



Etude ZIP

Zika Interaction Pesticides

1. Contexte et justification scientifique

1.1. Virus Zika et neurotoxicité

Le virus Zika (ZIKV) est un arbovirus de la famille des flavivirus, proche des virus de la dengue et de la fièvre jaune. Isolé en 1947 dans la forêt Zika en Ouganda, on lui connaît deux lignages : un africain et un asiatique. Ses vecteurs sont des moustiques de la famille des *Aedes* (*Aegypti* principalement, *Albopictus*,...). La transmission vectorielle est le mode de transmission principal dans les pays où un vecteur est implanté ; d'autres voies de transmission étant également avérées : transmission sexuelle, materno-foetale, materno-neonatale et transfusion sanguine (SpF, 2017).

Selon le dernier bilan de l'Organisation mondiale de la Santé (OMS, 2017), le ZIKV a touché 33 Etats entre janvier 2014 et février 2016. Les régions qui ont été les plus impactées sont l'Amérique latine et les Caraïbes : au premier rang, le Brésil avec 1,5 millions de cas où cette épidémie a révélé que des complications neurologiques sévères (microcéphalies et autres défauts congénitaux détectables par l'échographie fœtale ou à la naissance) pouvaient survenir chez le fœtus et le nouveau-né de mères infectées par le ZIKV au cours de la grossesse (Schuler-Faccini et al. 2016, Oliveira Melo et al. 2016, Mlakar et al. 2016, Brasil et al. 2016, Driggers et al. 2016).

L'ARN viral a pu être mis en évidence par RT-PCR dans des échantillons de liquide amniotique provenant de femmes enceintes chez lesquelles le diagnostic intra-utérin de microcéphalie avait été porté par échographie (Oliveira Melo et al. 2016, Besnard et al. 2016) illustrant la possibilité de passage transplacentaire du ZIKV. L'ARN viral et les particules virales ont pu être également détectés par RT-PCR ou microscopie électronique dans le cerveau de fœtus pour lesquels le ZIKV avait été isolé suite à des interruptions de grossesses (Mlakar et al. 2016; Driggers et al. 2016). Le fait qu'aucune microcéphalie n'ait été détectée chez 57 enfants nés de mères séronégatives pour le ZIKV alors que 4 microcéphalies ont été détectées parmi les enfants nés de 117 mères séropositives pour le ZIKV d'une cohorte brésilienne (Brasil et al. 2016) est venu renforcer l'hypothèse du lien entre l'infection virale et la survenue d'une fœtopathie, sans pour autant le prouver.

La nature causale de cette association a été étayée par une étude menée en Polynésie française suite à l'épidémie de Zika survenue entre octobre 2013 et avril 2014 et qui avait conduit à une augmentation significative du nombre de cas de microcéphalie associées à l'infection mères par le ZIKV pendant la grossesse ; le risque le plus élevé de fœtopathie étant associé à une infection survenant au cours du premier trimestre de grossesse (Cauchemez et al. 2016). La plausibilité biologique que le ZIKV puisse être neurotrope et neurotoxique pour le fœtus lors de la période prénatale a été également documentée par une étude ayant montré l'existence d'un taux élevé d'infection par le ZIKV dans des cellules souches neurales corticales humaines mais pas dans des cellules souches embryonnaires ou pluripotentes (Tang et al. 2016).

Enfin, en plus des anomalies du système nerveux central liées à une infection par le ZIKV au cours de la grossesse, il est vraisemblable que certains troubles neurosensoriels puissent être détectés ultérieurement, comme cela a été montré dans d'autres infections virales tératogènes comme la rubéole ou l'infection à CMV (Townsend et al. 2013), justifiant le suivi clinique des enfants asymptomatiques nés de mères infectées par le ZIKV au cours de la grossesse (Bill G 2017).

D'autres facteurs étiologiques peuvent également être impliqués ou interagir comme cofacteurs dans la neurotoxicité virale. De fait, la microcéphalie a été associée à diverses maladies génétiques (infectieuses ou non contagieuses) et à des expositions du fœtus à des substances toxiques : médicaments, alcool, tabac, pesticides...

1.2. Pesticides et neurotoxicité

Les pesticides constituent une catégorie de produits destinés à lutter contre les nuisances biologiques, qu'il s'agisse d'insectes (insecticides), acariens (acaricides), champignons (fongicides) ou de plantes adventices (herbicides).

Les modes d'action des pesticides sont multiples et visent des fonctions indispensables à la survie de l'organisme cible : photosynthèse, division cellulaire, activité mitochondriale, transmission nerveuse, etc. Nombreux insecticides de synthèse ont été conçus pour agir spécifiquement sur le système nerveux de l'insecte en modifiant l'acétylcholinestérase, les récepteurs GABA, les canaux sodium, les canaux chlorures glutamate-dépendants ou le récepteur nicotinique de l'acétylcholine ; la plupart de ces mécanismes biologiques étant présents également chez l'Homme.

L'usage des pesticides suscite donc de nombreux questionnements sur leurs conséquences sur la santé humaine, qu'il s'agisse de la santé des utilisateurs-applicateurs dans un cadre professionnel ou de celle de la population générale secondaire à la contamination des milieux (eaux, air, sols...) et de la chaîne trophique alimentaire. Les familles d'insecticides à potentiel neurotoxique les plus utilisées à travers le monde sont principalement les organophosphorés, et carbamates, les pyréthriinoïdes, les néonicotinoïdes et les organochlorés.

Chez l'homme, outre les effets neurologiques connus des insecticides lors d'expositions à doses élevées ou répétées, généralement dans des circonstances d'intoxication aiguë (tentatives d'autolyse, empoisonnement) et/ou d'usage professionnel, de nombreux travaux épidémiologiques suggèrent que l'exposition liée aux contaminations alimentaires et environnementales ou aux usages domestiques à ces produits, en particulier pendant des périodes critiques telles que la grossesse, pourrait conduire à une réduction du périmètre crânien à la naissance et à des atteintes sensorielles, motrices, cognitives ou comportementales chez l'enfant (Berkowitz et al. 2004, Chevrier et al. 2011, Inserm 2013, Oulhote et al. 2014, Viel et al. 2015).

1.3. Pesticides et Zika en Guadeloupe

Les régions tropicales se caractérisent par de fortes chaleurs et des taux d'humidité très élevés. Ces conditions climatiques favorisent le développement de nombreuses nuisances biologiques affectant de multiples activités économiques (élevage et agriculture notamment) et la santé de l'homme. Cela concerne également la prolifération d'insectes vecteurs d'agents pathogènes comme les moustiques transmetteurs d'arbovirus.

De par sa position géographique, la Guadeloupe est ainsi concernée par un usage important (actuel et/ou passé) de pesticides, notamment d'insecticides ; la culture bananière et dans une moindre mesure la culture de la canne à sucre, ayant été et constituant toujours des activités agricoles majeures. La culture de la banane est ainsi reconnue comme étant l'une des activités agricoles utilisant le plus de pesticides, principalement carbamates et organophosphorés, tant en termes de quantités épandues par hectares de surface agricole qu'en termes de fréquences annuelles de traitements (Edmond-Mariette et al. 2005, Procaccia et al. 2009). Quant à la lutte antivectorielle dans ce territoire, elle a principalement recours à des insecticides pyréthrinoïdes. Concernant les usages domestiques, il s'agit ici encore principalement d'insecticides de la famille des organophosphorés ou des pyréthrinoïdes.

1.3.1. Cas particulier du chlordécone

La Guadeloupe subit une pollution chronique au chlordécone, un insecticide organochloré employé entre 1973 et 1993 pour lutter contre le charançon du bananier. Du fait de sa faible dégradation biotique et abiotique, le chlordécone est toujours présent dans les sols (Cabidoche et al. 2009) et contamine les eaux de consommation et de nombreuses denrées alimentaires végétales et animales (Dubuisson et al, 2007). Cette pollution a entraîné une contamination généralisée des populations adultes, femmes enceintes, nouveau-nés et enfants (Guldner et al. 2010, Multigner et al. 2016). En dépit des mesures de protection mises en place par les autorités au cours de ces quinze dernières années, de nombreuses denrées alimentaires, en particulier provenant de réseaux courts non commerciaux, sont toujours contaminées. De fait, même si ces mesures ont entraîné une diminution de la contamination de la population, celle-ci reste toujours présente (Guldner et al. 2011).

Le chlordécone est une molécule dont la neurotoxicité est bien documentée chez l'animal de laboratoire, femelle gestante, prépubaire et adulte (Faroon et al. 1995). Il traverse la barrière placentaire et l'exposition pendant la gestation induit chez la progéniture des troubles neurologiques, moteurs et comportementaux. Les mécanismes biologiques mis en jeu pour expliquer cette neurotoxicité sont encore imprécis mais ciblent principalement la capture, sécrétion ou transport des neurotransmetteurs (sérotonine, noradrénaline, dopamine, GABA,...) par inhibition de nombreuses ATPases.

Une cohorte mère-enfant (TIMOUN), mise en place en Guadeloupe et destinée à identifier les conséquences de la pollution au chlordécone sur le déroulement de la grossesse et sur le développement de l'enfant, a apporté des connaissances chez l'Homme. L'exposition prénatale à ce pesticide a ainsi été retrouvée comme étant associée de manière significative chez l'enfant âgé de 7 mois à des plus faibles scores de tests neurologiques évaluant la vitesse d'acquisition d'information visuelle (test de Fagan) et le développement de la motricité fine (échelle de Brunet-Lezine) (Dallaire et al. 2012). Chez l'enfant âgé de 18 mois, l'exposition prénatale au chlordécone a également été retrouvée associée de manière significative à une réduction du score estimant la motricité fine (ASQ) (Boucher et al. 2013). Une analyse stratifiée par sexe montre que cette association est limitée aux enfants de sexe masculin. Ces observations sont cohérentes avec les observations faites chez l'animal

de laboratoire ainsi qu'avec les propriétés hormonales estrogéniques du chlordécone (Hammond et al. 1979, Eroschenko 1981, Vonier et al. 1996, Kuiper et al. 1998, Lemaire et al. 2005).

1.3.2. Epidémie de Zika

Une épidémie due au ZIKV s'est déclarée en Guadeloupe en avril 2016. Le pic épidémique a été atteint la première semaine de juin avec 2760 cas. Au total, elle a duré 22 semaines avec plus de 30 500 cas cliniquement évocateurs (SpF, 2017) dont 639 cas biologiquement confirmés par RT-PCR chez des femmes enceintes pour lesquelles, en janvier 2017, 8 microcéphalies et 5 autres malformations cérébrales fœtales ont été détectées à l'échographie (SpF, 2017).

1.3.3. Rôle des co-expositions

L'étude des conséquences sanitaires des co-expositions à des agents chimiques et biologiques, en particulier lorsque ces agents partagent des modes d'action ou constituent des dangers de nature similaire, constitue un domaine de recherche encore très peu étudié.

En raison de la co-exposition de la population guadeloupéenne à des arboviroses à tropisme neurologique comme l'infection à ZIKV et à des pesticides neurotoxiques comme le chlordécone, il apparaît donc pertinent d'étudier les conséquences d'une exposition conjointe au cours de la grossesse à ces agents sur le neuro-développement des enfants. L'épidémie de ZIKV qui vient de sévir en Guadeloupe, constitue une opportunité unique pour étudier l'interaction entre l'exposition à cet agent biologique et l'exposition à des pesticides neurotoxiques.

2. Objectifs

L'objectif de l'étude ZIP est d'évaluer l'effet conjoint (*i.e.* interaction) de la présence simultanée de l'infection par le virus Zika et de l'exposition à des pesticides neurotoxiques au cours de la grossesse dans la survenue d'anomalies morphologiques et fonctionnelles du développement du système nerveux du fœtus à la naissance et du nourrisson à l'âge de 18 mois.

3. Méthodes

3.1. Principe

L'étude ZIP est une étude de cohorte ancillaire monocentrique de l'étude multicentrique ZIKA-DFA-FE (*Étude observationnelle des conséquences de l'infection à virus Zika au cours de la grossesse pendant l'épidémie des départements français d'Amérique de l'année 2016*). Elle est complémentaire de l'étude ZIKA-DFA-BB (*Étude observationnelle des conséquences néonatales et pédiatriques de l'infection à virus Zika au cours de la grossesse pendant l'épidémie des départements français d'Amérique de l'année 2016*). L'objectif des études ZIKA-DFA est de collecter, dans le cadre des pratiques habituelles de soins, des informations cliniques et paracliniques (comportant des résultats d'imagerie et de biologie) ainsi qu'une collection biologique, permettant de décrire de façon précise les conséquences chez le fœtus et chez l'enfant de l'infection à ZIKV lorsqu'elle survient au cours de la grossesse. Mises en place en 2016 dans les Départements Français d'Amérique (DFA) par le CIC Inserm 1424, le promoteur de ces études l'Inserm.

Dans l'étude ZIP, les expositions à des pesticides neurotoxiques seront estimées par la mesure de leurs concentrations dans des matrices biologiques à partir de prélèvements réalisés chez les mères à l'occasion de leur accouchement. Ces données seront ensuite mises en relation avec celles collectées dans l'étude ZIKA-DFA-FE et issues de l'évaluation neuropsychologique du jeune enfant réalisée à l'âge de 18 mois. Le promoteur de l'étude ZIP est l'Inserm.

3.2. Population

La population de l'étude ZIP portera sur les femmes incluses dans l'étude ZIKA-DFA-FE accouchant à la maternité du CHU de Pointe à Pitre/Abymes en Guadeloupe et leurs enfants faisant l'objet d'un suivi dans le cadre de l'étude ZIKA-DFA-BB.

3.3. Mesures des expositions

3.3.1. Exposition au ZIKV

La fréquence des formes cliniques pauci ou asymptomatiques suite à une infection par le ZIKV est élevée, de l'ordre de 70 à 80% (HCSP 2015). Par ailleurs, les « fenêtres » au cours desquelles il est possible de mettre en évidence le génome du ZIKV par PCR dans le sang ou dans les urines sont étroites : virémie de 7 jours et virurie de 10 jours à compter de la date de début des signes cliniques (HAS, 2016). De ce fait, toutes les femmes incluses dans la cohorte ZIKA-DFA-FE bénéficieront d'un test sérologique anti-ZIKV ELISA disponible depuis janvier 2016 (Euroimmun[®], Hully 2016), réalisé sur un prélèvement sanguin effectué au moment de l'accouchement, et ce quel qu'ait été leur statut au cours de la grossesse ou lors de l'accouchement vis-à-vis de l'infection par le ZIKV (asymptomatique, symptomatique, PCR- ou PCR+).

Dans l'étude ZIP, les cas de Zika biologiquement confirmés seront définis selon l'algorithme retenu dans la cohorte ZIKA-DFA-FE prenant en compte le statut clinique, le résultat de la PCR prescrite le cas échéant au cours de la grossesse et le résultat de la sérologie ZIKV (détection IgM et/ou IgG).

3.3.2. Exposition aux substances chimiques

3.3.2.1. Prélèvements

Un prélèvement de sang maternel (10 ml de sang veineux périphérique sur EDTA) est effectué lors de l'accouchement. Un aliquot de sang total est prélevé, puis le restant est centrifugé pour collecter le surnageant (plasma). Sang total et plasma sont conservés à -30°C par le CRB du CHU de la Guadeloupe. Les prélèvements sanguins seront acheminés au laboratoire d'analyse par voie aérienne en emballage UN 3373 sous température dirigée congelée (-80°C). Ces échantillons permettront d'estimer les expositions à plusieurs contaminants chimiques par la mesure des concentrations sanguines du chlordécone, ainsi que d'autres contaminants connus pour influencer le neuro-développement : autres composés organochlorés, p-p' DDE, PCB153 ; métaux lourds, Hg, Pb, Cd ; oligoéléments, Se.

En suites de couches, un prélèvement de cheveux est réalisé chez la mère. Il est réalisé au niveau de la nuque visant à recueillir une mèche compressée de 2 mm de diamètre, coupée le plus près possible du cuir chevelu et sur une longueur de 9 cm si possible (partant de la croissance mensuelle d'1 cm par mois, les 9 cm permettent de couvrir une durée de grossesse normale). L'extrémité radiculaire est identifiée par un élastique maintenant la mèche. La mèche est conservée dans une enveloppe papier puis scellée, comportant le n° patient sur le dessus et conservé à température ambiante. Les prélèvements de cheveux seront acheminés au laboratoire d'analyse via un transport « bagages accompagnés ». Le prélèvement permettra d'estimer l'exposition à des pesticides (molécules mères et/ou métabolites) non persistants (insecticides organophosphorés, carbamates et pyréthrinoïdes).

3.3.2.2. Analyses chimiques

Les analyses chimiques seront réalisées au LERES.

- *Dans le sang*

Les métaux et oligoéléments seront analysés par analyse ICP-MS/MS après une étape de dilution. Le laboratoire ayant déjà l'expérience de l'analyse du Pb et du Cd dans le sang après dilution, une étape d'adaptation de la méthode existante sera réalisée pour intégrer le mercure et le sélénium en s'appuyant sur la méthode Jones (Jones et al. 2017).

Les pesticides persistants (chlordécone et p,p'-DDE) et les PCB seront isolés de la matrice par extraction sur phase solide (SPE), puis les extraits obtenus seront purifiés avant d'être analysés une première fois pour le chlordécone (méthode spécifique) et une seconde fois pour le p,p'-DDE et les PCB par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse en tandem (GC/MS/MS). Pour fiabiliser la quantification et garantir la qualité des résultats, des étalons internes marqués (deutérés ou marqués au carbone 13 ou à l'azote 15) seront utilisés et introduits dans l'échantillon dès le début du protocole afin de corriger d'éventuels pertes d'analytes ou effets de matrice au cours de l'analyse.

Les procédures qualité en vigueur au LERES seront appliquées à la campagne d'analyses. Le laboratoire aura notamment recours à des contrôles internes et externes (matériaux de référence certifiés tels que : les SRM 1957 (Organic Contaminants in Non-Fortified Human Serum) et 1958 (Organic Contaminants in Fortified Human Serum) proposés par le NIST (National Institute of Standards and Technology). Par ailleurs, Le LERES participe à des essais inter-laboratoires dont les programmes d'assurance qualité externes (PAQE) de l'Institut national de santé publique Québec (INSPQ).

- *Dans les cheveux*

Les pesticides (molécules mères et/ou métabolites) non persistants (malathion, dialkylphosphates (DAP), perméthrine, deltaméthrine, cyperméthrine, 3PBA, 4F3PBA, cis-/trans-DCCA, cis-DBCA, oxamyl, propoxur, propamocarbe HCl) seront dosés dans les cheveux.

Les cheveux seront tout d'abord pulvérisés à l'aide d'un broyeur à bille afin d'obtenir une poudre homogène sans dégradation des substances d'intérêt. Celles-ci seront ensuite extraites de la poudre de cheveux par extraction accélérée par solvant (ASE) à l'aide d'un automate. Les extraits obtenus seront ensuite purifiés avant d'être analysés par chromatographie en phase liquide ultra haute performance couplée à la spectrométrie de masse en tandem (UHPLC/MS/MS) ou haute résolution (UHPLC/HRMS).

Le LERES qui a l'expérience de l'analyse de pesticides et métabolites de pesticides dans les urines (en particulier sur une liste très proche de celle du projet ZIP) travaille également depuis plusieurs années sur le dosage de micropolluants organiques et inorganiques dans les cheveux (Verrey et al 2017). Une étape d'adaptation des méthodes existantes sera réalisée selon les procédures internes en vigueur au LERES répondant aux exigences du comité français d'accréditation (Cofrac) et s'appuiera sur l'expertise du LERES et la littérature scientifique récente (Duca et al. 2014).

3.3.3.3. Questionnaires en suites de couches

Un questionnaire (20 à 30 min) relatif aux expositions aux pesticides pendant la grossesse est passé en suite de couches à chaque femme ayant accouché, en vis-à-vis par une enquêtrice formée sur la base d'un questionnaire structuré en un ensemble d'*items* complémentaires à ceux déjà prévus dans l'étude ZIKA-DFA-FE. Ces informations portent sur l'exposition aux pesticides pendant la grossesse et des paramètres pouvant constituer des facteurs de confusion vis-à-vis de cette exposition : taille et

poids de la mère au début de la grossesse, poids en fin de grossesse, niveau d'études de la mère et du père, situation familiale, activités professionnelles en début de grossesse, utilisation de pesticides et biocides à usage professionnel ou domestique, avant et/ou début de la grossesse, activité professionnelle du père biologique ...

3.4. Questionnaires d'évaluation neuropsychologique

En sus de mesures échographiques in utero, anthropométriques et cliniques à la naissance évaluant le développement neurologique (et les éventuelles anomalies), le développement neuropsychologique (psychomoteur, sensoriel, comportemental) sera évalué spécifiquement à l'âge de 18 mois par des questionnaires validés, administrés à la mère. Seuls les enfants dont les parents ont donné leur accord de participation à l'étude ZIKA-DFA-BB pour une évaluation neuropsychologique, seront concernés.

Cette évaluation sera basée sur l'étude du développement global de l'enfant (Age and Stage Questionnaire - ASQ-3™ 18 mois) permettant l'évaluation de la communication, de la motricité globale, de la motricité fine, de la résolution de problèmes et des aptitudes individuelles ou sociales, ainsi que celle de son comportement (Child Behavior Checklist - CBCL) et de son profil sensoriel (réponses aux stimuli sensoriels et répercussions sur la performance occupationnelle de l'enfant - Dunn 2006). Le temps de passation de ces questionnaires se situe autour de 20 minutes.

Ils seront complétés par un court questionnaire afin d'évaluer les facteurs susceptibles d'influencer le développement de l'enfant qui n'auraient pas déjà été recueillis (durée d'allaitement, exposition au tabagisme et aux pesticides pendant l'enfance, relations parents-enfant, etc.).

3.5. Gestion des données

La gestion des données recueillies dans l'étude ZIKA-DFA-FE est assurée par l'unité Inserm CIC 1424. Les données sont saisies par les techniciens d'étude clinique du pôle régional Guadeloupe du CIC à partir des questionnaires anonymisés. Il s'agit d'une simple saisie sur case report form électronique (eCRF) implémenté sous l'application professionnelle ClinSight®. Le module Cs-Online de saisie en ligne des données intégré à ClinSight®, permet une transmission des données cryptées en mode SSL (jusqu'à 128 bits) directement par un navigateur. Un nom d'utilisateur et un mot de passe unique est fourni à chaque utilisateur (médecin, technicien d'étude clinique) pour se connecter à la base. L'historique de chaque donnée (avec l'ensemble des modifications, le nom de l'utilisateur et la date de modification) est tracé. La base de données fait l'objet d'une sauvegarde quotidienne sur un serveur géographiquement distant du serveur principal. Le logiciel ClinSight® respecte la norme 21 CFR Part 11.

Les données recueillies spécifiquement pour la cohorte ZIP (questionnaires, tests neuropsychologiques à 18 mois et résultats des analyses chimiques) sont gérées par l'Inserm U1085. Un code d'accès à la base ClinSight® permettra aux TEC de l'U1085, via le module Cs-Online, de saisir les données de la cohorte ZIP à partir des questionnaires et des résultats d'analyse anonymisés.

3.6. Analyses statistiques

Les mesures échographiques telles que le périmètre céphalique et le diamètre bipariétal, la vitesse de croissance de ces paramètres, le périmètre crânien, les tests de réflexes du nouveau-né, les scores d'Apgar à 5 min et les scores du développement neuropsychologique de l'enfant à 18 mois seront étudiés en lien avec les indicateurs d'exposition aux pesticides (*i.e.* exposition professionnelle, utilisation domestique et à proximité du domicile, concentrations mesurées dans les cheveux et les prélèvements sanguins).

Des modèles de régression multiple seront utilisés dans lesquels les concentrations biologiques de pesticides seront utilisées soit en variables catégorielles (modèle linéaire, analyse de variance) ou en variables continues lorsque le taux de détection est >70% (modèle de régression S splines ou polynomiale selon la forme de la relation dose-réponse testée). Ces relations dose-réponse seront étudiées séparément chez les enfants nés de mères infectées par ZIKV pendant la grossesse et chez les enfants non infectés, de façon à pouvoir mettre en évidence une interaction potentielle entre ces deux expositions à risque neurotoxique (*i.e.* test d'hétérogénéité des risques ou des pentes).

Les facteurs de confusion potentiels seront considérés dans les analyses, tels que : âge gestationnel, taille de la mère et du père, poids de la mère avant la grossesse, tabagisme de la mère, parité, niveau d'études de la mère et du père, consommation d'alcool chez la mère, prise de poids maternelle en cours de grossesse, diabète (gestationnel, type 1 ou 2), hypertension artérielle, allaitement et relations parent-enfant pour le suivi neuropsychologique, de même que l'exposition aux autres contaminants neurotoxiques estimée dans cette étude.

3.7. Nombre de sujets – Puissance de l'étude

Le nombre retenu de sujets à inclure est de 500 participants. La puissance associée à ce nombre est présentée dans les tableaux 1 et 2 ci-dessous, selon différents scénarii. A titre d'exemple, sur la base d'un risque de première espèce $\alpha = 5\%$, d'une prévalence d'un événement de santé de 20% (*i.e.* 20% des périmètres crâniens les plus petits, 20% des scores neuropsychologique les plus faibles), d'un RR attendu de 2 et d'une prévalence d'exposition de 30% dans la population, la puissance statistique est estimée à 88%.

Tableau 1. Puissance pour un facteur binaire d'exposition (ZIKV ou pesticides)

Prévalence de l'exposition (%)	RR attendu	Puissance statistique associée (%)
50%	1,5	48
	2,0	93
70%	1,5	40
	2,0	87
30%	1,5	44
	2,0	88

Tableau 2. Puissance pour une interaction entre deux facteurs (F1, F2) binaires d'exposition (ZIKV et pesticides)

Prévalence F1 et F2 (%)	RR attendu F1	RR attendu F2	RR présence conjointe (interaction multiple)	Puissance statistique associée (%)
50% et 50%	1,5	1,5	4,5 (x2)	41
	1,0	2,0	4,0 (x2)	40
	1,5	1,5	6,8 (x3)	77
70% et 50%	1,5	1,5	4,5 (x2)	34
	1,5	1,5	6,8 (x3)	68
30% et 50%	1,5	1,5	4,5 (x2)	36
	1,5	1,5	6,8 (X3)	72

Débutée mi-octobre 2016, 372 femmes ayant donné leur accord de participation à la cohorte ZICA-DFA-FE et ayant accouché au CHU de Pointe à Pitre/Abymes ont été incluses dans la cohorte ZIP à la date du 3/03/2017. Les inclusions se poursuivront jusqu'en août 2017, date correspondant aux derniers accouchements des femmes incluses dans la cohorte ZIKA-DFA-FE lors de l'épidémie de ZIKV survenue en Guadeloupe. Toutes ont fait l'objet de prélèvements biologiques et de questionnaires ; pour 215 des 372 femmes déjà incluses dans l'étude ZIP, une mèche de cheveux a pu être prélevée, soit un taux d'acceptation/faisabilité de 65%.

4. Partenaires

4.1. Laboratoire d'étude et de recherche en environnement et santé (LERES), EHESP, Rennes (Barbara le Bot, Fabien Mercier, Philippe Quénel)

Le LERES est le laboratoire d'analyse chimique et microbiologique de l'Ecole des Hautes Etudes en Santé Publique (EHESP) et une plateforme R&D de l'Unité Inserm 1085-Irset dans le champ de l'expologie humaine. Assurant des missions d'analyse et de recherche, il a l'expérience et les capacités technologiques nécessaires à la réalisation de vastes campagnes de mesure de contaminants d'intérêt dans diverses matrices environnementales et biologiques. Il dispose d'ores et déjà des équipements adaptés et performants pour mener à bien le projet (automate d'extraction accélérée par solvant (ASE), UHPLC/MS/MS, UHPLC/HRMS, GC/MS/MS). Ses compétences en développement analytique sont reconnues par le Comité français d'accréditation (portée flexible type B).

4.2. Equipe 3ERD "Exposure Assessment and Epidemiological Research on Environment, Reproduction and Development", Unité Inserm-IRSET n°1085, Rennes & Pointe-à-Pitre (Cécile Chevrier, Sylvaine Cordier, Philippe Kadhel, Leah Michineau, Philippe Quénel, Luc Multigner).

Cette équipe d'épidémiologie qui intervient depuis de nombreuses années aux Antilles (i.e. coordination de la cohorte TI MOUN) pour étudier les conséquences sanitaires des expositions au chlordécone et autres pesticides, réalise l'interrogatoire des mères et les prélèvements de cheveux, et coordonnera le suivi neuropsychologique à l'âge de 18 mois.

4.3. Inserm-CIC 1424, Pointe-à-Pitre (Bruno Hoen, Caroline Callier, Benoit Tressières).

Le site Guadeloupéen du CIC 1424 coordonne la mise en œuvre de l'étude multicentrique ZIKA-DFA-FE. Il intervient dans la réalisation des prélèvements de sang maternel lors de l'accouchement.

5. Organisation du projet

5.1. Année 1 (octobre 2017-octobre 2018)

- Fin des inclusions mères (08/2017)
- Saisie des données mères et enfants (06/2017-03/2018)
 - Données suivi de grossesse
 - Données anthropométriques nouveaux nés
 - Questionnaire « suites de couches »
- Démarrage suivi clinique des enfants à 18 mois (04/2018)

5.2. Année 2 (octobre 2018-octobre 2019)

- Fin suivi clinique des enfants à 18 mois (01/2019)
- Saisie des données enfants (05/2018-04/2019)
 - Données tests neuropsychologiques
- Analyses métaux lourds et oligo-éléments dans le sang (01/2019-10/2019)
- Analyses pesticides dans le sang et les cheveux (01/2019-01/2020)

5.3. Année 3 (octobre 2019-2020)

- Analyses statistiques (effets propres ZIKV, effets propres pesticides, effets conjoints)
- Rédaction et soumission d'articles scientifiques
- Communication auprès des autorités locales/régionales.

6. Actions de valorisation

Sur le plan scientifique, après définition des règles d'authorship, les résultats seront valorisés sous forme de communications dans des conférences internationales et sous formes de publications dans des revues internationales à comité de lecture.

Du point de vue des politiques publiques, ils seront présentés au niveau local aux représentants de l'Etat (Préfet et ARS) et des collectivités territoriales de Guadeloupe. Afin d'informer les autres pays de la région, ils seront également adressés à l'Office of Caribbean Program Coordination de l'Organisation Pan Américaine de la santé, basé à la Barbade.

Les méthodes et les résultats pourront également être valorisés lors de formation(s) initiales et/ou continue(s) délivrées à l'EHESP.

7. Considérations légales et éthiques

L'étude ZIKA-DFA-FE a reçu un avis favorable du Comité de Protection des Personnes Sud-Ouest et Outremer III en date du 24 février 2016 (n° CEBH 2016/03).

Le CIC Inserm 1424 et l'Unité Inserm U1085-Irset bénéficient d'une déclaration de méthodologie de référence MR-001, respectivement en date du 10 mars 2010 (n° 1417149) et du 13 janvier 2014 (n°1733556).

Un amendement concernant l'étude ZIP a été déposé auprès du promoteur.

8. Références

Berkowitz GS, Wetmur JG, Birman-Deych E et al. In utero pesticide exposure, maternal paraoxonase activity, and head circumference. *Environ Health Perspect* 2004;112:388-91

Besnard M, Lastere S, Teissier A, Cao-Lormeau V, Musso D. Evidence of perinatal transmission of Zika virus, French Polynesia, December 2013 and February 2014. *Euro Surveill* 2014;19(13)

Bill G, Kapogiannis M, Chakhtoura N, Hazra R et al. Bridging Knowledge Gaps to Understand How Zika Virus Exposure and Infection Affect Child Development. *JAMA Pediatr* 2017. doi:10.1001/jamapediatrics.2017.0002

Bodeau-Livinec F, Glorennec P, Cot M, Dumas P, Durand S, Massougbdji A, Ayotte P, Le Bot B. Elevated blood lead levels in infants and mothers in Benin and potential sources of exposure. *Int J Environ Res Public Health* 2016;13(3):pii: E316

Boucher O, Simard MN, Muckle G, Rouget F, Kadhel P, Bataille H, Chajès V, Dallaire R, Monfort C, Thomé JP, Multigner L, Cordier S. Exposure to an organochlorine pesticide (chlordecone) and development of 18-month-old infants. *Neurotoxicology* 2013;35:162-8

Brasil P, Pereira JP Jr, Raja Gabaglia C, et al. Zika virus infection in pregnant women in Rio de Janeiro - preliminary report. *N Engl J Med*. DOI:10.1056/NEJM oa1602412

Cabidoche YM, Achard R, Cattan P, Clermont-Dauphin C, Massat F, Sansoulet J. Long-term pollution by chlordecone of tropical volcanic soils in the French West Indies: a simple leaching model accounts for current residue. *Environ.Pollut* 2009;157:1697-1705

Cauchemez S, Ledrans M, Poletto C, Quénel P. et al. Local and regional spread of Chikungunya fever in the Americas. *Eurosurveillance* 2014;19(28):15-23

Cauchemez S, M Besnard, P Bompard, T Dub, P Guillemette-Artur, D Eyrolle-Guignot, Henrik Salje, M D Van Kerkhove, V Abadie, C Garel, A Fontanet, HP Mallet. Association between Zika virus and microcephaly in French Polynesia, 2013–15: a retrospective study. *The Lancet* 2016 [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)00651-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(16)00651-6) 2016

Chevrier C, Limon G, Monfort C, Rouget F, Garlandézec R, Petit C, Durand G, Cordier S., Urinary biomarkers of prenatal atrazine exposure and adverse birth outcomes in the PELAGIE birth cohort, *Environ Health Perspect* 2011;119:1034-41

Dallaire R, Muckle G, Rouget F, Kadhel P, Bataille H, Guldner L, Seurin S, Chajès V, Monfort C, Boucher O, Thomé JP, Jacobson SW, Multigner L, Cordier S. Cognitive, visual, and motor development of 7-month-old Guadeloupean infants exposed to chlordecone. *Environ Res* 2012;118:79-85

Daudens-Vaysse E, Ledrans, M, Gay N, Hoen B et al. Zika emergence in the French Territories of America and description of first confirmed cases of Zika virus infection on Martinique. *Eurosurveillance* 2016;21(28):11-16

Duca RC, Salquebre G, Hardy E, Appenzeller B. Comparison of solid phase- and liquid/liquid-extraction for the purification of hair extract prior to multi-class pesticides analysis. *Journal of Chromatography* 2014; B, 955–956, 98–107. <http://doi.org/10.1016/j.jchromb.2014.02.035>

Driggers RW, Ho C-Y, Korhonen, EM Kuivainen S, Jääskeläinen AJ et al. Zika Virus Infection with Prolonged Maternal Viremia and Fetal Brain Abnormalities. *NEJM* 2016 DOI: 10.1056/NEJMoa1601824

Dubuisson C, Héraud F, Leblanc JC, Gallotti S, Flamand C, Blateau A, Quenel P, Volatier JL. Impact of subsistence production on the management options to reduce the food exposure of the Martinican population to Chlordecone. *Regul Toxicol Pharmacol* 2007;49:5-16

Edmond-Mariette P, Le Guen J, Manscour LJ, Sauvadet F, Vialatte JS, Beaugendre J. Rapport d'information de la Commission des Affaires économiques, de l'environnement et du territoire sur l'utilisation du chlordécone et des autres pesticides dans l'agriculture martiniquaise et guadeloupéenne, 2005, n°2430. Assemblée nationale. <http://www.assemblee-nationale.fr/12/pdf/rap-info/i2430.pdf>

Eroschenko VP. Estrogenic activity of the insecticide chlordecone in the reproductive tract of birds and mammals, *J Toxicol Environ Health* 1981;8:731-742

Faroon O, Kueberuwa S, Smith L, DeRosa C. ATSDR evaluation of health effects of chemicals. II. Mirex and chlordecone: health effects, toxicokinetics, human exposure, and environmental fate. *Toxicol Ind Health* 1995;11:1-203

Guldner L, Multigner L, Héraud F, Monfort C, Thomé JP, Giusti A, Kadhel P, Cordier S. Pesticide exposure of pregnant women in Guadeloupe: ability of a food frequency questionnaire to estimate blood concentration of chlordecone. *Environ Res* 2010;110:146-51

Hammond B, Katzenellenbogen BS, Krauthammer N, McConnell J. Estrogenic Activity of the Insecticide Chlordecone (Kepone) and Interaction with Uterine Estrogen Receptors, *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1979;76:6641-6645

Haute Autorité de Santé. Détection du virus Zika par RT-PCR dans le sang et les urines – Argumentaire. 2016 ;32 pages. www.has-sante.fr/portail/upload/docs/application/pdf/2016/argumentaire_zika.pdf

Haut conseil de la santé publique. Prise en charge médicale des personnes atteintes par le virus Zika. Paris: HCSP; 2015. <http://www.hcsp.fr/explore.cgi/avisrapportsdomaine>

Huzly D, Hanselmann I, Schmidt-Chanasit J, Panning M. High specificity of a novel Zika virus ELISA in European patients after exposure to different flaviviruses. *EuroSurveill* 2016;21(16):pii=30203. DOI:<http://dx.doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2016.21.16.30203>

Inserm. Pesticides – effets sur la santé. Collection Expertise Collective; Editions Inserm, Paris, 2013

Jones DR, Jarrett JM, Tevis DS, Franklin M, Mullinix NJ, Wallon KL, Derrick Quarles CJ, Caldwell KL, Jones RL. Analysis of whole human blood for Pb, Cd, Hg, Se, and Mn by ICP-DRC-MS for biomonitoring and acute exposures. *Talanta* 2017;1(162):114-122. doi: 10.1016/j.talanta.2016.09.060

Kuiper GG, Lemmen JG, Carlsson B, Corton JC, Safe SH, Van der Saag PT, Van der Burg P, Gustafsson JA. Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor beta, *Endocrinology* 1998;139:4252-4263

Lemaire G, Balaguer P, Michel S, Rahmani R. Activation of retinoic acid receptor-dependent transcription by organochlorine pesticides, *Toxicology and Applied Pharmacology* 2005;202:38-49

Mlakar J, Korva M, Tul N, et al. Zika virus associated with microcephaly. *N Engl J Med* 2016; 374: 951-8

Multigner L, Kadhel P, Rouget F, Blanchet P, Cordier S. Chlordecone exposure and adverse effects in French West Indies populations. *Environ Sci Pollut Res Int* 2016 Jan;23(1):3-8

Oliveira Melo AS, Malingier G, Ximenes R, Szejnfeld PO, Alves Sampaio S, Bispo de Filippis AM. Zika virus

intrauterine infection causes fetal brain abnormality and microcephaly: tip of the iceberg? *Ultrasound Obstet Gynecol* 2016 Jan 1;47(1):6-7

OMS. Zika situation report 2017 <http://www.who.int/emergencies/zika-virus/situation-report/en/>

Oulhote Y, Bouchard MF. Urinary metabolites of organophosphate and pyrethroid pesticides and behavioral problems in Canadian children. *Environ Health Perspect* 2013;121:1378-84

Procaccia C, Le Deaut JY. Les impacts de l'utilisation de la chlordécone et des pesticides aux Antilles : bilan et perspectives d'évolution. Office parlementaire d'évaluation des choix scientifiques et technologiques, 2009, n°487 Sénat et n°1778. <http://www.assemblee-nationale.fr/13/pdf/rap-off/i1778.pdf>

Schuler-Faccini L, Ribeiro EM, Feitosa IM, Horovitz DD, Cavalcanti DP, Pessoa A, Doriqui MJ, Neri JI, Neto JM, Wanderley HY, Cernach M, El-Husny AS, Pone MV, Serao CL, Sanseverino MT; Brazilian Medical Genetics Society–Zika Embryopathy Task Force. Possible Association Between Zika Virus Infection and Microcephaly - Brazil, 2015. *MMWR* 2016;65(3):59-62. doi: 10.15585/mmwr.mm6503e2

Santé Publique France. Le virus Zika aux Antilles et en Guyane. *Bulletin de veille sanitaire* 2017;1:41

Santé Publique France. Surveillance du virus Zika aux Antilles et en Guyane. *Point épidémiologique* 2017;1:7

Tang H, Hammack C, Ogden SC, Wen Z, Qian X, Li Y, et al. Zika Virus Infects Human Cortical Neural Progenitors and Attenuates Their Growth. *Cell Stem Cell* 2016;18(5):587-90. doi: 10.1016/j.stem.2016.02.016

Townsend CL, Forsgren M, Ahlfors K, Ivarsson SA, Tookey PA, Peckham CS. Long-term outcomes of congenital cytomegalovirus infection in Sweden and the United Kingdom. *Clin Infect Dis* 2013;56(9):1232-9

Verrey D, Durand S, Lelévrier V, Quénel P, Le Bot B. New hair cleaning method for improve estimation of endogenous/exogenous metals contamination. *Environmental Research* 2017 (en révision)

Viel J.F, Warembourg C, Le Maner-Idrissi G, Lacroix A, Limon G, Rouget F, Monfort C, Durand G, Cordier S, Chevrier C. Pyrethroid insecticide exposure and cognitive developmental disabilities in children: The PELAGIE mother-child cohort. *Environ Int* 2015;82:69-75

Vonier PM, Crain D, McLachlan JA, Guillette LJ, Arnold SG. Interaction of Environmental Chemicals with the Estrogen and Progesterone Receptors from the Oviduct of the American Alligator. *Environmental Health Perspectives* 1996;104: 1318-1322
