78 (7.17)	1.66E-01	1.92E-01	0.9990	-8.14E-04	9.85E-01	0.9995
Body		cg10448329	89.4 (7.07)	4.67E-02	6.31E-01	0.9999	1.99E-02	5.72E-01	0.9758
Body		cg10496420	78.13 (6.31)	-9.01E-02	3.67E-01	0.9999	-4.02E-02	3.14E-01	0.9481
Body		cg10542123	64.97 (11.11)	-3.94E-01	5.16E-02	0.9598	-8.45E-02	2.63E-01	0.9386
Body	Island	cg10544696	42.35 (10.5)	2.28E-02	8.93E-01	0.9999	3.59E-02	5.86E-01	0.9766
Body	Shelf (N)	cg10724130	57.47 (6.77)	3.51E-02	7.89E-01	0.9999	1.78E-02	6.91E-01	0.9838
Body	Shore (S)	cg10826702	55.15 (6.19)	1.03E-01	3.60E-01	0.9999	-2.62E-02	5.51E-01	0.9749
Body	Shore (S)	cg10830219	38.13 (8.45)	-2.57E-01	5.89E-02	0.9656	-2.93E-02	5.93E-01	0.9770
3'UTR	Shore (N)	cg10834803	64.2 (10.1)	-2.09E-02	9.16E-01	0.9999	-8.63E-02	2.37E-01	0.9335
Body		cg10916515	29.44 (8.57)	-1.11E-02	9.38E-01	0.9999	1.65E-02	7.82E-01	0.9892
Body		cg11142437	73.85 (10.1)	1.91E-02	9.29E-01	0.9999	-3.25E-02	6.67E-01	0.9824
Body		cg11189134	28.85 (5.63)	9.70E-02	3.88E-01	0.9999	2.04E-02	6.29E-01	0.9799
Body		cg11239697	43.24 (5.88)	9.21E-02	4.56E-01	0.9999	2.62E-02	5.45E-01	0.9742
Body	Shelf (N)	cg11270017	60.29 (9.38)	1.33E-01	4.49E-01	0.9999	-3.99E-02	5.47E-01	0.9743
Body		cg11323585	57.16 (7.61)	1.05E-01	4.22E-01	0.9999	4.90E-02	3.18E-01	0.9487
Body	Shelf (N)	cg11342287	89.21 (3.59)	-1.39E-03	9.77E-01	0.9999	-9.99E-03	5.80E-01	0.9761
Body	Shelf (N)	cg11485894	37.15 (6.63)	-1.54E-01	1.73E-01	0.9984	-6.08E-02	1.49E-01	0.9137
Body		cg11498333	71.96 (10.15)	8.76E-02	6.50E-01	0.9999	2.87E-02	7.01E-01	0.9844

## Chapitre III : Partie A - Approche agnostique

Body	Shelf (S)	cg11508783	75.83 (14.61)	-4.22E-01	1.19E-01	0.9891	-7.67E-02	4.75E-01	0.9670
Body		cg11704601	36.12 (3.69)	-5.22E-02	4.43E-01	0.9999	-2.59E-02	3.05E-01	0.9469
Body		cg11861055	78.42 (10.17)	-2.75E-01	1.17E-01	0.9885	-4.59E-02	4.69E-01	0.9662
Body		cg11993399	90.07 (5.95)	-2.39E-01	1.01E-02	0.8869	-4.11E-02	2.39E-01	0.9338
Body		cg12037550	74.1 (10.06)	-8.54E-02	6.68E-01	0.9999	-8.46E-02	2.40E-01	0.9339
Body		cg12051364	59.43 (9.92)	-2.24E-01	2.56E-01	0.9999	-8.71E-02	2.19E-01	0.9293
Body		cg12090430	62.6 (13.64)	1.84E-01	4.83E-01	0.9999	-1.16E-02	9.09E-01	0.9961
Body	Shore (N)	cg12098569	17.74 (3.31)	2.88E-02	5.96E-01	0.9999	-1.02E-02	6.27E-01	0.9793
Body		cg12152703	73.76 (7.14)	-8.31E-02	5.30E-01	0.9999	-1.69E-02	7.41E-01	0.9869
Body		cg12205554	68.9 (10.43)	-1.94E-02	9.29E-01	0.9999	-5.85E-02	4.40E-01	0.9631
Body	Shelf (N)	cg12284235	92.38 (2.2)	-3.73E-02	2.28E-01	0.9999	-1.97E-02	1.09E-01	0.8976
Body		cg12344468	52.09 (12.92)	-1.58E-01	5.43E-01	0.9999	-9.30E-02	3.11E-01	0.9472
Body	Shore (S)	cg12438430	19.78 (6.65)	-2.33E-02	8.37E-01	0.9999	-6.69E-02	1.48E-01	0.9137
Body		cg12508258	44.59 (7.81)	-1.03E-01	4.61E-01	0.9999	-7.43E-02	1.43E-01	0.9119
Body		cg12513994	63.57 (13.58)	-4.11E-01	1.14E-01	0.9874	-3.27E-02	7.40E-01	0.9868
Body		cg12533206	46.14 (4.27)	-8.21E-02	2.72E-01	0.9999	-2.46E-02	3.79E-01	0.9561
Body	Island	cg12557867	14.63 (6.89)	1.35E-01	2.13E-01	0.9999	-5.39E-02	1.84E-01	0.9214
Body		cg12581741	65.2 (11.77)	-2.11E-01	3.43E-01	0.9999	-6.73E-02	4.03E-01	0.9590
Body	Island	cg12799314	77.21 (11.54)	-3.18E-01	1.47E-01	0.9974	-1.72E-01	3.97E-02	0.8542
Body		cg12805552	66.03 (12.23)	-1.16E-01	6.33E-01	0.9999	-8.65E-02	3.46E-01	0.9510
Body		cg13178198	25.55 (7.09)	4.59E-02	7.09E-01	0.9999	-3.40E-02	4.53E-01	0.9647
Body	Shore (S)	cg13504411	25.59 (6.8)	3.25E-02	7.88E-01	0.9999	-2.25E-02	6.14E-01	0.9782
Body		cg13681776	46.96 (7.73)	1.78E-01	2.57E-01	0.9999	2.19E-02	7.04E-01	0.9846
Body		cg13683507	3.97 (3.45)	-9.48E-03	5.60E-01	0.9999	2.11E-03	7.20E-01	0.9855
Body		cg13684379	56.99 (16.72)	-2.43E-02	9.45E-01	0.9999	-5.20E-02	6.92E-01	0.9839
Body		cg13720710	86.55 (8.91)	-6.90E-02	6.31E-01	0.9999	-1.72E-02	7.48E-01	0.9873
Body	Shore (N)	cg13771471	27.83 (7.47)	-6.99E-02	6.43E-01	0.9999	-5.34E-02	3.08E-01	0.9471
Body	Shore (N)	cg13786326	61.08 (11.3)	-1.38E-01	4.96E-01	0.9999	-2.74E-02	7.12E-01	0.9850
Body	Shore (S)	cg13807886	76.31 (8.46)	-2.61E-01	9.83E-02	0.9815	-4.24E-02	4.55E-01	0.9648
<b>Body</b>	<b>Shore (S)</b>	<b>cg13885156</b>	<b>80.26 (9.9)</b>	<b>-8.87E-01</b>	<b>6.21E-08</b>	<b>0.0265</b>	<b>-3.24E-01</b>	<b>1.04E-07</b>	<b>0.0443</b>
Body	Shore (N)	cg13911959	67.17 (12.29)	-2.89E-01	2.56E-01	0.9999	-9.37E-02	2.97E-01	0.9457
Body		cg14054842	90.56 (6.84)	3.36E-02	6.32E-01	0.9999	-6.55E-03	8.06E-01	0.9908
Body		cg14058291	76.59 (8.31)	4.31E-03	9.76E-01	0.9999	2.95E-02	6.10E-01	0.9779
Body	Island	cg14099218	85.78 (7.46)	1.73E-02	9.01E-01	0.9999	-2.37E-02	6.27E-01	0.9795
Body		cg14288086	76.46 (12.69)	-1.86E-01	4.15E-01	0.9999	-8.93E-03	9.19E-01	0.9964
Body		cg14288594	44.24 (7.24)	-1.14E-01	3.96E-01	0.9999	-5.40E-02	3.05E-01	0.9469
Body	Shore (S)	cg14434293	7.05 (1.2)	1.75E-02	4.22E-01	0.9999	8.69E-03	2.75E-01	0.9417
Body		cg14464133	30.78 (10.47)	2.34E-01	2.22E-01	0.9999	2.29E-02	7.30E-01	0.9861
Body	Island	cg14511364	71.27 (9.44)	1.08E-01	5.24E-01	0.9999	-3.60E-02	5.66E-01	0.9755
TSS200	Island	cg14590817	3.58 (1.26)	1.16E-03	9.34E-01	0.9999	-2.81E-03	5.79E-01	0.9761
Body		cg14667192	51.56 (4.4)	4.35E-03	9.60E-01	0.9999	-3.36E-03	9.01E-01	0.9957
Body		cg14698025	53.56 (5.92)	-4.16E-02	7.00E-01	0.9999	1.79E-02	6.60E-01	0.9818
Body		cg14786686	39.53 (6.33)	8.99E-03	9.44E-01	0.9999	3.00E-02	5.17E-01	0.9711
Body	Island	cg14826909	22.71 (13.79)	6.56E-02	7.74E-01	0.9999	1.67E-02	8.49E-01	0.9932
Body	Shore (S)	cg15081722	40.56 (10.29)	-2.12E-01	2.33E-01	0.9999	-6.99E-02	2.95E-01	0.9453
Body	Shelf (S)	cg15186969	30.18 (8.47)	1.48E-01	3.72E-01	0.9999	7.06E-03	9.04E-01	0.9958
Body	Island	cg15292706	84.62 (8.9)	-1.10E-01	4.06E-01	0.9999	-7.45E-02	1.70E-01	0.9178
Body		cg15462970	23.42 (5.87)	8.49E-02	4.35E-01	0.9999	-5.24E-03	8.98E-01	0.9955
Body		cg15479754	66.74 (9.56)	-3.00E-01	9.89E-02	0.9815	-7.33E-02	2.68E-01	0.9397

### Chapitre III : Partie A - Approche agnostique

Body	cg15518542	66.63 (12.65)	1.45E-01	5.86E-01	0.9999	-1.83E-02	8.57E-01	0.9935	
Body	cg15531433	74.32 (11.1)	-3.01E-01	1.45E-01	0.9965	-1.87E-01	7.97E-03	0.7827	
Body	cg15622527	61.65 (9.05)	-5.24E-02	7.55E-01	0.9999	2.57E-02	6.86E-01	0.9835	
Body	Shelf (S)	cg15806365	62.67 (7.73)	-3.86E-02	7.98E-01	0.9999	-4.52E-02	4.10E-01	0.9599
Body		cg16144314	38.52 (7.12)	1.29E-01	2.31E-01	0.9999	4.75E-02	2.35E-01	0.9335
Body		cg16252868	68.22 (8.61)	-1.58E-01	3.50E-01	0.9999	-7.32E-02	2.50E-01	0.9358
Body		cg16253451	68.42 (7.96)	-1.56E-01	2.81E-01	0.9999	-6.02E-02	2.84E-01	0.9436
Body		cg16282361	71.05 (11.59)	-3.23E-01	1.22E-01	0.9897	-7.94E-02	3.39E-01	0.9506
Body	Shore (S)	cg16296438	54.07 (10.7)	-1.42E-01	3.83E-01	0.9999	-1.24E-01	4.89E-02	0.8620
Body	Shore (S)	cg16419019	66.47 (8.63)	-3.81E-03	9.83E-01	0.9999	-3.48E-02	6.17E-01	0.9786
Body		cg16549151	66.52 (12.8)	-1.55E-01	5.65E-01	0.9999	-2.48E-02	8.03E-01	0.9906
Body		cg16615291	85.98 (4.32)	-1.09E-01	8.39E-02	0.9774	-5.21E-02	4.39E-02	0.8583
Body	Shore (N)	cg16646662	34.5 (14.12)	2.84E-01	2.97E-01	0.9999	1.04E-01	3.12E-01	0.9476
Body	Shelf (S)	cg16661473	72.47 (8.16)	2.38E-01	1.25E-01	0.9901	3.39E-02	5.47E-01	0.9743
Body		cg16706389	17.14 (5.56)	-7.01E-03	9.44E-01	0.9999	2.71E-02	4.80E-01	0.9676
Body		cg16707438	79.93 (10.83)	-1.14E-01	5.74E-01	0.9999	-6.16E-02	4.15E-01	0.9603
Body		cg16736679	62.78 (8.68)	1.46E-01	4.05E-01	0.9999	-2.47E-02	6.93E-01	0.9840
Body	Shore (N)	cg16754015	46.41 (5.78)	-4.60E-02	6.08E-01	0.9999	2.31E-02	5.25E-01	0.9722
Body		cg16772023	52.2 (5.25)	-1.44E-02	8.82E-01	0.9999	-2.80E-02	4.42E-01	0.9632
Body		cg16957758	15.7 (6.33)	-1.11E-02	9.15E-01	0.9999	6.23E-03	8.78E-01	0.9945
Body	Shore (N)	cg16990474	53.41 (9.12)	-1.27E-01	4.45E-01	0.9999	-1.38E-02	8.21E-01	0.9918
TSS1500	Shore (S)	cg17000076	21.2 (6.99)	-2.92E-02	8.22E-01	0.9999	-4.62E-03	9.22E-01	0.9967
Body	Shelf (S)	cg17023203	46.65 (14.36)	-4.19E-01	8.42E-02	0.9774	-1.26E-01	1.82E-01	0.9206
Body		cg17077845	44.61 (7.59)	-2.12E-01	1.29E-01	0.9919	-9.65E-02	6.21E-02	0.8704
Body		cg17133972	44.28 (7.73)	-1.17E-02	9.31E-01	0.9999	-5.03E-02	3.27E-01	0.9489
Body	Shelf (S)	cg17221993	66.49 (8.46)	1.39E-01	3.75E-01	0.9999	3.61E-02	5.46E-01	0.9742
Body	Shelf (S)	cg17276513	53.17 (13.82)	-2.11E-01	4.25E-01	0.9999	-1.87E-01	6.68E-02	0.8742
Body	Shore (N)	cg17285208	48.66 (13.63)	-3.28E-01	2.07E-01	0.9999	-3.93E-02	6.59E-01	0.9816
Body	Shelf (S)	cg17349486	37.18 (5.53)	2.42E-02	8.10E-01	0.9999	3.38E-02	3.64E-01	0.9540
Body		cg17405812	56.31 (8.94)	-5.56E-02	7.20E-01	0.9999	-3.35E-02	5.67E-01	0.9755
Body	Shore (S)	cg17439770	81.47 (7.05)	-2.76E-02	8.33E-01	0.9999	3.28E-03	9.44E-01	0.9974
Body	Shelf (S)	cg17486764	76.15 (8.19)	3.71E-02	8.00E-01	0.9999	-2.13E-02	7.15E-01	0.9852
Body		cg17522332	85.71 (10.74)	3.23E-02	8.54E-01	0.9999	-1.10E-01	8.37E-02	0.8890
Body	Island	cg17558772	48.65 (8.77)	-1.94E-01	2.37E-01	0.9999	-4.14E-02	4.77E-01	0.9674
Body	Shelf (N)	cg17672798	48.05 (10.65)	-2.97E-02	8.66E-01	0.9999	-1.37E-01	4.96E-02	0.8629
Body		cg17735539	12.48 (3.63)	1.98E-02	7.19E-01	0.9999	-1.41E-04	9.94E-01	0.9998
Body		cg17861863	39.23 (11.7)	-5.77E-02	7.95E-01	0.9999	3.46E-02	6.65E-01	0.9823
Body		cg17898884	69.61 (12.57)	2.93E-02	8.92E-01	0.9999	2.58E-03	9.75E-01	0.9991
Body		cg17919212	71.73 (5.21)	-4.19E-02	6.54E-01	0.9999	-3.81E-02	2.98E-01	0.9457
Body		cg17922326	50.62 (13.87)	-2.70E-01	2.55E-01	0.9999	-1.66E-01	7.77E-02	0.8844
Body		cg17951991	71.7 (11.34)	1.41E-01	4.53E-01	0.9999	9.48E-02	1.51E-01	0.9137
Body		cg17981439	44.93 (8.86)	-7.23E-02	6.15E-01	0.9999	-6.49E-02	2.40E-01	0.9339
Body	Shelf (S)	cg18093771	45 (11.25)	1.21E-02	9.53E-01	0.9999	1.45E-02	8.53E-01	0.9935
Body		cg18133357	47.96 (6.82)	8.62E-02	4.78E-01	0.9999	1.95E-03	9.67E-01	0.9987
Body	Shore (S)	cg18302890	53.04 (11.8)	3.01E-01	1.51E-01	0.9975	6.60E-02	3.91E-01	0.9579
Body		cg18387659	43.55 (6.74)	-5.84E-02	6.32E-01	0.9999	-4.17E-02	3.54E-01	0.9528
Body	Shelf (S)	cg18489675	18.27 (5.16)	7.42E-02	4.06E-01	0.9999	-1.99E-02	5.54E-01	0.9751
TSS1500	Island	cg18727303	20.17 (6.17)	2.00E-02	8.48E-01	0.9999	-2.51E-02	4.94E-01	0.9692
Body	Island	cg18944640	65.43 (11.62)	-1.83E-01	3.87E-01	0.9999	-1.04E-01	2.00E-01	0.9237

### Chapitre III : Partie A - Approche agnostique

Body	Island	cg18947437	85.99 (6.69)	-1.63E-02	8.59E-01	0.9999	6.31E-03	8.63E-01	0.9938
Body		cg19046793	89.46 (5.68)	-1.21E-01	1.25E-01	0.9901	-4.47E-02	1.48E-01	0.9137
Body	Island	cg19096048	53.32 (10.34)	-8.61E-02	5.91E-01	0.9999	-9.61E-03	8.83E-01	0.9946
Body	Island	cg19163058	73.53 (13.3)	-1.28E-01	6.05E-01	0.9999	-9.66E-02	2.89E-01	0.9443
Body		cg19192934	76.53 (8.69)	1.36E-01	3.69E-01	0.9999	2.28E-02	7.16E-01	0.9854
Body	Shore (N)	cg19207066	55.9 (6.52)	-9.08E-03	9.35E-01	0.9999	1.63E-03	9.73E-01	0.9990
Body	Shelf (N)	cg19416590	9.85 (1.72)	5.61E-02	6.57E-02	0.9686	7.99E-03	4.99E-01	0.9696
Body	Island	cg19533322	50.08 (13.05)	-5.19E-02	8.18E-01	0.9999	-3.68E-02	6.63E-01	0.9821
Body		cg19548181	31 (5.32)	1.60E-02	8.56E-01	0.9999	1.22E-02	7.08E-01	0.9850
Body		cg19738950	54.22 (11.2)	-4.16E-01	6.38E-02	0.9677	-1.42E-01	6.63E-02	0.8740
Body	Shore (N)	cg19758173	30.75 (8.28)	-8.23E-02	5.45E-01	0.9999	-3.84E-02	4.77E-01	0.9674
Body	Shore (N)	cg19810726	43.55 (13.57)	-1.99E-01	3.97E-01	0.9999	-6.13E-02	4.94E-01	0.9692
Body		cg19873199	57.36 (10.45)	1.31E-01	5.41E-01	0.9999	6.97E-02	3.55E-01	0.9528
Body		cg19909974	49.11 (8.08)	1.46E-02	9.22E-01	0.9999	4.34E-02	4.38E-01	0.9630
Body		cg19942454	36.79 (8.37)	-9.27E-02	5.24E-01	0.9999	-1.03E-01	6.40E-02	0.8717
Body		cg19976363	39.58 (11.94)	-3.37E-01	1.59E-01	0.9983	-7.04E-02	4.19E-01	0.9610
Body		cg20112984	14.43 (4.86)	5.56E-02	4.92E-01	0.9999	-5.80E-03	8.44E-01	0.9929
Body	Shelf (N)	cg20151301	42.16 (8.81)	6.10E-02	7.02E-01	0.9999	1.65E-02	7.77E-01	0.9889
Body	Shore (N)	cg20181180	58.13 (10.69)	-1.70E-01	3.95E-01	0.9999	6.00E-03	9.37E-01	0.9973
Body	Shore (N)	cg20205188	36.72 (17.35)	5.13E-01	1.26E-01	0.9905	1.57E-01	2.04E-01	0.9249
Body	Shore (S)	cg20257634	70.1 (7.97)	-2.33E-01	1.40E-01	0.9952	-9.67E-02	8.84E-02	0.8920
Body		cg20299776	77.49 (10.24)	-1.30E-01	5.23E-01	0.9999	-4.02E-02	5.89E-01	0.9766
Body		cg20395881	16.2 (5.76)	-9.67E-02	3.17E-01	0.9999	-3.47E-02	3.09E-01	0.9472
Body		cg20411671	8.94 (5.25)	-5.18E-02	5.12E-01	0.9999	1.74E-02	5.45E-01	0.9742
Body		cg20423602	38.47 (8.23)	-1.24E-01	4.24E-01	0.9999	-9.76E-02	1.05E-01	0.8971
Body		cg20425058	79.99 (11.71)	-3.15E-01	1.17E-01	0.9883	-1.57E-01	5.01E-02	0.8631
Body		cg20455197	49.85 (8.82)	1.09E-01	4.56E-01	0.9999	-1.90E-02	7.35E-01	0.9864
Body	Island	cg20525449	34.57 (12.69)	-1.16E-01	6.18E-01	0.9999	-1.19E-01	1.78E-01	0.9201
Body		cg20648369	18.18 (5.8)	-4.93E-02	5.96E-01	0.9999	-1.10E-02	7.49E-01	0.9873
Body	Island	cg20704381	40.61 (3.96)	-2.87E-02	6.77E-01	0.9999	-1.21E-02	6.56E-01	0.9813
Body	Shelf (S)	cg20731819	40.5 (8.09)	-4.85E-03	9.76E-01	0.9999	-3.10E-03	9.57E-01	0.9982
Body	Island	cg22172057	30.5 (8.32)	-1.71E-01	3.04E-01	0.9999	-6.35E-02	3.08E-01	0.9471
Body	Shelf (S)	cg22676877	45.72 (13.02)	5.97E-02	8.03E-01	0.9999	5.76E-03	9.52E-01	0.9978
Body	Shelf (S)	cg22912156	50.38 (3.05)	-1.52E-02	7.44E-01	0.9999	1.19E-02	5.08E-01	0.9704
Body	Island	cg23099319	18.43 (7.29)	-7.54E-02	5.57E-01	0.9999	-2.75E-02	5.68E-01	0.9755
Body		cg23131974	81.9 (9.91)	-8.06E-02	6.67E-01	0.9999	-2.75E-02	6.96E-01	0.9842
Body		cg23179265	34.43 (4.1)	9.73E-02	2.05E-01	0.9999	1.84E-02	4.96E-01	0.9696
Body		cg23384737	40.38 (7.97)	-1.14E-01	4.35E-01	0.9999	-6.80E-02	1.91E-01	0.9229
Body		cg23593232	21.24 (5.66)	-1.55E-02	8.79E-01	0.9999	-8.10E-03	8.39E-01	0.9929
Body		cg23631669	36.36 (6.84)	1.41E-03	9.91E-01	0.9999	3.30E-02	4.71E-01	0.9665
TSS1500	Island	cg23684973	26.04 (12.75)	9.59E-03	9.69E-01	0.9999	4.14E-02	6.46E-01	0.9807
Body		cg23695794	84.41 (8.79)	1.78E-01	7.19E-02	0.9719	6.45E-02	8.15E-02	0.8867
Body	Shelf (N)	cg23852670	38.64 (6.39)	-2.66E-02	8.00E-01	0.9999	-6.70E-02	9.52E-02	0.8939
Body		cg23853507	55.85 (9.53)	-3.36E-01	8.89E-02	0.9801	-7.78E-02	3.09E-01	0.9472
Body	Shelf (S)	cg23864180	35.11 (10.25)	-4.82E-02	8.09E-01	0.9999	-1.59E-02	8.36E-01	0.9928
Body		cg23934139	81.09 (8.19)	1.11E-01	4.48E-01	0.9999	5.35E-02	3.25E-01	0.9488
Body	Shelf (N)	cg23943953	48.02 (7.94)	3.40E-02	8.00E-01	0.9999	-3.27E-02	5.06E-01	0.9702
Body	Shelf (N)	cg24065216	58.57 (7.97)	2.97E-02	8.47E-01	0.9999	-3.41E-03	9.50E-01	0.9978
Body		cg24127345	44.94 (10.89)	-2.12E-01	3.25E-01	0.9999	-5.34E-02	5.08E-01	0.9704

## Chapitre III : Partie A - Approche agnostique

TSS200	Island	cg24184687	6.18 (1.88)	2.40E-02	3.39E-01	0.9999	1.60E-03	8.57E-01	0.9935
Body		cg24515131	77.21 (8.6)	1.42E-01	3.48E-01	0.9999	5.72E-02	3.22E-01	0.9488
Body		cg24624695	49.06 (13.78)	-4.50E-02	8.72E-01	0.9999	7.96E-02	4.78E-01	0.9675
Body		cg24743200	88.68 (6.07)	-3.03E-02	7.62E-01	0.9999	-3.14E-03	9.29E-01	0.9970
Body		cg24980040	79.9 (12)	-6.97E-02	7.19E-01	0.9999	-8.24E-02	2.50E-01	0.9359
Body		cg25054841	53.33 (6.66)	-1.81E-02	8.74E-01	0.9999	-4.34E-03	9.20E-01	0.9965
Body		cg25065716	33.53 (8.46)	3.15E-02	8.36E-01	0.9999	2.94E-02	5.95E-01	0.9771
Body		cg25356719	48.58 (4.25)	-1.73E-01	1.98E-02	0.9132	-4.78E-02	7.47E-02	0.8818
Body	Shelf (S)	cg25370941	59.11 (12.43)	-1.77E-01	4.55E-01	0.9999	-1.69E-01	5.03E-02	0.8633
Body		cg25379549	85.36 (9.9)	-5.75E-02	7.40E-01	0.9999	-8.55E-02	1.59E-01	0.9160
Body		cg25430878	37.13 (5.08)	7.37E-02	3.99E-01	0.9999	1.10E-02	7.35E-01	0.9865
Body		cg25578830	51.71 (7.9)	-1.81E-01	1.86E-01	0.9984	-1.40E-02	7.81E-01	0.9891
Body	Shore (S)	cg25884812	67.04 (8.54)	-8.27E-02	6.14E-01	0.9999	1.22E-02	8.38E-01	0.9929
Body		cg25970447	88.71 (6.23)	-1.14E-01	1.98E-01	0.9997	-3.82E-02	2.21E-01	0.9303
Body	Shore (N)	cg26040809	40.81 (7.11)	-1.90E-01	1.11E-01	0.9858	-7.46E-02	1.12E-01	0.8997
Body	Shore (N)	cg26059292	23.04 (6.1)	2.29E-01	3.30E-02	0.9447	6.23E-02	1.29E-01	0.9060
Body		cg26345613	36.75 (9.51)	2.82E-02	8.77E-01	0.9999	5.83E-02	3.56E-01	0.9531
Body	Shelf (S)	cg26361041	53.94 (7.39)	1.25E-01	3.75E-01	0.9999	7.88E-03	8.73E-01	0.9943
Body		cg26383468	42.51 (4.92)	1.71E-02	8.44E-01	0.9999	8.57E-03	8.00E-01	0.9904
Body		cg26394196	50.08 (12.07)	6.28E-02	7.79E-01	0.9999	-5.07E-02	5.44E-01	0.9740
Body		cg26540630	55.87 (7.11)	3.09E-01	7.51E-03	0.8706	1.01E-01	2.99E-02	0.8423
Body	Shore (S)	cg26555531	58.89 (9.06)	-1.06E-01	5.70E-01	0.9999	-5.12E-02	4.58E-01	0.9650
Body		cg26569590	66.85 (13.32)	1.82E-01	4.50E-01	0.9999	3.94E-02	6.83E-01	0.9833
Body	Island	cg26619296	54.2 (10.28)	-8.02E-02	6.66E-01	0.9999	-5.20E-02	4.54E-01	0.9648
Body		cg26900105	75.1 (6.34)	-1.66E-01	2.13E-01	0.9999	-3.83E-02	4.23E-01	0.9612
Body	Shelf (S)	cg26939277	16.21 (6.03)	1.66E-02	8.65E-01	0.9999	1.18E-02	7.52E-01	0.9876
Body		cg27097575	47.57 (7.09)	9.43E-02	4.21E-01	0.9999	2.84E-02	5.13E-01	0.9705
Body	Shelf (S)	cg27117585	64.29 (6.5)	-1.51E-02	9.07E-01	0.9999	-3.51E-02	4.80E-01	0.9676
Body	Shelf (S)	cg27299021	66.36 (8.97)	7.43E-02	6.92E-01	0.9999	-2.82E-02	6.79E-01	0.9832
Body		cg27336068	17.39 (9.08)	3.91E-02	7.77E-01	0.9999	3.48E-02	4.93E-01	0.9690
Body		cg27354589	64.49 (16.19)	2.17E-01	5.10E-01	0.9999	-3.99E-02	7.40E-01	0.9868
Body		cg27467275	28.42 (6.85)	1.19E-01	3.38E-01	0.9999	2.64E-02	5.76E-01	0.9759
Body	Shelf (N)	cg27517502	72.12 (9.43)	-1.58E-01	3.15E-01	0.9999	-1.66E-02	7.89E-01	0.9898
Body	Shelf (S)	cg27566842	36.04 (12.77)	-4.25E-01	9.72E-02	0.9810	-1.66E-01	4.77E-02	0.8616

Table S3. Top 20 CpGs from the epigenome-wide analysis of the association between prenatal PM10 exposure and placental DNA methylation (n=668 pregnant women from EDEN cohort).

Whole pregnancy				Trimester 3				Trimester 2				Trimester 1				Month before delivery				Week before delivery			
CpG	coef	se	pvalue	CpG	coef	se	pvalue	CpG	coef	se	pvalue	CpG	coef	se	pvalue	CpG	coef	se	pvalue	CpG	coef	se	pvalue
cg10537421	-0.037	0.008	1.54*10-6	cg26006117	0.030	0.006	8.14*10-7	cg00268547	-0.049	0.010	4.84*10-7	cg13885156*	<b>-0.089</b>	<b>0.016</b>	<b>6.21*10-8</b>	cg06721956	0.041	0.008	1.27*10-6	cg20149973	-0.055	0.011	3.03*10-7
cg21540588	0.060	0.012	1.59*10-6	cg03367643	-0.024	0.005	6.67*10-6	cg20491726	0.035	0.007	1.21*10-6	cg24777762	0.007	0.001	3.78*10-7	cg01377124	-0.024	0.005	1.63*10-6	cg26847756	0.001	0.001	1.08*10-6
cg13885156	-0.108	0.023	2.25*10-6	cg12554819	-0.003	0.001	8.50*10-6	cg05917284	-0.084	0.017	1.54*10-6	cg03215416	-0.020	0.004	1.82*10-6	cg08605016	-0.015	0.003	4.56*10-6	cg00671534	-0.034	0.007	1.96*10-6
cg14762062	0.006	0.001	9.53*10-6	cg12105691	0.063	0.014	1.27*10-5	cg00733683	0.048	0.010	3.22*10-6	cg24563570	-0.011	0.002	3.24*10-6	cg26236655	0.045	0.010	5.12*10-6	cg04337358	0.019	0.004	3.89*10-6
cg07023527	0.007	0.002	1.32*10-5	cg14975237	-0.034	0.008	1.49*10-5	cg10946295	0.018	0.004	3.60*10-6	cg14881371	0.065	0.014	5.07*10-6	cg11898958	0.042	0.009	6.32*10-6	cg24041541	-0.013	0.003	5.30*10-6
cg00729885	0.060	0.014	1.40*10-5	cg27653165	0.043	0.010	2.26*10-5	cg21789085	-0.059	0.013	1.07*10-5	cg02421175	0.072	0.016	6.69*10-6	cg07423651	0.021	0.005	6.89*10-6	cg01519094	0.017	0.004	5.72*10-6
cg03946297	0.077	0.018	1.45*10-5	cg18234543	-0.007	0.002	2.62*10-5	cg08502652	0.059	0.014	1.42*10-5	cg21874514	0.007	0.002	7.46*10-6	cg24957704	-0.013	0.003	7.12*10-6	cg10247711	0.015	0.003	5.79*10-6
cg20491726	0.041	0.009	1.57*10-5	cg07882535	0.061	0.015	2.99*10-5	cg11469137	0.011	0.003	1.44*10-5	cg07388132	0.005	0.001	7.71*10-6	cg22933107	0.024	0.005	7.43*10-6	cg03531951	0.012	0.003	6.18*10-6
cg06803406	0.052	0.012	1.79*10-5	cg21392204	0.062	0.015	3.52*10-5	cg14051535	0.013	0.003	1.47*10-5	cg24583468	0.027	0.006	8.41*10-6	cg25290938	-0.006	0.001	7.79*10-6	cg17315500	-0.024	0.005	6.70*10-6
cg24215978	0.093	0.022	2.37*10-5	cg24072451	0.071	0.017	4.19*10-5	cg19061270	0.039	0.009	1.60*10-5	cg24233594	0.053	0.012	8.62*10-6	cg16694182	0.002	0.001	8.74*10-6	cg19452248	0.033	0.007	7.95*10-6
cg20489305	-0.010	0.002	2.37*10-5	cg15321908	0.031	0.008	4.26*10-5	cg03213775	0.038	0.009	1.76*10-5	cg15063771	-0.034	0.008	1.10*10-5	cg12877935	0.017	0.004	9.94*10-6	cg02961557	0.010	0.002	8.29*10-6
cg06856891	0.040	0.010	2.51*10-5	cg06015834	-0.041	0.010	4.68*10-5	cg00535576	-0.037	0.009	1.78*10-5	cg21060925	-0.004	0.001	1.30*10-5	cg01861284	-0.002	0.001	1.04*10-5	cg22142922	0.021	0.005	8.52*10-6
cg15185458	0.005	0.001	2.51*10-5	cg03344351	-0.006	0.001	5.23*10-5	cg24925163	-0.054	0.013	1.91*10-5	cg12844142	0.005	0.001	1.36*10-5	cg12850636	-0.010	0.002	1.16*10-5	cg04933990	0.024	0.005	9.74*10-6
cg00589371	-0.021	0.005	2.55*10-5	cg18126247	0.031	0.008	5.49*10-5	cg20947775	0.005	0.001	1.99*10-5	cg22336401	0.008	0.002	1.49*10-5	cg20534662	-0.018	0.004	1.22*10-5	cg02078558	0.022	0.005	1.20*10-5
cg19324023	-0.058	0.014	2.61*10-5	cg22330935	-0.030	0.008	5.78*10-5	cg18387198	-0.100	0.024	2.14*10-5	cg01556466	0.038	0.009	1.78*10-5	cg26932779	-0.004	0.001	1.25*10-5	cg04302388	-0.012	0.003	1.26*10-5
cg05602567	0.005	0.001	2.63*10-5	cg21845226	-0.017	0.004	5.83*10-5	cg15969216	0.003	0.001	2.32*10-5	cg04416302	0.075	0.018	2.05*10-5	cg22910862	0.043	0.010	1.44*10-5	cg24719107	0.017	0.004	1.70*10-5
cg11742922	-0.007	0.002	2.67*10-5	cg16135936	0.037	0.009	6.01*10-5	cg17972625	-0.093	0.022	2.33*10-5	cg22215392	0.032	0.008	2.21*10-5	cg08474164	0.016	0.004	1.54*10-5	cg25353171	-0.014	0.003	1.89*10-5
cg13276896	0.004	0.001	2.67*10-5	cg16919517	0.004	0.001	6.38*10-5	cg10992419	-0.038	0.009	2.40*10-5	cg01789576	-0.034	0.008	2.25*10-5	cg18059802	0.005	0.001	1.61*10-5	cg04922971	0.027	0.006	1.99*10-5
cg08450965	-0.029	0.007	3.15*10-5	cg21467108	-0.027	0.007	6.51*10-5	cg18917524	-0.075	0.018	2.42*10-5	cg02003682	-0.021	0.005	2.34*10-5	cg05958740	-0.022	0.005	1.72*10-5	cg16529599	0.012	0.003	2.09*10-5
cg06732687	0.043	0.010	3.25*10-5	cg08605840	-0.045	0.011	6.64*10-5	cg07751196	0.014	0.003	2.46*10-5	cg26159090	0.044	0.010	2.41*10-5	cg09412782	0.007	0.002	1.78*10-5	cg21807694	0.016	0.004	2.21*10-5

Shown are top 20 CpG sites ordered by p-value; Results presented by 10 µg/m<sup>3</sup> increase in PM<sub>10</sub> exposure.

\*cg significant at FDR threshold (FDR p<0.05)

Table S6. Top 20 CpGs from the epigenome-wide analysis of the association between prenatal NO<sub>2</sub> exposure and placental DNA methylation (n=668 pregnant women from EDEN cohort).

Whole pregnancy				Trimester 3				Trimester 2				Trimester 1				Month before delivery				Week before delivery			
CpG	coef	se	pvalue	CpG	coef	se	pvalue	CpG	coef	se	pvalue	CpG	coef	se	pvalue	CpG	coef	se	pvalue	CpG	coef	se	pvalue
cg07563400	-0.047	0.009	2.53*10-7	cg13404331	-0.007	0.001	3.15*10-7	cg17580614*	<b>-0.041</b>	<b>0.008</b>	<b>5.51*10-8</b>	cg13885156	-0.032	0.006	1.04*10-7	cg20128365	0.003	0.001	1.67*10-7	cg01780943	0.006	0.001	4.53*10-7
cg13885156	-0.035	0.007	3.95*10-7	cg14713933	0.006	0.001	1.51*10-6	cg07563400	-0.044	0.009	4.04*10-7	cg19709822	0.002	0.000	1.29*10-6	cg19685922	0.004	0.001	2.65*10-7	cg20684528	-0.011	0.002	6.94*10-7
cg17580614	-0.040	0.008	7.10*10-7	cg24072451	0.034	0.007	2.13*10-6	cg20491726	0.015	0.003	5.79*10-7	cg03730941	-0.032	0.007	1.31*10-6	cg14713933	0.006	0.001	7.36*10-7	cg10330056	0.018	0.004	8.32*10-7
cg20491726	0.015	0.003	2.35*10-6	cg08798933	0.002	0.000	2.48*10-6	cg07693262	0.028	0.006	6.39*10-7	cg20491726	0.013	0.003	4.56*10-6	cg26006117	0.011	0.002	9.01*10-7	cg23671699	-0.010	0.002	1.34*10-6
cg19709822	0.002	0.000	2.39*10-6	cg12303627	0.026	0.006	2.65*10-6	cg03213775	0.018	0.004	1.09*10-6	cg20401058	0.013	0.003	4.88*10-6	cg24072451	0.035	0.007	1.01*10-6	cg07201003	-0.030	0.006	1.36*10-6
cg03730941	-0.033	0.007	3.49*10-6	cg26006117	0.011	0.002	2.92*10-6	cg15801007	0.010	0.002	2.13*10-6	cg20808234	-0.005	0.001	6.89*10-6	cg08798933	0.002	0.000	1.55*10-6	cg12446629	-0.031	0.006	1.55*10-6
cg09762582	0.014	0.003	4.43*10-6	cg13885156	-0.031	0.007	3.69*10-6	cg14003978	0.019	0.004	2.66*10-6	cg25848060	0.002	0.000	9.51*10-6	cg14191673	0.003	0.001	1.56*10-6	cg19246065	0.009	0.002	1.87*10-6
cg14003978	0.019	0.004	4.48*10-6	cg07563400	-0.038	0.008	3.91*10-6	cg13885156	-0.032	0.007	2.69*10-6	cg07563400	-0.037	0.008	9.64*10-6	cg19791143	0.007	0.001	1.93*10-6	cg10334127	0.020	0.004	2.61*10-6
cg20489305	-0.004	0.001	6.01*10-6	cg20489305	-0.003	0.001	4.76*10-6	cg09762582	0.014	0.003	3.41*10-6	cg27354537	0.012	0.003	1.10*10-5	cg12303261	-0.001	0.000	2.28*10-6	cg25353171	-0.011	0.002	3.13*10-6
cg07693262	0.027	0.006	6.19*10-6	cg12435611	0.002	0.000	5.59*10-6	cg11800844	0.016	0.003	4.74*10-6	cg09762582	0.013	0.003	1.12*10-5	cg20489305	-0.003	0.001	2.50*10-6	cg10537421	-0.009	0.002	3.44*10-6
cg24770256	0.026	0.006	8.67*10-6	cg14560339	0.001	0.000	6.14*10-6	cg23705108	0.020	0.004	5.99*10-6	cg22341908	0.013	0.003	1.25*10-5	cg12762816	-0.026	0.006	2.59*10-6	cg06682383	-0.011	0.002	3.72*10-6
cg21540588	0.017	0.004	9.91*10-6	cg15158031	-0.009	0.002	7.85*10-6	cg20946805	0.029	0.006	6.21*10-6	cg26347359	0.028	0.006	1.36*10-5	cg04460931	0.005	0.001	3.14*10-6	cg05394210	0.024	0.005	3.84*10-6
cg25848060	0.002	0.000	9.91*10-6	cg11121623	0.028	0.006	7.86*10-6	cg10946295	0.007	0.002	8.96*10-6	cg22934785	-0.020	0.005	1.94*10-5	cg02757696	-0.001	0.000	3.42*10-6	cg13404331	-0.006	0.001	3.96*10-6
cg20401058	0.013	0.003	1.08*10-5	cg27618216	0.013	0.003	8.58*10-6	cg01420564	0.015	0.003	9.91*10-6	cg09284275	0.011	0.002	2.00*10-5	cg13567360	0.015	0.003	4.32*10-6	cg08798933	0.002	0.000	4.65*10-6
cg07234569	0.003	0.001	1.21*10-5	cg08349602	-0.004	0.001	9.00*10-6	cg03730941	-0.030	0.007	1.03*10-5	cg03648155	-0.009	0.002	2.17*10-5	cg08898866	-0.014	0.003	4.32*10-6	cg13165070	0.014	0.003	4.67*10-6
cg11800844	0.016	0.004	1.37*10-5	cg18059012	0.016	0.004	9.15*10-6	cg17531430	0.015	0.003	1.10*10-5	cg17580614	-0.030	0.007	2.36*10-5	cg21222634	-0.002	0.000	5.74*10-6	cg01075271	-0.007	0.001	4.73*10-6
cg15801007	0.010	0.002	1.38*10-5	cg02757696	-0.001	0.000	9.36*10-6	cg13818276	0.017	0.004	1.25*10-5	cg24770256	0.023	0.005	2.40*10-5	cg20684528	-0.012	0.003	5.75*10-6	cg16378261	0.021	0.005	5.64*10-6
cg08798933	0.002	0.000	1.92*10-5	cg10164885	0.008	0.002	9.36*10-6	cg06523556	0.031	0.007	1.35*10-5	cg23671006	-0.007	0.002	2.64*10-5	cg07480327	0.006	0.001	6.15*10-6	cg01344644	-0.021	0.005	5.64*10-6
cg11256628	0.016	0.004	2.10*10-5	cg15124547	-0.011	0.002	1.14*10-5	cg20401058	0.013	0.003	1.42*10-5	cg08160970	-0.013	0.003	2.66*10-5	cg01712700	-0.004	0.001	6.28*10-6	cg08910906	0.018	0.004	5.71*10-6
cg24395890	0.003	0.001	2.12*10-5	cg11932746	0.002	0.001	1.16*10-5	cg11256628	0.016	0.004	1.44*10-5	cg05635114	-0.017	0.004	2.88*10-5	cg12185908	0.002	0.001	6.43*10-6	cg26159090	0.017	0.004	6.26*10-6

Shown are top 20 CpG sites ordered by p-value; Results presented by 10 µg/m<sup>3</sup> increase in NO<sub>2</sub> exposure.

\*cg significant at FDR threshold (FDR p<0.05)



## **Partie B**

### **Approche avec « *a priori* »**



## 1. Introduction

L'objectif de cette partie était sensiblement la même que la précédente c'est-à-dire étudier le rôle potentiel de la méthylation de l'ADN placentaire comme biomarqueur des expositions environnementales pendant la grossesse.

L'idée ici était d'élaborer et de mettre en œuvre une stratégie originale permettant de cibler efficacement certains gènes compte tenu de leur état d'expression ou de méthylation dans le placenta. En d'autres termes, nous avons utilisé une approche *a priori*, basée sur l'intégration de connaissances biologiques sur l'état d'expression et du génome sans toutefois se restreindre à des voies de signalisation spécifiques.

En effet, l'approche sans *a priori* peut être limitée dans l'interprétation des résultats du fait de la considération d'un très grand nombre de sites CpGs et de leur potentielle interaction/corrélation difficilement prise en compte dans ce genre d'analyse.

L'originalité de notre approche repose sur le fait que nous ne faisons pas d'hypothèse *a priori* sur des pathways éventuels qui seraient impliqués dans les associations entre expositions environnementales et issues de grossesse mais plutôt sur le fait que nous cherchons à identifier des régions génomiques propres au tissu placentaire qui seraient potentiellement sensibles à la pollution de l'air ou aux paramètres météorologiques.

L'intégration de connaissances biologiques autres que des pathways déjà identifiés dans les analyses d'association épigénétique à l'échelle du génome semble pertinente pour identifier de nouvelles voies épigénétiques en association avec les expositions environnementales et donc avec les événements de santé.

Ces travaux ont été réalisés et se poursuivent en collaboration avec l'équipe « Épigénétique et Signalisation Cellulaire » située dans le même centre de recherche dans lequel j'effectue ma thèse, l'institut pour l'Avancée des Biosciences (IAB) à Grenoble.

## 2. Méthodes

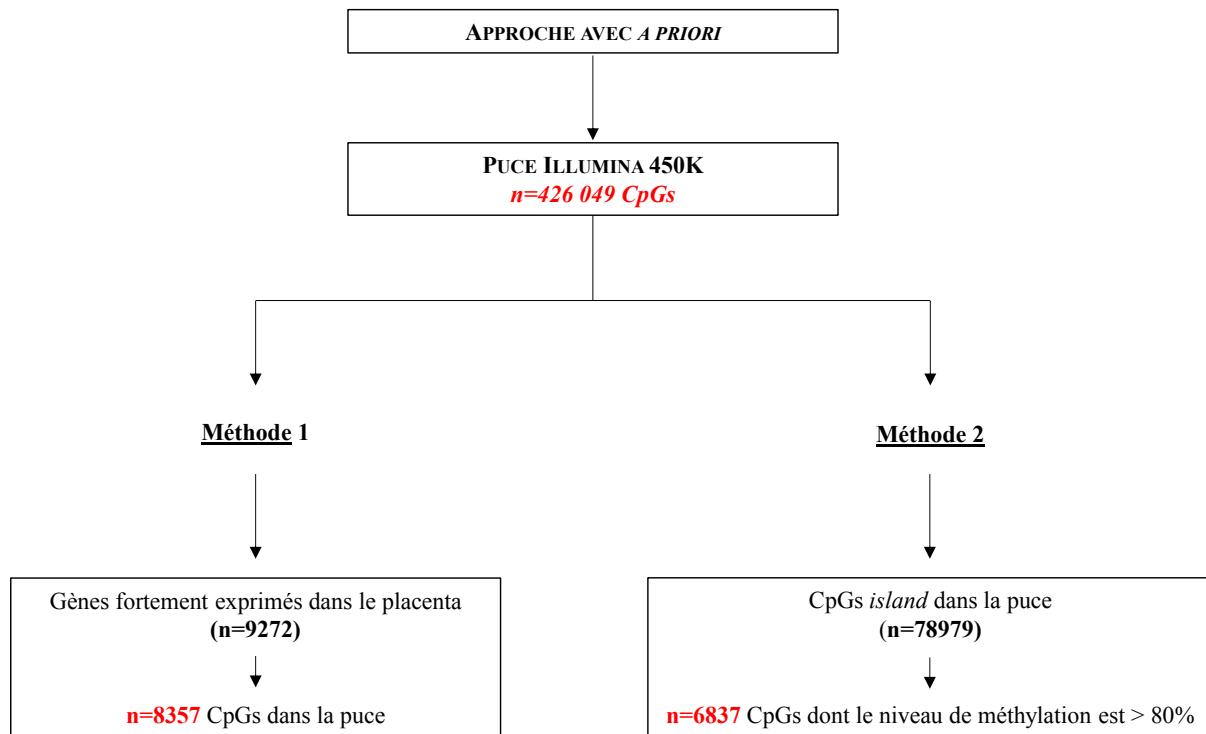
L'approche élaborée dans cette partie repose sur l'intégration de connaissances biologiques sur la relation « épigénome-expression » dans le placenta qui nous permet 1) d'identifier une ou plusieurs listes de gènes potentiellement cibles d'anomalies épigénétiques en lien avec les expositions environnementales, et 2) d'étudier le niveau de méthylation de l'ADN dans leurs régions régulatrices respectives en association avec l'exposition aux polluants NO<sub>2</sub> et PM<sub>10</sub> et aux paramètres météorologiques température et humidité. Ces travaux reposaient également sur l'échantillon des 668 couples mère-enfant de la cohorte EDEN décrit dans la partie A du Chapitre III.

### 2.1. Méthodes d'identification des gènes

Dans notre approche *a priori*, deux méthodes ont été mises en place :

- 1- Identifier une liste des gènes fortement exprimés dans le placenta au terme de la grossesse (spécificité et prédominance d'expression) et, peu ou pas exprimés dans un autre tissu. Grâce à l'exploitation de données transcriptomiques publiques (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/> : études GSE3526, GSE18809, GSE7434, GSE9984) l'équipe « Épigénétique et Signalisation Cellulaire » a pu définir cette liste de gènes. À partir des données de ces études groupées, normalisées et comparées les gènes montrant une prédominance d'expression dans le placenta à terme ont été sélectionnés.
- 2- Une deuxième méthode ciblant les gènes dont l'ADN des régions régulatrices est fortement méthylé. Cette deuxième approche est basée sur l'hypothèse qu'un niveau de méthylation élevé des régions riches en CpGs (ou CpG island) dans les parties régulatrices de ces gènes serait responsable de leur répression (ou non expression) et par conséquent ces gènes pourraient être plus susceptibles d'être affectés par les

changements de méthylation. Ainsi, à partir de nos données de méthylation dans le placenta (puce Illumina) nous avons sélectionné les gènes dont le niveau de méthylation est élevé (>80 %).



**Figure 7.** Processus de sélection des CpGs selon l'approche avec « *a priori* ».

## 2.2. Analyses d'association

Une fois les 2 listes créées, des méthodes de régression linéaire robuste ont été mises en place pour étudier les relations entre les polluants PM<sub>10</sub> et NO<sub>2</sub>, la température, l'humidité relative et la méthylation de l'ADN placentaire sur les différents sites CpG des gènes identifiés dans la liste 1 et sur les différents sites CpGs identifiés dans la liste 2. Les tests multiples ont été corrigés à l'aide critère de Benjamini and Hochberg (FDR). Le seuil de signification retenu était 5%.

Pour les polluants et les paramètres météorologiques, nous nous sommes intéressés aux mêmes fenêtres d'exposition pendant la grossesse décrites dans l'approche agnostique de la partie A du Chapitre III : jour 1 à 3, la semaine et le mois précédent la naissance, les trimestres de grossesse et la grossesse entière.

Nous avons testé (1) l'effet simultané de la température et de l'humidité et (2) l'effet propre de chaque polluant ajusté sur les paramètres météorologiques. Tous nos modèles étaient ajustés sur les covariables suivantes : le sexe de l'enfant, la parité (0, 1,  $\geq 2$  enfants), l'âge maternel à la fin des études ( $\leq 18$ , 19-20, 21-22, 23-24,  $\geq 25$  ans), la saison de conception, le centre d'étude (Poitiers, Nancy), l'indice de masse corporel de la mère ( $\text{kg}/\text{cm}^2$ ), l'âge de la mère (années), le tabagisme maternel pendant la grossesse (nombre moyen de cigarettes par jour) et la durée de gestation. Nous avons également ajusté sur les facteurs techniques des mesures de méthylation tels que le lot, la plaque et la puce.

### **3. Résultats**

#### **3.1. Méthode 1**

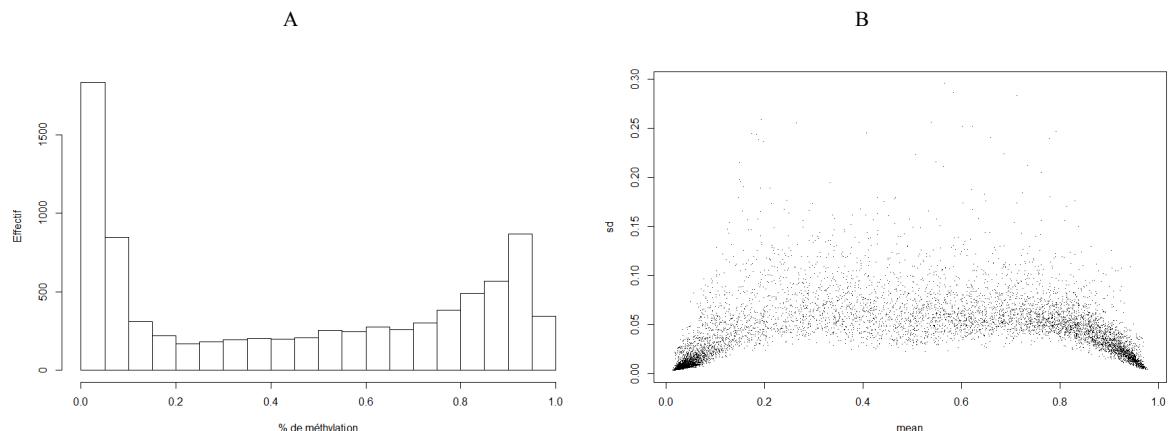
Description de la liste des 8 357 CpGs provenant des gènes fortement exprimés dans le placenta

Un quart des sites CpG ont un niveau de méthylation inférieur à 0,05 et un quart ont un niveau de méthylation supérieur à 0,83 (Tableau 2).

**Tableau 2. Distribution du niveau de méthylation, n=8 357 CpGs.**

0%	5%	25%	50%	75%	90%	95%	100%
0,007	0,025	0,056	0,456	0,826	0,931	0,953	0,986

On observe une distribution plutôt bimodale des niveaux moyens de méthylation. De plus, globalement, les sites CpG dont le niveau moyen de méthylation est faible ou élevé ont une variabilité faible (Figure 7. A, B).



**Figure 8. Histogramme des niveaux moyens de méthylation de sites CpG (A) et distribution des niveaux de méthylation selon la moyenne et l'écart-type (B)**

### Résultats des analyses d'association

Dans cette première méthode, nous avons identifié des associations significatives à l'échelle de l'épigénome (FDR p-values < 0,05) entre une diminution de la méthylation de l'ADN et l'exposition aux NO<sub>2</sub> (Tableau 3). Deux CpGs étaient significativement associés aux NO<sub>2</sub> pendant la grossesse entière et les 3 trimestres, et étaient localisés tous deux dans le corps du gène *ADORA2B* (chromosome 17). Deux autres CpGs étaient significativement associés aux NO<sub>2</sub> pendant le trimestre 2, et étaient respectivement localisés dans le corps du gène *B4GALT1* (chromosome 9) et dans la région promotrice du gène *BPESC1* (chromosome 3). Enfin, un CpG (cg15158031) était significativement associé aux NO<sub>2</sub> pendant le trimestre 3, et était localisé dans le 3'UTR du gène *ARID3A* (chromosome 19). Concernant les PM<sub>10</sub>, la température et l'humidité relative, aucune association significative avec la méthylation n'était trouvée.

Le gène *ADORA2B* a déjà été décrit dans l'approche agnostique. Dans la littérature, le gène *BPESC1* a été identifié au point d'arrêt d'une translocation associée à une maladie génétique rare, appelée blépharophimosis, ptosis, inversus épicanthus et télécanthus (BPES), qui est associée à l'infertilité féminine (De Baere et al. 2000).

**Tableau 3. CpGs significativement associés à l'exposition prénatale au NO<sub>2</sub> (n=668, EDEN).**

Chr	Position (built 37)	CpG	Gene	$\beta^*$	ET <sup>a</sup>	p-valeur	p FDR
<b>Grossesse</b>							
17	15849556	cg07563400	ADORA2B	-0,0047	0,0009	5,64E-07	0,002
17	15849512	cg17580614	ADORA2B	-0,0041	0,0008	4,79E-07	0,002
<b>Trimestre 1</b>							
17	15849556	cg07563400	ADORA2B	-0,0043	0,0009	1,16E-06	0,007
17	15849512	cg17580614	ADORA2B	-0,0036	0,0007	1,62E-06	0,007
<b>Trimestre 2</b>							
17	15849556	cg07563400	ADORA2B	-0,0044	0,0009	4,04E-07	0,002
9	33130375	cg13443165	B4GALT1	-0,0015	0,0004	2,23E-05	0,047
17	15849512	cg17580614	ADORA2B	-0,0041	0,0008	5,51E-08	0,001
3	138821772	cg20946805	BPESC1	0,0029	0,0006	6,21E-06	0,017
<b>Trimestre 3</b>							
17	15849556	cg07563400	ADORA2B	-0,0038	0,0008	3,91E-06	0,033
19	972384	cg15158031	ARID3A	-0,0009	0,0002	7,85E-06	0,033
17	15849512	cg17580614	ADORA2B	-0,0033	0,0008	4,13E-05	0,058

$\beta$  Coefficient de la régression

\* Pour une augmentation d'une unité du NO<sub>2</sub>.

a ET: écart type

p FDR : p-valeur après correction des tests multiples en utilisant la méthode du False Discovery Rate

### 3.2. Méthode 2

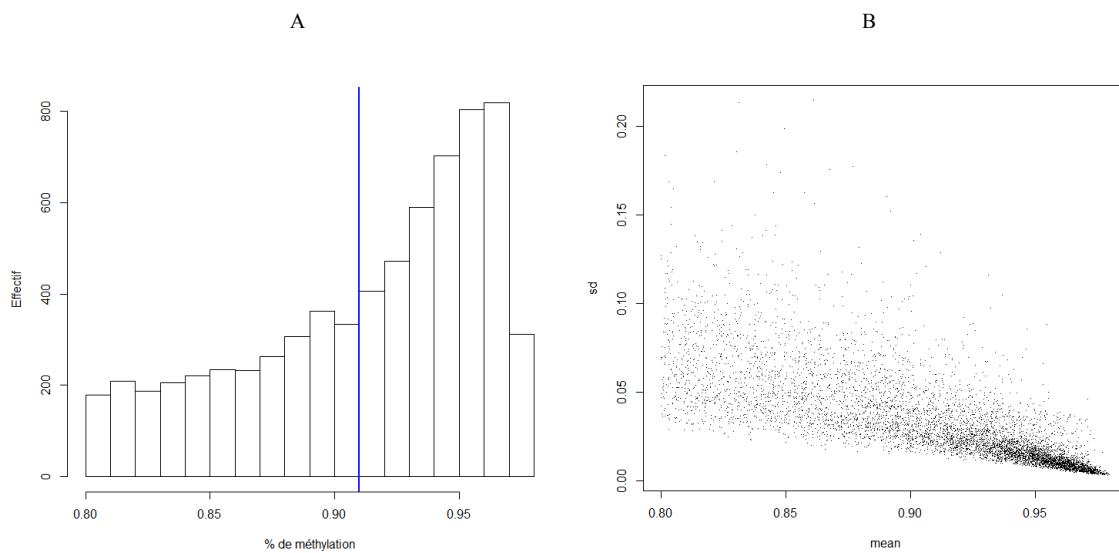
Description de la liste des 6 837 CpGs provenant des gènes fortement méthylés dans le placenta

L'ensemble des sites CpG de la méthode 2 ont bien un niveau de méthylation supérieur à 0,80 et la moitié d'entre eux ont un niveau de méthylation supérieur à 0,90 (Tableau 4).

**Tableau 4 : Distribution du niveau de méthylation, n=6 837 CpGs.**

0%	5%	25%	50%	75%	90%	95%	100%
0,800	0,818	0,879	0,926	0,953	0,965	0,970	0,980

Le niveau moyen de méthylation de cette liste de CpGs est de 0,91. On observe que plus les sites CpG ont un niveau moyen de méthylation élevé (c'est-à-dire proche de 1) et plus leur variabilité est faible (Figure 8. A, B).



**Figure 9 : Histogramme des niveaux moyens de méthylation de sites CpG (A) et distribution des niveaux de méthylation selon la moyenne et l'écart-type (B)**

### Résultats des analyses d'association

Dans cette seconde méthode, nous avons identifié une augmentation significative de la méthylation de l'ADN pour un CpG en association avec une exposition aux NO<sub>2</sub> au cours du mois précédent la naissance (FDR p-value < 0,05, Tableau 5). Ce CpG n'était pas localisé sur un gène précis, néanmoins ce CpG est dans un îlot (chr9:33019921-33020146) sur le chromosome 9. Concernant les PM<sub>10</sub>, la température et l'humidité relative, aucune association significative avec la méthylation n'était trouvée.

**Tableau 5. CpGs significativement associés à l'exposition prénatale au NO<sub>2</sub> (n=668, EDEN).**

Chr	Position (built 37)	CpG	Gene	$\beta^*$	ET <sup>a</sup>	p-valeur	p FDR
<b>Mois<sup>b</sup></b>							
9	33019956	cg14191673	-	0,0003	5,8E-05	1,56E-06	0,0107

$\beta$  Coefficient de la régression

\* Pour une augmentation d'une unité du NO<sub>2</sub>

<sup>a</sup> ET: écart type

<sup>b</sup> Précédant la naissance

p FDR : p-valeur après correction des tests multiples en utilisant la méthode du False Discovery Rate

#### **4. Conclusion**

Cette approche *a priori* est nouvelle et originale, car elle intègre des connaissances biologiques sur l'état d'expression des gènes, ce qui permet d'une part de réduire l'abondance d'information (sites CpG) et d'autre part d'identifier une ou des voie(s) particulière(s) de régulation du niveau d'expression de gènes dans le placenta en lien avec la méthylation des CpG de leurs régions régulatrices pouvant être affectée(s) par la pollution et/ou les conditions atmosphériques, tout en ne restreignant pas l'analyse à des pathways spécifiques déjà identifiés dans la littérature.

Concernant les résultats, l'identification du gène *ADORA2B* dont le niveau de méthylation est négativement associé avec la pollution dans les 2 approches (agnostique et *a priori*) conforte l'hypothèse que ce gène (son niveau de méthylation et potentiellement son niveau d'expression) pourrait être un biomarqueur des expositions à la pollution de l'air. Il serait intéressant par la suite de regarder son lien et son implication avec les issues de grossesse afin de voir s'il pourrait être un potentiel médiateur des effets des expositions environnementales sur les résultats indésirables de grossesse.

Compte tenu de la concordance des résultats observés dans les 2 approches, la discussion sera complétée dans la discussion générale.

Enfin, les travaux en collaboration avec l'équipe de biologie se poursuivent notamment avec la mise en place de nouvelles listes de gènes, comme par exemple les gènes dont le niveau d'expression varie de manière significative pendant le développement placentaire au cours de la grossesse (1<sup>er</sup>, 2<sup>ème</sup> et 3<sup>ème</sup> trimestre).

## **DISCUSSION GÉNÉRALE**



## **1. Résumé et apport de la thèse**

Cette thèse visait à évaluer l'effet de l'exposition maternelle pendant la grossesse aux conditions météorologiques sur les issues de grossesse, ainsi que l'effet des expositions in utero aux polluants de l'air et aux conditions météorologiques sur la méthylation de l'ADN placentaire. Ce deuxième objectif visait à identifier de nouveaux mécanismes biologiques pouvant potentiellement expliquer les effets des expositions environnementales sur les issues de grossesse indésirables.

Nous avons mis en évidence un poids de naissance plus faible en association avec une exposition prénatale à des températures plus élevées ; cette association s'observant surtout pour des expositions du milieu et de la fin de la grossesse. Il en était de même pour l'exposition prénatale à des niveaux d'humidité relative plus élevés pendant la grossesse. En revanche, aucune association entre ces expositions environnementales pendant la grossesse avec la prématurité et la durée de gestation n'a été identifiée. Ces résultats présentent pour la première fois l'influence propre des expositions prénatales à des niveaux d'humidité relative sur les issues de grossesse, les autres études sur ce thème ayant ajusté sur le niveau d'humidité mais n'ayant pas spécifié les effets éventuels de cette exposition.

Bien que nos premiers travaux suggèrent un effet délétère de l'humidité relative sur le poids de naissance, il existe trop peu d'études à ce jour pour certifier d'un tel effet. Il est donc nécessaire que les futures études approfondissent cette recherche d'une part pour valider ces résultats et d'autre part, si un tel effet existe, pour permettre la mise en œuvre de mesures de prévention afin d'éviter les conséquences d'une réduction du poids de naissance sur la santé du bébé. Bien qu'il soit impossible de modifier le taux d'humidité relatif à l'extérieur, il existe différentes façons pour contrôler le taux d'humidité relatif à l'intérieur telles qu'une

bonne aération quotidienne de son logement ou encore l'utilisation d'un humidificateur ou déshumidificateur.

L'analyse des liens entre expositions environnementales et méthylation a été abordée selon deux approches différentes : une approche agnostique à l'échelle du génome entier, et une approche avec *a priori*, basée sur des connaissances biologiques qui a permis de se concentrer sur un plus petit nombre de sites CpG que nous considérons biologiquement pertinents. Les résultats de la première approche ont mis en évidence, dans le tissu placentaire, une baisse de méthylation de l'ADN :

- pour le gène *ADORA2B*, en association avec une exposition pré-natale aux NO<sub>2</sub> pendant le second trimestre de grossesse,
- pour le gène *ADARB2*, en association avec une exposition pré-natale aux PM<sub>10</sub> et NO<sub>2</sub> pendant le premier trimestre de grossesse.

En revanche, nous n'avons identifié aucune association significative entre la méthylation de l'ADN et une exposition pré-natale à la température ou l'humidité relative. Ces premiers résultats sont globalement cohérents avec ceux trouvés dans la seconde approche avec *a priori*, dans laquelle nous avons également observé une baisse de la méthylation de l'ADN placentaire pour le gène *ADORA2B* en association avec une exposition pré-natale aux NO<sub>2</sub> pendant la grossesse et chacun des trois trimestres de grossesse. A notre connaissance, très peu d'études d'épidémiologie environnementale ont considéré une approche avec *a priori* telle que celle utilisée ici, originellement développée par l'équipe d'épigénétique de notre centre de recherche.

Ces travaux novateurs proposent de nouvelles voies biologiques possibles concernant les effets des expositions environnementales pendant la grossesse sur la santé en tout début de vie, mais aussi à plus long terme. De plus, bien qu'il n'y ait pas d'échantillons de réPLICATION

disponibles, la seconde approche, par des chemins différents, met en évidence des résultats similaires à la première approche. Cela conforte les résultats trouvés bien que les deux analyses ne puissent être considérées comme indépendantes.

Le gène *ADORA2B* a été associé dans la littérature à la pré-éclampsie et l'hypoxie de la femme enceinte (Acurio et al. 2014 ; Iriyama et al. 2015). D'ailleurs, un signal excessif de ce gène dans le placenta induit potentiellement une insuffisance placentaire, conduisant également à la physiopathologie de la pré-éclampsie, mais aussi à un placenta et un fœtus plus petits et enfin, à une restriction de la croissance fœtale. Bien que l'implication du gène *ADARB2* n'ait pas été étudiée à ce jour, il a été suggéré qu'il pourrait jouer un rôle régulateur l'édition de l'ARN. Il serait ainsi impliqué dans les troubles métaboliques chez l'adulte tels que la circonférence abdominale, l'indice de masse corporelle et le taux de triglycérides sériques. Bien qu'il faille être prudent, ceci pose la question d'effets possibles de la pollution atmosphérique sur la croissance de l'enfant et la survenue de troubles cardiaques ou métaboliques. Un petit nombre d'études épidémiologiques récentes ont suggéré que les niveaux de pollution atmosphérique pendant la grossesse pourraient être associés à la prise de poids dans l'enfance (Jerrett et al. 2014). Une étude toxicologique auprès de lapines gestantes a récemment suggéré un effet de l'exposition aux fumées de diesel pendant la grossesse sur les niveaux de cholestérol et de triglycérides de la génération F2 (petit fils de la lapine exposée) (Valentino et al. 2016).

Les mécanismes moléculaires pouvant expliquer les effets des expositions sur une altération de la méthylation sont encore peu connus et des recherches futures sont nécessaires.

## **2. Aspects méthodologiques**

De nombreuses études concernant les effets de l'environnement sur les issues de grossesse se sont appuyées sur des registres de naissance, qui recueillent peu de données sur les facteurs de confusion potentiels, et ont caractérisé l'exposition à partir des concentrations mesurées par les réseaux fixes de surveillance de la qualité de l'air, qui fournissent une résolution spatiale limitée.

Mes travaux de thèse reposaient sur les deux cohortes mères-enfants françaises EDEN et PELAGIE, qui présentaient l'avantage de posséder un large éventail de données sur les issues de grossesse, le déroulement de la grossesse et les caractéristiques sociodémographique et socioéconomique de la mère ; la contrepartie par rapport aux études s'appuyant sur des registres de naissance était un effectif plus limité.

### **2.1. Prise en compte des facteurs de confusion potentiels**

Grâce aux informations détaillées qu'offrent les 2 cohortes, nous avons pu ajuster sur de nombreuses covariables importantes tels que l'âge, la taille, le poids et le niveau d'éducation de la mère, mais aussi le tabagisme maternel, la saison et l'année de conception. Cependant, d'autres facteurs, tels que la consommation d'alcool ou encore le comportement alimentaire, n'ont pas pu être pris en compte, soit à cause d'un trop grand nombre de données manquantes soit parce qu'une homogénéisation dans le codage de ces variables n'était pas faisable entre EDEN et PELAGIE. Cela peut entraîner une erreur dans l'estimation des effets. Par exemple, le comportement alimentaire est différent selon les régions et probablement aussi selon qu'il fasse chaud, froid, sec ou humide.

## 2.2. Estimation des expositions

En épidémiologie environnementale, en particulier pour la pollution de l'air, l'estimation de l'exposition individuelle est un enjeu important. Il est pertinent, dans l'idéal, de prendre en compte la forte variation spatio-temporelle des polluants, ainsi que l'influence des comportements individuels sur l'exposition personnelle. L'erreur de mesure sur l'exposition peut être source de biais importants dans l'estimation des effets de la pollution de l'air sur la santé. Le modèle de dispersion ADMS-Urban utilisé dans ces travaux de thèse présente l'avantage d'estimer plus finement l'exposition maternelle à la pollution à différentes échelles spatiales et temporelles. Cependant, ce modèle d'exposition ne prend pas en compte le budget espace-temps de la femme, ni l'exposition dans l'air intérieur ce qui induit une erreur de mesure. Les niveaux de NO<sub>2</sub> dans l'air extérieur et intérieur peuvent varier, notamment du fait de l'existence de sources intérieures de NO<sub>2</sub> comme les cuisinières à gaz. Concernant les conditions météorologiques, de nombreuses études se sont basées sur les mesures d'une station météorologique unique. Bien que nos travaux présentent l'avantage de disposer d'un grand nombre de stations météo réparties sur l'ensemble du territoire français, l'exposition estimée par la station la plus proche du domicile de la femme peut ne pas refléter l'exposition à l'adresse exacte du domicile. Comme pour la pollution de l'air, les conditions climatiques mesurées en extérieur restent des indicateurs imparfaits de l'exposition personnelle, puisqu'ils ne prennent pas en compte l'exposition intérieure. On peut penser que l'erreur résultante est de type Berkson, lorsque l'exposition est mesurée au niveau de la population avec une station centrale et que les sujets sont répartis autour de la station (Armstrong 2008). Une erreur de type Berkson est donc plausible dans notre cas, puisque la même station est utilisée pour toutes les femmes qui vivent à proximité de cette station. Dans le cas spécifique d'une erreur de type Berkson, la puissance de l'étude est réduite et les

intervalles de confiance sont moins précis, mais on n'observe pas de biais dans les coefficients de régression linéaire (Zeger et al. 2000).

### **2.3. Mesure de la méthylation de l'ADN**

L'utilisation de la puce Illumina pour mesurer la méthylation de l'ADN est en plein essor et donne la possibilité d'étudier une multitude de sites CpG sur le génome. Les données issues de l'utilisation des biopuces sont soumises à de nombreuses erreurs de mesures telles que ceux liés à l'effet de lot ou de puce (« Batch effect » et « Chip effect » en anglais) (Aïssi 2015). Ces derniers ne sont pas encore bien connus et caractérisés. Des étapes de contrôle qualité et de normalisation sont nécessaires et réalisées afin de corriger une partie de ces biais avant la réalisation des analyses statistiques. Dans nos travaux, la méthode de correction et de normalisation utilisée Touleimat and Tost (2012) ne prenait pas en compte le biais potentiel lié à l'effet « Batch ». Nous avons donc ajusté nos modèles de régression sur les facteurs techniques tels que la puce et le lot afin de le minimiser. De nouvelles méthodes de correction et de normalisation sont recherchées et publiées fréquemment dans le but d'améliorer la qualité des données produites.

Si l'approche de l'épigénome entier présente l'avantage d'être une approche sans *a priori* et d'étudier la méthylation de l'ADN à grande échelle sur le génome, elle a néanmoins des conséquences en termes de comparaisons multiples et de risque d'association fortuite.

⇒ **Comment limiter les biais résultant des tests multiples dans le contexte de variables corrélées.**

D'après Dylan Aïssi, lorsque plusieurs tests statistiques sont réalisés simultanément, on s'expose à deux types d'erreurs : l'erreur de première espèce (noté  $\alpha$ , taux de faux positifs) et

l'erreur de seconde espèce (noté  $\beta$ , taux de faux négatifs). Le faux positif correspond au fait de rejeter l'hypothèse nulle testée alors qu'en réalité celle-ci est vraie. À l'inverse, le faux négatif correspond au fait de ne pas rejeter l'hypothèse nulle testée alors qu'en réalité celle-ci est fausse. Les analyses d'association à l'échelle de l'épigénome (EWAS) entraînent l'application d'une multitude de tests statistiques du fait du grand nombre de sites CpGs (environ 426 000 CpGs, multipliés par le nombre d'expositions et fenêtres considérées soit plusieurs millions de tests). Ce type d'analyse nécessite d'adopter un seuil statistique bas pour identifier une association significative et limiter les faux positifs et donc conclusions erronées. Les deux principales méthodes, utilisées pour parer à ce problème de tests multiples, se basent sur le taux d'erreur global (FWER : *Family-Wise Error Rate*) ou sur le taux de faux positifs (FDR : *False Discovery Rate*).

Parmi les FWER, la méthode de Bonferroni est la plus simple et la plus utilisée. Cette méthode consiste à corriger le seuil de significativité ( $\alpha$ ) en le divisant par le nombre de tests indépendants effectués (noté  $N$ ) :

$$\alpha' = \frac{\alpha}{N}$$

Cette méthode est efficace pour éviter les faux positifs lorsque l'on répète un très grand nombre de tests. Cependant, elle est optimale dans le cas où il y a une indépendance entre les tests réalisés. Dans les EWAS, on s'attend à ce que les sites CpG mesurés sur le génome soient corrélés selon la région à laquelle ils appartiennent. Dans cette situation, cette méthode devient trop stricte et implique une augmentation du nombre de faux négatifs soit une perte de puissance. La méthode FDR se présente comme une alternative à ce genre de problème afin de garantir un taux de faux négatifs bas. Si cette méthode semble être mieux adaptée que

celle de Bonferroni, elle ne prend malheureusement pas en compte la dépendance potentielle entre les différents sites CpG<sup>14</sup>.

Une simulation, réalisée dans le contexte de l'exposome avec 237 covariables ayant un niveau de corrélation de l'ordre de 0,12 – 0,15, a montré un taux de faux positifs très supérieur à 5 % (supérieur à 90 % en général) lorsque l'approche EWAS avec la correction de Bonferroni, ou d'autres corrections, était utilisée (Agier et al. 2016) Il apparaît donc nécessaire d'utiliser ou développer de nouvelles méthodes de correction prenant en compte cette dépendance. Des méthodes de sélection des variables ou de réduction de données semblent plus efficaces du point de vue de la limitation du taux de faux positifs.

De plus, selon leur position et leur proximité, les sites CpG sont plus ou moins corrélés. Les méthodes de régression utilisées dans ces travaux de thèse ne prennent pas en compte ce type de problème. D'ailleurs, à ce jour, il existe très peu de méthodes statistiques permettant de le faire pour les sites adjacents.

## 2.4. Caractérisation de la méthylation de l'ADN

La puce Illumina 450 K est une des premières puces à mesurer la méthylation de l'ADN au niveau du génome entier et est abordable en termes de prix. Néanmoins, elle mesure la méthylation de l'ADN seulement sur une petite portion des sites CpG du génome : moins de 2 %. Cela implique qu'il est possible de passer à côté de nombreux sites CpG potentiellement sensibles aux expositions environnementales et responsables d'une pathologie. Très récemment, une nouvelle puce a été commercialisée (Moran et al. 2016), mesurant cette fois-ci environ 850 000 sites CpG sur l'ensemble du génome. Bien que les CpGs mesurés soient mieux répartis sur gène, cela ne représente encore que 4 % de génome.

---

<sup>14</sup> Aïssi Dylan, « Épidémiologie épigénétique de biomarqueurs du risque cardio-vasculaire : intérêt de l'étude de la méthylation de l'ADN à partir d'échantillons sanguins », Thèse de doctorat en Santé Publique – génétique statistique, sous la direction de David-Alexandre Tregouet, Paris Saclay, 2015.

Le séquençage à haut débit est une autre méthode qui permet de mesurer la méthylation de l'ensemble des sites CpG du génome, et donc d'obtenir une représentation optimale du méthylome. Cependant, le coût est bien plus élevé que celui de la puce utilisée ici, ce qui aurait limité la puissance statistique, notamment dans le cadre d'études épidémiologiques où le nombre de sujets peut-être important. Bien que nous ayons un effectif plus élevé par rapport aux études publiées sur ce sujet, la puissance statistique reste *a priori* encore faible.

## 2.5. Méthylation de l'ADN dans un autre tissu

Les marques épigénétiques varient : i) d'un tissu à l'autre, chez un même individu ; ii) d'un individu à l'autre dans un même type cellulaire ; et iii) au cours du temps chez un même individu et dans un même tissu.

Le placenta est, par définition, le régulateur maître de l'environnement intra-utérin du fait de son rôle central des échanges materno-fœtaux. En s'appuyant sur le placenta, notre étude n'a pas eu besoin d'avoir recours à des cellules sanguines pour caractériser la méthylation, une des critiques majeures en épidémiologie épigénétique. En effet, un enjeu lié à l'utilisation d'échantillons de sang est la mixité de la composition cellulaire, or les différents types de cellules peuvent avoir différents niveaux de méthylation. Par ailleurs, la composition cellulaire varie entre sujets, par exemple du fait d'une infection. Une solution parfois adoptée est de corriger les analyses s'appuyant sur des prélèvements sanguins sur la composition cellulaire (Joubert et al. 2016). Le placenta paraît donc être un tissu pertinent pour l'analyse des modifications épigénétiques pendant la grossesse en lien avec les expositions environnementales, puisqu'il permet de s'affranchir de ce problème et est relativement facile à recueillir.

## 2.6. Autres mécanismes épigénétiques possibles

Il est également possible d'étudier d'autres types de mécanismes épigénétiques que la méthylation de l'ADN tels que l'ARN ou bien les protéines comme les histones. L'ADN mitochondrial (ADNmt) peut aussi présenter un nouveau mécanisme pertinent à étudier dans les effets des expositions environnementales sur les issues de grossesse. En effet, dans la cohorte de naissances ENVIRONAGE, les travaux de Janssen et al. (2015) ont mis en évidence que des modifications épigénétiques du génome mitochondrial, en particulier dans la région MT-RNR1, pourraient médier sensiblement l'association entre l'exposition aux PM<sub>2.5</sub> pendant la gestation et le contenu de l'ADNmt placentaire. Cela pourrait refléter des signes de mitophagie et la mort mitochondriale. Dans cette même cohorte, Grevendonk et al. (2016) ont montré que l'exposition à la pollution atmosphérique par les particules en début de vie joue un rôle dans l'augmentation du stress oxydatif systémique, au niveau des mitochondries, à la fois chez la mère et le fœtus. Dans deux cohortes européennes, Clemente et al. (2016) ont quant à eux établi que le contenu ADNmt pouvait être un des médiateurs de l'association entre l'exposition à la pollution de l'air (notamment NO<sub>2</sub>) et le poids de naissance.

### **3. Conclusion et perspectives**

Plusieurs prolongements à notre travail sont possibles.

**Concernant les évènements de santé** : nous avons considéré que le poids de naissance. Bien que facilement mesurable, le poids de naissance est un indicateur *a posteriori* de la croissance fœtale. Il ne permet pas de prendre en compte l'évolution de la croissance fœtale au cours de la grossesse (Slama et al. 2009). Il serait intéressant d'utiliser des mesures échographiques réalisées plusieurs fois au cours de la grossesse puisque ces données sont disponibles.

**Concernant l'analyse statistique** : une perspective intéressante, que nous avons commencée à traiter, est l'étude de la méthylation de l'ADN comme potentiel rôle médiateur des effets des expositions environnementales sur les issues de grossesse. Cela nécessite l'utilisation d'analyses de médiation (Valeri et al. 2013). Par ailleurs, il serait pertinent de prendre en compte le contexte rural/urbain, puisqu'on s'attend à ce que les expositions varient selon le milieu où l'on se trouve. Il influence également le cadre de vie et les comportements de santé des populations (Bertin 2015).

**Concernant la caractérisation des expositions** : Modéliser l'exposition aux conditions climatiques, plutôt qu'utiliser les stations les plus proches du domicile, permettrait d'avoir une estimation de l'exposition individuelle de chaque femme à l'adresse de son domicile comme pour l'exposition à la pollution de l'air. Prendre en compte le budget espace-temps et les expositions intérieures des femmes enceintes dans l'estimation des expositions environnementales, permettrait de minimiser l'erreur de mesure de l'exposition.

**Concernant la méthylation de l'ADN :** Comprendre la base biologique et les implications de ces profils de méthylation modifiés qui ne sont à l'heure actuelle pas encore très claires, de manière à mettre en œuvre de meilleures approches préventives et thérapeutiques.

La programmation épigénétique de tissus fœtaux et placentaires n'est pas seulement essentielle pour la survie, la croissance et le développement du fœtus, elle l'est également dans la programmation ultérieure de la santé.

Notre travail illustre le potentiel offert par l'épigénétique en santé environnementale, notamment pour suggérer des mécanismes d'actions des polluants environnementaux et fournir des pistes quant aux effets à long terme possibles de ces expositions. Il illustre aussi les enjeux méthodologiques et difficultés de ce champ, tant pour ce qui concerne la caractérisation des marques épigénétiques, le choix du tissu, le design d'étude, que les analyses statistiques.

Les avancées sur la compréhension des mécanismes épigénétiques et de leurs liens avec les expositions environnementales et les maladies bénéficieront à l'ensemble de la recherche médicale.



## RÉFÉRENCES

- Acurio J, Troncoso F, Bertoglia P, Salomon C, Aguayo C, Sobrevia L, Escudero C. Biomed Res Int. 2014.
- Agier L, Portengen L, Chadeau-Hyam M, Basagaña X, Giorgis-Allemand L, Siroux V, Robinson O, Vlaanderen J, González JR, Nieuwenhuijsen MJ, Vineis P, Vrijheid M, Slama R, Vermeulen R. A Systematic Comparison of Linear Regression-Based Statistical Methods to Assess Exposome-Health Associations. Environ Health Perspect. 2016 May 24.
- Aïssi Dylan, « Épidémiologie épigénétique de biomarqueurs du risque cardio-vasculaire : intérêt de l'étude de la méthylation de l'ADN à partir d'échantillons sanguins », Thèse de doctorat en Santé Publique – génétique statistique, sous la direction de David-Alexandre Tregouet, Paris Saclay, 2015.
- Althabe F, Howson CP, Kinney M, Lawn J, World Health Organization. 2012. Born too soon: the global action report on preterm birth.
- Armstrong B. 2008. Measurement error: consequences and design issues. In: Environmental Epidemiology: Study Methods and Application. New York:Oxford University Press93-112.
- Baccarelli A, Wright RO, Bollati V, Tarantini L, Litonjua AA, Suh HH, et al. 2009. Rapid DNA Methylation Changes after Exposure to Traffic Particles. Am. J. Respir. Crit. Care Med. 179:572–578.
- Banister CE, Koestler DC, Maccani MA, Padbury JF, Houseman EA, Marsit CJ. 2011. Infant growth restriction is associated with distinct patterns of DNA methylation in human placentas. Epigenetics 6:920–927;
- Barker DJP. 2006. Adult consequences of fetal growth restriction. Clin. Obstet. Gynecol. 49: 270–283.
- Barker DJP. 1995. Intrauterine programming of adult disease. Mol. Med. Today 1:418–423.
- Barker DJP. 2004. The developmental origins of adult disease. J. Am. Coll. Nutr. 23: 588S–595S.

- Barker DJP. 2007. The origins of the developmental origins theory. *J. Intern. Med.* 261:412–417.
- Barreca A. 2009. Climate Change, Humidity, and Mortality in the United States.
- Basu R, Malig B, Ostro B. 2010. High ambient temperature and the risk of preterm delivery. *Am. J. Epidemiol.* 172:1108–1117.
- Bell ML, Ebisu K, Belanger K. 2007. Ambient Air Pollution and Low Birth Weight in Connecticut and Massachusetts. *Environ. Health Perspect.* 115:1118–1124.
- Bellavia A, Urch B, Speck M, Brook RD, Scott JA, Albetti B, et al. 2013. DNA Hypomethylation, Ambient Particulate Matter, and Increased Blood Pressure: Findings From Controlled Human Exposure Experiments. *J. Am. Heart Assoc. Cardiovasc. Cerebrovasc. Dis.* 2.
- Beltran AJ, Wu J, Laurent O. 2014. Associations of Meteorology with Adverse Pregnancy Outcomes: A Systematic Review of Preeclampsia, Preterm Birth and Birth Weight. *Int. J. Environ. Res. Public. Health* 11:91–172.
- Benjamini Y, Hochberg Y. 1995. Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. *J. R. Stat. Soc. Ser. B Methodol.* 57: 289–300.
- Berger SL, Kouzarides T, Shiekhattar R, Shilatifard A. 2009. An operational definition of epigenetics. *Genes Dev.* 23:781–783.
- Berkowitz GS, Blackmore-Prince C, Lapinski RH, Savitz DA. 1998. Risk factors for preterm birth subtypes. *Epidemiol. Camb. Mass* 9: 279–285.
- Bernstein L, Pachauri RK, Reisinger A, Bernstein L, Groupe d'experts intergouvernemental sur l'évolution du climat, Équipe de rédaction principale, et al. 2013. Changements climatiques 2007: rapport de synthèse : un rapport du groupe d'experts intergouvernemental sur l'évolution du climat.
- Bertin Mélanie, « Impact des inégalités sociales et de la pollution atmosphérique sur le risque d'issues défavorable de grossesse dans la cohorte mère-enfant PELAGIE : rôle du contexte urbain-rural », Thèse de doctorat en Biologie et sciences de la santé, sous la direction de Jean-François Viel et de Cécile Chevrier, Rennes, 2015.

- Bind M-A, Lepeule J, Zanobetti A, Gasparrini A, Baccarelli AA, Coull BA, et al. 2014a. Air pollution and gene-specific methylation in the Normative Aging Study. *Epigenetics* 9:448–458.
- Bind MA, Lepeule J, Zanobetti A, Gasparrini A, Baccarelli A, Coull BA, Tarantini L, Vokonas PS, Koutrakis P, Schwartz J. Air pollution and gene-specific methylation in the Normative Aging Study: association, effect modification, and mediation analysis. *Epigenetics*. 2014 Mar; 9 (3): 448-58.
- Bind M-A, Zanobetti A, Gasparrini A, Peters A, Coull B, Baccarelli A, et al. 2014b. Effects of temperature and relative humidity on DNA methylation. *Epidemiol. Camb. Mass* 25:561–569.
- Bind M-AC, Coull BA, Peters A, Baccarelli AA, Tarantini L, Cantone L, et al. 2015. Beyond the Mean: Quantile Regression to Explore the Association of Air Pollution with Gene-Specific Methylation in the Normative Aging Study. *Environ. Health Perspect.*
- Blencowe H, Cousens S, Chou D, Oestergaard M, Say L, Moller A-B, et al. 2013. Born Too Soon: The global epidemiology of 15 million preterm births. *Reprod. Health* 10:S2.
- Blondel B, Norton J, Mazaubrun C, Breart G. 2011. Enquête nationale périnatale. Paris Inst. Natl. Santé Rech. Médicale.
- Bobak M. 2000. Outdoor air pollution, low birth weight, and prematurity. *Environ. Health Perspect.* 108: 173–176.
- Bollati V, Baccarelli A. 2010. Environmental Epigenetics. *Heredity* 105:105–112.
- Bosetti C, Nieuwenhuijsen MJ, Gallus S, Cipriani S, La Vecchia C, Parazzini F. 2010. Ambient particulate matter and preterm birth or birth weight: a review of the literature. *Arch. Toxicol.* 84:447–460.
- Brauer M, Lencar C, Tamburic L, Koehoorn M, Demers P, Karr C. 2008. A cohort study of traffic-related air pollution impacts on birth outcomes. *Environ. Health Perspect.* 116:680–686.
- Breton CV, Salam MT, Wang X, Byun H-M, Siegmund KD, Gilliland FD. 2012. Particulate Matter, DNA Methylation in Nitric Oxide Synthase, and Childhood Respiratory Disease. *Environ. Health Perspect.* 120:1320–1326.

- Breton CV, Yao J, Millstein J, Gao L, Siegmund KD, Mack W, et al. 2016. Prenatal Air Pollution Exposures, DNA Methyl Transferase Genotypes, and Associations with Newborn LINE1 and Alu Methylation and Childhood Blood Pressure and Carotid Intima-Media Thickness in the Children's Health Study. *Environ. Health Perspect.*
- Cao-Lei L, Suwansirikul S, Jutavijittum P, Mériaux SB, Turner JD, Muller CP. 2013. Glucocorticoid receptor gene expression and promoter CpG modifications throughout the human brain. *J. Psychiatr. Res.* 47:1597–1607.
- Chen L, Yang W, Jennison BL, Goodrich A, Omaye ST. 2002. Air pollution and birth weight in northern Nevada, 1991–1999. *Inhal. Toxicol.* 14:141–157.
- Chen Y, Lemire M, Choufani S, Butcher DT, Grafodatskaya D, Zanke BW, et al. 2013. Discovery of cross-reactive probes and polymorphic CpGs in the Illumina Infinium HumanMethylation450 microarray. *Epigenetics* 8:203–209.
- Chevrier C, Limon G, Monfort C, Rouget F, Garlantézec R, Petit C, et al. 2011. Urinary Biomarkers of Prenatal Atrazine Exposure and Adverse Birth Outcomes in the PELAGIE Birth Cohort. *Environ. Health Perspect.* 119:1034–1041.
- Clemente DBP, Casas M, Vilahur N, Begiristain H, Bustamante M, Carsin A-E, et al. 2016. Prenatal Ambient Air Pollution, Placental Mitochondrial DNA Content, and Birth Weight in the INMA (Spain) and ENVIRONAGE (Belgium) Birth Cohorts. *Environ. Health Perspect.* 124:659–665.
- Dadvand P, Basagaña X, Sartini C, Figueras F, Vrijheid M, de Nazelle A, et al. 2011. Climate extremes and the length of gestation. *Environ. Health Perspect.* 119:1449–1453.
- Darashchonak N, Koepsell B, Bogdanova N, von Versen-Höynck F. *BMC Pregnancy Childbirth.* 2014 Jan 3; 14:2.
- Darashchonak N, Sarisin A, Kleppa MJ, Powers RW, von Versen-Höynck F. *Placenta.* 2014 Sep; 35(9):763-71. doi: 10.1016/j.placenta.2014.06.369. Epub 2014 Jun 26.
- Darrow LA, Strickland MJ, Klein M, Waller LA, Flanders WD, Correa A, et al. 2009. Seasonality of birth and implications for temporal studies of preterm birth. *Epidemiol. Camb. Mass* 20:699–706.
- De Baere E, Fukushima Y, Small K, Udar N, Van Camp G, Verhoeven K, Palotie A, De Paepe A, Messiaen L. Identification of BPESC1, a novel gene disrupted by a balanced

chromosomal translocation, t(3;4)(q23;p15.2), in a patient with BPES. *Genomics*. 2000 Sep 15;68(3):296-304.

Deschênes O, Greenstone M, Guryan J. 2009. Climate Change and Birth Weight. *Am. Econ. Rev.* 99:211–217.

Du P, Kibbe WA, Lin SM. 2008. lumi: a pipeline for processing Illumina microarray. *Bioinforma. Oxf. Engl.* 24:1547–1548.

Edenhofer O, R. Pichs-Madruga, Y. Sokona, E. Farahani, S. Kadner, K. Seyboth, A. Adler, I. Baum, S. Brunner, P. Eickemeier, B., Kriemann JS, S. Schlömer, C. von Stechow, T. Zwickel and J.C. Minx editors. 2014. Summary for Policymakers. In: Climate Change 2014, Mitigation of Climate Change Contribution of Working Group III to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. Cambridge, United Kingdom and New York, NY, USA.: Cambridge University Press.

Egger G, Liang G, Aparicio A, Jones PA. 2004. Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. *Nature* 429:457–463.

Elichegaray C, Bouallala S, Maitre A, Ba M. 2009. [Development and current status of atmospheric pollution]. *Rev. Mal. Respir.* 26: 191–206.

Elter K, Ay E, Uyar E, Kavak ZN. 2004. Exposure to low outdoor temperature in the midtrimester is associated with low birth weight. *Aust. N. Z. J. Obstet. Gynaecol.* 44:553–557.

Flouris AD, Spiropoulos Y, Sakellariou GJ, Koutedakis Y. 2009. Effect of seasonal programming on fetal development and longevity: links with environmental temperature. *Am. J. Hum. Biol. Off. J. Hum. Biol. Counc.* 21:214–216.

Foley DL, Craig JM, Morley R, Olsson CA, Olsson CJ, Dwyer T, et al. 2009. Prospects for epigenetic epidemiology. *Am. J. Epidemiol.* 169:389–400.

Fox J, Weisberg S. 2011. Robust regression in R. In An R Companion to Applied Regression, Thousand Oaks, CA:Sage.

Gibson AT. 2007. Outcome following preterm birth. *Best Pract. Res. Clin. Obstet. Gynaecol.* 21:869–882.

- Glinianaia SV, Rankin J, Bell R, Pless-Mulloli T, Howel D. 2004. Particulate air pollution and fetal health: a systematic review of the epidemiologic evidence. *Epidemiol. Camb. Mass* 15:36–45.
- Gluckman PD, Hanson MA, Cooper C, Thornburg KL. 2008. Effect of In Utero and Early-Life Conditions on Adult Health and Disease. *N. Engl. J. Med.* 359:61–73.
- Goldberg AD, Allis CD, Bernstein E. 2007. Epigenetics: A Landscape Takes Shape. *Cell* 128:635–638.
- Goldenberg RL, Culhane JF, Iams JD, Romero R. 2008. Epidemiology and causes of preterm birth. *The Lancet* 371:75–84.
- Grenier Vanille, « Epigénétique et methylation de l'AND : Etude des mécanismes d'interaction du domaine SRA de UHRF1 avec l'ADN héri-méthylé », Thèse de doctorat en Sciences du Vivant, sous la direction de Yves Mely et Christian Bronner, Strasbourg, 2012.
- Grevendonk L, Janssen BG, Vanpoucke C, Lefebvre W, Hoxha M, Bollati V, et al. 2016. Mitochondrial oxidative DNA damage and exposure to particulate air pollution in mother-newborn pairs. *Environ. Health Glob. Access Sci. Source* 15:10.
- Grundberg E, Meduri E, Sandling JK, Hedman AK, Keildson S, Buil A, et al. 2013. Global analysis of DNA methylation variation in adipose tissue from twins reveals links to disease-associated variants in distal regulatory elements. *Am. J. Hum. Genet.* 93:876–890.
- Gruzieva O, Xu C-J, Breton CV, Annesi-Maesano I, Antó JM, Auffray C, et al. 2016. Epigenome-Wide Meta-Analysis of Methylation in Children Related to Prenatal NO<sub>2</sub> Air Pollution Exposure. *Environ. Health Perspect.*
- Guerreiro C, Leeuw F de, Foltescu V, González Ortiz A, Horálek J, European Environment Agency. 2015. Air quality in Europe 2015 report. Publications Office, Luxembourg.
- Gutierrez-Arcelus M, Lappalainen T, Montgomery SB, Buil A, Ongen H, Yurovsky A, et al. 2013. Passive and active DNA methylation and the interplay with genetic variation in gene regulation. *eLife* 2:e00523.
- Hansen C, Neller A, Williams G, Simpson R. 2006. Maternal exposure to low levels of ambient air pollution and preterm birth in Brisbane, Australia. *BJOG Int. J. Obstet. Gynaecol.* 113:935–941.

- Harrell FE. 2001. Regression modeling strategies: with applications to linear models, logistic regression, and survival analysis. New York: Springer.
- He J-R, Liu Y, Xia X-Y, Ma W-J, Lin H-L, Kan H-D, et al. 2015. Ambient Temperature and the Risk of Preterm Birth in Guangzhou, China (2001-2011). *Environ. Health Perspect.*
- Heude B, Forhan A, Slama R, Douhaud L, Bedel S, Saurel-Cubizolles M-J, et al. 2015. Cohort Profile: The EDEN mother-child cohort on the prenatal and early postnatal determinants of child health and development. *Int. J. Epidemiol.*
- Holliday R. 2006. Epigenetics: a historical overview. *Epigenetics* 1: 76–80.
- Hou L, Zhang X, Wang D, Baccarelli A. 2012. Environmental chemical exposures and human epigenetics. *Int. J. Epidemiol.* 41:79–105.
- Howson CP, Kinney M, Lawn JE, Eds. 2012. World Health Organization. M.o.D., PMNCH, and Save the Children, Born Too Soon: The Global Action Report on Preterm Birth.
- Huynh M, Woodruff TJ, Parker JD, Schoendorf KC. 2006. Relationships between air pollution and preterm birth in California. *Paediatr. Perinat. Epidemiol.* 20:454–461.
- Intergovernmental Panel on Climate Change, Edenhofer O, eds. 2014. Climate change 2014: mitigation of climate change: Working Group III contribution to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. Cambridge University Press, New York, NY.
- Iriyama T, Sun K, Parchim NF, Li J, Zhao C, Song A, Hart LA, Blackwell SC, Sibai BM, Chan LN, Chan TS, Hicks MJ, Blackburn MR, Kellems RE, Xia Y. *Circulation.* 2015 Feb 24;131(8):730-41. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.114.013740. Epub 2014 Dec 23.
- Janssen BG, Byun H-M, Gyselaers W, Lefebvre W, Baccarelli AA, Nawrot TS. 2015. Placental mitochondrial methylation and exposure to airborne particulate matter in the early life environment: An ENVIRONAGE birth cohort study. *Epigenetics* 10:536–544.
- Janssen BG, Godderis L, Pieters N, Poels K, Kiciński M, Cuypers A, et al. 2013. Placental DNA hypomethylation in association with particulate air pollution in early life. *Part Fibre Toxicol* 10: 1–11.

- Jerrett M, McConnell R, Wolch J, Chang R, Lam C, Dunton G, Gilliland F, Lurmann F, Islam T, Berhane K. Traffic-related air pollution and obesity formation in children: a longitudinal, multilevel analysis. *Environ Health*. 2014 Jun 9;13:49.
- Jia RZ, Zhang X, Hu P, Liu XM, Hua XD, Wang X, Ding HJ. *Int J Mol Med*. 2012 Jul; 30(1):133-41. doi: 10.3892/ijmm.2012.983. Epub 2012 Apr 25.
- Jirtle RL, Skinner MK. 2007. Environmental epigenomics and disease susceptibility. *Nat Rev Genet*. 8:253–262.
- Jjingo D, Conley AB, Yi SV, Lunyak VV, Jordan IK. 2012. On the presence and role of human gene-body DNA methylation. *Oncotarget* 3:462–474.
- Joubert BR, Felix JF, Yousefi P, Bakulski KM, Just AC, Breton C, Reese SE, Markunas CA, Richmond RC, Xu CJ, Küpers LK, Oh SS, Hoyo C, Gruzieva O, Söderhäll C, Salas LA, Baïz N, Zhang H, Lepeule J, Ruiz C, Ligthart S, Wang T, Taylor JA, Duijts L, Sharp GC, Jankipersadsing SA, Nilsen RM, Vaez A, Fallin MD, Hu D, Litonjua AA, Fuemmeler BF, Huen K, Kere J, Kull I, Munthe-Kaas MC, Gehring U, Bustamante M, Saurel-Coubizolles MJ, Quraishi BM, Ren J, Tost J, Gonzalez JR, Peters MJ, Håberg SE, Xu Z, van Meurs JB, Gaunt TR, Kerkhof M, Corpeleijn E, Feinberg AP, Eng C, Baccarelli AA, Benjamin Neelon SE, Bradman A, Merid SK, Bergström A, Herceg Z, Hernandez-Vargas H, Brunekreef B, Pinart M, Heude B, Ewart S, Yao J, Lemonnier N, Franco OH, Wu MC, Hofman A, McArdle W, Van der Vlies P, Falahi F, Gillman MW, Barcellos LF, Kumar A, Wickman M, Guerra S, Charles MA, Holloway J, Auffray C, Tiemeier HW, Smith GD, Postma D, Hivert MF, Eskenazi B, Vrijheid M, Arshad H, Antó JM, Dehghan A, Karmaus W, Annesi-Maesano I, Sunyer J, Ghantous A, Pershagen G, Holland N, Murphy SK, DeMeo DL, Burchard EG, Ladd-Acosta C, Snieder H, Nystad W, Koppelman GH, Relton CL, Jaddoe VW, Wilcox A, Melén E, London SJ. DNA Methylation in Newborns and Maternal Smoking in Pregnancy: Genome-wide Consortium Meta-analysis. *Am J Hum Genet*. 2016 Apr 7;98(4):680-96.
- Jones PA. 2012. Functions of DNA methylation: islands, start sites, gene bodies and beyond. *Nat Rev Genet*. 13:484–492.
- Kalkstein LS, Greene JS. 1997. An evaluation of climate/mortality relationships in large U.S. cities and the possible impacts of a climate change. *Environ Health Perspect*. 105: 84–93.

- Kannan S, Misra DP, Dvonch JT, Krishnakumar A. 2006. Exposures to Airborne Particulate Matter and Adverse Perinatal Outcomes: A Biologically Plausible Mechanistic Framework for Exploring Potential Effect Modification by Nutrition. *Environ. Health Perspect.* 114:1636–1642.
- Kloog I, Melly SJ, Coull BA, Nordio F, Schwartz JD. 2015. Using Satellite-Based Spatiotemporal Resolved Air Temperature Exposure to Study the Association between Ambient Air Temperature and Birth Outcomes in Massachusetts. *Environ. Health Perspect.* 123:1053–1058.
- Konkel L. 2016. Lasting Impact of an Ephemeral Organ: The Role of the Placenta in Fetal Programming. *Environ. Health Perspect.* 124.
- Koukoura O, SIFAKIS S, SPANDIDOS DA. 2012. DNA methylation in the human placenta and fetal growth (Review). *Mol. Med. Rep.* 5:883–889.
- Kramer MS. 2003. The Epidemiology of Adverse Pregnancy Outcomes: An Overview. *J. Nutr.* 133: 1592S–1596S.
- Künzli N, Kaiser R, Medina S, Studnicka M, Chanel O, Filliger P, et al. 2000. Public-health impact of outdoor and traffic-related air pollution: a European assessment. *The Lancet* 356:795–801.
- Laaidi M, Boumendil A, Tran T-C, Kaba H, Rozenberg P, Aegegerter P. 2011. Conséquences de la pollution de l'air sur l'issue de la grossesse : revue de la littérature. *Environ. Risques Santé* 10:287–298.
- Lajinian S, Hudson S, Applewhite L, Feldman J, Minkoff HL. 1997. An association between the heat-humidity index and preterm labor and delivery: a preliminary analysis. *Am. J. Public Health* 87: 1205–1207.
- Lander, E. S. et al. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 409, 860–921. issn : 0028-0836 (2001).
- Lawlor DA, Leon DA, Davey Smith G. 2005. The association of ambient outdoor temperature throughout pregnancy and offspring birthweight: findings from the Aberdeen Children of the 1950s cohort. *BJOG Int. J. Obstet. Gynaecol.* 112:647–657.
- Lee SJ, Hajat S, Steer PJ, Filippi V. 2008. A time-series analysis of any short-term effects of meteorological and air pollution factors on preterm births in London, UK. *Environ. Res.* 106:185–194.

- Leem J-H, Kaplan BM, Shim YK, Pohl HR, Gotway CA, Bullard SM, et al. 2006. Exposures to air pollutants during pregnancy and preterm delivery. *Environ. Health Perspect.* 114: 905–910.
- Lepeule J, Caïni F, Marquis N, Hulin A, Galineau J, Navel V, et al. 2012. Effets de l'exposition maternelle à la pollution atmosphérique sur le déroulement de la grossesse : résultats de la cohorte mère-enfant eden. *Pollut. Atmos.* 72–79.
- Lepeule J, Rondeau V, Filleul L, Dartigues J-F. 2006. Survival Analysis to Estimate Association between Short-Term Mortality and Air Pollution. *Environ. Health Perspect.* 114:242–247.
- Li G, Reinberg D. 2011. Chromatin higher-order structures and gene regulation. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 21:175–186.
- Lin VW, Baccarelli AA, Burris HH. 2016. Epigenetics—a potential mediator between air pollution and preterm birth. *Environ. Epigenetics* 2.
- Madrigano J, Baccarelli A, Mittleman MA, Wright RO, Sparrow D, Vokonas PS, et al. 2011. Prolonged exposure to particulate pollution, genes associated with glutathione pathways, and DNA methylation in a cohort of older men. *Environ. Health Perspect.* 119:977–982.
- Marlow N, Wolke D, Bracewell MA, Samara M. 2005. Neurologic and Developmental Disability at Six Years of Age after Extremely Preterm Birth. *N. Engl. J. Med.* 352:9–19.
- McGeehin MA, Mirabelli M. 2001. The potential impacts of climate variability and change on temperature-related morbidity and mortality in the United States. *Environ. Health Perspect.* 109: 185–189.
- McIntire DD, Leveno KJ. 2008. Neonatal mortality and morbidity rates in late preterm births compared with births at term. *Obstet. Gynecol.* 111:35–41.
- Meehl GA, Tebaldi C. 2004. More intense, more frequent, and longer lasting heat waves in the 21st century. *Science* 305:994–997.
- Moran S, Arribas C, Esteller M. Validation of a DNA methylation microarray for 850,000 CpG sites of the human genome enriched in enhancer sequences. *Epigenomics.* 2016 Mar;8(3):389-99.

- Moutquin J-M. 2003. Classification and heterogeneity of preterm birth. *BJOG Int. J. Obstet. Gynaecol.* 110:30–33.
- Murray LJ, O'Reilly DP, Betts N, Patterson CC, Davey Smith G, Evans AE. 2000. Season and outdoor ambient temperature: effects on birth weight. *Obstet. Gynecol.* 96: 689–695.
- Nguyen JL, Schwartz J, Dockery DW. 2014. The relationship between indoor and outdoor temperature, apparent temperature, relative humidity, and absolute humidity. *Indoor Air* 24:103–112.
- Nieuwenhuijsen M, Paustenbach D, Duarte-Davidson R. 2006. New developments in exposure assessment: The impact on the practice of health risk assessment and epidemiological studies. *Environ. Int.* 32:996–1009.
- Oguro R, Kamide K, Katsuya T, Akasaka H, Sugimoto K, Congrains A, Arai Y, Hirose N, Saitoh S, Ohishi M, Miura T, Rakugi H. A single nucleotide polymorphism of the adenosine deaminase, RNA-specific gene is associated with the serum triglyceride level, abdominal circumference, and serum adiponectin concentration. *Exp Gerontol.* 2012 Feb; 47(2):183-7.
- Olsson D, Ekström M, Forsberg B. 2012. Temporal variation in air pollution concentrations and preterm birth-a population based epidemiological study. *Int. J. Environ. Res. Public. Health* 9:272–285.
- OMS a | 7 millions de décès prématurés sont liés à la pollution de l'air chaque année. WHO. Available: <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2014/air-pollution/fr/> [accessed 10 August 2016a].
- OMS b| L'insalubrité de l'environnement provoque 12,6 millions de décès par an. WHO. Available: <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2016/deaths-attributable-to-unhealthy-environments/fr/> [accessed 10 August 2016b].
- Panasevich S, Håberg SE, Aamodt G, London SJ, Stigum H, Nystad W, et al. 2016. Association between pregnancy exposure to air pollution and birth weight in selected areas of Norway. *Arch. Public Health* 74:26.
- Panni T, Mehta AJ, Schwartz JD, Baccarelli AA, Just AC, Wolf K, et al. 2016. A Genome-Wide Analysis of DNA Methylation and Fine Particulate Matter Air Pollution in

Three Study Populations: KORA F3, KORA F4, and the Normative Aging Study. *Environ. Health Perspect.*

Patz JA, Githeko AK, Hussein S, Confalonieri U, de Wet N. 2003. Climate Change and Human Health - Risk and Responses. In *Climate Change and Infectious Diseases*, Vol. Chapter 6 of, pp. 103–132, World Health Organization, Geneva, Switzerland.

Pedersen M, Giorgis-Allemand L, Bernard C, Aguilera I, Andersen A-MN, Ballester F, et al. 2013. Ambient air pollution and low birthweight: a European cohort study (ESCAPE). *Lancet Respir. Med.* 1:695–704.

Philippat Claire, « Utilisation des biomarqueurs d'exposition en épidémiologie environnementale; application à l'étude des effets des expositions intra-utérines aux phénols et aux phtalates sur la croissance pré- et post-natale, Thèse de doctorat en Ingénierie pour la santé, la cognition, l'environnement, sous la direction de Remy Slama et de Isabelle Pin, Grenoble, 2013.

Philippat C, Mortamais M, Chevrier C, Petit C, Calafat AM, Ye X, et al. 2012. Exposure to phthalates and phenols during pregnancy and offspring size at birth. *Environ. Health Perspect.* 120:464–470.

Price EM, Cotton AM, Lam LL, Farré P, Emberly E, Brown CJ, et al. 2013. Additional annotation enhances potential for biologically-relevant analysis of the Illumina Infinium HumanMethylation450 BeadChip array. *Epigenetics Chromatin* 6:4.

Prüss-Üstün A, Corvalán CF. 2006. Preventing disease through healthy environments : towards an estimate of the environmental burden of disease. Geneva : World Health Organization.

Rauch SA, Braun JM, Barr DB, Calafat AM, Khoury J, Montesano MA, et al. 2012. Associations of Prenatal Exposure to Organophosphate Pesticide Metabolites with Gestational Age and Birth Weight. *Environ. Health Perspect.* 120:1055–1060.

Ritz B, Wilhelm M, Hoggatt KJ, Ghosh JKC. 2007. Ambient air pollution and preterm birth in the environment and pregnancy outcomes study at the University of California, Los Angeles. *Am. J. Epidemiol.* 166:1045–1052.

Ritz B, Yu F, Chapa G, Fruin S. 2000. Effect of air pollution on preterm birth among children born in Southern California between 1989 and 1993. *Epidemiol. Camb. Mass* 11: 502–511.

- Rylander C, Odland JØ, Sandanger TM. 2013. Climate change and the potential effects on maternal and pregnancy outcomes: an assessment of the most vulnerable — the mother, fetus, and newborn child. *Glob. Health Action* 6.
- Salam MT, Millstein J, Li Y-F, Lurmann FW, Margolis HG, Gilliland FD. 2005. Birth Outcomes and Prenatal Exposure to Ozone, Carbon Monoxide, and Particulate Matter: Results from the Children's Health Study. *Environ. Health Perspect.* 113:1638–1644.
- Schifano P, Lallo A, Asta F, De Sario M, Davoli M, Michelozzi P. 2013. Effect of ambient temperature and air pollutants on the risk of preterm birth, Rome 2001–2010. *Environ. Int.* 61:77–87.
- Schwartz J. 2000. The distributed lag between air pollution and daily deaths. *Epidemiol. Camb. Mass* 11: 320–326.
- Schwartz J. 2005. Who is sensitive to extremes of temperature?: A case-only analysis. *Epidemiol. Camb. Mass* 16: 67–72.
- Sellier Y, Galineau J, Hulin A, Caini F, Marquis N, Navel V, et al. 2014. Health effects of ambient air pollution: do different methods for estimating exposure lead to different results? *Environ. Int.* 66:165–173.
- Shah PS, Balkhair T, Knowledge Synthesis Group on Determinants of Preterm/LBW births. 2011. Air pollution and birth outcomes: a systematic review. *Environ. Int.* 37:498–516.
- Slama R, Darrow L, Parker J, Woodruff TJ, Strickland M, Nieuwenhuijsen M, et al. 2008. Meeting report: atmospheric pollution and human reproduction. *Environ. Health Perspect.* 116:791–798.
- Slama R, Werwatz A. 2005. Controlling for continuous confounding factors: non- and semiparametric approaches. *Rev. D'épidémiologie Santé Publique* 53 Spec No 2: 2S65-80.
- Srám RJ, Binková B, Dejmek J, Bobak M. 2005. Ambient air pollution and pregnancy outcomes: a review of the literature. *Environ. Health Perspect.* 113: 375–382.
- Slama R, Ballester F, Casas M, Cordier S, Eggesbø M, Iniguez C, et al. 2014. Epidemiologic tools to study the influence of environmental factors on fecundity and pregnancy-related outcomes. *Epidemiol. Rev.* 36:148–164.

- Stieb DM, Chen L, Eshoul M, Judek S. 2012. Ambient air pollution, birth weight and preterm birth: a systematic review and meta-analysis. *Environ. Res.* 117:100–111.
- Strand LB, Barnett AG, Tong S. 2012. Maternal exposure to ambient temperature and the risks of preterm birth and stillbirth in Brisbane, Australia. *Am. J. Epidemiol.* 175:99–107.
- Strand LB, Barnett AG, Tong S. 2011. The influence of season and ambient temperature on birth outcomes: A review of the epidemiological literature. *Environ. Res.* 111:451–462.
- Touleimat N, Tost J. 2012. Complete pipeline for Infinium® Human Methylation 450K BeadChip data processing using subset quantile normalization for accurate DNA methylation estimation. *Epigenomics* 4:325–341.
- Vadillo-Ortega F, Osornio-Vargas A, Buxton MA, Sánchez BN, Rojas-Bracho L, Viveros-Alcaráz M, et al. 2014. Air pollution, inflammation and preterm birth: a potential mechanistic link. *Med. Hypotheses* 82:219–224.
- Valentino SA, Tarrade A, Aioun J, Mourier E, Richard C, Dahirel M, Rousseau-Ralliard D, Fournier N, Aubrière MC, Lallemand MS, Camous S, Guinot M, Charlier M, Aujean E, Al Adhami H, Fokkens PH, Agier L, Boere JA, Cassee FR, Slama R, Chavatte-Palmer P. Maternal exposure to diluted diesel engine exhaust alters placental function and induces intergenerational effects in rabbits. *Part Fibre Toxicol.* 2016 Jul 26;13(1):39.
- Valeri L, Vanderweele TJ. 2013. Mediation analysis allowing for exposure-mediator interactions and causal interpretation: theoretical assumptions and implementation with SAS and SPSS macros. *Psychol. Methods* 18:137–150
- Valero De Bernabé J, Soriano T, Albaladejo R, Juarranz M, Calle ME, Martínez D, et al. 2004. Risk factors for low birth weight: a review. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 116:3–15.
- van den Hooven EH, Pierik FH, de Kluizenaar Y, Willemsen SP, Hofman A, van Ratingen SW, et al. 2012. Air pollution exposure during pregnancy, ultrasound measures of fetal growth, and adverse birth outcomes: a prospective cohort study. *Environ. Health Perspect.* 120:150–156.

- van Eijk KR, de Jong S, Boks MP, Langeveld T, Colas F, Veldink JH, et al. 2012. Genetic analysis of DNA methylation and gene expression levels in whole blood of healthy human subjects. *BMC Genomics* 13:636.
- Vicedo-Cabrera AM, Iñiguez C, Barona C, Ballester F. 2014. Exposure to elevated temperatures and risk of preterm birth in Valencia, Spain. *Environ. Res.* 134:210–217.
- Wardlaw TM. 2004. Low Birthweight: Country, Regional and Global Estimates. UNICEF.
- Waterland RA, Michels KB. 2007. Epigenetic epidemiology of the developmental origins hypothesis. *Annu. Rev. Nutr.* 27:363–388.
- Wells JCK, Cole TJ. 2002. Birth weight and environmental heat load: a between-population analysis. *Am. J. Phys. Anthropol.* 119:276–282.
- Wilcox AJ. Fertility and Pregnancy: An Epidemiologic Perspective. New York, NY: Oxford University Press, Inc; 2010.
- Wolf J, Armstrong B. 2012. The Association of Season and Temperature with Adverse Pregnancy Outcome in Two German States, a Time-Series Analysis. *PLoS ONE* 7:e40228.
- Wood SN, Augustin NH. 2002. GAMs with integrated model selection using penalized regression splines and applications to environmental modelling. *Ecol. Model.* 157: 157–177.
- Woodward A, Smith KR, Campbell-Lendrum D, Chadee DD, Honda Y, Liu Q, et al. 2014. Climate change and health: on the latest IPCC report. *Lancet Lond. Engl.* 383:1185–1189.
- World Health Organization and World Meteorological Organization. 2012. Atlas of Health and Climate. WHO Press; Geneva, Switzerland.
- World Health Organization. 2012. In: M.o.D., PMNCH, and Save the Children, Born Too Soon: The Global Action Report on Preterm Birth. Howson C.P., Kinney M.V., Lawn J.E., editors. WHO; Geneva, Switzerland.
- Wu J, Wilhelm M, Chung J, Ritz B. 2011. Comparing exposure assessment methods for traffic-related air pollution in an adverse pregnancy outcome study. *Environ. Res.* 111:685–692.

- Xu X, Ding H, Wang X. 1995. Acute effects of total suspended particles and sulfur dioxides on preterm delivery: a community-based cohort study. *Arch. Environ. Health* 50:407–415.
- Yang AS, Estécio MRH, Doshi K, Kondo Y, Tajara EH, Issa J-PJ. 2004. A simple method for estimating global DNA methylation using bisulfite PCR of repetitive DNA elements. *Nucleic Acids Res.* 32:e38.
- Yang C-Y, Tseng Y-T, Chang C-C. 2003. Effects of air pollution on birth weight among children born between 1995 and 1997 in Kaohsiung, Taiwan. *J. Toxicol. Environ. Health A* 66:807–816.
- Yurdakök K. 2013. Ambient air pollution and the fetus. *J. Pediatr. Neonatal Individ. Med. JPNIM* 2: e020232.
- Zeger SL, Thomas D, Dominici F, Samet JM, Schwartz J, Dockery D, et al. 2000. Exposure measurement error in time-series studies of air pollution: concepts and consequences. *Environ. Health Perspect.* 108: 419–426.
- Zhao N, Bell DA, Maity A, Staicu A-M, Joubert BR, London SJ, et al. 2015. Global Analysis of Methylation Profiles From High Resolution CpG Data. *Genet. Epidemiol.* 39:53–64.



# **Associations between environmental exposures and firstly pregnancy outcomes and secondly placental DNA methylation**

---

## **Abstract**

Nowadays, air pollution and weather conditions represent a major public health issue. It is recognized that they may have serious consequences for health especially in the most sensitive populations such as pregnant women. More recent studies have suggested an effect of exposure to these environmental factors during the fetal period. Fetal life is a critical period for the healthy development of the child. Maternal exposure to environmental exposures during pregnancy could have serious consequences on pregnancy outcomes and short- and long- term health. Furthermore, the biological mechanisms that could explain the effect of environmental exposures on adverse pregnancy outcomes are largely unknown up to now. The objectives of the thesis were: 1) to study the association between maternal exposure to temperature and relative humidity during pregnancy and birth weight, gestational duration and preterm birth; 2) to study the association between maternal exposure to air pollutants and meteorological conditions during pregnancy and placental DNA methylation using A) an agnostic approach and B) a priori approach based on integration of biological knowledge. The first part of this work relied on data from two mother-child cohorts EDEN (Poitiers and Nancy, 2003-2006) and PELAGIE (Britain, 2002-2006) corresponding to 5185 mother-infant pairs analyzed; and the second part relied on a sample of the EDEN cohort for which methylation data were available ( $n = 668$ ). Daily data of temperature and humidity were obtained from Météo-France and pollution data were obtained using a dispersion model. Their exposure was averaged over different periods during pregnancy. Central placenta samples were collected at delivery and DNA methylation was analyzed using Illumina 450K chip. For the first objective, linear regression models and Cox models were used. For the second objective, robust linear regression models, especially across the genome-wide, were used and correction methods for multiple testing such as Bonferroni and Benjamini-Hochberg were applied. Our results suggest a deleterious effect of temperature and relative humidity on birth weight and did not show an association between air pollution and pregnancy outcomes. Exposure to air pollutants (NO<sub>2</sub> and PM10) during pregnancy was associated with a decrease in placental DNA methylation for ADORA2B and ADARB2 genes; the first gene is known to be potentially involved in preeclampsia and hypoxia of the pregnant woman and the second being potentially involved in metabolic disorders in adults such as abdominal circumference and BMI. The results of agnostic and *a priori* approaches were consistent for ADORA2B gene. We did not find association between weather conditions and placental DNA methylation. To our knowledge, we are the first to study the association between DNA methylation in the placental tissue and prenatal exposure to air pollutants and weather conditions using data from the entire epigenome. This work opens up new possible pathways regarding mechanisms of action of environmental pollutants and provides pointers as to the possible long-term effects of these exposures.

***Key words:*** *temperature, humidity, ambient air pollution, pregnancy outcomes, birth weight, preterm birth, gestational duration, epigenetic, DNA methylation, EWAS.*

# Associations entre les expositions environnementales et les issues de grossesse d'une part et la méthylation de l'ADN placentaire d'autre part

---

## Résumé

La pollution atmosphérique et les événements météorologiques sont reconnus pour avoir des graves conséquences sur la santé telles que la mortalité cardiovasculaire et respiratoire, et par conséquent représentent un enjeu majeur de santé publique. Des travaux plus récents ont suggéré un effet des expositions à ces facteurs environnementaux durant la période intra-utérine. La vie fœtale est déterminante pour le bon développement de l'enfant. L'exposition maternelle aux facteurs environnementaux pendant la grossesse pourrait avoir des conséquences sur les issues de grossesse et la santé à court ou long terme. Par ailleurs, les mécanismes biologiques qui pourraient expliquer l'effet des expositions environnementales sur les issues de grossesse indésirables sont à l'heure actuelle très peu connus. Les objectifs de la thèse étaient : 1) d'étudier les associations entre d'une part la température et l'humidité relative pendant la grossesse et d'autre part le poids de naissance, la durée de gestation et la prématurité ; 2) d'étudier les associations entre l'exposition maternelle aux polluant de l'air et aux événements météorologiques pendant la grossesse et la méthylation de l'ADN placentaire en utilisant A) une approche agnostique et B) une approche avec *a priori* basée sur l'intégration de connaissances biologiques. Le premier objectif s'est appuyé les données issues de deux cohortes mère-enfant, EDEN (avec un recrutement à Poitiers et Nancy en 2003-2006) et PELAGIE (Bretagne, 2002-2006) soit au total 5185 couples mère-enfant ; le deuxième objectif s'est appuyé sur un échantillon de 668 femmes de la cohorte EDEN chez qui le placenta a été prélevé et le niveau de méthylation de son ADN caractérisé. Les données quotidiennes de température et d'humidité ont été obtenues de Météo-France et l'exposition à la pollution atmosphérique a été estimée par un modèle de dispersion atmosphérique. Différentes fenêtres d'exposition au cours de la grossesse ont été considérées. Des échantillons de placenta centraux ont été collectés à l'accouchement et la méthylation de l'ADN a été analysée en utilisant la puce Illumina 450K. Pour répondre au premier objectif, des modèles de régression linéaire et des modèles de Cox ont été réalisés. Pour répondre au second objectif, des modèles de régression linéaire robuste, notamment à l'échelle du génome entier, ont été réalisés en appliquant des méthodes de correction de tests multiples telles que Bonferroni et Benjamini-Hochberg. Nos résultats suggèrent un effet délétère de la température et l'humidité sur le poids de naissance et ne mettent pas en évidence d'association entre pollution atmosphérique et issues de grossesse. L'exposition aux polluants atmosphériques ( $\text{NO}_2$  et  $\text{PM}_{10}$ ) pendant la grossesse était associée à une diminution de la méthylation de l'ADN placentaire pour les gènes *ADORA2B* et *ADARB2* ; le premier gène étant connu pour être potentiellement impliqué dans la pré-éclampsie et l'hypoxie de la femme enceinte et le deuxième étant potentiellement impliqué dans les troubles métaboliques chez l'adulte tels que la circonférence abdominale et l'IMC. Les résultats des approches agnostique et avec *a priori* étaient cohérents pour le gène *ADORA2B*. Nous n'avons pas identifié d'association entre les conditions météorologiques et la méthylation de l'ADN placentaire. A notre connaissance, nous sommes les premiers à avoir étudié l'association entre la méthylation de l'ADN dans le tissu placentaire et l'exposition prénatale aux polluants de l'air et aux conditions météorologiques en utilisant des données de l'épigénome entier. Ce travail de thèse ouvre de nouvelles voies possibles concernant les mécanismes d'actions des polluants environnementaux et fournit des pistes quant aux effets à long terme possibles de ces expositions.

*Mots-clés : température, humidité, pollution atmosphérique, issues de grossesse, poids de naissance, prématurité, durée de gestation, épigénétique, méthylation de l'ADN, EWAS.*