



HAL
open science

Impact de l'exposition in utero aux pesticides sur les fonctions neurophysiologiques du nouveau-né prématuré

Tchamba Christelle Kouakam

► To cite this version:

Tchamba Christelle Kouakam. Impact de l'exposition in utero aux pesticides sur les fonctions neurophysiologiques du nouveau-né prématuré. Sciences agricoles. Université de Picardie Jules Verne, 2018. Français. NNT : 2018AMIE0006 . tel-03647583

HAL Id: tel-03647583

<https://theses.hal.science/tel-03647583>

Submitted on 20 Apr 2022

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 de Doctorat

*Mention Biologie Santé
Spécialité Physiologie Humaine*

Présentée à *l'Ecole Doctorale en Sciences Technologie et Santé (ED 585)*

de l'Université de Picardie Jules Verne

par

Tchamba Christelle Kouakam

pour obtenir le grade de Docteur de l'Université de Picardie Jules Verne

*Impact de l'exposition in utero aux pesticides sur les
fonctions neurophysiologiques du nouveau-né prématuré*

Soutenue le 12 juillet 2018, après avis des rapporteurs, devant le jury d'examen :

M. L. Storme, Professeur

M. S. Mortaud, Professeur

M^{me} C. Jaffré, Professeur

M^{me} F. Cayetanot, Maître de Conférences

M^{me} K. Chardon, Professeur

M. E. Stephan-Blanchard, Maître de Conférences

Rapporteur

Rapporteur

Examineur

Examineur

Directeur de thèse

Co-encadrant



Ils ont contribué à façonner la personne que je suis aujourd'hui, m'ont donné les clés pour continuer à évoluer et déterminer celle que je serai demain.

À mes parents, Brigitte et Joseph KOUAKAM,

À ma sœur et à mes frères, Estelle, Jean-Jacques et Yannis,

À toute ma famille et mes amis,

À celle dont la passion de la recherche m'a inspirée, « Tata » Docteur Marie-Madeleine GIMOU.

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier chaleureusement mes directeurs de thèse, Madame la Professeure Karen Chardon et Monsieur le Docteur Erwan Stephan-Blanchard. Merci de m'avoir accompagnée toutes ces années, de la première à la dernière minute et de votre disponibilité. Votre complémentarité ainsi que vos nombreux conseils ont permis de rendre mon travail bien plus facile et qui plus est dans une ambiance très agréable, j'espère que vous continuerez à travailler ensemble pour le plus grand bonheur de vos futurs doctorants.

J'exprime ma profonde gratitude à Messieurs les Professeurs Laurent STORME et Stéphane MORTAUD pour avoir accepté de juger ce travail. Je souhaite également remercier Madame le Docteur Florence CAYETANOT et le Docteur André LÉKÉ d'avoir accepté d'être membre du jury. Je remercie sincèrement Madame la Professeure Christelle JAFFRÉ de m'avoir fait l'honneur de présider ce jury.

Je remercie très sincèrement Madame la Professeure Véronique Bach, de m'avoir accueillie au sein du laboratoire Péritox-Ineris et qui malgré un emploi du temps très chargé, reste disponible pour l'ensemble des doctorants.

Je tiens à exprimer à Monsieur Stéphane Delanaud, toute l'estime que j'ai pour lui. Premièrement en tant qu'ingénieur, car rien n'aurait été possible sans lui. Ce « Mac Gyver » des temps modernes associé à des compétences techniques inestimables font de lui un des piliers de ce laboratoire. Mais il y a aussi Stéphane l'Homme, cette personne qui laisse tout tomber lorsque vous avez besoin de lui, une oreille attentive au quotidien et d'une justesse remarquable.

Un Stéphane pouvant en cacher un autre, cette fois c'est à Monsieur Stéphane Personne que j'exprime ma profonde gratitude. Son aide précieuse pendant toute la durée de la réalisation des dosages des pesticides aura été déterminante. Je le remercie tout

particulièrement d'avoir chaque semaine trouvé le temps entre sa propre thèse et son travail, de m'expliquer encore et encore ce qui allait me permettre d'atteindre un objectif primordial de ma thèse. Je suis très heureuse de le compter parmi mes amis.

J'adresse mes profonds remerciements aux Docteurs Walaa Darwiche et Julie Reygner pour tous ces bons moments partagés et dont je suis sûre qu'il y en aura beaucoup d'autres, pour leurs conseils tout au long de la thèse et jusqu'au jour de la soutenance.

Je souhaiterais également remercier l'ensemble des doctorants et anciens doctorants avec qui on ne s'ennuyait pas : Marina, Marion, Dimitri, Hiba et Aymar. Avec une mention spéciale pour Fatima dont la gentillesse et la bienveillance m'ont accompagnée jusqu'au bout.

J'adresse mes remerciements à tous les stagiaires Myriam, Alexandre, Eva, Marie-Charlotte et Céline qui à travers leur implication et leur sérieux tout au long de leur stage ont contribué de manière significative à faire avancer ce projet. Je leur souhaite le meilleur pour la suite, et je ne doute pas qu'ils atteindront les objectifs qu'ils se sont fixés.

Je remercie chaleureusement Monsieur le Professeur Frédéric TELLIEZ pour sa bienveillance, ses encouragements, son enthousiasme et sa bonne humeur, ainsi que l'ensemble des membres de l'Institut d'Ingénierie de la Santé pour leur gentillesse tout au long de mon monitorat.

Bien qu'il me soit impossible de remercier tout le monde, j'exprime toute ma reconnaissance à l'ensemble de l'équipe du laboratoire Pérیتox-Ineris. Notamment Monsieur le Professeur Jean-Pierre LIBERT pour son immense expérience et son humour qu'il aime partager avec tous, à Dorothée MAKAREWICZ de m'avoir suivie, aidée et pour sa gentillesse pendant toutes ces années. Un grand merci également à Aurélie CORONA pour son aide, ses conseils

techniques et ses mots bienveillants et rassurants pendant toute la durée des dosages, ainsi qu'au Docteur Jérôme GAY. En effet, je n'ai pas oublié cette rencontre du mois d'avril 2013 qui aura été déterminante et sans laquelle je n'en serais peut être pas là aujourd'hui.

Je tiens aussi à exprimer ma reconnaissance au Docteur Estelle DURAND, car je peux aujourd'hui affirmer qu'elle a joué ce rôle de guide dont j'avais besoin pour dessiner les contours de mon après thèse. Grâce à sa vision globale de l'ensemble des acteurs de la recherche, sa connaissance du monde associatif, mais aussi des qualités telles que la rigueur, l'action et la curiosité, ont fait qu'il m'était impossible d'entrer dans son bureau avec une question et d'en ressortir sans une réponse claire ou plusieurs pistes de recherches.

Je remercie également le Docteur Paulo MARCELO et tous les membres de la plateforme d'Ingénierie Cellulaire et Analyses des Protéines pour m'avoir accueillie et permis de réaliser l'ensemble des dosages de pesticides.

Je tiens à remercier les médecins pédiatres André LÉKÉ, Pierre TOURNEUX, Guy KONGOLO, Eléonore CARPENTIER, Yasser MOUSSA et l'ensemble des médecins et internes des services de Soins Intensifs de Néonatalogie et Médecine Néonatale, de Réanimation Pédiatrique et de Surveillance Continue de Pédiatrie pour leur implication lors des inclusions des nouveau-nés, et d'avoir permis que les explorations se déroulent dans de bonnes conditions.

Je tiens particulièrement à remercier l'ensemble des infirmières et aides soignantes pour leur investissement au quotidien et leur rôle clé dans le recueil du méconium des nouveau-nés. Ce travail d'équipe entre le laboratoire et le CHU Amiens-Picardie a été la clé de la réussite de cette thèse. Merci pour le travail énorme effectué chaque jour pour prendre soin, avec une immense bienveillance de tous ces petits bébés.

Enfin, j'aimerais terminer ces remerciements en exprimant ma sincère reconnaissance aux parents qui ont accepté de faire participer leurs enfants à cette étude, sans qui ce travail n'aurait pas pu être réalisé.

PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS

PUBLICATIONS

- ❖ The hypoxic test in preterm neonates reinvestigated.
C. Kouakam, E. Stephan-Blanchard, A. Léké, G. Kongolo, E. Haraux, S. Delanaud, F. Telliez, K. Chardon.
Pediatric Pulmonology 2018 Apr; 53(4):483-491

- ❖ Isolated hypospadias: impact of prenatal exposure to pesticides determined by meconium analysis.
E. Haraux, P. Tourneux, **C. Kouakam**, E. Stephan-Blanchard, B. Boudaillez, A. Léké, C. Klein, K. Chardon.
Environment international 2018 Oct; 119:20-25

COMMUNICATIONS

Orales

- ❖ Impact du sommeil sur la réponse ventilatoire à l'hypoxie chez le nouveau-né prématuré : résultats préliminaires.
C. Kouakam, E. Stephan-Blanchard, A. Léké, S. Delanaud, K. Chardon.
Journée Jeunes Chercheurs (JJC) – AMIENS 2016.

- ❖ Ventilatory response to hypoxia during sleep in preterm neonates.
C. Kouakam, E. Stephan-Blanchard, A. Léké, G. Kongolo, S. Delanaud, F. Telliez, K. Chardon.
23rd Congress of the European Sleep Research Society (ESRS) – BOLOGNE 2016.

Poster

- ❖ Réponse ventilatoire à un test hypoxique pendant le sommeil chez le nouveau-né prématuré : résultats préliminaires d'une nouvelle méthode d'analyse.
C. Kouakam, K. Chardon, E. Stephan-Blanchard, S. Delanaud, A. Léké.
4^{ème} Journée Amiénoise de Recherche en Santé (JARS) – AMIENS 2015.

- ❖ Ventilatory response to hypoxia during sleep in premature neonates: preliminary results.
C. Kouakam, E. Stephan-Blanchard, A. Léké, S. Delanaud, K. Chardon.
19th annual meeting of the LARC-Neuroscience network – AMIENS 2015.

- ❖ Réponse ventilatoire à un test hypoxique pendant le sommeil chez le nouveau-né prématuré : résultats préliminaires.
C. Kouakam, E. Stephan-Blanchard, A. Léké, S. Delanaud, K. Chardon.
Congrès du sommeil – NANTES 2015.
- ❖ Impact du sommeil sur la réponse ventilatoire à l'hypoxie chez le nouveau-né prématuré.
C. Kouakam, E. Stephan-Blanchard, A. Léké, S. Delanaud, K. Chardon.
Journée Jeunes Chercheurs (JJC) – REIMS 2017.
- ❖ Impact du sommeil sur la réponse ventilatoire à l'hypoxie chez le nouveau-né prématuré.
C. Kouakam, E. Stephan-Blanchard, A. Léké, S. Delanaud, K. Chardon.
Sleep and breathing – MARSEILLE 2017.

Concours

- ❖ Finaliste nationale du concours international de vulgarisation scientifique « Ma thèse en 180 secondes », organisé par le Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS) et la Conférence des Présidents d'Université (CPU) – TOULOUSE 2018.

Communications en radio et télévision

- ❖ France inter – émission « La tête au carré » du 1^{er} juin 2018 présentée par Mathieu Vidard
- ❖ Arte – émission « 28 minutes » du 29 juin 2018 présentée par Elizabeth Quin

SOMMAIRE

REMERCIEMENTS	3
PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS	6
SOMMAIRE DES FIGURES	13
SOMMAIRE DES TABLEAUX	16
ABREVIATIONS	18
Introduction générale	21
Chapitre 1 : Contrôle cardio-ventilatoire et sommeil du nouveau-né prématuré	24
1 Ventilation du nouveau-né	24
1.1 Caractéristiques ventilatoires du nouveau-né prématuré.....	24
1.1.1 Les paramètres ventilatoires.....	24
1.1.2 Les évènements cardioventilatoires.....	25
1.2 Systèmes de contrôle de la ventilation	29
1.2.1 Groupe respiratoire bulbaire.....	32
1.2.2 Groupe respiratoire pontique	34
1.3 Contrôle chimique de la ventilation	34
1.3.1 Chémorécepteurs centraux.....	35
1.3.2 Chémorécepteurs périphériques	36
1.3.3 Fonctions des chémorécepteurs périphériques.....	41
2 Le système cardiovasculaire du nouveau-né prématuré	42
2.1 Développement des paramètres cardiovasculaires	42
2.1.1 La fréquence cardiaque	42
2.1.2 La pression artérielle	43
2.2 Le contrôle cardiovasculaire.....	44
2.2.1 Le système nerveux autonome	44
2.2.2 Contrôle autonome cardiaque	45
2.3 Relation entre le système cardiovasculaire et respiratoire	46
3 Le sommeil du nouveau-né prématuré	48
3.1 Caractéristiques.....	48
3.2 Développement des états de veille/sommeil.....	49
3.3 Influence des stades de sommeil sur les paramètres cardio-ventilatoires.....	50
3.3.1 Impact sur les paramètres ventilatoires.....	50
3.3.2 Impact sur le contrôle de la ventilation	51
3.3.3 Impact sur la fréquence cardiaque et la variabilité du rythme cardiaque	52

Chapitre 2 : Exposition maternelle aux pesticides et santé périnatale	53
1 Utilisation des pesticides.....	53
1.1 Usage agricole	54
1.2 Usage non agricole	58
1.3 Usage domestique.....	59
2 Classification des différentes familles de pesticides	60
2.1 En fonction de l'utilisation.....	61
2.1.1 Les herbicides	61
2.1.2 Les insecticides	62
2.1.3 Les fongicides	62
2.2 En fonction de la structure chimique	62
2.2.1 Les organochlorés.....	63
2.2.2 Les organophosphorés	63
2.2.3 Les carbamates.....	64
2.2.4 Les pyréthrinoïdes	65
2.2.5 Les phénylurées.....	65
3 Exposition humaine aux pesticides.....	66
3.1 Dispersion des pesticides	66
3.2 Exposition aux pesticides	67
3.2.1 Modes d'exposition	67
3.2.2 Voies d'entrée des pesticides.....	68
3.2.3 Types d'exposition.....	68
3.2.4 Imprégnation fœtale aux pesticides et quantification	69
4 Impact de l'exposition <i>in utero</i> aux pesticides sur les fonctions physiologiques.....	71
4.1 Effets sur les paramètres anthropométriques	71
4.2 Effets sur le système nerveux (central et périphérique).....	71
4.3 Impact sur le sommeil	75
4.4 Impact sur la ventilation.....	76
5 But du travail.....	77
Chapitre 3 : Matériels et méthodes	78
1 Lieu et conditions d'exploration	78
1.1 Recrutement des sujets, comité d'éthique	78
1.2 Protocole général et déroulement des explorations	79
2 Présentation de la plateforme d'exploration	80
3 Exploration du sommeil : polysomnographie.....	81
3.1 Signaux et enregistrements.....	81

3.1.1	Les signaux hypniques	81
3.1.2	Les signaux cardio-respiratoires	82
3.2	Les paramètres hypniques	83
3.2.1	Décodage des stades de sommeil	83
3.2.2	Paramètres hypniques.....	85
3.3	Désaturations indépendantes	85
3.4	Apnées.....	86
3.5	Respirations périodiques.....	88
4	Développement de la plateforme d'exploration de la chémoréception périphérique	89
4.1	Matériel et adaptation du logiciel au test hypoxique	90
4.2	Déroulement du test hypoxique	91
4.3	Méthode d'analyse de la ventilation et de la réponse à l'hypoxie	92
4.3.1	Période normoxique : ventilation de base	93
4.3.2	Période hypoxique : mesure de l'activité des chémorécepteurs périphériques	94
4.3.3	Validation de la méthode d'analyse de la réponse ventilatoire hypoxique.....	95
5	Evaluation de l'activité du système nerveux autonome	97
5.1	Paramètres temporels.....	98
5.2	Paramètres fréquentiels.....	98
6	Bilan des paramètres étudiés.....	99
-	Ventilation minute (V_E , mL.kg ⁻¹ .min ⁻¹)	100
-	Volume courant (V_T , mL.kg ⁻¹)	100
Chapitre 4 (Etude 1) : Evaluation de l'exposition <i>in utero</i> aux pesticides chez le nouveau-né prématuré		
101		
1	Introduction	101
1.1	Contexte scientifique et problématique	101
1.2	Mesure de l'imprégnation fœtale (ou dose interne) aux pesticides.....	102
1.2.1	Dosage des pesticides dans le sang.....	102
1.2.2	Dosage des pesticides dans l'urine.....	103
1.2.3	Dosage des pesticides dans les cheveux	103
1.2.4	Dosage des pesticides dans le méconium	103
1.3	Objectifs de l'étude	104
2	Matériels et méthodes	105
2.1	Evaluation de l'exposition maternelle aux pesticides	105
2.1.1	L'exposition domestique et environnementale	105
2.1.2	Exposition alimentaire.....	106
2.1.3	Exposition professionnelle	113

2.2	Evaluation de l'imprégnation aux pesticides.....	114
2.2.1	Choix des pesticides recherchés.....	114
2.2.2	Dosages des pesticides dans le méconium	117
3	Résultats de l'étude	122
3.1	Description de la population	122
3.2	Résultats de l'exposition maternelle aux pesticides (Questionnaire).....	123
3.2.1	Exposition domestique et environnementale	123
3.2.2	Exposition alimentaire.....	125
3.2.3	Exposition professionnelle	126
3.3	Résultats de l'imprégnation fœtale aux pesticides	127
4	Discussion	130
4.1	Imprégnation fœtale aux pesticides.....	130
4.2	Exposition maternelle.....	131
4.3	Limites	133
Chapitre 5 (Etude 2) : Exposition <i>in utero</i> aux pesticides et impacts sur les fonctions neurovégétatives du nouveau-né prématuré.....		
1 Contexte de l'étude		
2 Sujets et protocole.....		
2.1	Sommeil et évènements cardio-ventilatoires	135
2.2	Ventilation et sensibilité des chémorécepteurs périphériques	136
2.3	Contrôle autonome cardiaque	137
2.4	Analyses statistiques	137
3	Résultats	139
3.1	Structure du sommeil	139
3.1.1	Imprégnation fœtale aux pesticides.....	141
3.1.2	Exposition environnementale	143
3.1.3	Exposition alimentaire.....	143
3.2	Ventilation et contrôle ventilatoire.....	144
3.2.1	Imprégnation fœtale aux pesticides.....	146
3.2.2	Exposition environnementale	148
3.2.3	Exposition alimentaire.....	148
3.3	Evènements cardio-ventilatoires	149
3.3.1	Désaturations	149
3.3.2	Apnées.....	153
3.3.3	Respirations périodiques.....	159
3.4	Contrôle autonome cardiaque	162

4 Discussion et implications cliniques.....	171
Conclusion générale.....	178
Bibliographie.....	180
Annexes.....	196

SOMMAIRE DES FIGURES

Figure 1. Schéma de l'organisation du système de contrôle respiratoire.	31
Figure 2. Localisation des centres respiratoires dans le système nerveux central.....	32
Figure 3. Fonctionnement des chémorécepteurs centraux.....	36
Figure 4. Localisation des chémorécepteurs périphériques.	37
Figure 5. Mécanisme de détection et neurotransmetteurs impliqués au niveau des chémorécepteurs périphériques.....	38
Figure 6. Schéma représentant l'effet des chémorécepteurs en condition hypoxique.	47
Figure 7. Structures nerveuses impliquées dans la relation entre les systèmes respiratoires et cardiovasculaires.	48
Figure 8. Répartition de l'utilisation des pesticides dans le monde.	54
Figure 9. Evolution des quantités de produits phytosanitaires vendues en France.	55
Figure 10. Répartition des régions agricoles selon l'origine et le niveau de la pression phytosanitaire (pesticides par hectare).	56
Figure 11. Utilisation des produits phytosanitaires pour l'entretien des routes.....	59
Figure 12. Répartition de l'utilisation des pesticides dans le monde par catégorie de produit.	61
Figure 13. Formule du DichloroDiphénylTrichloroéthane (DDT).	63
Figure 14. Structure des organophosphorés.....	64
Figure 15. Structure des carbamates.	64
Figure 16. Exemple d'un pyréthrianoïde : structure de la perméthrine.....	65
Figure 17. Structure des phénylurées.	66
Figure 18. Sites de diffusion et les principales voies de projection de l'acétylcholine dans le cerveau.	73
Figure 19. Sites de diffusion et les principales voies de projection de la dopamine dans le cerveau.	74
Figure 20. Sites de diffusion et les principales voies de projection de la noradrénaline dans le cerveau.	75
Figure 21. Schéma du protocole général de l'étude présentée dans ce travail.	79
Figure 22. Placement des capteurs utilisés pour la polysomnographie.	82

Figure 23. Tracés représentant une période de sommeil calme (en haut) et de sommeil agité (en bas) sur une plage de 30 s.....	84
Figure 24. Désaturations isolées sur le logiciel Alice Sleepware.....	86
Figure 25. Apnée centrale suivie d'une désaturation sur le logiciel Alice Sleepware.	87
Figure 26. Exemple de respiration périodique sur le logiciel Alice Sleepware.	88
Figure 27. Ensemble du système d'analyse de la fonction ventilatoire (EXHALYZER® D).	90
Figure 28. Réalisation du test hypoxique, en condition d'exploration dans le berceau du nouveau-né.	92
Figure 29. Analyse de la réponse ventilatoire à l'hypoxie.	94
Figure 30. Résultats des tests (TH1 et TH2) pour la ventilation de base ($V_{E\text{ REF}}$) (A) ; la réponse ventilatoire à l'hypoxie. (ΔV_E) (B) et le temps de réponse (TR) (C).....	96
Figure 31. Différences individuelles de la réponse ventilatoire (ΔV_E) à l'hypoxie en fonction des valeurs moyennes correspondantes.....	97
Figure 32. Prélèvement du méconium dans un pot de coproculture.....	118
Figure 33. Protocole d'analyse des pesticides et de leurs métabolites dans le méconium. .	120
Figure 34. (A) Exemple du chlorpyrifos. Courbe de calibration issue de la gamme d'étalonnage (logiciel MassLynx). (B) Chromatogramme issu du logiciel MassLynx, exemple du diazinon.....	121
Figure 35. Description de la répartition des sujets.	123
Figure 36. Résultats du calcul du S_{Alim} pour l'ensemble des mères.	126
Figure 37. Résultats du calcul du S_{Pro} pour l'ensemble des mères.	127
Figure 38. Nombre de nouveau-nés en fonction du nombre de pesticides détectés dans les échantillons de méconium.	128
Figure 39. Effet de l'imprégnation au DMP et à l'isoproturon sur le temps total de sommeil (TTS).....	141
Figure 40. Effet de l'exposition au DEP sur la durée relative (% temps total de sommeil, TTS) de SA et SC.....	142
Figure 41. Effet de l'exposition au DEP sur la fréquence de changement de stade (f_{Stade}). .	143
Figure 42. Relation entre le score d'exposition alimentaire aux pesticides (S_{Alim}) et la fréquence de la veille intra-sommeil (f_{VIS}).....	144
Figure 43. Effet de l'exposition au DEP (A) et au DMDTP (B) sur la ventilation minute pendant la période normoxique ($V_{E\text{ REF}}$).	147

Figure 44. Relation entre le score d'exposition alimentaire aux pesticides (S_{Alim}) et la $V_{E REF}$	149
Figure 45. Relation entre le score d'exposition alimentaire aux pesticides (S_{Alim}) et la durée moyenne des désaturations $\pm B$ en sommeil calme.	153
Figure 46. Effet de l'exposition <i>in utero</i> au DMDTP et DETP sur la fréquence des apnées -B +D en SA (A). Effet de l'exposition <i>in utero</i> au DMP sur la durée moyenne et la durée maximale des apnées -B +D en SA (B).	157
Figure 47. Relation entre le niveau d'exposition au DETP et la durée moyenne des épisodes de respiration périodique ($D_{moy RP}$), tous stades de sommeil confondus.	161
Figure 48. Effet de l'exposition <i>in utero</i> au DEP sur la FC (A). Effet de la cyperméthrine sur RMSSD (B).	166
Figure 49. Effet de l'exposition <i>in utero</i> sur les paramètres fréquentiels de la variabilité cardiaque. Valeurs relatives de puissance dans les VLF (A), valeurs relatives de puissance dans les LF (B), valeurs relatives et absolues de puissance dans les HF (C) et rapport LF/HF (D).	168

SOMMAIRE DES TABLEAUX

Tableau 1. Les paramètres ventilatoires analysés pendant la période de référence (normoxie).....	93
Tableau 2. Paramètres hypniques, ventilatoires et cardiovasculaires utilisés lors des différents protocoles présentés dans ce travail.....	100
Tableau 3. Synthèse de l'AJRpt de la femme dans les aliments.	108
Tableau 4. Equivalence des Repères Inpes et des Repères MecOExpo.	110
Tableau 5. Apports Journaliers en Résidus de Pesticides (AJRP).	110
Tableau 6. Apports Journaliers en Résidus de Pesticides (AJRP, µg/j) de chaque catégorie d'aliments selon la fréquence de consommation des aliments et l'AJRpt.	111
Tableau 7. Classement des pesticides généré par l'outil Sph'Air appliqué aux données picardes en 2006.	115
Tableau 8. Pesticides recherchés dans notre étude et leurs principales caractéristiques. ...	117
Tableau 9. Description de la population.	123
Tableau 10. Sources d'exposition domestique et environnementale pendant la grossesse.	124
Tableau 11. Consommation maternelle des principales catégories alimentaires issues de l'agriculture biologique, pendant la grossesse.	125
Tableau 12. Description de la population.	127
Tableau 13. Résultats des dosages de pesticides des échantillons de méconium : détection et concentrations des pesticides et métabolites.	129
Tableau 14. Description de l'échantillon.....	135
Tableau 15. Résultats des analyses statistiques de l'impact des pesticides étudiés sur les paramètres hypniques.	140
Tableau 16. Résultats des analyses statistiques de l'impact des pesticides étudiés sur les paramètres ventilatoires en périodes normoxique et lors du test hypoxique.	145
Tableau 17. Effet de l'exposition alimentaire aux pesticides sur la ventilation en période normoxique et la réponse ventilatoire à l'hypoxie.	148
Tableau 18. Résultats des analyses statistiques de l'impact des pesticides étudiés sur les désaturations avec ou sans bradycardie ($\pm B$) pendant le sommeil.	150
Tableau 19. Effet de l'exposition <i>in utero</i> au DMP et à l'isoproturon sur les désaturations.	151

Tableau 20. Résultats des analyses statistiques de l'impact des pesticides étudiés sur les apnées ($\pm B \pm D$) pendant le sommeil.	154
Tableau 21. Résultats des analyses statistiques de l'impact des pesticides étudiés sur les apnées sans bradycardie et avec désaturations ($-B +D$) pendant le sommeil.....	155
Tableau 22. Résultats des analyses statistiques de l'impact des pesticides étudiés sur les apnées isolées ($-B -D$) pendant le sommeil.....	156
Tableau 23. Effet de l'exposition alimentaire aux pesticides sur les apnées $\pm B \pm D$ et $-B -D$.	159
Tableau 24. Résultats des analyses statistiques de l'impact des pesticides étudiés sur les épisodes de respiration périodique avec et sans désaturation ($\pm D$) pendant le sommeil....	160
Tableau 25. Résultats des analyses statistiques de l'impact des pesticides étudiés sur les paramètres temporels de la variabilité du rythme cardiaque, pendant le sommeil.....	163
Tableau 26. Résultats des analyses statistiques de l'impact des pesticides étudiés sur les paramètres fréquentiels de la variabilité du rythme cardiaque, pendant le sommeil.....	164
Tableau 27. Effet de l'exposition environnementale sur les paramètres temporels et fréquentiels de la variabilité du rythme cardiaque.....	170

ABREVIATIONS

ACh :	Acétylcholine
AJRP :	Apport Journalier de Résidus de Pesticides, $\mu\text{g}\cdot\text{j}^{-1}$
AJRPt :	Apport Journalier de Résidus de Pesticides théorique, $\mu\text{g}\cdot\text{j}^{-1}$
ANJm :	Apport Nutritionnel Journalier moyen ($\text{g}\cdot\text{j}^{-1}$)
Apn :	Apnée
Bpm :	Battements par minute
Ca^{2+} :	Ion calcium
CO :	Monoxyde de carbone
CO_2 :	Dioxyde de carbone
CRP :	Chémorécepteurs périphériques
DA :	Dopamine
DEP :	Diéthylphosphate
DETP :	Diéthylthiophosphate
Désat :	Désaturation
Dmax :	Durée maximale, s
Dmoy :	Durée moyenne, s
DMP :	Diméthylthiophosphate
DMDTP :	Diméthylthiophosphate
DGS :	Durée globale de sommeil
ECG :	Électrocardiogramme
EEG :	Électro-encéphalogramme
EOG :	Électro-oculogramme
ETU :	Éthylène thiourée
FC :	Fréquence cardiaque, bpm
FiCO_2 :	Fraction inspirée en dioxyde de carbone, %
FiO_2 :	Fraction inspirée en oxygène, %
f_{Apn} :	Fréquence des apnées, h^{-1}

$f_{\text{Désat}}$:	Fréquence des désaturations, h^{-1}
f_{Stade} :	Fréquence de changement de stade, h^{-1}
fr :	Fréquence respiratoire, cycles.min^{-1}
f_{RP} :	Fréquence des épisodes de respiration périodique, h^{-1}
f_{VIS} :	Fréquence des épisodes de veille intra-sommeil, h^{-1}
GRD :	Groupe respiratoire dorsal
GRV :	Groupe respiratoire ventral
H^+ :	Ion hydrogène
H_2CO_3 :	Acide carbonique
HCO_3^- :	Ion bicarbonate
HFabs :	Valeur absolue des puissances dans les bandes hautes fréquences, ms^2
HF% :	Valeur relative des puissances dans les bandes hautes fréquences, %
K^+ :	Ion potassium
LFabs :	Valeur absolue des puissances dans les bandes basses fréquences, ms^2
LF% :	Valeur relative des puissances dans les bandes basses fréquences, %
LD :	Limite de détection
LQ :	Limite de quantification
NTS :	Noyau du tractus solitaire
O_2 :	Oxygène
OP :	Organophosphorés
PA :	Pression artérielle, mmHg
PAM :	Pression artérielle moyenne, mmHg
Psys :	Pression artérielle systolique, mmHg
Pdia :	Pression artérielle diastolique, mmHg
PaCO_2 :	Pression artérielle en dioxyde de carbone, mmHg
PaO_2 :	Pression artérielle en oxygène, mmHg
pNN50 :	Nombre d'intervalles NN successifs supérieur à 50 ms, %
PreBötC :	Complexe de préBötzingger
RP :	Respiration périodique

RMSSD :	Racine carrée des différences au carré des intervalles RR successifs
RR ou NN :	Intervalle de temps entre 2 ondes R du signal cardiaque, ms
$S_{\text{Alim gl}}$:	Score alimentaire général
S_{Alim} :	Score alimentaire final
SA :	Sommeil agité
SpO_2 :	Saturation pulsée en oxygène, %
S_{pro} :	Score professionnel
SC :	Sommeil calme
SI :	Sommeil indéterminé
Sem.a. :	Semaines d'aménorrhée
SDNN :	Déviati on standard des intervalles NN, ms
SI :	Sommeil indéterminé
SNC :	Système nerveux central
SNA :	Système nerveux autonome
TR :	Temps de réponse, s
TRPmax :	Teneur en Résidus de Pesticides maximale, $mg.kg^{-1}$
TTS :	Temps total de sommeil
VAS :	Voies aériennes supérieures
\dot{V}_E :	Ventilation minute, $mL.min^{-1}.kg^{-1}$
VIS :	Veille intra-sommeil
VLFabs :	Valeur absolue des puissances dans les bandes très basses fréquences, ms^2
VLF% :	Valeur relative des puissances dans les bandes très basses fréquences, %
V_T :	Volume courant, $mL.kg^{-1}$
VRC :	Variabilité du rythme cardiaque

Introduction générale

Actuellement, avec près de 65 000 tonnes de pesticides répandues dans les champs, la France est le 1^{er} utilisateur européen de pesticides et le 3^{ème} mondial. La région Picardie est plus particulièrement exposée avec près de 70% de sa superficie utilisée à des fins agricoles.

Si les effets d'une intoxication aiguë aux pesticides chez l'Homme sont bien connus, il n'en est pas de même pour les expositions chroniques à faible dose. Bien que la dose et la durée d'exposition soient les principaux paramètres à prendre en compte pour évaluer l'impact des pesticides sur la santé, le contexte de l'exposition est également un facteur important dans la survenue et la sévérité des effets. Ainsi, certaines périodes de la vie telle que la grossesse constituent des fenêtres d'exposition particulières. Pendant celle-ci, le fœtus est exposé de manière chronique à de nombreuses substances à faibles doses qui pourraient avoir des impacts à plus ou moins long terme. C'est notamment le paradigme exprimé par le concept de « l'origine développementale de la santé » (DOHaD pour Developmental Origins of Health and Disease) ou des 1000 premiers jours de vie, qui propose une théorie unificatrice à l'ensemble des observations ayant mis en évidence l'existence de liens entre diverses expositions dès la vie intra-utérine et la mortalité ou la survenue de maladies chroniques à l'âge adulte.

Concernant l'exposition aux pesticides pendant la grossesse, des études ont observé des effets sur le nouveau-né. Le poids et la taille de naissance étaient diminués chez les nouveau-nés de mamans exposées aux pesticides. Ces substances ont également été incriminées dans l'augmentation du risque de prématurité (Mayhoub et al., 2014; Petit et al., 2010; Whyatt et al., 2004).

Le laboratoire PériTox a été le premier en France à mettre en évidence la présence de pesticides dans le méconium (1^{ère} selles) des nouveau-nés (Mayhoub et al., 2014). Les pesticides les plus retrouvés dans le méconium faisaient partie de la famille des organophosphorés (OP). Les OP agissent principalement en tant qu'inhibiteur de l'acétylcholinestérase, enzyme métabolisant l'acétylcholine (ACh). Ce neurotransmetteur est très présent chez l'Homme et joue un rôle important dans la régulation des cycles veille-sommeil (Buzsaki et al., 1988) et la respiration (Takeda et Haji, 1991). Dès lors, de possibles

répercussions sur ces fonctions neurovégétatives sont à craindre chez les nouveau-nés exposés à ces substances durant la grossesse, qui est une période cruciale dans la mise en place des voies de régulation nerveuses.

Néanmoins, aucune étude à ce jour n'a étudié l'impact de l'exposition prénatale aux pesticides sur les fonctions neurovégétatives des nouveau-nés prématurés.

Ce travail de thèse s'inscrit dans le cadre de l'étude des adaptations et des interactions des systèmes de contrôle des fonctions hypnique, ventilatoire et cardiovasculaire. Ces différentes fonctions sont souvent immatures ou altérées chez le nouveau-né prématuré et leurs interactions pendant le sommeil peuvent représenter de véritables conflits de régulation, entraînant des déficits fonctionnels susceptibles de mettre l'enfant dans des situations critiques pour sa survie. L'exposition à certains facteurs environnementaux comme les pesticides pourrait générer un stress déséquilibrant l'homéostasie et entraîner une crise fonctionnelle que l'organisme de l'enfant ne pourrait gérer en raison de l'immaturité (ou de connexions neuronales défailantes) de ses centres nerveux.

Le but de ce travail est d'étudier l'influence d'une exposition *in utero* aux pesticides sur les fonctions neurophysiologiques du nouveau-né prématuré. L'hypothèse de notre travail est que l'exposition aux pesticides pendant la grossesse pourrait affecter le développement fœtal des structures nerveuses centrales et périphériques impliquées dans le contrôle chimique de la ventilation, et les fonctions hypnique et cardiovasculaire durant la période néonatale. Cette étude s'inscrit dans un contexte qui vise à mieux comprendre les effets d'une exposition chronique aux pesticides chez le nouveau-né.

La première partie de ce travail présentera l'état des connaissances actuelles sur la ventilation, la chémoréception périphérique, le sommeil et les interactions entre ces différentes fonctions chez le nouveau-né prématuré. La deuxième partie sera consacrée à la présentation de données sur l'exposition maternelle aux pesticides et son impact sur le développement des systèmes nerveux central et périphérique du nouveau-né en relation avec les fonctions physiologiques concernées. Nous détaillerons dans une troisième partie la plateforme d'exploration qui a permis l'étude simultanée de la ventilation, du sommeil et de la fonction cardiovasculaire.

Les résultats obtenus au cours de ce travail seront présentés sous la forme de deux études. La première portera sur l'évaluation de l'imprégnation aux pesticides des nouveau-nés pendant la vie fœtale. Cette partie évoquera également la méthode de dosage simultané de plusieurs familles de pesticides dans le méconium des nouveau-nés et permettra de discuter de l'objectivité et de la pertinence de telles méthodes pour la détection d'une exposition prénatale chronique aux pesticides. Enfin, la deuxième étude sera consacrée à l'impact de l'exposition aux pesticides pendant la grossesse sur les fonctions hypnique, ventilatoire, cardiovasculaire, ainsi que sur leurs interactions.

Chapitre 1 : Contrôle cardio-ventilatoire et sommeil du nouveau-né prématuré

1 Ventilation du nouveau-né

1.1 Caractéristiques ventilatoires du nouveau-né prématuré

Les effecteurs pulmonaires et les structures nerveuses permettant le contrôle de la ventilation étant toujours en cours de maturation chez le nouveau-né, celle-ci est caractérisée par son irrégularité et ses faibles capacités d'adaptation aux modifications de l'environnement. Les troubles de la ventilation sont donc fréquents chez le nouveau-né et d'autant plus s'il est né prématuré.

1.1.1 Les paramètres ventilatoires

La **fréquence respiratoire** (fr , cycles.min⁻¹) est très élevée à la naissance (50-60 cycles.min⁻¹) et diminue avec l'âge pour atteindre 15-20 cycles.min⁻¹ chez l'adulte. Le temps total d'un cycle respiratoire (T_{tot} , sec), correspond au temps d'une inspiration (T_i , sec) et d'une expiration (T_e , sec).

Le **volume courant** (V_T , mL.kg⁻¹), représente le volume d'air inspiré et expiré à chaque mouvement respiratoire, il est d'environ 6 mL.kg⁻¹ et reste relativement constant de la naissance à l'adolescence (Bolton et Herman, 1974).

La **ventilation minute** (\dot{V}_E , mL.min⁻¹.kg⁻¹) est un débit qui correspond au produit de la fréquence respiratoire et du volume courant. Chez le nouveau-né à terme, les valeurs de ventilation minute oscillent entre 250 et 350 mL.min⁻¹.kg⁻¹ (Mortola et al., 1992; Parslow et al., 2004).

1.1.2 Les évènements cardioventilatoires

1.1.2.1 Bradycardies

Les bradycardies sont définies comme une chute de la fréquence cardiaque (FC). En fonction des auteurs, il peut s'agir d'une chute de 10 à 33% par rapport au rythme cardiaque de base (Barrington and Finer, 1990; 1996a), ou l'observation d'une FC instantanée <90 bpm (Keene et al., 2000; Upton et al., 1992), ou <100 bpm pendant plus de 5 s (Barrington et al., 2002). Les bradycardies peuvent survenir seules mais, dans la majorité des cas, elles sont associées à des apnées (Curzi-Dascalova et al., 1989), plus fréquemment lors d'apnées de type obstructif que lors d'apnées centrales. En effet, il a été observé que 88% des apnées obstructives étaient suivies d'une bradycardie (Upton et al., 1992).

Le temps entre la survenue de l'apnée et la bradycardie est généralement plus court en l'absence de désaturation par rapport à celui observé lors d'une bradycardie hypoxique. Ces épisodes réflexes seraient plutôt liés à un effort respiratoire lors de la fermeture des voies aériennes supérieures, à des efforts de vomissements ou de défécation plus qu'à l'hypoxie elle-même (Milner et Greenough, 2004; Upton et al., 1992).

1.1.2.2 Désaturations

Les désaturations, chez les nouveau-nés étudiés dans cette étude (35-37 semaines d'âge post-conceptionnel) peuvent être définies comme la chute de la valeur absolue de la saturation partielle artérielle en oxygène (SpO_2) en dessous d'un seuil établi à 85% (Barrington et al., 2002) ou 80% (Keene et al., 2000). Les désaturations sont fréquemment associées à des apnées avec bradycardie. Dans ce cas, les désaturations sont généralement définies par la chute relative entre la valeur de SpO_2 associée à l'apnée et celle précédant l'évènement, ce seuil variant selon les études de 4% (American Thoracic Society, 1996) à 10% (Barrington and Finer, 1990). Il a également été observé que la chute de SpO_2 survient plus rapidement (médiane 0,8 s) que celle de la fréquence cardiaque (médiane 4,8 s) au cours des apnées (Poets et al., 1993). Le délai de survenue d'une désaturation ne peut être expliqué par l'hypoventilation alvéolaire consécutive à l'apnée, l'hypothèse la plus souvent

avancée est celle d'un shunt intrapulmonaire (Poets et al., 1992). Une corrélation significative a été observée entre la vitesse d'apparition de la désaturation et la durée de l'apnée. Ainsi, le temps d'apparition de la désaturation est d'autant plus court que l'apnée est courte. La capacité résiduelle fonctionnelle représente un des compartiments pulmonaire de réserve en O₂. Chez l'adulte sain, il a été démontré que lors d'apnées volontaires de 30 s une hypoxémie apparaît lorsque les volumes pulmonaires sont petits (Findley et al., 1983). Cependant, la chute de la SpO₂ observée est supérieure à ce qui serait attendu d'une simple déplétion des stocks alvéolaires en O₂ au cours d'une apnée. Le rôle éventuel d'une fermeture des voies aériennes distales a alors été suggéré par ces auteurs.

1.1.2.3 Les apnées

Définitions :

L'apnée ou pause respiratoire est définie comme l'arrêt de la circulation du flux d'air au niveau des voies aériennes supérieures. La durée utilisée pour définir une apnée est très variable en fonction des auteurs. En effet, elle peut être supérieure à 3 s (Berterottière et al., 1990; Franco et al., 2000), à 5 s (Curzi-Dascalova et al., 2000), à 10 s (Gabriel et al., 1976) ou encore à 20 s (Nock et al., 2004; 1996a). Les apnées de courte durée (< 5 sec) sont physiologiques et très fréquentes chez le nouveau-né prématuré. Sur le plan clinique, seules sont considérées comme pathologiques les apnées ayant une durée supérieure à 10 ou 20 s ou les apnées qui, quelle que soit leur durée, sont accompagnées par une désaturation, une bradycardie ou un retentissement clinique (pâleur, cyanose...) (American Thoracic Society, 1996).

Les apnées sont divisées en trois types (Curzi-Dascalova et Mirmiran, 1996) :

- Les **apnées centrales** caractérisées par une absence de flux aérien et de mouvements thoraco-abdominaux (Martin et Abu-Shaweesh, 2005) ;
- Les **apnées obstructives** présentant une absence de flux aérien et le maintien des mouvements thoraco-abdominaux (Milner et Greenough, 2004) ;
- Les **apnées mixtes** déterminées par la succession d'une apnée centrale et d'une apnée obstructive.

Incidence des apnées :

La survenue des apnées peut être influencée par divers facteurs tels que le sexe de l'enfant, le poids de naissance (Curzi-Dascalova et Christova-Guéorguieva, 1983), la température (Berterottière et al., 1990; Tourneux et al., 2008) ou le stade sommeil (Flores-Guevara et al., 1982). L'âge gestationnel et postnatal sont des déterminants importants dans la survenue des apnées centrales. Plus les enfants sont jeunes plus les apnées sont fréquentes (Curzi-Dascalova et Christova-Guéorguieva, 1983). La prématurité est un facteur important d'apparition d'apnées car le contrôle de la ventilation par les chémorécepteurs est en cours de développement (Gauda et al., 2004). De la même façon, l'incidence des apnées est plus importante chez les enfants avec un retard de croissance intra-utérin par rapport aux enfants du même âge (35 à 41 semaines d'aménorrhée (sem. a.)) (Curzi-Dascalova et Mirmiran, 1996). Les apnées supérieures à 15 s sont observées dès la naissance chez les prématurés, mais leur fréquence reste faible et augmente au cours de la première semaine de vie (Barrington et Finer, 1990). Elles sont ensuite de moins en moins nombreuses entre 39 et 41 sem. a. (Curzi-Dascalova et Christova-Guéorguieva, 1983; Darnall et al., 2006). Une immaturité du contrôle ventilatoire peut persister chez les enfants anciens prématurés. Curzi-Dascalova et al., (1984) ont montré que des prématurés de moins de 35 sem. a. considérés à un âge corrigé de 39-40 sem. a. avaient une fréquence d'apnées (supérieures à 5 s) plus élevée par rapport à des nouveau-nés à terme. D'autres études ont observé que plus le nouveau-né était né prématuré, plus la durée des apnées était longue (Darnall et al., 2006). Enfin, après le terme, les apnées supérieures à 15 s restent rares et les apnées courtes voient leur fréquence diminuer jusqu'à l'âge de 3 mois (Hoppenbrouwers et al., 1977).

Retentissement des apnées :

Les principales conséquences à court terme des apnées sont liées à l'hypoxie, à la diminution du transport de l'O₂ et à l'hypercapnie. Au cours d'une apnée, le débit sanguin cérébral peut augmenter ou à l'inverse diminuer en fonction de la durée de celle-ci ou de son association ou non à une bradycardie. Lorsqu'une bradycardie apparaît au cours d'une apnée, il est observé une baisse plus importante du volume sanguin cérébral et de l'index d'oxygénation cérébrale que lors d'une apnée isolée (Payer et al., 2003 ; Pichler et al., 2003). Une hyperperfusion est observée en fin d'apnée (Ramaekers et al., 1993). En revanche, la présence d'une désaturation suite à une apnée ne semble pas avoir de lien avec les variations de débit sanguin.

Dans la littérature, des retentissements à long terme pouvant être imputés aux apnées restent discutés. Pour certains auteurs, le risque est jugé suffisamment important pour justifier la réalisation d'une polysomnographie systématique avant le retour à domicile de l'enfant, et ce même chez le nouveau-né asymptomatique. Le but est d'identifier une population à risque qui serait contrôlée et traitée spécifiquement (Cheung et al., 1999; Subhani et al., 2000). Pour d'autres auteurs, l'incidence des complications, en particulier cérébrales, ne serait pas augmentée à l'âge de 1 et 2 ans parmi les enfants ayant présenté des apnées persistantes du prématuré (Koons et al., 1993).

1.1.2.4 Respiration périodique

Les épisodes de respiration périodique sont fréquemment observés chez le nouveau-né prématuré mais diminuent au cours de la première année de vie. Il s'agit de cycles respiratoires réguliers entrecoupés de plusieurs arrêts respiratoires (apnées).

Les mécanismes responsables de l'apparition de la respiration périodique sont mal connus mais il semblerait que ce motif serait lié à l'immaturation des chémorécepteurs périphériques. En effet, la respiration périodique serait due au phénomène « d'overshoot/undershoot ». Suite à une hypoxie détectée par des chémorécepteurs périphériques immatures (chez le prématuré), l'hyperventilation réactionnelle trop importante (« overshoot ») entraînerait une hypocapnie secondaire à l'origine d'une dépression au niveau de la commande

inspiratoire centrale, entraînant alors une apnée (« undershoot »). Cette dernière entraînerait une hypercapnie transitoire à l'origine d'une nouvelle augmentation de la ventilation. Ce phénomène a été décrit chez le chien adulte (Cherniack et al., 1966) et l'agneau nouveau-né (Canet et al., 1993, 1997). D'autres facteurs favoriseraient l'apparition de cet évènement respiratoire tels que la régulation thermique (Berterottière et al., 1990), la chémoréception centrale et le changement d'activité cérébrale lié aux stades de sommeil (Gabriel et al., 1976; Rigatto et Brady, 1972).

1.2 Systèmes de contrôle de la ventilation

La ventilation a pour rôle principal et indispensable d'assurer les échanges gazeux entre l'air et le sang. Elle représente l'ensemble des mécanismes permettant l'apport en oxygène (O_2) aux tissus de l'organisme et l'élimination du dioxyde de carbone (CO_2) qui résulte du métabolisme de ces derniers.

Pendant la vie fœtale, les mouvements respiratoires apparaissent entre 10 et 12 semaines de gestation par des contractions épisodiques du diaphragme, les poumons du fœtus sont alors remplis de fluide et ne participent pas à l'activité métabolique. Les mécanismes responsables de la transition vers une respiration continue à la naissance restent complexes mais il est suggéré qu'elle soit déclenchée par l'hypoxie prolongée qui fait suite au détachement du placenta ainsi que par d'autres stimuli tels que le froid, la lumière et le bruit (Givan, 2003). L'hypoxie entraîne une chute de la pression partielle artérielle en O_2 (PaO_2), du pH sanguin et une augmentation de la pression partielle artérielle en CO_2 ($PaCO_2$). Une mise en place rapide de la respiration à la naissance est donc indispensable afin d'assurer l'apport en O_2 nécessaire au fonctionnement des organes. En général, l'installation de la respiration continue intervient au maximum 15 à 20 min après la naissance (Adamson, 1991).

Chez l'Homme, le contrôle ventilatoire possède une part d'activité automatique qui prend origine au niveau du tronc cérébral notamment grâce aux centres respiratoires. Toutefois, une composante consciente voire volontaire existe comme par exemple lors d'apnées volontaires. Cette fois la ventilation est sous contrôle du cortex qui peut alors surpasser

l'activité automatique générée par le tronc cérébral. Les échanges d'O₂ et CO₂ entre l'air et le sang représentent la fonction principale des poumons afin de maintenir l'homéostasie des PaO₂ et PaCO₂. Cependant, il est important de noter que malgré les importantes variations des demandes de l'organisme en consommation d'O₂ et élimination de CO₂, les valeurs de PaO₂ et de PaCO₂ sont maintenues à l'intérieur de limites très étroites. Ceci est rendu possible grâce à un contrôle très fin du niveau de la ventilation.

Le système de contrôle de la ventilation repose sur différentes structures (Figure 1) :

Des **récepteurs** qui collectent l'information en périphérie via des mécanorécepteurs (au niveau des voies aériennes supérieures, de la cage thoracique, du parenchyme pulmonaire et du diaphragme), des chémorécepteurs centraux (situés dans la partie ventro-latérale du bulbe rachidien) et périphériques (corps carotidiens et aortiques).

Ces récepteurs transmettent l'information aux **centres de contrôle** bulbo-pontiques qui génèrent et régulent le rythme respiratoire. Ces centres sont eux-mêmes, comme évoqué précédemment, sous la dépendance du cortex et des structures diencephaliques, et par conséquent sous influence des états de veille-sommeil.

Enfin, les centres de contrôle envoient des impulsions aux **effecteurs** que sont les muscles respiratoires, le principal étant le diaphragme, pour répondre à la stimulation.

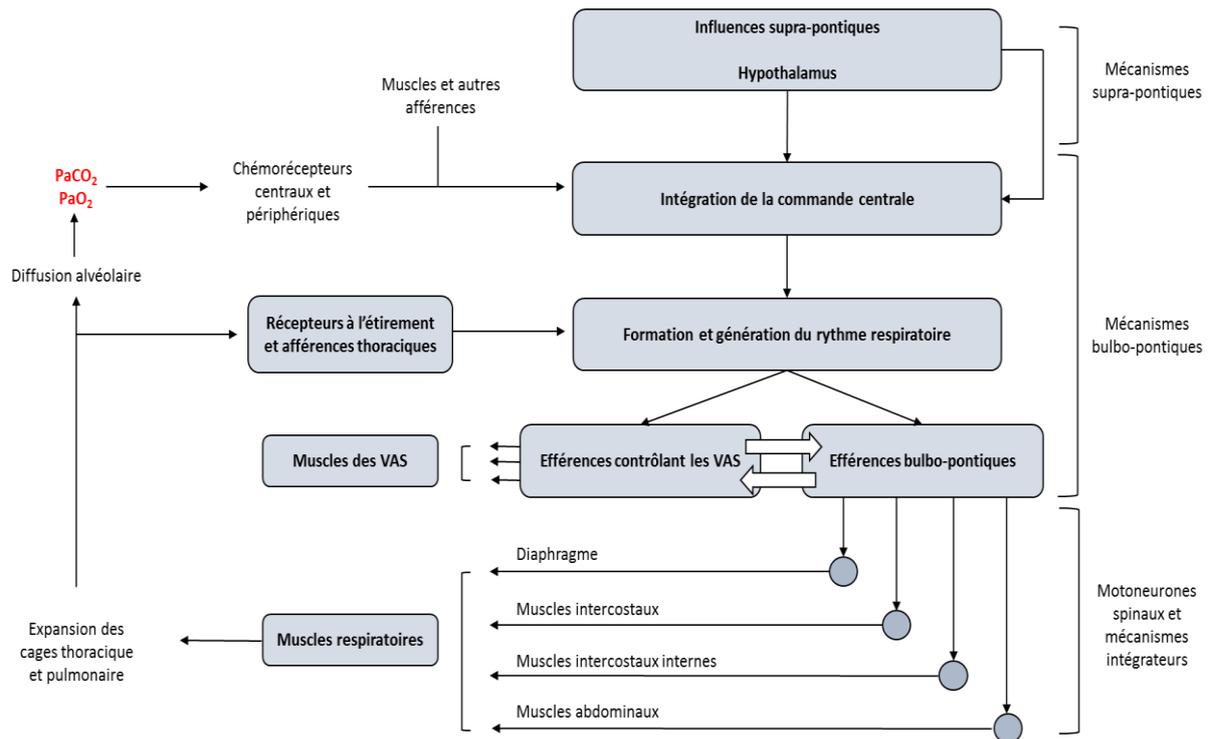


Figure 1. Schéma de l'organisation du système de contrôle respiratoire.

Adapté de Darnall et al., 2006. VAS : voies aériennes supérieures ; PaO₂ et PaCO₂ : pressions partielles artérielles en O₂ et CO₂.

La commande centrale de la ventilation est assurée par des groupes de neurones appelés « centres respiratoires ». Ces structures sont situées essentiellement au niveau bulbo-pontique. On distingue 3 grands groupes (Figure 2) (Bianchi, 1971; Stornetta, 2008) :

- le groupe **respiratoire bulbaire** incluant les groupes respiratoires dorsal (GRD) et ventral (GRV) au niveau du bulbe rachidien ;
- le groupe **respiratoire pontique**.

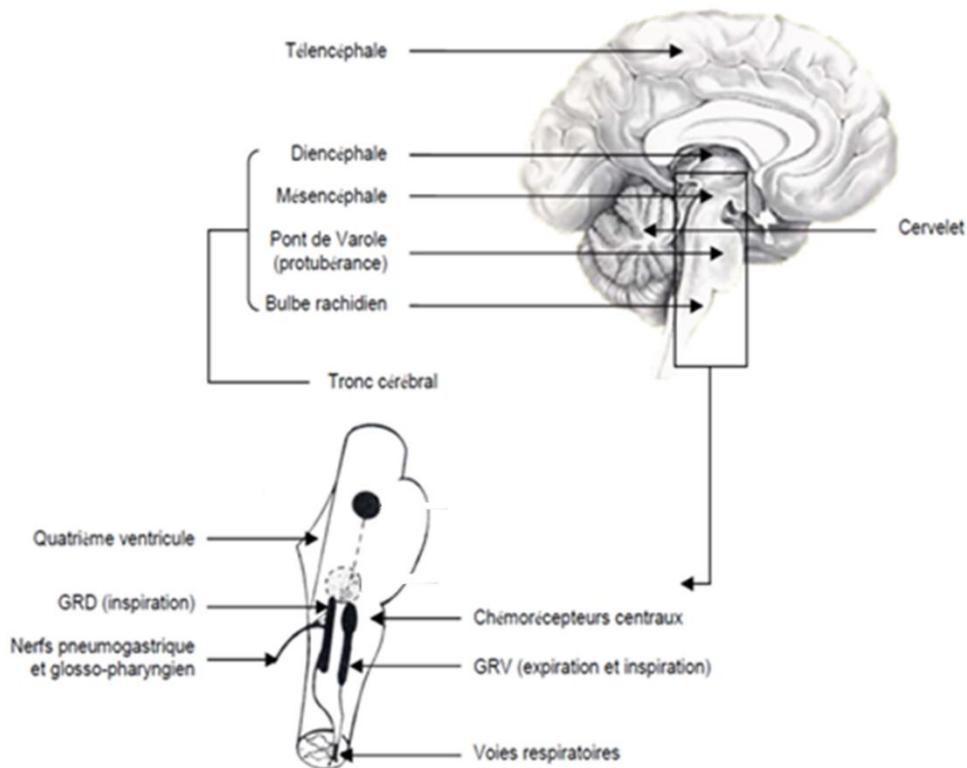


Figure 2. Localisation des centres respiratoires dans le système nerveux central.

GRD : groupe respiratoire dorsal ; GRV : groupe respiratoire ventral

1.2.1 Groupe respiratoire bulbaire

- Groupe respiratoire dorsal (GRD)

Il s'agit de neurones inspiratoires situés dans la partie dorsale du bulbe rachidien. Il correspond à la sousdivision ventro-latérale du Noyau du Tractus Solitaire (NTS). Le GRD est principalement responsable de la régulation du rythme de base de la ventilation, l'expiration se produisant de manière passive grâce aux propriétés élastiques des poumons et de la cage thoracique. Le GRD reçoit des signaux nerveux afférents qui proviennent des récepteurs pulmonaires sensibles à l'étirement (Kubin et al., 2006) et des chémorécepteurs périphériques (CRP) répondant principalement à l'hypoxie artérielle (Finley et Katz, 1992). Ces signaux nerveux sont transmis par le biais du nerf glosso-pharyngien et du nerf vague. Le GRD se projette directement sur le groupe respiratoire ventral, ainsi que sur les motoneurones diaphragmatiques et intercostaux externes (Bianchi, 1971).

- Groupe respiratoire ventral (GRV)

Le GRV est situé au niveau de la partie ventro-latérale du bulbe rachidien. Ce réseau respiratoire est aussi appelé colonne respiratoire ventrale en raison de sa forme. Il est composé de neurones qui s'étendent de la jonction bulbo-spinale à l'extrémité caudale du noyau facial et est divisé en trois parties :

Le **GRV caudal** prend origine au niveau de la jonction bulbo-spinale et s'étend jusqu'à l'obex. Il est constitué de neurones expiratoires qui se projettent sur les motoneurones expiratoires des muscles respiratoires abdominaux et intercostaux internes.

Les noyaux ambigu et para-ambigu constituent le **GRV intermédiaire** qui lui s'étend de l'obex à l'extrémité rostrale du NTS (Bianchi, 1971; Kalia, 1981). Le noyau ambigu inclut des motoneurones laryngés et pharyngés possédant des capacités de décharge inspiratoires et expiratoires (Barillot et al., 1990; Bianchi et al., 1988). En ce qui concerne le noyau para-ambigu, il est constitué de pré-motoneurones bulbo-spinaux respiratoires, qui grâce à leurs liens avec des motoneurones spinaux, permettent d'innover les muscles respiratoires thoraciques. De plus, des neurones proprio-bulbaires joueraient un rôle dans la synchronisation des muscles des voies aériennes supérieures ainsi que de la cage thoracique (Bellingham, 1998; Bianchi et al., 1995; Dobbins et Feldman, 1994).

Enfin, le **GRV rostral** se situe entre l'extrémité rostrale du NTS et l'extrémité caudale du noyau facial. Il correspond aux groupes d'interneurones que sont les complexes de Bötzing et préBötzing (preBötC) :

- Le preBötC est situé en position caudale par rapport au complexe de Bötzing. Ces neurones possèdent un rôle qualifié de « pacemaker » car ils sont essentiels à la génération du rythme respiratoire (Feldman et Del Negro, 2006; Rekling et Feldman, 1998; Smith et al., 1991). En 1991, Smith et al. ont montré qu'une lésion réalisée immédiatement en position caudale au préBötC entraînait un arrêt de l'activité respiratoire.

- Le complexe de Bötzing est une extension rostrale provenant d'une portion du noyau ambigu et se trouve juste derrière le noyau facial. Il contient des neurones expiratoires qui se projettent de façon monosynaptique vers le GRD et possèdent une activité inhibitrice sur les neurones inspiratoires (Merrill et al., 1983). D'autres études ont montré que le complexe

de Böttinger pouvait également inhiber les neurones inspiratoires du GRV caudal et rostral (Fedorko et al., 1989; Jiang and Lipski, 1990) et les motoneurones laryngés (Ono et al., 2006).

1.2.2 Groupe respiratoire pontique

Il correspond au groupe de neurones pontiques comprenant les noyaux Kölliker-Fuse et para-brachial médian situés au niveau de la partie dorso-latérale du pont. Des études réalisées sur des animaux vagotomisés ont montré que l'ablation de ces noyaux entraînait une modification du rythme respiratoire (Bertrand et Hugelin, 1971; Feldman et Gautier, 1976). Le groupe respiratoire pontique (GRP) est notamment connecté aux structures bulbaires telles que le PrébötC (Tan et al., 2010), Le NTS (Loewy et Burton, 1978) ou encore la surface ventrale du bulbe rachidien (Song et al., 2012), mais aussi aux structures supra-pontiques comme les noyaux para-ventriculaire et dorso-médian de l'hypothalamus (Bester et al., 1997).

Le GRP ne semblerait pas être nécessaire pour la génèse du rythme respiratoire. En effet, sur des tranches de bulbe rachidien isolées, une persistance du rythme respiratoire a été observée malgré l'absence du GRP (Smith et al., 1991). Ainsi, les neurones du groupe respiratoire pontique pourraient servir de relais entre les centres respiratoires bulbaires et les structures supra-pontiques (Bianchi et al., 1995).

1.3 Contrôle chimique de la ventilation

Le contrôle chimique de la ventilation se fait par le biais de structures nerveuses appelées chémorécepteurs. Ces structures sont sensibles aux variations de PaO_2 et PaCO_2 , ainsi qu'à la composition chimique du sang. Il existe deux types de chémorécepteurs : centraux et périphériques, qui se différencient par leur localisation et le type de stimulation auquel ils répondent.

1.3.1 Chémorécepteurs centraux

Les chémorécepteurs centraux, seraient situés au niveau de la surface ventrale du bulbe rachidien près des centres respiratoires (Bruce et Cherniack, 1987; Morrell et al., 2001), mais leur localisation exacte reste incertaine. D'autres structures du tronc cérébral tels que le Locus Coeruleus (Oyamada et al., 1999), le NTS et le Raphé Médian (Ballantyne et Scheid, 2000) possèderaient également des propriétés chémosensibles et pourraient par conséquent être impliquées dans la régulation de la ventilation. Par ailleurs, il n'est pas exclu que les neurones des centres respiratoires soient eux-mêmes chémosensibles (Teitel, 1996). L'ensemble de ces structures participe pour 75 à 80% de la réponse ventilatoire à l'hypercapnie, les 20 à 25% restant étant attribués aux chémorécepteurs périphériques. Le temps de réponse des chémorécepteurs centraux est relativement long (20 s à 3 min), à cause des propriétés de perméabilité de la barrière hémato-encéphalique. En effet, les chémorécepteurs centraux sont sensibles à la composition chimique du liquide céphalo-rachidien et particulièrement à la présence d'ions H^+ , mais la barrière hémato-encéphalique est peu perméable aux ions H^+ et HCO_3^- alors qu'elle favorise le passage du CO_2 (Figure 3). Ce dernier constitue donc le stimulus initial : lorsque la $PaCO_2$ augmente, le CO_2 diffuse au niveau du liquide céphalo-rachidien où il forme rapidement de l'acide carbonique (H_2CO_3), qui se dissocie par la suite en ions H^+ et HCO_3^- . Les ions H^+ ainsi produits stimulent alors les chémorécepteurs centraux et entraînent une hyperventilation (Lahiri et Forster, 2003). De plus, cette réponse s'observe pour des variations importantes de la teneur en CO_2 . C'est pour cette raison que l'activité de ces structures est difficile à évaluer expérimentalement chez l'Homme et d'autant plus chez le nouveau-né car cela nécessiterait des stimulations hypercapniques intenses et prolongées.

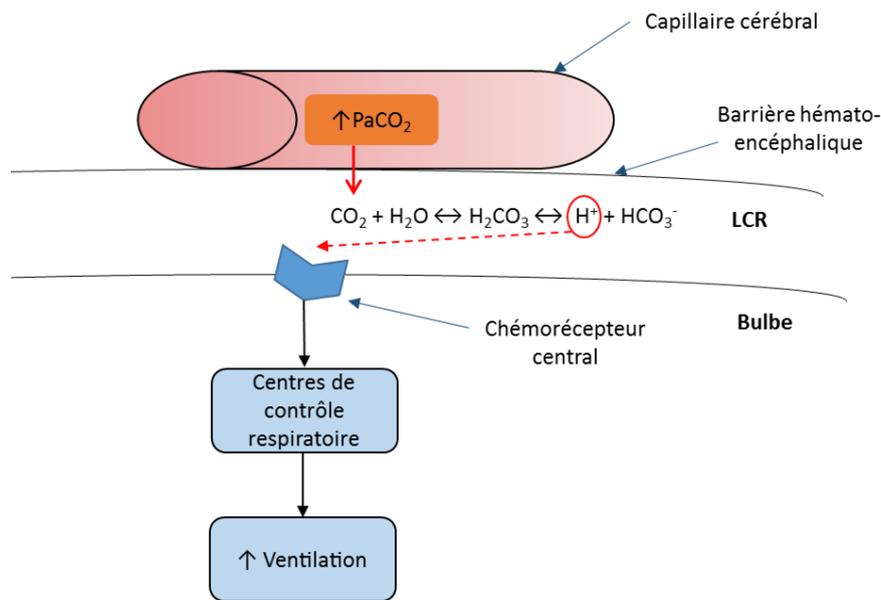


Figure 3. Fonctionnement des chémorécepteurs centraux.

LCR : Liquide céphalo-rachidien ; PaCO₂ : pression artérielle en CO₂.

Une absence ou une altération de l'activité des chémorécepteurs centraux peut entraîner des perturbations ventilatoires telles que des apnées (Gaultier, 1995). Les structures centrales ne reçoivent plus d'informations sur les variations de CO₂, les mécanismes de régulation par les chémorécepteurs ne se font plus et l'homéostasie n'est plus maintenue.

1.3.2 Chémorécepteurs périphériques

1.3.2.1 Structure

Les chémorécepteurs périphériques (CRP) (Figure 4) sont des structures qui protègent les tissus d'une éventuelle hypoxie, stress auquel les nouveau-nés prématurés peuvent être fréquemment exposés. En effet, les CRP ont pour stimulus principal une baisse de la PaO₂, mais aussi l'augmentation de la PaCO₂. Très sensibles, ils détectent des variations de la PaO₂ même très faibles et stimulent à leur tour les groupes respiratoires pour augmenter la ventilation (Gauda et al., 2007). Les CRP sont divisés en deux groupes en fonction de leur localisation (Heymans et Bouckaert, 1930) :

- Les **corps carotidiens** situés au niveau de la jonction entre les artères carotides interne et externe ;
- Les **corps aortiques** localisés au niveau de la crosse aortique.

Les CRP sont des petits nodules de 1 à 2 mm de diamètre contenant au moins deux types de cellules glomiques. Les cellules de type I, rondes ou ovoïdes et d'un diamètre de 10 à 12 μm , sont les plus nombreuses et contiennent de nombreux neuromédiateurs tels que la dopamine, la noradrénaline mais aussi l'acétylcholine. Il semble qu'elles représentent les cellules chémoréceptrices en elles-mêmes (Gonzalez et al., 1995). Les cellules de type II sont en périphérie et enveloppent les cellules de type I. Ce sont des cellules de soutien apparentées aux cellules gliales.

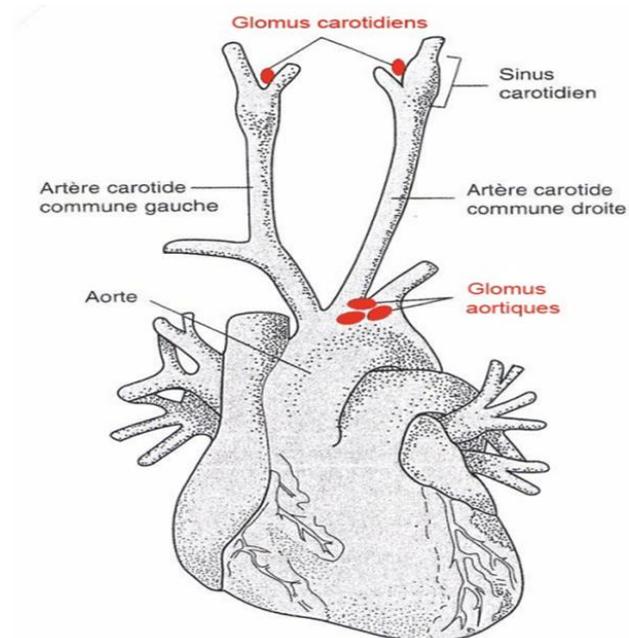


Figure 4. Localisation des chémorécepteurs périphériques.

Les CRP ont un débit sanguin élevé pour leur taille ($20 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ de tissu) et ont par conséquent une très faible différence artério-veineuse en O_2 et CO_2 . On peut donc considérer que les pressions en O_2 et CO_2 dans ces structures sont très proches de la PaO_2 et de la PaCO_2 . À l'inverse des chémorécepteurs centraux la réponse des CRP est très rapide ($<30 \text{ s}$) et, comme évoqué précédemment, ils sont également responsables de 20 à 25% de la réponse ventilatoire à l'hypercapnie.

1.3.2.2 Réponse cellulaire à l'hypoxie

Les mécanismes de détection du stimulus et les neurotransmetteurs impliqués au niveau des CRP sont encore mal connus. Plusieurs modèles de chémoréception de l'oxygène ont été proposés, le plus détaillé étant le modèle membranaire (Figure 5). Des récepteurs sensibles à l'O₂ situés sur la membrane des cellules de type I permettraient de détecter la chute de PaO₂. La cascade de réactions qui en résulterait serait la suivante : (1) Une inhibition des canaux potassiques (K⁺) entraînant une dépolarisation des cellules chémoréceptrices et l'activation des canaux calciques (Ca²⁺) voltage-dépendants (2). L'entrée de calcium dans la cellule, entraîne une augmentation du Ca²⁺ intracellulaire, induisant la libération des neurotransmetteurs (dopamine, acétylcholine...) (3). Les neurotransmetteurs excitateurs ou inhibiteurs ainsi libérés auraient deux actions : (4) d'une part ils seraient détectés par des autorécepteurs membranaires des cellules de type I des CRP permettant le rétro-contrôle de leur libération future et d'autre part, (5) ils se lieraient aux récepteurs post-synaptiques régulant l'activité électrique des nerfs qui innervent les CRP. Ces derniers possèdent des afférences qui se projettent sur le NTS dans le GRD via le nerf glosso-pharyngien et le nerf vague pour adapter la ventilation.

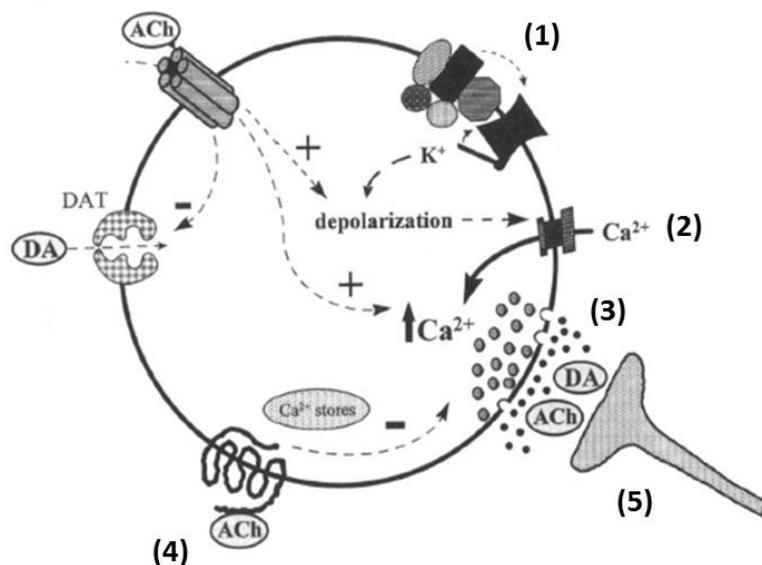


Figure 5. Mécanisme de détection et neurotransmetteurs impliqués au niveau des chémorécepteurs périphériques.

ACh : acétylcholine ; DA : dopamine.

Les principaux neurotransmetteurs présents au niveau des CRP sont l'acétylcholine (ACh), les catécholamines (dopamine (DA), noradrénaline (NA)), la sérotonine, l'adénosine triphosphate (ATP) et les amino-acides. D'autres neurotransmetteurs non conventionnels, produits par réaction enzymatique, tels que le monoxyde d'azote (NO) et le monoxyde de carbone (CO) sont également retrouvés (Prabhakar, 1999). Certains de ces neuromodulateurs (ACh, ATP) stimulent l'activité nerveuse afférente, alors que d'autres (DA, NA) inhibent cette activité. Il est d'ailleurs clairement établi que l'hypoxie entraîne la libération de neurotransmetteurs aussi bien excitateurs qu'inhibiteurs par les CRP.

Les CRP synthétisent, stockent et libèrent de l'ACh en réponse à l'hypoxie. L'ACh joue un rôle excitateur rapide, en réponse à l'hypoxie, notamment par l'activation des récepteurs cholinergiques de type nicotinique (nAChRs) post-synaptiques. L'ACh, peut également agir directement sur la cellule glomique par une autorégulation des nAChRs qui moduleront la libération d'autres neurotransmetteurs. Par exemple, il a été suggéré que les nAChRs seraient impliqués dans la régulation de la libération de catécholamines (Meza et al., 2012).

La DA est dès la naissance l'amine la plus présente chez l'Homme. Elle est également synthétisée, stockée et libérée par les cellules des CRP en réponse à l'hypoxie. Il existe deux types de récepteurs à la DA (D_1 et D_2), mais la réponse des CRP est essentiellement due à (1) la stimulation des autorécepteurs D_2 pré-synaptiques qui contrôlent la libération de DA par un mécanisme de rétrocontrôle inhibiteur, et (2) la stimulation des récepteurs D_2 post-synaptiques. La DA joue un rôle inhibiteur de l'activité du nerf sinusal-carotidien, entraînant une diminution de la réponse ventilatoire à l'hypoxie.

La NA en se fixant aux récepteurs α_2 -adrénergique (Prabhakar et Overholt, 2000) pourrait également inhiber l'activité nerveuse afférente des CRP en réponse à l'hypoxie mais son rôle reste très discuté. L'ATP et l'adénosine sont des neurotransmetteurs dont la libération au niveau des CRP est favorisée par l'hypoxie (Conde et Monteiro, 2006). Des études chez l'animal adulte ont suggéré un rôle pour l'ATP et l'adénosine, dont la libération entraînerait la stimulation de l'influx nerveux au niveau des CRP via sa fixation au récepteur A_{2a} (Gonzalez et al., 1994; Zapata, 2007).

Enfin le NO et le CO auraient un rôle de second messenger au niveau des CRP. L'enzyme qui synthétise le NO a été observée au niveau des fibres nerveuses et de l'endothélium

vasculaire des corps carotidiens. Des études ont montré que le NO possède un effet inhibiteur sur la réponse des CRP. En effet, dans la cellule glomérique, le NO inhibe l'activité des canaux calciques influant sur la concentration intracellulaire de Ca^{2+} . Le CO possède la même action inhibitrice sur les CRP. Il est synthétisé grâce à l'hème oxygénase-2, localisée dans les cellules glomériques. L'oxygène moléculaire est également essentiel pour la production de NO et de CO. Pendant l'hypoxie, la diminution de la synthèse de ces deux neurotransmetteurs pourrait contribuer en partie à l'augmentation de l'activité des CRP (Prabhakar, 1999).

1.3.2.3 Réinitialisation des chémorécepteurs périphériques

Le fœtus possède déjà une activité tonique des chémorécepteurs périphériques (CRP), qui sont adaptés à une PaO_2 de base d'environ 23 mmHg, et qui ne répondent donc qu'à des changements de PaO_2 en dessous de cette valeur seuil. Sans l'adaptation de ce seuil de sensibilité à la naissance, les CRP des nouveau-nés ne pourraient pas assurer le maintien de l'apport en O_2 et l'élimination du CO_2 , ce qui mettrait le nouveau-né en danger.

Pendant l'accouchement, la PaO_2 diminue pour atteindre 15-20 mmHg. La $PaCO_2$, qui était inférieure à 30 mmHg augmente jusqu'à 50 mmHg. Le fœtus se retrouve alors en acidose métabolique et respiratoire. Après la naissance, la PaO_2 est multipliée par 3 ou 4, rendant silencieux les CRP. Au cours de l'hyperoxie associée au passage à la vie extra-utérine, il n'a été observé chez l'animal aucune activité du nerf sinusal carotidien (Blanco et al., 1984). Ces résultats suggèrent que les CRP ne seraient pas nécessaires à la mise en place de la ventilation à la naissance ni pendant les 2 à 3 premiers jours de vie (Jansen et al., 1981). Par la suite, les CRP retrouvent une activité tonique et réajustent leur seuil de sensibilité, c'est la réinitialisation. Les CRP deviennent même plus sensibles que ceux du fœtus puisque la normoxie fœtale (23 mmHg) entraîne maintenant une réponse de ces récepteurs. Après la réinitialisation, l'implication des CRP dans la respiration devient importante (Hertzberg et Lagercrantz, 1987). Des études ont confirmé l'origine de cette réinitialisation par la modification de la teneur en O_2 de l'air inspiré notamment chez le fœtus d'agneau. En induisant une hyperoxie par ventilation mécanique, une réinitialisation précoce des CRP a

été observé (Blanco et al., 1987). A l'inverse lorsque des rats étaient soumis à une hypoxie chronique, la survenue de la réinitialisation était retardée (Eden et Hanson, 1987; Hertzberg et al., 1992).

1.3.3 Fonctions des chémorécepteurs périphériques

1.3.3.1 Activité tonique des chémorécepteurs périphériques

Une technique indirecte pour connaître l'activité tonique des CRP, c'est-à-dire leur degré de participation à la ventilation de base en normoxie consiste à augmenter la PaO₂ à des valeurs pour lesquelles plus aucune décharge n'est enregistrée au niveau du nerf sinusal, soit 300 mmHg (Dejours, 1962). On parle alors de « chémodénervation physiologique ».

En effet, après inhalation d'un mélange hyperoxique, une chute de la ventilation est observée chez le nouveau-né dès 28 semaines d'âge gestationnel (Rigatto et al., 1975), démontrant que l'activité des CRP existe déjà 12 semaines avant le terme. Si l'hyperoxie est maintenue plus de 30 s, une augmentation secondaire de la ventilation est observée (Rigatto et al., 1982), mais les mécanismes sont encore peu connus. Une stimulation des chémorécepteurs centraux par l'augmentation du CO₂ a été suggérée. En effet, la chute initiale de la ventilation serait à l'origine d'une augmentation centrale de PaCO₂ et d'une diminution du pH consécutive à la vasoconstriction cérébrale et à la rétention métabolique de CO₂. La chute de la ventilation est plus importante chez les nouveau-nés prématurés que chez ceux nés à terme (Haider et al., 1995). On observe en effet que chez le nouveau-né prématuré, la fréquence respiratoire et le volume courant chutent de manière concomitante, contrairement au nouveau-né à terme, chez qui seul le volume courant diminue (Aizad et al., 1984). Ces résultats suggèrent que la participation des CRP à l'eupnée est plus importante chez le nouveau-né prématuré que chez le nouveau-né à terme. Ceci pourrait être dû à l'immaturation de la fonction respiratoire dont le contrôle nécessiterait une plus grande contribution des CRP par rapport aux autres influences encore immatures chez les nouveau-nés prématurés.

1.3.3.2 Sensibilité des chémorécepteurs périphériques

La sensibilité des CRP peut être évaluée par l'utilisation de la stimulation hypoxique, qui consiste à inhaler un mélange gazeux dont la teneur en O₂ est inférieure à 20 %. Tandis que chez l'adulte l'hypoxie entraîne une hyperventilation soutenue, la réponse ventilatoire à l'hypoxie chez le nouveau-né est biphasique. En effet, on observe une augmentation initiale de la ventilation suivie d'une chute qui peut passer en dessous du niveau de base (Martin et al., 1998). Il a été démontré que l'hyperventilation était attribuée à l'action des CRP car des agneaux ayant subi une chémodénervation périphérique ne présentaient plus cette réponse (Blanco et al., 1984). L'intérêt de cette première phase est d'augmenter la pression alvéolaire en O₂ et de réguler la pression artérielle en O₂, tout en éliminant le CO₂ des poumons. La deuxième phase serait due à l'incapacité des nouveau-nés à maintenir une hyperventilation et serait attribuée aux chémorécepteurs centraux. Un effet dépresseur du manque d'oxygène, l'alcanisation du liquide céphalo-rachidien due à une augmentation du flux sanguin cérébral ou une diminution du métabolisme (diminuant la production de CO₂) sont autant de facteurs pouvant expliquer la chute de la ventilation. Toutefois, l'implication des CRP ne peut pas être écartée car des études chez l'animal ont permis de mettre en évidence la présence de cette chute uniquement lorsque les corps carotidiens étaient intacts (Bureau et al., 1985; Schramm et Grunstein, 1987).

2 Le système cardiovasculaire du nouveau-né prématuré

2.1 Développement des paramètres cardiovasculaires

2.1.1 La fréquence cardiaque

Chez l'enfant né à terme le système cardiovasculaire n'est pas totalement mature et continue son développement plusieurs semaines après la naissance (Friedman, 1972). A la

naissance l'adaptation à la vie extra-utérine nécessite des changements circulatoires importants afin de s'adapter à l'apport d'O₂ pulmonaire. Parmi ces adaptations, on peut noter la fermeture du canal artériel et du foramen ovale (Polin et al., 2011).

La fréquence cardiaque (FC) est relativement élevée chez le nouveau-né prématuré, environ 150 bpm (Stéphan-Blanchard et al., 2013a) et diminue considérablement pendant les premiers mois de vie. Cet effet de l'âge postnatal est principalement dû à une augmentation de l'activité parasympathique qui s'opère progressivement avec l'âge (Harper et al., 1978). La prématurité a une influence significative sur les paramètres cardiovasculaires, ces enfants présentant une FC au repos plus élevée que les enfants nés à terme (Eiselt et al., 1993; Katona et al., 1980). Il a également été montré que l'élévation de la FC pouvait persister chez les prématurés, une étude (Patural et al., 2008) ayant observé à un âge équivalent une FC de 155 bpm pour des enfants nés prématurés contre 117 bpm pour des enfants nés à terme. Toutefois, ces résultats restent discutés car d'autres études n'ont trouvé aucune différence de FC entre des enfants nés prématurés et à terme, que ce soit à 2-3 semaines, 2-3 mois ou 6 mois d'âge corrigé. De plus, il est communément observé une augmentation de la FC en sommeil agité par rapport au sommeil calme chez l'enfant né à terme qui s'explique par une augmentation de l'activité sympathique en sommeil agité. Ceci n'a pas été retrouvé chez le nouveau-né prématuré, indiquant qu'une perturbation du contrôle autonome cardiaque persisterait à âge équivalent pour les enfants nés prématurés (Tuladhar et al., 2005; Witcombe et al., 2008).

2.1.2 La pression artérielle

La pression artérielle (PA) correspond à la pression du sang circulant dans les artères, son maintien dans des valeurs normales est essentiel pour l'apport de l'O₂ vers l'ensemble des tissus de l'organisme. Elle est donc soumise à des ajustements en fonction des besoins qui sont assurés principalement grâce au baroréflexe.

Des études évaluant la PA chez des nouveau-nés prématurés ont montré qu'à environ 12 semaines ou 4 mois d'âge postnatal aucune différence avec les enfants nés à terme n'était observée (Georgieff et al., 1996; Greenough and Emery, 1993). Plus récemment, une étude évaluant la PA pendant le sommeil a montré que celle-ci était plus faible chez les nouveau-nés prématurés comparativement à des nouveau-nés à terme, jusqu'à 5-6 mois d'âge postnatal (Witcombe et al., 2008). Aucune variation de FC entre les groupes n'avait été observée dans cette étude. Les auteurs ont donc conclu que l'effet sur la PA était dû à une perturbation de la régulation vasculaire, plutôt qu'à une altération de la fonction cardiaque.

2.2 Le contrôle cardiovasculaire

L'ensemble des données ci-dessus suggère que la prématurité pourrait avoir un effet important sur le contrôle cardiovasculaire. La PA et la FC sont des paramètres qui subissent des variations à tout moment. Leur contrôle se fait à plusieurs niveaux : la régulation à court terme est assurée par le système nerveux central et le système nerveux autonome (chémoréflexe, baroréflexe). Les systèmes hormonaux (systèmes rénine-angiotensine, arginine-vasopressine) et le phénomène de tension relaxation sont quant à eux responsables des fluctuations à moyen terme. Enfin, la régulation à plus long terme pourrait être due aux reins et à la thermorégulation (Guyton, 1991)

2.2.1 Le système nerveux autonome

Le système cardiovasculaire est principalement sous le contrôle du système nerveux autonome (SNA) pour lequel on distingue deux branches : le système nerveux **sympathique** et le système nerveux **parasymphatique**. La PA et la FC sont régulées par le SNA grâce à des nerfs sympathiques qui innervent le cœur et les vaisseaux, ainsi que des nerfs parasymphatiques qui innervent le cœur uniquement. En effet, une partie du contrôle de la FC est déterminée par l'activité de neurones cardio-vagaux pré-ganglionnaires, parasymphatiques situés au niveau du noyau ambigu.

Le lien entre le système nerveux central et l'organe cible est assuré par des fibres pré- et post-ganglionnaires. Les neurotransmetteurs impliqués sont l'ACh pour les neurones pré-ganglionnaires sympathiques et parasympathiques. Les neurones post-ganglionnaires parasympathiques sont également cholinergiques, alors que les neurones sympathiques sont noradrénergiques (Silvani et al., 2016; Souza Neto et al., 2003a).

2.2.2 Contrôle autonome cardiaque

La FC est essentiellement contrôlée par le SNA, via l'innervation du nœud sinusal par les nerfs de ce système. Les nerfs sympathiques (nerf sympathique cardiaque) et parasympathiques (nerf vague) fonctionnent en opposition et c'est l'interaction complexe entre ces deux voies (balance sympatho-vagale) qui permet la régulation de la FC.

La variabilité du rythme cardiaque (VRC) correspond à la fluctuation du temps entre deux battements consécutifs du cœur. L'étude de la VRC est un outil permettant d'évaluer de manière indirecte le contrôle autonome cardiaque en raison de la capacité du SNA à réguler rapidement la FC. La VRC peut être divisée en variabilité à court terme de haute fréquence (HF) et à plus long terme de basse fréquence (LF). La variabilité haute fréquence est un reflet de l'activité parasympathique liée au rythme respiratoire (onde de Traube-Hering). La variabilité basse fréquence correspond à une combinaison d'influences sympatho-vagales modulées par le système baroréflexe (Onde de Mayer). La VRC est donc utilisée pour déterminer l'intégrité du contrôle de la FC par le SNA et permet d'obtenir des informations sur l'activité sympathique et parasympathique. Plusieurs études se sont intéressées à la maturation du contrôle autonome cardiaque. C'est le cas d'une étude dans laquelle la FC et les paramètres de VRC ont été comparés entre des enfants nés prématurés (31-36 sem.a), nés à un âge proche du terme (37-38 sem.a), et nés à terme (38-41 sem.a) (Clairambault et al., 1992). Cette étude a observé une augmentation de l'ensemble des paramètres de VRC des nouveau-nés prématurés jusqu'aux enfants nés à terme reflétant une maturation du SNA. Néanmoins, il a été démontré que la variabilité haute fréquence n'augmentait de manière importante qu'entre les nouveau-nés prématurés et ceux proche du terme, alors que la variabilité basse fréquence était en élévation constante avec l'augmentation de l'âge de naissance. En effet, pendant la vie fœtale, le

développement des deux branches du SNA est différent. La branche sympathique se développe d'abord rapidement pendant le premier trimestre de grossesse puis ralentit par la suite. C'est alors la branche parasympathique qui devient dominante à partir de 25-30 sem.a. (Wakai, 2004).

Globalement, la majorité des études a montré que les nouveau-nés prématurés ont un contrôle autonome cardiaque immature touchant particulièrement le système parasympathique. Ceci serait le résultat direct de leur petit âge gestationnel (Clairambault et al., 1992; Longin et al., 2006). De plus, la naissance avant l'âge du terme semble également perturber la maturation normale du contrôle cardiaque par le SNA, limitant de nouveau le développement de l'activité parasympathique (Padhye et al., 2008; Patural et al., 2004).

2.3 Relation entre le système cardiovasculaire et respiratoire

Il existe une interaction très forte entre le système cardiovasculaire et respiratoire. En effet, la coordination de leurs activités est nécessaire à la régulation de l'apport en O_2 aux tissus dans des situations telles que l'exercice, le sommeil ou encore en cas d'hypoxie, de déshydratation ou de changement de température ambiante (revue dans Dampney, 2016). En cas d'hypoxie par exemple, la chute de la PaO_2 va provoquer l'activation des CRP et entraîner deux effets (Figure 6) :

- au niveau respiratoire, l'élévation de la fréquence ventilatoire afin d'augmenter les apports en O_2
- au niveau cardiovasculaire le débit sanguin au niveau des tissus est diminué en parallèle du rythme cardiaque afin de conserver l' O_2 disponible.

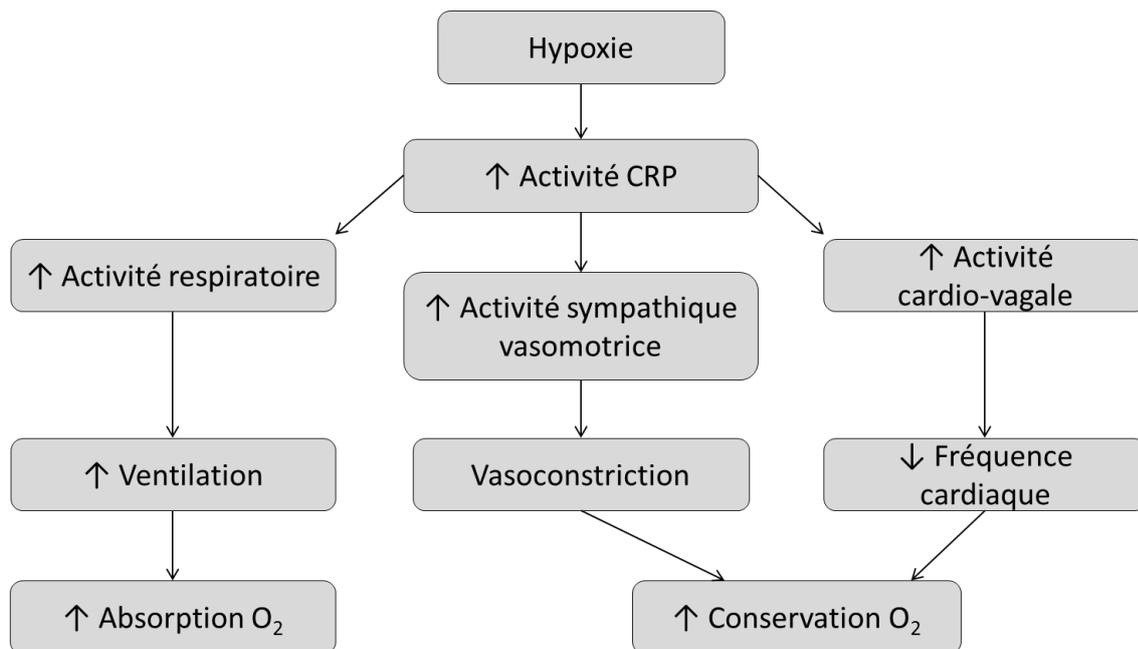


Figure 6. Schéma représentant l'effet des chémorécepteurs en condition hypoxique.

Adapté de Dampney et *al.*, 2016. CRP : chémorécepteurs périphériques ; O₂ : Oxygène.

L'information en provenance des CRP arrive au centre respiratoire bulbaire via les neurones glutaminergiques du noyau du tractus solitaire (NTS). Ces afférences ciblent aussi les neurones pré-sympathiques du GRV rostral augmentant de cette façon l'activité sympathique. Les CRP régulent également les sorties sympathiques et parasympathiques par le biais des projections du centre respiratoire bulbaire sur les neurones pré-sympathiques et les neurones cardio-vagaux pré-ganglionnaires.

Les chémorécepteurs centraux régulent les sorties sympathiques et cardio-vagales, en partie par l'activation des réseaux respiratoires. Ils augmentent également l'activité sympathique par des mécanismes indépendants du centre respiratoire bulbaire. Cette augmentation serait due en grande partie à l'élévation du rythme de décharge des neurones pré-sympathiques du GRV rostral (Moreira et *al.*, 2006). Cependant, le mécanisme responsable de l'activation des neurones du GRV rostral par les chémorécepteurs centraux reste mal connu.

L'influx parasympathique cardiaque est aussi modulé par le système respiratoire. Ces variations sont responsables des fluctuations respiratoires de la FC appelées arythmie sinusale. Les neurones parasympathiques cardiaques pré-ganglionnaires reçoivent un signal inhibiteur provenant des récepteurs pulmonaires à l'étirement, ce qui contribue à l'augmentation de la FC lorsque que la ventilation augmente. Le mécanisme d'action peut

être direct par une activité inhibitrice provenant des cellules GABAergiques situées dans le NTS, et indirect via des éléments du générateur du centre respiratoire bulbaire (Figure 7).

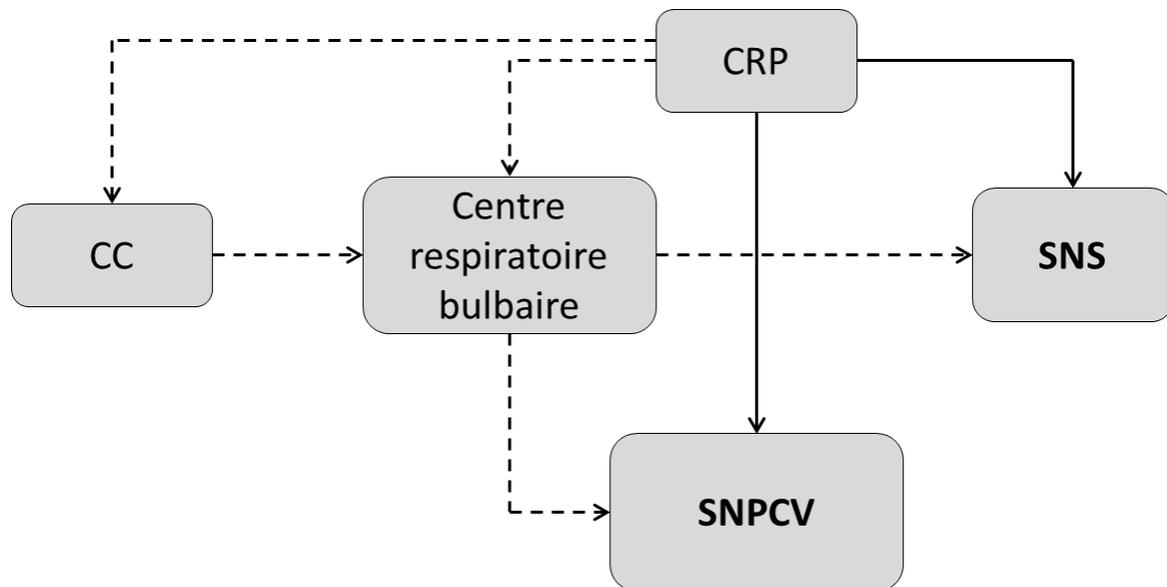


Figure 7. Structures nerveuses impliquées dans la relation entre les systèmes respiratoires et cardiovasculaires.

Adapté de Guyenet (2014). CRP : chémorécepteurs périphériques ; CC : chémorécepteurs centraux ; SNS : système nerveux sympathique ; SNPCV : système nerveux parasymphatique cardio-vagal.

3 Le sommeil du nouveau-né prématuré

3.1 Caractéristiques

Les nouveau-nés prématurés dorment entre 17 et 18 heures par jour. On distingue 4 stades comportementaux (Grigg-Damberger, 2016) :

- **L'état de veille** : la veille peut être calme, elle est rare avant 35 semaines d'aménorrhées (sem.a). Le nouveau-né a les yeux ouverts et est attentif, les mouvements corporels sont rares voire absents. D'autre part, la veille peut être agitée, l'enfant est alors moins attentif à son environnement et la présence de mouvements corporels et oculaires est souvent observée.

- Le **sommeil agité** (SA) est caractérisé par un électro-encéphalogramme (EEG) rapide (4-6 Hz), avec un tracé continu et de faible intensité (50-80 μ V), accompagné de mouvements oculaires rapides et de mouvements corporels. En SA, la fréquence cardiaque et la respiration sont rapides et irrégulières.
- Le **sommeil calme** (SC) est caractérisé par un EEG plus lent (ondes lentes de 0,5-3 Hz synchrones jusqu'à 200 μ V, avec un tracé discontinu ou semi discontinu et l'absence de mouvements oculaires. Entre 37 et 41 sem.a., l'EEG en SC prend la forme d'un « tracé alternant » présentant des bouffées EEG haut voltage entrecoupées par 2 à 40 s de tracé plat. C'est un sommeil stable, la respiration et la fréquence cardiaque (120-140 bpm) sont régulières.
- Le **sommeil indéterminé ou intermédiaire** (SI) peut survenir pendant la période de transition entre le SA et le SC. En effet, il présente les caractéristiques des deux stades. En SI, un tracé EEG continu et l'absence de mouvements oculaires sont généralement observés.

3.2 Développement des états de veille/sommeil

C'est entre la 8^{ème} et la 12^{ème} sem. a. que les premiers mouvements spontanés chez le fœtus humain sont observés. Ces mouvements sont qualifiés d'épisodiques car chaque phase active est séparée par des périodes calmes. Les états de vigilance ou états de veille/sommeil sont identifiables lorsque les structures nerveuses qui les contrôlent sont assez développées pour organiser la cyclicité de ces états. Le développement des différents stades comportementaux (sommeil et veille) commence pendant la vie fœtale à partir de la 27^{ème} sem. a.. L'amélioration avec l'âge de la synchronisation de l'activité motrice cyclique avec des changements périodiques de la fréquence cardiaque sont des moments clés dans le développement du système nerveux central (Visser et *al.*, 1987).

Les évolutions qualitatives et quantitatives des signaux EEG sont mal connues chez le nouveau-né prématuré, notamment à cause de l'importante variabilité inter- et intra-individuelle mais aussi du fait que peu d'études sur l'ontogénèse des états de veille/sommeil ont été réalisées dans cette population. Le développement du sommeil chez ces nouveau-nés est alors caractérisé par la coexistence progressive d'un certain nombre de paramètres

physiologiques pendant des périodes de plus en plus longues. Le cas des enfants nés à terme est différent car leurs états de veille/sommeil sont beaucoup mieux définis et il est donc possible de leur appliquer les critères comportementaux destinés au départ aux adultes.

Les nouveau-nés prématurés ne présentent pas encore l'ensemble des critères physiologiques de sommeil en raison de l'immaturation de leur système nerveux central. L'EEG reste discontinu jusqu'à 28-29 sem. a.. Les mouvements corporels sont très fréquents jusqu'à 28 sem. a., ainsi que les mouvements oculaires pour lesquels des périodes sans activité ne surviendront pas avant 30 sem. a.. La ventilation restera irrégulière jusqu'à 34 sem. a. (Curzi-Dascalova et al., 1988).

En ce qui concerne les évolutions qualitatives, il est considéré qu'avant 27 sem. a. le nouveau-né ne présente aucun stade de sommeil. La différenciation entre le SA et le SC se fait entre 28 et 30 sem. a. pour atteindre des périodes stables entre 31 et 34 sem. a.. Enfin, le SA et le SC ne sont considérés comme totalement individualisés qu'à partir de 35 semaines. Avant 36-37 sem. a., il est difficile de distinguer l'éveil du sommeil.

Les évolutions quantitatives sont caractérisées par des modifications importantes des durées absolues et relatives (en % par rapport au temps total de sommeil, TTS) des différents stades de sommeil. La durée relative du SI est importante jusqu'à 32 sem. a., cette durée diminuera par la suite avec la maturation. A l'inverse, le SA augmente avec l'âge conceptionnel en passant de 45 à 65 % entre 28 et 41 sem.a.. Pour le SC, cette augmentation est plus lente et passe de 20 à 35% entre 30 et 41 sem. a.. Les périodes de veille sont presque absentes chez le nouveau-né prématuré (inférieure à 10%). A l'âge du terme, les différences entre enfants nés à terme et prématurés sont peu marquées (Peirano et al., 2003).

3.3 Influence des stades de sommeil sur les paramètres cardio-ventilatoires

3.3.1 Impact sur les paramètres ventilatoires

Une étude (Curzi-Dascalova et Christova-Guéorguieva, 1983) a montré que, chez des nouveau-nés prématurés de 35 sem.a., la fréquence respiratoire était significativement plus

élevée en SA (50 cycles.min⁻¹) qu'en SC (40 cycles.min⁻¹). En SI, la fréquence respiratoire se retrouve dans une zone intermédiaire entre le SA et le SC. La ventilation minute étant le produit de la fréquence respiratoire et du volume courant, celle-ci est donc également plus élevée en SA, le volume courant restant constant (Bolton et Herman, 1974).

Les apnées sont également influencées par le stade de sommeil dans lequel se trouve l'enfant. En effet, il a été observé chez des enfants entre 30 et 35 sem. a. que, pendant le SA, les apnées sont plus fréquentes, durent plus longtemps et sont plus fréquemment associées à des bradycardies sévères par rapport au SC (Gabriel et al., 1976). Une étude précédente réalisée au sein du laboratoire (Chardon et al., 2004a) a suggéré que cette prédominance des apnées en SA pourrait être expliquée par une plus forte influence des chémorécepteurs périphériques sur la ventilation de base.

3.3.2 Impact sur le contrôle de la ventilation

À ce jour, les études s'intéressant à l'influence du sommeil sur le contrôle de la ventilation sont peu nombreuses. De plus, les méthodes utilisées étant différentes, cela rend la comparaison des résultats difficile.

Différentes études réalisées chez le nouveau-né ont utilisé la technique de « rebreathing » (le gaz inspiré est de plus en plus riche en CO₂), qui minimise les changements de la PaO₂ et provoque une augmentation de la ventilation. Les résultats montraient que la réponse ventilatoire était moindre en SA par rapport au SC (Cohen et al., 1997; Moriette et al., 1983).

D'autres investigations ont utilisé le test hyperoxique pour étudier la contribution des chémorécepteurs périphériques (CRP) à la ventilation de base en fonction des stades de sommeil. Rigatto et al. (1982) n'ont pas observé de différence significative dans la chute de la ventilation suite au test hyperoxique entre les différents stades de sommeil. Pourtant, dans une étude menée au sein du laboratoire, une chute de la ventilation plus marquée en SA a été observée (Chardon et al., 2004a). Ces résultats contradictoires pourraient s'expliquer par une différence dans la méthodologie d'analyse de la réponse ventilatoire. Dans l'étude de notre laboratoire, la chute de la ventilation a été relevée à la première baisse significative de la ventilation qui dépend des CRP ; alors que dans l'étude de Rigatto et

al., (1982), la baisse de la ventilation était moyennée sur les 30 premières secondes, reflétant alors l'influence des chémorécepteurs périphériques et centraux.

Plusieurs études relativement anciennes se sont intéressées à l'impact du stade de sommeil sur la réponse ventilatoire à l'hypoxie mais n'ont pas démontré de différence entre SA et SC (Brady et Ceruti, 1966; Rigatto et al., 1975). Une étude plus récente Parslow et al., (2003) a cependant observé une réponse ventilatoire qui tendait à être supérieure en SA chez des enfants âgés de 5 à 6 mois, sans montrer de différence significative entre les deux stades.

3.3.3 Impact sur la fréquence cardiaque et la variabilité du rythme cardiaque

Plusieurs études menées chez l'enfant à terme (Harper et al., 1978; Yiallourou et al., 2012) ont montré que la FC au repos était plus élevée en SA par rapport au SC. De la même façon, ces auteurs ont également observé que la variabilité à court terme du rythme cardiaque était plus importante en SA. Chez le nouveau-né prématuré, il a été montré que le stade de sommeil avait également un impact sur la FC et sur les paramètres de VRC (Stéphan-Blanchard et al., 2016). Globalement, la variabilité LF, qui est le reflet de l'activité sympathique (et dans une moindre mesure parasympathique), était plus élevée en SA, alors que la variabilité HF, reflet de l'activité parasympathique uniquement, était plus importante en SC. En conséquence, la balance sympatho-vagale était plus grande en SA par rapport au SC. Ces résultats confirment des travaux précédents qui ont permis de mettre en évidence une différence du contrôle autonome cardiaque en fonction du stade de sommeil avec un déplacement caractéristique d'une prédominance de l'activité parasympathique en SC vers une prédominance de l'activité sympathique en SA (Clairambault et al., 1992; Frasch et al., 2007).

Chapitre 2 : Exposition maternelle aux pesticides et santé périnatale

1 Utilisation des pesticides

Le terme « pesticide » représente l'ensemble des substances utilisées dans un but de prévention, de contrôle ou d'élimination des organismes nuisibles (plantes indésirables, insectes, animaux, champignons, bactéries). Selon la réglementation européenne, on distingue deux grandes catégories de pesticides :

- Les **produits phytosanitaires (ou phytopharmaceutiques)** utilisés sur les végétaux agricoles ou non agricoles comme les espaces verts des collectivités locales, des particuliers, etc. Il en existe plusieurs catégories : les herbicides pour lutter contre les mauvaises herbes ; les fongicides pour lutter contre les champignons ; les insecticides contre les insectes. D'autres produits sont également inclus tels que les rodenticides pour lutter contre les rongeurs et les régulateurs de croissance permettant d'augmenter ou limiter la croissance des plantes.
- Les **biocides** désignent les substances destinées à détruire, repousser ou rendre inoffensifs les organismes nuisibles en milieux non agricoles comme l'industrie (conservation du bois, du textile, ...), le milieu hospitalier (la désinfection des objets et surfaces) ou certains usages domestiques. Un insecticide par exemple sera qualifié de produit phytosanitaire s'il est utilisé sur un champ de blé et de biocide s'il est utilisé pour la conservation du bois.

Depuis des centaines d'années, l'Homme a recours à ces substances chimiques afin de protéger et d'améliorer le rendement des cultures. Cette course permanente à l'élimination des nuisibles a conduit à l'utilisation de composés organiques de synthèse de plus en plus toxiques. C'est au milieu du XX^{ème} siècle que l'utilisation des pesticides a connu une augmentation considérable. Cependant, cette généralisation de l'utilisation des pesticides ainsi que la contamination de l'environnement qui en résulte pose désormais question au vu des propriétés toxiques de ces composés. Des impacts sur la santé humaine et animale de certains produits ont été mis en évidence par de nombreuses études.

1.1 Usage agricole

L'utilisation quasi systématique des pesticides a conduit à une certaine dépendance des systèmes agricoles aux produits phytosanitaires dans les pays développés ou en développement. L'Europe et l'Amérique du Nord représentent à eux seuls plus de la moitié de l'utilisation de ces substances. L'Asie et l'Amérique latine sont aussi d'importants consommateurs. Malgré cette généralisation planétaire, l'usage de ces produits reste rare en Afrique (Figure 8). Dans le milieu agricole, les pesticides ont eu pour effet d'augmenter de façon significative le rendement des cultures en luttant contre les maladies, les insectes et les mauvaises herbes.

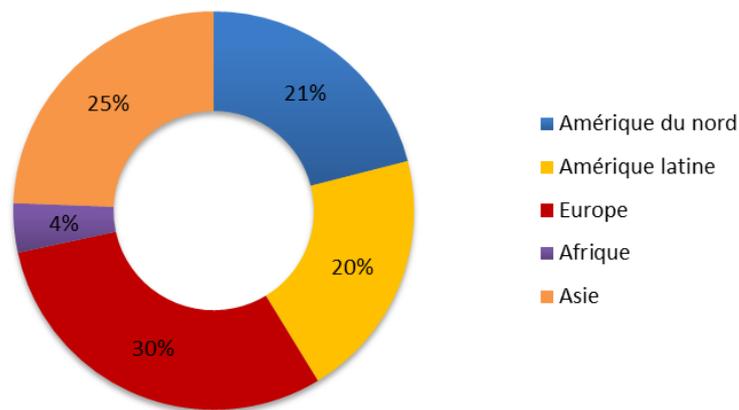


Figure 8. Répartition de l'utilisation des pesticides dans le monde.

(UIPP, 2009)

Selon l'Union des Industries de la Protection des Plantes (l'UIPP), en 2012 la France est le premier marché européen et consommateur de produits phytosanitaires avec un chiffre d'affaires de 1,99 milliards d'euros (soit un tonnage global de 63 200 tonnes) devant l'Allemagne, l'Italie et la Grande-Bretagne. Au niveau mondial, la France est à la 4^{ème} place derrière les Etats-Unis, le Brésil et le Japon.

En France, 95% des pesticides utilisés sont à usage agricole. L'utilisation des produits phytosanitaires concerne 96% des surfaces de grandes cultures pour les herbicides, 64% pour les fongicides et 34% des surfaces pour les insecticides. L'agriculture biologique ne

représente que 5,7% de la surface agricole utile¹. Comme l'indique la figure 9, la consommation de pesticides en France diminue depuis la fin des années 1990 passant d'un tonnage maximal à 120 500 à environ 63 000 tonnes vendues en 2012. Depuis 2009, les ventes se stabilisent. Cependant, bien que cette diminution semble très importante il faut noter qu'elle peut en partie être expliquée par l'apparition de molécules de plus en plus efficaces sur le marché nécessitant donc une plus faible quantité par hectare.

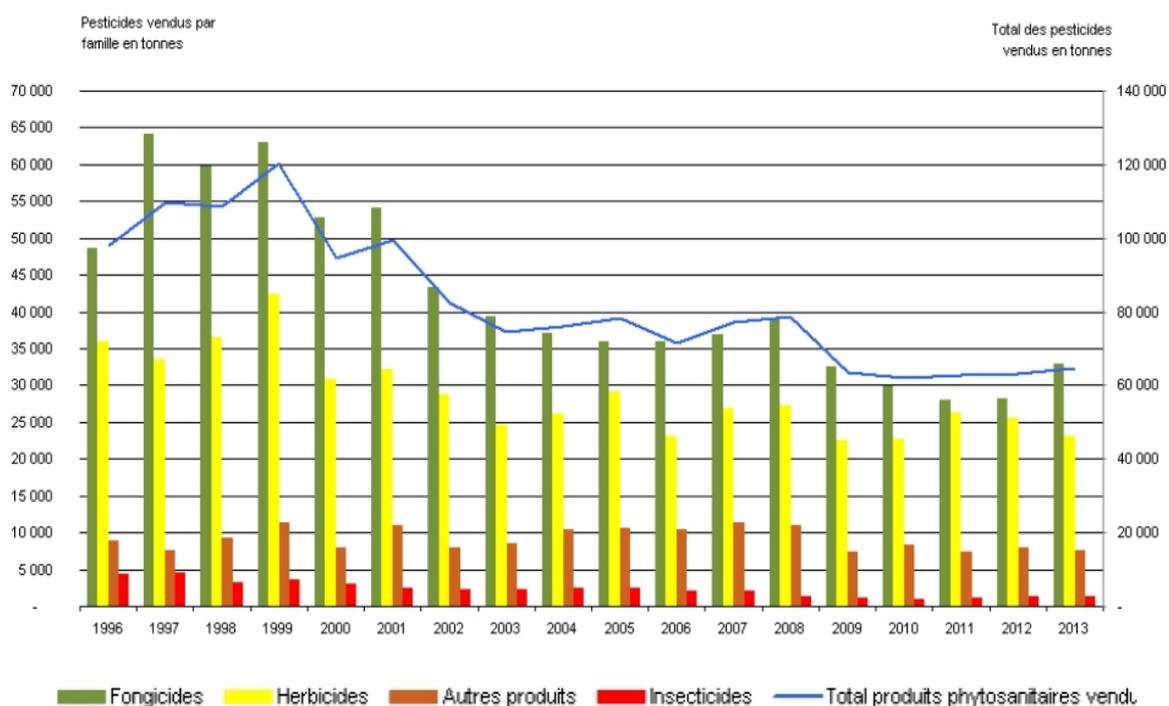


Figure 9. Evolution des quantités de produits phytosanitaires vendues en France.

(UIPP, 2016).

Si la France est désignée comme le principal consommateur européen, c'est également le premier producteur agricole avec la plus grande superficie de terres cultivées. En ce qui concerne la consommation de pesticides ramenée à l'hectare, la France se retrouve derrière plusieurs pays comme les Pays-Bas et la Belgique. La France utilise une quantité de produits phytosanitaires par hectare comparable à celle des Etats-Unis (environ 2,5 kg/ha).

Selon les régions, il existe de grandes disparités des pratiques agricoles. En 2001, le Service Central des Enquêtes et Etudes Statistiques (SCEES) a montré que certaines régions traitaient

¹ <http://www.agencebio.org/la-bio-en-france>

² Rapport Anses : Exposition de la population générale aux résidus de pesticides en France : Synthèse des

leurs cultures 3 fois plus que d'autres. En Alsace par exemple les champs de blé sont traités en moyenne 3 fois par an. Pour les agriculteurs picards c'est 9 fois par an. L'ancienne région Picardie, très agricole (70% de sa superficie) utilise à elle seule 5 500 tonnes de produits phytosanitaires par an (dont seulement 500 pour des usages domestiques et industriels). Une étude réalisée par l'Institut National de la Recherche Agronomique l'INRA a montré que la Picardie faisait partie des régions qui dépensent le plus pour l'achat de pesticides (Figure 10).

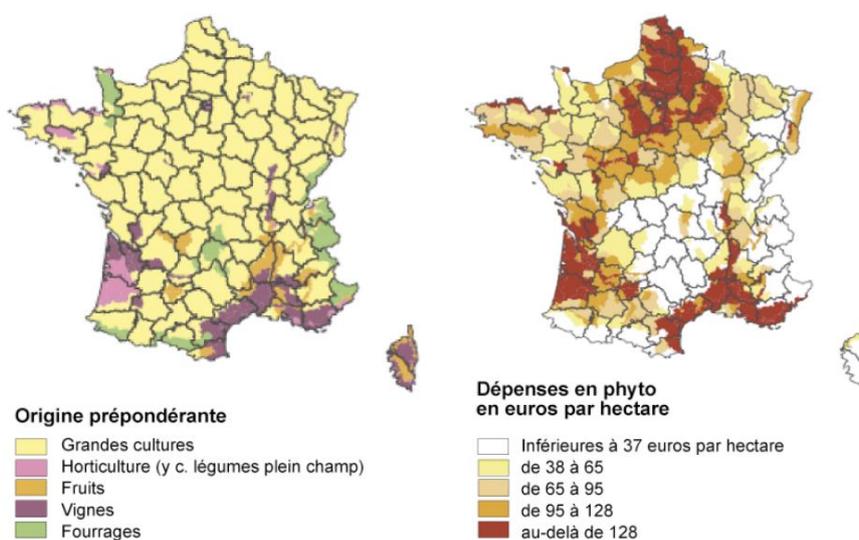


Figure 10. Répartition des régions agricoles selon l'origine et le niveau de la pression phytosanitaire (pesticides par hectare).

(INRA).

Mais alors que l'utilisation des produits phytosanitaires permet d'améliorer de façon considérable les rendements et d'atteindre les besoins en nourriture de la population, la mise en évidence des risques d'une telle utilisation sur l'environnement et la santé humaine remet en cause ce type de pratiques. Des études ont montré l'importance de la contamination environnementale à ces produits (Gong et al., 2010; Su et al., 2008) (Anses 2010)². Les pesticides sont aujourd'hui présents dans tous les compartiments de l'environnement (eau, air et sol) mais aussi dans les fruits, les légumes, les produits d'origine

² Rapport Anses : Exposition de la population générale aux résidus de pesticides en France : Synthèse des données d'utilisation, de contamination des milieux et d'imprégnation de la population, Mars 2010

animale (lait, viande, poisson, ..) et les céréales. En 2008, un rapport de la Direction Générale de la Concurrence, de la Consommation et de la Répression des Fraudes (DGCCRF) faisait état de la présence de résidus de pesticides dans 80% des rivières, 57% des nappes phréatiques et 52% des fruits et légumes consommés quotidiennement avec des concentrations supérieures aux limites autorisées dans 7,6% des cas. De plus, de nombreuses études ont montré une augmentation de certaines maladies chez les individus exposés professionnellement aux pesticides comme l'apparition de certains cancers, de troubles neurologiques, de troubles de la reproduction et de perturbations du système endocrinien ³.

Cette préoccupation pour les risques liés à l'exposition aux pesticides est intégrée dans le Grenelle de l'Environnement, dans la continuité du programme SCALE (Science, Children, Awareness, Legislation, Evaluation) de la Commission Européenne et la Conférence Interministérielle de Budapest, ainsi que dans les Plans Nationaux Santé Environnement (PNSE). Tous ces programmes visent à donner une place plus importante à la prévention des risques sanitaires, en développant particulièrement des axes de santé environnementale à destination des populations à risques que sont les enfants et les femmes enceintes.

Le plan ECOPHYTO lancé suite au Grenelle de l'Environnement de 2008 visait à réduire progressivement l'utilisation des produits phytosanitaires en France de 50% à l'horizon 2018, tout en conservant une agriculture économiquement performante. L'objectif initialement fixé à 2018 apparaissant hors de portée, la deuxième version du plan (ECOPHYTO 2), repousse la diminution de 50 % à 2025 avec un palier intermédiaire de 25 % souhaité en 2020. Avec un budget de 71 millions d'euros par an, le plan ECOPHYTO vise par différentes actions à démontrer qu'il est possible de produire autrement. En effet, afin d'atteindre l'objectif fixé, les actions du plan ECOPHYTO 2 visent à améliorer l'information des agriculteurs (création d'un réseau d'épidémiologie-surveillance), former les agriculteurs à une utilisation responsable des pesticides, à diffuser les bonnes pratiques agricoles (dont l'agriculture biologique) et à amplifier les efforts de recherche, développement et d'innovation.

³ Rapport INSERM. Pesticides. Effets sur la sante. Collection expertise collective, Inserm, Paris, 2013.

1.2 Usage non agricole

En France, les communes représentent le deuxième consommateur de produits phytosanitaires en zone non agricole après les particuliers. Ils sont utilisés de façon diverse pour l'entretien des espaces verts, de la voirie, des parkings ou encore des trottoirs. Avec 90% des substances actives utilisées, les produits de la famille des herbicides sont les plus représentés (Anses 2010). Les herbicides les plus couramment utilisés sont le glyphosate et l'aminotriazole.

Une autre utilisation non agricole des pesticides est à destination de l'entretien du réseau ferré, essentiellement par l'utilisation d'herbicides qui permettent de contrôler la végétation sur et aux abords des voies afin d'assurer la sécurité ferroviaire. Les quantités utilisées sont en constante diminution avec environ 200 tonnes en 2004 contre près de 400 tonnes en 1984 (Anses 2010).

Une étude réalisée par l'INERIS en 2008 par voie d'enquête (auprès d'organismes d'autoroutes, de la direction interrégionale des routes, des conseils généraux) a permis de détailler l'utilisation des pesticides pour l'entretien des réseaux routiers (Figure 11). 154 produits commerciaux ainsi que 69 substances actives ont été mis en évidence avec en grande majorité des herbicides qui représentent à eux seuls 68%. A nouveau, le glyphosate est le plus utilisé avec 56% des quantités répandues soit près de 11 tonnes par an. Au total, environ 20 tonnes de produits phytosanitaires sont déversées sur les routes de France chaque année.

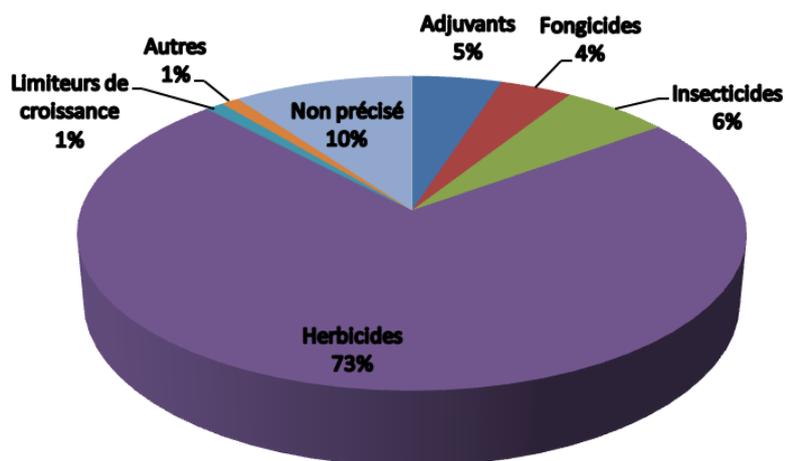


Figure 11. Utilisation des produits phytosanitaires pour l'entretien des routes.

(D'après INERIS, 2008).

1.3 Usage domestique

Bien que l'utilisation des pesticides ait lieu majoritairement dans le domaine agricole, ces produits sont aussi très utilisés dans les foyers. Cependant, les études françaises s'intéressant à la contamination de l'air intérieur restent peu nombreuses.

Une étude menée entre 2003 et 2005 par le CNAM-IHIE (Conservatoire National des Arts et Métiers - Institut d'Hygiène Industrielle et de l'Environnement) a permis de recueillir des informations sur les pratiques d'utilisation de plusieurs produits, notamment les pesticides, au moyen d'une enquête par questionnaire auto-administré chez 2281 personnes réparties sur tout le territoire français. Elle a permis de mettre en évidence la présence d'au moins un pesticide dans 92,7 % des logements (Lecomte, 2004). Les pyréthrinoïdes figurent parmi les familles chimiques les plus recensées dans les logements (47,8 % des cas). Les principales substances actives utilisées étaient la bifenthrine (utilisée principalement comme insecticide dans les jardins), la cyperméthrine (essentiellement utilisée comme insecticide des logements ou pour le traitement des bois) et d'autres pyréthrinoïdes surtout utilisés comme insecticides dans les logements ou en utilisation vétérinaire.

Les composés inorganiques comme le sulfate de cuivre utilisé comme fongicide et le glyphosate de la famille des herbicides sont également très utilisés par les particuliers

puisqu'on les retrouve dans respectivement 46,2 % et 31,2 % des logements. Contrairement aux pyréthriinoïdes, ces composés sont utilisés en extérieur pour l'entretien des jardins. D'autres composés comme le friponil ou la pyréthrine peuvent être utilisés comme insecticides d'intérieur pour lutter notamment contre les cafards et sont présents dans respectivement 31,2 % et 15,3 % des logements. Les organophosphorés sont quant à eux moins utilisés par les particuliers puisqu'ils n'ont été répertoriés que dans 13,2 % des cas, le plus utilisé étant le malathion, retrouvé dans 4,9 % des habitations.

L'étude *Expope*, réalisée entre 2002 et 2005 en Ile de France, a permis de décrire de façon qualitative et quantitative les pratiques d'utilisation de pesticides dans 130 foyers franciliens non ruraux (Bouvier et al., 2005). Cette étude a confirmé la tendance selon laquelle les pyréthriinoïdes sont les insecticides les plus fréquemment retrouvés dans les logements (présents dans 88,5 % d'entre eux). Ils sont suivis par les organophosphorés (39 %) et les carbamates (21,5 %).

L'utilisation domestique des pesticides a été évaluée par l'Anses (Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail) à 1400 tonnes par an (Anses, 2010).

Ce type d'utilisation engendre une exposition directe non négligeable de la population qui peut être d'autant plus élevée si aucune protection n'est appliquée.

2 Classification des différentes familles de pesticides

Il existe un grand nombre de pesticides différents possédant des propriétés et des modes d'action divers et variés. En France, plus de 500 substances actives entrant dans la composition de près de 3000 produits commerciaux utilisés en agriculture ont été recensées et homologuées. Ces substances peuvent être regroupées selon leur activité et l'espèce qu'ils combattent ou selon leur famille chimique.

2.1 En fonction de l'utilisation

On distingue les pesticides de la catégorie des herbicides, des insecticides et des fongicides qui combattent respectivement les végétaux, les insectes et les champignons. Ce sont les produits les plus utilisés (Figure 12). Il existe aussi d'autres catégories utilisées de façon plus spécifique et en quantités moins importantes pour presque chaque type d'organismes nuisibles. On retrouve par exemple les rodenticides pour lutter contre les rongeurs, les bactéricides contre les bactéries, les acaricides contre les acariens, les molluscicides contre les limaces et les escargots...

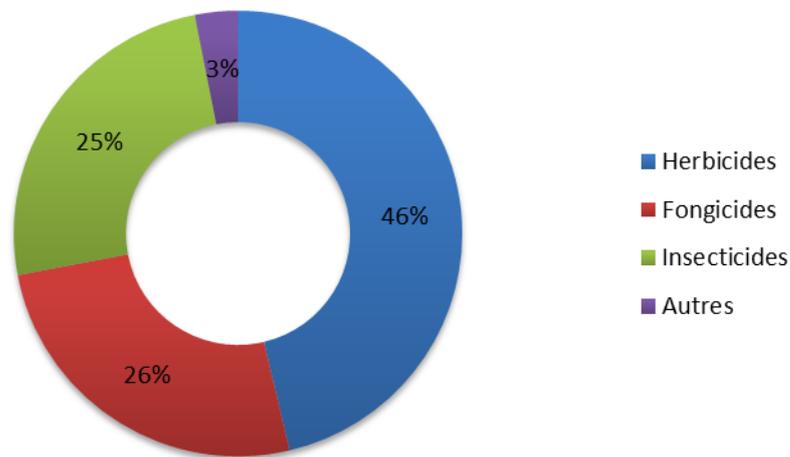


Figure 12. Répartition de l'utilisation des pesticides dans le monde par catégorie de produit.

2.1.1 Les herbicides

Comme évoqué précédemment, les herbicides sont les pesticides les plus utilisés. Ils représentent plus de 46% du marché mondial. En Europe et aux Etats-Unis ils constituent 70 à 80% des produits utilisés (UIPP, 2009). Ces produits limitent la propagation des végétaux et leur croissance par diverses actions : ils perturbent la synthèse de l'auxine qui est une hormone de croissance des cellules, ils inhibent la division cellulaire ou le processus de photosynthèse indispensable chez les végétaux. Ils agissent également sur la synthèse de lipides et des acides aminés. Les herbicides, comprennent des substances de la famille des phénols, des urées, des carbamates, des triazines ou des amines quaternaires.

2.1.2 Les insecticides

Utilisés pour lutter contre les insectes en agriculture ou en usage domestique, ils sont également choisis pour lutter contre la propagation de certaines maladies véhiculées par les insectes d'où leur importante utilisation dans les régions tropicales. En effet ils représentent 50% des pesticides dans ces régions contre une utilisation mondiale à 25 % (UIPP, 2009). Par leurs propriétés neurotoxiques ils peuvent éliminer les nuisibles ou stopper leur prolifération en limitant leur reproduction. Les insecticides regroupent la famille des organophosphorés, des organochlorés (dont beaucoup sont interdits), des carbamates ou des pyréthrinoïdes.

2.1.3 Les fongicides

Ils permettent de lutter contre les champignons et les maladies associées. Ils vont agir soit en stoppant le système respiratoire ou la division cellulaire, soit en perturbant la biosynthèse des acides aminés, des protéines ou des glucides. Certains fongicides appartiennent à la famille des carbamates, des amides ou des triazoles.

2.2 En fonction de la structure chimique

Les principales familles chimiques de pesticides sont les organophosphorés, les organochlorés, les pyréthrinoïdes, les carbamates et les phénylurées. Dans chaque famille les pesticides possèdent une fonction, un groupement chimique et/ou des propriétés communes.

2.2.1 Les organochlorés

Ce sont les premiers pesticides commercialisés et massivement utilisés entre 1940 et 1970, le plus connu étant le DichloroDiphénylTrichloroéthane (DDT) (Figure 13). Ce sont des composés très stables rendant leur dégradation très lente (plusieurs dizaines d'années). De plus, ils s'accumulent facilement dans les sols, les tissus végétaux et biologiques. Ceci a conduit à leur interdiction dans de nombreux pays dont la France car ils étaient considérés comme Polluants Organiques Persistants (POPs). Les organochlorés possèdent, comme leur nom l'indique un ou plusieurs atomes de chlore. Ils font partie des insecticides qui ont un effet sur le système nerveux entraînant une paralysie puis la mort.

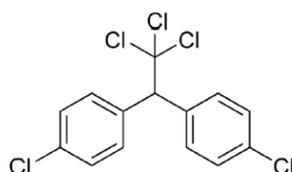


Figure 13. Formule du DichloroDiphénylTrichloroéthane (DDT).

Mécanisme d'action : Le système nerveux central est la cible principale des organochlorés. Il a été suggéré qu'ils pourraient avoir un effet inhibiteur sur la fonction de certains canaux ou récepteurs membranaires dont les récepteurs gamma aminobutyrique (GABA) (Vale et al., 2003; Zhao et al., 2003). Cette inhibition entraînerait une entrée massive de Ca^{2+} au niveau des récepteurs glutaminergiques (Pomés et al., 1994), entraînant la mort cellulaire de ces neurones par apoptose.

2.2.2 Les organophosphorés

Les organophosphorés possèdent une toxicité aigüe plus élevée que les organochlorés mais se dégradent rapidement. C'est à partir des années 1970 que leur utilisation comme insecticides s'est développée afin de remplacer les organochlorés persistant dans l'environnement. Ils se sont rapidement imposés par leur grande efficacité en tant qu'insecticides et acaricides, notamment grâce à des substances comme le malathion et le

chlorpyrifos (Figure 14). Les organophosphorés sont utilisés tant en agriculture que dans les logements des particuliers (traitement des habitations, plantes d'intérieur, jardin, potager), ils se dégradent rapidement dans l'environnement où ils sont transformés en une grande variété de métabolites.

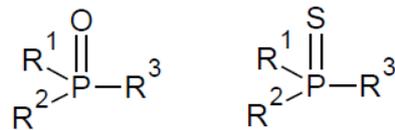


Figure 14. Structure des organophosphorés.

Mécanisme d'action : Leur propriété neurotoxique est principalement due à leur effet sur l'acétylcholinestérase. En effet, par la phosphorylation de cette enzyme, les organophosphorés inhibent son activité et par conséquent, empêchent la dégradation de l'acétylcholine qui s'accumule donc dans les synapses et prolonge son action. L'acétylcholine est un neurotransmetteur primordial pour le fonctionnement des systèmes nerveux central et périphérique, ainsi que de nombreuses fonctions qui sont sous leur contrôle.

2.2.3 Les carbamates

Ce sont des dérivés de l'acide carbamique, ils possèdent des propriétés neurotoxiques qui s'apparentent à celles des organophosphorés (Figure 15). En effet, ils inhibent également l'acétylcholinestérase mais avec une toxicité plus faible. On les retrouve en tant qu'insecticides, fongicides et dans certains produits domestiques.

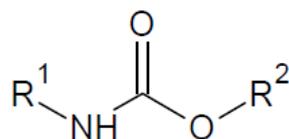


Figure 15. Structure des carbamates.

2.2.4 Les pyréthriinoïdes

Les pyréthriinoïdes introduits sur le marché dans les années 1970, font partie des insecticides les plus utilisés actuellement notamment parce qu'ils possèdent une forte toxicité, ce qui permet de les utiliser en plus petites quantités (Figure 16). Ils permettent aussi de lutter contre les acariens, ce qui rend leur utilisation très vaste que ce soit en agriculture, en répulsif domestique, pour la protection des bois ou pour le traitement de bâtiments recevant du public (hôpitaux, bureaux, commerces...). Les pyréthriinoïdes sont principalement émis dans l'air mais étant peu volatils ils vont principalement contaminer les surfaces et les sols.

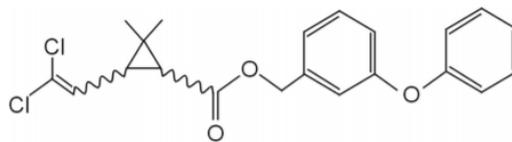


Figure 16. Exemple d'un pyréthriinoïde : structure de la perméthrine.

Mécanisme d'action : Ces neurotoxiques entraîneraient le maintien de l'activation des canaux sodiques voltage-dépendants ce qui perturberait plusieurs mécanismes de signalisation. En effet, les pyréthriinoïdes inhibent la signalisation GABAergique, modulent la transmission cholinergique, favorisent la libération de noradrénaline et ont un effet sur les canaux calcique et chlore. (Revue dans Ray et Fry, 2006)

2.2.5 Les phénylurées

Ce sont des dérivés de l'urée utilisés comme herbicides (Figure 17). Ils agissent sur une protéine des plantes qui a pour but de capter les photons. Cette action entraîne l'inhibition de la photosynthèse.

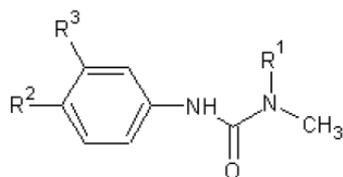


Figure 17. Structure des phénylurées.

3 Exposition humaine aux pesticides

3.1 Dispersion des pesticides

Les résidus de pesticides vont se disperser dans différents compartiments de l'environnement après leur application mais aussi dans les aliments d'origine végétale et animale. Suite à l'ingestion de ces aliments, les résidus de pesticides peuvent donc se retrouver dans les matrices biologiques humaines. Les pesticides existent sous leur forme initiale (substances mères) ou de métabolites.

Une part importante de pesticides s'infiltrer dans les sols pour s'y fixer plus ou moins durablement. Les pesticides présents dans les sols peuvent ensuite contaminer les eaux de surface et les eaux souterraines, principale source d'eau potable. En 2014, bien que la présence de pesticides soit généralisée dans les eaux des métropoles, 94 % de la population française a été alimentée par de l'eau en permanence conforme aux limites de qualité (Agences Régionales de Santé, ARS 2016). Ainsi, 6 % de la population soit 3,86 millions d'habitants ont été alimentés par de l'eau du robinet au moins une fois non-conforme. Cependant, les dépassements des limites pour cette population étaient ponctuels et très limités, n'occasionnant ainsi pas de restriction à l'utilisation de l'eau pour les usages alimentaires.

La présence de pesticides dans l'air est due principalement par l'usage agricole pendant les épandages à partir de rampes de pulvérisation montées sur des tracteurs ou par applications aériennes. Des prélèvements réalisés dans l'air extérieur par l'Association de Surveillance de la Qualité de l'Air (Atmo France) ont mis en évidence la présence de pesticides

potentiellement toxiques dans l'atmosphère en milieux rural et urbain. Bien que les études sur l'air intérieur soient peu nombreuses, la présence de certains composés a été détectée dans l'air intérieur et les poussières déposées aux sols (Bouvier et al., 2006).

3.2 Exposition aux pesticides

L'exposition humaine aux pesticides est très complexe de par la diversité des substances existantes, des sources d'exposition et des voies d'entrée des substances dans l'organisme.

3.2.1 Modes d'exposition

L'exposition aux produits phytosanitaires peut être **professionnelle** et touche principalement les professions agricoles qui représentent 17%⁴ du total des actifs, mais aussi non agricoles pour les personnes en charges de l'entretien des routes, des voies ferrées, des espaces communaux, des terrains de sports et de loisirs, de l'hygiène publique ou des soins vétérinaires, etc...

Cependant, cette exposition aux produits phytosanitaires n'est pas limitée à l'activité professionnelle. En effet, il existe également une exposition **domestique** par l'utilisation de produits d'entretien des plantes d'intérieur ou du jardin, de lutte contre les insectes domestiques, d'entretien des literies, des tapis ou des moquettes ou encore, lutte contre les parasites humains et vétérinaires.

Enfin, une part importante de la population subit une exposition **environnementale** par inhalation des particules de pesticides volatilisées dans l'air à partir des sites d'application professionnelle des pesticides (agricole ou non agricole).

⁴ Ministère de l'alimentation, de l'agriculture et de la pêche - Enquête structure, 2015

3.2.2 Voies d'entrée des pesticides

L'exposition humaine aux pesticides peut se faire par trois voies : digestive (ingestion de produits contaminés, contact main-bouche), respiratoire (inhalation des substances volatiles présentes dans l'air) ou cutanée. Lors d'une activité professionnelle, la pénétration se fait principalement par la voie respiratoire et la voie cutanée par contact direct (sur la peau non protégée), ou indirect (entourage, vêtements, ...). La population générale est quant à elle principalement exposée par voie digestive par la consommation d'eaux et d'aliments contaminés.

3.2.3 Types d'exposition

L'exposition aux pesticides peut être aiguë ou chronique :

- **L'exposition aiguë** s'observe principalement lors d'un accident d'utilisation chez les professionnels, d'une exposition accidentelle chez les enfants ou enfin d'une administration volontaire à visée suicidaire. Il s'agit d'une exposition généralement importante mais ponctuelle. Les manifestations de l'exposition aiguë aux pesticides sont très variables en fonction de la toxicité, de la voie de pénétration dans l'organisme, des caractéristiques et de la quantité du produit. Cette exposition peut parfois avoir des conséquences graves voire mortelles. Les effets d'une exposition aiguë sont étudiés dans les études toxicologiques dont le but est de déterminer la dose létale 50 (DL50). C'est-à-dire la dose d'une substance pouvant causer la mort de 50 % de la population.
- **L'exposition chronique** aux pesticides correspond à des expositions répétées généralement à de faibles doses de ces produits, qui s'accumulent dans l'organisme pendant un délai de quelques semaines à plusieurs années. Elle pourrait être à l'origine de différentes perturbations : des cancers, des déficits immunitaires, des perturbations endocriniennes, des troubles de la reproduction ou des perturbations du développement fœtal.

L'ensemble de la population peut donc être exposée. Parmi celle-ci, les femmes enceintes et leur futur nouveau-né constituent une population plus vulnérable en raison des processus de maturation qui ont lieu pendant ces périodes.

De plus, le paradigme concernant le lien entre la dose et l'effet est de plus en plus remis en question ; le moment de l'exposition apparaît désormais comme un facteur très important dans la survenue et la sévérité des effets. Ainsi, des niveaux d'exposition très bas, même brefs, qui ne produiraient pas d'effets chez l'adulte, mais se déroulant pendant des phases cruciales du développement fœtal, peuvent altérer de façon irréversible les organes en croissance et/ou le cerveau. La grossesse apparaît dans ce cadre comme une période de vulnérabilité pour le fœtus vis-à-vis des expositions aux pesticides. Cette fenêtre d'exposition chronique à de nombreuses substances que constitue la grossesse fait d'ailleurs l'objet d'études en toxicologie.

3.2.4 Imprégnation fœtale aux pesticides et quantification

Après une exposition aux pesticides, les différents composés seront absorbés, distribués, métabolisés et enfin excrétés.

Suite à l'absorption des composés (par voie orale, respiratoire ou cutanée), ils seront distribués via la circulation sanguine, aux organes et tissus cibles (foie, cerveau, poumons, reins, tissus adipeux...) où ils seront métabolisés, stockés et/ou excrétés. Le foie représente le site principal de métabolisation qui vise à permettre l'élimination des substances dans l'urine ou les fèces. Dans le cadre de la grossesse, suite à la distribution tissulaire, le fœtus peut être exposé à de nombreux xénobiotiques, dont les pesticides par le passage de la barrière placentaire. En effet, à partir de 16 sem.a., l'épaisseur de la barrière placentaire diminue entraînant une augmentation de sa perméabilité (Boyd et Hamilton, 1967). Le transfert des pesticides à travers le placenta peut alors se faire par plusieurs mécanismes : (1) la diffusion simple qui dépend du gradient de concentration entre le sang maternel et fœtal, elle concerne la majorité des xénobiotiques ; (2) la diffusion facilitée par un transporteur contre le gradient de concentration mais sans besoin en énergie ; (3) le transport actif de la substance contre le gradient de concentration et nécessitant de

l'énergie et (4) la phagocytose, qui est cependant un mécanisme moins impliqué dans le passage de la barrière placentaire (Ostrea et al., 2004). Par conséquent, les substances se retrouvent dans l'organisme du fœtus et s'y accumulent. Il est aujourd'hui communément admis que le fœtus n'est pas à l'abri des milliers de substances toxiques existant dans l'environnement. Évaluer de manière précise et individuelle les niveaux d'exposition pendant la période *in utero* est une étape cruciale permettant d'une part d'avoir une meilleure connaissance des modalités d'exposition des nouveau-nés aux pesticides, et d'autre part de faciliter la compréhension des mécanismes physio(patho)logiques et d'identifier les conséquences fonctionnelles associées à cette exposition. Cependant, dans de nombreuses études, l'exposition aux pesticides pendant la grossesse était souvent évaluée par des questionnaires qui, lorsqu'ils sont utilisés seuls ne permettent pas d'appréhender correctement l'exposition ni de la quantifier. D'autres études ont eu recours à des dosages de pesticides dans des matrices biologiques telles que le sang du cordon ou encore l'urine maternelle ou néonatale (Chevrier et al., 2011). Toutefois, ces milieux biologiques ne reflètent que les expositions récentes précédant le moment du prélèvement.

Peu nombreuses, d'autres études ont utilisé des matrices telles que le méconium et les cheveux du nouveau-né qui permettent de témoigner de l'exposition chronique des nouveau-nés (Berton et al., 2014; Meyer-Monath et al., 2014; Ostrea et al., 2009). Notre laboratoire, avec l'étude MecoExpo a été le premier en France à utiliser le méconium comme témoin de l'accumulation des pesticides pendant la grossesse. En effet, dans cette étude, le dosage de pesticides a été réalisé sur 171 échantillons de méconium. Ceci a permis de montrer que 80 % des échantillons présentaient, au moins 1 pesticide recherché. Avec une prévalence de pesticides issus principalement de la famille des organophosphorés (57,9 %) et des carbamates (22,8 %) chez des enfants nés en Picardie (Berton et al., 2014).

La méthode de dosage et les résultats de l'exposition de notre cohorte sont abordés dans le Chapitre 4.

4 Impact de l'exposition *in utero* aux pesticides sur les fonctions physiologiques

Les pesticides pourraient perturber le développement neurologique du fœtus et plus particulièrement des systèmes de neurotransmission (cholinergique, dopaminergique, noradrénergique, ...). Le dysfonctionnement des systèmes nerveux central et périphérique qui en résulterait pourrait avoir un effet délétère sur les fonctions neurophysiologiques qui assurent l'homéostasie des nouveau-nés (fonctions hypnique, cardiorespiratoire et cardiovasculaire).

4.1 Effets sur les paramètres anthropométriques

L'exposition intra-utérine aux pesticides pourrait avoir un impact défavorable sur la croissance fœtale. Un retard dans le développement fœtal est un facteur prédictif du retard du développement et de certaines pathologies de la vie ultérieure de l'enfant (McIntire et al., 1999; Yanney et Marlow, 2004).

Les études expérimentales réalisées chez les animaux (rat, souris, lapin) ont mis en évidence l'effet négatif de l'exposition maternelle aux pesticides pendant la gestation sur la croissance fœtale. Il s'agit notamment d'un faible poids fœtal ou néonatal (Lee et al., 2001; Syed et al., 2010; Ujházy et al., 2006). Ces résultats ont été confirmés par des études épidémiologiques réalisées chez l'Homme dans lesquelles l'exposition intra-utérine aux pesticides était associée à une diminution de certains paramètres de la naissance (poids, taille, périmètre cranien) (Chevrier et al., 2011; Mayhoub et al., 2014; Petit et al., 2010, 2012; Whyatt et al., 2004; Xiang et al., 2000)

4.2 Effets sur le système nerveux (central et périphérique)

Il a été démontré que les organophosphorés et les carbamates avaient un effet neurotoxique. Leur rôle d'inhibiteur de l'acétylcholinestérase perturbe la dégradation de l'acétylcholine (ACh) au niveau des synapses nerveuses. Cette inhibition entraîne

l'accumulation de l'ACh dont l'effet est dans un premier temps stimulant puis inhibiteur sur la neurotransmission.

Le système cholinergique :

Les neurones à projection diffuse qui utilisent l'ACh comme neurotransmetteur se retrouvent dans la région ventrale du télencéphale et dans la partie rostrale du pont dans le tronc cérébral. Près de trois quart de l'ACh corticale est issue du noyau basal de Meynert. Les noyaux pédonculo-pontin et pontique tegmental latéral projettent quant à eux au niveau du thalamus (Figure 18). L'ACh est un neurotransmetteur important aussi bien dans le système nerveux central, où elle est impliquée dans la mémoire et l'apprentissage, que dans le système nerveux périphérique, notamment dans l'activité musculaire et certaines fonctions neurovégétatives. Il jouerait en effet un rôle important dans la régulation du rythme respiratoire (Moss et al., 1986) en participant à l'excitation des chémorécepteurs centraux et périphériques, au moins en partie, à la phase active de dépolarisation des neurones respiratoires induite lors de stimulations hypercapnique et hyperoxique (Takeda and Haji, 1991). De plus, le système cholinergique joue un rôle dans la régulation et la modulation des états de veille/sommeil. Les neurones cholinergiques participeraient à l'activation corticale de l'éveil et du sommeil paradoxal via leurs projections excitatrices sur l'ensemble des zones corticales (Jouvet, 1972).

Les mécanismes cholinergiques possèdent une importance primordiale étant donné le rôle critique joué de l'ACh dans les phases de la maturation cérébrale. En effet, les récepteurs cholinergiques de type nicotinique sont présents dans l'organisme bien avant l'étape de neurulation (Schneider et al., 2002). Plus tard, durant la phase terminale de différenciation neuronale, l'ACh entraîne le passage de la réplication à la différenciation, modulant ainsi l'axogénèse et la synaptogénèse (revue dans Slotkin, 1998). Enfin, en fonction de la phase de développement, l'ACh entraîne ou prévient l'apoptose neuronale : lorsque les cellules sont peu différenciées, l'effet est d'abord pro-apoptotique ; alors que pour les cellules déjà différenciées, l'effet est anti-apoptotique (Pugh et Margiotta, 2000; Slotkin et al., 1997). Ainsi, même les phases tardives du développement cérébral sont dépendantes des influences trophiques de l'ACh.

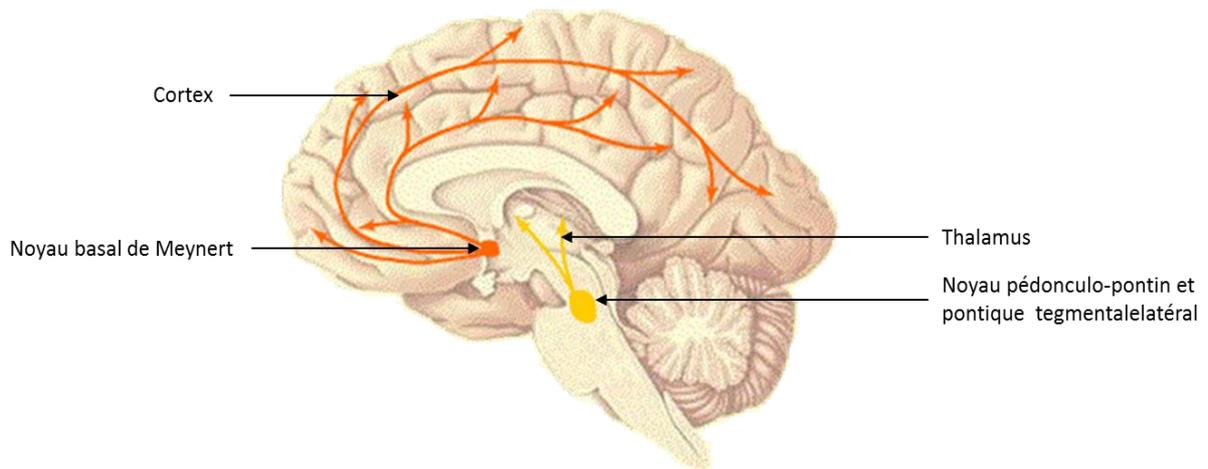


Figure 18. Sites de diffusion et les principales voies de projection de l'acétylcholine dans le cerveau.

L'effet des pesticides sur l'ACh, pourraient également entraîner indirectement des troubles du développement des autres systèmes de neurotransmission de par l'action neurotrophique de l'ACh.

Le système dopaminergique :

Les deux groupes de neurones qui libèrent de la dopamine (DA) sont situés au niveau de la partie inférieure du mésencéphale dans la substance noire. D'autres projections dopaminergiques partent de l'aire tegmentale ventrale pour rejoindre la région frontale du cortex et la plupart des structures du système limbique (Figure 19). Les mécanismes dopaminergiques sont essentiels pour la modulation de la réponse centrale inhibitrice à l'hypoxie. Au niveau périphérique la dopamine est impliquée dans le contrôle de la respiration en affectant les mécanismes de détection de l'oxygène par les chémorécepteurs périphériques (Bairam et Carroll, 2005).

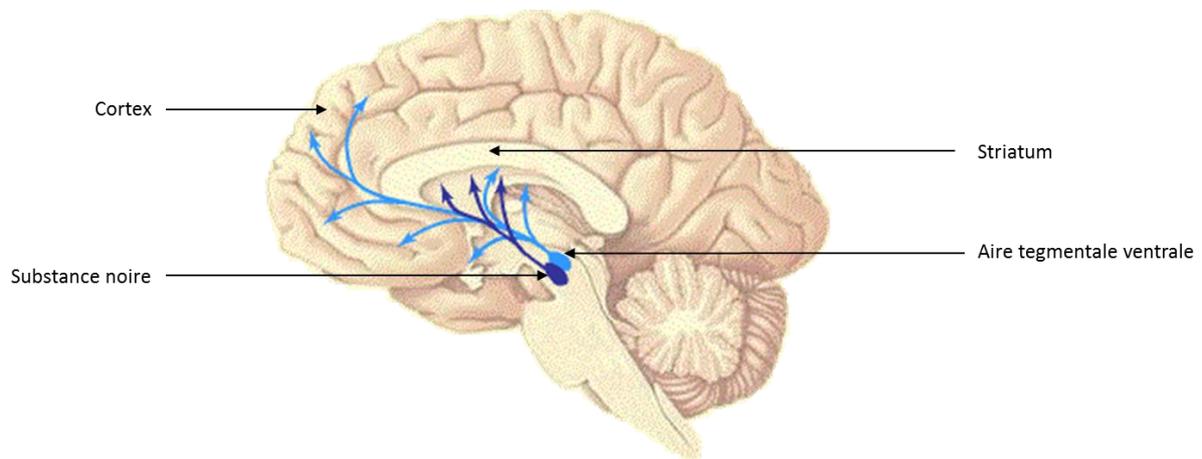


Figure 19. Sites de diffusion et les principales voies de projection de la dopamine dans le cerveau.

Le système noradrénergique :

La majorité des neurones qui produisent la noradrénaline (NA) dans le cerveau est regroupée au niveau du Locus Cœrulus. Ils envoient des projections vers presque toutes les régions du système nerveux central (Figure 20). La NA est un neurotransmetteur important pour le sommeil. En effet, les neurones noradrénergiques diffusent de façon ascendante vers les aires corticale et sous-corticale et sont donc considérés comme une composante intégrale du système ascendant de l'activation corticale (Jones, 2003; Jouvet, 1972). Cependant, ces neurones ne seraient pas directement responsables de l'activation corticale lors de l'éveil car la destruction totale des noyaux du Locus Cœrulus ou la lésion chimique spécifique de leurs cellules noradrénergiques ascendantes ne produit aucun effet sur l'électro-encéphalogramme cortical. La NA pourrait également inhiber l'activité nerveuse afférente des CRP en réponse à l'hypoxie (Prabhakar et Overholt, 2000).

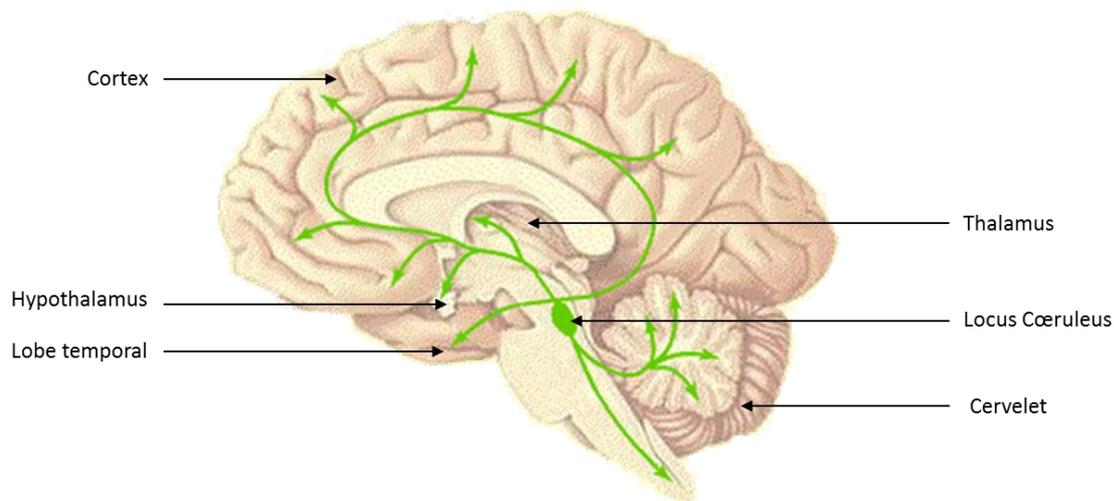


Figure 20. Sites de diffusion et les principales voies de projection de la noradrénaline dans le cerveau.

4.3 Impact sur le sommeil

Le nouveau-né passe plus de 80% de son temps en sommeil. Le sommeil est crucial pour le bon développement neurophysiologique de l'enfant particulièrement s'il est prématuré. De plus, l'intégrité du sommeil est un indicateur d'une bonne maturation du système nerveux central.

Chez l'Homme adulte, l'inhibition de l'acétylcholinestérase, principal mécanisme d'action des organophosphorés, initie et prolonge le sommeil paradoxal (Berkowitz et al., 1990). Une étude chez l'animal adulte (Timofeeva et Gordon, 2002) a mis en évidence que l'exposition à un pesticide organophosphoré (chlorpyrifos) entraînait des modifications de l'activité électro-encéphalographique (diminution du temps total de sommeil et augmentation des épisodes de veille) et du comportement.

Des effets de perturbation endocrinienne de certains pyréthrinoïdes (telle que la cyperméthrine) et carbamates (essentiellement l'ETU : métabolite du mancozèbe) ont aussi été rapportés. Ces pesticides induiraient une hypothyroïdie. Or, des études ont suggéré que la modification des sécrétions thyroïdiennes pourrait également être impliquée dans la perturbation du sommeil chez l'adulte principalement par une fréquence plus élevée d'apnée du sommeil (Bottini et Tantucci, 2003; Hira et Sibal, 1999).

4.4 Impact sur la ventilation

Les chémorécepteurs périphériques situés dans les corps carotidiens sont actifs dès la naissance et interviennent dans la ventilation de repos en informant en permanence les structures centrales de la composition chimique du sang artériel mais aussi dès la détection d'un changement dans cette composition chimique (hypoxie, hypercapnie, acidose). Les chémorécepteurs périphériques ont donc une activité tonique mais également dynamique (sensibilité) en réponse à une stimulation. De nombreux neurotransmetteurs interviennent dans la transmission du message issu des CRP. Parmi eux, l'ACh semble jouer un rôle important (Nurse, 2010; Shirahata et al., 2007). L'ACh est présente dans les corps carotidiens et sa quantité reste inchangée après la section du nerf sinusal carotidien (Fidone et al., 1976). L'acétylcholine transférase, l'enzyme de synthèse de l'ACh est également présente dans les corps carotidiens. De plus, on observe une libération d'ACh par les corps carotidiens en réponse à l'hypoxie et à l'hypercapnie (Fitzgerald et al., 1999, 2000). Ainsi, l'utilisation d'agent bloquant les récepteurs nicotiques à l'ACh (AChR) entraîne une inhibition partielle de la réponse à l'hypoxie. L'ACh agissant via des récepteurs post et présynaptiques de type nicotinique apparaît alors comme un neurotransmetteur excitateur du contrôle chimique de la ventilation. L'effet des pesticides (principalement les organophosphorés) sur l'ACh par l'intermédiaire de leur effet inhibiteur de l'acétylcholinestérase pourrait donc perturber cette régulation de la ventilation par les corps carotidiens. De nombreuses études montrent qu'une modification des contrôles autonomes parasympathique (cholinergique) et sympathique régulant les voies aériennes respiratoires, qui pourrait se produire lors d'une exposition aux pesticides, serait un facteur important dans la survenue d'épisodes asthmatiques et de leur sévérité (Barnes, 1995).

Enfin, comme pour le sommeil, la modification des hormones thyroïdiennes par l'exposition aux mancozèbe (carbamate) notamment pourrait également modifier le profil ventilatoire du nouveau-né, comme c'est le cas lors d'hypothyroïdisme (Schlenker, 2012).

5 But du travail

Si les effets sanitaires et cliniques d'une exposition aux pesticides chez le nouveau-né sont assez détaillés dans la littérature (diminution du poids et de la taille à la naissance), peu d'études se sont intéressées à l'impact sur les fonctions neurovégétatives d'une exposition chronique aux pesticides pendant la période cruciale du développement fœtal.

Les objectifs de ce travail sont les suivants :

- Evaluer l'exposition chronique du fœtus par l'utilisation de questionnaires parentaux et la réalisation du dosage simultané de plusieurs familles de pesticides dans le méconium des nouveau-nés (Etude 1) ;
- Etudier l'impact de l'exposition *in utero* aux pesticides sur les fonctions neurovégétatives essentielles pour le nouveau-né prématuré : le sommeil, la ventilation et son contrôle par les chémorécepteurs périphériques, et le système cardiovasculaire (Etude 2).

Chapitre 3 : Matériels et méthodes

1 Lieu et conditions d'exploration

1.1 Recrutement des sujets, comité d'éthique

Les explorations ont été réalisées au sein du service de Soins Intensifs de Néonatalogie et Médecine Néonatale (Dr André Léké) et du service de Réanimation Pédiatrique et de Surveillance Continue de Pédiatrie (Pr Pierre Tourneux) du Centre Hospitalier Universitaire (CHU) Amiens-Picardie. Le projet a reçu l'accord du comité d'éthique « CPP Nord-Ouest II » en décembre 2013. L'inclusion des enfants dans l'étude s'effectuait après la remise d'une note d'information et la signature du consentement éclairé par les parents. La signature faisait suite à une discussion du médecin avec les parents expliquant le but de l'étude.

31 nouveau-nés prématurés ont été recrutés.

Les critères d'inclusion étaient les suivants :

- Naissance au CHU d'Amiens ;
- Terme compris entre 26 et 32 sem.a. ;
- Mère majeure au moment de l'inclusion, et non privée de ses droits parentaux.

Les critères de non inclusion concernaient les nouveau-nés :

- Infectés ;
- Souffrant de troubles neurologiques, de pathologies graves cardiaques, respiratoires, digestives ou métaboliques.

1.2 Protocole général et déroulement des explorations

Le protocole général de l'étude est présenté dans la figure 21.

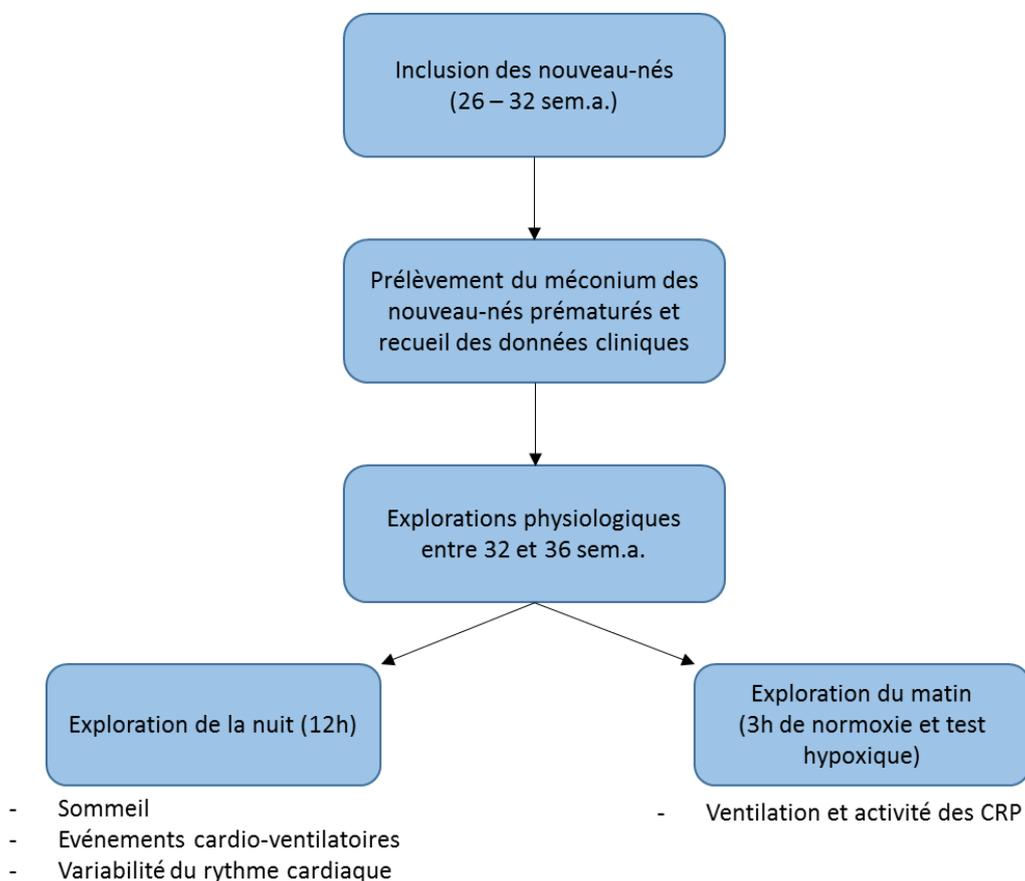


Figure 21. Schéma du protocole général de l'étude présentée dans ce travail.

CRP : chémorécepteurs périphériques.

Les enregistrements s'effectuaient en deux temps : tout d'abord une première partie visait à étudier l'impact de l'exposition *in utero* aux pesticides sur les états de veille/sommeil des nouveau-nés prématurés, ainsi que sur les paramètres cardio-ventilatoires. Pour cela, les nouveau-nés étaient explorés pendant une longue période de sommeil nocturne entre 20h et 8h le lendemain matin directement dans la chambre de l'enfant placé dans son berceau afin de ne pas perturber la continuité des soins. Cette configuration permettait également aux mamans présentes en chambre de rester auprès de leur enfant pendant toute la durée des enregistrements.

Le second temps de notre travail avait pour but d'étudier la chémoréception périphérique en fonction des stades de sommeil, ainsi que l'influence que pourraient avoir les pesticides sur cette interaction avec le sommeil. Les enregistrements étaient alors réalisés au cours d'une sieste matinale, dans les mêmes conditions que lors de la première partie. L'environnement de l'exploration était contrôlé : porte fermée afin d'éviter les bruits du service hospitalier pouvant perturber le sommeil de l'enfant, les explorations étaient également réalisées sans lumière artificielle, et les stores fermés (le matin) pour éviter la lumière du jour ; enfin, la température de la chambre était contrôlée et comprise entre 25 et 27°C

2 Présentation de la plateforme d'exploration

Notre étude reposait sur une approche plurifonctionnelle originale mais complexe car elle nécessitait l'enregistrement simultané d'un grand nombre de variables neurophysiologiques dans une population très particulière que représente les nouveau-nés prématurés. Un premier travail a donc consisté à adapter le matériel à l'expérimentation chez les nouveau-nés prématurés afin de permettre une mesure synchronisée du sommeil, de la ventilation et des paramètres cardiovasculaires. L'inexistence d'un matériel commercial dédié à l'exploration de la réponse ventilatoire à l'hypoxie représentait une difficulté supplémentaire. Une plateforme d'exploration a donc été mise en place afin de réunir tous les éléments techniques nécessaires à l'enregistrement des différentes fonctions neurophysiologiques et de les adapter aux spécificités de notre protocole et à la population des nouveau-nés prématurés.

3 Exploration du sommeil : polysomnographie

3.1 Signaux et enregistrements

L'étude du sommeil du nouveau-né a été réalisée à l'aide d'un polysomnographe Alice 4 (Respironics[®], Nantes, France).

Le polysomnographe permettait l'enregistrement simultané et synchronisé de plusieurs signaux électro-physiologiques incluant : l'électro-encéphalogramme (EEG), l'électrocardiogramme (ECG), la saturation pulsée en oxygène (SpO₂), le signal respiratoire ainsi que les mouvements oculaires et corporels (Figure 22). Tous les signaux étaient ensuite visualisés et analysés dans le logiciel Alice Sleepware[™] 2.4.14.

3.1.1 Les signaux hypniques

Les signaux hypniques utilisés pour le décodage en temps réel du sommeil se composent de :

- 2 électro-encéphalogrammes : obtenus par des électrodes Capsulex plates (MEI, Medical Equipment International, Toulon, France) appliquées directement sur le cuir chevelu des bébés à l'aide d'une pâte conductrice EC2 (MEI, Medical Equipment International, Toulon, France). 4 électrodes réceptrices étaient placées selon le système international 10/20, dont 2 en position occipitale (O1 et O2) et 2 en position temporale (T3 et T4). Une cinquième électrode utilisée comme référence était placée en position frontale. L'ensemble des électrodes était maintenu sur la tête de l'enfant par un filet de maintien (Surgifix[®], laboratoire URGO, Chenôve, France) et connecté à la boîte têtère du polysomnographe. L'échantillonnage du signal était de 100 Hz, avec des filtres passe-haut à 0,3 Hz et passe-bas à 10 Hz.
- Les mouvements corporels étaient mesurés par 2 actimètres (Respironics[®], Nantes, France) répartis de façon contralatérale au niveau de la main et de la cheville de l'enfant.

- Les mouvements oculaires : l'électro-oculogramme était obtenu à l'aide de deux électrodes (NeoLead[®], Valencia, USA) placées au niveau des yeux en controlatéral, en haut de l'œil gauche et en bas de l'œil droit.

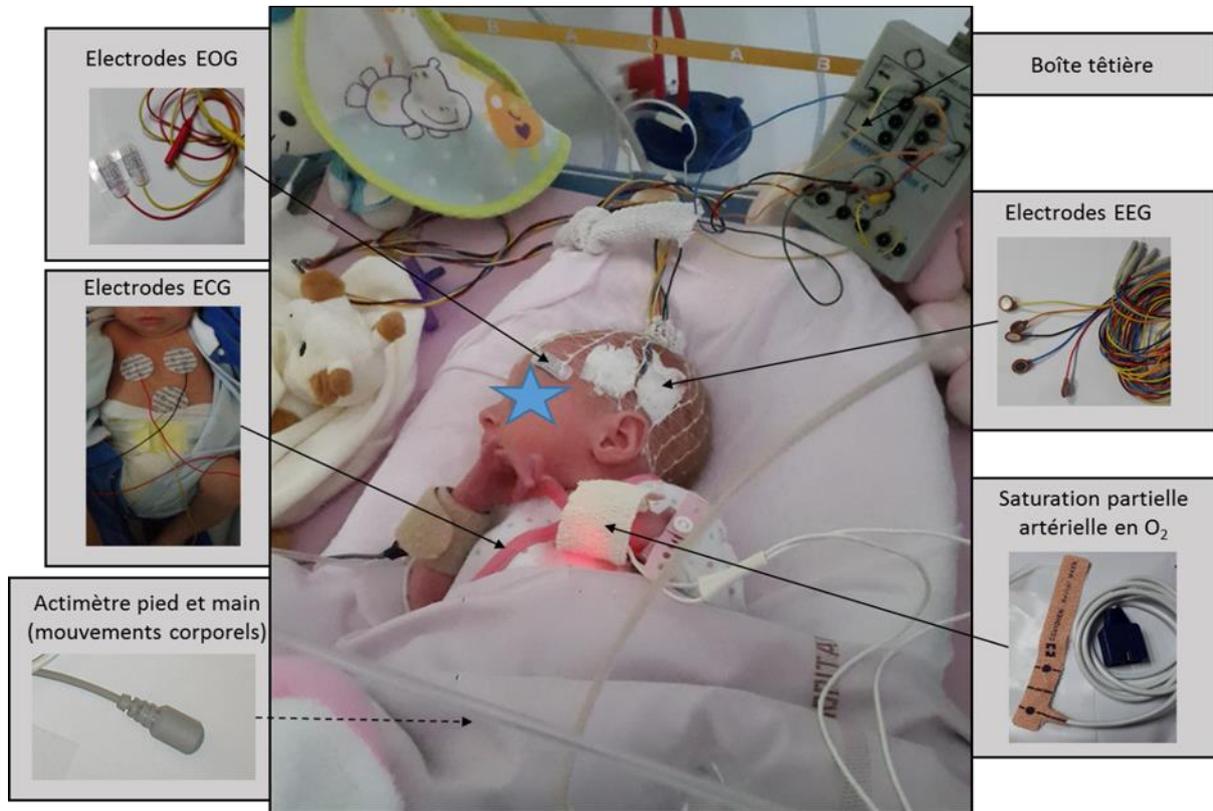


Figure 22. Placement des capteurs utilisés pour la polysomnographie.

NB : Les actimètres non visibles, étaient placés au niveau d'une main et d'un pied.

3.1.2 Les signaux cardio-respiratoires

Le signal ECG était enregistré grâce à 3 électrodes (NEUROCOM, Comepa, Bagnolet, France). Les deux premières étaient placées au niveau de la clavicule droite et gauche et la troisième au niveau de la partie basse de l'abdomen. Reliées à la boîte tête du polysomnographe, les électrodes permettaient d'obtenir en continu deux signaux distincts : d'une part l'ECG à une fréquence d'échantillonnage de 200 Hz et, d'autre part, le signal RR à 2000 Hz. La fréquence cardiaque était calculée à partir de ce signal.

Le signal respiratoire ne nécessitait pas la pose de capteurs supplémentaires, il était mesuré par impédancemétrie à partir des électrodes ECG. Enfin, la SpO₂ était enregistrée en continu

à l'aide d'un capteur de saturation (OxiMax Technology, COVIDIEN, MAX-N, Nellcor, Mansfield, USA) placé au poignet ou au pied de l'enfant. Le flux nasal était mesuré par un capteur enregistrant par thermistance (variation d'une résistance électrique en fonction de la température) les cycles respiratoires (inspiration et expiration), dont les extrémités étaient placées devant chaque narine.

3.2 Les paramètres hypniques

3.2.1 Décodage des stades de sommeil

Le décodage du sommeil a été réalisé sur la base des critères recommandés par Grigg-Damberger (2016). Ceux-ci permettent de différencier les stades de sommeil par intervalle de 30 s grâce aux signaux EEG, aux mouvements oculaires et à la respiration selon les critères suivants (Figure 23) :

- Le sommeil agité (SA) était déterminé par une activité EEG continue d'amplitude faible, d'une respiration irrégulière et de la présence d'au moins un mouvement oculaire par plage de 30 s pendant une période d'au moins 3 min ;
- Le sommeil calme (SC) était, défini par un signal EEG discontinu ou semi-discontinu, une ventilation plus régulière et sans mouvement oculaire pendant une période minimale de 3 min ;
- Le sommeil indéterminé (SI) était représenté par un signal EEG qui comprenait simultanément les caractéristiques du SA et du SC. Les périodes de SI sont généralement caractérisées par l'absence de mouvements oculaires durant un tracé EEG continu.

Pendant la veille, le nouveau-né avait les yeux ouverts scrutant ou non son environnement, des mouvements corporels étaient observés plus fréquemment et l'enfant pouvait parfois crier ou pleurer.

Les périodes d'éveil avec de nombreux mouvements corporels, par exemple pour la prise d'un biberon, ou lors d'intervention des infirmières, étaient exclues de l'analyse.

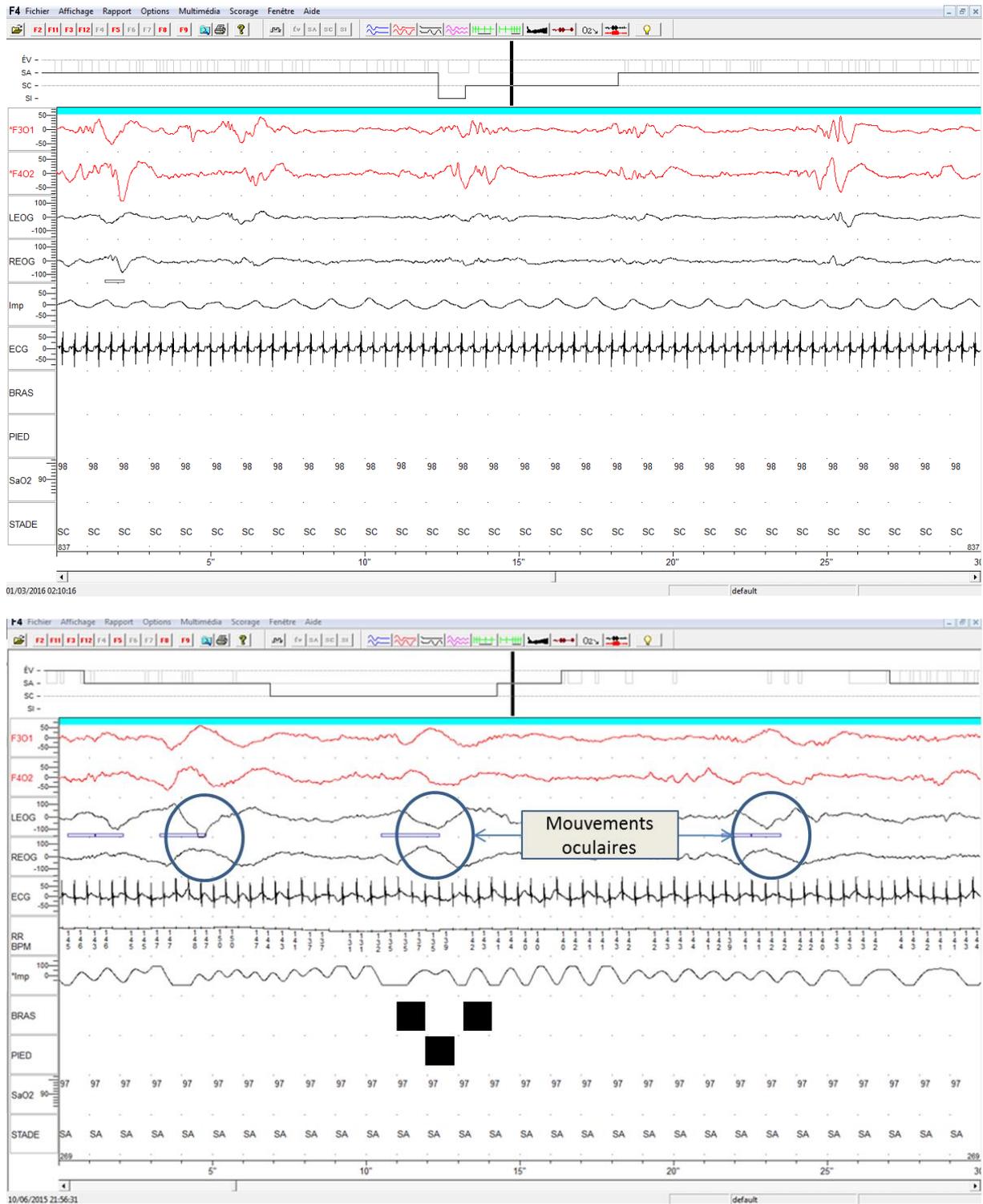


Figure 23. Tracés représentant une période de sommeil calme (en haut) et de sommeil agité (en bas) sur une plage de 30 s.

F301 et F402 : signaux EEG, LEOG/REOG : électro-oculogrammes gauche et droit, ECG : électrocardiogramme, Imp : signal respiratoire par impédancemétrie, BRAS/PIED : mouvement de bras/pied du nouveau-né, SpO₂ : Saturation pulsée en oxygène, STADE : stade de sommeil.

3.2.2 Paramètres hypniques

Afin d'étudier le sommeil, deux types de paramètres ont été mesurés. Il s'agit des paramètres relatifs à la structure du sommeil et ceux se rapportant à sa stabilité, c'est-à-dire la capacité des nouveau-nés à maintenir leur sommeil.

Les paramètres suivants ont donc été pris en compte :

- la durée globale de sommeil (DGS, min), définie comme le temps écoulé entre le premier endormissement et le dernier éveil ;
- la veille intra-sommeil (VIS), exprimée par sa fréquence (h^{-1}) et son pourcentage (% DGS) ;
- le temps total de sommeil (TTS, min), correspond à la différence entre la DGS et la durée totale de la VIS ;
- les différents stades de sommeil (SA, SC, SI), exprimés par leur durée moyenne (min), leur durée maximale (min) et leur durée relative (% TTS) ;
- la fréquence de changements de stades (VIS, SA, SC, SI) sur toute la DGS (h^{-1}).

3.3 Désaturations indépendantes

Les désaturations ont tout d'abord été analysées indépendamment des apnées (Figure 24). Pour plus de pertinence clinique, le choix a été fait ici de filtrer et d'étudier les désaturations dont la SpO_2 chutait en dessous de 90%. En effet, les répercussions physiologiques d'une chute plus faible, sont quasi-inexistantes. La présence d'une bradycardie, définie par une baisse de 10% de la fréquence cardiaque entre le début de la désaturation et la fin de celle-ci, a également été recherchée. Des désaturations avec (+B) et sans (-B) bradycardie ont donc été distinguées.

Quatre paramètres ont été étudiés en fonction du stade de sommeil et de l'association ou non à une bradycardie : la durée moyenne des désaturations en secondes ($D_{moy\ desat}$), la fréquence moyenne de désaturation (f_{desat} , désaturation. h^{-1}) et le pourcentage moyen de chute de SpO_2 lors des désaturations (Chute SpO_2 , %).

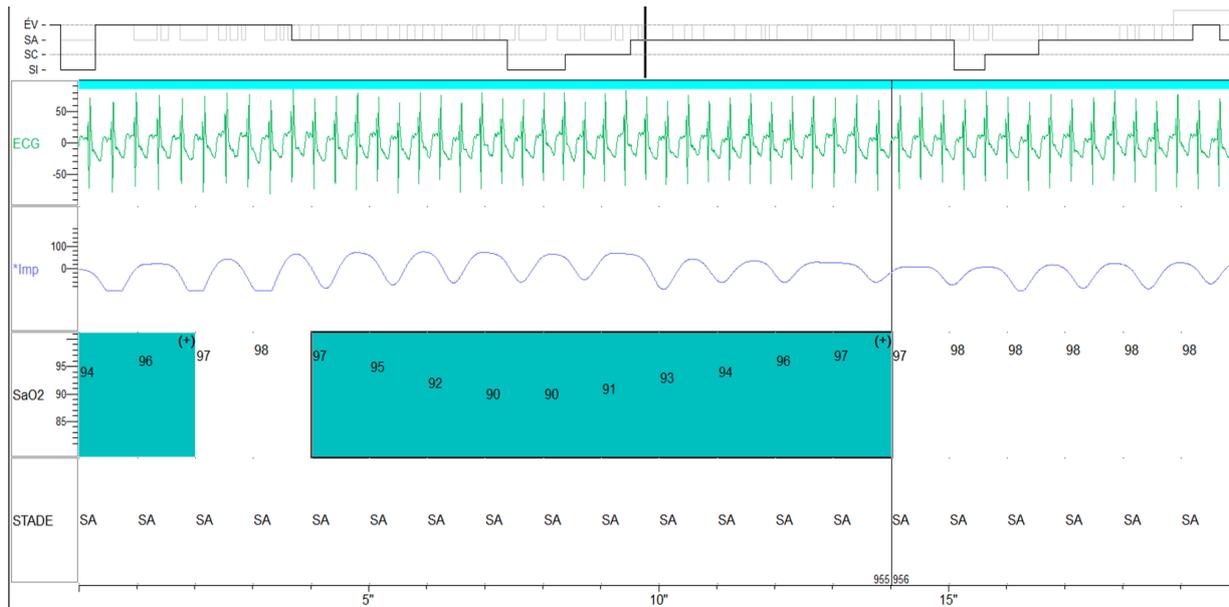


Figure 24. Désaturations isolées sur le logiciel Alice Sleepware.

ECG : électrocardiogramme ; Imp : signal respiratoire par impédancemétrie ; SpO₂ : Saturation pulsée en oxygène, STADE : stade de sommeil, (+) : désaturation.

3.4 Apnées

Les apnées ont été déterminées à partir du signal d'impédancemétrie et de flux nasal. Les apnées étaient caractérisées par un arrêt de la ventilation d'au moins 3 s (Berterottière et al., 1990; Chardon et al., 2004a; Tourneux et al., 2008). 3 types d'apnées ont été analysées : les **apnées centrales** qui correspondent à une absence de flux aérien et de mouvements thoraco-abdominaux, les **apnées obstructives** qui associent une absence de flux aérien et le maintien de mouvements thoraco-abdominaux et les **apnées mixtes** qui se caractérisent par la succession d'une apnée centrale et d'une apnée obstructive.

Dans notre travail, seules les apnées centrales ont été utilisées pour étudier l'effet des pesticides (Figure 25). En effet, les nourrissons, ayant pour habitude de porter leurs mains au visage, retiraient très régulièrement le capteur de flux nasal, empêchant la détermination de l'ensemble des apnées obstructives et par conséquent des apnées mixtes.

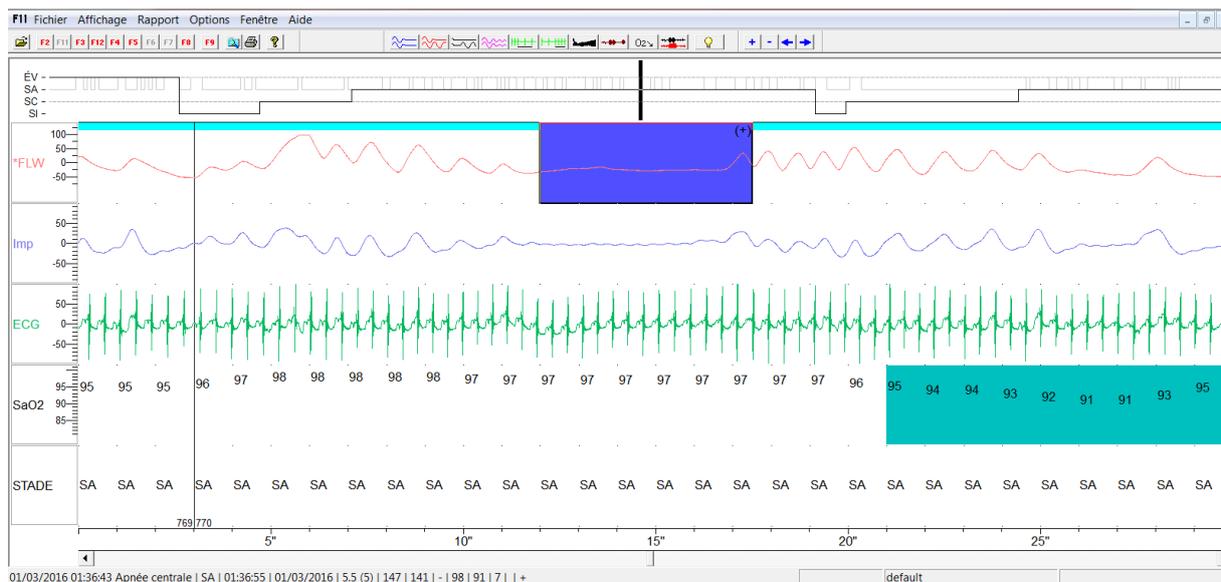


Figure 25. Apnée centrale suivie d'une désaturation sur le logiciel Alice Sleepware.

FLW : flux nasal ; Imp : signal respiratoire par impédancemétrie ; ECG : électrocardiogramme ; SpO₂ : Saturation pulsée en oxygène, STADE : stade de sommeil, (+) : apnée centrale.

Les apnées centrales ont été analysées pendant la période de sommeil nocturne en SA et en SC à l'aide du logiciel Alice Sleepware™, qui permettait de détecter automatiquement certains événements respiratoires (apnées, bradycardies, désaturations...) sur l'ensemble de l'enregistrement. Cependant, une relecture manuelle de toutes les données était nécessaire afin d'exclure d'éventuels artefacts pouvant être causés par des mouvements corporels par exemple.

Cinq types d'apnées centrales ont été considérés en fonction de la présence ou non d'une désaturation et/ou d'une bradycardie :

- toutes les apnées confondues (Apn ±D/±B) ;
- les apnées isolées (Apn -D/-B) ;
- les apnées avec désaturation et sans bradycardie (Apn +D/-B) ;
- les apnées sans désaturation et avec bradycardie (Apn -D/+B) ;
- les apnées avec désaturation et bradycardie (Apn +D/+B).

Une désaturation était définie par une chute de la SpO₂ d'au moins 4% (référence fixée par le logiciel Alice Sleepware™) et une bradycardie par une chute de 10% de la fréquence cardiaque.

Pour chacun de ces types d'apnées, la fréquence (f_{Apn} , Apnée.h⁻¹), la durée moyenne (D_{moy} Apn, s) et la durée maximale (D_{max} Apn, s) ont été analysées. Dans le cas où aucune apnée n'était détectée sur l'ensemble de l'exploration ou pendant un stade de sommeil précis, la fréquence était notée 0 apnée.h⁻¹, la durée moyenne était elle, considérée comme valeur manquante dans l'analyse statistique.

3.5 Respirations périodiques

Les respirations périodiques ont été analysées selon la définition suivante : une succession d'au moins 3 pauses respiratoires (de minimum 3 secondes) entrecoupées de périodes de respiration normale (durant moins de 20 secondes) (Berry et al., 2012). A nouveau, le logiciel Alice Sleepware™ effectuait un décodage automatique des respirations périodiques mais certains évènements n'étaient pas comptabilisés. Une analyse manuelle restait donc nécessaire pour l'ensemble des nouveau-nés (Figure 26). Les désaturations ($SpO_2 \leq 90\%$) associées aux respirations périodiques étaient également analysées. On distinguait ainsi deux types de respiration périodique : avec (+D) et sans (-D) désaturation.

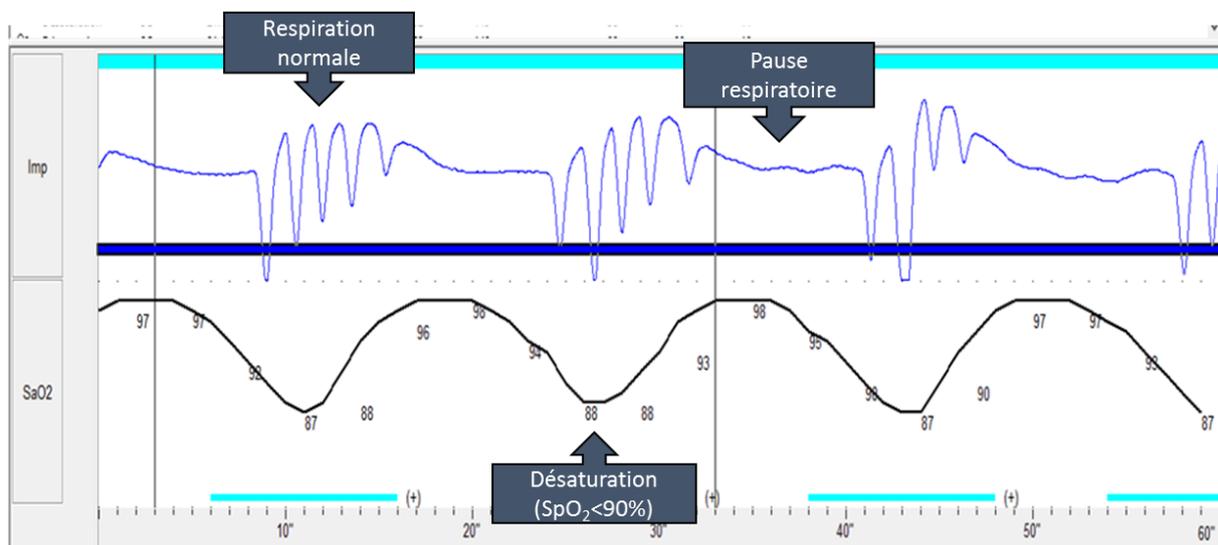


Figure 26. Exemple de respiration périodique sur le logiciel Alice Sleepware.

Imp : signal respiratoire par impédancemétrie, SpO_2 : saturation pulsée en oxygène.

Trois paramètres pour ces respirations périodiques ont été étudiés en SA et en SC : leur fréquence (f_{RP} , $RP \cdot h^{-1}$), leur durée moyenne ($D_{moy RP}$, s) et leur durée maximale (D_{max} , s).

4 Développement de la plateforme d'exploration de la chémoréception périphérique

L'étude de la fonction ventilatoire et de l'activité des chémorécepteurs périphériques (CRP) chez le nouveau-né est peu présente dans la littérature. Ce faible nombre d'études peut s'expliquer par la difficulté technique de mettre en œuvre ce type de travaux notamment chez les nouveau-nés prématurés. En effet, il s'agit d'une population sensible et non consentante pour laquelle le matériel est souvent non adapté. Chez le nouveau-né prématuré, l'étude de la ventilation nécessite la juxtaposition de techniques d'apport et de prélèvement de gaz qui doivent être adaptées à la biométrie et à la morphologie du nouveau-né prématuré.

L'appareil choisi pour les explorations ventilatoires fut l'EXHALYZER[®] D (ECOMedics AG, Duerten, Suisse), appareil complet, avec l'avantage d'être adapté à la morphologie (petites surfaces corporelles) et à la physiologie des nouveau-nés prématurés (fréquences respiratoires élevées, faibles débits ventilatoires et petits volumes de gaz à prélever). Il permettait l'étude de la ventilation grâce à des mesures tels que les débits ventilatoires et l'analyse des gaz prélevés. De plus, il possédait un temps de réponse rapide (100 ms) qui permettait l'obtention d'un signal précis et rapide. Enfin, la présence d'une électrovanne à l'intérieur de l'EXHALYZER[®] D permettait d'alterner entre l'air ambiant ou le gaz hypoxique (Figure 27).

4.1 Matériel et adaptation du logiciel au test hypoxique

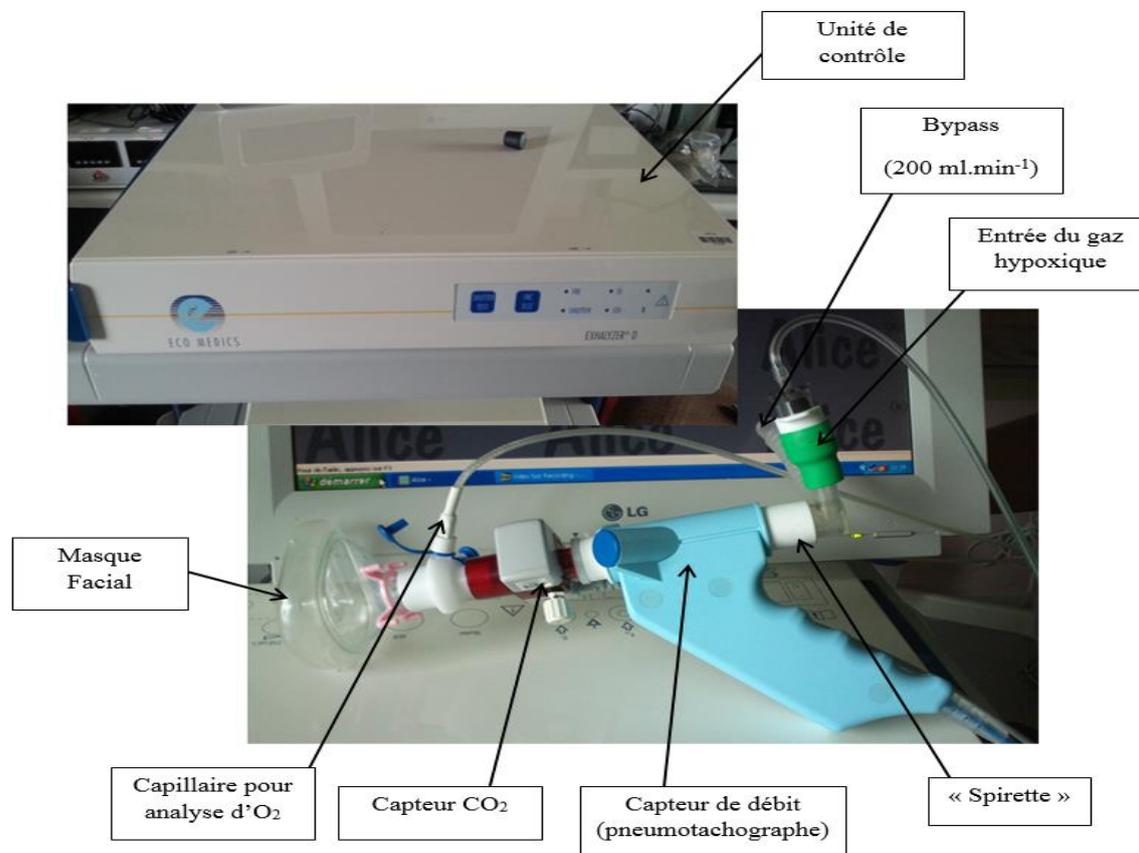


Figure 27. Ensemble du système d'analyse de la fonction ventilatoire (EXHALYZER® D).

Le dispositif pour l'enregistrement de la ventilation et de l'activité des CRP comprenait :

- Un **masque facial** (COMEPA, taille-1, Bagnolet, France) en PVC à usage unique qui correspondait à ceux utilisés en routine clinique à l'hôpital. Il était adapté à la morphologie et aux dimensions du visage d'un prématuré afin de ne pas altérer sa respiration. Lorsqu'il était posé, il recouvrait l'ensemble du nez et de la bouche assurant une étanchéité totale. Un temps d'attente entre la pose du masque et le début du test était observé afin de pallier une éventuelle modification de la ventilation qu'aurait pu engendrer la pose du masque facial ;
- Un **analyseur de gaz** : le CO₂ était mesuré par un capteur infrarouge situé directement en sortie du masque facial, la réponse était donc instantanée. L'O₂ était d'abord prélevé à l'aide d'un capillaire avant d'être analysé par l'unité de contrôle via une méthode d'absorption par diode laser utilisant le spectre de l'infrarouge. Cette

analyse renseignait en continue sur les valeurs des fractions d'O₂ et CO₂ inspirées et expirées (FO₂ et FCO₂) ;

- Un **pneumotachographe** qui faisait suite au masque facial et aux capteurs de gaz. Il permettait de mesurer les volumes et débits ventilatoires par ultrasons. Une « spirette » à usage unique était insérée afin de réduire l'espace mort. L'Exhalyzer à un espace mort qui était de 1,9 mL. De plus, il était sensible à des changements de débit jusqu'à $\pm 0,5$ L/s.

L'EXHALYZER[®] D est le plus souvent utilisé afin de réaliser des opérations de routine clinique dans le cadre d'explorations fonctionnelles respiratoires à l'hôpital (évaluation de la capacité résiduelle fonctionnelle, dilution à l'hélium et à l'azote). Il était nécessaire de l'adapter à la réalisation d'un test hypoxique. Des modifications au niveau du logiciel (ECOMedics, Spiroware 3.1.8) ont été effectuées afin de débloquent certaines « alarmes » prévues lors d'une utilisation clinique de l'appareil.

4.2 Déroulement du test hypoxique

Le test hypoxique consiste à solliciter les CRP en diminuant la concentration en O₂ de l'air inspiré (F_IO₂ < 20%). C'est une technique qui permet d'évaluer la sensibilité des CRP et d'estimer leur capacité à modifier la ventilation en réponse à la stimulation.

Le test avait lieu pendant la sieste du matin entre 8h00 et 12h00, entre deux prises alimentaires (Figure 28). La réponse ventilatoire à l'hypoxie était mesurée dans les deux stades de sommeil (SA et SC) alors que l'enfant se trouvait dans son berceau. Le test était ensuite décliné en 3 phases :

- **Une phase de référence (normoxie)** : l'enfant respirait l'air ambiant à travers le masque. Cette phase représentait un temps d'habituation suite à la pose du masque (≈ 1 min), pendant lequel étaient mesurés les paramètres ventilatoires de base.
- **Une phase de test (hypoxie)** : par le biais de l'électrovanne, le test hypoxique était déclenché, l'EXHALYZER[®] D passait de l'air ambiant au gaz hypoxique à 15% d'O₂ contenu dans une bouteille. Le test était d'une durée maximale de deux minutes,

mais il pouvait être arrêté en cas d'éveil ou d'un épisode de désaturation ($SpO_2 < 85\%$).

- **Une phase de récupération (normoxie)** : pendant cette phase, l'enfant respirait à nouveau de l'air ambiant. Les paramètres ventilatoires retournaient à la normale. A noter que dans la présente étude, le but n'était pas d'observer cette phase. Les données obtenues dans cette phase n'ont pas été analysées et ne seront donc pas évoquées par la suite.



Figure 28. Réalisation du test hypoxique, en condition d'exploration dans le berceau du nouveau-né.

4.3 Méthode d'analyse de la ventilation et de la réponse à l'hypoxie

La méthode d'analyse de la réponse ventilatoire à l'hypoxie a été développée et validée lors de ce travail (Kouakam et al., 2017). Notre laboratoire dispose d'un certain niveau d'expertise dans ce domaine pour avoir réalisé auparavant de nombreuses études sur l'activité de base des CRP en utilisant un test hyperoxique (Bouferrache et al., 2000; Chardon et al., 2004b, 2004a; Stéphan-Blanchard et al., 2013b). Les effets du tabac, de la température ou de la caféine sur la réponse ventilatoire du nouveau-né à l'hyperoxie ont notamment été étudiés. Cependant, concernant l'étude de la sensibilité des CRP et l'utilisation du test hypoxique il s'agissait d'une première dans notre laboratoire, d'où la nécessité de

développer une nouvelle plateforme d'exploration de la chémoréception adaptée au nouveau-né prématuré. Certaines études ont évalué la réponse ventilatoire à l'hypoxie en mesurant la variation de la ventilation entre une phase d'hypoxie et une phase de normoxie (Martin et al., 1998; Rigatto et al., 1975, 1981). Or, chez le prématuré, la réponse à l'hypoxie est bi-phasique avec une phase initiale d'augmentation de la ventilation et une seconde phase de dépression. En moyennant le calcul de la ventilation sur ces deux phases, les méthodes actuelles pourraient donc sous-estimer l'implication réelle des CRP dans la réponse ventilatoire à l'hypoxie. Nous avons donc choisi de nous baser sur la méthode d'analyse de Bouferrache et al. (2000) qui permettait de limiter cette sous-estimation. Toutefois, cette méthode n'était pas spécifiquement adaptée au test hypoxique, nous avons donc développé et validé une nouvelle technique d'analyse pour l'évaluation de la sensibilité des CRP chez le nouveau-né prématuré.

4.3.1 Période normoxique : ventilation de base

Contrairement à l'étude de Bouferrache et al. (2000) dans laquelle la ventilation minute en période normoxique ($\dot{V}_{E\text{ REF}}$) était représentée uniquement par les 4 derniers cycles avant le début du test, nous avons choisi de calculer la $\dot{V}_{E\text{ REF}}$ sur les 16 derniers cycles précédant le début du test hypoxique. Ceci permettait de tenir compte de la forte variabilité de la ventilation observée chez les nouveau-nés prématurés.

Les différents paramètres ventilatoires présentés dans le tableau 1 ont été moyennés sur les 16 derniers cycles de la période normoxique.

	Désignation	Unité
V_T	Volume courant	mL.kg^{-1}
fr	Fréquence respiratoire	cycles.min^{-1}
$\dot{V}_{E\text{ REF}}$	Ventilation minute	$\text{mL.kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$

Tableau 1. Les paramètres ventilatoires analysés pendant la période de référence (normoxie).

4.3.2 Période hypoxique : mesure de l'activité des chémorécepteurs périphériques

La réponse ventilatoire à l'hypoxie était calculée à l'aide de notre nouvelle méthode d'analyse. Les valeurs de ventilation minute (\dot{V}_E) des 16 derniers cycles de la période normoxique ont été divisées en 4 blocs égaux (contenant 4 cycles ventilatoires chacun). \dot{V}_E était moyennée à l'intérieur de chaque bloc et les 4 valeurs de référence obtenues étaient ensuite comparées à la période hypoxique qui était représentée par des fenêtres glissantes de 4 cycles respiratoires avec un pas d'un cycle (Figure 29). Cette approche permettait de détecter la première augmentation significative de \dot{V}_E ($\Delta\dot{V}_E$, %) à l'aide d'un test t apparié, ainsi que le temps de réponse (TR, s). Le TR était donc défini comme le délai séparant le début de la phase hypoxique de la première augmentation significative de \dot{V}_E . Les changements de fr et de V_T étaient également calculés au TR.

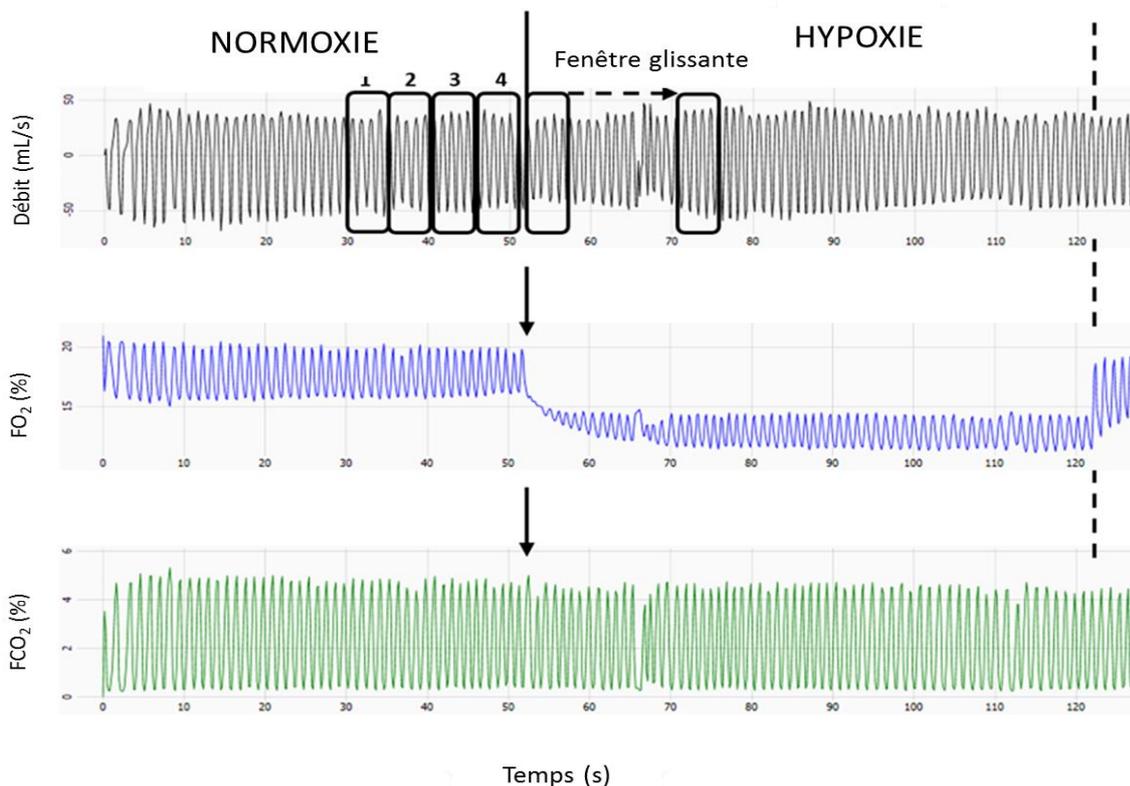


Figure 29. Analyse de la réponse ventilatoire à l'hypoxie.

Les signaux extraits représentent le débit ventilatoire, les fractions en O_2 (FO_2) et CO_2 (FCO_2) ; La flèche verticale à 50 s indique le début du test hypoxique. La période de référence a été divisée en 4 blocs (1 à 4). \dot{V}_E était moyennée dans chaque bloc, puis les valeurs

obtenues ont été comparées à une fenêtre glissante de 4 cycles pendant la période test. Pour cet enfant la SpO₂ la plus basse était de 97%.

4.3.3 Validation de la méthode d'analyse de la réponse ventilatoire hypoxique

4.3.3.1 Méthode de validation

25 nouveau-nés prématurés (âge corrigé : $36,4 \pm 1,0$ semaines) ont été étudiés. Deux tests hypoxiques (TH1 et TH2) ont été réalisés dans chaque stade de sommeil. Des comparaisons appariées sur les paramètres ventilatoires entre TH1 et TH2 ont été effectuées (test de Wilcoxon) à l'aide du logiciel Statview (version 5.0, SAS Institute Inc., Cary, NC). Afin de vérifier la concordance entre les $\Delta\dot{V}_E$ des deux tests, nous avons également utilisé la technique graphique de Bland et Altman (1986).

4.3.3.2 Résultats de la validation

Nous n'avons trouvé aucune différence entre TH1 et TH2, en ce qui concerne la $\dot{V}_{E\text{ REF}}$, la $\Delta\dot{V}_E$ et le TR quel que soit le stade de sommeil (Figure 30).

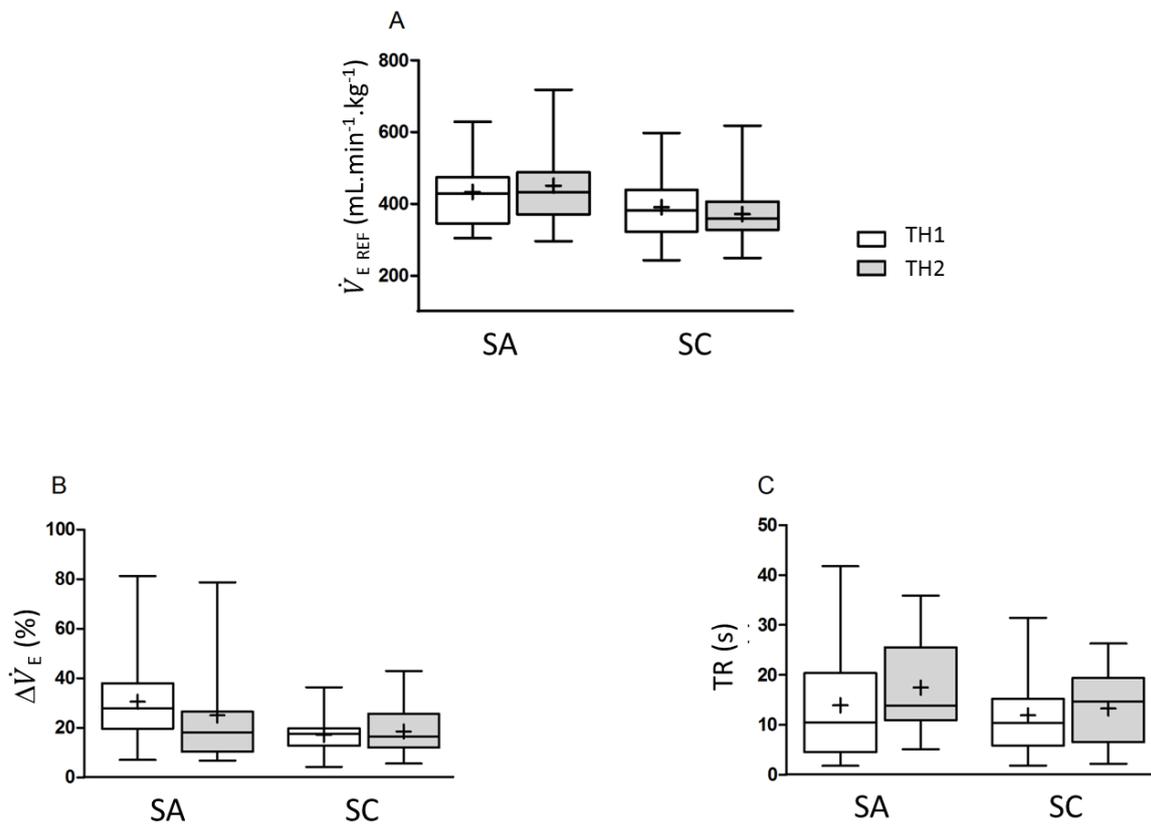


Figure 30. Résultats des tests (TH1 et TH2) pour la ventilation de base ($\dot{V}_{E\text{ REF}}$) (A) ; la réponse ventilatoire à l'hypoxie. ($\Delta\dot{V}_E$) (B) et le temps de réponse (TR) (C).

SA : sommeil agité ; SC : sommeil calme.

La technique de Bland et Altman nous a permis de tracer les différences de $\Delta\dot{V}_E$ entre TH1 et TH2 en fonction des moyennes correspondantes pour chaque enfant. Les résultats ont montré qu'au moins 95% des différences étaient dans l'intervalle « moyenne \pm 2 écarts-type » (Figure 31).

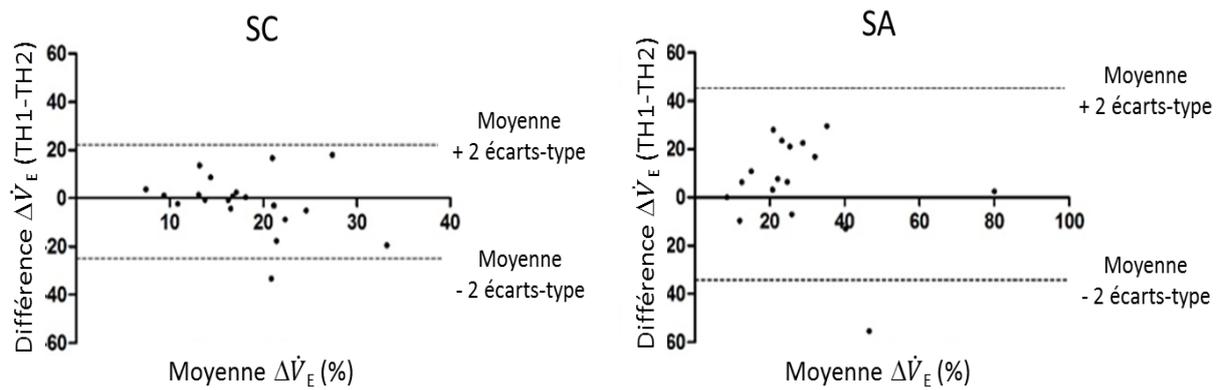


Figure 31. Différences individuelles de la réponse ventilatoire ($\Delta\dot{V}_E$) à l'hypoxie en fonction des valeurs moyennes correspondantes.

SA : sommeil agité ; SC : sommeil calme.

5 Evaluation de l'activité du système nerveux autonome

Dans notre étude, le polysomnographe permettait de recueillir directement le signal RR échantillonné à 2000 Hz. Le signal RR a été extrait de toutes les périodes de SA et de SC présentes lors de la polysomnographie nocturne. L'analyse a été réalisée avec le logiciel Kubios HRV® (version 2.2, Biosignal Analysis and medical group, Kuopio, Finlande). Pour chaque période de SA et SC, les valeurs d'intervalles RR ont été vérifiées afin de s'assurer que les enregistrements ne contenaient pas de battements ectopiques ou d'artefacts et que le signal était stationnaire. Le signal a été subdivisé en fenêtres de 2 min afin de calculer l'ensemble des paramètres temporels et fréquentiels. Les paramètres de la variabilité du rythme cardiaque (VRC) pris en compte dans notre étude étaient ceux recommandés par la Société Européenne de Cardiologie (Task Force, 1996) :

5.1 Paramètres temporels

L'analyse dans le domaine temporel fait appel à une analyse statistique simple des séries temporelles. L'intervalle RR non ectopique est appelé intervalle NN (« normal-to-normal »). Les paramètres calculés étaient les suivants :

- La fréquence cardiaque (FC, bpm) ;
- La déviation standard des intervalles NN sur toute la période d'enregistrement (SDNN, ms). Elle reflète toutes les composantes cycliques responsables de la VRC et est donc un indicateur de la variabilité globale ;
- la racine carrée des différences au carré des intervalles NN successifs (RMSSD, ms). RMSSD reflète l'activité parasympathique et est un indicateur de la variabilité à court terme du signal ;
- le nombre d'intervalles NN successifs supérieurs à 50 ms divisé par le nombre total d'intervalles (pNN50, %). pNN50 reflète également l'activité parasympathique et la variabilité à court terme du signal.

5.2 Paramètres fréquentiels

Il est possible d'analyser le contrôle autonome cardiaque en assimilant l'évolution de la FC à un signal périodique. La méthode d'analyse spectrale par transformée de Fourier rapide permet, à partir du signal temporel, d'obtenir des spectres de fréquence qui sont représentés sous forme de courbes représentant la puissance spectrale en fonction de la fréquence (Kay et al., 1981). Il est ainsi possible de calculer une puissance spectrale dans une bande de fréquences définie.

Dans notre étude, les bornes des bandes de fréquences pour l'analyse spectrale de la VRC étaient paramétrées spécifiquement pour correspondre aux caractéristiques des nouveau-nés prématurés. Les bandes de fréquences choisies étaient les suivantes :

- Les très basses fréquences (VLF) comprises entre 0,003 et 0,04 Hz, qui traduisent des mécanismes de régulation de la FC à long terme, probablement dus à la thermorégulation, à la vasomotricité et au système rénine-angiotensine ;

- Les basses fréquences (LF) comprises entre 0,04 et 0,24 Hz. Ces variations à moyen terme seraient liées au baroréflexe (onde de Mayer) ;
- Les hautes fréquences (HF) comprises entre 0,24 et 1,2 Hz, dont les variations à court terme seraient liées à l'arythmie sinusale respiratoire (onde de Traube-Hering). La limite haute des HF a été établie à une valeur plus importante qu'habituellement dans la littérature afin de prendre en compte les valeurs élevées de fréquence respiratoire chez le nouveau-né prématuré (Doyle et al., 2009; Souza Neto et al., 2003b).

La puissance dans chaque bande de fréquence était exprimée en valeur absolue (ms^2), et relative (%). La balance sympatho-vagale était exprimée par le ratio LF/HF.

6 Bilan des paramètres étudiés

Le tableau 2 récapitule l'ensemble des paramètres hypniques, ventilatoires, cardiovasculaires mesurés ou calculés dans ce travail :

Paramètres hypniques	Polysomnographie nocturne de 12h	<ul style="list-style-type: none"> - Durée globale de sommeil (DGS, min) - Fréquence (h^{-1}) et durée relative (% DGS) de la veille intra sommeil (VIS) - Temps total de sommeil (TTS, min) - Durée moyenne (min) et relative (% TTS) des épisodes de SA, SC, SI - Durée maximale des épisodes de SA et SC (min) - Fréquence de changement de stade de sommeil (h^{-1})
Paramètres cardio-ventilatoires	Polysomnographie nocturne de 12h	<ul style="list-style-type: none"> - Durée moyenne (s), fréquence des désaturations (h^{-1}) - Chute moyenne de la SpO2 (%) lors d'une désaturation - Durée moyenne (s) et fréquence des apnées (apnées.h^{-1}) - Durée maximale des apnées - Durée moyenne (s) et Fréquence (h^{-1}) des épisodes de respiration périodique - Durée maximale des épisodes de respiration périodique
Variabilité du rythme cardiaque	Polysomnographie nocturne de 12h	<u>Paramètres temporels :</u> <ul style="list-style-type: none"> - Fréquence cardiaque (FC, bpm) - Déviation standard des intervalles NN (SDNN, ms) - Racine carrée des différences au carré des intervalles RR successifs (RMSSD, ms) - Nombre d'intervalles NN successifs supérieur à 50 ms (pNN50, %)
		<u>Paramètres fréquentiels :</u> <ul style="list-style-type: none"> - Valeurs absolues (ms^2) et relatives (%) des puissances dans les bandes HF, LF et VLF - Balance sympatho-vagale (LF/HF ratio)
Paramètres ventilatoires	Polysomnographie matinale (Phase normoxique)	<ul style="list-style-type: none"> - Ventilation minute (\dot{V}_E, mL.kg$^{-1}$.min$^{-1}$) - Volume courant (V_T, mL.kg$^{-1}$) - Fréquence respiratoire (fr, cycles.min$^{-1}$)
	Polysomnographie matinale (Phase hypoxique)	<ul style="list-style-type: none"> - Temps de réponse (TR, s) - Variation au TR de \dot{V}_E ($\Delta\dot{V}_E$, % du \dot{V}_E de base)

Tableau 2. Paramètres hypniques, ventilatoires et cardiovasculaires utilisés lors des différents protocoles présentés dans ce travail.

Chapitre 4 (Etude 1) : Evaluation de l'exposition *in utero* aux pesticides chez le nouveau-né prématuré

1 Introduction

1.1 Contexte scientifique et problématique

Le but des études présentées dans ce mémoire, est de déterminer l'impact d'une exposition maternelle aux pesticides pendant la grossesse, sur les fonctions neurophysiologiques et leurs interactions chez le nouveau-né prématuré. Cependant et avant toute chose il faut pouvoir évaluer correctement l'exposition du futur nouveau-né.

Il existe plusieurs méthodes d'évaluation de la dose externe :

(1) Les enquêtes de données de vente ou d'utilisation. En France, plusieurs enquêtes pilotées par des organismes nationaux sont réalisées afin, d'une part, de définir l'exposition environnementale de la population générale aux pesticides, et d'autre part de renseigner sur les données de vente et d'utilisation de produits phytosanitaires à usage agricole et non agricole. Toutefois, ces données n'existent pas pour les expositions domestiques.

(2) Les matrices emploi-exposition. L'utilisation ou l'exposition professionnelle à des pesticides varie fortement d'une profession à l'autre. Des outils appelés matrices emploi-exposition ont été créés pour évaluer cette variabilité. Ces matrices fournissent des données précises qui peuvent être un outil précieux pour l'évaluation de l'exposition professionnelle. Cependant, des difficultés peuvent apparaître lorsque la population est différente de celle initialement ciblée par ces matrices. A ce jour, il existe une matrice emploi-exposition développée à partir des données de l'Office Nationale de Statistiques britannique (Van Tongeren et al., 2002), mais aucune matrice spécifique à la population française n'est encore disponible.

(3) Les mesures environnementales externes. En France, l'Observatoire de Résidus de Pesticides (ORP) ou les Agences de Surveillance de la qualité de l'air (ASQA) rassemblent

les données d'observation de pesticides dans les différents milieux de l'environnement (eau, air, sol). Il s'agit de cartographies nationales qui permettent d'accéder aux données disponibles sur la contamination aux pesticides par région et/ou département puis par milieu.

(4) Les questionnaires d'exposition. La plupart des études épidémiologiques utilisent des questionnaires pour recueillir les informations permettant de prendre en considération les différentes modalités et sources d'exposition de la population. Il peut être utilisé seul ou associé à d'autres méthodes d'évaluation.

Néanmoins, le questionnaire conserve un caractère subjectif voire imprécis. En effet, il est connu que la réponse au questionnaire peut être régie par un défaut de mémoire, une certaine pression sociale, ou par anxiété (Czeizel et al., 2004).

L'ensemble de ces méthodes permettent donc d'estimer ou même de quantifier l'exposition externe d'un individu et peuvent être utilisées pour caractériser l'exposition des femmes enceintes. Les biomarqueurs, permettent eux d'étudier l'imprégnation (ou dose interne) des individus dont vont dépendre les effets observés. Concernant notre problématique d'exposition du fœtus plusieurs matrices peuvent être utilisées.

1.2 Mesure de l'imprégnation foétale (ou dose interne) aux pesticides

1.2.1 Dosage des pesticides dans le sang

Le dosage des pesticides dans le sang possède l'avantage d'être facile à réaliser et bien documenté (Barr et al., 2002). Néanmoins, le prélèvement sanguin reste invasif, ce qui représente un facteur limitant au taux d'acceptation par les parents. Le volume sanguin prélevé doit être faible compte tenu du petit volume de sang chez le nouveau-né (environ 250mL), ce qui nécessite de disposer de techniques analytiques très sensibles. De plus, le sang permet uniquement de détecter une exposition récente car les pesticides sont rapidement métabolisés avant d'être excrétés ou de se fixer dans les tissus.

L'utilisation du sang de cordon représente une alternative car celui-ci peut être collecté de façon non invasive et en grande quantité. Cependant, l'organisation de son recueil est difficile car il n'est disponible qu'au moment de l'accouchement. De plus, beaucoup de pesticides possèdent des propriétés lipophiles et ne se retrouvent donc pas dans le cordon ombilical qui contient peu de lipides (Ostrea et al., 2009).

1.2.2 Dosage des pesticides dans l'urine

L'imprégnation du futur nouveau-né aux pesticides est souvent estimée à partir du dosage de ces substances dans les urines de la femme enceinte (Chevrier et al., 2011). Cependant, de la même manière que les dosages réalisés dans le sang, ceux effectués dans l'urine sont le reflet d'une exposition à court terme (quelques jours avant le dosage). Le prélèvement chez le nouveau-né est difficile surtout chez les filles notamment à cause de fuites présentes lors du recueil dans 20 % des cas (Burguet et al., 2001).

1.2.3 Dosage des pesticides dans les cheveux

Le dosage de substances dans les cheveux est souvent réalisé afin de renseigner sur les expositions chroniques. Toutefois les cheveux du nouveau-né ne commencent à se développer qu'à partir du 6^{ème} ou 7^{ème} mois de grossesse (Koren et al., 2002) et nombre d'entre eux en sont dépourvus à la naissance. Les cheveux ne sont donc pas une matrice pertinente pour refléter l'exposition chronique pendant la grossesse

1.2.4 Dosage des pesticides dans le méconium

Le méconium peut être utilisé pour évaluer l'exposition du fœtus aux xénobiotiques. Il s'agit des premières selles du nouveau-né composées de mucopolysaccharides, d'eau, d'acides biliaires de cellules épithéliales et autres lipides.

Le méconium est facile à prélever, de manière non invasive pendant les premiers jours de vie. De plus, il reflète l'exposition du fœtus aux pesticides sur une large fenêtre de temps puisqu'il se forme dans les intestins dès la douzième semaine de grossesse (Gray et Huestis, 2007). Contrairement à l'urine il n'est pas excrété *in utero*, les différents pesticides vont donc s'y accumuler pendant tout le reste de la grossesse. Ce phénomène d'accumulation entraîne une augmentation des concentrations au cours du temps, ce qui rend cette matrice particulièrement sensible et donc très intéressante pour caractériser l'exposition prénatale du fœtus aux pesticides. Ainsi, quelques études ont utilisé cette matrice pour caractériser l'imprégnation du fœtus à différentes familles de pesticides (Bielawski et al., 2005; Ostrea et al., 2002) ou à une famille en particulier comme les polluants organiques persistants de la famille des organochlorés (Hong et al., 2002; Zhao et al., 2007) ou les dialkylphosphates, métabolites dérivant des organophosphorés (Tsatsakis et al., 2009; Whyatt et Barr, 2001). Les études comparatives réalisées par Ostrea et al., (2008, 2009) ont clairement établi que le méconium représenterait la meilleure matrice pour l'évaluation de l'imprégnation fœtale aux pesticides par rapport au sang de cordon ou aux cheveux du nouveau-né.

1.3 Objectifs de l'étude

Au vu des avantages et inconvénients des méthodes d'évaluation de l'exposition maternelle aux pesticides, nous avons fait le choix d'utiliser un questionnaire à destination des mamans afin d'évaluer au mieux les différentes sources d'exposition possibles (alimentaire, professionnelle, domestique et environnementale).

La plupart des techniques de dosages ne reflètent pas l'exposition du fœtus sur l'ensemble de la grossesse, nous avons fait le choix d'utiliser le méconium pour réaliser des dosages de pesticides. De plus, le recueil du méconium n'est pas invasif et relativement facile, ce qui permet d'avoir un fort taux d'acceptation des parents pour la participation de leur enfant à l'étude.

La méthode de dosage utilisée dans cette étude, provient de celle développée conjointement par notre équipe et l'INERIS, qui permet de doser simultanément des

pesticides issus de plusieurs familles (Berton et al., 2014). Cette technique sera abordée plus en détails dans la partie « Matériels et méthodes » de ce chapitre.

L'objectif de cette 1^{ère} étape (ou étude 1) était donc après transfert et adaptation de la technique de dosage, de quantifier les niveaux d'imprégnation foétale aux pesticides de notre population et de comparer ces derniers avec les données de la littérature et les résultats obtenus par l'INERIS lors de l'étude antérieure.

2 Matériels et méthodes

2.1 Evaluation de l'exposition maternelle aux pesticides

Le questionnaire d'exposition maternelle est un outil précédemment utilisé lors du projet MecExpo (Mayhoub et al., 2014) du laboratoire afin d'évaluer et de préciser les différentes sources et modalités d'expositions aux pesticides des femmes pendant leur grossesse. Ce questionnaire était complété par les mères à la maternité et il permettait de renseigner sur les différentes voies d'entrée des pesticides (ingestion, inhalation et éventuellement contact cutané), leurs origines (professionnelle, domestique, alimentaire, environnementale) et d'avoir des informations sur le mode de vie de la maman (loisirs, tabagisme...). Il s'agissait d'estimer séparément l'exposition professionnelle, alimentaire, domestique et environnementale de ces femmes (Annexe 1).

2.1.1 L'exposition domestique et environnementale

Pour l'exposition domestique, les questions concernaient :

- L'utilisation d'antiparasitaires à usage humain : anti-poux, anti-tiques, anti-gales, anti-acariens et anti-mycotiques ;

- La possession d'animaux domestiques et l'utilisation d'antiparasitaires à usage vétérinaire ;
- La possession de plantes d'intérieur et l'application de produits d'entretien sur celles-ci ;
- La possession d'un jardin privé et l'utilisation de produits phytosanitaires sur celui-ci ;
- L'exposition professionnelle aux pesticides des autres membres du foyer.

Pour l'exposition environnementale, les questions concernaient la domiciliation à proximité :

- d'un espace vert ;
- d'un champ cultivé ;
- d'une autoroute, d'une voie ferrée ou d'un aéroport.

Pour les analyses, l'exposition domestique et environnementale a été prise en compte par la réponse binaire (oui/non) à chacune des questions citées ci-dessus.

2.1.2 Exposition alimentaire

L'exposition alimentaire a été évaluée à l'aide du calcul d'un score afin d'obtenir un critère de jugement quantitatif de l'exposition maternelle pendant la grossesse. Les réponses au questionnaire ont été cotées selon la méthodologie utilisée dans l'étude MecoExpo. Cette étude réalisée au sein du laboratoire Pérیتox chez 993 mères s'est basée sur les données de la littérature. Les cotations ont permis de créer des formules de calcul de scores afin de tenir compte des différentes contributions des aliments. Dans le cas où certaines réponses au questionnaire étaient manquantes, les scores n'ont pas pu être calculés.

Le score alimentaire final (S_{Alim}) tenait compte :

- D'un score alimentaire général ($S_{\text{Alim gl}}$), calculé en fonction de la consommation quotidienne d'aliments par la mère sans tenir compte des aliments issus de l'agriculture biologique (bio) ;
- D'une pondération (facteur F) calculée en fonction de la fréquence de consommation des aliments « bio ».

Le $S_{\text{Alim gl}}$ correspond à la somme des Apports Journaliers en Résidus de Pesticides (AJRP) des catégories d'aliments proposés dans le questionnaire (Question 4) :

- Les fruits et légumes ;
- Les céréales ou des produits à la base de céréales ;
- Le soja ou des produits à la base de soja ;
- Les produits laitiers ;
- La viande ;
- Le poisson et les fruits de mer ;
- Les œufs.

Où :

$$\text{AJRP} = \text{AJRpt} \times \text{fréquence de consommation (estimée par les mères)}$$

AJRpt : Apport Journalier de Résidus de Pesticides théoriques pour chaque catégorie d'aliments consommés par les femmes enceintes

Nous avons conservé les méthodes de calcul de l'étude MecoExpo. Ainsi, pour calculer l'AJRpt de chaque catégorie d'aliments consommés par la population des femmes enceintes, nous nous sommes basés sur l'Apport Nutritionnel Journalier moyen (ANJm, en g.j^{-1}) et la Teneur en Résidus de Pesticides maximale (TRPmax, en mg.kg^{-1}) des aliments proposés par le questionnaire selon l'équation suivante :

$$\text{AJRpt} = \text{ANJm} \times \text{TRPmax}$$

Les ANJm de la femme ont été extraits des bases de données nationales sur la consommation alimentaire de la population française. Il s'agit de l'Etude Individuelle Nationale des Consommations Alimentaires (INCA)⁵ 1 et 2 et de l'Etude Nationale Nutrition Santé (ENNS)⁶.

Les TRPmax de chaque catégorie d'aliments proviennent de la base de données de la Direction Générale de la Santé et de la Consommation (DG SANCO)⁷ qui fournit les TRPmax de chaque aliment dans les pays de l'Union Européenne. Les données disponibles sur les différents pesticides les plus utilisés en Picardie (44 composés) pouvant être retrouvés dans les différents aliments ont été extraites. La médiane des TRPmax pour tous les pesticides confondus a été calculée. Les TRPmax dans les poissons et les fruits de mer n'étant pas disponibles dans cette base de données, une valeur arbitraire correspondant au TRPmax de la viande et de la volaille a été attribuée.

(1) Calcul de L'AJRpt :

L'AJRpt correspond donc au produit de l'ANJm et les TRPmax (Tableau 3).

Aliments	Fruits et Légumes	Céréales	Soja	Produits Laitiers	Viande et Volaille	Poisson et Fruits de mer	Œuf	Total
ANJm (g.j⁻¹)	521	203	5	218	110	43	16	1116
TRPmax (mg.kg⁻¹)	0,1	0,1	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,45
AJRpt (µg.j⁻¹)	52,1	20,3	0,2	10,9	5,5	2,1	0,8	92

Tableau 3. Synthèse de l'AJRpt de la femme dans les aliments.

ANJm : Apport Nutritionnel Journalier moyen ; TRPmax : Teneur en Résidus de pesticides maximale ; AJRpt : Apport Journalier en Résidus de Pesticides théorique.

⁵ <https://www.anses.fr/fr/system/files/PASER-Ra-INCA2.pdf>

⁶ http://opac.invs.sante.fr/doc_num.php?explnum_id=3481

⁷ <http://ec.europa.eu/sanco/pesticides/public/index.cfm>

(2) Pondération de l’AJRpt calculé (Tableau 3) en fonction de la fréquence de consommation :

La fréquence de consommation des différents produits a été cotée par les mères. Ceci a permis de pondérer l’AJRpt ($\mu\text{g.j}^{-1}$) et d’estimer l’AJRP.

Pour rappel :

$$\text{AJRP} = \text{AJRpt} \times \text{fréquence de consommation}$$

La question posée pour toutes les catégories d’aliment était : « A quelle fréquence consommez-vous les aliments suivants ? ». Les réponses possibles étaient les suivantes :

- Jamais ou presque jamais ;
- Pas tous les jours ;
- Tous les jours ;
- Plusieurs fois par jour.

Nous avons considéré que les fréquences de consommation d’aliments recommandées pour les femmes enceintes par l’Institut national de prévention et d’éducation pour la santé (Inpes) étaient des repères de consommation pour ces derniers (Repères Inpes). Les fréquences de consommation proposées par le questionnaire ont été rapprochées de celles de l’Inpes (Tableau 4) pour créer des repères de consommation Mecoxpo (Repères Mecoxpo).

La consommation de soja, n’était pas présente dans les repères Inpes et celle des œufs était citée dans le même repère que la viande sans précision. Des repères spécifiques pour ces deux aliments ont donc été créés. L’étude descriptive de la cohorte Mecoxpo a mis en évidence que 90% des mamans avaient répondu « jamais ou presque jamais » pour la consommation de soja et 80% « pas tous les jours » pour celle des œufs. Par conséquent, ces deux fréquences ont été considérées comme des repères (Repère Mecoxpo) pour ces deux aliments.

Aliments	Fruits et Légumes	Céréales	Soja	Produits Laitiers	Viande et Volaille	Poisson et Fruits de mer	Œuf
Repères Inpes	Au moins 5 fois/j	A chaque repas	ND	3 fois/j	1 ou 2 fois/j	Au moins 2 fois/semaine	ND
Repères MecoExpo	Plusieurs fois/j	Plusieurs fois/j	Jamais ou presque	Plusieurs fois/j	Tous les jours	Pas tous les jours	Pas tous les jours

Tableau 4. Equivalence des Repères Inpes et des Repères MecoExpo.

ND : non déclaré.

Les Repères MecoExpo ont donc été utilisés comme références. Pour chaque catégorie d'aliment, si la réponse de la mère était identique au Repère MecoExpo alors l'AJRP est égale à l'AJRPt ; si la réponse était inférieure ou supérieure au Repère MecoExpo, un facteur multiplicateur à l'AJRPt (de 1/5 à 5) était appliqué pour diminuer ou augmenter l'AJRP en conséquence (Tableau 5).

Repères MecoExpo	Réponse au questionnaire	AJRP
Jamais ou presque jamais	<u>Jamais ou presque jamais</u>	AJRPt
	Pas tous les jours	AJRPt x 2
	Tous les jours	AJRPt x 3
	Plusieurs fois par jour	AJRPt x 5
Pas tous les jours	Jamais ou presque jamais	AJRPt x 1/2
	<u>Pas tous les jours</u>	AJRPt
	Tous les jours	AJRPt x 2
	Plusieurs fois par jour	AJRPt x 3
Tous les jours	Jamais ou presque jamais	AJRPt x 1/3
	Pas tous les jours	AJRPt x 1/2
	<u>Tous les jours</u>	AJRPt
	Plusieurs fois par jour	AJRPt x 2
Plusieurs fois par jour	Jamais ou presque jamais	AJRPt x 1/5
	Pas tous les jours	AJRPt x 1/3
	Tous les jours	AJRPt x 1/2
	<u>Plusieurs fois par jour</u>	AJRPt

Tableau 5. Apports Journaliers en Résidus de Pesticides (AJRP).

(3) Calcul de L'AJRP :

Les valeurs des AJRP pour chaque catégorie d'aliment qui ont donc été calculées en fonction des fréquences de consommation (repère MecosExpo) et de l'AJRpt sont présentées dans le tableau 6

Aliments	Fréquence			
	Jamais ou presque jamais	Pas tous les jours	Tous les jours	Plusieurs fois par jour
Fruits et légumes [FL]	11,3	17,4	26,0	52,1*
Céréales [C]	4,1	6,8	10,1	20,3*
Soja [S]	0,2*	0,4	0,6	1,0
Produits laitiers [PL]	2,2	3,6	5,4	10,9*
Viande [V]	1,8	2,7	5,5*	11,0
Poisson et fruits de mer [PFM]	1,0	2,1*	4,2	6,3
Œuf [O]	0,4	0,8*	1,6	2,4

Tableau 6. Apports Journaliers en Résidus de Pesticides (AJRP, µg/j) de chaque catégorie d'aliments selon la fréquence de consommation des aliments et l'AJRpt.

* : AJRP lorsque les repères Inpes sont observés.

Le $S_{Alim\ gl}$ correspondait donc à la somme des AJRP des aliments ingérés quotidiennement par la mère. Il était donné par l'équation suivante :

$$S_{Alim\ gl} = [FL] + [C] + [S] + [PL] + [V] + [PFM] + [O]$$

Les bornes de ce score étaient de 21 pour le minimum et de 104 pour le maximum.

(4) Pondération liée à la consommation d'aliments issus de l'agriculture biologique :

Une pondération a été réalisée afin de tenir compte de la consommation éventuelle d'aliments issus de l'agriculture biologique. Elle concernait les trois groupes d'aliments principaux (Question 4a) :

- Les fruits et légumes (FL) ;
- Les produits laitiers et les œufs (PLO) ;
- La viande (V).

La consommation des aliments « bio » permet de diminuer l'AJRP de ces aliments. Ainsi, pour les trois groupes d'aliments, l'AJRP a été pondéré par un facteur dépendant de la fréquence de consommation de produits « bio ». Le facteur (F) était de :

- 1 lorsque la mère a répondu qu'elle n'en consommait « jamais » ;
- 0,8 pour la réponse « parfois » ;
- 0,4 pour la réponse « le plus souvent ».

Le S_{Alim} final correspondait donc à l'équation suivante en tenant compte de la pondération :

$$S_{\text{Alim}} = [\text{FL}] \times F_{\text{FL bio}} + [\text{PL}] \times F_{\text{PLO bio}} + [\text{O}] \times F_{\text{PLO bio}} + [\text{V}] \times F_{\text{V bio}} + [\text{C}] + [\text{S}] + [\text{PFM}]$$

Ex : pour une mère ayant consommé des produits laitiers plusieurs fois par jour, le score PL était de 10,9 (Tableau 6). Si elle répondait avoir consommé parfois des aliments « bio », on multipliait ce score par un facteur 0,8 (pondération). Le score PL final était donc $10,9 \times 0,8 = 8,7$.

Les bornes du S_{Alim} final étaient de 11,6 pour la valeur minimale et 104 pour la maximale.

Remarque : L'apport journalier conseillé de l'eau de consommation pour la femme enceinte est 1,5 litre. D'après l'arrêté du 11 janvier 2007 relatif aux limites et références de la qualité

des eaux brutes et des eaux destinées à la consommation humaine, la limite de qualité des eaux de consommation est de 0,5 µg/L par « total pesticide » (soit la somme de tous les pesticides détectés). La contribution de l'eau de consommation humaine à l'exposition aux pesticides est donc très faible (0,75 µg/j ou 0,00075 mg/j) par rapport à l'alimentation (TRPmax total : 0,45 mg/kg) (Tableau 3). C'est la raison pour laquelle la contribution de l'eau à l'exposition alimentaire n'a pas été prise en compte dans le calcul du score.

2.1.3 Exposition professionnelle

L'exposition professionnelle a également fait l'objet d'un calcul de score

Celui-ci (S_{Pro}), correspond au produit des cotations des réponses liées à l'exposition professionnelle maternelle aux pesticides pendant la grossesse. Il tient compte de 5 facteurs :

1) **L'activité professionnelle [Act Pro]** (question 1), cotée 1 si la réponse est « oui » et 0 si la réponse est « non » ;

2) **L'appartenance de la mère à une profession exposée aux pesticides [Sect Pro]** (question 1b), cotée 2 si une ou plusieurs cases étaient cochées pour les réponses : agriculture, jardinerie, entretien des routes, vente de fruits et légumes, animalier, autres secteurs utilisant ou exposés aux produits phytosanitaires. Le secteur professionnel était coté 1 si aucune case n'était cochée. La réponse « autre » était cotée 1 ou 2 en fonction de la précision notée par la mère et appréciée par nos soins ;

3) **L'exposition professionnelle maternelle aux pesticides [Expo Pro Pest]** (question 2), cotée 2 si la mère déclarait avoir utilisé des pesticides lors de son activité professionnelle et 1 si non. Cette question permettait à la mère de se déclarer exposée aux pesticides sans pour autant exercer une activité dans les secteurs proposés à la question 1 ;

4) **La fréquence de l'exposition maternelle aux pesticides [Fr Expo Pro Pest]** exprimée en jours travaillés par mois (question 2a). La réponse « une fois par mois » était cotée 2 ; la réponse « 1 fois par mois ou plus » correspondant à une durée qui varie entre 2

et 19 jours travaillés par mois était cotée 10 ; la réponse « tous les jours » correspondant à 20 jours travaillés par mois était cotée 20 ;

5) **Le lieu de l'exposition professionnelle maternelle aux pesticides [Lieu Expo Pro Pest]** (question 2d). L'intensité de l'exposition aux pesticides étant plus élevée à l'intérieur qu'à l'extérieur, le lieu de l'exposition professionnelle maternelle aux pesticides a été cotée 2 pour une exposition « à l'intérieur » contre 1 pour une exposition « à l'extérieur ».

Remarque : Ce score étant le produit du codage de l'activité professionnelle (coté 1 si mère active et 0 si non active) et de facteurs modifiant l'exposition durant cette activité, il était nécessaire de choisir un codage 1 (et non pas 0) lorsque ces facteurs étaient absents pour ne pas annuler l'effet du codage de l'activité professionnelle.

Au final, le S_{Pro} est obtenu par l'équation suivante :

$$S_{Pro} = [Act Pro] \times [Sect Pro] \times [Expo Pro Pest] \times [Fr Expo Pro Pest] \times [Lieu Expo Pro Pest]$$

Les bornes de ce score étaient de 0 pour la valeur minimale et de 160 pour la maximale.

2.2 Evaluation de l'imprégnation aux pesticides

2.2.1 Choix des pesticides recherchés

La méthode de dosage de pesticides dans le méconium utilisée pour notre étude a fait l'objet d'un travail antérieur de développement afin de détecter de façon simultanée l'ensemble des composés d'intérêts (Berton et al., 2014). Les pesticides qui ont fait l'objet des dosages ont été pré-sélectionnés sur la base des critères suivants :

- L'importance de leur utilisation en Picardie : selon les estimations du Service régional de la Protection des Végétaux en 2006, les pesticides les plus utilisés en agriculture étaient le mancozèbe, l'isoproturon, le chlorure de chlorméquat et le MCPA (acide 2-méthyl-4-chlorophenxyacétique). L'utilisation de ces 4 pesticides représentait près de

50% des tonnages de pesticides vendus dans la région. A ces 4 pesticides ont également été ajoutés des pesticides des familles les plus utilisées dans les domiciles, les pyréthrinoïdes et les organophosphorés. Les organophosphorés sont aussi utilisés en agriculture et parmi ses composés les plus utilisés on retrouve le chlorpyrifos, le malathion, le propoxur et le diazinon ;

- Les pesticides à rechercher en priorité dans l'air : l'outil Sph'Air a été développé au sein de l'INERIS afin d'identifier et de hiérarchiser les produits phytosanitaires à surveiller en priorité dans l'air. Les pesticides étaient caractérisés par 4 critères : (1) les quantités utilisées sur le territoire ; (2) les sources atmosphériques, qui reflètent le potentiel d'une substance à se retrouver dans l'atmosphère après son utilisation ; (3) la persistance atmosphérique, définie par la propriété d'une substance à rester dans le compartiment atmosphérique ; (4) la toxicité des composés, indiquée par la Dose Journalière Admissible. Ces critères ont permis d'établir deux classements pour les données de l'air en Picardie en 2006, le premier sans le critère de toxicité afin de mettre en évidence les pesticides ayant la plus grande probabilité de se retrouver dans l'atmosphère et le deuxième tenant compte des critères de toxicité (Tableau 7).

	Classement Sph'Air sans critère de toxicité	Classement Sph'Air avec critère de toxicité
1	MCPA	MCPA
2	Chlorothalonil	Chlorothalonil
3	Isoproturon	Fluazinam
4	Mancozèbe	Isoproturon
5	Fluazinam	Prosulfacarbe
6	Clopyralid	Diclofop-methyl*
7	Chlorure de chlormequat	Expoxiconazole
8	Clomazone	Chlorure de chlormequat
9	Boscalide	Boscalide
10	Metamitron	Mancozèbe

Tableau 7. Classement des pesticides généré par l'outil Sph'Air appliqué aux données picardes en 2006.

* : substance interdite.

- Leur toxicité sur le développement fœtal : il s'agit des pesticides ayant des associations observées dans la littérature avec certains paramètres cliniques à la naissance (âge gestationnel, poids, taille, périmètre crânien) qu'il nous a paru pertinent de prendre en compte dans notre étude. Ainsi, le chlorpyrifos, le mancozèbe, l'isoproturon et le MCPA entraînent une fœtotoxicité et une diminution du poids de naissance lors d'une exposition animale anténatale. De plus, comme évoqué précédemment (*cf* chapitre 2), certaines familles de pesticides possèdent des propriétés neurotoxiques pouvant impacter le système nerveux central et périphérique ;
- L'intégration de ces substances dans d'autres études utilisant différentes matrices biologiques (méconium, cheveux etc..) à des fins de comparaison (Ostrea et al., 2008, 2009).

A partir des différents critères et des modalités de sélections précédemment décrites, 15 substances (substances mères et métabolites) à doser dans le méconium des nouveau-nés ont été retenues. Les molécules, leur famille chimique, leur nature et les principales caractéristiques de ces produits sont présentés dans le tableau 8.

Notre méthode de dosage est une technique unique pour plusieurs composés de différentes familles. Toutefois, parmi les composés retenus, le mancozèbe n'a pas pu être analysé en tant que substance mère, le solvant nécessaire à son extraction étant différent de celui utilisé pour les autres substances. Néanmoins, l'éthylène thiourée (ETU), principal métabolite du groupe des éthylènes bis-dithio-carbamates dont fait partie le mancozèbe a pu lui être dosé.

Famille chimique	Substance	Nature	Usage principal	Domaine d'utilisation
Carbamates	Propoxur	Substance mère	Fongicides/ Insecticides	Agricole
	ETU	Métabolite du mancozèbe		Domestique Médicale Vétérinaire
Organophosphorés	Chlorpyrifos	Substance mère	Insecticides	Agricole Domestique
	Diazinon			Agricole
	Malathion			Agricole
	DEP-DETP-DMP-DMDTP	Métabolites communs des OP		Agricole Domestique
Pyréthriinoïdes	Cyperméthrine	Substance mère	Insecticides	Agricole Domestique Vétérinaire
	Deltaméthrine			
	Perméthrine			
	DCCA	Métabolite commun des pyréthriinoïdes		
Phénylurés	Isoproturon	Substance mère	Herbicides	Agricole
	Desméthylisoproturon	Métabolite de l'isoproturon		

Tableau 8. Pesticides recherchés dans notre étude et leurs principales caractéristiques.

ETU : éthylène thiourée ; OP : Organophosphorés ; DEP : diéthyl phosphate ; DETP : diéthyl thiphosphate ; DMP : diméthyl phosphate ; DMDTP : diméthyl dithiophosphate ; DCCA : 3-(2,2-Dichlorovinyl)-2,2-diméthyl-1-cyclopropane acide carboxylique.

2.2.2 Dosages des pesticides dans le méconium

Les dosages de pesticides dans le méconium ont été réalisés selon la méthode d'analyse développée par l'INERIS. En effet, le développement d'une méthode de dosage simultané dans le méconium de pesticides issus de plusieurs familles y avait fait l'objet d'un travail de thèse et d'un article (Berton et al., 2014). Cependant, pour notre projet, le choix a été fait d'utiliser les ressources matérielles disponibles à la plateforme d'Ingénierie Cellulaire et Analyse des Protéines (ICAP) de l'Université Picardie Jules Verne d'Amiens afin de réaliser les dosages de pesticides dans nos échantillons de méconium. Un transfert de technologie a donc été nécessaire avant de pouvoir réaliser les dosages. Ce transfert a nécessité certains ajustements de la méthode auxquels j'ai participé.

➤ *Prélèvement et conservation*

Les échantillons de méconium ont été collectés par le personnel soignant directement dans la couche de l'enfant dès la naissance et jusqu'à l'apparition des premières selles. Le méconium était déposé dans un pot de coproculture à l'aide d'une spatule en plastique (Figure 32). Un réfrigérateur (4°C) était disposé au sein même du service afin d'y déposer les pots immédiatement après le prélèvement. Le transport vers ICAP était ensuite réalisé et les échantillons conservés au congélateur à -80°C avant analyse.



Figure 32. Prélèvement du méconium dans un pot de coproculture.

➤ *Traitement des échantillons*

Le méconium est une matrice qui présente l'avantage d'être prélevée de manière non invasive. Cependant, le méconium est une matrice complexe visqueuse, elle-même constituée d'un grand nombre de composés susceptibles d'interférer dans la détection des molécules d'intérêt. L'analyse a donc nécessité des étapes de traitement et de purification afin de limiter l'effet matrice et conserver une sensibilité satisfaisante.

La première étape consistait d'abord à sécher l'échantillon de méconium des nouveau-nés dans une étuve à 55°C pendant 72h afin d'éliminer l'eau contenue dans le méconium, puis broyé à l'aide d'un broyeur à billes pendant 6 minutes à 450 tours/min. Il résulte de ces

étapes l'obtention d'une poudre fine et homogène. Ce qui augmente la surface de contact et facilite l'extraction des composés d'intérêt lors des prochaines étapes.

La deuxième étape correspondait à l'extraction. Une prise d'essai de 500 mg de poudre de méconium subissait une extraction solide-liquide grâce à l'ajout d'un mélange de solvant méthanol/acétonitrile (50/50) agité pendant 45 min. Après centrifugation pendant 40min à 4500 tours/minute le surnageant était purifié par extraction sur phase solide (SPE) à l'aide d'un automate (GX-241, Gilson) et l'utilisation d'une cartouche type « mixed mode » (Phenomenex Strata® X-AW 33µm, phase inverse + échange d'anion). Cette étape permettait de conserver les composés polaires et apolaires et par conséquent les deux classes de composés d'intérêt (substance mère et métabolites) dans la cartouche alors que les éléments interférents étaient éliminés lors du dépôt de l'échantillon dans la cartouche ou lors du rinçage de cette dernière. Les composés étaient finalement remis en solution dans du solvant et constituaient l'extrait final.

Les échantillons ainsi purifiés étaient ensuite analysés par chromatographie en phase liquide couplée à un spectromètre de masse triple quadripôle (U-HPLC MS/MS, Ultra-High Performance Liquid Chromatography tandem mass spectrometry ; Acquity UPLC® H-class, Waters). Une action séparative par chromatographie est indispensable afin de pouvoir séparer les pesticides d'intérêt de leur matrice et ainsi réduire les interférences induites lors de la détection des composés par spectrométrie de masse.

Il est important de noter qu'avant la réalisation de l'extraction, des étalons internes au comportement proche des composés analysés ont été ajoutés. Ces étalons internes ou composés radiomarqués étaient présents en concentration connue dans tous les échantillons et nécessaires à la quantification après analyses.

Les différentes phases du protocole sont présentées dans la figure 33.

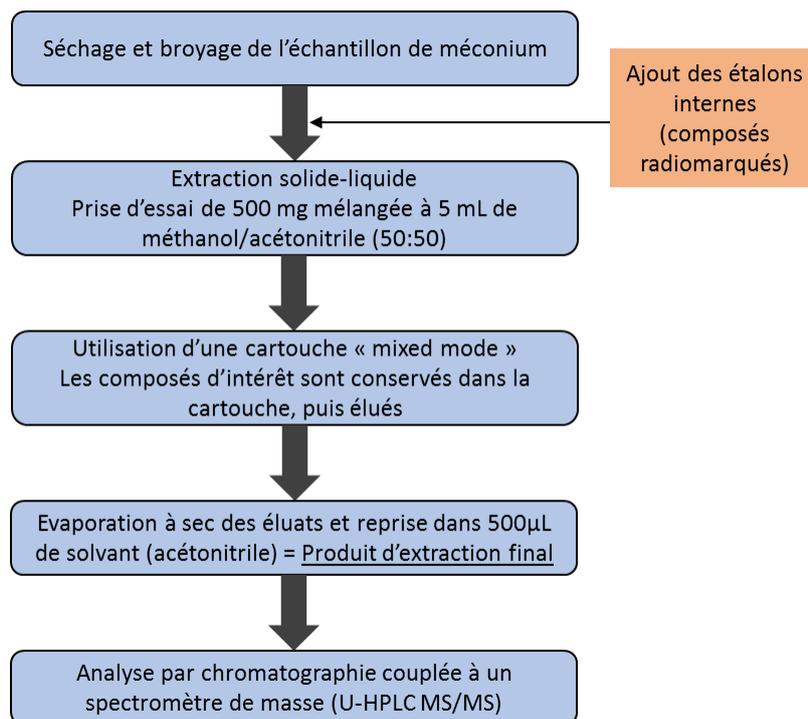


Figure 33. Protocole d'analyse des pesticides et de leurs métabolites dans le méconium.

➤ *Gammes d'étalonnage et dosages*

Chaque gamme d'étalonnage était composée de 9 niveaux de concentration compris entre $0,2-28 \text{ ng.g}^{-1}$; $0,2-280 \text{ ng.g}^{-1}$; $2-280 \text{ ng.g}^{-1}$ ou $20-2800 \text{ ng.g}^{-1}$ en fonction des composés ; afin d'obtenir la courbe de calibration nécessaire à la quantification (Figure 34A).

Pour réaliser cette gamme, des analyses préliminaires ont été réalisées afin de sélectionner les méconiums dits « blancs », c'est-à-dire peu ou pas contaminés par les composés d'intérêts. Ces méconiums ont été traités selon le même protocole d'extraction (décrit précédemment) que les échantillons de chacun des nouveau-nés et dosés par U-HPLC-MS/MS, puis analysés dans le logiciel MassLynx (version 4.1).

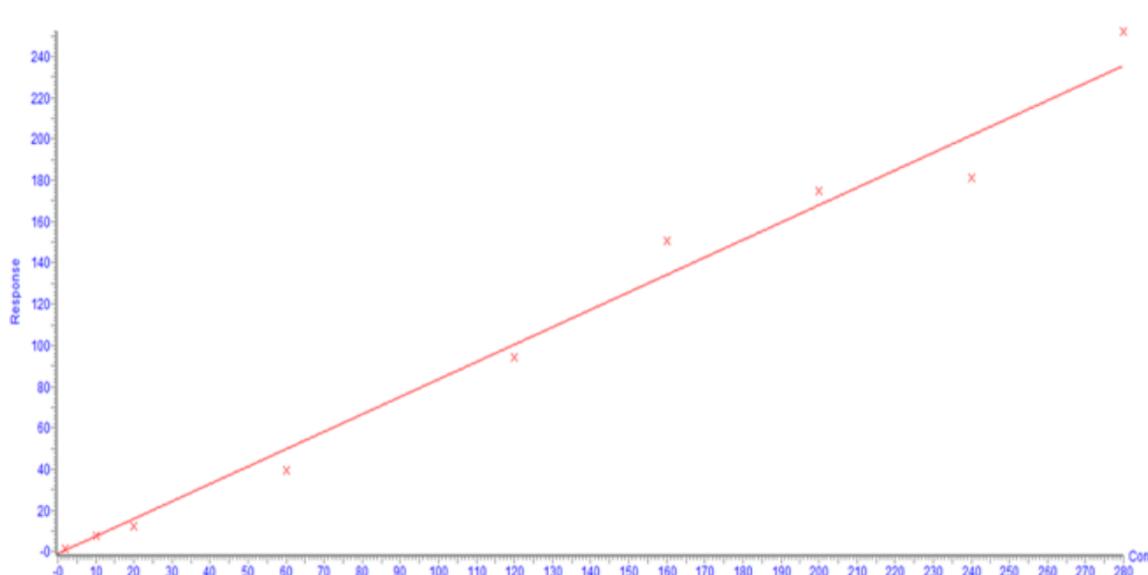
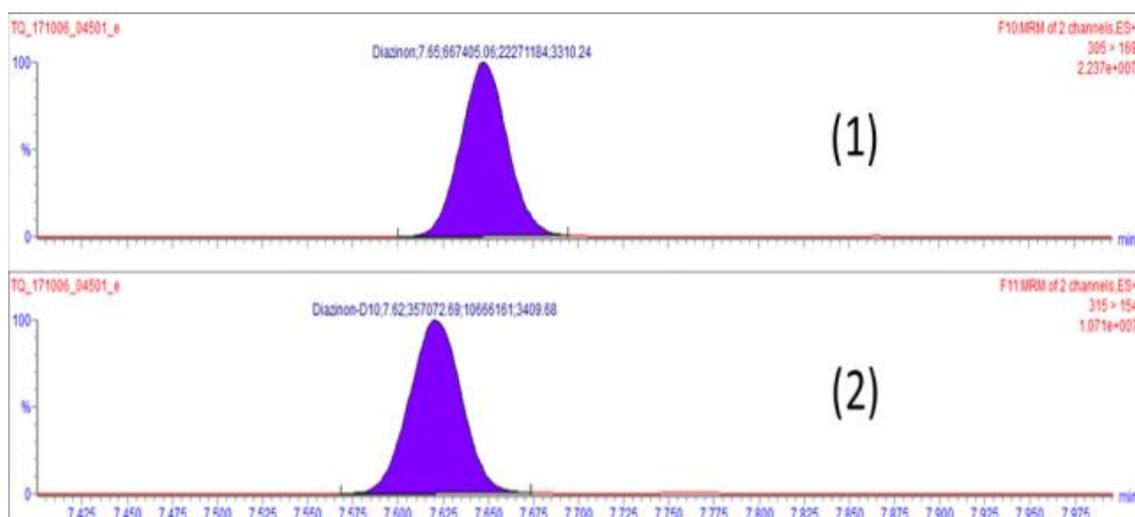
A**B**

Figure 34. (A) Exemple du chlorpyrifos. Courbe de calibration issue de la gamme d'étalonnage (logiciel MassLynx). (B) Chromatogramme issu du logiciel MassLynx, exemple du diazinon.

(A) La réponse du composé ciblé est en ordonnée et la concentration en ng.g⁻¹ est en abscisse. Coefficient de détermination, $R^2 = 0,99$. (B) Les aires sous la courbe (en bleu) sont représentées pour le composé ciblé (1) et le composé radiomarcué (2).

Cette courbe décrit une régression linéaire de type $y=ax+b$ où y correspond au rapport du signal de la réponse du composé ciblé par rapport à celui de son étalon interne (Aire des pics) (Figure 34B).

Le dosage des pesticides dans les échantillons des nouveau-nés était donc réalisé en deux étapes :

- Le calcul de la réponse de chaque composé présent dans nos échantillons et obtenue par la formule suivante :

$$\text{Réponse} = \text{Aire du composé cible} \times \left(\frac{\text{Concentration du composé radiomarqué}}{\text{Aire du composé radiomarqué}} \right)$$

- La quantification exprimée en ng.mL^{-1} (puis rapportée à la prise d'essai de méconium afin d'obtenir une concentration exprimée en ng.g^{-1}), obtenue en comparant la réponse de chaque extrait à la réponse des différents points de la courbe de calibration.

3 Résultats de l'étude

3.1 Description de la population

95,5% des mères ayant participé à l'étude ont répondu au questionnaire.

Le dosage a pu être réalisé dans 24 échantillons sur 32 (soit 75 % de l'effectif inclus). En effet, sur la cohorte de 32 nouveau-nés, 8 méconiums n'ont pu être utilisés : pour l'un d'entre eux, le séchage n'a pas été possible même après plus de 3 jours à 55°C et pour les 7 autres la quantité de méconium n'était pas suffisante pour constituer la prise d'essai de 500 mg nécessaire à l'analyse.

La figure 35 représente la répartition de la population étudiée en fonction de l'évaluation de l'exposition par questionnaire et par dosages dans le méconium.

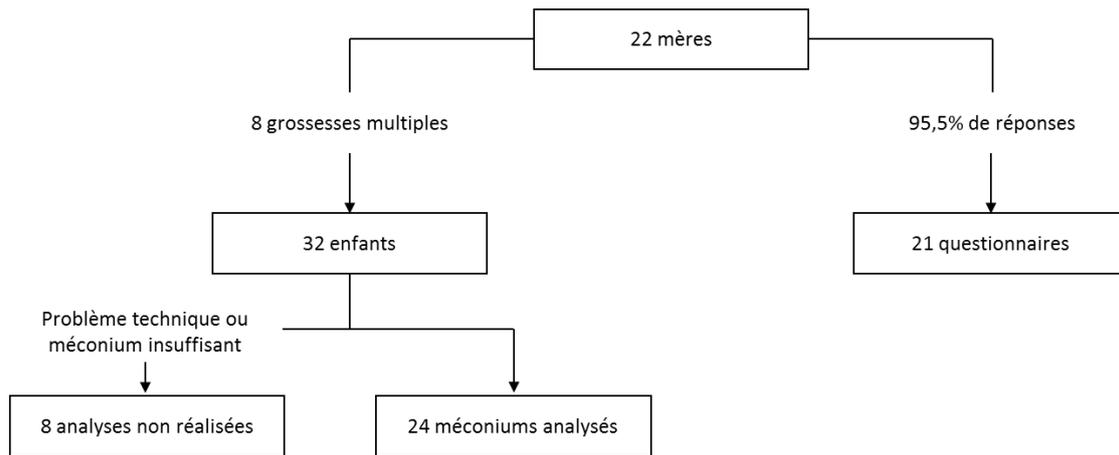


Figure 35. Description de la répartition des sujets.

3.2 Résultats de l'exposition maternelle aux pesticides (Questionnaire)

La description des 21 mères ayant répondu au questionnaire sont présentées dans le tableau 9.

Population totale (n=21)		
Age (an)		28,0 ± 4
Tabagisme (n)	Oui	3
	Non	18
Fausses couches (n)	Oui	2
	Non	18
Niveau d'étude*	Lycée	6
	Etude sup.	13

Tableau 9. Description de la population.

*L'âge est exprimé sous la forme de moyenne ± écart-type. * : 2 valeurs manquantes.*

3.2.1 Exposition domestique et environnementale

L'ensemble des résultats de l'exposition domestique et environnementale des mamans est présenté dans le tableau 10.

Parmi les mères de notre cohorte, seules 9,5% ont déclaré avoir été exposées aux antiparasitaires humains (anti-poux, anti-gales, anti-tiques et antifongiques) et aucune aux

antiparasitaires vétérinaires pendant leur grossesse. En effet, bien que 66,7% des familles incluses possédaient un animal domestique, aucune de ces familles n'a déclaré traiter leurs animaux. 52,4% des mères ont déclaré avoir des plantes d'intérieur sans traiter ces dernières, et 9,5% ont déclaré utiliser des produits anti-mites ou anti-acariens à l'intérieur de leur domicile. Pendant la grossesse, seules 4,8% des mères ont déclaré avoir subi une désinsectisation de leur logement. Enfin, 52,4% des familles possédaient un jardin privé, mais seule une maman a indiqué entretenir ce jardin avec des produits phytosanitaires.

En ce qui concerne l'exposition environnementale, 47,6% des foyers de la cohorte se situaient à moins d'1 km d'un champ de culture, 61,9% à proximité d'un espace vert et 33,3% à proximité d'un grand axe de transport (autoroute, voie ferrée ou aéroport).

N=21	Oui n (%)	Non n (%)	Données manquantes n (%)
Exposition domestique			
Antiparasitaires humains	2 (9,5)	18 (85,7)	1 (4,8)
Animaux domestiques	14 (66,7)	6 (28,6)	1 (4,8)
Antiparasitaires vétérinaires	0 (0)	14 (100)	0 (0)
Plantes intérieur	11 (52,4)	10 (47,6)	0 (0)
Entretien plantes	0 (0)	11 (100)	0 (0)
Anti-mites/Anti-acariens	2 (9,5)	19 (90,5)	0 (0)
Jardin privé	11 (52,4)	10 (47,6)	0 (0)
Entretien jardin privé	1 (9,1)	10 (90,9)	0 (0)
Exposition environnementale			
Champ à <1km	10 (47,6)	10 (47,6)	1 (4,8)
Espace vert à < 1km	13 (61,9)	8 (38,1)	0 (0)
Axe de transport à < 1km	7 (33,3)	12 (57,1)	2 (9,5)

Tableau 10. Sources d'exposition domestique et environnementale pendant la grossesse.

3.2.2 Exposition alimentaire

Les réponses aux questionnaires ont permis de constater qu'aucune des femmes ne se déclarait végétarienne. Peu de femmes ont déclaré manger des produits issus de l'agriculture biologique. En effet, seules 4,8 à 19,1% des mères ont déclaré en manger « le plus souvent » en fonction des différentes catégories d'aliments et 47,6% ont indiqué ne jamais en consommer (Tableau 11).

Aliments	Fréquence de consommation (%)		
	Jamais	Parfois	Le plus souvent
Fruits et légumes « bio »	47,6	33,3	19,1
Produits laitiers « bio »	66,7	23,8	9,5
Œufs « bio »	57,1	23,8	19,1
Viande « bio »	85,7	9,5	4,8

Tableau 11. Consommation maternelle des principales catégories alimentaires issues de l'agriculture biologique, pendant la grossesse.

L'alimentation était donc principalement non biologique avec 25% des mères qui consommaient des fruits et légumes, 50% consommaient des produits laitiers et 40% des céréales « plusieurs fois par jour ». 60% des mères ont déclaré consommer de la viande « tous les jours »

Le score d'exposition alimentaire (exprimé par la médiane (Min-Max)) n'a pu être calculé que lorsque l'ensemble des réponses au questionnaire était renseigné (soit pour 20 mères sur 21). Pour la population des mères ayant participé à l'étude, il était de 50,4 (26,7 – 80,4) (Figure 36). Pour rappel, les bornes du S_{Alim} était de 21 pour la valeur minimale et 104 pour la maximale.

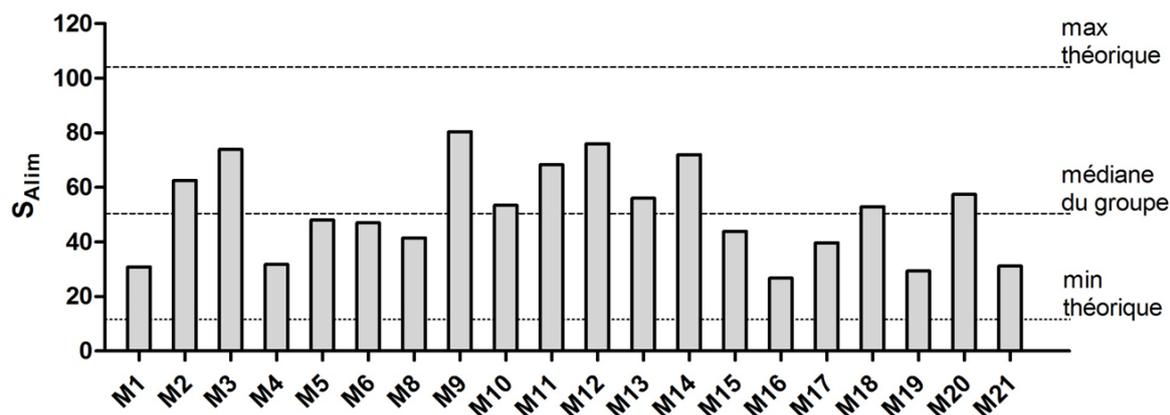


Figure 36. Résultats du calcul du S_{Alim} pour l'ensemble des mères.

La mère n°7 n'est pas représentée car le questionnaire n'a pas été renseigné ; M : mère.

3.2.3 Exposition professionnelle

65 % des mères ont déclaré exercer une activité professionnelle pendant leur grossesse. Sur la population totale, 15% des mères et des pères ont travaillé dans un secteur potentiellement exposé aux pesticides. Ainsi, 22,6% des nouveau-nés possédaient au moins un parent exposé professionnellement aux pesticides (les deux parents sont exposés dans 9,7% des cas).

Le score d'exposition professionnelle n'a pas pu être calculé pour 2 mamans à cause de valeurs manquantes. Les résultats pour l'ensemble des autres mères sont présentés dans la figure 37. Le score médian était de 1 (0 – 80). Pour rappel, les bornes du S_{Pro} étaient de 0 pour la valeur minimale et de 160 pour la maximale.

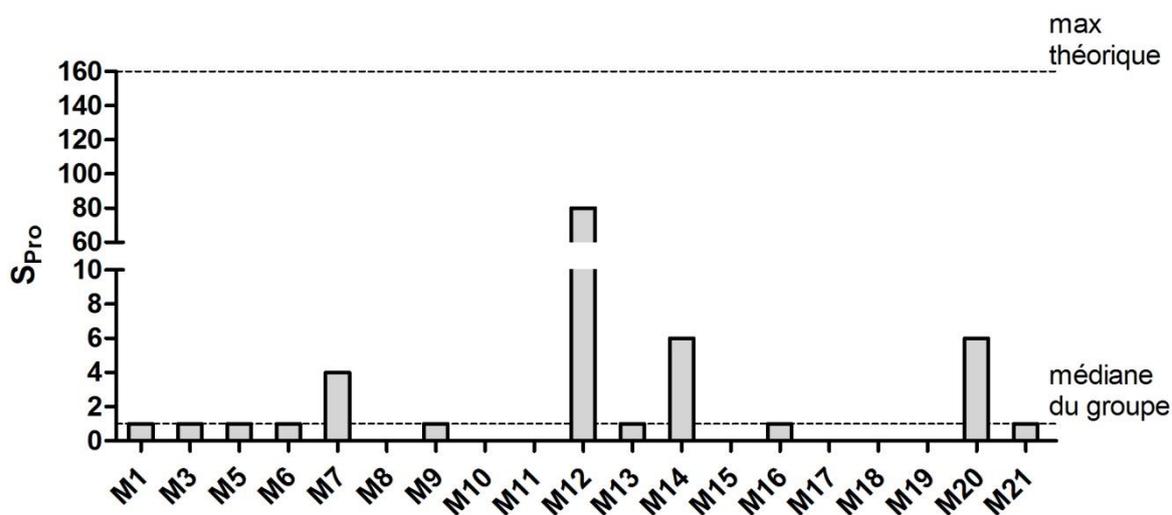


Figure 37. Résultats du calcul du S_{Pro} pour l'ensemble des mères.

Les mères n°2 et 4 ne sont pas représentées car le questionnaire comportait des données manquantes ; M : mère.

3.3 Résultats de l'imprégnation fœtale aux pesticides

Les caractéristiques des 24 nouveau-nés pour lesquels les dosages ont été réalisés sont présentées dans le tableau 12.

	Population totale (n=24)
Age gestationnel (Sem.a.)	31,4 ± 1,4
Poids de naissance (g)	1583,0 ± 306,0
Taille à la naissance (cm)	40,9 ± 2,8
Périmètre crânien à la naissance (cm)	28,5 ± 2,1
Garçons/Filles (n)	15/9
Age de la mère (ans)	28 ± 4

Tableau 12. Description de la population.

Les valeurs sont exprimées sous la forme de moyenne ± écart-type.

La figure 38 représente la répartition des pesticides détectés. Tous les échantillons présentaient au moins un pesticide. Mais la majorité des méconiums (58,3%) contenait 3 ou 4 substances. Enfin, seulement 2 méconiums de nouveau-nés présentaient plus de 6 pesticides.

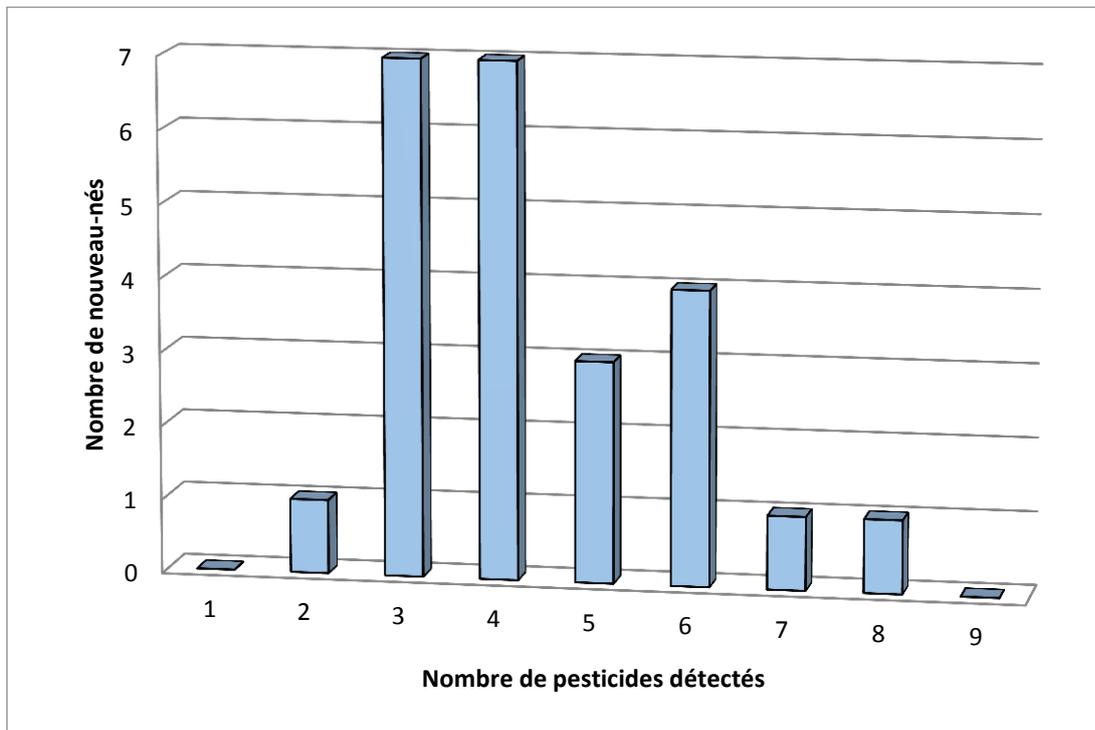


Figure 38. Nombre de nouveau-nés en fonction du nombre de pesticides détectés dans les échantillons de méconium.

Les résultats regroupant les pourcentages de détection, ainsi que la médiane et l'étendue (Min – Max) des concentrations de chaque composé sont présentés dans le tableau 13. Parmi les 15 composés recherchés, 8 ont été détectés. En effet, le chlorpyrifos, le malathion, le propoxur, l'ETU, la deltaméthrine, la perméthrine et le DCCA n'ont été détectés dans aucun des échantillons.

Les composés les plus fréquemment retrouvés sont des métabolites des organophosphorés, les principaux étant le DEP et le DETP, qui ont été détectés dans respectivement 66,7% et 100% des échantillons. Le DMP et le DMDTP (autres métabolites des organophosphorés) et l'isoproturon ont également été fréquemment détectés dans respectivement 37,5%, 25% et

50% des méconiums. La cyperméthrine est le seul pesticide parent de la famille des pyréthriinoïdes retrouvé dans 41% des échantillons.

La majorité des concentrations des 8 composés détectés étant inférieure à la limite de quantification (LQ), seul le diazinon, DEP et le DETP ont pu être quantifiés (respectivement 0,3 (0,2 – 1,7) ng.g⁻¹, 48,0 (3,2 – 110,8) ng.g⁻¹ et 93,2 (2,9 – 163,6) ng.g⁻¹).

Substances	LD (ng.g ⁻¹)	LQ (ng.g ⁻¹)	n (%) > LD	Concentration médiane (Min – Max) (ng.g ⁻¹)
ORGANOPHOSPHORES				
Chlorpyrifos	0,5	2	ND	
Diazinon	0,01	0,05	4 (16)	0,3 (0,2 – 1,7)
Malathion	0,05	0,3	ND	
DEP	0,05	0,7	16 (66,7)	48,0 (3,2 – 110,8)
DETP	0,5	2	24 (100)	93,2 (2,9 – 163,6)
DMP	0,5	2	9 (37,5)	<LQ
DMDTP	16,7	50	6 (25)	<LQ
CARBAMATES				
Propoxur	0,1	0,5	ND	
ETU	1	4	ND	
PHENYLUREES				
Isoproturon	0,05	0,1	12 (50)	<LQ
Desméthylisoproturon	0,05	0,2	2 (8,3)	<LQ
PYRETHRINOIDES				
Cyperméthrine	40	100	10 (41,7)	<LQ
Deltaméthrine	10	20	ND	
Perméthrine	20	80	ND	
DCCA	10,0	5,0	ND	

Tableau 13. Résultats des dosages de pesticides des échantillons de méconium : détection et concentrations des pesticides et métabolites.

LD : limite de détection ; LQ : limite de quantification ; Min/Max : minimum et maximum ; ND : non détecté.

4 Discussion

4.1 Imprégnation foétale aux pesticides

Comme évoqué précédemment, le dosage simultané de plusieurs familles de pesticides a pu être réalisé dans 24 échantillons de méconium. Le diazinon, le DEP et le DETP ont pu être quantifiés. Les autres composés ont été considérés comme présents (>LD) ou absents (<LD) dans l'échantillon analysé sans pouvoir les quantifier.

Les taux de détection de pesticides rapportés dans les rares études ayant réalisé le dosage dans le méconium sont très variables (Berton et al., 2014; Bielawski et al., 2005; Meyer-Monath et al., 2014; Ostrea et al., 2008, 2009; Whyatt et Barr, 2001). Dans notre étude, le DEP et le DETP, métabolites des organophosphorés, sont les pesticides les plus souvent détectés (dans respectivement 66,7 et 100% des échantillons), suivis par l'isoproturon (50%), la cyperméthrine (41,7%) et le DMP (37,5%). Dans l'étude réalisée par Berton et al. (2014), dans laquelle 171 méconiums issus de la même région que nous ont été analysés, les métabolites des organophosphorés étaient également les composés avec le taux de détection le plus important. Ces taux étaient néanmoins différents des nôtres. En effet, il était de 49% pour le diméthyl thiophosphate (non dosé dans notre étude) et de 31% pour le DEP (Le DETP n'était pas détecté). Par ailleurs, les concentrations de DEP dans l'étude de Berton et al. (2014) (comprises entre 2,1 – 78,8 ng.g⁻¹) sont comparables aux nôtres (3,2 – 110,8 ng.g⁻¹). Nos résultats de concentration étaient également similaires avec ceux de l'étude de Meyer-Monath et al., (2014), dans laquelle les techniques de dosage des pesticides étaient adaptées à chaque famille de pesticides. Whyatt et Barr (2001) rapportaient eux aussi un taux de DETP dans 100% de leurs échantillons mais avec des mesures entre 2,0 et 5,6 µg.g⁻¹, nettement supérieures aux nôtres qui étaient de 93,2 (2,9 – 163,6 ng.g⁻¹).

Comme dans la plupart des études antérieures, le chlorpyrifos n'a pas été détecté dans nos échantillons. Les autres substances non détectées dans notre étude : le malathion, le propoxur, l'ETU, la deltaméthrine, et le DCCA, n'étaient pas (ou à un taux très faible) non plus détectées dans les travaux de Berton et al. (2014). De manière générale, on constate

dans notre étude et dans la littérature que les substances mères sont très peu détectées dans le méconium, ceci pouvant certainement s'expliquer par leur métabolisation dans l'organisme de la mère avant leur accumulation fœtale. Ainsi, à l'issue des dosages, nous avons mis en évidence la présence d'isoproturon et de cyperméthrine comme seules substances mères chez le nouveau-né. Ces résultats diffèrent de certains articles où le propoxur était la substance mère la plus fréquemment détectée (Bielawski et al., 2005; Ostrea et al., 2009).

Si nos résultats sont en grande partie en accord avec l'étude de Berton et al. (2014) sur laquelle nous avons basé notre technique de dosage, certaines variations avec le reste de la littérature peuvent être expliquées par de nombreux éléments, en particulier de grandes différences entre les méthodes et techniques utilisées ainsi que les populations étudiées. Le choix de la technique employée peut avoir un impact sur la limite de détection, qui dépend très largement de la sensibilité et de la précision des appareils utilisés pour les dosages. De plus, l'environnement et le mode de vie des mères des populations étudiées sont des facteurs déterminants de l'exposition aux pesticides qui présentent évidemment une grande hétérogénéité entre les études. Rappelons que chaque région en France mais aussi dans le monde possède ses propres pratiques culturelles et par conséquent, ses propres produits phytosanitaires

4.2 Exposition maternelle

L'exposition maternelle aux pesticides dans notre étude a été évaluée à l'aide d'un questionnaire renseigné par les mamans. Ce questionnaire nous a permis d'obtenir des informations sur les différentes sources d'exposition aux pesticides de notre population.

L'évaluation de l'exposition professionnelle aux pesticides des mères participant à l'étude a permis de mettre en évidence que ces dernières étaient très peu voire non exposées aux pesticides dans le cadre de leur activité. En effet, seules 15% des mères ont travaillé dans un secteur pouvant potentiellement les exposer aux pesticides. Dans l'étude de Mayhoub et al. (2014) sur une cohorte de 993 mères, elles représentaient également une faible proportion (4,3%). Le score que nous avons calculé était par conséquent très faible pour l'ensemble des

mères : 1,0 (0 – 80), les limites théoriques de celui-ci étant comprises entre 0 et 104. Seules 4 mères avaient un score au-dessus de 1.

En ce qui concerne l'exposition alimentaire, nous avons observé que l'alimentation était principalement « non bio » car seule 4,8 à 19,1% des mères ont déclaré consommer « le plus souvent possible » des aliments bio et près de la moitié (47,6%) ont indiqué ne jamais en consommer. Le score alimentaire était réparti de façon relativement homogène dans la population. Toutefois, l'exposition alimentaire étant le résultat d'une exposition à une multitude de pesticides, il est difficile d'établir un lien entre score alimentaire et les résultats des dosages dans le méconium.

L'exposition domestique a été étudiée grâce à des questions concernant l'usage de produits antiparasitaires humains et/ou vétérinaires dans le domicile, ou à destination de l'entretien des plantes et d'un jardin privé. Les résultats que nous avons obtenus ont montré une exposition domestique très faible pour notre cohorte. En effet, aucune des familles qui possédaient un animal domestique (soit 66,7%) n'utilisait de produits antiparasitaires vétérinaires et seule 9,1% des mamans utilisaient des antiparasitaires humains à leur domicile. De plus, dans aucun des foyers, les plantes d'intérieur n'ont fait l'objet d'un entretien par des produits phytosanitaires, il en était de même pour les jardins privés.

Ces résultats sont cohérents avec ceux des dosages, car il a été montré que les pesticides à usage domestique les plus utilisés faisaient partie de la famille des pyréthrinoïdes (Lecomte et al., 2004). Or, nos résultats de dosages dans le méconium montrent qu'hormis la cyperméthrine, aucun autre pyréthrinoïde n'a été détecté, démontrant la faible utilisation de pesticides à usage domestique.

L'exposition environnementale des mères a également été évaluée selon la présence d'un champ de culture, d'un espace vert et d'un axe de transport à proximité du domicile. 47,6% des mères ont déclaré habiter à moins d'1 km d'un champ de culture, ce qui pourrait expliquer en partie la détection importante des métabolites d'organophosphorés dans le méconium des nouveau-nés, famille de pesticides dont l'usage est très répandu en agriculture. De plus, 57% des familles résidaient à proximité d'un axe de transport, l'entretien de ces routes et réseaux ferrés est principalement réalisé à l'aide d'herbicides (Anses 2010) notamment l'isoproturon qui a été détecté dans 50% de nos échantillons.

4.3 Limites

L'utilisation d'un questionnaire peut être limitée par plusieurs facteurs : la culpabilité des mères qui pourraient se sentir responsables de la prématurité de leur enfant ; les défauts de mémoire ou l'absence de réponses à certaines questions. Le questionnaire peut être utilisé pour identifier les éventuelles sources ou modalités d'expositions aux pesticides mais ne permet pas de quantifier l'exposition. Par ailleurs, un lien entre les réponses au questionnaire et le dosage des pesticides est difficile car il n'est pas possible pour les mamans d'identifier spécifiquement les pesticides auxquels elles pourraient être exposées. Cette exposition qui regroupe par ailleurs plusieurs familles de composés.

La réalisation de cette étude, nous a permis de mettre en évidence quelques limites concernant le dosage simultané de différentes familles de pesticides dans le méconium. La première est liée à notre population, car si le recueil du méconium est un procédé facile à réaliser, les nouveau-nés prématurés accumulent moins de méconium au cours de la grossesse par rapport à un enfant né à terme. Ainsi, pour plusieurs nouveau-nés inclus dans notre étude, nous n'avons pas pu obtenir la quantité nécessaire à la réalisation des dosages. La deuxième limite est liée à la technique de dosage que nous avons utilisée (Berton et al., 2014). Cette technique permet à l'aide d'une unique méthode d'extraction, de réaliser le dosage simultané de plusieurs familles de pesticides. Elle présente donc l'avantage de rendre possible le dosage d'un grand nombre de pesticides avec une seule prise d'essai de méconium (500 mg). Cependant, les propriétés physico-chimiques des pesticides varient en fonction de leur famille. L'utilisation de méthodes adaptées à chaque famille pourrait donc être envisagée afin d'augmenter encore plus la précision des résultats.

Malgré ces limites, nos résultats de dosage ont permis de discriminer et de hiérarchiser les enfants (issus d'un même échantillon) entre eux par rapport à leur niveau d'exposition aux pesticides qui ont pu être quantifiés et ce sont ces données clés qui permettent l'étude de l'impact des pesticides sur les fonctions neurophysiologiques des nouveau-nés (*cf* chapitre 5 – étude 2).

Chapitre 5 (Etude 2) : Exposition *in utero* aux pesticides et impacts sur les fonctions neurovégétatives du nouveau-né prématuré

1 Contexte de l'étude

La période postnatale est une phase de maturation importante, notamment chez l'enfant prématuré. Pendant cette période, le sommeil, dont la structure et l'évolution constituent des critères d'intégrité du système nerveux central et du développement neurologique de l'enfant, représente jusqu'à 80% de l'état comportemental du nouveau-né.

Par leurs propriétés neurotoxiques, les pesticides (ou produits phytosanitaires) pourraient être responsables de perturbations du développement et de l'activité du système nerveux et des fonctions sous son contrôle, fonctions qui sont encore immatures chez le nouveau-né prématuré. On peut craindre en particulier un impact sur les systèmes de neurotransmission. L'action inhibitrice sur l'acétylcholinestérase des organophosphorés notamment pourrait entraîner un dysfonctionnement au niveau du système cholinergique alors que celui-ci est impliqué dans de nombreuses fonctions neurovégétatives, telles que le sommeil, la ventilation ou encore le système cardiovasculaire (*cf.* Chapitre 2).

Il est aujourd'hui admis que le fœtus est exposé aux produits phytosanitaires. L'exposition de la femme enceinte à ces substances par son alimentation, son environnement mais aussi son activité professionnelle en est la cause principale. En effet, de nombreux pesticides auxquels sont exposées les mamans sont capables de traverser la barrière placentaire et s'accumulent dans l'organisme du fœtus (*cf.* Chapitre 4).

Toutefois, à notre connaissance, il n'existe aucune étude s'intéressant à l'impact d'une exposition chronique aux pesticides pendant la période périnatale sur les fonctions neurovégétatives du nouveau-né. Par ailleurs, on observe dans la littérature que l'évaluation de l'exposition fœtale aux pesticides est rarement réalisée dans le méconium, alors que cette matrice est décrite comme plus précise pour quantifier une exposition chronique (Ostrea et al., 2008, 2009). Les matrices les plus fréquemment utilisées, comme le sang ou l'urine, ne reflètent qu'une courte fenêtre d'exposition.

Ainsi, le but de cette étude était d'évaluer, chez le nouveau-né prématuré, l'influence d'une exposition prénatale chronique aux pesticides sur le sommeil d'une part, et sur les paramètres ventilatoires de base (ventilation minute, apnées...), le contrôle de cette ventilation par les chémorécepteurs périphériques et les paramètres cardiovasculaires pendant les différents stades de sommeil d'autre part.

2 Sujets et protocole

L'étude a été réalisée chez 31 nouveau-nés prématurés dont les caractéristiques sont présentées dans le tableau 14. Le niveau d'exposition aux pesticides des nouveau-nés pendant la vie fœtale a été évalué par un questionnaire d'exposition maternelle et par le dosage simultané de plusieurs familles de pesticides dans leur méconium (*cf.* Chapitre 4).

	Population totale (n=31)
Age gestationnel (sem.a.)	31,1 ± 1,6
Poids de naissance (g)	1525,0 ± 320,0
Taille à la naissance (cm)	40,6 ± 2,9
Périmètre crânien à la naissance (cm)	28,6 ± 2,0
Garçons/Filles (n)	18/13

Tableau 14. Description de l'échantillon.

Les valeurs sont exprimées sous la forme de moyenne ± écart-type.

2.1 Sommeil et événements cardio-ventilatoires

Les enregistrements polysomnographiques ont été réalisés entre 20h00 et 8h00 le lendemain matin. Les périodes de veille et les stades de sommeil étaient distingués selon les critères basés sur les signaux EEG, les mouvements oculaires et corporels tels que recommandés par Grigg-Damberger (2016) (*cf.* Chapitre 1 et 3).

La structure du sommeil a été caractérisée par la durée globale de sommeil (DGS, min), la veille intra-sommeil (VIS, fréquence en h^{-1} ; durée relative en %DGS), le temps total de sommeil (TTS, min), les durées relatives de SA, SC et SI (% TTS), les durées maximales des épisodes de SA et SC et la fréquence de changement de stade de sommeil (f_{stade} , h^{-1}).

Les évènements cardio-ventilatoires pendant le sommeil ont également été analysés. Pour rappel, les paramètres étudiés comprenaient :

- La fréquence ($f_{\text{Désat}}$, h^{-1}), la durée moyenne (Dmoy desat, s) des désaturations avec (+B) et sans (-B) bradycardie et la chute moyenne de SpO₂ lors des désaturations (Chute SpO₂, %);
- La fréquence (f_{Apn} , h^{-1}), la durée moyenne (Dmoy Apn, s) et la durée maximale (Dmax Apn, s) des cinq types d'apnées centrales (Apn $\pm D/\pm B$; Apn -D/-B; Apn +D/-B; Apn -D/+B; Apn +D/+B);
- La fréquence (f_{RP} , h^{-1}), la durée moyenne (Dmoy RP, s), et la durée maximale (Dmax RP, s) des épisodes de respiration périodique.

2.2 Ventilation et sensibilité des chémorécepteurs périphériques

Les enregistrements ont été réalisés par polysomnographie lors d'une sieste matinale entre 8h00 et 12h00, entre deux prises alimentaires, directement dans le berceau du nouveau-né. Le test hypoxique a été effectué à deux reprises dans chaque stade de sommeil (SA et SC). Aucun des nouveau-nés explorés n'était sous assistance ventilatoire depuis au moins 7 jours avant les enregistrements. De plus, la prise de médicaments pouvant influencer les paramètres cardio-ventilatoires comme la caféine par exemple était terminée depuis au moins 3 jours avant l'exploration.

Les paramètres analysés :

- La ventilation minute (\dot{V}_E , mL.kg⁻¹.min⁻¹), le volume courant (V_T , mL.kg⁻¹) et la fréquence respiratoire (f_r , cycles.min⁻¹) pendant la période de référence avant le test (période normoxique);

- Le temps de réponse (TR, s) et la variation au TR de \dot{V}_E ($\Delta\dot{V}_E$, % du \dot{V}_E de base) lors du test hypoxique.

2.3 Contrôle autonome cardiaque

L'évaluation de la variabilité du rythme cardiaque (VRC) a été effectuée à partir du signal RR extrait de l'enregistrement polysomnographique nocturne. Pour chacune des périodes de SA et SC, les paramètres suivants ont été analysés :

- La fréquence cardiaque moyenne (FC, bpm) ;
- La déviation standard des intervalles RR normalisés (SDNN, ms) ;
- La racine carrée des différences au carré des intervalles RR successifs (RMSSD, ms) ;
- La proportion d'intervalles RR successifs supérieurs à 50 ms (pNN50, %) ;
- La puissance spectrale dans les fréquences très basses (VLF), basses (LF) et hautes (HF), exprimée en valeurs absolue (ms^2) et relative (%) ;
- Le rapport LF/HF.

2.4 Analyses statistiques

Le logiciel de statistiques Statview (version 5.0, SAS Institute Inc., Cary, NC) a été utilisé pour cette étude. En fonction de la nature des données, de leurs interactions et des hypothèses formulées, différentes analyses statistiques ont été réalisées. Étant donné notre effectif, une grande majorité des données ne suivait pas une distribution normale et des tests non paramétriques ont donc été utilisés. Le seuil de significativité considéré était $p < 0,05$. Les données présentées dans les résultats sont exprimées par la médiane (min – max).

En ce qui concerne le questionnaire d'exposition maternelle, le score alimentaire a d'abord été exprimé en variable continue (S_{Alim}). La relation entre le score alimentaire et les différents paramètres étudiés a été évaluée par un test de corrélation de Spearman. Ce score a aussi été exprimé en variable catégorielle ($S_{\text{Alim}} < \text{ou} > \text{à la médiane}$). Les différences

dans les paramètres physiologiques entre ces deux groupes ont été analysées par un test de Mann-Whitney. L'exposition environnementale a été évaluée à l'aide de la question « y-a-t-il un champ à moins d'1 km de votre domicile ? ». Les paramètres physiologiques des groupes « champ oui » et « champ non » ont donc également été comparés par un test de Mann-Whitney.

L'analyse des données de dosage dans le méconium a consisté en une analyse descriptive du nombre de substances détectées (cf. chapitre 4). Par la suite, les niveaux de concentration des différents pesticides dosés dans le méconium ont été exprimés en variables continues et/ou catégorielles :

- DEP et DETP :

(1) Variable continue (concentration, ng.g^{-1}). L'influence du niveau d'imprégnation aux DEP et DETP sur l'ensemble des paramètres étudiés a été testée grâce à un test de corrélation de Spearman.

(2) Variable catégorielle. La classification des enfants a été faite en fonction du taux de détection de chaque substance :

- Si la substance était détectée dans moins de 50 % des échantillons, les nouveau-nés étaient divisés en 2 classes (< ou > à la limite de détection (LD)).
- Si la substance était détectée dans plus de 50 % des échantillons alors les nouveau-nés étaient répartis en 3 classes en fonction des valeurs de concentration (<LD, [LD – médiane], >médiane ; la médiane était calculée sur les valeurs de concentrations supérieures à la LD).

C'est cette dernière classification que nous avons utilisée pour les concentrations de DEP et de DETP. Dans ce cas, l'impact des pesticides a été évalué par un test de Kruskal-Wallis afin de tester la différence entre les 3 classes. Par la suite, lorsque la valeur de p était significative, un test *post hoc* de Mann-Whitney était réalisé.

Remarque : le DETP était détecté dans 100% des échantillons. Seules deux classes ont donc été considérées ([LD – médiane] et >médiane). Les paramètres de ces deux groupes ont donc été comparés uniquement par un test de Mann-Whitney.

- DMP, DMDTP, Isoproturon et cyperméthrine :

Ces pesticides n'ont pas pu être quantifiés précisément car leur concentration était inférieure à la limite de quantification. Par conséquent, ces substances ont été exprimées en variable catégorielle en fonction de leur détection ou non dans l'échantillon (<LD : absence et >LD : présence). Leurs effets sur les paramètres physiologiques ont été étudiés à l'aide d'un test de Mann-Whitney.

Pour l'ensemble des paramètres physiologiques survenant pendant le sommeil, les tests de comparaison ont été effectués séparément en SA et en SC.

3 Résultats

3.1 Structure du sommeil

L'ensemble des résultats des tests statistiques sur les caractéristiques du sommeil des nouveau-nés de notre étude est présenté dans le tableau 15.

Valeurs de p	DEP				DETP		DMP	DMDTP	Isopro.	Cyper.	Champ	S _{Alim}	
	<LD vs [LD-méd]	[LD-méd] vs >méd	<LD vs >méd	Corr.	[LD-méd] vs >méd	Corr.	Abs. vs Prés.	Abs. vs Prés.	Abs. vs Prés.	Abs. vs Prés.	Non vs Oui	<méd vs >méd	Corr.
DGS (min)	NS	NS	NS	NS	NS	NS	0,03	NS	NS	NS	NS	NS	NS
TTS (min)	NS	NS	NS	NS	NS	NS	0,01	NS	0,03	NS	NS	NS	NS
Durée max SA (min)	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	0,02	NS	NS
Durée max SC (min)	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Durée relative SA (%)	NS	NS	0,02	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Durée relative SC (%)	NS	0,03	0,03	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Durée relative SI (%)	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	0,03	NS	NS
Durée relative VIS (%)	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Durée moyenne SA (min)	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Durée moyenne SC (min)	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Durée moyenne SI (min)	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Durée moyenne VIS (min)	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
$f_{\text{Stade}} (h^{-1})$	0,043	0,048	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
$f_{\text{VIS}} (h^{-1})$	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	0,02

Tableau 15. Résultats des analyses statistiques de l'impact des pesticides étudiés sur les paramètres hypniques.

NS : non significatif ; LD : limite de détection ; méd : médiane ; Abs. : absence ; Prés. : présence ; Corr. : corrélation de Spearman ; Isopro. : isotropuron ; Cyper. : cyperméthrine ; f_{Stade} : fréquence de changement de stade ; f_{VIS} : fréquence des épisodes de veille intra-sommeil.

3.1.1 Imprégnation foétale aux pesticides

Le dosage des pesticides dans le méconium nous a permis de mettre en évidence un impact des pesticides sur la structure du sommeil des nouveau-nés. En effet, les principaux résultats ont montré que la présence de DMP diminuait significativement la DGS qui était de 576 min (366 – 617) dans le groupe avec DMP contre 597,3 min (549,5 – 673,0) dans le groupe sans DMP. Le DMP et l'isoproturon avaient également un effet négatif sur le TTS (Figure 39).

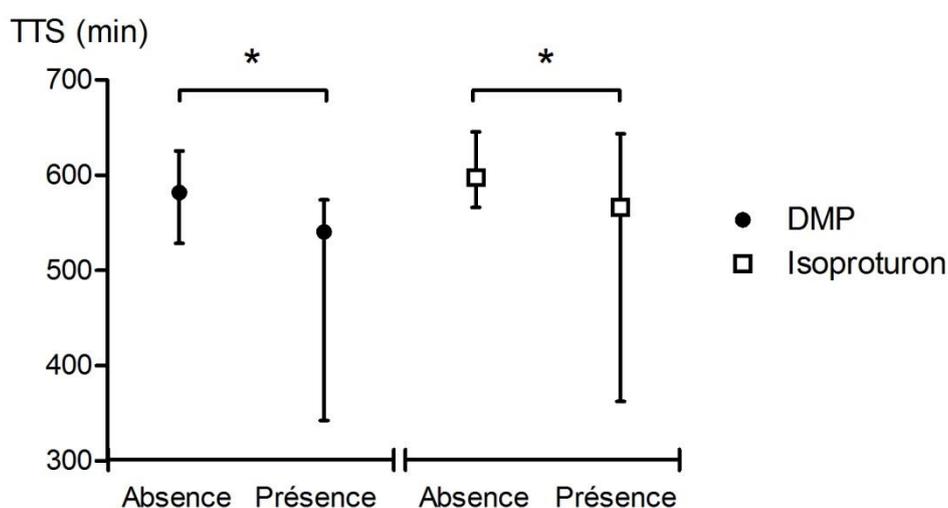


Figure 39. Effet de l'imprégnation au DMP et à l'isoproturon sur le temps total de sommeil (TTS).

** $p < 0,05$. Les résultats sont exprimés en médiane (min – max).*

Nos résultats ont permis de mettre en évidence une influence du DEP sur la structure du sommeil. Cet effet n'a été observé que chez les enfants les plus exposés. La durée relative de SA était significativement plus faible dans le groupe >médiane par rapport au groupe <LD (58,4% (54,6 – 62) et 69,9% (57,6 – 77,6) respectivement). Parallèlement, la durée relative de SC était significativement plus importante dans le groupe >médiane (27,9% (24,6 – 57,1)) que dans le groupe <LD (20,9% (13,5 – 35)) (Figure 40).

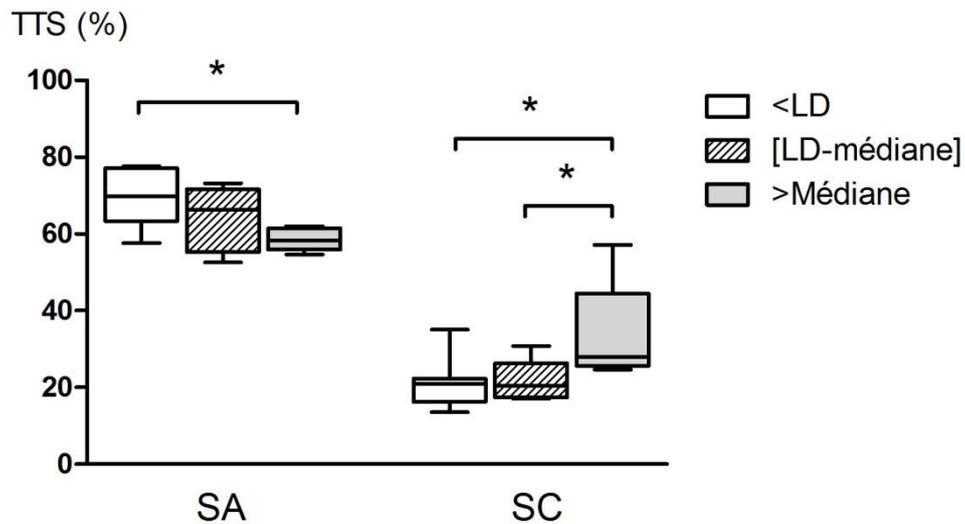


Figure 40. Effet de l'exposition au DEP sur la durée relative (% temps total de sommeil, TTS) de SA et SC.

* $p < 0,05$. LD : limite de détection ; SA : sommeil agité ; SC : sommeil calme.

La fréquence de changement de stade était significativement plus élevée dans le groupe DEP [LD-médiane] ($3,5 \text{ h}^{-1}$ ($2,9 - 4,4$)) par rapport au groupe <LD (3 h^{-1} ($2,3 - 3,8$)). Cependant, nous avons observé que pour un niveau d'exposition plus important (groupe >médiane), cette fréquence était plus faible ($2,8 \text{ h}^{-1}$ ($2,7 - 3,5$)) que dans le groupe [LD-médiane] pour retourner à une valeur semblable au groupe <LD (Figure 41).

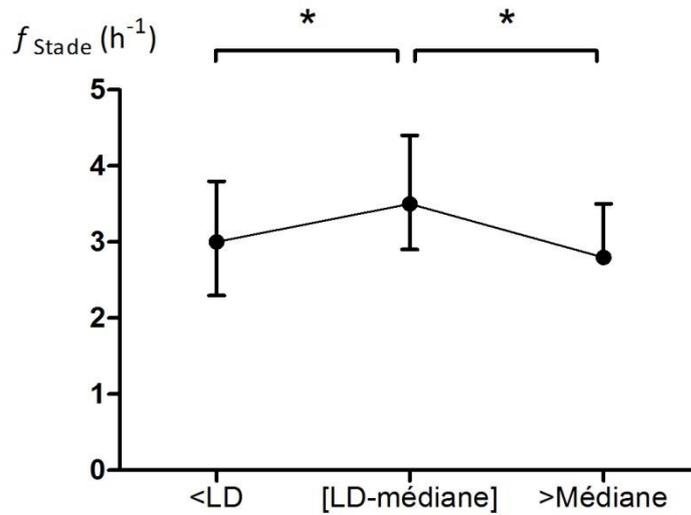


Figure 41. Effet de l'exposition au DEP sur la fréquence de changement de stade (f_{Stade}).

* $p < 0,05$. Les valeurs sont exprimées en médiane (min – max). LD : limite de détection.

3.1.2 Exposition environnementale

Nous avons observé que la domiciliation à proximité d'un champ de culture était associée à une durée maximale du SA plus faible par rapport au groupe sans champ à moins d'1 km (champ non : 72,3 min (54,5 – 93) ; champ oui : 54 min (41 – 93) ;) et à une durée relative du SI plus importante (champ non : 11,7% (2 – 29) ; champ oui : 17% (6 – 22,8)).

3.1.3 Exposition alimentaire

L'analyse du score d'exposition alimentaire a montré qu'il existait une corrélation positive significative entre le S_{Alim} et la fréquence d'apparition d'épisodes de VIS (Figure 42).

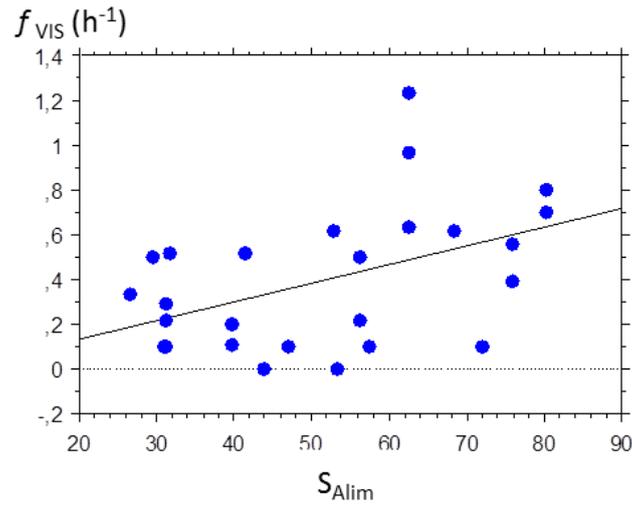


Figure 42. Relation entre le score d'exposition alimentaire aux pesticides (S_{Alim}) et la fréquence de la veille intra-sommeil (f_{VIS}).

$p=0,02$; $p=0,5$ dans un test de corrélation de Spearman. S_{Alim} : score alimentaire.

3.2 Ventilation et contrôle ventilatoire

L'ensemble des résultats statistiques de l'influence des pesticides sur la ventilation et le contrôle ventilatoire est présenté dans le tableau 16.

Valeurs de p		DEP				DETP		DMP	DMDTP	Isopro.	Cyper.	Champ	S _{Alim}	
		<LD vs [LD-méd]	[LD-méd] vs >méd	<LD vs >méd	Corr.	[LD-méd] vs >méd	Corr.	Abs. vs Prés.	Abs. vs Prés.	Abs. vs Prés.	Abs. vs Prés.	Non vs Oui	<méd vs >méd	Corr.
NORMOXIE														
$\dot{V}_{E\text{ REF}}$	SA	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	0,047	NS	NS	NS	0,001	0,0003
	SC	NS	NS	0,03	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
V _T	SA	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	0,02	NS	NS	NS	NS	NS
	SC	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
fr	SA	NS	NS	0,03[†]	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	0,03[†]	0,01[†]
	SC	NS	NS		NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS		
HYPOXIE														
$\Delta\dot{V}_E$	SA	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
	SC	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	0,04	NS	NS	NS	0,01	NS
TR	SA	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
	SC	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS

Tableau 16. Résultats des analyses statistiques de l'impact des pesticides étudiés sur les paramètres ventilatoires en périodes normoxique et lors du test hypoxique.

NS : non significatif ; LD : limite de détection ; méd : médiane ; Abs. : absence ; Prés. : présence ; Corr. : corrélation de Spearman ; Isopro. : isoproturon ; Cyper. : cyperméthrine ; † : SA/SC compactés.

3.2.1 Imprégnation foétale aux pesticides

Il a été observé un impact des pesticides de la famille des organophosphorés sur la ventilation en période normoxique. Les enfants les plus exposés au DEP (>Médiane) présentaient une $\dot{V}_{E\text{ REF}}$ en SC significativement plus élevée (426,3 mL.min⁻¹.kg⁻¹ (372,6 – 442,6)) que les enfants du groupe le moins exposé (<LD) (350,2 mL.min⁻¹.kg⁻¹ (264,7 – 425,7)) (Figure 43A). En ce qui concerne V_T et FR, nous n'avons pas observé de différence significative entre ces deux groupes. Toutefois, la FR tendait à être plus élevée en SC dans le groupe le plus exposé au DEP, sans atteindre le seuil de significativité ($p=0,08$).

Le groupe exposé au DMDTP présentait en SA une $\dot{V}_{E\text{ REF}}$ inférieure au groupe non exposé (374,7 mL.min⁻¹.kg⁻¹ (310,8 – 473,6) et 435,4 mL.min⁻¹.kg⁻¹ (306,7 – 633,6) respectivement) (Figure 43B). Nous avons pu constater que cette différence de ventilation était principalement due à un impact du DMDTP sur V_T . En effet, en présence de DMDTP, le V_T était significativement plus faible (5,9 mL.kg⁻¹ (4,3 – 7,4)) qu'en l'absence de DMDTP (7,1 mL.kg⁻¹ (5,1 – 9,2)).

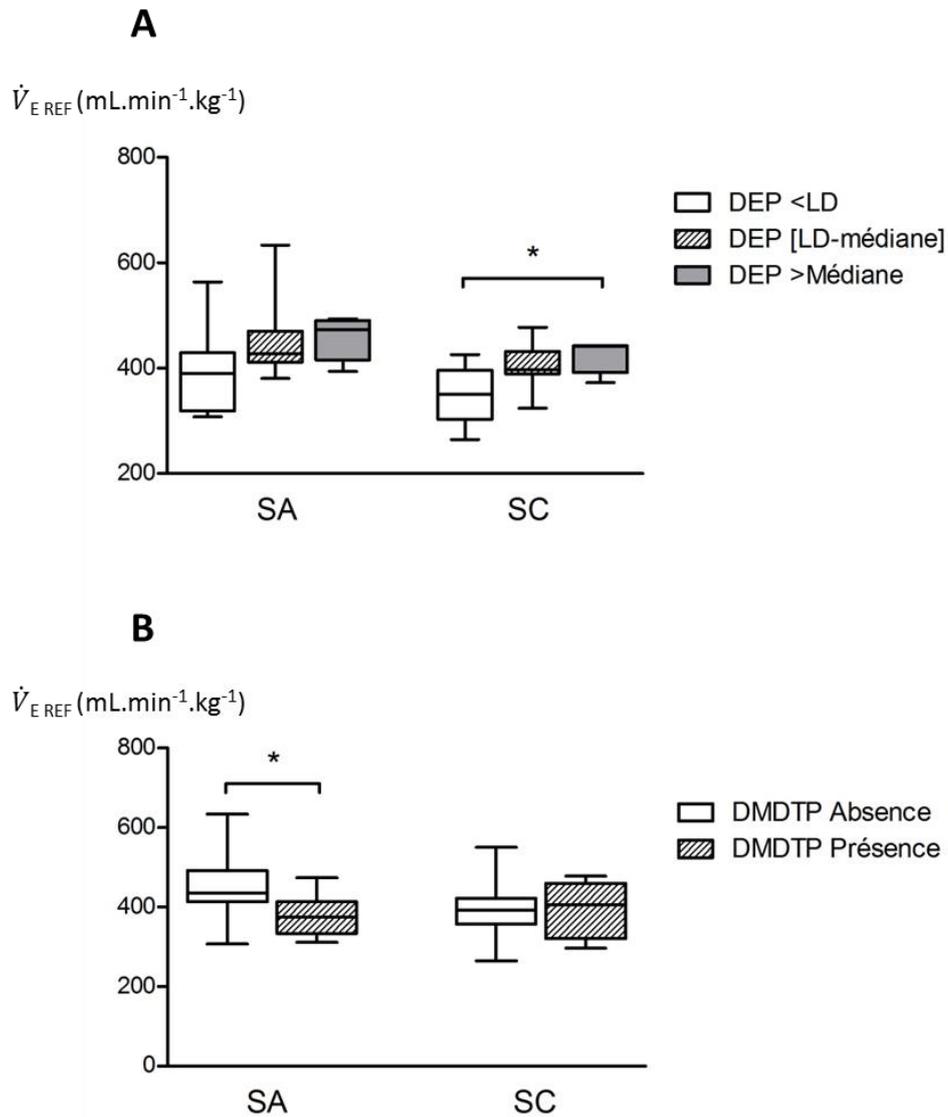


Figure 43. Effet de l'exposition au DEP (A) et au DMDTP (B) sur la ventilation minute pendant la période normoxique ($\dot{V}_{E\text{REF}}$).

* $p < 0,05$.

Au cours du test hypoxique, la réponse ventilatoire ($\Delta\dot{V}_E$, %) et le temps de réponse (TR, s) des chémorécepteurs périphériques (CRP) ont été mesurés. Les enfants exposés au DMDTP présentaient une réponse ventilatoire à l'hypoxie significativement plus faible que les enfants non exposés, mais ce résultat n'a été retrouvé qu'en SC (groupe exposé : 10,3% (7,5 – 17,1) ; groupe non exposé : 19,8% (6,7 – 37,3)). Aucun effet sur le TR n'a été observé.

3.2.2 Exposition environnementale

Aucun effet significatif de la présence d'un champ à proximité du domicile n'a été observé sur les paramètres ventilatoires et la réponse au test hypoxique.

3.2.3 Exposition alimentaire

La $\dot{V}_{E\text{ REF}}$ était significativement plus faible dans le groupe $S_{\text{Alim}} > \text{médiane}$ que dans le groupe $S_{\text{Alim}} < \text{médiane}$ en SA. La variation de la ventilation ($\Delta\dot{V}_E$) en réponse à l'hypoxie était également plus faible dans le groupe avec un $S_{\text{Alim}} > \text{médiane}$ (vs. $S_{\text{Alim}} < \text{médiane}$) mais l'effet a été observé cette fois-ci uniquement en SC (Tableau 17).

	$S_{\text{Alim}} < \text{médiane}$	$S_{\text{Alim}} > \text{médiane}$
	$\dot{V}_{E\text{ REF}} \text{ (mL}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{kg}^{-1}\text{)}$	
SA	466,3 (411,5 – 633,6)	397,0 (306,7 – 627,0)**
SC	407 (321,2 – 507,8)	360,1 (264,7 – 608)
	$\Delta\dot{V}_E \text{ (\%)}$	
SA	19,3 (8,6 – 46,6)	24 (13,4 – 80)
SC	20,3 (9,6 – 37,3)	13,5 (6,7 – 24,4)**

Tableau 17. Effet de l'exposition alimentaire aux pesticides sur la ventilation en période normoxique et la réponse ventilatoire à l'hypoxie.

** : $p \leq 0,01$

L'analyse du score d'exposition alimentaire a montré qu'il existait une corrélation négative significative entre le S_{Alim} et la $\dot{V}_{E\text{ REF}}$ (Figure 44).

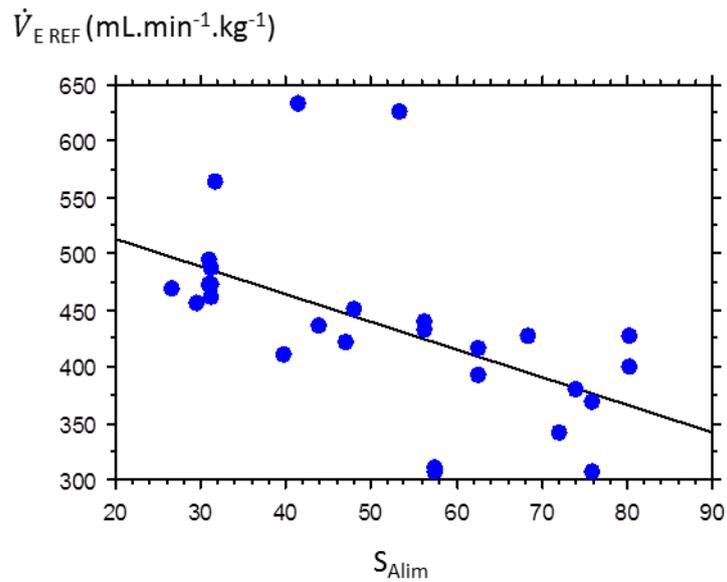


Figure 44. Relation entre le score d'exposition alimentaire aux pesticides (S_{Alim}) et la $\dot{V}_{E REF}$.
 $p < 0,001$; $\rho = -0,7$ dans un test de corrélation de Spearman. S_{Alim} : score alimentaire.

3.3 Evènements cardio-ventilatoires

3.3.1 Désaturations

Les résultats des analyses statistiques concernant l'impact de l'exposition aux pesticides sur l'ensemble des désaturations (désat $\pm B$) sont présentés dans le tableau 18. Les résultats spécifiques des désaturations +B et -B sont présentés en annexes 2 et 3 respectivement.

Valeurs de p	DEP				DETP		DMP	DMDTP	Isopro.	Cyper.	Champ	S _{Alim}		
	<LD vs [LD-méd]	[LD-méd] vs >méd	<LD vs >méd	Corr.	[LD-méd] vs >méd	Corr.	Abs. vs Prés.	Abs. vs Prés.	Abs. vs Prés.	Abs. vs Prés.	Non vs Oui	<méd vs >méd	Corr.	
Désat ±B														
Durée moyenne	TTS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
	SA	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	0,03	NS	NS
	SC	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	0,045	0,04
f _{Désat}	TTS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	0,03	NS
	SA	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	0,02	NS
	SC	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Chute moyenne SpO ₂	TTS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	0,02	NS	NS	NS	NS
	SA	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
	SC	NS	NS	NS	NS	NS	NS	0,02	NS	0,01	NS	NS	NS	NS

Tableau 18. Résultats des analyses statistiques de l'impact des pesticides étudiés sur les désaturations avec ou sans bradycardie (±B) pendant le sommeil.

Désat : désaturation ; NS : non significatif ; LD : limite de détection ; méd : médiane ; Abs. : absence ; Prés. : présence ; Corr. : corrélation de Spearman ; Isopro. : isoproturon ; Cyper. : cyperméthrine ; f_{Désat} : fréquence des désaturations.

3.3.1.1 Imprégnation foetale aux pesticides

Aucun effet de l'exposition aux pesticides recherchés n'a été observé sur la fréquence d'apparition et sur la durée moyenne des désaturations, quel que soit le stade de sommeil. En revanche, les enfants exposés au DMP et à l'isoproturon présentaient une chute moyenne de la SpO₂ significativement plus faible lors des désaturations \pm B que les enfants non exposés. Cet effet n'a été observé qu'en SC. En SA, la durée moyenne des désaturations +B des enfants exposés à l'isoproturon était inférieure à celle des enfants non exposés. De plus, en ce qui concerne les désaturations -B, nous avons observé une chute moyenne de SpO₂ significativement plus faible dans le groupe exposé à l'isoproturon en SA et dans le groupe exposé au DMP en SC (vs. non exposés) (Tableau 19). Enfin, tous stades de sommeil confondus la présence de cyperméthrine dans le méconium était associée à une chute moyenne de la SpO₂ plus faible lors des désaturations -B (6,6% (5,7 – 8,9)) qu'en l'absence de cyperméthrine (9,3% (6,5 – 10,7)).

Médiane (min – max)	Stade	DMP		Valeur de p	Isoproturon		Valeur de p
		Absence	Présence		Absence	Présence	
Désat \pmB							
Chute moyenne SpO ₂ (%)	SA	8,6 (6,1 – 10,7)	7,5 (6,2 – 8,5)	0,16	8,7 (8,4 – 10,7)	7,1 (6,1 – 9,6)	0,01
	SC	9,7 (8,4 – 10,9)	6,7 (5,2 – 6,8)	0,02	8,4 (5,3 – 10,3)	9,4 (6,7 – 10,9)	0,62
Désat +B							
Durée moyenne (s)	SA	14,3 (11,6 – 25,8)	12,1 (11 – 13,1)	0,09	14,7 (12,2 – 25,8)	12,1 (11 – 17,9)	0,03
	SC	19,8 (11,3 – 23)	21,5 (17 – 26)	0,56	22 (16,5 – 24,3)	16,2 (11 – 20)	0,16
Désat -B							
Chute moyenne SpO ₂ (%)	SA	8,8 (5,7 – 10,8)	6,8 (6,1 – 8,7)	0,24	9,0 (8,7 – 10,8)	6,4 (5,7 – 8,9)	0,01
	SC	8,7 (7,9 – 10,3)	6,7 (6,3 – 7,1)	0,03	8,1 (6,3 – 10,3)	7,1 (6,7 – 9,2)	0,72

Tableau 19. Effet de l'exposition *in utero* au DMP et à l'isoproturon sur les désaturations.

Désat : désaturations ; NS : non significatif ; min/max : minimum et maximum ; SpO₂ : saturation pulsée en oxygène.

3.3.1.2 Exposition environnementale

Nos résultats ont montré une influence de la localisation du domicile sur la durée moyenne des désaturations tous types confondus ($\pm B$). En effet, en SA, les nouveau-nés du groupe « champ oui » avaient une durée moyenne de ces désaturations plus élevée par rapport au groupe « champ non » (14 s (11,3 – 25,1) et 12 s (10,8 – 13,3) respectivement). Aucun effet sur les désaturations avec ou sans bradycardie (+B et –B) n’a été mis en évidence.

3.3.1.3 Exposition alimentaire

Un résultat opposé à celui de l’exposition environnementale a été observé concernant l’exposition alimentaire mais en SC cette fois-ci. Dans ce stade de sommeil, la durée moyenne des désaturations était significativement plus faible dans le groupe avec un $S_{Alim} > \text{médiane}$ (11 s (10,6 – 20) comparativement au groupe $S_{Alim} < \text{médiane}$ (17,7 s (11,1 – 26,5). De plus, les désaturations étaient plus fréquentes chez les enfants dont les mamans avaient un score alimentaire supérieur à la médiane ($S_{Alim} > \text{médiane}$: 12 désaturations.h⁻¹ (0 – 45,2)) par rapport au groupe $S_{Alim} < \text{médiane}$ (1,3 désaturations.h⁻¹ (0 – 11,5)), même si cela n’a été observé qu’en SA.

En complément du premier résultat, nous avons observé une corrélation négative significative entre le S_{Alim} et durée moyenne des désaturations $\pm B$ en SC (Figure 45).

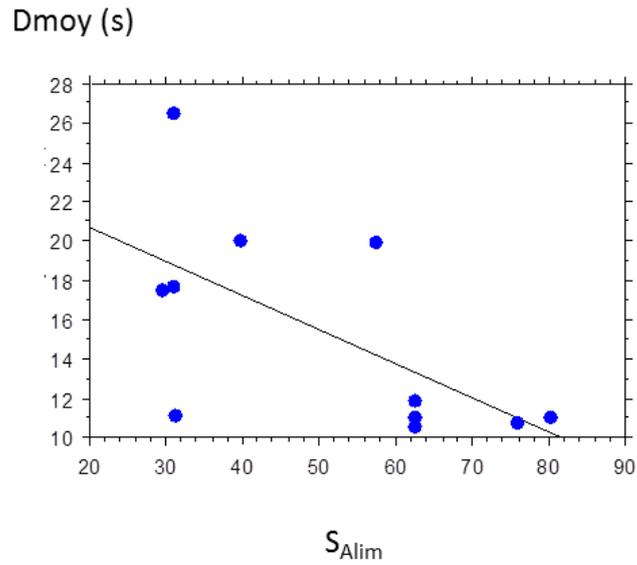


Figure 45. Relation entre le score d'exposition alimentaire aux pesticides (S_{Alim}) et la durée moyenne des désaturations $\pm B$ en sommeil calme.

$p=0,04$; $\rho=-0,7$ dans un test de corrélation de Spearman. D_{moy} : durée moyenne ; S_{Alim} : score alimentaire.

3.3.2 Apnées

Les résultats des analyses statistiques concernant l'impact de l'exposition aux pesticides sur les différentes apnées sont présentés dans les tableaux 20,21 et 22.

Valeurs de p		DEP				DETP		DMP	DMDTP	Isopro.	Cyper.	Champ	S _{Alim}	
		<LD vs [LD-méd]	[LD-méd] vs >méd	<LD vs >méd	Corr.	[LD-méd] vs >méd	Corr.	Abs. vs Prés.	Abs. vs Prés.	Abs. vs Prés.	Abs. vs Prés.	Non vs Oui	<méd vs >méd	Corr.
Apn ±B ±D														
Durée moyenne	TTS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
	SA	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
	SC	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Durée max	TTS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
	SA	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
	SC	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
<i>f</i> _{Apn}	TTS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	<0,001	0,02
	SA	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	0,03	NS
	SC	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	0,02	0,01

Tableau 20. Résultats des analyses statistiques de l'impact des pesticides étudiés sur les apnées (±B ±D) pendant le sommeil.

NS : non significatif ; LD : limite de détection ; méd : médiane ; Abs. : absence ; Prés. : présence ; Corr. : corrélation de Spearman ; Isopro. : isoproturon ; Cyper. : cyperméthrine ; *f*_{Apn} : fréquence des apnées.

Valeurs de p	DEP				DETP		DMP	DMDTP	Isopro.	Cyper.	Champ	S _{Alim}		
	<LD vs [LD-méd]	[LD-méd] vs >méd	<LD vs >méd	Corr.	[LD-méd] vs >méd	Corr.	Abs. vs Prés.	Abs. vs Prés.	Abs. vs Prés.	Abs. vs Prés.	Non vs Oui	<méd vs >méd	Corr.	
Apn -B +D														
Durée moyenne	TTS	0,02	NS	NS	NS	NS	NS	0,01	NS	NS	NS	NS	NS	NS
	SA	NS	NS	NS	NS	NS	NS	0,02	NS	NS	NS	NS	NS	NS
	SC	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Durée max	TTS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
	SA	NS	NS	NS	NS	NS	NS	0,03	NS	NS	NS	NS	NS	NS
	SC	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
f_{Apn}	TTS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
	SA	NS	NS	NS	NS	0,04	NS	NS	0,03	NS	NS	NS	NS	NS
	SC	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS

Tableau 21. Résultats des analyses statistiques de l'impact des pesticides étudiés sur les apnées sans bradycardie et avec désaturations (-B +D) pendant le sommeil.

NS : non significatif ; LD : limite de détection ; méd : médiane ; Abs. : absence ; Prés. : présence ; Corr. : corrélation de Spearman ; Isopro. : isoproturon ; Cyper. : cyperméthrine ; f_{Apn} : fréquence des apnées.

Valeurs de p	DEP				DETP		DMP	DMDTP	Isopro.	Cyper.	Champ	S _{Alim}		
	<LD vs [LD-méd]	[LD-méd] vs >méd	<LD vs >méd	Corr.	[LD-méd] vs >méd	Corr.	Abs. vs Prés.	Abs. vs Prés.	Abs. vs Prés.	Abs. vs Prés.	Non vs Oui	<méd vs >méd	Corr.	
Apn -B -D														
Durée moyenne	TTS	NS	NS	NS	0,04	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
	SA	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
	SC	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Durée max	TTS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	0,046	NS
	SA	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
	SC	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
<i>f</i> _{Apn}	TTS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	<0,001	NS
	SA	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	0,02	NS
	SC	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	0,02	0,02

Tableau 22. Résultats des analyses statistiques de l'impact des pesticides étudiés sur les apnées isolées (-B -D) pendant le sommeil.

NS : non significatif ; LD : limite de détection ; méd : médiane ; Abs. : absence ; Prés. : présence ; Corr. : corrélation de Spearman ; Isopro. : isoproturon ; Cyper. : cyperméthrine ; *f*_{Apn} : fréquence des apnées.

3.3.2.1 Imprégnation foetale aux pesticides

Dans notre étude, aucune influence de l'imprégnation foetale aux pesticides sur les apnées tous types confondus ($\pm B \pm D$) n'a été établie.

En revanche, lorsque seules les apnées avec bradycardie et sans désaturation (+B -D) étaient considérées (cf. Annexe 4), celles-ci étaient plus fréquentes dans le groupe présentant du DMDTP que dans le groupe n'ayant pas de DMDTP, avec 1,3 apnées.h⁻¹ (0,4 – 2,7) et 0 apnées.h⁻¹ (0 – 2,1) respectivement.

En ce qui concerne les apnées avec désaturation (-B +D), nous avons observé que la présence d'organophosphorés dont le DETP et le DMDTP étaient associés à une fréquence de survenue de ces apnées pendant le SA plus importante qu'en l'absence de ces pesticides dans le méconium des nouveau-nés (Figure 46A). De plus, ce type d'apnées étaient d'une durée moyenne et maximale moins longue dans le groupe exposé au DMP (respectivement 3,4 s (3,3 – 4,7) et 4 s (3,5 – 7,5)) par rapport au groupe non exposé (5 s (3,6 – 7,9) et 8,3 s (4,5 – 11,5)), spécifiquement en SA (Figure 46B).

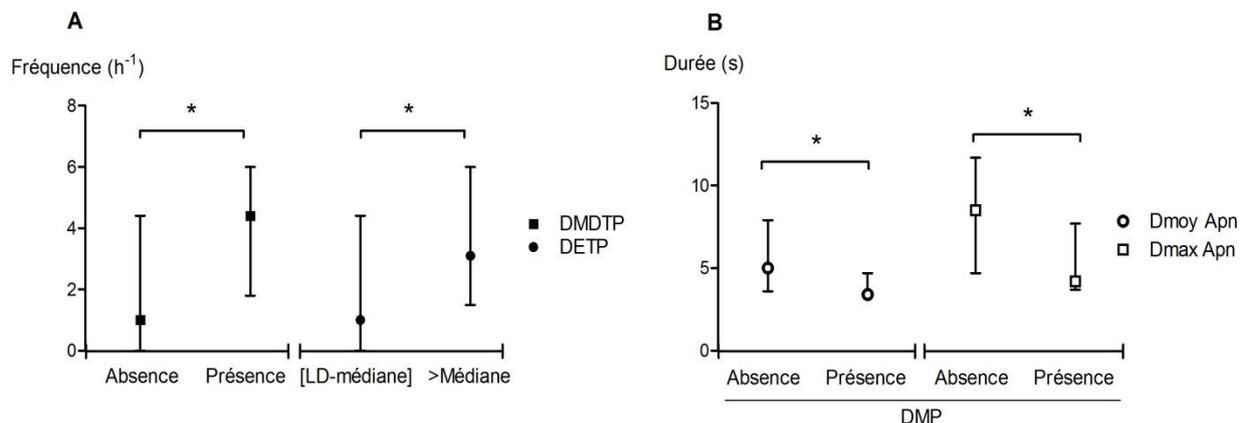


Figure 46. Effet de l'exposition *in utero* au DMDTP et DETP sur la fréquence des apnées -B +D en SA (A). Effet de l'exposition *in utero* au DMP sur la durée moyenne et la durée maximale des apnées -B +D en SA (B).

Dmoy Apn : Durée moyenne des apnées ; Dmax Apn : Durée maximale des apnées. *p<0,05. Les résultats sont exprimés en médiane (min – max).

Nous avons observé qu'une forte exposition au DETP impactait également la durée maximale des apnées +B +D (cf. Annexe 5). En effet, les nouveau-nés les plus fortement exposés (groupe >médiane) présentaient en SA des apnées d'une durée maximale plus importante (10,0 s (11 – 8,5)) par rapport au groupe moins exposé (groupe [LD-médiane]) (5,5 s (7,0 – 4,5)).

3.3.2.2 Exposition environnementale

Aucun effet de la domiciliation à proximité d'un champ cultivé n'a été observé sur la durée moyenne, la durée maximale et la fréquence de l'ensemble des apnées. Seules les apnées -B +D en SA avaient une durée moyenne significativement plus élevée lorsque les mères résidaient à proximité d'un champ (champ oui : 5,3 s (3,3 – 7,9) vs. champ non : 4,4 s (3,3 – 5,3)) (p=0,05).

3.3.2.3 Exposition alimentaire

Nous avons observé que les apnées avec ou sans événements associés ($\pm B \pm D$) et les apnées isolés (-B -D) étaient moins fréquentes dans le groupe $S_{Alim} > \text{médiane}$, aussi bien en SA qu'en SC. De même, la durée maximale des apnées -B -D était significativement plus faible pour les nouveau-nés dont la maman avait un S_{Alim} supérieur à la médiane (vs. groupe $S_{Alim} < \text{médiane}$) tous stades de sommeil confondus (Tableau 23).

	$S_{\text{Alim}} < \text{médiane}$	$S_{\text{Alim}} > \text{médiane}$
$f_{\text{Apn}} (\text{h}^{-1}), \text{Apn} \pm \text{B} \pm \text{D}$		
TTS	8,1 (0,6 – 26,6)	2,0 (0 – 15,6)***
SA	9,5 (3,8 – 26,6)	4,7 (0,7 – 15,5)*
SC	2,9 (0,6 – 14,9)	1,2 (0 – 3,6)*
$f_{\text{Apn}} (\text{h}^{-1}), \text{Apn} - \text{B} - \text{D}$		
TTS	4,9 (0 – 15,9)	0,6 (0 – 8,3)***
SA	7,9 (0 – 15,3)	1,7 (0 – 8,3)*
SC	1,7 (0 – 9,5)	0,4 (0 – 2)*
$\text{Dmax} (\text{s}), \text{Apn} - \text{B} - \text{D}$		
TTS	7,3 (4,5 – 10,5)	6 (4 – 9)*
SA	7 (5,5 – 9)	5 (4 – 9)
SC	6,5 (4 – 10,5)	5 (3,5 – 7)

Tableau 23. Effet de l'exposition alimentaire aux pesticides sur les apnées $\pm \text{B} \pm \text{D}$ et $-\text{B} - \text{D}$.

* : $p < 0,05$; ** : $p < 0,01$; *** : $p < 0,001$. S_{Alim} : Score alimentaire ; TTS : temps total de sommeil ; Apn : apnée ; f_{Apn} : fréquence des apnées ; Dmax : durée maximale des apnées.

3.3.3 Respirations périodiques

L'ensemble des résultats des analyses statistiques concernant l'impact de l'exposition aux pesticides sur les épisodes de respiration périodique avec et sans désaturation (RP $\pm \text{D}$) est présenté dans le tableau 24. Aucun effet sur les RP +D ou -D n'a été observé (Annexes 6 et 7)).

Valeurs de p	DEP				DETP		DMP	DMDTP	Isopro.	Cyper.	Champ	S _{Alim}		
	<LD vs [LD-méd]	[LD-méd] vs >méd	<LD vs >méd	Corr.	[LD-méd] vs >méd	Corr.	Abs. vs Prés.	Abs. vs Prés.	Abs. vs Prés.	Abs. vs Prés.	Non vs Oui	<méd vs >méd	Corr.	
RP ±D														
Durée moyenne	TTS	NS	NS	NS	NS	NS	0,03	NS	0,045	NS	NS	NS	NS	NS
	SA	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
	SC	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Durée max	TTS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
	SA	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
	SC	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
f_{RP}	TTS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
	SA	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
	SC	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	0,03	NS

Tableau 24. Résultats des analyses statistiques de l'impact des pesticides étudiés sur les épisodes de respiration périodique avec et sans désaturation (±D) pendant le sommeil.

NS : non significatif ; LD : limite de détection ; méd : médiane ; Abs. : absence ; Prés. : présence ; Corr. : corrélation ; Isopro. : isoproturon ; Cyper. : cyperméthrine ; f_{RP} : fréquence des épisodes de respiration périodique.

3.3.3.1 Imprégnation foétale aux pesticides

Les analyses ont montré l'existence, tous stades de sommeil confondus, d'une corrélation positive significative entre le niveau d'exposition au DETP et la durée moyenne des RP±D (Figure 47). Par ailleurs, le groupe d'enfants exposés au DMDTP présentait également une durée moyenne des RP±D plus élevée par rapport au groupe non exposé (62,4 s (41,2 – 484,8) et 47,1 s (28,0 – 275,3) respectivement) lorsque les stades de sommeil n'étaient pas séparés dans l'analyse.

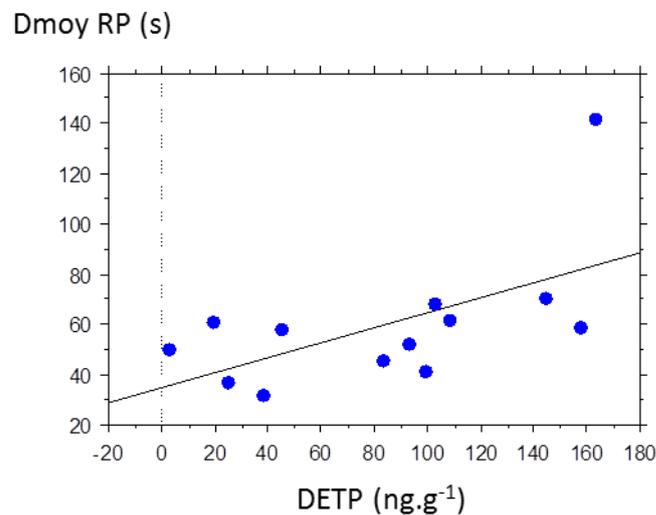


Figure 47. Relation entre le niveau d'exposition au DETP et la durée moyenne des épisodes de respiration périodique (Dmoy RP), tous stades de sommeil confondus.

$p=0,03$; $p=0,6$ dans un test de corrélation de Spearman.

3.3.3.2 Exposition environnementale

Nous n'avons observé aucun effet de la présence d'un champ à proximité du domicile sur la respiration périodique des nouveau-nés.

3.3.3.3 Exposition alimentaire

En SC, nous avons observé que les enfants du groupe $S_{\text{Alim}} > \text{médiane}$ présentaient une fréquence d'épisodes de respiration périodique plus importante comparativement au groupe $S_{\text{Alim}} < \text{médiane}$ (0,6 RP.h⁻¹ (0 – 6,5) et 0 RP. h⁻¹ (0 – 8,1) respectivement).

3.4 Contrôle autonome cardiaque

L'ensemble des résultats des analyses statistiques sur l'impact de l'exposition aux pesticides sur les paramètres temporels et fréquentiels de la variabilité du rythme cardiaque est présenté dans les tableaux 25 et 26.

Valeurs de p		DEP				DETP		DMP	DMDTP	Isopro.	Cyper.	Champ	S _{Alim}	
		<LD vs [LD-méd]	[LD-méd] vs >méd	<LD vs >méd	Corr.	[LD-méd] vs >méd	Corr.	Abs. vs Prés.	Abs. vs Prés.	Abs. vs Prés.	Abs. vs Prés.	Non vs Oui	<méd vs >méd	Corr.
FC	SA	NS	0,02 †	0,045	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
	SC	NS		NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
SDNN	SA	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
	SC	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	0,047	NS	NS
RMSSD	SA	NS	NS	NS	NS	NS	0,04 †	NS	NS	NS	0,002	NS	NS	NS
	SC	NS	NS	NS	NS	NS		NS	NS	NS	0,02	NS	NS	NS
pNN50	SA	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
	SC	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS

Tableau 25. Résultats des analyses statistiques de l'impact des pesticides étudiés sur les paramètres temporels de la variabilité du rythme cardiaque, pendant le sommeil.

NS : non significatif ; LD : limite de détection ; méd : médiane ; Abs. : absence ; Prés. : présence ; Corr. : corrélation de Spearman ; Isopro. : Isoproturon ; Cyper. : Cyperméthrine ; † : SA/SC compactés.

Valeurs de p		DEP				DETP		DMP	DMDTP	Isopro.	Cyper.	Champ	S _{Alim}	
		<LD vs [LD-méd]	[LD-méd] vs >méd	<LD vs >méd	Corr.	[LD-méd] vs >méd	Corr.	Abs. vs Prés.	Abs. vs Prés.	Abs. vs Prés.	Abs. vs Prés.	Non vs Oui	<méd vs >méd	Corr.
VLF (ms ²)	SA	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	0,02	NS	NS
	SC	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	0,01	NS	NS
VLF (%)	SA	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	0,01	NS	NS	NS	NS
	SC	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
LF (ms ²)	SA	NS	NS	NS	NS	0,049[†]	NS	NS	NS	NS	NS	0,047	NS	NS
	SC	NS	NS	NS	NS		NS	NS	NS	NS	NS	0,01	NS	NS
LF (%)	SA	NS	NS	NS	NS	NS	NS	0,02	NS	0,03	NS	NS	NS	NS
	SC	NS	0,02	0,03	NS	NS	NS	NS	NS	NS	0,01	NS	NS	NS
HF (ms ²)	SA	NS	NS	NS	NS	NS	NS	0,03[†]	NS	NS	0,004	NS	NS	NS
	SC	NS	NS	NS	NS	NS	NS		NS	NS	NS	NS	NS	NS
HF (%)	SA	NS	NS	NS	NS	NS	NS	0,03[†]	NS	NS	0,03	0,04	NS	NS
	SC	NS	NS	NS	NS	NS	NS		NS	NS	0,03	NS	NS	NS
LF/HF	SA	NS	NS	NS	NS	NS	NS	0,02	NS	NS	0,01	0,03	NS	NS
	SC	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	0,02		NS	NS

Tableau 26. Résultats des analyses statistiques de l'impact des pesticides étudiés sur les paramètres fréquentiels de la variabilité du rythme cardiaque, pendant le sommeil.

NS : non significatif ; LD : limite de détection ; méd : médiane ; Abs. : absence ; Prés. : présence ; Corr. : corrélation de Spearman ; Isopro. : isoproturon ; Cyper. : cyperméthrine ; † : SA/SC compactés.

3.4.1.1 Imprégnation fœtale aux pesticides

Les résultats ont révélé une influence de l'imprégnation fœtale aux pesticides sur les paramètres temporels et fréquentiels de la variabilité du rythme cardiaque.

Pour les paramètres temporels, la fréquence cardiaque était significativement plus élevée chez les enfants fortement exposés (groupe >Médiane) au DEP (160,7 bpm (155,3 – 169)) comparativement aux enfants non exposés (groupe <LD) (153 bpm (147,8 – 164,4)). Cet effet n'a été retrouvé qu'en SA (Figure 48A). Le seul autre paramètre temporel affecté par la présence de pesticides était la RMSSD. Ce paramètre était significativement plus élevé chez les enfants exposés à la cyperméthrine que chez les enfants non exposés, en SA (exposés : 13,2 ms (7,6 – 22,1) vs non exposés : 6,8 ms (4,7 – 10)) comme en SC (exposés : 9,8 ms (5,4 – 16,6) vs non exposés : 6 ms (2,6 – 10,7)) (Figure 48B). Le même effet a également été observé pour l'exposition au DMP mais uniquement lorsque les valeurs de SA et SC étaient regroupées dans l'analyse statistique (exposés : 9,9 ms (2,6 – 16,2) vs non exposés : 6,8 ms (2,9 – 22,1)). La pNN50 en SA tendait à être plus élevée en présence de cyperméthrine ($p=0,054$).

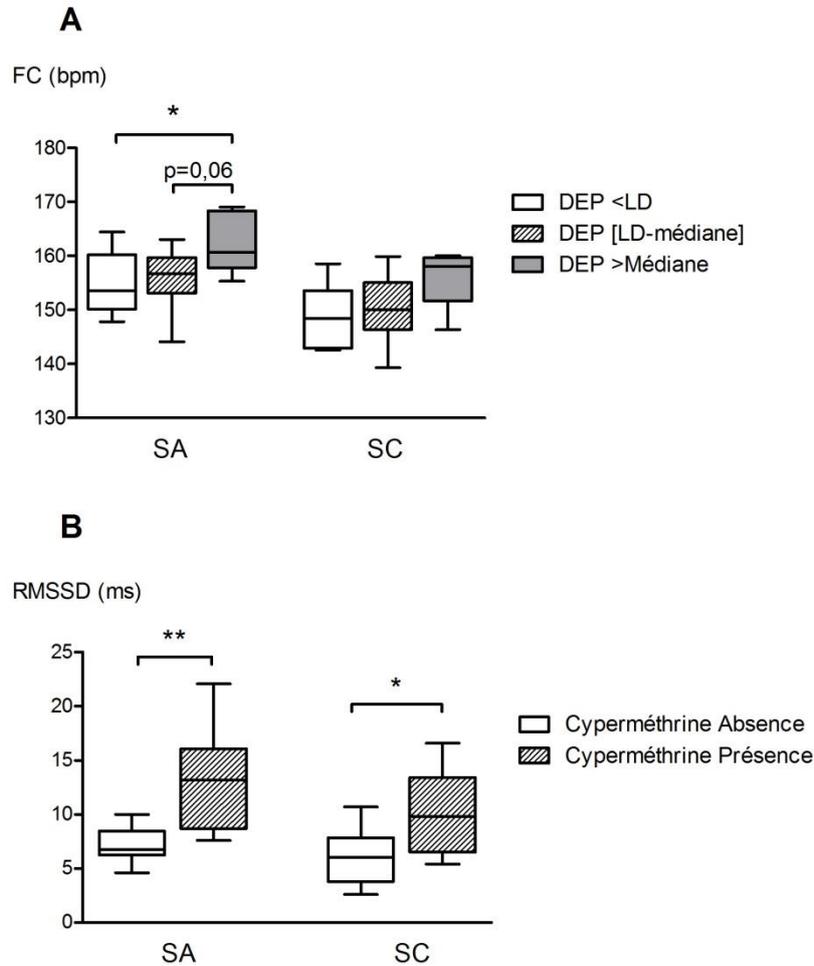


Figure 48. Effet de l'exposition *in utero* au DEP sur la FC (A). Effet de la cyperméthrine sur RMSSD (B).

* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$. FC : fréquence cardiaque ; RMSSD : Racine carrée des différences au carré des intervalles RR successifs ; LD : limite de détection ; SA : sommeil agité ; SC : sommeil calme.

L'exposition *in utero* aux pesticides entraînant également un impact sur les paramètres fréquentiels de la variabilité du rythme cardiaque. En SA, les valeurs relatives de puissance dans les très basses fréquences (VLF) étaient significativement plus faibles dans le groupe exposé à l'isoproturon (54,2% (43,1 – 62,5)) comparativement au groupe non exposé (60,7% (54,5 – 67,8)) (Figure 49A).

Nous avons observé que les valeurs relatives de puissance dans les basses fréquences (LF) (LF%), étaient influencées par plusieurs pesticides avec des résultats hétérogènes. En effet, LF% était significativement plus faible dans les groupes exposés, en SA pour le DMP

(exposés : 17,4% (15,2 – 29,3) vs non exposés : 28% (17,7 – 35,3)) et en SC pour la cyperméthrine (exposés : 28% (18,3 – 36) vs non exposés : 36,9% (28,2 – 52)). À l'inverse, LF% était significativement plus élevée dans les groupes exposés, en SA pour l'isoproturon (exposés : 29% (17,4 – 29) vs non exposés : 20% (15,2 – 32,3)) et en SC pour le DEP (>Médiane : 39,3% (36 – 45,6) vs <LD : 32,9% (26 – 44,1) ; >Médiane vs [LD-médiane] : 29,2% (23,6 – 37,4)) (Figure 49B).

De plus, les nouveau-nés exposés à la cyperméthrine présentaient des valeurs relatives (HF%) et absolues (HFabs) de puissance dans les hautes fréquences (HF) plus importantes que les enfants non exposés. Ces effets ont été observés en SA uniquement pour HFabs (exposés : 43,9 ms² (19,4 – 109,6) vs non exposés : 17,8 ms² (5,9 – 49,6)) et dans les deux stades de sommeil pour HF% (SA, exposés : 8,7% (2,6 – 15,5) vs non exposés : 3,3% (1,1 – 12,2) ; SC, exposés : 12,3% (5,4 – 29,3) vs non exposés : 5,3% (1,6 – 23,3)) (Figure 49C). Nous avons également observé que lorsque les deux stades de sommeil étaient regroupés, HFabs et HF% étaient plus élevés chez les enfants exposés au DMP (34,1 ms² (2,4 – 62,1) et 10,5% (1,7 – 28,3) respectivement) comparativement aux enfants non exposés au DMP (18,4 ms² (2,2 – 109,6) et 3,9% (1,1 – 18,9)).

Enfin, nous avons observé une influence significative du DMP et de la cyperméthrine sur le rapport LF/HF qui était plus faible dans les groupes exposés par rapport aux groupes non exposés. Ces effets ont été observés en SA uniquement pour le DMP (exposés : 4,7 (1,7 – 9,9) vs non exposés : 9,7 (2,2 – 21,3)) et dans les deux stades de sommeil pour la cyperméthrine (SA, exposés : (4,4 (1,9 – 9,2) vs non exposés : 10 (1,7 – 21,3) ; SC, exposés : 3,5 (2 – 7,8) vs non exposés : 8,8 (1,6 – 22,8)) (Figure 49D).

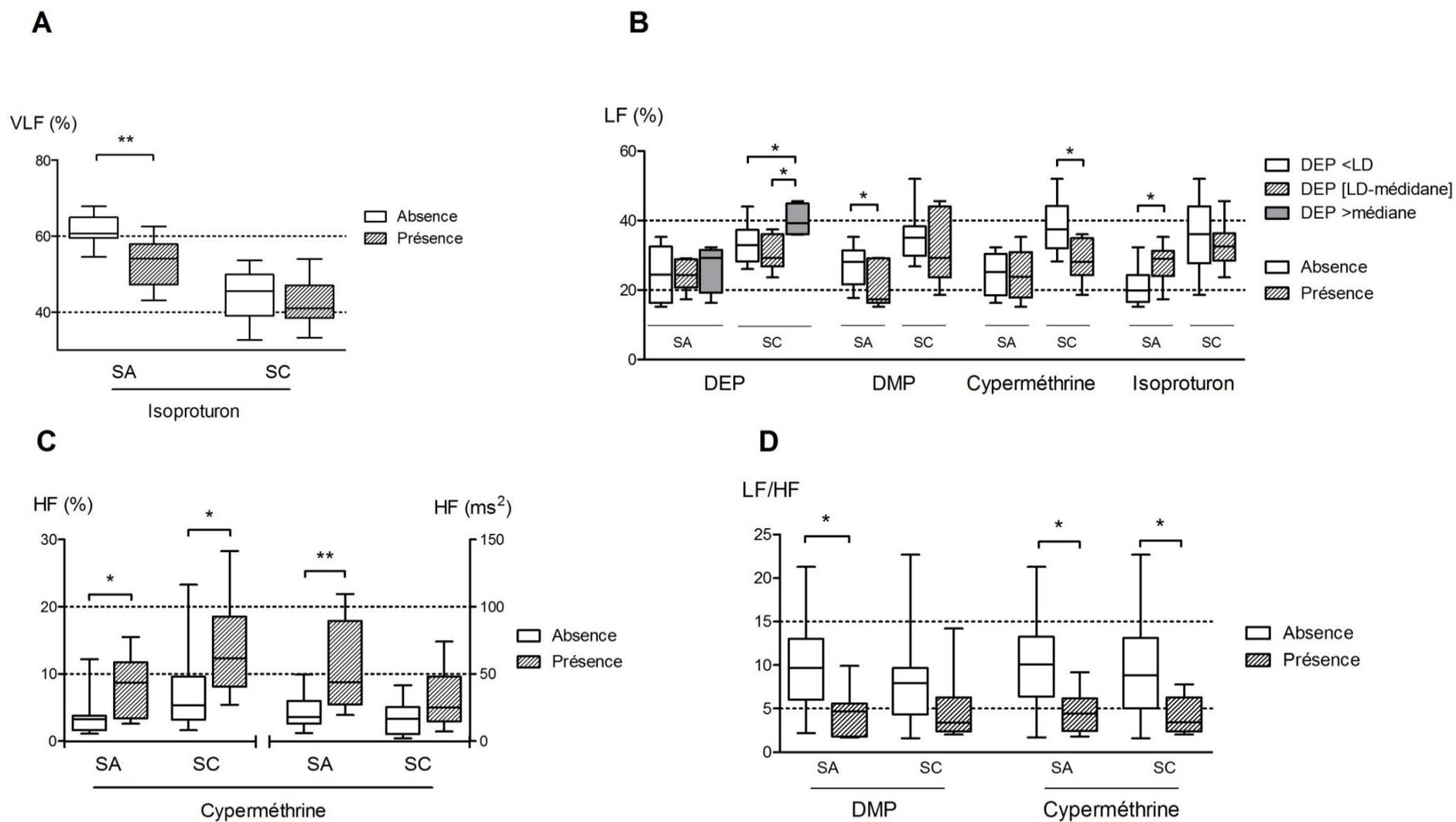


Figure 49. Effet de l'exposition *in utero* sur les paramètres fréquentiels de la variabilité cardiaque. Valeurs relatives de puissance dans les VLF (A), valeurs relatives de puissance dans les LF (B), valeurs relatives et absolues de puissance dans les HF (C) et rapport LF/HF (D).

*p<0,05, **p<0,01. SA : sommeil agité ; SC : sommeil calme ; Isopro. : isoproturon ; LD : limite de détection ; Cyper. : cyperméthrine.

3.4.1.2 Exposition environnementale

Les valeurs des paramètres issus de l'analyse de la variabilité du rythme cardiaque affectés significativement par la domiciliation à proximité d'un champ de culture sont présentées dans le tableau 27. Parmi les paramètres temporels étudiés, seul SDNN était significativement plus élevé en SC lorsque les mères résidaient à moins d'1 km d'un champ cultivé. Pour les paramètres fréquentiels, les valeurs absolues de puissance dans les VLF et les LF étaient significativement plus importantes dans le groupe « champ oui » par rapport au groupe « champ non », aussi bien en SA qu'en SC. La présence d'un champ près du domicile était également associée à une valeur relative de puissance dans les HF plus élevée en SA uniquement. Enfin, bien que le groupe « champ oui » présentait un rapport LF/HF supérieur à celui du groupe « champ non » en SA, cette différence n'atteint pas la significativité ($p=0,053$).

Médiane (min – max)	Champ		Valeur de p	
	Oui	Non		
Paramètres temporels				
SDNN (ms)	SA	10,7 (5,5 – 21,8)	9,1 (6,4 – 16,2)	NS
	SC	7,6 (3,1 – 12,1)	5,1 (2,6 – 9,3)	0,03
Paramètres fréquentiels				
VLF (ms ²)	SA	509,0 (266 – 1339,4)	346,9 (184,0 – 869,7)	0,02
	SC	201,9 (134,3 – 357,4)	66,8 (31,2 – 499,3)	0,01
LF (ms ²)	SA	190,3 (154,0 – 411,5)	152,0 (55,3 – 296,0)	0,05
	SC	107,5 (55,4 – 340,6)	49,0 (29 – 170,4)	0,01
HF (ms ²)	SA	23,8 (11,6 – 93,2)	31,0 (13,1 – 109,6)	NS
	SC	17,9 (9,7 – 52,0)	23,2 (2,4 – 74,0)	NS
VLF (%)	SA	58,2 (45,3 – 63,2)	55,4 (43,1 – 67,8)	NS
	SC	47,2 (33,9 – 55,4)	41,6 (32,7 – 49,0)	NS
LF (%)	SA	25,7 (19,0 – 37,0)	26,6 (15,2 – 36,2)	NS
	SC	31,7 (18,6 – 52,0)	34,8 (23,6 – 45,6)	NS
HF (%)	SA	3,0 (1,6 – 12,1)	4,5 (1,7 – 15,5)	0,04
	SC	5,7 (2,2 – 19,5)	10,8 (3,0 – 28,3)	NS
LF/HF	SA	9,0 (2,0 – 20,3)	5,6 (1,7 – 5,6)	NS
	SC	7,3 (1,1 – 18,9)	4,4 (1,6 – 14,2)	NS

Tableau 27. Effet de l'exposition environnementale sur les paramètres temporels et fréquentiels de la variabilité du rythme cardiaque.

min/max : minimum et maximum ; SA : sommeil agité ; SC : sommeil calme ; NS : non significatif.

3.4.1.3 Exposition alimentaire

Nous n'avons observé aucun effet de l'exposition alimentaire sur les paramètres de la variabilité du rythme cardiaque.

4 Discussion et implications cliniques

De plus en plus d'études s'intéressent au lien pouvant exister entre l'exposition aux pesticides et les paramètres anthropométriques à la naissance (terme, poids, taille...) (Chevrier et al., 2011; Mayhoub et al., 2014; Petit et al., 2010, 2012) ou l'incidence de malformations congénitales telles que les hypospades (Gaspari et al., 2011; Haraux et al., 2016). Cependant, peu d'études chez l'Homme se sont encore intéressées à l'impact de cette exposition sur les fonctions neurophysiologiques. A notre connaissance, notre étude est même la première à montrer un impact de l'exposition prénatale chronique aux pesticides sur le sommeil, la ventilation et le système cardiovasculaire du nouveau-né prématuré.

De façon générale, notre étude met en lumière que l'exposition aux pesticides de la famille des organophosphorés (OP) (DEP, DETP, DMP, DMDTP) semble provoquer le plus d'effets. Des effets sur le sommeil et sa structure, ainsi que sur la ventilation de base et la réponse ventilatoire à un test hypoxique ont notamment été observés. En ce qui concerne les paramètres cardio-ventilatoires, nous avons montré essentiellement un impact des OP sur la fréquence des apnées. Le système cardiovasculaire semble également impacté avec une perturbation du contrôle autonome cardiaque, dont la balance sympatho-vagale. L'impact des pesticides de la famille des pyréthrinoïdes (cyperméthrine dans notre étude) et des phénylurées (isoproturon dans notre travail) apparaissait plus restreint. En effet, dans notre étude, les enfants exposés à la cyperméthrine présentaient des altérations uniquement au niveau du système cardiovasculaire, principalement des perturbations de la balance sympatho-vagale. L'exposition à l'isoproturon était associée à une perturbation du sommeil et du contrôle autonome cardiaque. Nous avons également observé un impact de l'exposition alimentaire aux pesticides sur l'ensemble des fonctions étudiées à l'exception du système cardiovasculaire.

- Organophosphorés

Les nouveau-nés exposés aux OP présentait un temps de sommeil diminué, une modification de l'architecture du sommeil avec une proportion de SA plus faible conjointement à une proportion de SC plus élevée. Un fractionnement du sommeil plus important a été observé chez les nouveau-nés exposés aux OP. Nos résultats rejoignent une étude de Timofeeva et Gordon (2002) montrant une diminution de la durée de sommeil chez des rats adultes exposés à une seule dose d'une substance mère de la famille des OP, le chlorpyrifos. En ce qui concerne l'impact des OP sur la ventilation de base, nos résultats diffèrent en fonction du composé. En effet, nous avons montré que les enfants fortement exposés au DEP présentaient une ventilation plus importante que les enfants non exposés. Cependant, lorsqu'ils présentaient du DMDTP, ces mêmes enfants avaient une ventilation plus faible que les nouveau-nés non exposés. Ce dernier résultat est en accord avec l'étude de Darwiche et al. (2018) dans laquelle des rats présentaient une fréquence respiratoire et un volume courant plus faible à la suite d'une exposition chronique au chlorpyrifos, et par conséquent une ventilation plus faible. Nos résultats ont également montré que l'augmentation de la ventilation en réponse au test hypoxique, était plus faible chez les enfants présentant du DMDTP, mais uniquement en sommeil calme. Ces résultats suggèrent une diminution de la sensibilité des chémorécepteurs périphériques en cas d'exposition à ce type de pesticides. De plus, nous avons mis en évidence que les apnées étaient plus fréquentes lorsque les enfants étaient exposés aux OP. Ces résultats sont cohérents avec ceux de Darwiche et al. (2018) qui suite à une exposition périnatale chronique au chlorpyrifos ont mis en évidence une fréquence des apnées du sommeil plus élevée chez les rats issus de rates exposées.

L'exposition aux OP entraînait également des effets sur les paramètres cardiovasculaires. Chez les nouveau-nés exposés, nous avons observé des valeurs de base de fréquence cardiaque plus fortes que chez les enfants non exposés. Par ailleurs, l'impact de l'exposition aux OP sur les paramètres de la variabilité du rythme cardiaque a de nouveau montré des résultats hétérogènes en fonction des composés. La variabilité à long terme (valeurs relatives de puissance dans les LF) reflet des influences sympathiques majoritairement et parasympathiques dans une moindre mesure, était plus importante en SC chez les enfants exposés au DEP mais plus faible en SA chez les enfants exposés au DMP. Dans ce dernier cas,

on observait en conséquence une diminution de la balance sympatho-vagale en SA, témoignant d'une altération de l'équilibre entre les sorties sympathiques et parasympathiques.

Au vu de nos résultats sur l'impact des OP, nous constatons que ces pesticides pourraient être responsables de la modification de l'activité des fonctions neurophysiologiques étudiées, en raison de leurs propriétés neurotoxiques. Les OP agissent sur l'acétylcholinestérase qui est responsable de la dégradation de l'acétylcholine (ACh). Or, la phosphorylation de cette enzyme par les OP entraîne l'inhibition de son activité et par conséquent l'accumulation d'ACh au niveau des synapses (Fukuto, 1990). L'hyperstimulation initialement engendrée est alors suivie d'une inhibition du système de neurotransmission cholinergique alors que celui-ci est impliqué dans la régulation des états de veille/sommeil ou l'activité des chémorécepteurs centraux et périphériques. De plus, les OP pourraient agir sur le sommeil et le contrôle cardiovasculaire de façon indirecte car l'ACh peut également agir sur la libération d'un autre neurotransmetteur également impliqué dans ces fonctions, la noradrénaline. En effet, l'ACh et la noradrénaline sont les neurotransmetteurs des neurones pré- et post-ganglionnaire sympathique et parasympathique impliqués dans la vasoconstriction des vaisseaux du cœur et le contrôle de la durée du cycle cardiaque (Bucchi et al., 2007; Silvani et al., 2016) pouvant donc être avancés pour expliquer l'effet observé sur la variabilité cardiaque dans notre étude.

Notre travail est le premier à s'intéresser à l'impact des pesticides sur le sommeil, la sensibilité des CRP à travers l'étude de la réponse ventilatoire à l'hypoxie et le système cardiovasculaire des nouveau-nés prématurés. Il est difficile au vu de nos seules données, d'expliquer les résultats hétérogènes observés au sein d'une même famille de pesticides. Toutefois, différentes hypothèses peuvent être avancées. Une interaction entre l'action de ces composés et l'influence des stades de sommeil n'est pas à exclure pour interpréter ces résultats peu cohérents car l'effet du DEP sur la ventilation (plus élevée chez les enfants exposés) a été observé en SC alors que l'effet inverse du DMDTP était observé en SA. Des études ont en effet montré que les structures supra-pontiques peuvent influencer l'activité des neurones du tronc cérébral et par conséquent perturber les informations en provenance des structures périphériques (Bach et al., 2002; Chardon et al., 2004b). La dose de l'exposition est une autre hypothèse expliquant nos résultats divergents. Il est connu depuis

longtemps dans la littérature que les effets des substances chimiques dépendent de la dose à laquelle l'organisme est exposé. A titre d'exemple, des études sur l'effet de la nicotine ont montré qu'à faible dose la nicotine stimulait la prolifération cellulaire contrairement à une forte dose qui était cytotoxique (Park et al., 2008; Villablanca, 1998). Néanmoins, nos résultats ne nous permettent pas de confirmer cette hypothèse car nous avons pu quantifier le DEP mais pas le DMDTP.

- Pyréthriinoïdes

Dans ce travail, l'étude de l'impact des pyréthriinoïdes représentés par la cyperméthrine, a permis de mettre en évidence leur influence sur le système cardiovasculaire. De plus, la variabilité à court terme du rythme cardiaque (RMSSD, valeurs absolues et relatives de puissance dans les HF), reflet des influences parasympathiques, chez les enfants exposés à la cyperméthrine était plus forte. En parallèle, la variabilité à long terme du rythme cardiaque était plus faible chez les enfants exposés. Ceci témoigne une nouvelle fois d'une altération de l'équilibre entre les influences nerveuses sympathiques et parasympathiques par la diminution de la balance sympatho-vagale chez les enfants exposés à la cyperméthrine. Ces résultats peuvent être mis en lien avec l'étude réalisée par Laugeray et al. (2017). Dans cette étude, il a été démontré que les souris exposées de façon chronique à la cyperméthrine étaient plus sensibles au stress face à différents challenges. Ils ont également observé un impact négatif de la cyperméthrine sur le développement des motoneurones de ces souris. Or, le système nerveux autonome, une des parties motrices du système nerveux périphérique est responsable du maintien de l'homéostasie notamment en situation de stress. Nos résultats montrant un déséquilibre de la balance sympatho-vagale pourraient donc venir en complément des observations des travaux de Laugeray et al. (2017). Une explication serait que les pyréthriinoïdes pourraient perturber la propagation des signaux neuronaux en agissant sur les canaux sodiques au niveau de la membrane cellulaire des neurones. En effet, ils prolongeraient l'activation de ces canaux en les maintenant ouverts. La série d'influx électriques au niveau des neurones qui en résulterait serait responsable de leur dépolarisation et de l'état d'hyperexcitabilité des cellules neuronales à l'origine des dysfonctionnements observés.

- Exposition alimentaire

Tout comme les organophosphorés, l'exposition alimentaire a engendré de nombreux effets. Nos résultats ont mis en évidence une influence de l'exposition alimentaire sur la structure du sommeil et les paramètres ventilatoires. Tout d'abord, nous avons observé une corrélation positive entre l'exposition aux pesticides par la voie alimentaire et la fréquence de survenue des épisodes de veille intra-sommeil. Ce résultat est en accord avec la diminution du temps de sommeil des nouveau-nés exposés à l'isoproturon et au DMP. Deuxièmement, la ventilation des nouveau-nés en normoxie et l'augmentation de la ventilation en réponse au test hypoxique, étaient plus faibles lorsque la maman était plus fortement exposée aux pesticides par l'alimentation. Ces résultats sont identiques à ceux des nouveau-nés exposés au DMDTP. Ils pourraient être expliqués par le rapport d'étude de l'alimentation totale française (Anses, 2011) qui a montré que les pesticides les plus fréquemment détectés dans l'alimentation étaient les substances de la famille des OP et des carbamates. Toutefois, en ce qui concerne les apnées du sommeil tous types confondus, celles-ci étaient moins fréquentes chez les enfants dont les mamans étaient les plus exposées aux résidus de pesticides par la voie alimentaire. Enfin, aucun effet de l'exposition alimentaire sur les paramètres de la variabilité du rythme cardiaque n'a été observé. Ces derniers résultats diffèrent de ceux cités précédemment sur l'impact des OP sur les apnées. Les différences que nous observons suite aux analyses statistiques entre les effets des pesticides pris individuellement et les effets de l'exposition par la voie alimentaire peuvent s'expliquer par le score alimentaire. En effet, ce score est le reflet d'un effet « cocktail » des pesticides dont la nature chimique, la famille et la forme ne peuvent pas être connues. Il est aussi le témoin d'une seule voie d'exposition des mamans interrogées. De plus, bien que le calcul soit basé sur des données connues de la quantité de résidus de pesticides dans l'alimentation, il ne s'agit que d'estimations et il faut tout de même les considérer avec prudence lorsque les résultats qui en découlent sont comparés à ceux des dosages dans le méconium. Enfin, le calcul du score se réfère aux réponses au questionnaire données par les mères, un risque de sur- ou de sous-estimation de l'exposition ne peut donc pas être écarté.

- Exposition environnementale

La domiciliation à proximité d'un champ de culture dans la présente étude était associée à des épisodes de désaturation plus longs, ainsi qu'une variabilité à long et très long terme du rythme cardiaque plus élevée (valeurs absolues de puissances dans les LF et VLF) qu'en l'absence de champ. Aucun effet sur le sommeil, la ventilation et son contrôle, les apnées et les épisodes de respiration périodique n'a été observé. Ces résultats diffèrent de l'exposition alimentaire aux pesticides, mais il est difficile de comparer les effets observés car de nombreuses différences séparent ces deux méthodes d'évaluation. Dans le cas de l'exposition environnementale, il s'agit non seulement de pesticides différents mais aussi d'une autre voie de pénétration des pesticides (voie pulmonaire par inhalation) Ceci engendre forcément des cinétiques et des dynamiques toxiques différentes (distribution, métabolisation, mécanismes d'action). L'interprétation des résultats de l'exposition environnementale évaluée uniquement par la présence ou non d'un champ de culture à moins d'1 km est également à considérer avec précaution. Cette information reste néanmoins importante puisque 95% des pesticides répandus en France sont utilisés à des fins agricoles. Le recueil de données sur la qualité de l'air, en fonction de la localisation du domicile par exemple, pourrait permettre d'évaluer cette exposition avec plus de précision. Néanmoins, dans la littérature, il n'est pas rare que l'exposition environnementale soit évaluée à l'aide d'un seul facteur tel que la domiciliation en milieu rural ou urbain (Nurminen, 1995).

Notre étude est la première à associer dosage des pesticides dans le méconium et questionnaire d'exposition. Cela a permis de réaliser une analyse fine et poussée et de montrer des différences entre les enfants exposés et non exposés. Notre travail comporte toutefois des limites méthodologiques qui pourraient dans une certaine mesure expliquer la disparité de certains résultats. En effet, la technique de dosage utilisée est unique pour toutes les familles de pesticides étudiées et par conséquent pourrait ne pas être optimale à chacune des substances (*cf.* chapitre 4). Le petit effectif étudié dans notre travail est également un élément qui aurait peut-être permis d'observer d'autres effets, une augmentation du nombre de nouveau-nés permettrait d'augmenter la puissance de nos tests statistiques. Enfin, la technique d'analyse de la réponse ventilatoire à l'hypoxie a été

développée et validée pour la première fois lors de ce travail (Kouakam et al., 2017), elle nécessiterait d'être utilisée de manière répétée dans le futur pour confirmer nos résultats.

L'ensemble de nos résultats suggèrent un impact de l'exposition aux pesticides sur le sommeil, sur la ventilation et son contrôle, ainsi que sur la fonction cardiovasculaire. La population étudiée dans notre étude est celle de nouveau-nés prématurés et nos résultats témoignent d'une vulnérabilité innée de ces enfants qui pourrait être exacerbée lors d'une exposition aux pesticides pendant la vie fœtale. La perturbation de la fonction hypnique pourrait entraîner des répercussions à court terme, car le sommeil est primordial pour le développement neurophysiologique des nouveau-nés prématurés et la maturation de nombreuses structures nerveuses tels que les chémorécepteurs. Les apnées centrales et les désaturations au cours du sommeil reflètent l'instabilité ventilatoire souvent observée chez les nouveau-nés prématurés et représentent un facteur de risque important pouvant mettre en jeu la vie des enfants. Les nouveau-nés, de par leur prématurité, sont plus exposés à certains événements cardio-ventilatoires. L'impact de l'exposition aux pesticides pendant la grossesse sur l'activité des CRP pourrait augmenter le risque de troubles ventilatoires au cours du sommeil des nouveau-nés, particulièrement en cas de stress hypoxique car les enfants pourraient être dans l'incapacité d'adapter leur ventilation de façon appropriée. De plus, les différentes fonctions étudiées étant étroitement liées, les ajustements cardiovasculaires qui accompagnent ces réactions protectrices pourraient également être inadéquats voire absents. Enfin, de plus en plus d'études s'intéressant à l'impact des pesticides, suggèrent des effets négatifs à long terme sur le neuro-développement (QI, langage...) (Bouchard et al., 2011; Eskenazi et al., 2007; Rauh et al., 2011). Nos résultats pourraient être les premiers signes de ces manifestations à plus long terme. Ce qui rejoint le concept des 1000 premiers jours de vie, qui s'appuie sur des observations ayant mis en lumière l'existence de liens entre diverses expositions pendant la vie fœtale et la survenue de maladies chroniques à l'âge adulte.

Conclusion générale

Pendant la grossesse, le fœtus est exposé à de nombreuses substances chimiques. L'exposition aux pesticides pendant cette période cruciale pour la croissance et le développement cérébral pourrait représenter un risque pour l'intégrité et la mise en place des principales fonctions neurovégétatives assurant le maintien de l'homéostasie du nouveau-né.

Dans ce travail, l'exposition chronique prénatale aux pesticides a été évaluée par questionnaire d'exposition maternelle, ainsi que par le dosage de pesticides dans le méconium des nouveau-nés. Dans l'étude 1, l'analyse des questionnaires a permis de caractériser l'exposition professionnelle, alimentaire, domestique et environnementale des mamans participant à l'étude. Cette analyse révèle que les mamans seraient principalement exposées aux pesticides par la voie alimentaire. L'évaluation par questionnaire est toutefois soumise à un risque de sous déclaration de la part des mamans, à l'absence de réponse à certaines questions, et ne permet pas toujours une quantification précise de l'exposition. L'utilisation de données sur les résidus de pesticides dans l'air en fonction de la domiciliation serait un élément permettant d'augmenter la fiabilité des données sur l'exposition environnementale. En ce sens, CartoExpo un projet en cours de réalisation au sein du laboratoire, vise à développer un Système d'Informations Géographiques, qui permettra de cartographier les expositions en fonction du lieu de résidence.

En complément des questionnaires, l'évaluation de l'imprégnation fœtale aux pesticides a été réalisée dans le méconium à l'aide d'une technique innovante permettant le dosage simultané de plusieurs familles de pesticides. Les pesticides les plus fréquemment détectés dans notre étude étaient de la famille des organophosphorés (uniquement leurs métabolites, DEP : 66,7% et DETP : 100%). 58,3% des méconiums contenaient 3 ou 4 substances. Pour de futures études, il serait intéressant d'avoir recours à une technique de dosage adaptée aux propriétés physicochimiques de chaque famille de pesticide. De cette façon, l'évaluation de l'imprégnation fœtale pourrait être encore plus fine en raison de l'augmentation de l'efficacité de l'extraction des pesticides.

Etant donné les propriétés neurotoxiques de certains pesticides, nous avons étudié leur impact sur des fonctions essentielles telles que le sommeil, la ventilation et son contrôle ainsi que le système cardiovasculaire (Etude 2). En ce qui concerne la fonction hypnique, cette étude a permis de montrer que l'exposition des nouveau-nés aux organophosphorés entraînait une perturbation de la structure du sommeil. Les enfants présentant du DMP ou de l'isoproturon dans leur méconium avaient une diminution de 7% et de 5% respectivement du temps de sommeil. Les enfants exposés au DEP présentaient une proportion de sommeil agité diminuée (-16%) conjointement à une augmentation de la proportion de sommeil calme (+25%). Les enfants dont les mères étaient fortement exposées par la voie alimentaire présentaient également des réveils plus fréquents. La ventilation de base était plus élevée chez les enfants exposés au DEP (+18%), en revanche elle était plus faible lorsqu'ils étaient exposés au DMDTP (-14%) et lorsque le score d'exposition alimentaire était élevé.

Les chémorécepteurs périphériques sont des structures impliquées dans le contrôle chimique de la ventilation et informent en permanence les centres nerveux bulbo-pontiques de la respiration sur la teneur en O₂ du sang artériel. L'activité de ces structures a été évaluée par l'augmentation de la ventilation consécutive à un test hypoxique, développé et validé lors de ce travail. Notre étude a montré que la réponse ventilatoire était plus faible chez les enfants exposés au DMDTP et dont les mamans étaient le plus exposées aux résidus de pesticides par l'alimentation. Nos résultats ont montré que l'exposition aux pesticides pourrait également influencer l'activité du système nerveux autonome par le déséquilibre de la balance sympatho-vagale. Une altération des mécanismes permettant d'assurer les ajustements ventilatoires et cardiovasculaires nécessaires pour une réaction optimale de l'organisme face à des challenges cardiorespiratoires, pourrait placer les nouveau-nés dans une situation à risque.

Des actions de sensibilisation et de prévention à destination des femmes enceintes en vue de limiter leur exposition est à envisager. En particulier, ces actions pourraient être orientées sur l'alimentation qui représente une piste à exploiter car elle représente une voie majeure d'exposition à de nombreux pesticides, pour laquelle nous avons observé de nombreux effets.

Bibliographie

- Adamson, S.L. (1991). Regulation of breathing at birth. *J. Dev. Physiol.* *15*, 45–52.
- Aizad, T., Bodani, J., Cates, D., Horvath, L., and Rigatto, H. (1984). Effect of a single breath of 100% oxygen on respiration in neonates during sleep. *J. Appl. Physiol.* *57*, 1531–1535.
- Bach, V., Telliez, F., and Libert, J.P. (2002). The interaction between sleep and thermoregulation in adults and neonates. *Sleep Med. Rev.* *6*, 481–492.
- Bairam, A., and Carroll, J.L. (2005). Neurotransmitters in carotid body development. *Respir. Physiol. Neurobiol.* *149*, 217–232.
- Ballantyne, D., and Scheid, P. (2000). Mammalian brainstem chemosensitive neurones: linking them to respiration in vitro. *J. Physiol.* *525 Pt 3*, 567–577.
- Barillot, J.C., Grélot, L., Reddad, S., and Bianchi, A.L. (1990). Discharge patterns of laryngeal motoneurons in the cat: an intracellular study. *Brain Res.* *509*, 99–106.
- Barnes, P.J. (1995). Is asthma a nervous disease? The Parker B. Francis Lectureship. *Chest* *107*, 119S-125S.
- Barr, D.B., Barr, J.R., Maggio, V.L., Whitehead, R.D., Sadowski, M.A., Whyatt, R.M., and Needham, L.L. (2002). A multi-analyte method for the quantification of contemporary pesticides in human serum and plasma using high-resolution mass spectrometry. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life. Sci.* *778*, 99–111.
- Barrington, K.J., and Finer, N.N. (1990). Periodic Breathing and Apnea in Preterm Infants. *Pediatr. Res.* *27*, 118–121.
- Barrington, K.J., Tan, K., and Rich, W. (2002). Apnea at discharge and gastro-esophageal reflux in the preterm infant. *J. Perinatol. Off. J. Calif. Perinat. Assoc.* *22*, 8–11.
- Bellingham, M.C. (1998). Driving respiration: the respiratory central pattern generator. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* *25*, 847–856.
- Berkowitz, A., Sutton, L., Janowsky, D.S., and Gillin, J.C. (1990). Pilocarpine, an orally active muscarinic cholinergic agonist, induces REM sleep and reduces delta sleep in normal volunteers. *Psychiatry Res.* *33*, 113–119.
- Berry, R.B., Budhiraja, R., Gottlieb, D.J., Gozal, D., Iber, C., Kapur, V.K., Marcus, C.L., Mehra, R., Parthasarathy, S., Quan, S.F., et al. (2012). Rules for scoring respiratory events in sleep: update of the 2007 AASM Manual for the Scoring of Sleep and Associated Events. Deliberations of the Sleep Apnea Definitions Task Force of the American Academy of Sleep Medicine. *J. Clin. Sleep Med. JCSM Off. Publ. Am. Acad. Sleep Med.* *8*, 597–619.

- Berterottière, D., D'Allest, A.M., Dehan, M., and Gaultier, C. (1990). Effects of increase in body temperature on the breathing pattern in premature infants. *J. Dev. Physiol.* *13*, 303–308.
- Berton, T., Mayhoub, F., Chardon, K., Duca, R.-C., Lestremau, F., Bach, V., and Tack, K. (2014). Development of an analytical strategy based on LC-MS/MS for the measurement of different classes of pesticides and their metabolites in meconium: application and characterisation of foetal exposure in France. *Environ. Res.* *132*, 311–320.
- Bertrand, F., and Hugelin, A. (1971). Respiratory synchronizing function of nucleus parabrachialis medialis: pneumotoxic mechanisms. *J. Neurophysiol.* *34*, 189–207.
- Bester, H., Besson, J.M., and Bernard, J.F. (1997). Organization of efferent projections from the parabrachial area to the hypothalamus: a Phaseolus vulgaris-leucoagglutinin study in the rat. *J. Comp. Neurol.* *383*, 245–281.
- Bianchi, A.L. (1971). [Localization and study of respiratory medullary neurons. Antidromic starting by spinal cord or vagal stimulation]. *J. Physiol. (Paris)* *63*, 5–40.
- Bianchi, A.L., Grélot, L., Iscoe, S., and Remmers, J.E. (1988). Electrophysiological properties of rostral medullary respiratory neurones in the cat: an intracellular study. *J. Physiol.* *407*, 293–310.
- Bianchi, A.L., Denavit-Saubié, M., and Champagnat, J. (1995). Central control of breathing in mammals: neuronal circuitry, membrane properties, and neurotransmitters. *Physiol. Rev.* *75*, 1–45.
- Bielawski, D., Ostrea, E., Posecion, N., Corrion, M., and Seagraves, J. (2005). Detection of Several Classes of Pesticides and Metabolites in Meconium by Gas Chromatography-Mass Spectrometry. *Chromatographia* *62*, 623–629.
- Blanco, C.E., Dawes, G.S., Hanson, M.A., and McCooke, H.B. (1984). The response to hypoxia of arterial chemoreceptors in fetal sheep and new-born lambs. *J. Physiol.* *351*, 25–37.
- Blanco, C.E., Martin, C.B., Hanson, M.A., and McCooke, H.B. (1987). Breathing activity in fetal sheep during mechanical ventilation of the lungs in utero. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* *26*, 175–182.
- Bland, J.M., and Altman, D.G. (1986). Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. *Lancet Lond. Engl.* *1*, 307–310.
- Bolton, D.P., and Herman, S. (1974). Ventilation and sleep state in the new-born. *J. Physiol.* *240*, 67–77.
- Bottini, P., and Tantucci, C. (2003). Sleep apnea syndrome in endocrine diseases. *Respir. Int. Rev. Thorac. Dis.* *70*, 320–327.
- Bouchard, M.F., Chevrier, J., Harley, K.G., Kogut, K., Vedar, M., Calderon, N., Trujillo, C., Johnson, C., Bradman, A., Barr, D.B., et al. (2011). Prenatal exposure to organophosphate pesticides and IQ in 7-year-old children. *Environ. Health Perspect.* *119*, 1189–1195.

- Bouferrache, B., Filtchev, S., Leke, A., Marbaix-Li, Q., Freville, M., and Gaultier, C. (2000). The hyperoxic test in infants reinvestigated. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* *161*, 160–165.
- Bouvier, G., Seta, N., Vigouroux-Villard, A., Blanchard, O., and Momas, I. (2005). Insecticide urinary metabolites in nonoccupationally exposed populations. *J. Toxicol. Environ. Health B Crit. Rev.* *8*, 485–512.
- Bouvier, G., Blanchard, O., Momas, I., and Seta, N. (2006). Pesticide exposure of non-occupationally exposed subjects compared to some occupational exposure: a French pilot study. *Sci. Total Environ.* *366*, 74–91.
- Boyd, J.D., and Hamilton, W.J. (1967). Development and structure of the human placenta from the end of the 3rd month of gestation. *J. Obstet. Gynaecol. Br. Commonw.* *74*, 161–226.
- Brady, J.P., and Ceruti, E. (1966). Chemoreceptor reflexes in the new-born infant: effects of varying degrees of hypoxia on heart rate and ventilation in a warm environment. *J. Physiol.* *184*, 631–645.
- Bruce, E.N., and Cherniack, N.S. (1987). Central chemoreceptors. *J. Appl. Physiol. Bethesda Md* *1985* *62*, 389–402.
- Bucchi, A., Baruscotti, M., Robinson, R.B., and DiFrancesco, D. (2007). Modulation of rate by autonomic agonists in SAN cells involves changes in diastolic depolarization and the pacemaker current. *J. Mol. Cell. Cardiol.* *43*, 39–48.
- Bureau, M.A., Lamarche, J., Foulon, P., and Dalle, D. (1985). Postnatal maturation of respiration in intact and carotid body-chemodenervated lambs. *J. Appl. Physiol. Bethesda Md* *1985* *59*, 869–874.
- Burguet, A., Berard, M., Woronoff, A.S., Roth, P., Menetrier, M., Vanlemmens, P., Schaal, J.P., and Menget, A. (2001). [An appreciation of maternal smoking with high-performance liquid chromatographic determination of maternal and neonatal urinary cotinine]. *J. Gynecol. Obstet. Biol. Reprod. (Paris)* *30*, 166–173.
- Buzsaki, G., Bickford, R.G., Ponomareff, G., Thal, L.J., Mandel, R., and Gage, F.H. (1988). Nucleus basalis and thalamic control of neocortical activity in the freely moving rat. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *8*, 4007–4026.
- Canet, E., Praud, J.P., Laberge, J.M., Blanchard, P.W., and Bureau, M.A. (1993). Apnea threshold and breathing rhythmicity in newborn lambs. *J. Appl. Physiol. Bethesda Md* *1985* *74*, 3013–3019.
- Canet, E., Praud, J.P., and Bureau, M.A. (1997). Periodic breathing induced on demand in awake newborn lamb. *J. Appl. Physiol. Bethesda Md* *1985* *82*, 607–612.
- Chardon, K., Telliez, F., Bach, V., Leke, A., Delanaud, S., Bouferrache, B., Libert, J.-P., and Gaultier, C. (2004a). Effects of warm and cool thermal conditions on ventilatory responses to hyperoxic test in neonates. *Respir. Physiol. Neurobiol.* *140*, 145–153.

- Chardon, K., Bach, V., Telliez, F., Cardot, V., Tourneux, P., Leke, A., and Libert, J.-P. (2004b). Effect of caffeine on peripheral chemoreceptor activity in premature neonates: interaction with sleep stages. *J. Appl. Physiol. Bethesda Md* 1985 *96*, 2161–2166.
- Cherniack, N.S., Longobardo, G.S., Levine, O.R., Mellins, R., and Fishman, A.P. (1966). Periodic breathing in dogs. *J. Appl. Physiol.* *21*, 1847–1854.
- Cheung, P.Y., Barrington, K.J., Finer, N.N., and Robertson, C.M. (1999). Early childhood neurodevelopment in very low birth weight infants with pre-discharge apnea. *Pediatr. Pulmonol.* *27*, 14–20.
- Chevrier, C., Limon, G., Monfort, C., Rouget, F., Garlantézec, R., Petit, C., Durand, G., and Cordier, S. (2011). Urinary biomarkers of prenatal atrazine exposure and adverse birth outcomes in the PELAGIE birth cohort. *Environ. Health Perspect.* *119*, 1034–1041.
- Clairambault, J., Curzi-Dascalova, L., Kauffmann, F., Médigue, C., and Leffler, C. (1992). Heart rate variability in normal sleeping full-term and preterm neonates. *Early Hum. Dev.* *28*, 169–183.
- Cohen, G., Malcolm, G., and Henderson-Smart, D. (1997). Ventilatory response of the newborn infant to mild hypoxia. *Pediatr. Pulmonol.* *24*, 163–172.
- Conde, S.V., and Monteiro, E.C. (2006). Profiles for ATP and adenosine release at the carotid body in response to O₂ concentrations. *Adv. Exp. Med. Biol.* *580*, 179–184; discussion 351–359.
- Curzi-Dascalova, L., and Christova-Guéorguieva, E. (1983). Respiratory pauses in normal prematurely born infants. A comparison with full-term newborns. *Biol. Neonate* *44*, 325–332.
- Curzi-Dascalova, L., and Mirmiran, M. (1996). Manuel des techniques d'enregistrement et d'analyse des stades de sommeil et de veille chez le prématuré et le nouveau-né à terme = Manual of methods for recording and analyzing sleep-wakefulness states in preterm and full-term infant (Paris: Editions INSERM).
- Curzi-Dascalova, L., Christova-Guéorguieva, L., Lebrun, F., and Firtion, G. (1984). Respiratory pauses in very low risk prematurely born infants reaching normal term. A comparison to full-term newborns. *Neuropediatrics* *15*, 13–17.
- Curzi-Dascalova, L., Peirano, P., and Morel-Kahn, F. (1988). Development of sleep states in normal premature and full-term newborns. *Dev. Psychobiol.* *21*, 431–444.
- Curzi-Dascalova, L., Christova, E., Peirano, P., Singh, B.B., Gaultier, C., and Vicente, G. (1989). Relationship between respiratory pauses and heart rate during sleep in normal premature and full-term newborns. *J. Dev. Physiol.* *11*, 323–330.
- Curzi-Dascalova, L., Bloch, J., Vecchierini, M., Bedu, A., and Vignolo, P. (2000). Physiological parameters evaluation following apnea in healthy premature infants. *Biol. Neonate* *77*, 203–211.

- Czeizel, A.E., Petik, D., and Puho, E. (2004). Smoking and alcohol drinking during pregnancy. The reliability of retrospective maternal self-reported information. *Cent. Eur. J. Public Health* *12*, 179–183.
- Dampney, R.A.L. (2016). Central neural control of the cardiovascular system: current perspectives. *Adv. Physiol. Educ.* *40*, 283–296.
- Darnall, R.A., Ariagno, R.L., and Kinney, H.C. (2006). The late preterm infant and the control of breathing, sleep, and brainstem development: a review. *Clin. Perinatol.* *33*, 883–914; abstract x.
- Darwiche, W., Gay-Quéheillard, J., Delanaud, S., El Khayat El Sabbouri, H., Khachfe, H., Joumaa, W., Bach, V., and Ramadan, W. (2018). Impact of chronic exposure to the pesticide chlorpyrifos on respiratory parameters and sleep apnea in juvenile and adult rats. *PloS One* *13*, e0191237.
- Dejours, P. (1962). Chemoreflexes in breathing. *Physiol. Rev.* *42*, 335–358.
- Dobbins, E.G., and Feldman, J.L. (1994). Brainstem network controlling descending drive to phrenic motoneurons in rat. *J. Comp. Neurol.* *347*, 64–86.
- Doyle, O.M., Korotchikova, I., Lightbody, G., Marnane, W., Kerins, D., and Boylan, G.B. (2009). Heart rate variability during sleep in healthy term newborns in the early postnatal period. *Physiol. Meas.* *30*, 847–860.
- Eden, G.J., and Hanson, M.A. (1987). Effects of chronic hypoxia from birth on the ventilatory response to acute hypoxia in the newborn rat. *J. Physiol.* *392*, 11–19.
- Eiselt, M., Curzi-Dascalova, L., Clairambault, J., Kauffmann, F., Médigue, C., and Peirano, P. (1993). Heart-rate variability in low-risk prematurely born infants reaching normal term: a comparison with full-term newborns. *Early Hum. Dev.* *32*, 183–195.
- Eskenazi, B., Marks, A.R., Bradman, A., Harley, K., Barr, D.B., Johnson, C., Morga, N., and Jewell, N.P. (2007). Organophosphate pesticide exposure and neurodevelopment in young Mexican-American children. *Environ. Health Perspect.* *115*, 792–798.
- Fedoroko, L., Duffin, J., and England, S. (1989). Inhibition of inspiratory neurons of the nucleus retroambigualis by expiratory neurons of the Botzinger complex in the cat. *Exp. Neurol.* *106*, 74–77.
- Feldman, J.L., and Del Negro, C.A. (2006). Looking for inspiration: new perspectives on respiratory rhythm. *Nat. Rev. Neurosci.* *7*, 232–242.
- Feldman, J.L., and Gautier, H. (1976). Interaction of pulmonary afferents and pneumotaxic center in control of respiratory pattern in cats. *J. Neurophysiol.* *39*, 31–44.
- Fidone, S.J., Weintraub, S.T., and Stavinoha, W.B. (1976). Acetylcholine content of normal and denervated cat carotid bodies measured by pyrolysis gas chromatography/mass fragmentometry. *J. Neurochem.* *26*, 1047–1049.

- Findley, L.J., Ries, A.L., Tisi, G.M., and Wagner, P.D. (1983). Hypoxemia during apnea in normal subjects: mechanisms and impact of lung volume. *J. Appl. Physiol.* *55*, 1777–1783.
- Finley, J.C., and Katz, D.M. (1992). The central organization of carotid body afferent projections to the brainstem of the rat. *Brain Res.* *572*, 108–116.
- Fitzgerald, R.S., Shirahata, M., and Wang, H.Y. (1999). Acetylcholine release from cat carotid bodies. *Brain Res.* *841*, 53–61.
- Fitzgerald, R.S., Shirahata, M., and Wang, H.Y. (2000). Acetylcholine is released from in vitro cat carotid bodies during hypoxic stimulation. *Adv. Exp. Med. Biol.* *475*, 485–494.
- Flores-Guevara, R., Plouin, P., Curzi-Dascalova, L., Radvanyi, M.F., Guidasci, S., Pajot, N., and Monod, N. (1982). Sleep apneas in normal neonates and infants during the first 3 months of life. *Neuropediatrics* *13 Suppl*, 21–28.
- Franco, P., Chabanski, S., Szliwowski, H., Dramaix, M., and Kahn, A. (2000). Influence of maternal smoking on autonomic nervous system in healthy infants. *Pediatr. Res.* *47*, 215–220.
- Frasch, M.G., Zwiener, U., Hoyer, D., and Eiselt, M. (2007). Autonomic organization of respirocardial function in healthy human neonates in quiet and active sleep. *Early Hum. Dev.* *83*, 269–277.
- Friedman, W.F. (1972). The intrinsic physiologic properties of the developing heart. *Prog. Cardiovasc. Dis.* *15*, 87–111.
- Fukuto, T.R. (1990). Mechanism of action of organophosphorus and carbamate insecticides. *Environ. Health Perspect.* *87*, 245–254.
- Gabriel, M., Albani, M., and Schulte, F.J. (1976). Apneic spells and sleep states in preterm infants. *Pediatrics* *57*, 142–147.
- Gaspari, L., Paris, F., Jandel, C., Kalfa, N., Orsini, M., Daurès, J.P., and Sultan, C. (2011). Prenatal environmental risk factors for genital malformations in a population of 1442 French male newborns: a nested case-control study. *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* *26*, 3155–3162.
- Gauda, E.B., McLemore, G.L., Tolosa, J., Marston-Nelson, J., and Kwak, D. (2004). Maturation of peripheral arterial chemoreceptors in relation to neonatal apnoea. *Semin. Neonatol.* *SN 9*, 181–194.
- Gauda, E.B., Cristofalo, E., and Nunez, J. (2007). Peripheral arterial chemoreceptors and sudden infant death syndrome. *Respir. Physiol. Neurobiol.* *157*, 162–170.
- Gaultier, C. (1995). Cardiorespiratory adaptation during sleep in infants and children. *Pediatr. Pulmonol.* *19*, 105–117.
- Georgieff, M.K., Mills, M.M., Gómez-Marín, O., and Sinaiko, A.R. (1996). Rate of change of blood pressure in premature and full term infants from birth to 4 months. *Pediatr. Nephrol. Berl. Ger.* *10*, 152–155.

- Givan, D.C. (2003). Physiology of breathing and related pathological processes in infants. *Semin. Pediatr. Neurol.* *10*, 271–280.
- Gong, P., Wang, X., Sheng, J., and Yao, T. (2010). Variations of organochlorine pesticides and polychlorinated biphenyls in atmosphere of the Tibetan Plateau: Role of the monsoon system. *Atmos. Environ.* *44*, 2518–2523.
- Gonzalez, C., Almaraz, L., Obeso, A., and Rigual, R. (1994). Carotid body chemoreceptors: from natural stimuli to sensory discharges. *Physiol. Rev.* *74*, 829–898.
- Gonzalez, C., Lopez-Lopez, J.R., Obeso, A., Perez-Garcia, M.T., and Rocher, A. (1995). Cellular mechanisms of oxygen chemoreception in the carotid body. *Respir. Physiol.* *102*, 137–147.
- Gray, T., and Huestis, M. (2007). Bioanalytical procedures for monitoring in utero drug exposure. *Anal. Bioanal. Chem.* *388*, 1455–1465.
- Greenough, A., and Emery, E.F. (1993). Blood pressure levels of preterm infants in the first year of life. *Acta Paediatr. Oslo Nor.* *1992* *82*, 528–529.
- Grigg-Damberger, M.M. (2016). The Visual Scoring of Sleep in Infants 0 to 2 Months of Age. *J. Clin. Sleep Med. JCSM Off. Publ. Am. Acad. Sleep Med.* *12*, 429–445.
- Guyenet, P.G. (2014). Regulation of breathing and autonomic outflows by chemoreceptors. *Compr. Physiol.* *4*, 1511–1562.
- Guyton, A.C. (1991). Blood pressure control--special role of the kidneys and body fluids. *Science* *252*, 1813–1816.
- Haider, A.Z., Rehan, V., Al-Saedi, S., Alvaro, R., Kwiatkowski, K., Cates, D., and Rigatto, H. (1995). Effect of baseline oxygenation on the ventilatory response to inhaled 100% oxygen in preterm infants. *J. Appl. Physiol. Bethesda Md* *1985* *79*, 2101–2105.
- Haraux, E., Braun, K., Buisson, P., Stéphan-Blanchard, E., Devauchelle, C., Ricard, J., Boudailliez, B., Tourneux, P., Gouron, R., and Chardon, K. (2016). Maternal Exposure to Domestic Hair Cosmetics and Occupational Endocrine Disruptors Is Associated with a Higher Risk of Hypospadias in the Offspring. *Int. J. Environ. Res. Public Health* *14*.
- Harper, R.M., Leake, B., Hoppenbrouwers, T., Sterman, M.B., McGinty, D.J., and Hodgman, J. (1978). Polygraphic studies of normal infants and infants at risk for the sudden infant death syndrome: heart rate and variability as a function of state. *Pediatr. Res.* *12*, 778–785.
- Hertzberg, T., and Lagercrantz, H. (1987). Postnatal sensitivity of the peripheral chemoreceptors in newborn infants. *Arch. Dis. Child.* *62*, 1238–1241.
- Hertzberg, T., Hellström, S., Holgert, H., Lagercrantz, H., and Pequignot, J.M. (1992). Ventilatory response to hyperoxia in newborn rats born in hypoxia--possible relationship to carotid body dopamine. *J. Physiol.* *456*, 645–654.
- Heymans, C., and Bouckaert, J.J. (1930). Sinus caroticus and respiratory reflexes: I. Cerebral blood flow and respiration. *Adrenaline apnoea. J. Physiol.* *69*, 254–266.

- Hira, H.S., and Sibal, L. (1999). Sleep apnea syndrome among patients with hypothyroidism. *J. Assoc. Physicians India* 47, 615–618.
- Hong, Z., Günter, M., and Randow, F.F.E. (2002). Meconium: a matrix reflecting potential fetal exposure to organochlorine pesticides and its metabolites. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 51, 60–64.
- Hoppenbrouwers, T., Hodgman, J.E., Harper, R.M., Hofmann, E., Stermann, M.B., and McGinty, D.J. (1977). Polygraphic studies of normal infants during the first six months of life: III. Incidence of apnea and periodic breathing. *Pediatrics* 60, 418–425.
- Horton, M.K., Rundle, A., Camann, D.E., Boyd Barr, D., Rauh, V.A., and Whyatt, R.M. (2011). Impact of prenatal exposure to piperonyl butoxide and permethrin on 36-month neurodevelopment. *Pediatrics* 127, e699-706.
- Jansen, A.H., Ioffe, S., Russell, B.J., and Chernick, V. (1981). Effect of carotid chemoreceptor denervation on breathing in utero and after birth. *J. Appl. Physiol.* 51, 630–633.
- Jiang, C., and Lipski, J. (1990). Extensive monosynaptic inhibition of ventral respiratory group neurons by augmenting neurons in the Böttinger complex in the cat. *Exp. Brain Res.* 81, 639–648.
- Jones, B.E. (2003). Arousal systems. *Front. Biosci. J. Virtual Libr.* 8, s438-451.
- Jouvet, M. (1972). The role of monoamines and acetylcholine-containing neurons in the regulation of the sleep-waking cycle. *Ergeb. Physiol.* 64, 166–307.
- Kalia, M.P. (1981). Anatomical organization of central respiratory neurons. *Annu. Rev. Physiol.* 43, 105–120.
- Katona, P.G., Frasz, A., and Egbert, J. (1980). Maturation of cardiac control in full-term and preterm infants during sleep. *Early Hum. Dev.* 4, 145–159.
- Keene, D.J., Wimmer, J.E., and Mathew, O.P. (2000). Does supine positioning increase apnea, bradycardia, and desaturation in preterm infants? *J. Perinatol. Off. J. Calif. Perinat. Assoc.* 20, 17–20.
- Koons, A.H., Mojica, N., Jadeja, N., Ostfeld, B., Hiatt, M., and Hegyi, T. (1993). Neurodevelopmental outcome of infants with apnea of infancy. *Am. J. Perinatol.* 10, 208–211.
- Koren, G., Chan, D., Klein, J., and Karaskov, T. (2002). Estimation of fetal exposure to drugs of abuse, environmental tobacco smoke, and ethanol. *Ther. Drug Monit.* 24, 23–25.
- Kouakam, C., Stephan-Blanchard, E., Léké, A., Kongolo, G., Haraux, E., Delanaud, S., Telliez, F., and Chardon, K. (2017). The hypoxic test in preterm neonates reinvestigated. *Pediatr. Pulmonol.*

Kubin, L., Alheid, G.F., Zuperku, E.J., and McCrimmon, D.R. (2006). Central pathways of pulmonary and lower airway vagal afferents. *J. Appl. Physiol. Bethesda Md* 1985 *101*, 618–627.

Lahiri, S., and Forster, R.E. (2003). CO₂/H⁺ sensing: peripheral and central chemoreception. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* *35*, 1413–1435.

Laugeray, A., Herzine, A., Perche, O., Richard, O., Montecot-Dubourg, C., Menuet, A., Mazaud-Guittot, S., Lesné, L., Jegou, B., and Mortaud, S. (2017). In utero and lactational exposure to low-doses of the pyrethroid insecticide cypermethrin leads to neurodevelopmental defects in male mice-An ethological and transcriptomic study. *PloS One* *12*, e0184475.

Lecomte J. Expositions aux produits biocides et produits phytopharmaceutiques en milieu domestique. Elaboration et validation d'indicateurs basés sur les usages et description des scénarios d'émission et d'exposition, 53 p. Cnam -Pays de Loire - IHIE Ouest, Angers, 2004.

Lee, K., Johnson, V.L., and Blakley, B.R. (2001). The effect of exposure to a commercial 2,4-D formulation during gestation on the immune response in CD-1 mice. *Toxicology* *165*, 39–49.

Loewy, A.D., and Burton, H. (1978). Nuclei of the solitary tract: efferent projections to the lower brain stem and spinal cord of the cat. *J. Comp. Neurol.* *181*, 421–449.

Longin, E., Gerstner, T., Schaible, T., Lenz, T., and König, S. (2006). Maturation of the autonomic nervous system: differences in heart rate variability in premature vs. term infants. *J. Perinat. Med.* *34*, 303–308.

Martin, R.J., and Abu-Shaweesh, J.M. (2005). Control of breathing and neonatal apnea. *Biol. Neonate* *87*, 288–295.

Martin, R.J., DiFiore, J.M., Jana, L., Davis, R.L., Miller, M.J., Coles, S.K., and Dick, T.E. (1998). Persistence of the biphasic ventilatory response to hypoxia in preterm infants. *J. Pediatr.* *132*, 960–964.

Mayhoub, F., Berton, T., Bach, V., Tack, K., Deguines, C., Floch-Barneaud, A., Desmots, S., Stéphan-Blanchard, E., and Chardon, K. (2014). Self-reported parental exposure to pesticide during pregnancy and birth outcomes: the MecoExpo cohort study. *PloS One* *9*, e99090.

McIntire, D.D., Bloom, S.L., Casey, B.M., and Leveno, K.J. (1999). Birth weight in relation to morbidity and mortality among newborn infants. *N. Engl. J. Med.* *340*, 1234–1238.

Merrill, E.G., Lipski, J., Kubin, L., and Fedorko, L. (1983). Origin of the expiratory inhibition of nucleus tractus solitarius inspiratory neurones. *Brain Res.* *263*, 43–50.

Meyer-Monath, M., Chatellier, C., Rouget, F., Morel, I., and Lestremau, F. (2014). Development of a multi-residue method in a fetal matrix: analysis of meconium. *Anal. Bioanal. Chem.* *406*, 7785–7797.

- Meza, R.C., Ortiz, F.C., Bravo, E., Iturriaga-Vásquez, P., Eugénín, J.L., and Varas, R. (2012). Functional expression of the $\alpha 7$ and $\alpha 4$ -containing nicotinic acetylcholine receptors on the neonatal rat carotid body. *Neurochem. Int.* *60*, 115–124.
- Milner, A.D., and Greenough, A. (2004). The role of the upper airway in neonatal apnoea. *Semin. Neonatol.* *SN 9*, 213–219.
- Moreira, T.S., Takakura, A.C., Colombari, E., and Guyenet, P.G. (2006). Central chemoreceptors and sympathetic vasomotor outflow. *J. Physiol.* *577*, 369–386.
- Moriette, G., Chaussain, M., Radvanyi-Bouvet, M.F., Walti, H., Pajot, N., and Relier, J.P. (1983). Functional residual capacity and sleep states in the premature newborn. *Biol. Neonate* *43*, 125–133.
- Morrell, M.J., Heywood, P., Moosavi, S.H., Stevens, J., and Guz, A. (2001). Central chemosensitivity and breathing asleep in unilateral medullary lesion patients: comparisons to animal data. *Respir. Physiol.* *129*, 269–277.
- Mortola, J.P., Frappell, P.B., Dotta, A., Matsuoka, T., Fox, G., Weeks, S., and Mayer, D. (1992). Ventilatory and metabolic responses to acute hyperoxia in newborns. *Am. Rev. Respir. Dis.* *146*, 11–15.
- Moss, I.R., Denavit-Saubié, M., Eldridge, F.L., Gillis, R.A., Herkenham, M., and Lahiri, S. (1986). Neuromodulators and transmitters in respiratory control. *Fed. Proc.* *45*, 2133–2147.
- Nock, M.L., Difiore, J.M., Arko, M.K., and Martin, R.J. (2004). Relationship of the ventilatory response to hypoxia with neonatal apnea in preterm infants. *J. Pediatr.* *144*, 291–295.
- Nurminen, T. (1995). Maternal pesticide exposure and pregnancy outcome. *J. Occup. Environ. Med.* *37*, 935–940.
- Nurse, C.A. (2010). Neurotransmitter and neuromodulatory mechanisms at peripheral arterial chemoreceptors. *Exp. Physiol.* *95*, 657–667.
- Ono, K., Shiba, K., Nakazawa, K., and Shimoyama, I. (2006). Synaptic origin of the respiratory-modulated activity of laryngeal motoneurons. *Neuroscience* *140*, 1079–1088.
- Ostrea, E.M., Mantaring, J.B., and Silvestre, M.A. (2004). Drugs that affect the fetus and newborn infant via the placenta or breast milk. *Pediatr. Clin. North Am.* *51*, 539–579, vii.
- Ostrea, E.M., Bielawski, D.M., Posecion, N.C., Corrion, M., Villanueva-Uy, E., Jin, Y., Janisse, J.J., and Ager, J.W. (2008). A comparison of infant hair, cord blood and meconium analysis to detect fetal exposure to environmental pesticides. *Environ. Res.* *106*, 277–283.
- Ostrea, E.M., Bielawski, D.M., Posecion, N.C., Corrion, M., Villanueva-Uy, E., Bernardo, R.C., Jin, Y., Janisse, J.J., and Ager, J.W. (2009). Combined analysis of prenatal (maternal hair and blood) and neonatal (infant hair, cord blood and meconium) matrices to detect fetal exposure to environmental pesticides. *Environ. Res.* *109*, 116–122.

- Ostrea, E.M.J.R., Morales, V., Ngoumgna, E., Prescilla, R., Tan, E., Hernandez, E., Ramirez, G.B., Cifra, H.L., and Manlapaz, M.L. (2002). Prevalence of fetal exposure to environmental toxins as determined by meconium analysis. *Neurotoxicology* 23, 329–339.
- Oyamada, Y., Andrzejewski, M., Mückenhoff, K., Scheid, P., and Ballantyne, D. (1999). Locus coeruleus neurones in vitro: pH-sensitive oscillations of membrane potential in an electrically coupled network. *Respir. Physiol.* 118, 131–147.
- Padhye, N.S., Verklan, M., Brazdeikis, A., Williams, A.L., Khattak, A.Z., and Lasky, R.E. (2008). A comparison of fetal and neonatal heart rate variability at similar post-menstrual ages. *Conf. Proc. Annu. Int. Conf. IEEE Eng. Med. Biol. Soc. IEEE Eng. Med. Biol. Soc. Annu. Conf. 2008*, 2801–2804.
- Park, Y.J., Lee, T., Ha, J., Jung, I.M., Chung, J.K., and Kim, S.J. (2008). Effect of nicotine on human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) migration and angiogenesis. *Vascul. Pharmacol.* 49, 32–36.
- Parsiow, P.M., Parslow, P.M., Cranage, S.M., Adamson, T.M., Harding, R., and Horne, R.S.C. (2004). Arousal and ventilatory responses to hypoxia in sleeping infants: effects of maternal smoking. *Respir. Physiol. Neurobiol.* 140, 77–87.
- Parslow, P.M., Harding, R., Cranage, S.M., Adamson, T.M., and Horne, R.S.C. (2003). Ventilatory responses preceding hypoxia-induced arousal in infants: effects of sleep-state. *Respir. Physiol. Neurobiol.* 136, 235–247.
- Patural, H., Barthelemy, J.C., Pichot, V., Mazzocchi, C., Teyssier, G., Damon, G., and Roche, F. (2004). Birth prematurity determines prolonged autonomic nervous system immaturity. *Clin. Auton. Res. Off. J. Clin. Auton. Res. Soc.* 14, 391–395.
- Patural, H., Pichot, V., Jaziri, F., Teyssier, G., Gaspoz, J.-M., Roche, F., and Barthelemy, J.-C. (2008). Autonomic cardiac control of very preterm newborns: a prolonged dysfunction. *Early Hum. Dev.* 84, 681–687.
- Payer, C., Urlesberger, B., Pauger, M., and Müller, W. (2003). Apnea associated with hypoxia in preterm infants: impact on cerebral blood volume. *Brain Dev.* 25, 25–31.
- Peirano, P., Algarín, C., and Uauy, R. (2003). Sleep-wake states and their regulatory mechanisms throughout early human development. *J. Pediatr.* 143, S70-79.
- Petit, C., Chevrier, C., Durand, G., Monfort, C., Rouget, F., Garlantezec, R., and Cordier, S. (2010). Impact on fetal growth of prenatal exposure to pesticides due to agricultural activities: a prospective cohort study in Brittany, France. *Environ. Health* 9.
- Petit, C., Blangiardo, M., Richardson, S., Coquet, F., Chevrier, C., and Cordier, S. (2012). Association of Environmental Insecticide Exposure and Fetal Growth With a Bayesian Model Including Multiple Exposure Sources: The PELAGIE Mother-Child Cohort. *Am. J. Epidemiol.* 175, 1182–1190.

- Pichler, G., Urlesberger, B., and Müller, W. (2003). Impact of bradycardia on cerebral oxygenation and cerebral blood volume during apnoea in preterm infants. *Physiol. Meas.* *24*, 671–680.
- Poets, C.F., Samuels, M.P., and Southall, D.P. (1992). Potential role of intrapulmonary shunting in the genesis of hypoxemic episodes in infants and young children. *Pediatrics* *90*, 385–391.
- Poets, C.F., Stebbens, V.A., Samuels, M.P., and Southall, D.P. (1993). The relationship between bradycardia, apnea, and hypoxemia in preterm infants. *Pediatr. Res.* *34*, 144–147.
- Polin, R.A., Fox, W.W., and Abman, S.H. (2011). *Fetal and Neonatal Physiology: Expert Consult (2-Volume Set)*. (London: Elsevier Health Sciences).
- Pomés, A., Rodríguez-Farré, E., and Suñol, C. (1994). Disruption of GABA-dependent chloride flux by cyclodienes and hexachlorocyclohexanes in primary cultures of cortical neurons. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* *271*, 1616–1623.
- Prabhakar, N.R. (1999). NO and CO as second messengers in oxygen sensing in the carotid body. *Respir. Physiol.* *115*, 161–168.
- Prabhakar, N.R., and Overholt, J.L. (2000). Cellular mechanisms of oxygen sensing at the carotid body: heme proteins and ion channels. *Respir. Physiol.* *122*, 209–221.
- Pugh, P.C., and Margiotta, J.F. (2000). Nicotinic acetylcholine receptor agonists promote survival and reduce apoptosis of chick ciliary ganglion neurons. *Mol. Cell. Neurosci.* *15*, 113–122.
- Ramaekers, V.T., Casaer, P., and Daniels, H. (1993). Cerebral hyperperfusion following episodes of bradycardia in the preterm infant. *Early Hum. Dev.* *34*, 199–208.
- Rauh, V., Arunajadai, S., Horton, M., Perera, F., Hoepner, L., Barr, D.B., and Whyatt, R. (2011). Seven-year neurodevelopmental scores and prenatal exposure to chlorpyrifos, a common agricultural pesticide. *Environ. Health Perspect.* *119*, 1196–1201.
- Ray, D.E., and Fry, J.R. (2006). A reassessment of the neurotoxicity of pyrethroid insecticides. *Pharmacol. Ther.* *111*, 174–193.
- Rekling, J.C., and Feldman, J.L. (1998). PreBötzinger complex and pacemaker neurons: hypothesized site and kernel for respiratory rhythm generation. *Annu. Rev. Physiol.* *60*, 385–405.
- Rigatto, H., and Brady, J.P. (1972). Periodic breathing and apnea in preterm infants. I. Evidence for hypoventilation possibly due to central respiratory depression. *Pediatrics* *50*, 202–218.
- Rigatto, H., Brady, J.P., and de la Torre Verduzco, R. (1975). Chemoreceptor reflexes in preterm infants: I. The effect of gestational and postnatal age on the ventilatory response to inhalation of 100% and 15% oxygen. *Pediatrics* *55*, 604–613.

Rigatto, H., Desai, U., Leahy, F., Kalapesi, Z., and Cates, D. (1981). The effect of 2% CO₂, 100% O₂, theophylline and 15% O₂ on “inspiratory drive” and “effective” timing in preterm infants. *Early Hum. Dev.* 5, 63–70.

Rigatto, H., Kalapesi, Z., Leahy, F.N., Durand, M., MacCallum, M., and Cates, D. (1982). Ventilatory response to 100% and 15% O₂ during wakefulness and sleep in preterm infants. *Early Hum. Dev.* 7, 1–10.

Schlenker, E.H. (2012). Effects of hypothyroidism on the respiratory system and control of breathing: Human studies and animal models. *Respir. Physiol. Neurobiol.* 181, 123–131.

Schneider, A.S., Atluri, P., Shen, Q., Barnes, W., Mah, S.J., Stadfelt, D., Goderie, S.K., Temple, S., and Fleck, M.W. (2002). Functional nicotinic acetylcholine receptor expression on stem and progenitor cells of the early embryonic nervous system. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 971, 135–138.

Schramm, C.M., and Grunstein, M.M. (1987). Respiratory influence of peripheral chemoreceptor stimulation in maturing rabbits. *J. Appl. Physiol. Bethesda Md* 1985 63, 1671–1680.

Shirahata, M., Balbir, A., Otsubo, T., and Fitzgerald, R.S. (2007). Role of acetylcholine in neurotransmission of the carotid body. *Respir. Physiol. Neurobiol.* 157, 93–105.

Silvani, A., Calandra-Buonaura, G., Dampney, R.A.L., and Cortelli, P. (2016). Brain-heart interactions: physiology and clinical implications. *Philos. Transact. A Math. Phys. Eng. Sci.* 374.

Slotkin, T.A. (1998). Fetal nicotine or cocaine exposure: which one is worse? *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 285, 931–945.

Slotkin, T.A., McCook, E.C., and Seidler, F.J. (1997). Cryptic brain cell injury caused by fetal nicotine exposure is associated with persistent elevations of c-fos protooncogene expression. *Brain Res.* 750, 180–188.

Smith, J.C., Ellenberger, H.H., Ballanyi, K., Richter, D.W., and Feldman, J.L. (1991). Pre-Bötzinger complex: a brainstem region that may generate respiratory rhythm in mammals. *Science* 254, 726–729.

Song, N., Zhang, G., Geng, W., Liu, Z., Jin, W., Li, L., Cao, Y., Zhu, D., Yu, J., and Shen, L. (2012). Acid sensing ion channel 1 in lateral hypothalamus contributes to breathing control. *PLoS One* 7, e39982.

Souza Neto, E., Neidecker, J., and Lehot, J.. (2003a). Comprendre la variabilité de la pression artérielle et de la fréquence cardiaque. *Ann. Fr. Anesth. Réanimation* 22, 425–452.

Souza Neto, E., Neidecker, J., and Lehot, J.. (2003b). Comprendre la variabilité de la pression artérielle et de la fréquence cardiaque. *Ann. Fr. Anesth. Réanimation* 22, 425–452.

- Stéphan-Blanchard, E., Chardon, K., Léké, A., Delanaud, S., Bach, V., and Telliez, F. (2013a). Heart Rate Variability in Sleeping Preterm Neonates Exposed to Cool and Warm Thermal Conditions. *PLoS ONE* *8*, e68211.
- Stéphan-Blanchard, E., Bach, V., Telliez, F., and Chardon, K. (2013b). Perinatal nicotine/smoking exposure and carotid chemoreceptors during development. *Respir. Physiol. Neurobiol.* *185*, 110–119.
- Stéphan-Blanchard, E., Chardon, K., Djeddi, D.-D., Léké, A., Delanaud, S., Bach, V., and Telliez, F. (2016). The dynamics of cardiac autonomic control in sleeping preterm neonates exposed in utero to smoking. *Clin. Neurophysiol. Off. J. Int. Fed. Clin. Neurophysiol.* *127*, 2871–2877.
- Stornetta, R.L. (2008). Identification of neurotransmitters and co-localization of transmitters in brainstem respiratory neurons. *Respir. Physiol. Neurobiol.* *164*, 18–27.
- Su, Y., Hung, H., Blanchard, P., Patton, G.W., Kallenborn, R., Konoplev, A., Fellin, P., Li, H., Geen, C., and Stern, G. (2008). A circumpolar perspective of atmospheric organochlorine pesticides (OCPs): Results from six Arctic monitoring stations in 2000–2003. *Atmos. Environ.* *42*, 4682–4698.
- Subhani, M., Katz, S., and DeCristofaro, J.D. (2000). Prediction of postdischarge complications by predischarge event recordings in infants with apnea of prematurity. *J. Perinatol. Off. J. Calif. Perinat. Assoc.* *20*, 92–95.
- Syed, F., Soni, I., John, P.J., and Bhatnagar, P. (2010). Evaluation of teratogenic potential of cyfluthrin, a synthetic pyrethroid in Swiss albino mice. *Toxicol. Ind. Health* *26*, 105–111.
- Takeda, R., and Haji, A. (1991). Synaptic response of bulbar respiratory neurons to hypercapnic stimulation in peripherally chemodenervated cats. *Brain Res.* *561*, 307–317.
- Tan, W., Pagliardini, S., Yang, P., Janczewski, W.A., and Feldman, J.L. (2010). Projections of preBötzinger complex neurons in adult rats. *J. Comp. Neurol.* *518*, 1862–1878.
- Teitel, D.F. (1996). Fetal chemoreception: a developing story. *Reprod. Fertil. Dev.* *8*, 471–482.
- Timofeeva, O.A., and Gordon, C.J. (2002). EEG spectra, behavioral states and motor activity in rats exposed to acetylcholinesterase inhibitor chlorpyrifos. *Pharmacol. Biochem. Behav.* *72*, 669–679.
- Tourneux, P., Cardot, V., Museux, N., Chardon, K., Léké, A., Telliez, F., Libert, J.-P., and Bach, V. (2008). Influence of thermal drive on central sleep apnea in the preterm neonate. *Sleep* *31*, 549–556.
- Tsatsakis, A.M., Tzatzarakis, M.N., Koutroulakis, D., Toutoudaki, M., and Sifakis, S. (2009). Dialkyl phosphates in meconium as a biomarker of prenatal exposure to organophosphate pesticides: a study on pregnant women of rural areas in Crete, Greece. *Xenobiotica Fate Foreign Compd. Biol. Syst.* *39*, 364–373.

- Tuladhar, R., Harding, R., Michael Adamson, T., and Horne, R.S.C. (2005). Comparison of postnatal development of heart rate responses to trigeminal stimulation in sleeping preterm and term infants. *J. Sleep Res.* *14*, 29–36.
- Ujházy, E., Sadlonová, I., Dubovický, M., Mach, M., Múcková, M., and Flaskárová, E. (2006). Teratological study of the herbicide 4-chloro-2-methylphenoxyacetic acid in rabbits. *J. Appl. Toxicol.* *JAT 26*, 368–373.
- Upton, C.J., Milner, A.D., and Stokes, G.M. (1992). Episodic bradycardia in preterm infants. *Arch. Dis. Child.* *67*, 831–834.
- Vale, C., Fonfría, E., Bujons, J., Messeguer, A., Rodríguez-Farré, E., and Suñol, C. (2003). The organochlorine pesticides gamma-hexachlorocyclohexane (lindane), alpha-endosulfan and dieldrin differentially interact with GABA(A) and glycine-gated chloride channels in primary cultures of cerebellar granule cells. *Neuroscience* *117*, 397–403.
- Van Tongeren, M., Nieuwenhuijsen, M.J., Gardiner, K., Armstrong, B., Vrijheid, M., Dolk, H., and Botting, B. (2002). A job-exposure matrix for potential endocrine-disrupting chemicals developed for a study into the association between maternal occupational exposure and hypospadias. *Ann. Occup. Hyg.* *46*, 465–477.
- Villablanca, A.C. (1998). Nicotine stimulates DNA synthesis and proliferation in vascular endothelial cells in vitro. *J. Appl. Physiol.* Bethesda Md 1985 *84*, 2089–2098.
- Visser, G.H., Poelmann-Weesjes, G., Cohen, T.M., and Bekedam, D.J. (1987). Fetal behavior at 30 to 32 weeks of gestation. *Pediatr. Res.* *22*, 655–658.
- Wakai, R.T. (2004). Assessment of fetal neurodevelopment via fetal magnetocardiography. *Exp. Neurol.* *190 Suppl 1*, S65-71.
- Whyatt, R.M., and Barr, D.B. (2001). Measurement of organophosphate metabolites in postpartum meconium as a potential biomarker of prenatal exposure: a validation study. *Environ. Health Perspect.* *109*, 417–420.
- Whyatt, R.M., Rauh, V., Barr, D.B., Camann, D.E., Andrews, H.F., Garfinkel, R., Hoepner, L.A., Diaz, D., Dietrich, J., Reyes, A., et al. (2004). Prenatal insecticide exposures and birth weight and length among an urban minority cohort. *Environ. Health Perspect.* *112*, 1125–1132.
- Witcombe, N.B., Yiallourou, S.R., Walker, A.M., and Horne, R.S.C. (2008). Blood pressure and heart rate patterns during sleep are altered in preterm-born infants: implications for sudden infant death syndrome. *Pediatrics* *122*, e1242-1248.
- Xiang, H., Nuckols, J.R., and Stallones, L. (2000). A Geographic Information Assessment of Birth Weight and Crop Production Patterns around Mother's Residence. *Environ. Res.* *82*, 160–167.
- Yanney, M., and Marlow, N. (2004). Paediatric consequences of fetal growth restriction. *Semin. Fetal. Neonatal Med.* *9*, 411–418.

Yiallourou, S.R., Sands, S.A., Walker, A.M., and Horne, R.S.C. (2012). Maturation of heart rate and blood pressure variability during sleep in term-born infants. *Sleep* 35, 177–186.

Zapata, P. (2007). Is ATP a suitable co-transmitter in carotid body arterial chemoreceptors? *Respir. Physiol. Neurobiol.* 157, 106–115.

Zhao, G., Xu, Y., Li, W., Han, G., and Ling, B. (2007). Prenatal exposures to persistent organic pollutants as measured in cord blood and meconium from three localities of Zhejiang, China. *Sci. Total Environ.* 377, 179–191.

Zhao, X., Salgado, V.L., Yeh, J.Z., and Narahashi, T. (2003). Differential actions of fipronil and dieldrin insecticides on GABA-gated chloride channels in cockroach neurons. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 306, 914–924.

(1996a). Standards and indications for cardiopulmonary sleep studies in children. American Thoracic Society. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 153, 866–878.

(1996b). Heart rate variability. Standards of measurement, physiological interpretation, and clinical use. Task Force of the European Society of Cardiology and the North American Society of Pacing and Electrophysiology. *Eur. Heart J.* 17, 354–381.

Annexes

Annexe 1. Questionnaire d'exposition maternelle aux pesticides.

Projet de recherche PHYSIO-MECO :

Impact de l'exposition prénatale aux pesticides sur les fonctions neurophysiologiques (sommeil, respiration) du nouveau-né prématuré en
Picardie

Questionnaire adressé aux Mamans



I - VOTRE ENVIRONNEMENT PROFESSIONNEL PENDANT LA GROSSESSE

1. Avez-vous exercé une activité professionnelle pendant votre grossesse ?

Non, passer directement à la question 3 (page 5)

Oui,

Profession :

Commune :

1a. pendant combien de temps :

Jusqu'au 3^{ème} mois

Jusqu'au 6^{ème} mois

Jusqu'au congé maternité

Ou jusqu'à la date du / / 20

1b. Votre profession fait partie d'un des secteurs suivants :

(Cocher plusieurs cases si nécessaire)

Agriculture : Culture maraîchère, Arboriculture (pommiers, cerisiers,...), Céréales (blé, maïs, orge,...), Horticulture (fleurs),...

Jardinier, Entretien des espaces verts ou des forêts, ...

Entretien des autoroutes, des voies ferrées, ou des aéroports,...

Entretien des locaux (désinsectisation, désinfection, ...)

Vente de fruits, de légumes, de fleurs ou de plantes....

Animalier : Médecine vétérinaire, Toilettage animalier, Soins aux animaux, Elevage,...

Transport ou Vente des produits phytosanitaires

Autre secteur utilisant ou exposé aux produits phytosanitaires, **préciser :**

2. Dans votre profession, lors de votre grossesse, avez-vous utilisé (ou été exposée à) des produits phytosanitaires (voir définition) ?

Non, passer directement à la question 3 (page 5)

Oui

2a. Pendant combien de temps :

Moins de 1 fois par mois

1 fois par mois ou plus

Tous les jours

Autre, préciser : _____

2b. A quels types de produits phytosanitaires avez-vous été exposé principalement ? (plusieurs réponses possibles)

- Fongicides (traitement contre les champignons)
- Insecticides (traitement contre les insectes)
- Herbicides (traitement contre les mauvaises herbes)
- Rodenticides (traitement contre les animaux nuisibles : taupes, corbeaux, rats...)
- Régulateurs ou hormones de croissance (substances qui augmentent ou limitent la croissance des végétaux)
- Je ne sais pas

2c. Citer si possible le nom de quelques produits phytosanitaires que vous avez utilisés (ou auxquels vous avez été exposée) dans votre travail, pendant votre grossesse?

2d. Votre exposition à ces produits a eu lieu:

- Principalement à l'intérieur (d'un bâtiment ou d'une serre, ...)
- Principalement à l'extérieur
- Les deux

2e. Lorsque vous avez utilisé (ou vous avez été exposée à) ces produits pendant votre grossesse, vous êtes-vous protégée?

Non

Oui, préciser comment ? (plusieurs réponses possibles):

- Combinaison Masque coton Masque cartouche
- Lunettes Gants coton Gants caoutchouc
- Blouse Bottes Autres : préciser _____

2f. Pendant votre grossesse, avez-vous été malade, incommodée ou avez-vous souffert d'irritations suite à l'utilisation de ces produits :

Non

- Oui, préciser la voie d'entrée : Nez Bouche Peau Yeux
- Je ne sais pas

3. Une ou plusieurs personnes, vivant sous le même toit que vous, exerce(nt)-t-elles(s) une profession dans un des secteurs suivants? (Cocher plusieurs cases si nécessaire)

- Agriculture : Culture maraîchère, Arboriculture (pommiers, cerisiers,...), Céréales (blé, maïs, orge,...), Horticulture (fleurs),...
- Jardinerie, Entretien des espaces verts ou des forêts, ...
- Entretien des autoroutes, des voies ferrées, ou des aéroports,...
- Entretien des locaux (désinsectisation, désinfection, ...)
- Vente de fruits, de légumes, de fleurs ou de plantes....
- Animalier : Médecine vétérinaire, Toilettage animalier, Soins aux animaux, Elevage,...
- Transport ou Vente des produits phytosanitaires
- Autre secteur utilisant ou exposé aux produits phytosanitaires, **préciser** :

Non personne. (Si personne passer directement à la question 4 (page 6))

3a. Cette(ces) personne(s), est(sont)-elle(s) :

(2 réponses possibles)

Le père de l'enfant

Autre(s), **préciser** _____

3b. A quels types de produits phytosanitaires cette(ces) personne(s) a(ont)-t-elle(s) été exposé(s) principalement ? Cocher plusieurs cases si nécessaire

- Fongicides (traitement contre les champignons)
- Insecticides (traitement contre les insectes)
- Herbicides (traitement contre les mauvaises herbes)
- Rodenticides (traitement contre les animaux nuisibles : taupes, corbeaux...)
- Régulateurs ou hormones de croissance (des substances qui augmentent ou limitent la croissance des végétaux)
- Je ne sais pas

3c. Pouvez-vous citer le nom de quelques produits phytosanitaires au(x)quel(s) ce(s) membre(s) de votre famille a(ont) été exposé(s)?

**II-VOTRE ALIMENTATION ET HABITUDES DE VIE
PENDANT LA GROSSESSE**

➤ **Alimentation :**

4. Pendant votre grossesse à quelle fréquence consommiez-vous les aliments suivants :

Mettre une croix (X) dans la case qui correspond à votre réponse

	Jamais ou presque jamais	Pas tous les jours	tous les jours	plusieurs fois par jour
Fruits et légumes (frais, cuits, surgelés, conserves,..)				
Céréales ou produits à base de céréales (blé, maïs, riz, semoule, pain, biscotte, pâtes,..)				
Soja ou des produits à base de soja				
Produits laitiers				
Viande				
Poisson ou fruits de mer				
Œuf				

4a. S'agissait-il alors de produits issus de l'agriculture biologique (Bio) ou d'un jardin non traité ?

	Jamais	Parfois	Le plus souvent
Fruits et légumes			
Produits laitiers			
Viande			
Oeufs			

5. Pendant votre grossesse, consommiez-vous ? (Cocher plusieurs cases si nécessaire)

- L'eau du robinet non filtrée
 L'eau du robinet filtrée
 L'eau de bouteille

➤ **Tabagisme et médicaments**

6. Avez-vous fumé pendant votre grossesse ?

- Non, passer directement à la question 7
 Oui

6a. Pendant combien de temps ?

- Jusqu'au 3^{ème} mois
 Jusqu'au 6^{ème} mois
 Pendant toute la grossesse

Ou Jusqu'à / / 20

6b. Combien de cigarettes par jour fumiez-vous pendant votre grossesse?

Entre 1 et 10 cigarettes par jour

Plus de 10 cigarettes par jour

7. Pendant votre grossesse, y avait-il des personnes qui fumaient régulièrement dans la pièce où vous vous trouviez?

Non, passer directement à la question 8

Oui

7a. Pendant combien de temps ?

Moins d'une heure par jour

Plus d'une heure par jour

8. Avez-vous utilisé les médicaments ou produits suivants pendant votre grossesse pour vous ou pour vos proches:

– **Produit « anti-poux » :**

Non

Oui, nom du produit si possible :

– **Produits « anti-tiques » :**

Non

Oui, nom du produit si possible :

– **Traitement « anti-gale » :**

Non

Oui, nom du produit si possible :

– **Traitement contre les mycoses ou les champignons :**

Non

Oui nom du produit si possible :

➤ **Les animaux domestiques :**

9. Avez-vous des animaux domestiques (chien, chat, hamster, cobaye, oiseau,...) ?

Non (passer directement à la question 10)

Oui

9a. Espèce(s) et nombre :

9b. Pendant votre grossesse vous occupiez-vous de leurs soins d'hygiène (lavage, brossage, traitements antiparasitaires, traitement ou collier anti puce, etc.) ?

Non

Oui, les produits utilisés :

**III- VOTRE LIEU DE VIE
PENDANT LA GROSSESSE**

10. Avez-vous été domiciliée en Picardie durant votre grossesse ?

- Non
 Oui

11. Avez-vous changé de logement durant votre grossesse ?

- Non

Merci de répondre uniquement aux questions de **la colonne de gauche** correspondant au « **logement actuel** » du tableau ci-dessous :

- Oui, date ___/___/___

Merci de répondre aux questions **des deux colonnes** : « **logement actuel** » puis « **logement ancien** » du tableau ci-dessous :

Questions	Logement actuel	Logement ancien
<p>12. Nombre de plantes d'intérieur dans le logement :</p> <p>12a. Des produits d'entretien ont-ils été utilisés sur ces plantes d'intérieur ?</p> <p>12b. Les produits utilisés :</p> <p>12c. Les avez-vous appliqués, vous-même ?</p>	<p><input type="checkbox"/> 0. <i>passer à la question 13</i></p> <p><input type="checkbox"/> 1 à 5 <input type="checkbox"/> Plus de 5</p> <p><input type="checkbox"/> Non. <i>passer à la question 13</i></p> <p><input type="checkbox"/> Oui</p> <p><input type="checkbox"/> Non, préciser qui :</p> <p><input type="checkbox"/> Oui</p>	<p><input type="checkbox"/> 0. <i>passer à la question 13</i></p> <p><input type="checkbox"/> 1 à 5 <input type="checkbox"/> Plus de 5</p> <p><input type="checkbox"/> Non. <i>passer à la question 13</i></p> <p><input type="checkbox"/> Oui</p> <p><input type="checkbox"/> Non, préciser qui :</p> <p><input type="checkbox"/> Oui</p>
<p>13. Pendant votre grossesse, avez-vous traité contre les acariens ou les mites des literies des tapis ou des moquettes ?</p>	<p><input type="checkbox"/> Non</p> <p><input type="checkbox"/> Oui</p>	<p><input type="checkbox"/> Non</p> <p><input type="checkbox"/> Oui</p>
<p>14. Pendant votre grossesse avez-vous effectué ou fait effectuer une désinsectisation de votre logement contre les moustiques, les mouches, les puces, les cafards, etc. ?</p>	<p><input type="checkbox"/> Non</p> <p><input type="checkbox"/> Oui</p>	<p><input type="checkbox"/> Non</p> <p><input type="checkbox"/> Oui</p>

Questions	Logement actuel	Logement ancien
<p>15. Avez-vous habité un logement avec un jardin ou une cour?</p> <p>15a. Des produits phytosanitaires ont-ils été utilisés dans votre jardin ou dans votre cour (sur des fleurs, légumes, fruits, haie, etc.)?</p> <p>15b. Les avez-vous appliqués vous-même ?</p> <p>15c. Si vous les avez utilisés vous même, vous êtes-vous protégée?</p>	<p><input type="checkbox"/> Non. <i>passer à la question 16</i></p> <p><input type="checkbox"/> Oui</p> <p><input type="checkbox"/> Non. <i>passer à la question 16</i></p> <p><input type="checkbox"/> Oui, citer les produits utilisés</p> <hr/> <p><input type="checkbox"/> Non, préciser qui : _____</p> <hr/> <p><input type="checkbox"/> Oui</p> <p><input type="checkbox"/> Non</p> <p><input type="checkbox"/> Oui, préciser :</p> <p><input type="checkbox"/> Combinaison</p> <p><input type="checkbox"/> Masque coton</p> <p><input type="checkbox"/> Masque cartouche</p> <p><input type="checkbox"/> Gants coton</p> <p><input type="checkbox"/> Gants caoutchouc</p> <p><input type="checkbox"/> Blouse <input type="checkbox"/> Lunettes</p> <p><input type="checkbox"/> Autres, préciser :</p>	<p><input type="checkbox"/> Non. <i>passer à la question 16</i></p> <p><input type="checkbox"/> Oui</p> <p><input type="checkbox"/> Non. <i>passer à la question 16</i></p> <p><input type="checkbox"/> Oui, citer les produits utilisés</p> <hr/> <p><input type="checkbox"/> Non, préciser qui : _____</p> <hr/> <p><input type="checkbox"/> Oui</p> <p><input type="checkbox"/> Non</p> <p><input type="checkbox"/> Oui, préciser :</p> <p><input type="checkbox"/> Combinaison</p> <p><input type="checkbox"/> Masque coton</p> <p><input type="checkbox"/> Masque cartouche</p> <p><input type="checkbox"/> Gants coton</p> <p><input type="checkbox"/> Gants caoutchouc</p> <p><input type="checkbox"/> Blouse <input type="checkbox"/> Lunettes</p> <p><input type="checkbox"/> Autres, préciser :</p>
<p>16. Le logement est-il entouré de jardins (privés, publics, ouvriers, etc.) et/ou d'espaces verts ?</p>	<p><input type="checkbox"/> Non</p> <p><input type="checkbox"/> Oui</p>	<p><input type="checkbox"/> Non</p> <p><input type="checkbox"/> Oui</p>
<p>17. Utilisez-vous l'eau d'un puits privé (pour boire, arroser le jardin potager, arroser les fleurs, remplir une piscine, etc.) ?</p>	<p><input type="checkbox"/> Non</p> <p><input type="checkbox"/> Oui, les principales utilisations pendant votre grossesse</p> <hr/>	<p><input type="checkbox"/> Non</p> <p><input type="checkbox"/> Oui, les principales utilisations pendant votre grossesse</p> <hr/>
<p>18. Existe-il des champs cultivés à moins de 1 Km de l'habitation ?</p> <p>18a. Préciser le type de culture qu'on y trouve si vous le savez ?</p>	<p><input type="checkbox"/> Non. <i>passer à la question 19</i></p> <p><input type="checkbox"/> Oui</p> <hr/>	<p><input type="checkbox"/> Non. <i>passer à la question 19</i></p> <p><input type="checkbox"/> Oui</p> <hr/>
<p>19. Existe-il une autoroute, des voies ferrées ou un aéroport près de votre habitation ?</p>	<p><input type="checkbox"/> Non</p> <p><input type="checkbox"/> Oui</p>	<p><input type="checkbox"/> Non</p> <p><input type="checkbox"/> Oui</p>
<p>20. Existe-il des établissements industriels fabriquant des pesticides près de l'habitation ?</p>	<p><input type="checkbox"/> Non</p> <p><input type="checkbox"/> Oui</p> <p><input type="checkbox"/> Je ne sais pas</p>	<p><input type="checkbox"/> Non</p> <p><input type="checkbox"/> Oui</p> <p><input type="checkbox"/> Je ne sais pas</p>

Les informations concernant votre identité dans cette page sont strictement confidentielles et utilisées uniquement pour servir cette étude.

A- Vous :

Nom : _____ Prénom : _____

Date de naissance : ___/___/___

Adresse de résidence : _____

Commune: _____ code postal : _____

Souhaitez-vous être informée des résultats de l'étude PHYSIO'MECO ?

Non Oui

Acceptez-vous d'être contactée si besoin (demande de précisions notamment)?

Non Oui

Téléphone : _____.____.____.____.____ / _____.____.____.____.____

E-mail : _____

*** En cas de déménagement pendant la grossesse :**

Ancienne adresse : _____

Commune: _____ code postal : _____

Niveau d'études le plus élevé atteint (même si vous n'avez pas obtenu le diplôme) :

Primaire Collège Lycée Etudes supérieures

B- Votre / Vos bébé(s)

Nom : _____ Prénom(s) : _____

Date de naissance : ___/___/___

Sexe : M M
 F F

Commentaires et informations complémentaires :

FIN DU QUESTIONNAIRE
Merci de votre participation

Annexe 3. Résultats des analyses statistiques de l'impact des pesticides étudiés sur les désaturations sans bradycardie (-B) pendant le sommeil. Désat : désaturation ; NS : non significatif ; LD : limite de détection ; méd : médiane ; Abs. : absence ; Prés. : présence ; Corr. : corrélation de Spearman ; Isopro. : isoproturon ; Cyper. : cyperméthrine. $f_{\text{Désat}}$: fréquence des désaturations.

Valeurs de p		DEP				DETP		DMP	DMDTP	Isopro.	Cyper.	Champ	S_{Alim}	
		<LD vs [LD-méd]	[LD-méd] vs >méd	<LD vs >méd	Corr.	[LD-méd] vs >méd	Corr.	Abs. vs Prés.	Abs. vs Prés.	Abs. vs Prés.	Abs. vs Prés.	Non vs Oui	<méd vs >méd	Corr.
Désat -B														
Durée moyenne	TTS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
	SA	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
	SC	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
$f_{\text{Désat}}$	TTS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
	SA	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
	SC	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Chute moyenne SaO ₂	TTS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	0,02	0,04	NS	NS	NS
	SA	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	0,01	NS	NS	NS	NS
	SC	NS	NS	NS	NS	NS	NS	0,03	NS	NS	NS	NS	NS	NS

RÉSUMÉ

Contexte : Pendant la grossesse, le fœtus est exposé à de nombreuses substances chimiques. En raison de leurs propriétés neurotoxiques, l'exposition chronique aux pesticides pendant cette période cruciale pour la croissance et le neurodéveloppement pourrait représenter un risque pour la mise en place des fonctions neurovégétatives responsables du maintien de l'homéostasie du nouveau-né.

Objectifs : Notre étude avait pour objectifs d'évaluer l'exposition chronique du fœtus aux pesticides et d'en étudier l'impact sur des fonctions essentielles pour le nouveau-né prématuré que sont le sommeil, la ventilation et son contrôle, ainsi que le contrôle cardiovasculaire.

Matériels et méthodes : 31 nouveau-nés prématurés (âge gestationnel : $31,1 \pm 1,6$ semaines d'aménorrhées) ont été inclus dans notre étude. L'évaluation de l'exposition aux pesticides des enfants a été réalisée par questionnaire d'exposition maternelle complété par le dosage de certains pesticides dans le méconium des nouveau-nés. Les paramètres hypniques et cardiovasculaires ont été obtenus lors d'une polysomnographie nocturne. La sensibilité des chémorécepteurs périphériques a été évaluée par un test hypoxique (15% O₂) réalisé dans chacun des stades de sommeil.

Résultats : 100% des nouveau-nés présentaient au moins un des pesticides recherchés dans leur méconium, et pour 58,3% d'entre eux, plus de 3 substances ont été retrouvées. Les pesticides les plus fréquemment détectés étaient de la famille des organophosphorés et majoritairement leurs métabolites communs (DEP : 66,7% et DETP : 100%). Nos résultats ont montré un impact des pesticides sur la structure du sommeil avec un temps de sommeil plus court (DMP), et une proportion de sommeil agité plus importante et de sommeil calme plus faible (DEP). Les enfants avaient également un sommeil plus fractionné lorsque les mamans étaient exposées aux pesticides par l'alimentation. En ce qui concerne la ventilation, nos résultats ont montré des effets hétérogènes avec une ventilation de base plus élevée en présence de DEP (+18%) mais plus faible en présence de DMDTP (-14%) ou lors d'une exposition aux pesticides par la voie alimentaire. La sensibilité des chémorécepteurs périphériques était également plus faible chez les enfants exposés au DMDTP. Enfin, la balance sympatho-vagale était perturbée par l'exposition aux pesticides.

Conclusion : Nos résultats suggèrent que l'exposition chronique aux pesticides pourrait entraîner des dysfonctionnements des fonctions neurovégétatives du nouveau-né prématuré (sommeil, ventilation et système cardiovasculaire) les rendant plus vulnérables face à divers stress cardio-ventilatoires.

Mots clés : nouveau-nés prématurés, pesticides, exposition chronique, sommeil, ventilation, chémorécepteurs périphériques, système cardiovasculaire.

DEP : Diéthyl phosphate ; DETP : Diéthyl thiophosphate ; DMP : Diméthyl phosphate ; DMDTP : Diméthyl dithiophosphate.