



HAL
open science

Prédiction in silico de l'absorption intestinale et de la pénétration cérébrale des pesticides chez l'homme

Lisa Chedik

► **To cite this version:**

Lisa Chedik. Prédiction in silico de l'absorption intestinale et de la pénétration cérébrale des pesticides chez l'homme. Sciences du Vivant [q-bio]. 2017. dumas-01812006

HAL Id: dumas-01812006

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01812006>

Submitted on 11 Jun 2018

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

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

THÈSE D'EXERCICE / UNIVERSITÉ DE RENNES 1
sous le sceau de l'Université Bretagne Loire

Thèse en vue du

DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

présentée par

Lisa Chedik

**Prédiction *in silico* de
l'absorption
intestinale et de la
pénétration cérébrale
des pesticides chez
l'homme.**

Thèse soutenue à Rennes
Le 19 octobre 2017

devant le jury composé de :

Cédric LOGÉ

MCU Université de Nantes / *rapporteur*

Ronan GARLANTEZEC

MCU-PH Université Rennes 1 / *rapporteur*

Pascal LE CORRE

PU-PH Université Rennes 1 / *examineur*

Florian LEMAITRE

MCU-PH Université Rennes 1 / *examineur*

Olivier FARDEL

PU-PH Université Rennes 1 / *directeur de thèse*

Arnaud BRUYERE

MCU Université Rennes 1 / *co-directeur de thèse*

Listes des enseignants-chercheurs de la Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

PROFESSEURS

BOUSTIE Joël

BURGOT Gwenola

DONNIO Pierre Yves

FAILI Ahmad

FARDEL Olivier

FELDEN Brice

GAMBAROTA Giulio

GOUGEON Anne

LAGENTE Vincent

LE CORRE Pascal

LORANT (BOICHOT)
Elisabeth

MOREL Isabelle

SERGENT Odile

SPARFEL-BERLIVET Lydie

TOMASI Sophie

URIAC Philippe

VAN DE WEGHE Pierre

VERNHET Laurent

PROFESSEURS ASSOCIÉS

BUREAU Loïc

DAVOUST Noëlle

PROFESSEURS ÉMÉRITES

CILLARD Josiane

GUILLOUZO André

MAITRES DE CONFÉRENCES

ABASQ-PAOFAI Marie-
Laurence

ANINAT Caroline

AUGAGNEUR Yoann

BEGRICHE Karima

BOUSARGHIN Latifa

BRANDHONNEUR Nolwenn

BRUYERE Arnaud

BUNETEL Laurence

CHOLLET-KRUGLER
Marylène

COLLIN Xavier

CORBEL Jean-Charles

DAVID Michèle

DELALANDE Olivier

DELMAIL David

DION Sarah

DOLLO Gilles

GICQUEL Thomas

GILOT David

GOUAULT Nicolas

HITTI Eric

JEAN Mickaël

JOANNES Audrey

LEUREUR Valérie

LE FERREC Eric

LE PABIC Hélène

LEGOUIN-GARGADENNEC
BéatriceLOHEZIC-LE DEVEHAT
Françoise

MARTIN-CHOULY Corinne

MINET Jacques

NOURY Fanny

PINEL-MARIE Marie-Laure

PODECHARD Normand

POTIN Sophie

RENAULT Jacques

ROUILLON Astrid

ATER

HATAHET Taher

SMIDA Imen

COUM Amandine

Remerciements

Je remercie chaleureusement mes co-directeurs Olivier Fardel et Arnaud Bruyère, pour leur intérêt et leur soutien, leur grande disponibilité et nombreux conseils durant la rédaction de ma thèse.

Je remercie également Pascal Le Corre, Florian Lemaitre, Ronan Garlantezec et Cédric Logé d'avoir accepté d'être membre du jury et de juger ce travail de thèse.

Je tiens à remercier les collègues pharmaciens et préparateurs de la PUI du CHU de Rennes et les IDE qui étaient sympathiques en garde (celles qui ne nous réveillaient pas pour de l'euphytose à 2h du matin).

Je remercie également les internes avec qui j'ai passé de bons moments, tout particulièrement mes co-internes, V35, B35 et Caroline (pour les fous rires dans les églises !). Je remercie également mes camarades de promo et toutes les personnes qui m'ont entourée pendant ces années de pharma à Châtenay, notamment Camélia et Lina et les profs inspirants qui m'ont donné envie de faire de la recherche (coucou Mr Pinto).

Je remercie aussi les chats (Luna, Pilou et Bouille) qui ont partagé mes années d'études et m'ont manifesté leurs encouragements en s'allongeant sur le clavier et en ponctuant mes documents Word de « ezjhgsbdfbfgdgsdsffsd ».

Merci également aux collègues de l'Université Rennes 1, de l'IRSET et tout particulièrement à Yu, qui a partagé mon bureau et a égayé mes journées avec son sourire et sa bonne humeur et Manuella pour ses anecdotes mayennaises et ses relectures de manuscrit.

Je remercie aussi mes parents sans qui je ne serais pas née et mon frère sans qui je n'aurais pas appris l'alphabet. Je tiens également à remercier Dominique pour son soutien sans faille et ses plots « R » et Maya pour plus de choses qu'il n'y a de place pour les écrire.

Table des matières

Liste des abréviations	5
Liste des illustrations	6
Liste des tableaux	6
Résumé	7
I. Introduction	8
1) Les pesticides	8
a) Généralités	8
b) Classes et mécanismes d'actions	8
c) Utilisations des pesticides en France et en Europe	10
d) Exposition et imprégnation de la population aux pesticides	11
e) Toxicocinétique et effets toxiques des pesticides	17
2) Passage des membranes biologiques par les xénobiotiques	21
a) Absorption intestinale des xénobiotiques	23
b) Méthodes d'étude de l'absorption intestinale des xénobiotiques	24
c) Pénétration cérébrale des xénobiotiques	26
d) Méthodes d'études de la pénétration cérébrale des xénobiotiques	27
e) Méthodes <i>in silico</i> de prédiction de l'absorption intestinale et de la pénétration cérébrale des xénobiotiques	30
II. Objectifs de l'étude	34
III. Résultats	35
<i>Article. Prédiction in silico de l'absorption intestinale et de la pénétration cérébrale des pesticides chez l'homme.</i>	36
IV. Discussion et Conclusion	54
V. Références bibliographiques	59

Liste des abréviations

3-PBA: Acide 3-phenoxybenzoïque	Kp,uu: Coefficient de partage liquide interstitiel cérébral/plasma pour les molécules libres
ABC: ATP Binding Cassette	
AMPA: Acide aminométhylphosphonique	LMR: Limite maximale de résidus
BCRP: Breast Cancer Resistance Protein	LogBB: Logarithme du ratio de concentration en xénobiotiques dans le cerveau et dans le sang, mesuré à l'équilibre
BHE: Barrière hémato-encéphalique	
BOILED-Egg: Méthode d'estimation de la perméabilité intestinale et cérébrale	LogD: Coefficient de distribution octanol/eau
Br ₂ CA: Acide cis-3-(2,2-dibromo-vinyl)-2,2-diméthylcyclopropane-carboxylique	LogP: Coefficient de partage octanol/eau
CIRC: Centre international de recherche sur le cancer	LogPS: Coefficient perméabilité-surface
DDE: Dichlorodiphényldichloroéthylène	MRP: Multidrug resistance protein
DDT: Dichlorodiphényltrichloroéthane	PAMPA: Essai de perméabilité sur membranes artificielles en parallèle
ENNS: Etude nationale nutrition santé	Papp: Perméabilité apparente
FA : Fraction absorbée	P-gp : P-glycoprotéine
F-PBA: Acide 4-fluoro-3-phenoxybenzoïque	PSA: Surface polaire
HCB: Hexachlorobenzene	qSAR: Relation quantitative structure à activité
HCH: Hexachlorocyclohexane	SLC: Solute Carrier transporter
Kp: Coefficient de partage cerveau/plasma	SNC: Système nerveux central
	SVM: Machine à vecteurs de support

Liste des illustrations

Figure 1: Cibles des insecticides, herbicides et fongicides en pourcentages des ventes mondiales en 2013	9
Figure 2: Historique d'utilisation des pesticides	10
Figure 3: Pesticides les plus quantifiés dans les cours d'eau de métropole en 2013.....	12
Figure 4: Schéma des différents modes de passage des membranes par les xénobiotiques	21
Figure 5: Barrières pharmacocinétiques entre l'ingestion du xénobiotique et sa cible.....	23
Figure 6: Représentation du protocole expérimental d'étude de transport des xénobiotiques sur cellules Caco-2 en inserts.....	24
Figure 7: Facteurs influençant la pénétration cérébrale des xénobiotiques	26
Figure 8: Paramètres de pénétration cérébrale des xénobiotiques	29

Liste des tableaux

Tableau 1: Liste des substances les plus fréquemment quantifiées à fortes concentrations (> 30ng/m ³) entre 2001 et 2006 dans l'atmosphère de métropole	13
Tableau 2: Concentrations en pesticides les plus détectés dans l'air de 130 logements franciliens	13
Tableau 3: Exemples de pesticides classés par le CIRC	20

Résumé

Les pesticides sont des produits largement utilisés dans l'agriculture et dans la sphère domestique pour leurs propriétés insecticides, fongicides ou herbicides. Les humains sont largement exposés à ces composés tout au long de leur vie, notamment en consommant des aliments contenant des résidus de pesticides. De plus en plus de recherches scientifiques suggèrent que l'exposition aux pesticides est à l'origine de troubles métaboliques, hormonaux et neurologiques chez l'homme.

Ces effets néfastes sont tributaires de la capacité des pesticides ingérés à traverser une série de membranes biologiques très sélectives : la barrière intestinale pour accéder au flux sanguin, puis la barrière hémato-encéphalique pour accéder au système nerveux central.

Contrairement aux médicaments, ces phases clés du passage intestinal et cérébral sont peu décrites dans la littérature. L'objectif de notre étude a été de prédire l'absorption gastro-intestinale et le passage cérébral de 338 pesticides (appartenant entre autres aux classes des pyréthrinoïdes, des organophosphorés, des organochlorés, des carbamates et des triazines), en utilisant le logiciel en ligne SwissADME®.

Nos résultats montrent que 81% des pesticides étudiés seraient capables de traverser la barrière gastro-intestinale. Une proportion plus faible (39%) est prédite pour accéder au cerveau. Parmi ceux-ci, la famille des carbamates est la classe de pesticides la plus susceptible de traverser la barrière hémato-encéphalique.

Notre étude, basée sur une méthode *in silico* robuste et précise, apporte un nouvel éclairage sur la toxicocinétique et le devenir biologique des pesticides chez l'homme.

I. Introduction

1) Les pesticides

a) Généralités

« Pesticide » est un terme générique désignant les composés capables de tuer (du latin « caedere ») les nuisibles (du latin « pestis »). Ils sont largement utilisés en France et dans le monde pour leurs propriétés herbicides, insecticides, et fongicides. Certains composés possèdent également des propriétés désinfectantes, rodenticides, acaricides, molluscicides, algicides, nématocides, bactéricides ou encore régulatrices de croissance.

Très utilisés dans l'agriculture, ils sont également utilisés dans l'entretien des jardins, de la voirie, dans le traitement des bois, des bateaux, en traitement vétérinaire ainsi que dans la lutte insecticide au sein des foyers. Ils contribuent également à la lutte anti-parasitaire (nématocide, molluscicides...) et certains ont été, ou sont encore utilisés, comme médicaments (warfarine, métrifonate).

Les produits commerciaux contiennent souvent, en plus de ces substances actives, des adjuvants, solvants, conservateurs et parfois des impuretés ou des métabolites des molécules mères (1,2).

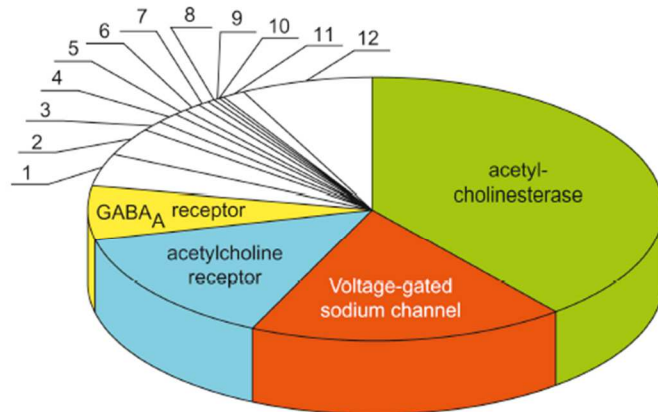
b) Classes et mécanismes d'actions

Les pesticides peuvent être classés en différentes familles chimiques selon leur structure. Les principales familles de pesticides sont les organochlorés, les organophosphorés, les pyréthriinoïdes, les carbamates et les triazines. De nouvelles classes de pesticides émergent régulièrement, et certaines classes ne comptent que quelques représentants (néonicotinoïdes, phtalimides...).

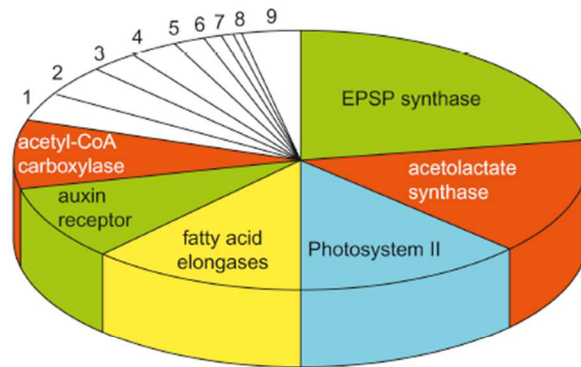
Les mécanismes d'action des pesticides sont variables (Figure 1) (3). Les insecticides agissent notamment sur le système cholinergique et les canaux sodiques et chlores (4–9). Les herbicides agissent sur la photosynthèse, la production de pigments, d'acides aminés et d'acides gras, ou encore la division cellulaire (10–15). Les fongicides altèrent la synthèse de stérols, la traduction et la division cellulaire, la synthèse protéique et lipidique et la perméabilité cellulaire (16–20).

insecticide (mostly neurotransmission)other targets

- 1 chitin biosynthesis
- 2 glutamate(chloride) receptor
- 3 acetyl-CoA carboxylase
- 4 ATP synthase
- 5 ecdysone receptor
- 6 uncoupler
- 7 Bt toxin
- 8 NADH dehydrogenase
- 9 succinic dehydrogenase
- 10 octopamine receptor
- 11 unspecific
- 12 unknown

herbicide (mostly plant specific pathways)other targets

- 1 tubulin
- 2 photosystem I
- 3 protoporphyrinogen IX oxidase
- 4 4-hydroxyphenyl pyruvate dehydrogenase
- 5 phytoene desaturase
- 6 glutamine synthase
- 7 others
- 8 unknown
- 9 unspecific

fungicide (mostly basic cellular functions)other targets

- 1 succinic dehydrogenase
- 2 protein His kinase (osmo sensor)
- 3 RNA polymerase
- 4 scytalone dehydratase
- 5 sterol $\Delta 14$ reductase
- 6 uncoupler
- 7 methionine biosynthesis
- 8 protein kinase (osmo sensing)
- 9 phospholipid biosynthesis
- 10 protein biosynthesis (ribosomes)
- 11 sterol 3-keto reductase
- 12 ATP synthase
- 13 chitin biosynthesis
- 14 dihydroorotate dehydrogenase
- 15 inositol biosynthesis
- 16 others, unknown

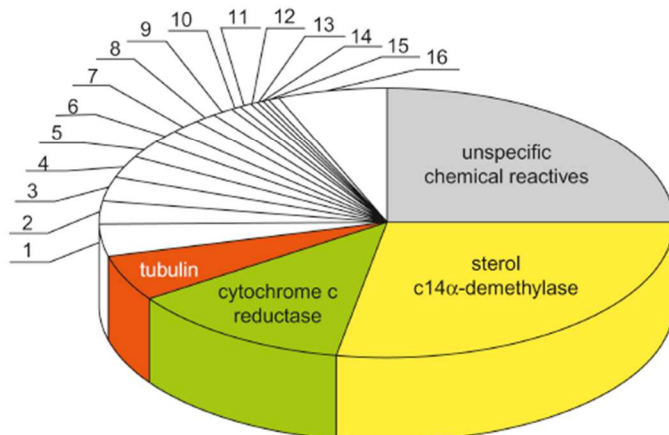


Figure 1: Cibles des insecticides, herbicides et fongicides en pourcentages des ventes mondiales en 2013.

Source : Hayes' Handbook of Pesticide Toxicology - Third Edition – Volume 1, d'après Tietjen, 2003

c) Utilisations des pesticides en France et en Europe

En 2017, en Union Européenne (UE), 493 substances actives phytopharmaceutiques sont approuvées et 28 sont en cours d'évaluation (21). La France est le troisième pays utilisateur de pesticides au monde (22), principalement dans un cadre agricole. Les pesticides aux propriétés fongicides y sont les plus employés, notamment dans les exploitations vigneronnes et céréalières, suivis des herbicides (culture du maïs et du colza) puis des insecticides (22).

En terme de familles chimiques, les organochlorés introduits dans les années 40 ont été largement utilisés comme insecticides en France jusqu'à leurs interdictions dans les années 70 à 90. Les organophosphorés ont fait leur apparition dans les années 50 et ont rapidement constitué une alternative aux organochlorés persistants. Aujourd'hui les utilisations des organophosphorés en usage agricole ou domestique sont de plus en plus restreintes. Les carbamates et les pyréthrinoïdes les ont progressivement remplacés et ces derniers constituent de nos jours la classe d'insecticides la plus utilisée en France et en Europe. Les néonicotinoïdes font quant à eux l'objet d'un moratoire européen et sont en passe d'être interdits en France et en Union Européenne.

Pour les herbicides, les triazines ont été très utilisées depuis les années 50 puis progressivement interdites dans les années 2000 (23). Le glyphosate est le désherbant le plus utilisé en France (deuxième pesticide le plus utilisé en termes de tonnage) (24). Enfin, le soufre est le fongicide le plus employé en France (pesticide le plus utilisé en tonnage).

	HERBICIDES	FONGICIDES	INSECTICIDES
Avant 1900	Sulfate de cuivre ● Sulfate de fer ●	Soufre ● Sels de cuivre ●	Nicotine ●
1900 - 1920	Acide sulfurique ●		Sels d'arsenic ●
1920 - 1940	Colorants nitrés ▼ ●		
1940 - 1950	Phytohormones... ●		Organo-chlorés ● Organo-phosphorés ▼ ●
1950 - 1960	Triazines, Urées substituées ● Carbamates ▼ ●	Dithiocarbamates ● Phtalimides ●	Carbamates ▼ ●
1960 - 1970	Dipyridyles ● Toluidines... ●	Benzimidazoles ●	
1970 - 1980	Amino-phosphonates ● Propionates... ●	Triazoles ● Dicarboximides ● Amides, Phosphites ● Morholines ●	Pyréthrinoïdes ● Benzoyl-urées (régulateurs de croissance) ●
1980 - 1990	Sulfonyl urées... ●		
1990 - 2000	▼▼▼▼▼	Phénylpyrroles ● Strobilurines ●	▼▼▼

Figure 2: Historique d'utilisation des pesticides (source : Union des industries de la protection des plantes)

d) Exposition et imprégnation de la population aux pesticides

L'exposition aux pesticides peut s'effectuer par voie respiratoire, cutanée ou par ingestion de poussières ou d'aliments contenant des traces de pesticides (25).

L'exposition professionnelle aux pesticides concerne essentiellement les agriculteurs, les professionnels de l'industrie phytosanitaire et de l'industrie du bois mais également les personnels d'entretien de voiries ou encore les jardiniers (26). Ce type d'exposition intervient surtout par voie cutanée (27). L'exposition de la population générale dépend des utilisations des pesticides au sein des foyers (entretien des jardins, traitement des plantes intérieures, du bois, utilisations antiparasitaires en usage vétérinaire ou anti-poux). Elle dépend également de la pollution de l'environnement intérieur et extérieur et de l'ingestion d'aliments contenant des traces de pesticides. C'est la voie orale qui constitue la principale source d'exposition de la population générale (25).

Les études menées par les agences sanitaires montrent que les pesticides sont largement présents dans l'ensemble des compartiments de notre environnement et dans notre alimentation (28).

Contamination aux pesticides des eaux françaises

Les pesticides les plus hydrosolubles/polaires (triazines, urées substituées) sont susceptibles de contaminer les eaux souterraines et les cours d'eau. 312 pesticides ont été recherchés dans les cours d'eau français en 2013 : leur présence a été retrouvée dans 92% des points de surveillance et dans 60% des cas, plus de dix pesticides différents ont été détectés (29). Les régions les plus touchées sont les zones du nord de la France, l'île de France et le Sud-Ouest (29). La Martinique est elle aussi touchée, du fait d'une contamination historique au chlordécone, pesticide persistant utilisé autrefois dans les bananeraies. Les pesticides les plus retrouvés dans les cours d'eau français en 2013 sont majoritairement des herbicides (Figure 3). On y retrouve notamment le glyphosate et son métabolite AMPA (acide aminométhylphosphonique), certains chloroacétanilides (métolachlore, métazachlore), néonicotinoïdes (imidaclopride) et des triazines persistantes comme l'atrazine et ses métabolites (interdits depuis 2003) (30).

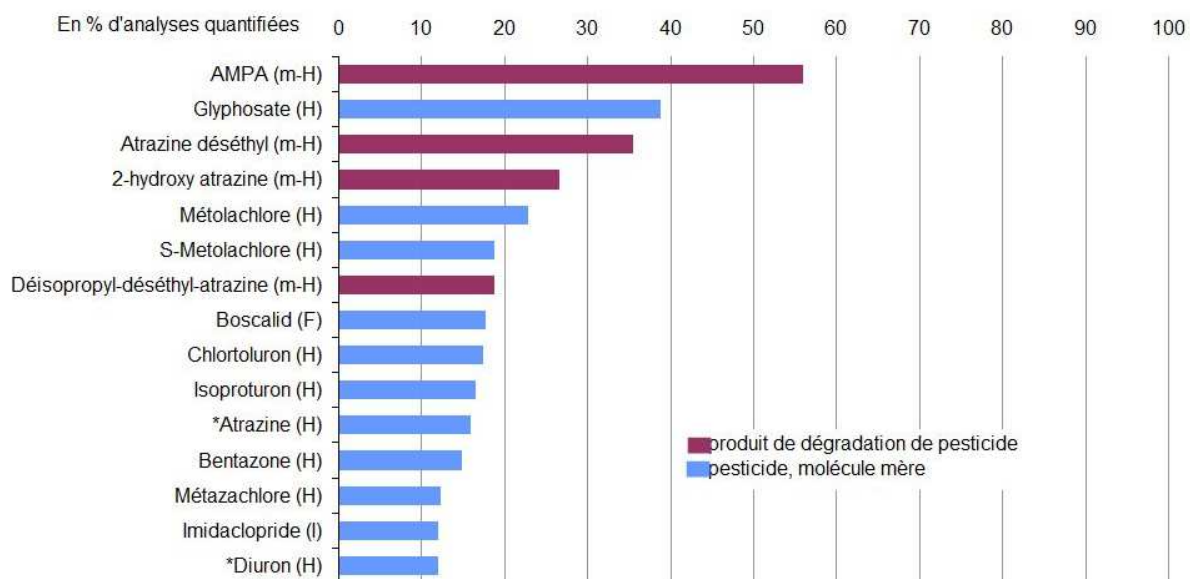


Figure 3: Pesticides les plus quantifiés dans les cours d'eau de métropole en 2013. Source : agence de l'eau, statistiques-gouv (30). *molécule interdite. H : herbicide ; m : métabolite ; F : fongicide ; I : insecticide.

Huit pesticides sont à l'origine de dépassement des normes en vigueur (majoritairement l'isoproturon et l'acide 2-méthyl-4-chlorophenoxyacétique (MCPA), dans une moindre mesure le diuron, l'hexachlorocyclohexane (HCH), l'endosulfan, la trifluraline, l'atrazine et le chlorpyrifos) (30).

Au niveau des eaux souterraines, en 2013, 70 % des points de mesure étaient contaminés par des traces de pesticides, sensiblement les mêmes que dans les cours d'eau (31). Une nouvelle fois, ce sont les herbicides qui sont le plus responsables des dépassements de norme, notamment l'atrazine et ses dérivés, le métolachlore et l'alachlore, le glyphosate et des métabolites de dithiocarbamates (31).

Contamination aux pesticides dans l'atmosphère et l'air intérieur

Certains pesticides, comme les organochlorés, sont des composés volatils, qui peuvent être facilement transportés sur de longues distances dans l'atmosphère et sont ainsi susceptibles de contaminer l'air extérieur (32,33).

Sur près de 100 000 mesures réalisées dans l'atmosphère entre 2002 et 2006, 12% ont permis de détecter au moins un pesticide (28). Parmi les pesticides les plus souvent retrouvés à fortes concentrations, certains organophosphorés (chlorpyrifos, dichlorvos, malathion, phosmet, parathion-méthyl), le captane et l'organochloré endosulfan (Tableau 1) (34). Les concentrations en pesticides varient en fonction de la zone géographique (urbaine ou rurale) et de la proximité des exploitations agricoles (34). Il convient de noter l'absence de normes européennes ou françaises concernant les pesticides dans l'air.

Pesticide	Nombre d'AASQA ayant mesuré la substance	Pourcentage de valeurs supérieures à la limite de détection (%)	Valeur maximale mesurée (ng/m ³)
Captane	4	9	7893
Chlorothalonil	9	48	306
Chlorpyrifos	5	52	217
Chlorpyrifos-éthyl	6	26	956
Cyprodinil	8	25	36
Dichlorvos	8	1	42
Endosulfan	10	45	81
Folpel	10	45	3949
Malathion	6	4	51
Oxadiazon	7	30	75
Parathion-méthyl	8	18	248
Pendiméthaline	8	49	117
Phosmet	5	4	1209
Tolyfluanide	4	23	1077
Trifluraline	8	81	41

Tableau 1: Liste des substances les plus fréquemment quantifiées à fortes concentrations (> 30ng/m³) entre 2001 et 2006 dans l'atmosphère de métropole d'après le rapport F.Marlière, 2008 (34). AASQA : Associations Agréées pour la Surveillance de la Qualité de l'Air.

En ce qui concerne l'air intérieur, ce sont des organochlorés (lindane et ses isomères, endosulfan, dieldrine), des organophosphorés (diazinon, dichlorvos) et des carbamates (propoxur), qui font partie des pesticides les plus fréquemment retrouvés dans les logements franciliens d'après une étude de 2005 (Tableau 2) (35).

Pesticide	Fréquence de détection (%)	Médiane (ng/m ³)	Percentile 75 (ng/m ³)	Maximum (ng/m ³)
Lindane (γ -HCH) (OC)	88%	2,90	5,5	209,30
α -HCH (OC)	49%	0,20	0,75	5,80
Propoxur (C)	44%	nd	6,0	280
α -endosulfan (OC)	27%	nd	0,30	11,90
Diazinon (OP)	20%	nd	6,0	301
Dieldrine (OC)	20%	nd	nd	9,70
Dichlorvos (OP)	14%	nd	12,9	423
Terbutylazine (T)	13%	nd	nd	34
Chlorpyrifos (OP)	10,5%	nd	2,1	7,7
β -endosulfan (OC)	10%	nd	nd	1,75
Trifluraline (D)	9%	nd	nd	62
Malathion (OP)	7%	nd	3,1	5,6
Carbaryl (C)	5%	nd	nd	140
4,4-DDT (OC)	5%	nd	nd	2,45

Tableau 2: Concentrations en pesticides les plus détectés dans l'air de 130 logements franciliens d'après Bouvier et al, 2005 (35). nd : inférieur à la limite de quantification de la méthode ; so= sans objet ; OP : composé organophosphoré ; C : carbamate ; T : triazine ; D : dinitroaniline ; OC : organochloré ; HCH : hexachlorocyclohexane ; DDT : dichlorodiphényltrichloroéthane.

Contamination des sols aux pesticides

Les données disponibles concernant la contamination des sols aux pesticides portent essentiellement sur le lindane (36) pour la France métropolitaine et le chlordécone pour les départements d'outre-mer (37). Le lindane, pesticide organochloré utilisé pendant 50 ans, a été interdit en 1998 en France mais peut persister jusqu'à quarante ans dans les sols. Les concentrations les plus élevées (supérieures à 2µg/kg de sol) sont retrouvées dans la Beauce, le nord de la France et en Bretagne (36). Pour le chlordécone, insecticide utilisé jusqu'en 1993 dans les bananeraies, près de 8200 hectares de terrain seraient contaminés par le pesticide sur toute la Guadeloupe, parfois à fortes concentrations (supérieures à 1µg/kg de sol) (37).

Contamination de l'alimentation aux pesticides

L'exposition alimentaire aux pesticides est régulièrement évaluée par les autorités sanitaires françaises et européennes (Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (Anses), Institut national de la recherche agronomique (INRA), Autorité européenne de sécurité des aliments (EFSA)).

En 2015, sur les quelques 85000 échantillons de denrées alimentaires analysés en Union Européenne, 97% étaient dépourvus de résidus de pesticides dépassant la limite légale (38). Pour les fruits et légumes, sur 156 pesticides recherchés, 120 ont pu être détectés au moins une fois, les plus fréquemment retrouvés étant l'imazalil (7,1%), le thiabendazole (6,8%), l'azoxystrobin (6,4%), le boscalid (6,3%) et le chlorpyrifos (4,1%) (38). Concernant les produits d'origine animale (viandes, poissons et produits laitiers), ce sont les organochlorés très lipophiles (DDT et hexachlorobenzène (HCB)) qui sont les plus fréquemment retrouvés (38) du fait de leur accumulation dans les graisses animales.

Les six pesticides les plus fréquemment retrouvés dans les aliments dans l'étude EAT2 (Etude de l'alimentation totale 2), sont des organophosphorés (le pyrimiphos-méthyl, le chlorpyrifos-méthyl, le chlorpyrifos-éthyl), l'iprodione, le carbendazime et l'imazalil (39). 2% des échantillons analysés ont fait l'objet d'un dépassement de limite maximale de résidus (LMR) (jusqu'à 20 fois la LMR pour le lindane) (39). Le seul composé retrouvé à des concentrations dépassant la dose journalière admissible était le diméthoate (fruits et légumes) (39). Le pyrimiphos-méthyl et le chlorpyrifos-méthyl, utilisés dans le stockage des céréales, sont retrouvés respectivement dans 24% et 13% des échantillons de céréales en 2010 (40,41).

Imprégnation de la population française

Afin d'évaluer le degré d'exposition à ces pesticides, il est possible d'estimer l'imprégnation de la population aux pesticides à partir du dosage de molécules mères et de métabolites dans des prélèvements biologiques (sang, urine, cheveux...), et ce, quelle que soit la voie d'exposition.

La plupart des pesticides ayant une demi-vie courte, le dosage réalisé est donc un indicateur d'une exposition récente aux pesticides. Seuls les organochlorés dérogent à ce principe, avec des demi-vies de l'ordre de plusieurs semaines voire plusieurs mois (267j pour la dieldrine (42)), du fait de leur accumulation à long terme dans le tissu adipeux. La détection de métabolites de pesticides dans les prélèvements biologiques peut refléter l'exposition à la molécule mère (bien que certains métabolites soient communs à plusieurs pesticides) mais aussi l'exposition au métabolite lui-même, parfois présent dans la formulation commerciale ou dans l'environnement.

Dans le cadre de l'étude nationale nutrition santé (ENNS), l'Institut national de veille sanitaire (InVS) a évalué en 2007 l'imprégnation de 400 français aux pesticides organochlorés, organophosphorés et pyréthrinoïdes (43). Concernant la famille des **organochlorés**, le lindane et ses isomères, le DDT et le dichlorodiphényldichloroéthylène (DDE) sont présents à l'état de traces dans la quasi-totalité des prélèvements biologiques. Bien que les concentrations sériques détectées soient relativement basses (43), elles restent bien supérieures (notamment pour le lindane et ses isomères) à celles retrouvées dans les études nord-américaines et européennes (44-46). Le 2,5-dichlorophénol et le 2,4-dichlorophénol (impurétés de l'herbicide acide 2,4-dichlorophénoxyacétique (2,4-D)), sont massivement retrouvés dans les prélèvements urinaires à fortes concentrations. Les pesticides de la famille des organochlorés étant pour la plupart interdits aujourd'hui en France et en Europe, l'imprégnation de la population à ces composés est due à la consommation de viandes et de poissons contenant des résidus de pesticides suite à leur bioaccumulation dans les graisses animales.

De la même manière que dans l'étude « Expope » de 2002 (35), les **organophosphorés** et leurs métabolites (dialkylphosphates) sont majoritairement retrouvés dans les échantillons urinaires des participants à ENNS (80 à 96% des prélèvements pour ENNS et « Expope » (35,43) et plus de 70% des prélèvements urinaires chez les enfants de l'étude « Expope » (35)). Les concentrations urinaires en organophosphorés détectées sont inférieures à celles des études allemandes (47) mais supérieures à celles des études américaines (48) et canadiennes (49). Les dialkylphosphates étant des métabolites communs à plusieurs organophosphorés, il est impossible de déterminer le ou les composés à l'origine de l'imprégnation de la population de l'étude.

Les **pyréthrinoïdes** et leurs métabolites sont détectés dans plus de 90% des échantillons testés dans le cadre d'ENNS (43). Les concentrations urinaires retrouvées sont plus élevées que celles des études menées à l'étranger (46,49–51). Comme dans les autres pays, c'est l'acide 3-phénoxybenzoïque (3-PBA), métabolite commun à de nombreux pyréthrinoïdes, qui est le plus fréquemment détecté (98,5%) et le métabolite de la deltaméthrine (Br₂CA : acide cis-3-(2,2-dibromo-vinyl)-2,2-diméthylcyclopropane-carboxylique) (83%) (52,53). Le métabolite de la cyfluthrine (F-PBA : acide 4-fluoro-3-phénoxybenzoïque) est plus rarement détecté dans l'étude ENNS française (30%), tout comme dans les études allemande et américaine (46,54).

L'imprégnation des **femmes enceintes** aux organophosphorés et aux triazines a été évaluée dans l'étude « Pélagie » entre 2002 et 2005 sur environ 600 femmes bretonnes. Des traces de pesticides ont été retrouvées dans plus de 80% des échantillons urinaires des femmes enceintes. Parmi les composés les plus fréquemment détectés figurent des molécules mères d'organophosphorés (diazinon, éthion et phoxim) et des métabolites (dialkylphosphates et chlorpyrifos-oxon) (55). Des traces d'atrazine et de simazine ont été retrouvées dans une faible part des échantillons urinaires, mais leurs métabolites ont été détectés dans 40% des prélèvements (56). Cette imprégnation des femmes enceintes à l'atrazine, interdite en 2003, traduit la grande persistance dans l'environnement de cet herbicide.

Enfin, une étude menée sur la cohorte mère-enfant « Ti Moun » entre 2004 et 2007 en Guadeloupe s'est intéressée à l'imprégnation de 800 femmes enceintes et de leurs nouveaux-nés au chlordécone, (pesticide persistant interdit en 1993). Presque 15 ans après, le pesticide est encore détectable dans 88% des prélèvements sanguins maternels (57). Ces résultats sont similaires à ceux de la cohorte « Hibiscus » menée en 2003 en Guadeloupe (58). Le DDT a également été retrouvé dans les prélèvements sanguins des deux études. Les deux pesticides étaient aussi détectés dans le lait et la graisse sous-cutanée abdominale des femmes de l'étude « Hibiscus » (58).

Il convient de noter que la quasi-totalité des études épidémiologiques attachées à mesurer l'imprégnation aux pesticides de la population ne recherchent que certains composés. Les fongicides sont par exemple peu recherchés dans les prélèvements biologiques, de même que le glyphosate. L'imprégnation de la population à de nombreux pesticides reste donc aujourd'hui inconnue.

e) Toxicocinétique et effets toxiques des pesticides

Toxicocinétique

Il existe peu de données sur la toxicocinétique des pesticides chez l'homme en dehors de case-report d'intoxications aiguës ou d'études très anciennes. La plupart des données concernant les phases d'absorption, de distribution, de métabolisme et d'élimination des pesticides dans l'organisme sont obtenues chez l'animal mais ne sont pas toujours transposables à l'homme (59,60).

Les **organochlorés** sont des composés facilement absorbés par voie orale, respiratoire et cutanée (61). Leur absorption intestinale est importante du fait des propriétés lipophiles (62) et de leurs réabsorptions via un cycle entéro-hépatique (63). Les organochlorés se distribuent majoritairement dans les tissus riches en graisses et s'y accumulent à long terme (64). Ces pesticides sont métabolisés majoritairement par les cytochromes P450 (65), certains d'entre eux peuvent être également conjugués (acide glucuronique, glutathion) (66). L'accumulation et la métabolisation des organochlorés varient selon les composés (67) et même selon les isomères (68). Les organochlorés sont majoritairement excrétés dans la bile ou dans les urines mais peuvent également être excrétés à travers la paroi intestinale (69). Ces pesticides sont susceptibles de traverser la barrière hémato-placentaire (70), et d'être excrétés dans le lait maternel (71). Ils peuvent donc être responsables d'une contamination du fœtus ou du nouveau-né.

Les **organophosphorés** sont bien absorbés quelle que soit la voie d'exposition, ces composés sont susceptibles de s'accumuler dans les tissus adipeux et d'être relargués par la suite, leur conférant une propriété de « libération prolongée » responsable de rechutes chez les patients intoxiqués aux organophosphorés (72). Ces pesticides sont rapidement métabolisés (mono-oxygénases et estérases) en des produits plus hydrosolubles éliminés dans les urines (dialkylphosphates) (73). La détoxification des organophosphorés soufrés (diazinon, fonofos, chlorpyrifos...) aboutit à la formation de dérivés oxons, à forte activité anti-acétylcholinestérase et responsables d'effets toxiques (74).

Les **pyréthrinoïdes** sont rapidement absorbés par voie respiratoire et orale et de façon plus restreinte par voie cutanée. Ces composés peuvent être hydrolysés par des estérases dès le tube digestif (75). Une fois absorbés, ces pesticides, très lipophiles, se distribuent dans les tissus riches en graisse (tissu adipeux, SNC...) mais sont rapidement métabolisés au niveau du foie (hydrolyse, oxydation, conjugaison) (76). Les métabolites de pyréthrinoïdes peuvent être spécifiques d'une molécule mère, comme le Br₂CA pour la deltaméthrine, mais aussi communs à plusieurs pyréthrinoïdes (3-PBA, F-PBA, Cl₂CA : acide 3-(2,2dichlorovinyl)-2,2-diméthylcyclopropane-carboxylique). L'effet de premier passage hépatique est important pour ces pesticides (77). Les molécules mères et leurs métabolites sont

excrétés par voie urinaire. D'autre part, ces composés traversent facilement la barrière hémato-placentaire, et certaines molécules mères peuvent être excrétées dans le lait maternel (78).

Les **carbamates** sont facilement absorbés par voie orale, respiratoire et percutanée. Ils se distribuent dans tous les types de tissus et peuvent franchir la barrière materno-fœtale (79). Les carbamates peuvent subir un cycle entéro-hépatique (80) et sont rapidement métabolisés (hydrolyse, oxydation, conjugaison) au niveau du foie (cytochrome P450, flavine mono-oxygénases) et éliminés par voie urinaire.

Les **triazines** sont faiblement absorbées par voie percutanée, mais facilement absorbées par voie orale. Elles ne s'accumulent pas dans l'organisme mais sont rapidement métabolisées au niveau hépatique par les cytochromes P450 (81) puis excrétées par voie urinaire (82). Certaines triazines ou métabolites seraient susceptibles de traverser la barrière hémato-placentaire (56).

Toxicité

Alors que les pesticides sont conçus à l'origine pour éliminer des organismes nuisibles en interagissant avec des cibles impliquées dans des fonctions vitales (signalisation nerveuse, équilibre hormonal, métabolisme ou division cellulaire), ils peuvent avoir des effets délétères sur la santé humaine en altérant des mécanismes physiologiques qui ne sont pas spécifiques des organismes cibles.

La toxicité des pesticides va être la résultante d'un certain nombre de facteurs (voie d'absorption, voie métabolique, de détoxification, propriétés physicochimiques de la molécule) qui vont impacter la quantité de pesticides absorbés, leur distribution dans l'organisme et leur vitesse d'élimination. Paradoxalement certaines voies métaboliques vont transformer les molécules mères en des métabolites plus toxiques encore que la molécule d'origine (aldicarbe, propoxur, organophosphorés-oxons) (83,84).

Une étude estimait à 2,9 millions le nombre de cas d'intoxications aiguës par an, à l'origine de 220 000 décès chaque année dans les pays en développement (85). Il n'y a pas d'estimation du nombre de cas d'intoxications aiguës aux pesticides en France. L'exposition aiguë aux pesticides est à l'origine de manifestations locales (irritations, réactions allergiques) mais aussi neurologiques (maux de tête, nausées, tremblements, salivation, choréo-athétose, convulsions, paresthésie, bradycardie) pouvant aller jusqu'à la mort (86,87).

A la différence des intoxications aiguës, les conséquences d'une exposition chronique aux pesticides sont peu connues. L'exposition chronique aux pesticides est à l'origine de différents symptômes très peu spécifiques et à des pathologies résultant de l'interaction complexe de plusieurs facteurs de risque. Dans ce contexte, il est difficile d'évaluer les effets sanitaires d'exposition chronique aux

pesticides et a fortiori la prévalence et la mortalité associée à une exposition à faibles doses à ces contaminants.

Les troubles neurologiques associés à une exposition chronique aux pesticides comprennent des maux de têtes, vertiges, fatigue, insomnie, nausée, oppression thoracique, troubles respiratoires, mais également des troubles cognitifs (confusion, troubles de l'attention), moteurs (faiblesses musculaires, tremblements) et sensitifs (engourdissement, troubles visuels) (88).

La plupart des études indiquent que l'exposition chronique aux pesticides est associée à un déficit des fonctions cognitives (89,90) et psychomotrices (91–93), mais aucun lien n'est retrouvé concernant les fonctions somato-sensorielles périphériques (94).

Les pesticides sont aussi suspectés d'être à l'origine de maladies chroniques mais les études restent controversées notamment quant au lien entre exposition aux pesticides et augmentation du risque de maladie d'Alzheimer (95,96), de maladie de Parkinson (97–109) ou encore de sclérose latérale amyotrophique (110–112). Certaines études ont associé l'exposition aux pesticides à des malformations et des altérations du développement du système nerveux de l'enfant (113,114).

L'exposition de la population générale aux pesticides a été associée dans certaines études à une augmentation du risque de tumeurs cérébrales (115) et de certaines hémopathies malignes, notamment chez l'enfant (116). Le lien entre cancer du sein et exposition aux pesticides est controversé (117,118) et des études sont nécessaires pour évaluer le lien entre exposition professionnelle et cancer (hémopathies malignes, tumeurs cérébrales, cancer de la prostate, du testicule, de l'ovaire, du poumon et mélanome) (119).

Du fait de leur manque de spécificité, les signes d'intoxications chroniques aux pesticides sont difficilement imputables à un composé particulier. Toutefois, certaines familles de pesticides ont pu être reliées à des pathologies chroniques.

Concernant la famille des **organophosphorés**, une augmentation de la prévalence de symptômes neurologiques est largement retrouvée dans le cadre d'expositions professionnelles (120–126). Certaines études ont relié exposition à ces pesticides à des troubles de l'humeur (120,125,127,128), des troubles cognitifs et psychomoteurs (120,125,129–131) et sensitifs (132,133). Certains organophosphorés (particulièrement le chlorpyrifos, le malathion et le parathion-méthyl) altéreraient également le développement cognitif de l'enfant (134,135).

Pour la famille des **organochlorés**, le DDT a été associé à une hausse de la prévalence de symptômes neurologiques, de troubles de l'humeur et des fonctions cognitives et psychomotrices (136). Le lien

entre exposition à certains organochlorés (DDT, DDE, lindane, hexachlorobenzène (HCB), isomères de l'HCH, chlordécone) et altérations du neuro-développement fait l'objet de débat (137,138).

L'exposition aux familles des **carbamates** et **dithiocarbamates** est associée à un risque accru de maladie d'Alzheimer (106), de troubles moteurs et du développement de l'enfant (139).

Un risque accru de **maladie de Parkinson** a été suggéré pour l'exposition aux organochlorés (140), organophosphorés (141), au glyphosate (142), aux carbamates et dithiocarbamates (143,144), au paraquat (145–148), au diquat (149) et à la roténone (150). De plus, de fortes concentrations de dieldrine ont été retrouvées dans les prélèvements cérébraux post-mortem de patients parkinsoniens (151,152).

Certains pesticides sont suspectés d'être **cancérogènes**. Actuellement, le centre international de recherche sur le cancer (CIRC) a classé une soixantaine de pesticides (Tableau2), dont de nombreux pesticides organochlorés et organophosphorés (153), et tout récemment le glyphosate en groupe 2A « cancérogènes probables » (154).

Groupe 1 : cancérogène certain pour l'Homme	Groupe 2A : cancérogènes probables pour l'Homme	Groupe 2B : cancérogènes possibles pour l'homme	Groupe 3 : non classés en l'état des connaissances actuelles
Arsenic Hexachlorocyclohexane (Lindane)	Captafol DDT Diazinon Glyphosate Malathion	1,2- Dibromo-3-chloropropane Chlordane Chlordécone Chlorothalonil Dichlorvos Heptachlor Hexachlorobenzène Mirex Nitrofène Ortho-Phénylphénate de sodium Oxyde de propylène Para-dichlorobenzène Parathion Tétrachlorvinphos Toxaphène	Amitrole Captane Carbaryl Deltaméthrine Fluometuron Manèbe Thirame Zirame

Tableau 3: Exemples de pesticides classés par le CIRC

Certaines études suggèrent des effets **perturbateurs endocriniens** de certains pyréthriinoïdes (perméthrine, resméthrine, fenvalérate), organophosphorés (malathion), carbamates (carbaryl), organochlorés (DDT, chlordécone) et du paraquat (155,156). Certains pesticides peuvent ainsi être agonistes ou antagonistes de récepteurs d'hormones (récepteurs des œstrogènes (ER, ERR α), récepteurs des androgènes (AR)...) ou interférer avec la synthèse, le transport, le métabolisme et l'élimination d'hormones, altérant leurs concentrations endogènes (156).

2) Passage des membranes biologiques par les xénobiotiques

Les membranes cellulaires sont constituées de deux couches de lipides (cholestérol, phospholipides, sphingolipides) dans lesquelles sont enchâssées des protéines (récepteurs, transporteurs, canaux, glycoprotéines..). Elles constituent une des premières barrières biologiques contre le passage des xénobiotiques et jouent un rôle majeur dans toutes les étapes de la pharmacocinétique des médicaments et de la toxicocinétique des contaminants de l'environnement.

Plusieurs mécanismes permettent aux xénobiotiques de passer ces membranes. En fonction de leurs propriétés physico-chimiques, les xénobiotiques pourront traverser par diffusion passive, diffusion facilitée ou transport actif (Figure 4).

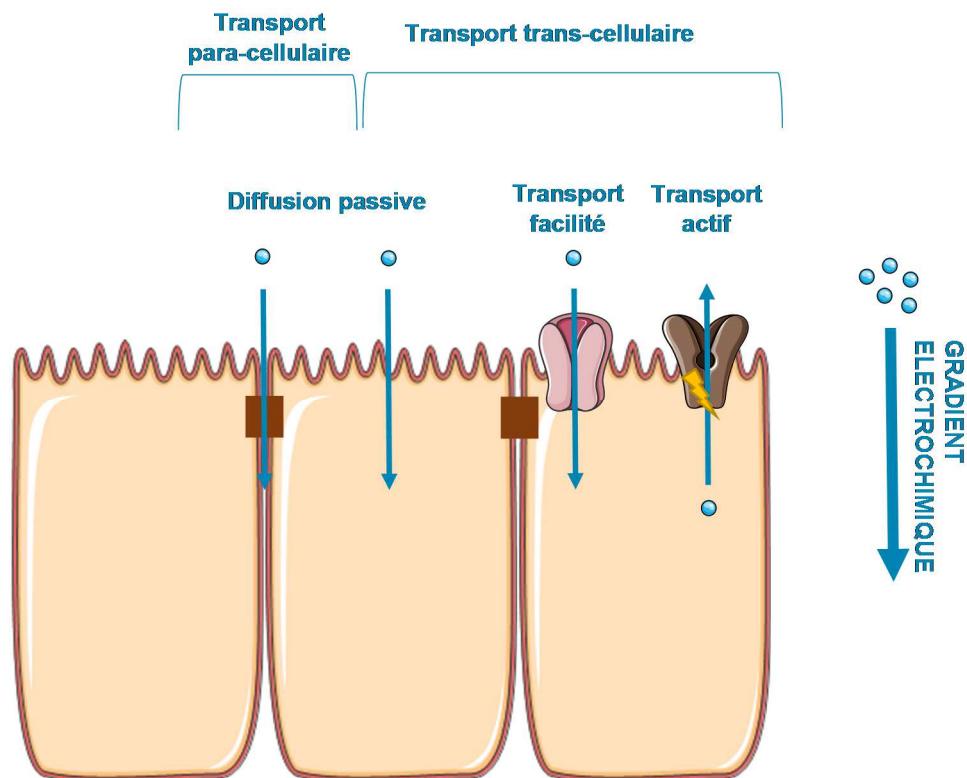


Figure 4: Schéma des différents modes de passage des membranes par les xénobiotiques

Les xénobiotiques lipophiles diffusent passivement à travers la membrane. Ce mode d'entrée dans la cellule est gouverné par la loi de Fick et s'effectue dans le sens du gradient de concentration (157). Le passage est influencé par la surface de diffusion et la composition lipidique de la membrane cellulaire (157). La diffusion est également fonction de l'état d'ionisation de la molécule et de sa solubilité dans l'eau, eux même influencés par le pH du compartiment.

La diffusion para-cellulaire (entre les cellules) reste négligeable au vu de la surface accessible et est restreinte par la présence éventuelle de jonctions serrées.

La diffusion facilitée est un autre mode d'entrée dans la cellule: la molécule est alors prise en charge par un transporteur (notamment de la famille des SLC (Solute Carrier transporters)), qui va permettre son entrée de façon spécifique dans le sens du gradient de concentration. Les xénobiotiques de petites tailles, plutôt hydrophiles, qui sont substrats de ces transporteurs, pourront pénétrer dans la cellule à une vitesse supérieure à celle de la diffusion passive, et non proportionnelle au gradient de concentration.

Les transporteurs actifs permettent également à certains xénobiotiques de traverser les membranes cellulaires (158). Ces protéines transmembranaires prennent en charge des xénobiotiques de façon sélective, et les transportent contre le gradient de concentration. Ces protéines, impliquées dans le transport actif (influx et efflux) des xénobiotiques, appartiennent à la famille des transporteurs ABC (ATP-Binding Cassette transporters) et SLC (159).

Pour les modes de passage impliquant des protéines de transport (diffusion facilitée et transport actif), le nombre de transporteurs présents à la surface des cellules et leurs affinités pour leur substrat (K_m) constituent les facteurs limitant la vitesse de pénétration cellulaire (V_{max}) et la quantité de xénobiotiques transportés (phénomène de saturation) (160).

En fonction de leurs propriétés physico-chimiques, les xénobiotiques vont donc emprunter une ou plusieurs voies d'entrée dans la cellule. Les composés lipophiles pourront diffuser passivement à travers la double couche de phospholipides. A l'inverse, les composés plus hydrophiles devront être pris en charge par des transporteurs pour traverser. Le caractère lipophile, tout en augmentant la capacité de diffuser dans la membrane, augmente également la probabilité de prise en charge par des transporteurs d'efflux. Une molécule non chargée et peu polaire pourra diffuser passivement à travers la membrane à l'inverse des molécules polarisées et chargées, qui devront être pris en charge par des transporteurs pour traverser. Les xénobiotiques à petite masse moléculaire auront plus de facilité à traverser les membranes par diffusion ou via des protéines de transport.

a) Absorption intestinale des xénobiotiques

Pour accéder au sang, et par là aux tissus de l'organisme, les xénobiotiques ingérés vont devoir traverser la barrière constituée par le tube digestif (Figure 5). Tout au long du tube digestif, ils vont être mis en contact avec une série de films d'eau et de mucines (161,162) et avec des enzymes de la muqueuse gastro-intestinale et de la flore bactérienne (163). Les épithéliums n'étant pas vascularisés, les xénobiotiques devront traverser la barrière entérocytaire pour être absorbés. L'absorption peut avoir lieu tout au long du tube digestif mais est maximale dans l'intestin grêle.

Pour entrer dans la cellule entérocytaire, les xénobiotiques vont traverser la membrane par diffusion passive ou via des transporteurs d'influx. Cette étape est dépendante de la concentration en xénobiotiques dans les deux compartiments (dose ingérée, solubilité, pH) et de la présence éventuelle d'inhibiteurs de transporteurs (médicaments, toxiques, aliments). Le transport trans-cellulaire est majoritaire au niveau de la barrière intestinale, la voie para-cellulaire restant minoritaire du fait de la présence de jonctions serrées (même si certaines molécules hydrophiles de petites tailles (<200g/mol) peuvent diffuser par cette voie). D'autres paramètres peuvent influencer l'entrée des xénobiotiques comme l'intégrité de la barrière cellulaire (fluidité, jonctions, inflammation, pathologies) et le flux sanguin gastrique et intestinal. Une fois entrés dans l'entérocyte, certains xénobiotiques vont parfois être métabolisés (164) par les cytochromes P450 (165) ou être expulsés de la cellule par des transporteurs d'efflux localisés au pôle apical, comme la P-glycoprotéine (P-gp), la BCRP (Breast Cancer Resistance Protein) ou des MRPs (Multidrug resistance-associated protein) (166).

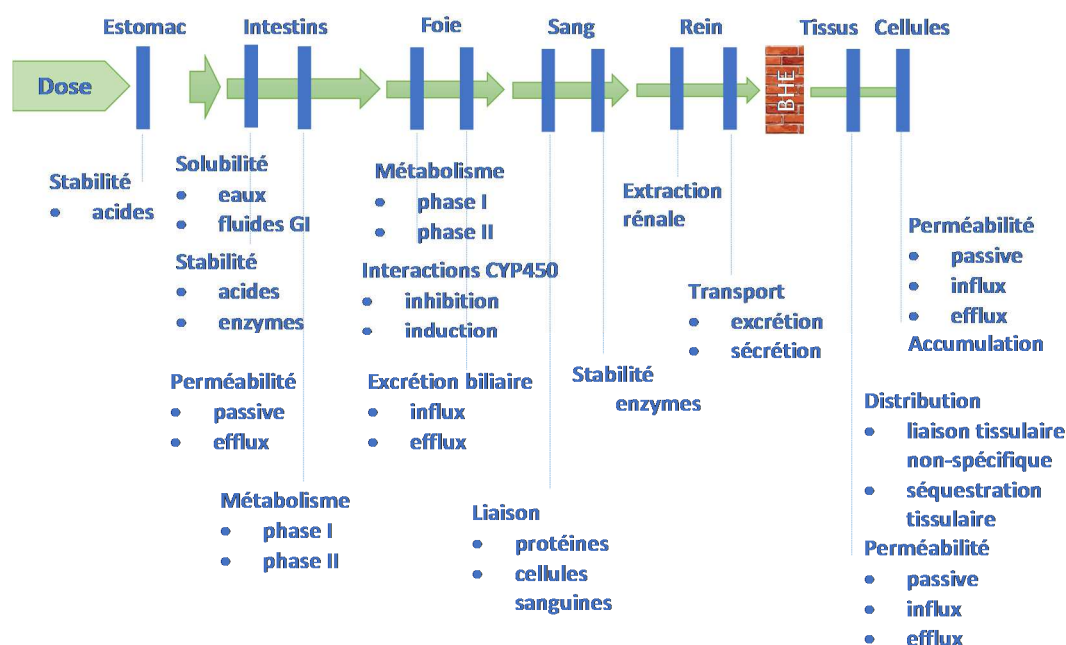


Figure 5: Barrières pharmacocinétiques entre l'ingestion du xénobiotique et sa cible d'après Reichel et al, 2009

Une fois qu'une molécule a traversé l'entérocyte, elle sera rapidement transportée à partir du pôle basolatéral jusqu'au sang ou la circulation lymphatique. Ce sont ces conditions « siphon » qui permettent de maintenir un gradient de concentration permettant l'absorption.

L'absorption gastro-intestinale est fonction de la taille, de la lipophilie, de la polarité et de l'état d'ionisation des xénobiotiques, mais également du temps de vidange gastrique, du bol alimentaire, du flux sanguin gastrique et intestinal et du péristaltisme intestinal conditionnant le temps de transit.

Les xénobiotiques absorbés accéderont à la circulation et seront transportés jusqu'au foie, où certains d'entre eux subiront un effet de premier passage. Ces composés seront alors métabolisés et éliminés par voie biliaire ou urinaire. Les xénobiotiques et métabolites « libres » circulant pourront accéder aux autres tissus de l'organisme et accéder entre autre au SNC.

b) Méthodes d'étude de l'absorption intestinale des xénobiotiques

Des modèles cellulaires ont été mis au point pour étudier l'absorption des xénobiotiques. Parmi eux, le modèle cellulaire Caco-2, lignée dérivée d'adénocarcinome colique, est un des modèles les plus utilisés pour étudier l'absorption intestinale des médicaments et des toxiques. Ces cellules forment une monocouche polarisée, morphologiquement semblable à l'épithélium intestinal, et forment des jonctions serrées (168). Les Caco-2 cultivés sur inserts (Figure 6) permettent de quantifier le passage des xénobiotiques (perméabilité apparente P_{app}) du pôle apical vers le pôle basolatéral et inversement, à travers une membrane semi-perméable. Les valeurs de perméabilités mesurées sont ensuite comparées aux valeurs de médicaments très perméables comme le métoprolol (P_{app} : 29×10^{-6} cm/s) pour évaluer le degré d'absorption du composé (169).

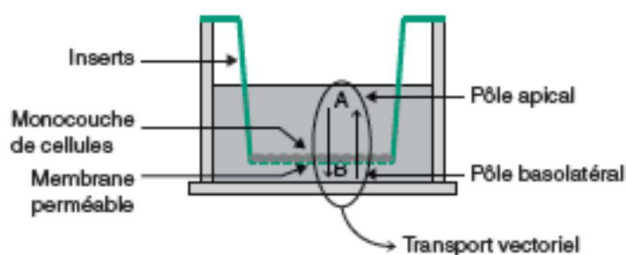


Figure 6: Représentation du protocole expérimental d'étude de transport des xénobiotiques sur cellules Caco-2 en inserts

Ce modèle d'étude permet de prédire le degré d'absorption intestinale et renseigne également sur le mode de passage du composé (diffusion passive ou prise en charge par des transporteurs). Les valeurs de perméabilité mesurées sur Caco-2 sont relativement bien corrélées à l'absorption intestinale

humaine mais doivent être interprétées avec prudence (169). Les composés ayant des $P_{app} > 5 \times 10^{-6}$ cm/s présentent une absorption gastro-intestinale de plus de 50% chez l'homme (170) mais les composés présentant des perméabilités plus faibles ne sont pas nécessairement peu absorbés *in vivo* (170). Les études effectuées sur la lignée Caco-2 présentent également l'inconvénient d'une grande variabilité entre les laboratoires de recherche, des contraintes d'utilisations, et des temps d'absorption lents comparés à l'intestin humain. La lignée sous-exprime aussi les transporteurs présents dans le tractus gastro-intestinal et ne peut prédire précisément la contribution du transport actif dans le passage de la barrière *in vivo* (171).

D'autres lignées cellulaires (IPEC-1, T48, HT29, MDCK) sont également utilisées sur le même principe, de même que des entérocytes primaires, pour étudier l'absorption intestinale des xénobiotiques (172–175).

Le modèle PAMPA (Parallel Artificial Membrane Permeability Assay) est également utilisé pour étudier l'absorption intestinale des xénobiotiques et est proche du modèle de cellules cultivées en inserts, à la différence que le passage des xénobiotiques s'effectue à travers une membrane artificielle lipidique (176). Ce modèle présente l'inconvénient de n'estimer que la perméabilité passive. D'autres modèles ont récemment été mis au point pour mesurer la diffusion passive des xénobiotiques grâce à des liposomes (177).

In vivo, des modèles animaux sont également utilisés. Le modèle de l'intestin perfusé consiste à perfuser un composé dans un segment de l'intestin sur un animal anesthésié et de doser la quantité absorbée, ce modèle permet ainsi d'étudier le transport et le métabolisme intestinal du produit (178). Des études sur animal entier sont également effectuées, dans lesquelles l'animal est nourri avec le xénobiotique et l'absorption du produit est quantifiée par dosage sanguin. *In vivo*, l'absorption intestinale d'un composé est généralement caractérisée par la fraction absorbée (FA) définie par le ratio de la quantité absorbée et de la dose administrée.

Des méthodes *ex-vivo* sont également employées pour caractériser l'absorption intestinale des xénobiotiques, comme le modèle de sac intestinal retourné, de l'anse duodéno-jéjunale isolée ou de la chambre de Ussing (179–181).

Des études ont été également menées chez l'homme dans les années 70 à 90 pour déterminer l'absorption intestinale de certains pesticides après ingestion en mesurant l'élimination urinaire et fécale des composés (182).

c) Pénétration cérébrale des xénobiotiques

La barrière hémato-encéphalique (BHE) est une barrière encore plus sélective que la barrière intestinale. Elle est constituée essentiellement de cellules endothéliales, de péricytes et de cellules gliales (183). Elle se caractérise par la présence de jonctions serrées et de jonctions adhérentes et constitue une barrière physique contre le passage des xénobiotiques. La BHE empêche efficacement la pénétration cérébrale des xénobiotiques. Il a été estimé que la BHE empêche l'entrée de plus de 98% des candidats médicaments neurologiques, elle constitue donc une barrière moins perméable que la barrière intestinale (184).

Pour traverser la barrière hémato-encéphalique, les xénobiotiques peuvent diffuser de façon passive à travers la membrane des cellules endothéliales (voie trans-cellulaire) ou être pris en charge par des transporteurs. La voie para-cellulaire reste minoritaire du fait de la présence des jonctions serrées, tout comme l'endocytose adsorptive réservée à quelques xénobiotiques cationiques (185).

Des enzymes sont présentes dans les cellules endothéliales (cytochromes P450, monoamines oxydases, phosphatases alcalines, gamma-glutamyl transpeptidase) et constituent une barrière métabolique aux xénobiotiques (186). Des transporteurs membranaires ABC et SLC sont également présents à la surface des cellules notamment pour effluer les composés indésirables dans le sang (P-gp, BCRP, MRPs) (187).

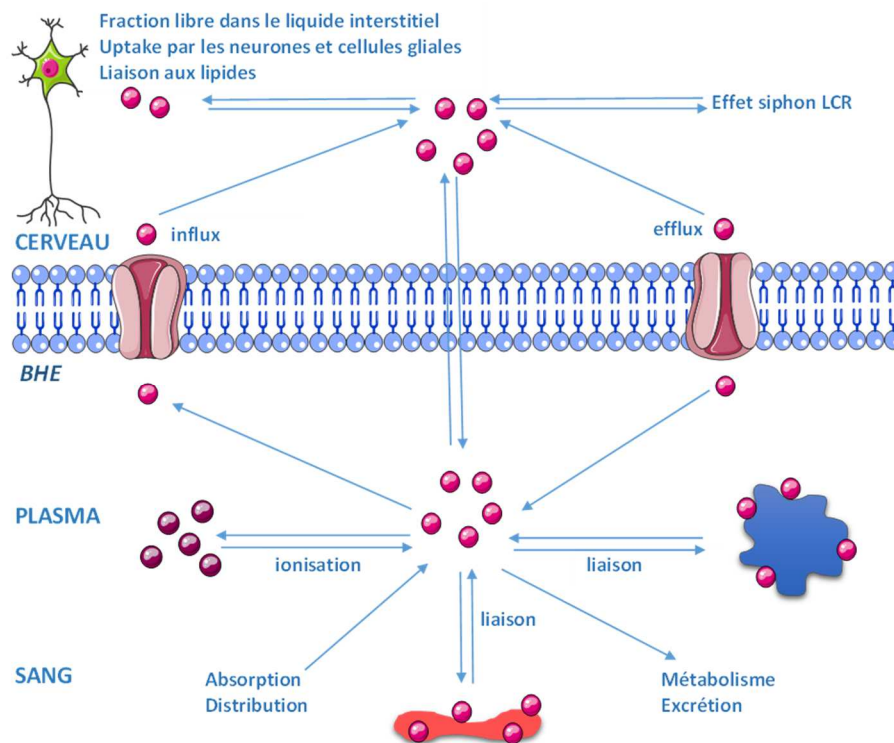


Figure 7: Facteurs influençant la pénétration cérébrale des xénobiotiques d'après Reichel et al, 2009 (167)

Une fois dans le SNC, les xénobiotiques peuvent se lier de façon non spécifique aux tissus cérébraux, entrer dans les neurones et cellules gliales, et/ou être éliminés via le liquide interstitiel.

La perméabilité cérébrale des xénobiotiques est dépendante de leur diffusion passive, de leur prise en charge par des transporteurs, de leurs interactions avec les enzymes intracellulaires, de leur liaison aux protéines plasmatiques et aux tissus cérébraux et du flux sanguin et de la clairance du liquide interstitiel (Figure 7).

d) Méthodes d'études de la pénétration cérébrale des xénobiotiques

Des modèles *in vitro* ont été développés pour étudier la perméabilité apparente (Papp) des xénobiotiques. Les cultures primaires de cellules endothéliales maintiennent une grande part des propriétés de la barrière hémato-encéphalique mais les contraintes d'utilisations en font des modèles peu adaptés pour une utilisation haut-débit (188). Certaines cellules endothéliales secondaires d'origine bovine ou porcine peuvent être amplifiées et présentent de bonnes corrélations avec les données de pénétration cérébrale humaine (189). Des cellules endothéliales cérébrales ont également été immortalisées et des lignées humaines utilisées (hCMEC/D3, HBMEC TY08, HBMEC/ciβ) mais leur haute perméabilité para-cellulaire et leur instabilité génétique réduisent leurs utilisations (190–193). Plus récemment, des cellules dérivées de cellules souches humaines et des modèles de co-culture ont été développés et se rapprochent de la physiologie humaine (jonctions serrées et transporteurs), avec de bonnes corrélations avec les données *in vivo* (194,195). Des lignées cellulaires non cérébrales sont parfois utilisées pour l'étude de la pénétration cérébrale des xénobiotiques (Caco-2, MDCK) mais les corrélations avec les données *in vivo* sont faibles du fait de différences morphologiques et d'équipement protéique et enzymatique très différents des cellules endothéliales (196,197). Un modèle de cellules MDCK transfectées avec les gènes de certaines protéines a été mis au point pour se rapprocher du niveau d'expression des transporteurs ABC des cellules endothéliales (198). Toutefois, les données *in vitro* de perméabilité cérébrale souffrent de différences inter-laboratoires et de différences de méthodologie.

Un modèle PAMPA-BHE a été développé en modifiant la composition lipidique de la membrane artificielle mais encore une fois, le modèle ne rend compte uniquement que de la diffusion passive (199).

Des expériences *in vivo* chez le rongeur permettent également de déterminer les concentrations en xénobiotiques dans le sang et le cerveau (ou le liquide céphalo-rachidien) après gavage des animaux ou injection sous-cutanée (167,200). Ces méthodes permettent le calcul du logBB, paramètre correspondant au ratio à l'équilibre des concentrations d'un composé dans le cerveau par rapport aux

concentrations sanguines. Le cutoff du \log_{BB} est souvent fixé à 0 ($\log_{BB} > 0$ pour les composés perméants, $\log_{BB} < 0$ pour les non perméants) et le paramètre prend en compte les liaisons aux protéines plasmatiques, les interactions avec les transporteurs d'efflux, le métabolisme intra-endothélial et la clairance cérébrale. Le \log_{BB} est très utilisé pour définir la pénétration cérébrale d'un xénobiotique mais sa pertinence est limitée par la variabilité inter-laboratoire, et par l'erreur dans la mesure expérimentale du \log_{BB} , qui est estimée à $\sim 0,3$ unité \log (184). L'importance de la pénétration cérébrale du composé peut aussi être évaluée par le coefficient de perméabilité (K_p), défini par le ratio des ASC (aire sous la courbe) du composé dans le cerveau et le sang.

La microdialyse cérébrale consiste à implanter une sonde dans le cerveau de l'animal perfusé par un liquide proche du liquide extracellulaire cérébral et a l'avantage d'évaluer la concentration de xénobiotiques libres dans le cerveau de l'animal après une administration intraveineuse. Cette méthode permet de calculer le coefficient de perméabilité (K_p) en xénobiotiques libres (K_p, uu).

La perfusion cérébrale *in situ* consiste à injecter un perfusé contenant le xénobiotique étudié dans l'artère qui irrigue l'hémisphère droit de l'animal. Le perfusé est forcé d'emprunter la circulation sanguine cérébrale par un système de ligatures. Après rinçage, le cerveau de l'animal est prélevé et la molécule dosée (201). Cette méthode permet d'évaluer la vitesse de pénétration du xénobiotique dans le cerveau mais ne prend pas compte de la distribution cérébrale et du binding non spécifique. Ces méthodes de perfusion vasculaire de courte durée permettent de calculer le coefficient de perméabilité/surface (\log_{PS}), qui correspond à la vitesse initiale de transfert du composé depuis le sang jusqu'au cerveau.

Des méthodes *ex vivo* (homogénats et coupes de cerveau) sont également utilisées et des techniques non invasives ont été également développées, notamment avec la tomographie par émission de positrons, qui évalue le passage cérébral de composés radio-marqués et est utilisable chez l'homme (202,203).

En résumé, pour évaluer la pénétration cérébrale des xénobiotiques, il est possible d'estimer la perméabilité apparente, c'est-à-dire la vitesse de passage de la BHE (coefficient de perméabilité Papp ou coefficient de perméabilité/surface \log_{PS}) par les composés (167) mais il convient de prendre en compte également la distribution cérébrale à l'équilibre du xénobiotique pour estimer la répartition de la molécule entre le cerveau et le sang (K_p ou \log_{BB}) (167). Par ailleurs, étant donné que seule la part de pesticides « libres » va pouvoir interagir avec des cibles cérébrales et exercer une toxicité, le paramètre le plus adapté est le coefficient de perméabilité de pesticides libres (K_p, uu) qui prend en compte la liaison non spécifique des xénobiotiques aux tissus cérébraux et aux protéines plasmatiques.

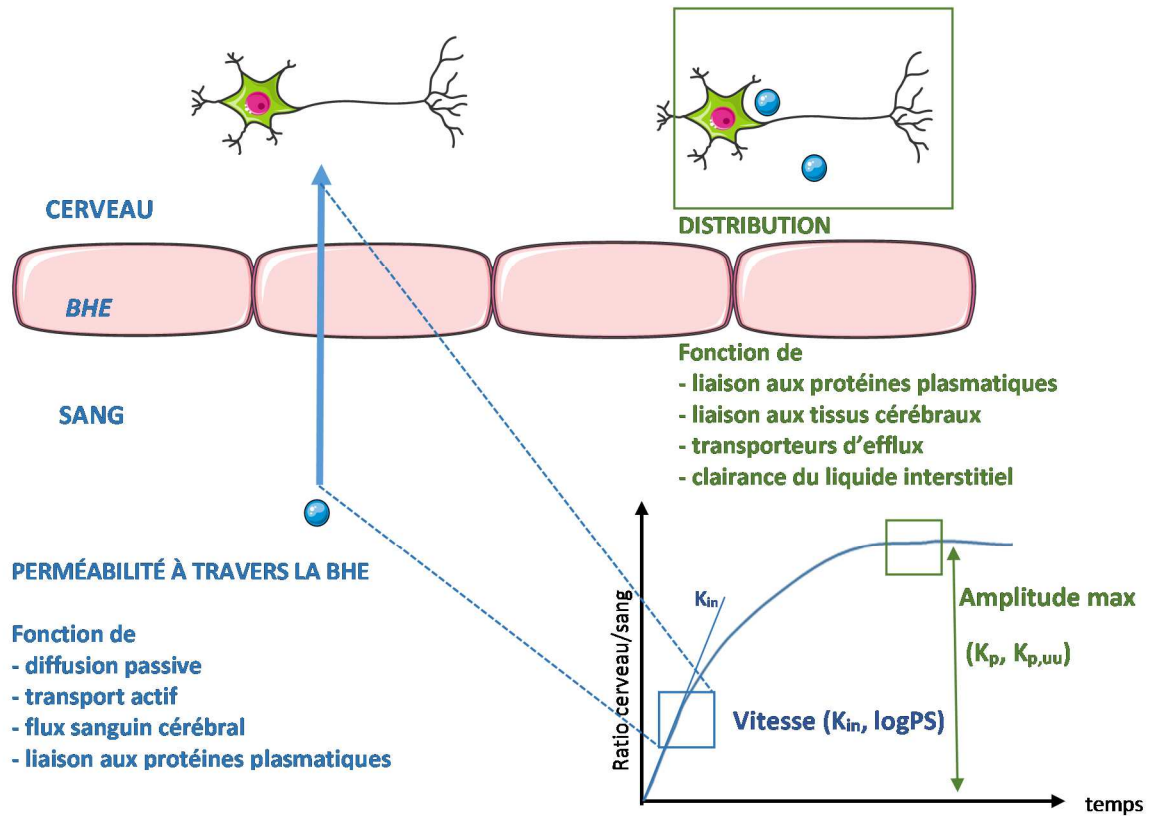


Figure 8: Paramètres de pénétration cérébrale des xénobiotiques d'après Reichel et al 2009 (167)

Toutes ces méthodes expérimentales présentent des inconvénients économiques et/ou éthiques (204) pour l'étude de l'absorption intestinale et de la perméabilité cérébrale des xénobiotiques. De ce fait, de plus en plus de méthodes *in silico* sont développées pour prédire le passage de ces barrières biologiques par les médicaments mais restent peu appliquées aux polluants environnementaux.

e) Méthodes *in silico* de prédiction de l'absorption intestinale et de la pénétration cérébrale des xénobiotiques

Les méthodes *in silico* consistent à prédire informatiquement le comportement d'une molécule en ne connaissant que sa structure.

Cette prédiction passe par la mise au point d'un modèle. Ce modèle doit être entraîné à partir de jeux de données expérimentales de composés dont on connaît les propriétés de perméabilité intestinale ou cérébrale (perméant ou non perméant pour la barrière étudiée). Ce modèle est ensuite testé sur des composés qui n'ont pas été utilisés pour l'entraînement, permettant ainsi d'évaluer ses performances. Enfin, si le modèle possède une bonne précision, il peut être utilisé pour tester des composés dont on ne connaît pas la perméabilité intestinale ou cérébrale (205).

Des modèles *in silico* existent pour prédire l'absorption intestinale et la pénétration cérébrale des xénobiotiques par diffusion passive, mais peu de modèles prennent en compte la prise en charge par les transporteurs.

Des sets de données de grandes tailles et de bonnes qualités (données *in vitro* de passage de cellules confluentes (Papp), données *in vivo* (FA, logPS, logBB)) sont nécessaires pour construire des modèles *in silico* précis et robustes.

Le set d'entraînement peut être basé sur des données d'effets pharmacodynamiques ou des données logBB/logPS/Papp. Certains jeux de données ont été construits en assimilant l'effet ou l'absence d'effet central d'un xénobiotique à sa pénétration cérébrale, considérant qu'un composé ayant une action centrale pénètre le SNC alors qu'un composé n'ayant pas d'effet central ne traverse pas la BHE. Mais cette dernière approximation n'est pas toujours vraie, des composés traversant la BHE peuvent être rapidement métabolisés ou éflués et ne pas pouvoir exercer leurs effets pharmacodynamiques, ou ils peuvent n'avoir aucun effet central.

La précision des prédictions des modèles *in silico* est généralement bonne (>80%), particulièrement pour détecter les composés perméants, qui sont mieux prédits que les composés non perméants.

Plusieurs types de modèles ont été développés. Des approches par classifications, régressions linéaires multiples, analyses discriminantes linéaires, analyses multivariées, réseaux de neurones, algorithmes génétiques, analyses en composantes principales, machines à vecteurs de support (SVM), des modèles qSAR-qSPR (relation quantitative structure à activité/propriété), sont utilisés aujourd'hui pour classer les médicaments traversant ou non la barrière intestinale et la BHE (206–212).

Des modèles qSAR basés sur des descripteurs moléculaires ont été appliqués pour classer les médicaments traversant ou non la barrière intestinale et la BHE. Ces modèles permettent de caractériser les propriétés moléculaires et caractéristiques structurales facilitant le passage des barrières cellulaires et ainsi prédire le passage de xénobiotique ($\log_{BB}/P_{app}/FA$) (213–220) (revue (206)). La performance de ces modèles est moyenne ($r^2=0,6-0,7$), malgré la grande diversité des descripteurs moléculaires employés et de molécules testées.

Les modèles \log_{BB}/P_{app} qSAR ont permis de dégager des descripteurs moléculaires importants pour la traversée de la barrière intestinale et la pénétration cérébrale :

- **La capacité de la molécule à créer des liaisons hydrogènes**

Les descripteurs les plus utilisés rendant compte de la capacité de la molécule à créer des liaisons hydrogènes sont le nombre de groupements donneurs (HBD) et accepteurs de liaisons hydrogènes (HBA) et la surface polaire (PSA polar surface area), qui est calculée en déterminant les contributions à la surface de la molécule, des atomes d'azote et d'oxygène et des hydrogènes liés à des atomes d'oxygènes ou d'azotes. La PSA est corrélée négativement avec le \log_{BB} , la fraction absorbée et la perméabilité sur Caco-2 (209,213,214,217–219,221). Plus le composé est capable de former des liaisons hydrogènes, moins il sera capable de diffuser passivement dans les membranes et donc de pénétrer dans le cerveau.

- **La lipophilie de la molécule**

Selon la loi de Fick, le transport par diffusion passive à travers une membrane est proportionnel au coefficient de partage de la molécule entre la membrane et l'eau. Cette relation se base sur l'hypothèse que la membrane est un milieu homogène et que le milieu extracellulaire est plus concentré en xénobiotique que l'intérieur de la cellule. Le coefficient de partage membrane/eau est approximé par le coefficient de partage de la molécule entre l'eau et un solvant organique (l'octanol) : le $\log P$.

Le $\log P$ est corrélé positivement au \log_{BB} , de ce fait, un composé lipophile diffusera plus aisément à travers les membranes et pénétrera plus facilement au niveau cérébral (215,217). Des études ont combiné deux descripteurs (PSA et $\log P$) pour améliorer les modèles de prédiction de la perméabilité cérébrale (222) et de l'absorption intestinale (223) avec une bonne précision (~80%). Toutefois, une étude montre que la lipophilie a moins d'impact que la polarité dans le passage cérébral (215).

D'autre part, le $\log P$ n'est qu'une estimation de la lipophilie d'un composé dans un milieu biologique, notamment pour les composés ionisables. Ces molécules ont différents états d'ionisation et donc différents $\log P$ selon le pH. De ce fait, un paramètre plus précis pour ces composés est le $\log D$, qui est la mesure du $\log P$ à un pH donné pour un composé ionisable. Ce

paramètre tient compte ainsi de la concentration en molécules ionisées et de leur solubilité différentielle dans l'eau et l'octanol). Le logD mesuré donne une meilleure prédiction du passage de la barrière intestinale des xénobiotiques que le logP (224), par contre le logD calculé donne des corrélations peu satisfaisantes du fait des approximations effectuées dans la prédiction du pKa.

- **La taille et le volume de la molécule**

La taille de la molécule ne doit pas être trop importante (inférieure à 400-500g/mol) pour diffuser passivement par voie trans-cellulaire (225). De façon surprenante, plus le volume de la molécule est important plus elle traversera la BHE (213,214). Les interactions liant les molécules d'eau doivent être interrompues pour créer une cavité autour de la molécule, il en résulte une force proportionnelle au volume moléculaire qui pousse les solutés hydrophobes dans des phases moins polaires et leur permet de diffuser dans la membrane (226).

- **La charge moléculaire**

Une molécule non chargée ou chargée positivement à pH 7 traversera plus facilement l'intestin et la BHE qu'une molécule chargée négativement (187,218). Les molécules basiques chargées positivement, interagissent avec les phospholipides membranaires et le glycocalyx, chargés négativement ce qui facilite leur diffusion passive (187) alors que les composés acides traverseront moins facilement les membranes et auront une probabilité plus grande de se fixer aux protéines plasmatiques, ce qui diminuera leur fraction libre (213,228).

- **La forme de la molécule et sa flexibilité**

Certains modèles suggèrent que les molécules de forme sphériques sont préférables aux molécules linéaires pour pénétrer dans le cerveau (215). Toutefois, des modèles indiquent qu'une augmentation de la ramification est corrélée négativement avec le logBB (216). Une étude a montré qu'une augmentation de la flexibilité du soluté corrèle positivement avec le logBB (217) mais d'autres études montrent que la flexibilité nuit au passage des membranes (nombre de rotatable bonds) (229). A priori une flexibilité modérée augmente le logBB mais une molécule trop flexible ne traversera pas la BHE (217). Une étude suggère que l'absorption intestinale augmente avec la complexité moléculaire (augmentation du nombre de cycles et de liaisons rigides) (230).

Des règles de bases en termes de propriétés physicochimiques ont pu être dégagées pour favoriser l'absorption intestinale et la pénétration cérébrale :

- la masse moléculaire doit être inférieure à 480-500g/mol pour une bonne absorption par voie orale et cette borne est abaissée à 450g/mol pour faciliter la pénétration cérébrale (231–233).
- La PSA de la molécule doit être inférieure à 140 Å² pour être absorbée par voie intestinale (178,192) et inférieure à 120Å² voire à 90 Å² selon certaines études pour traverser la BHE (231,234).
- Le ClogP doit être inférieur à 5 ou le MLogP inférieur à 4,15 (232) pour traverser l'intestin, et logP – (N + O) doit être supérieur à 0 pour que le logBB soit positif (206).
- Le nombre de donneurs d'hydrogènes (groupements OH et NH) doit être inférieur à 5 pour traverser l'intestin (232) et le nombre d'accepteurs d'hydrogènes (N+O) doit être inférieur ou égal à 10 pour traverser l'intestin (232) et inférieur ou égal à 5 pour que la molécule traverse la BHE (206).
- La réfractivité molaire (polarisabilité) doit être comprise en 40 et 130 pour que la molécule traverse l'intestin (233).

Globalement, les composés traversant la barrière intestinale et la BHE sont plus lipophiles, plus rigides, ont moins de groupement donneurs et accepteurs de liaisons hydrogènes, moins d'atomes chargés (particulièrement les charges négatives) et une surface polaire (PSA) plus faible. De plus, ils sont moins pris en charge par des transporteurs d'efflux que les composés ne traversant pas (235). Toutefois ces règles sont des critères minimaux pour qu'une molécule puisse être absorbée par voie orale ou pénétrer le cerveau, beaucoup de molécules satisfont ces critères mais présenteront une perméabilité faible, des modèles *in silico* sont donc nécessaires pour discriminer les molécules perméantes et non perméantes.

La précision des modèles de prédiction *in silico* actuels est relativement bonne (~80%), notamment les modèles basés sur le SVM (jusqu'à 96% de précision (236)) mais ils souffrent du manque de données expérimentales, *in vitro* et *in vivo*, disponibles dans la littérature. En effet, même les plus gros échantillons de données ne peuvent être représentatifs de toutes les structures et propriétés des xénobiotiques et permettent de déduire des relations entre les structures et propriétés des molécules et leur absorption par voie orale et leur pénétration cérébrale. Les progrès des modèles de prédiction *in silico* ont permis de mettre en évidence des descripteurs moléculaires importants pour la diffusion passive de la BHE comme la polarité ou la lipophilie. Des programmes informatiques utilisent aujourd'hui des combinaisons de descripteurs pour prédire l'absorption intestinale et la diffusion cérébrale des candidats médicaments. C'est le cas du logiciel SwissADME®, qui permet de prédire le passage de ces deux barrières par les médicaments à partir de leur lipophilie et polarité et a l'avantage d'être disponible en ligne gratuitement.

II. Objectifs de l'étude

Les pesticides sont des composés très présents dans tous les compartiments de l'environnement (eau, air, sols, aliments). L'exposition de la population générale à ces contaminants est importante, notamment par voie orale. Ces composés font l'objet d'une préoccupation croissante de la communauté scientifique et des autorités sanitaires, et sont de plus en plus reliés à des pathologies chroniques (maladies neurologiques, cancers, perturbations endocriniennes).

Dans ce contexte, il est nécessaire de caractériser la toxicocinétique de ces contaminants pour connaître leur devenir biologique chez l'homme.

Des méthodes expérimentales ont été développées dans le but d'évaluer l'absorption intestinale et la pénétration cérébrale des xénobiotiques. Les études menées sur cellules ou sur animaux, sont longues, coûteuses et pas forcément transposables à l'homme, tandis que les études menées chez l'homme posent des questionnements éthiques.

De plus, leur corrélation avec les données humaines sont parfois débattues. Ces difficultés sont les mêmes que celles rencontrées par l'industrie pharmaceutique dans le développement de nouveaux médicaments. Pour surmonter ces contraintes, des modèles *in silico* ont été mis au point pour le screening haut débit et permettent de prédire l'absorption intestinale et la pénétration cérébrale de candidats médicaments.

Parmi eux, SwissADME® est un logiciel en ligne permettant d'évaluer les paramètres physico-chimiques et la pharmacocinétique de petites molécules. La méthode « BOILED-Egg » (Méthode d'estimation de la perméabilité intestinale et cérébrale) permet d'estimer l'absorption intestinale et la pénétration cérébrale des médicaments en se basant sur leur polarité et lipophilie.

L'objectif de notre étude a été d'appliquer ce type de méthodologie *in silico*, à 338 composés appartenant aux principales classes de pesticides et d'évaluer leur passage de la barrière intestinale et hémato-encéphalique chez l'homme.

III. Résultats

Les résultats de notre étude sont décrits dans l'article ci-après.

Notre étude a permis d'évaluer l'absorption intestinale et la pénétration cérébrale de 338 pesticides appartenant à différentes classes chimiques, en utilisant le modèle *in silico* BOILED-egg/SwissADME® basé sur des paramètres de lipophilie et de polarité, et initialement développé pour les médicaments.

Une proportion importante de pesticides (81,4%) est prédite pour traverser la barrière intestinale et une part plus faible (38,5%) est prédite pour traverser la BHE.

Parmi les différentes classes de pesticides, ce sont les organochlorés (n=30) qui comptent le moins de composés absorbés (40%) et les organophosphorés (n=99) qui comptent le moins de pesticides traversant la BHE (9%).

La précision de la prédiction du modèle est bonne (96%) et les prédictions de perméabilité sont également associées à des descripteurs moléculaires décrits pour discriminer les médicaments perméants et non-perméants.

Au final, nos données *in silico* suggèrent que l'exposition humaine aux pesticides par voie orale conduit à une absorption de la plupart de ces contaminants et à une pénétration cérébrale pour certains d'entre eux, venant conforter les suspicions d'effets toxiques, notamment neurologiques, causés par les pesticides.

Article. Prédiction *in silico* de l'absorption intestinale et de la pénétration cérébrale des pesticides chez l'homme.

"In silico prediction for intestinal absorption and brain penetration of chemical pesticides in humans"

Lisa Chedik, Dominique Mias-Lucquin, Arnaud Bruyere, Olivier Fardel

Publié dans le journal : *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 2017



Article

In Silico Prediction for Intestinal Absorption and Brain Penetration of Chemical Pesticides in Humans

Lisa Chedik ¹, Dominique Mias-Lucquin ², Arnaud Bruyere ¹ and Olivier Fardel ^{1,3,*}

¹ Institut de Recherche en Santé, Environnement et Travail (IRSET), UMR INSERM U1085, Faculté de Pharmacie, Université de Rennes 1, 2 Avenue du Pr Léon Bernard, 35043 Rennes, France; lisa.chedik@univ-rennes1.fr (L.C.); arnaud.bruyere@univ-rennes1.fr (A.B.)

² Institut de Génétique et Développement de Rennes, UMR CNRS 6290, Université de Rennes 1, 35043 Rennes, France; dominique.mias-lucquin@univ-rennes1.fr

³ Pôle Biologie, Centre Hospitalier Universitaire, 2 rue Henri le Guilloux, 35033 Rennes, France

* Correspondence: olivier.fardel@univ-rennes1.fr; Tel.: +33-223-23-4880

Received: 11 June 2017; Accepted: 26 June 2017; Published: 30 June 2017

Abstract: Intestinal absorption and brain permeation constitute key parameters of toxicokinetics for pesticides, conditioning their toxicity, including neurotoxicity. However, they remain poorly characterized in humans. The present study was therefore designed to evaluate human intestine and brain permeation for a large set of pesticides ($n = 338$) belonging to various chemical classes, using an *in silico* graphical BOILED-Egg/SwissADME online method based on lipophilicity and polarity that was initially developed for drugs. A high percentage of the pesticides (81.4%) was predicted to exhibit high intestinal absorption, with a high accuracy (96%), whereas a lower, but substantial, percentage (38.5%) displayed brain permeation. Among the pesticide classes, organochlorines ($n = 30$) constitute the class with the lowest percentage of intestine-permeant members (40%), whereas that of the organophosphorus compounds ($n = 99$) has the lowest percentage of brain-permeant chemicals (9%). The predictions of the permeations for the pesticides were additionally shown to be significantly associated with various molecular descriptors well-known to discriminate between permeant and non-permeant drugs. Overall, our *in silico* data suggest that human exposure to pesticides through the oral way is likely to result in an intake of these dietary contaminants for most of them and brain permeation for some of them, thus supporting the idea that they have toxic effects on human health, including neurotoxic effects.

Keywords: pesticides; toxicokinetics; intestinal absorption; brain permeation; toxicity; *in silico* method; prediction

1. Introduction

Chemical pesticides constitute an important group of substances, exhibiting notably insecticide, rodenticide, fungicide, nematicide, or herbicide properties, which are used to control and repel pests in different fields. They can be grouped into various chemical families, including the pyrethroids, organochlorines, carbamates, organophosphorus compounds, triazines, and neonicotinoids. Due to their large use for agricultural, industrial, or domestic purposes, and also due to the strong persistence of some of them, pesticides appear as widely-distributed environmental pollutants [1]. Humans are consequently highly exposed to these chemicals—notably by an oral way—through the consumption of food or water contaminated by pesticides [2–4]. This is probably a major health issue, owing to the well-established toxicity of pesticides, which can trigger or favor various diseases including cancers and neurodegenerative, metabolic, reproductive, or developmental pathologies [5,6]. Such adverse effects are thought to reflect specific toxicodynamic properties of pesticides, such as agonistic or antagonistic effects towards endocrine receptors, genotoxicity, the blockage of ion channels, the

inhibition of enzymes such as acetylcholinesterase, the impairment of the redox balance, or oxidative stress generation [7–9].

Before exerting toxicodynamic effects, pesticides have however to be absorbed by exposed humans, notably at the gastro-intestinal level in response to oral exposure; neurotoxic ones have additionally to cross the blood-brain barrier [10]. Such a consideration for intestinal absorption and brain distribution is also a major concern for drugs, notably during their industrial development [11,12]. In this context, the passage of drugs across the intestinal barrier and the blood-brain barrier is usually extensively characterized using *in vitro* cellular models, animal experimentation, and clinical human pharmacokinetics studies before marketing authorization [13–15]. The intestinal absorption and brain disposition of drugs can moreover be *in silico* predicted with good accuracy, using various computer models [16–19]. Among them, SwissADME is a recent free web tool designed for predicting pharmacokinetics parameters [20]. It notably concomitantly evaluates the intestinal and brain permeation of drugs through an accurate predictive model that works by computing the lipophilicity and polarity of drugs with good accuracies (83–93% for intestinal absorption and 90% for brain permeation [21]). This physicochemical descriptors-based method, termed the BOILED-Egg method, permits a clear and informative graphical representation of the data, and can be applied in a variety of settings, from the filtering of chemical libraries at the early steps of drug discovery, to the evaluation of drug candidates for development [21].

In contrast to drugs, pesticides are very poorly characterized with respect to their intestinal and brain passage in humans. For a very limited number of them, intestinal absorption has been characterized from pharmacokinetics studies performed with human volunteers [22]. Some information may additionally be extrapolated from animal studies or *in vitro* studies [23]; however, the animal versus human bioavailability of chemicals is known to be poorly correlated [24], making it difficult to precisely and unambiguously predict the human absorption of pesticides from animal data. The intestinal and brain permeations of pesticides are nevertheless important to evaluate, in order to fully apprehend their potential toxicity, as discussed above. In this context, the use of *in silico* tools may be considered a valuable and robust approach. Indeed, the great number and variety of pesticides which have to be evaluated precludes the use of cost-effective and labor-consuming classical pharmacokinetics *in vitro* or *in vivo* methods. Clinical pharmacokinetics studies in human subjects with pesticides are moreover now hampered by appropriate ethical considerations [25,26]. The present study was therefore designed to evaluate *in silico* the intestinal absorption and brain permeation of 338 pesticides belonging to various chemical classes, using the SwissADME web tool.

2. Materials and Methods

2.1. Pesticide Selection

The complete list of pesticides ($n = 338$) included in the study is shown in Table S1, while the list of oxon metabolites of organophosphorus pesticides ($n = 15$) is provided in Table S2. The selection of pesticides was driven by retaining the main members of various major chemical classes of pesticides, i.e., the organochlorines ($n = 30$), the organophosphorus compounds ($n = 99$), the pyrethroids ($n = 42$), the carbamates ($n = 74$), and the triazines ($n = 31$); miscellaneous pesticides ($n = 62$) belonging to various additional classes of pesticides, such as the neonicotinoids, were also included. Most if not all of these chemicals are included in pesticide and/or chemical data bases, such as the Hazardous Substance Data Bank (HSDB), a Toxicology data file on the U.S. National Library of Medicine's (NLM) Toxicology Data Network (TOXNET) (Bethesda, MD, USA), which is freely available online [27]. They are referenced by organizations devoted to pesticide concerns, such as, for example, the National Pesticide Information Center (Corvallis, OR, USA), a collaboration between Oregon State University and the U.S. Environmental Protection Agency to provide objective, science-based, and accessible online information about pesticides [28]. They commonly exhibit insecticide, fungicide, or herbicide properties, and correspond to registered products currently in use or banned products due to toxicity

issues. Some pesticide metabolites or degradation by-products as well as the pesticide impurities dibenzo-*para*-dioxin and 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) [29] were also included in the list of studied chemicals.

2.2. *In Silico* Evaluation of Intestine and Brain Permeation

A Simplified Molecular Input Line Entry System (SMILES) was collected online for each pesticide of the Table S1 and also for the oxon metabolites of the organophosphorus pesticides (Table S2) through interrogating the PubChem data base (U.S. National Library of Medicine) [30]; they are indicated in Table S1 for each pesticide and in Table S2 for each oxon organophosphorus pesticide. The list of SMILES was then entered in the online SwissADME web tool for generating a prediction of the gastrointestinal absorption (high or low) and brain penetration (yes or no). These predictions were done using the BOILED-Egg method, which corresponds to a descriptive graphical approach discriminating between intestinal well-absorbed and intestinal poorly absorbed molecules, and between brain-permeant and brain non-permeant molecules. This method is primarily based on two parameters: (1) the lipophilicity of chemicals, evaluated from partition-coefficient (*P*) by a Log*P* value calculated according to the Wildman–Crippen method (WLog*P*), and (2) their polarity, determined by a calculated topological polar surface area (tPSA) value. A prior analysis of human absorption and brain permeation databases for drugs has allowed us to delineate two ellipsoidal regions (one for intestine permeation and one for brain permeation, which are not mutually exclusive) on the graph WLog*P* versus tPSA [21]. The compounds included in these ellipses are predicted to display high intestinal absorption, i.e., the fraction absorbed (*F_a*) is ≥ 0.30 , with *F_a* equal to the amount of absorbed chemical/amount of ingested chemical, or brain permeation, i.e., the brain-blood concentration ratio is ≥ 1 (the LogBB, defined as the logarithm of the ratio of the drug concentration in the brain versus that in the blood, is therefore ≥ 0) [20]. Such predictions have been previously performed with good accuracy (around 90%) for drugs [21]. The ellipsoidal regions defining the intestine and brain permeation were drawn as initially reported in [21] using the software R (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria) [31]); the specific R code used is shown in Appendix A.

2.3. Association of Pesticide Physicochemical Parameters and Predicted Permeation across Intestinal or Blood-Brain Barriers

Physicochemical parameters such as molecular weight, the number of heavy atoms, the number of aromatic heavy atoms, the number of rotatable bonds, the number of H-bond acceptors, the number of H-bond donors, the fraction of carbon bond saturation (Csp³), i.e., the number of sp³ hybridized carbons/total carbon count, the solubility (*S*) parameter Log*S* (Silicos-IT), the lipophilicity parameter Log*P* predicted using the additive XLogP₃ method [32], and the molar refractivity were given for each pesticide by the online SwissADME web tool. Additional basic molecular descriptors such as the mean atomic van der Waals volume, the mean atomic polarizability, and the number of nitrogen and oxygen atoms were obtained using the Dragon 7.0 software (Talet, Milano, Italy), as previously described in [33]. The values of each of these parameters were next compared between the predicted intestine or brain-permeant and non-permeant pesticides by the Student's *t* test, in order to determine the nature of the physicochemical parameters that may be associated with the predicted intestine or brain permeation of the pesticides. The criterion of significance was $p < 0.05$.

2.4. Confrontation of Predicted and Measured Human Intestinal Absorption Values for Some Pesticides

The curation of measured human intestinal absorption for pesticides was performed through searching available pharmacokinetics studies related to the oral administration of pesticides in human subjects. For this purpose, PubMed (US National Library of Medicine) [34] and HSDB [27] were interrogated online for each pesticide included in the study. The *F_a* values were directly collected when they were provided in human pharmacokinetics studies, or were estimated from the excreted fraction in urine of the ingested dose of pesticide. When the *F_a* values were given as a range of values

for one ingested dose, the median value was retained. When different F_a values were reported for one pesticide in various studies and/or for different ingested doses, the mean value was retained. The pesticides were considered as exhibiting high or low measured intestinal absorption when the measured experimental F_a was ≥ 0.30 or < 0.30 , respectively. The measured and predicted intestinal absorption was then compared for each considered pesticide. Accuracy of the prediction was finally determined using the following equation:

$$\text{Accuracy (\%)} = \frac{\text{Total number of pesticides with identical predicted and measured intestinal absorption}}{\text{Total number of studied pesticides}} \times 100$$

3. Results

3.1. Prediction of Intestinal and Brain Permeation of Pesticides

The predictions of intestinal absorption and brain permeation were determined using the tPSA/WLogP-based graphical BOILED-Egg method included in the SwissADME tool and are indicated for each pesticide in Table S1. When considering the total number of pesticides ($n = 338$), 275 pesticides (81.4% of pesticides) exhibited a predicted high intestinal absorption, as demonstrated by their location inside the grey ellipse defining intestinal absorption (Figure 1). A lower number of pesticides ($n = 130$, representing 38.5% of pesticides) is comprised inside the yellow ellipse corresponding to brain-permeant molecules (Figure 1), and can therefore be predicted to show brain permeation. Essentially, all of the pesticides predicted to enter the brain also displayed a predicted high intestinal absorption. This was expected, owing to the fact that the brain permeation-related ellipse defined by the BOILED-Egg method is almost entirely comprised into the intestine permeation ellipse (Figure 1). Only the organochlorine lindane was predicted to display low intestinal absorption, but high brain permeation (Table S1).

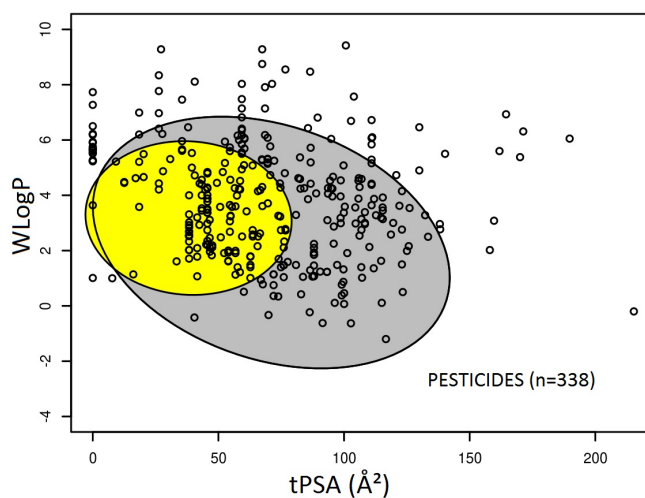


Figure 1. Graphical distribution of pesticides using the BOILED-Egg predictive model for intestine and brain permeation. Each pesticide corresponds to a small black circle. The grey region is the physicochemical space of pesticides ($n = 275$) predicted to exhibit high intestinal absorption, and the yellow region is the physicochemical space of pesticides ($n = 130$) predicted to permeate the brain. Abbreviation: topological polar surface area (tPSA). WLogP: LogP value calculated according to the Wildman–Crippen method.

The graphical prediction of intestine absorption and brain permeation by the pesticide classes is shown in Figure 2. The percentage of predicted intestine-permeant molecules was very high for the triazines (100% permeant) and the carbamates (99% permeant); high for the organophosphorus pesticides (82% permeant), the miscellaneous pesticides (77% permeant), and the pyrethroids (71%

permeant); and lower for the organochlorines (40% permeant) (Figure 3). Organochlorines such as aldrin, chlordane, dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT), heptachlor, and lindane, which failed to successfully meet the criteria for high intestinal absorption, were those with a null value for tPSA and a high WLogP value (Table S1 and Figure 2), indicating that they correspond to highly lipophilic non-polar chemicals. With respect to the prediction of brain permeation, the chemical class with the highest percentage of permeant pesticides was the carbamates (77% permeant), followed by the pyrethroids (41% permeant), the organochlorines (40%), the miscellaneous pesticides (39% permeant), the triazines (36% permeant), and the organophosphorus compounds (9% permeant) (Figure 3). Pesticides from the carbamate, triazine and organophosphorus pesticide classes, which were predicted to be brain non-permeant, display globally higher tPSA values than their permeant counterparts (Figure 2), thus suggesting that they correspond to more polar chemicals.

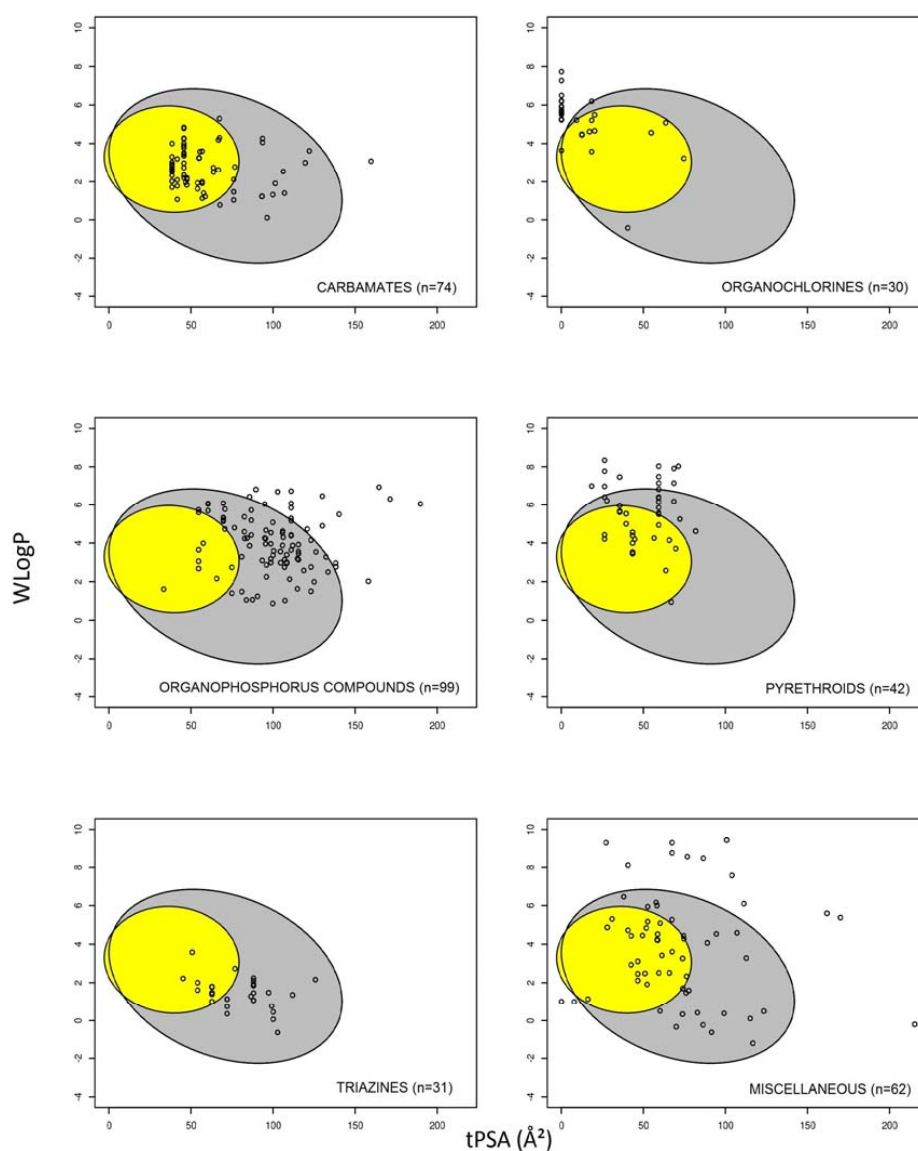


Figure 2. Graphical distribution of pesticides according to chemical classes using the BOILED-Egg predictive model for intestine and brain permeation. Each member of a chemical pesticide class corresponds to a small black circle. The grey region is the physicochemical space of pesticides predicted to exhibit high intestinal absorption, and the yellow region is the physicochemical space of pesticides predicted to permeate the brain. tPSA: Topological polar surface area; WLogP: LogP value calculated according to the Wildman–Crippen method.

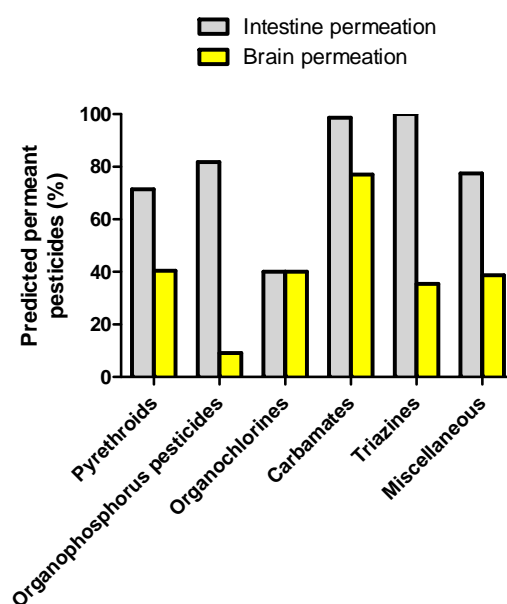


Figure 3. Percentage of predicted intestine- and brain-permeant molecules for the main chemical classes of pesticides.

Some organophosphorus pesticides require metabolic bioactivation to be maximally active [35,36]. Organophosphorus oxon metabolites, formed notably upon the action of hepatic cytochromes P-450, have thus been shown to exert potent irreversible anti-acetylcholinesterase activity and to cause neurotoxicity [37]. The passage of such oxon metabolites across the blood-brain barrier is therefore important to consider, in addition to that of the parent molecules. The prediction of brain permeation was therefore performed for oxon metabolites from 15 different organophosphorus pesticides using the BOILED-Egg method. As shown in Table 1, none of the parent organophosphorus compound was predicted to cross the blood-brain barrier. By contrast, three oxon metabolites were predicted to do it (Table 1), resulting however in a rather low percentage of brain-permeant oxon metabolites (20%).

Table 1. Prediction of brain permeation for organophosphorus oxon metabolites and parent pesticide molecules ¹.

Organophosphorus Pesticide	Brain Permeation Prediction	
	Parent Molecule	Oxon Metabolite
Bensulide	No	No
Chlorpyrifos	No	Yes
Chlorpyrifos-methyl	No	Yes
Coumaphos	No	No
Diazinon	No	No
Ethion	No	No
Fenthion	No	No
Fonofos	No	Yes
Malathion	No	No
Methyl-parathion	No	No
Parathion	No	No
Phorate	No	No
Phosmet	No	No
Sulprofos	No	No
Terbufos	No	No

¹ Prediction was based on tPSA/WLogP-based graphical BOILED-Egg method.

3.2. Pesticide Physicochemical Parameters Associated with the Prediction of Intestinal or Brain Permeation

The values of different physicochemical parameters were first compared between the predicted intestine permeant and non-permeant pesticides. As indicated in Table 2, various parameters such as molecular weight, mean atomic van der Waals volume, mean atomic polarizability, number of heavy atoms, LogS, XLogP3, and molar refractivity were found to discriminate between predicted intestine-permeant and non-permeant pesticides with a high level of significance ($p < 0.0001$). The predicted intestine-permeant pesticides have thus notably lower molecular weight, mean atomic van der Waals volume, mean atomic polarizability, XLogP3-related lipophilicity, and molar refractivity than predicted non-permeant counterparts, whereas they exhibit higher solubility. Other parameters, such as the number of rotatable bonds and the number of H-bond acceptors, also differentiate permeant and non-permeant pesticides, but with a more moderate level of significance, whereas the parameters fraction Csp3, number of aromatic heavy atoms, and number of H-bond donors fail to do it (Table 2). When these molecular descriptors were applied to one particular class of pesticides, such as the organochlorine class, which approximately comprises similar proportions of predicted intestine-permeant and non-permeant chemicals (Figure 3), only XLogP3, LogS, the number of H-bond acceptors, and the number of H-bond donors reached significant levels (Figure S1). The parameter tPSA also highly discriminates intestine-permeant and non-permeant organochlorines (Figure S1), whereas it fails to do it for the whole set of pesticides (Table 2).

Table 2. Physicochemical parameters of pesticides ($n = 338$) predicted to exhibit low or high intestinal absorption ¹.

Physicochemical Parameter	Parameter Value (Mean \pm SD)		
	Low Intestinal Absorption ($n = 63$ Pesticides)	High Intestinal Absorption ($n = 275$ Pesticides)	Significance ²
Molecular weight (g/mol)	420.4 \pm 145.4	284.0 \pm 79.3	S ($p < 0.0001$)
Mean atomic van der Waals volume	0.7 \pm 0.1	0.6 \pm 0.1	S ($p < 0.0001$)
Mean atomic polarizability	0.8 \pm 0.5	0.7 \pm 0.1	S ($p < 0.0001$)
Number of heavy atoms	24.2 \pm 11.4	18.0 \pm 5.3	S ($p < 0.0001$)
Number of aromatic heavy carbons	6.6 \pm 6.3	5.5 \pm 4.4	NS ($p = 0.1050$)
Fraction Csp3	0.5 \pm 0.3	0.5 \pm 0.3	NS ($p = 0.7335$)
Number of rotatable bonds	6.2 \pm 4.2	5.4 \pm 2.2	S ($p = 0.0252$)
Number of H-bond acceptors	4.5 \pm 4.3	3.5 \pm 1.6	S ($p = 0.0031$)
Number of H-bond donors	0.4 \pm 0.9	0.6 \pm 0.8	NS ($p = 0.0550$)
LogS (Silicos-IT)	-6.0 \pm 2.5	-3.8 \pm 1.9	S ($p < 0.0001$)
XLogP3	5.2 \pm 2.1	3.1 \pm 1.8	S ($p < 0.0001$)
Molar refractivity	97.4 \pm 37.6	73.2 \pm 19.9	S ($p < 0.0001$)
tPSA (\AA^2)	68.1 \pm 61.3	70.3 \pm 27.7	NS ($p = 0.6675$)

¹ Prediction was based on the tPSA/WLogP-based graphical BOILED-Egg method; ² S, statistically significant between pesticides displaying predicted low or high intestinal absorption ($p < 0.05$); NS, not statistically significant ($p \geq 0.05$).

With respect to the prediction of brain permeation for pesticides, the molecular weight, the number of rotatable bonds, and the number of H-bond acceptors, as well as tPSA, constitute discriminative physicochemical parameters with a high level of significance ($p < 0.0001$) (Table 3). The predicted brain-permeant pesticides display thus a lower molecular weight, number of rotatable bonds, number of H-bond acceptors, and tPSA than their non-permeant counterparts. The number of heavy atoms and molar refractivity also differentiate predicted permeant and non-permeant pesticides, but with a lower level of significance (Table 3). The number of nitrogen and oxygen atoms, which is recognized as one of the main parameters to consider for brain penetration [38], was additionally highly significantly ($p < 0.0001$) lower for pesticides predicted to be brain-permeant than for their brain non-permeant counterparts.

Table 3. Physicochemical parameters of pesticides ($n = 338$) predicted to display brain or no brain permeation ¹.

Physicochemical Parameter	Parameter Value (Mean \pm SD)		Significance ²
	No-Brain Permeation ($n = 208$ Pesticides)	Brain Permeation ($n = 130$ Pesticides)	
Molecular weight (g/mol)	332.2 \pm 120.2	273.1 \pm 74.6	S ($p < 0.0001$)
Mean atomic van der Waals volume	0.7 \pm 0.1	0.6 \pm 0.1	S ($p = 0.0225$)
Mean atomic polarizability	0.7 \pm 0.3	0.7 \pm 0.1	NS ($p = 0.0510$)
Number of heavy atoms	20.0 \pm 8.3	17.8 \pm 4.8	S ($p = 0.0061$)
Number of aromatic heavy carbons	5.9 \pm 5.2	5.4 \pm 4.2	NS ($p = 0.3634$)
Fraction Csp3	0.5 \pm 0.3	0.5 \pm 0.3	NS ($p = 0.4746$)
Number of rotatable bonds	6.0 \pm 2.9	4.8 \pm 2.2	S ($p < 0.0001$)
Number of H-bond acceptors	4.3 \pm 2.7	2.8 \pm 1.3	S ($p < 0.0001$)
Number of H-bond donors	0.6 \pm 0.9	0.6 \pm 0.7	NS ($p = 0.6422$)
LogS (Silicos-IT)	-4.2 \pm 2.5	-4.1 \pm 1.6	NS ($p = 0.6153$)
XLogP3	3.6 \pm 2.4	3.4 \pm 1.4	NS ($p = 0.4395$)
Molar refractivity	81.1 \pm 29.1	72.2 \pm 18.4	S ($p = 0.0021$)
tPSA (\AA^2)	83.3 \pm 39.2	48.5 \pm 15.2	S ($p < 0.0001$)
Number of N and O atoms	4.4 \pm 2.5	3.4 \pm 1.2	S ($p < 0.0001$)

¹ Prediction was based on the tPSA/WLogP-based graphical BOILED-Egg method; ² S, statistically significant between predicted brain- and non-brain-permeant pesticides ($p < 0.05$); NS, not statistically significant ($p \geq 0.05$).

3.3. Confrontation of Predicted and Measured Human Intestinal Absorption for Some Pesticides

The prediction of human intestinal absorption determined from the tPSA/WLogP-based graphical BOILED-Egg method was finally compared with the measured intestinal absorption for a limited number of pesticides ($n = 25$) belonging to various chemical classes of pesticides, and for which human pharmacokinetics data are available. The threshold retained for predicted and measured high intestinal absorption was the same, i.e., $F_a \geq 0.30$. As shown in Table 4, the prediction for almost all of the considered pesticides ($n = 24$) was confirmed with human experimental data. The accuracy of the prediction was consequently found to correspond to 96%.

4. Discussion

Human intestinal absorption and human brain distribution correspond to key steps of pesticide toxicokinetics, but remain poorly characterized. In the present study, we have used a recent and original web tool, i.e., SwissADME, previously developed and validated for drugs [20], for investigating *in silico* the human intestine and brain permeation of 338 various pesticides belonging to the main chemical classes of pesticides. Our results showed that a large proportion of pesticides (more than 80%) is predicted to be highly absorbed by the human gastro-intestinal tract. This supports the idea that human exposure to pesticides through the oral way, which commonly occurs via the ingestion of contaminated food or water, is likely to result in an intake of these environmental contaminants. This may ultimately favor their deleterious effects towards human health, including endocrine disruption and carcinogenic effects [5]. In addition, a notable, although minor, proportion of pesticides (around 38%) is predicted to permeate the brain, which may support the well-established idea that pesticides have neurotoxic effects [39].

Table 4. Comparison of measured and predicted human intestinal absorption for some pesticides.

Pesticide	Class	Intestinal Absorption ¹	
		Determined from Pharmacokinetics Studies	Predicted by SwissADME Webtool
Cypermethrin	Pyrethroid	High (Fa = 0.40 [40,41])	High
Deltamethrin	Pyrethroid	High (Fa > 0.48 [42,43])	High
Permethrin	Pyrethroid	High (Fa ≥ 0.32 [44])	High
Bendiocarb	Carbamate	High (Fa ≥ 0.99 [45])	High
Pirimicarb	Carbamate	High (Fa = 0.74 [46])	High
Molinate	Carbamate	High (Fa > 0.40 [22])	High
Propoxur	Carbamate	High (Fa > 0.37 [47,48])	High
DDT ²	Organochlorine	Low (Fa = 0.15 [49])	Low
Pentachlorophenol	Organochlorine	High (Fa > 0.86 [50])	High
TCDD ²	Organochlorine	High (Fa > 0.87 [51])	Low
Chlorpyrifos	Organophosphorus compound	High (Fa = 0.82 [52,53])	High
Diazinon	Organophosphorus compound	High (Fa > 0.66 [54])	High
Dichlorvos	Organophosphorus compound	High (Fa > 0.36 [55])	High
Dimethoate	Organophosphorus compound	High (Fa = 0.86 [56,57])	High
Fenitrothion	Organophosphorus compound	High (Fa = 0.81 [58])	High
Parathion	Organophosphorus compound	High (Fa > 0.46 [59])	High
Propetamphos	Organophosphorus compound	High (Fa > 0.41 [60])	High
2,4,5-T ²	Miscellaneous	High (Fa > 0.89 [61])	High
2,4-D ²	Miscellaneous	High (Fa = 0.85 [62,63])	High
Fluazifop-butyl	Miscellaneous	High (Fa = 0.88 [64])	High
MCPA ²	Miscellaneous	High (Fa > 0.55 [65])	High
Paraquat	Miscellaneous	Low (Fa ≤ 0.05 [66])	Low
Picloram	Miscellaneous	High (Fa = 0.91 [67])	High
Triclopyr	Miscellaneous	High (Fa > 0.82 [68])	High
Warfarine	Miscellaneous	High (Fa > 0.93 [69])	High

¹ Human intestinal absorption is considered high when Fa ≥ 0.30 and low when Fa < 0.30; ² DDT, dichlorodiphenyltrichloroethane; TCDD, 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin; 2,4,5-T, 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid; 2,4-D, 2,4-dichlorophenoxyacetic acid; MCPA, 2-methyl-4-chlorophenoxyacetic acid.

The prediction of intestinal absorption of pesticides performed with the SwissADME/BOILED-egg method was interestingly validated with absorption data from human toxicokinetics studies, with an accuracy of 96%. Even if the available measured data from the human studies are unfortunately limited ($n = 25$), and rather unbalanced, i.e., most of them ($n = 23$) reporting high intestinal absorption of pesticides (Table 4), this validation is worth noting. A similar high accuracy (83–93%) has also been reported for the prediction of human intestine absorption by the SwissADME tool for a large data set of drugs [21]. In addition, pesticides predicted to display high intestinal permeation exhibit a profile of physicochemical parameters, i.e., reduced molecular weight, van der Waals volume, and polarizability, and increased solubility, which is well-known to favor the high intestinal absorption of drugs and chemicals [70–72]. This supports the relevance of the *in silico* prediction. In particular, the size of the drug molecule affects absorption. Smaller molecular weight drugs are consequently absorbed better compared to larger ones [73]. Indeed, as molecular size increases, a larger cavity must be formed in water to be soluble. Increasing the size also impedes passive diffusion through the tightly packed aliphatic side chains of the lipid bilayer membrane. Moderately lipophilic drugs, i.e., drugs with LogP < 5, are additionally more absorbed than highly lipophilic drugs [74]; in agreement with this rule, *in silico* predicted high intestine-permeant pesticides have significantly lower LogP (estimated notably by the XlogP3 value in the present study) than their non-permeant counterparts. It should however be kept in mind that each physicochemical parameter, when separately considered, may fail to unambiguously predict intestine permeation, thus highlighting the relevance of combining two parameters as is done in the BOILED-Egg method. Finally, the *in vitro* measurement of transport across human intestinal Caco-2 cells for some pesticides, such as the neonicotinoids acetamiprid and imidacloprid, have revealed high apparent permeability coefficients [75,76] consistent with *in vivo* absorption with 100% efficiency, and thus with the *in silico* prediction of high absorption for these two pesticides (Table S1).

The prediction of brain permeation for pesticides cannot, unfortunately, be validated by human experimental pharmacokinetics data, owing to the quasi-absence of such data in the scientific literature and pesticide database. Nevertheless, the fact that the BOILED-Egg method predicts drug transfer across the blood-brain barrier with high accuracy [21] supports the relevance of this method for other chemicals such as pesticides. In addition, some physicochemical parameters significantly associated with the prediction of brain permeation for pesticides, such as a reduced tPSA and the number of nitrogen and oxygen atoms, are well-established factors favoring the permeation of drugs into the brain. Indeed, drugs entering the brain typically have a tPSA value of less than 60–70 Å² [77] and a number of nitrogen and oxygen atoms less than or equal to five [38]. *In silico* predictions of brain passage were moreover supported by *in vitro* or *in vivo* data for some pesticides. The pyrethroid deltamethrin, predicted to be brain non-permeant (Table S1), has thus been shown to accumulate relatively poorly in human brain endothelial hCMEC/D3 cells [78]; whereas paraquat, also predicted to be brain non-permeant (Table S1), is excluded by the blood-brain barrier in the primate rhesus macaque [79].

Even if most of the pesticides are predicted to exhibit high intestine absorption, some of them, notably the organochlorines aldrin, chlordane, DDT, heptachlor, and lindane, are predicted to display low intestine absorption. Such intestine non-permeant organochlorines are highly lipophilic non-polar chemicals; they do not comprise H-bond acceptors or donors, in contrast to intestine-permeant organochlorines (Figure S1). This lack of potential H-bonds for the non-permeant organochlorines is consistent with their low solubility, probably contributing to their predicted poor intestinal absorption. It is noteworthy that the marked lipophilicity of the organochlorines also results in long-term storage in fat tissue and low excretion [80]. Therefore, the organochlorines, although some of them poorly absorbed, may nevertheless accumulate in an organism. These persistent organic pollutants may consequently reach cellular levels for which toxic effects, notably metabolic or endocrine effects, are suspected to occur [81,82]. In addition, the fact that the dietary intake of lipophilic organic chemicals such as organochlorines may occur primarily via adsorption to mixed dietary lipid micelles has to be considered [83,84]. Such a process may notably contribute to the intestine permeation of TCDD, thus explaining the discordance between the high measured intestine absorption of this organochlorine [51] and the prediction of low absorption by the BOILED-Egg method (Table 4).

It is noteworthy that the percentage of brain-permeant pesticides (less than 40%) is approximately twice as low as that of their intestine-permeant counterparts (more than 80%). This probably reflects the fact that the physicochemical criteria for entering the brain are more stringent than those required for intestinal absorption. In particular, concerning polarity, the tPSA value has to be ideally less than 60–70 Å² for brain permeation, whereas the tPSA threshold is higher, i.e., 120 Å², for oral absorption [77]. Organophosphorus pesticides are consequently predicted, for most of them, to be not brain-permeant, owing to their relatively high tPSA values (Figure 2); the bioactive metabolites of organophosphorus compounds, such as oxons-related molecules, are also rather poorly brain-permeant (Table 1). Similarly, the carbamates and triazines exhibiting substantial tPSA values are predicted to not cross the blood-brain barrier (Figure 2). It should be however kept in mind that the organophosphorus pesticides are suspected to cause neurotoxicity, including delayed neuropathies and long-term effects [85,86], which may appear as contradictory with the fact that they are predicted to be not brain-permeant. Such an apparent discrepancy may be due to the threshold retained for predicting a brain non-permeant chemical by the BOILED-egg method, i.e., LogBB < 0, whereas other studies have retained a less stringent threshold (LogBB < −1) for compounds poorly distributed in the brain [87–89]. In this context, it may be hypothesized that at least some of the organophosphorus pesticides can in fact partly access the brain, with LogBB values comprised between −1 and 0 (−1 < LogBB < 0), which may be compatible with their neurotoxicity. The fact that a LogBB equal to −0.09 has been measured for the organophosphorus parathion in pigs probably supports this hypothesis [90]. Besides, organophosphorus pesticides such as chlorpyrifos and malathion directly alter the functional integrity

of the blood-brain barrier [91–93]. Such a disruption of this blood-tissue barrier may secondarily result in the enhanced passage of organophosphorus pesticides in the central nervous system.

It is noteworthy that the BOILED-Egg method-based prediction of drug passage across the intestine and the blood-brain barrier does not directly take into account the potential implication of the influx or efflux of drug transporters [21]. However, there is now increasing evidence that such membrane transporters may interact with various pesticides [94], including organophosphorus compounds, organochlorines, paraquat, and pyrethroids [33,95–98]. In particular, the putative transport of pesticides at the intestinal level by ATP-binding cassette (ABC) efflux transporters such as P-glycoprotein (*ABCB1*) and the breast cancer resistance protein (BCRP, *ABCG2*) has probably to be taken into account [99]. Indeed, the low doses of pesticides contained in food are unlikely to saturate these efflux pumps, in contrast to the high doses of administered drugs. The P-glycoprotein and/or BCRP-mediated efflux of pesticides at the apical pole of intestinal cells may consequently efficiently prevent their absorption by actively repelling them into the lumen of the intestine. Solute carrier (SLC) transporters acting as influx transporters may also have to be considered for the intestinal transport of some pyrethroids [100].

If intestinal absorption and brain penetration constitute key steps of pesticide toxicokinetics in response to oral exposure, other parameters have to be taken into account for more globally considering pesticide disposition in the human organism. This is notably the case for metabolism and/or excretion processes, which may occur rapidly and extensively, notably for first-pass hepatic metabolism, thus resulting in the relatively short half-lives of some pesticides. This may concern pyrethroids and organophosphorus insecticides, which are subjected to many metabolic pathways mediated by various xenobiotic metabolizing enzymes [101,102]. By contrast, organochlorine pesticides are thought to be less metabolized, and therefore appear to be more stable in the organism. Storage in some compartments, such as adipose tissue, may additionally play a major role in the toxicokinetics of pesticides, notably for the most lipophilic of them, such as the organochlorines [103], as discussed above. Binding to proteins, including plasma proteins, is also a key parameter to consider, as only the free fraction of pesticides is presumed to exert toxicodynamic effects and to be handled by pharmacokinetics effectors such as drug transporters and drug metabolizing enzymes. The chirality of pesticides may also have to be taken into account, as reported for drugs [104]. Entero-hepatic circulation, which occurs for some pesticides such as the carbamates and organochlorines [103,105], may additionally deserve attention. Moreover, the formulation of pesticides may constitute a feature influencing their intestinal absorption, notably for the organophosphorus insecticides [52,106]. The fact that humans are usually exposed to a mixture of pesticides [107] may also affect their intestinal absorption, owing to possible pesticide–pesticide interactions with respect to drug transporters, as already described for drug–drug interactions [108]. Finally, the nature of the diet may interfere with the passage of pesticides across the intestinal barrier, as previously shown for the intestinal absorption of drugs [109].

Computer-based methods based on molecular descriptors such as lipophilicity and polarity, initially developed for drugs [16], may be useful for predicting not only pesticide intestine and brain permeation, as described in the present study, but also for evaluating other pharmacokinetics parameters such as metabolism and clearance, as well as the biological effects of pesticides. More globally, *in silico* methods and computational systems biology probably represent promising ways for assessing pesticide toxicity and risk, notably in humans [110–113]. However, further studies are required to fully validate *in silico* approaches, notably with respect to the realistic conditions of environmental exposure to pesticides, i.e., low and/or chronic doses of mixtures of pesticides. In particular, *in silico* methods are likely to be compared with other non-animal approaches, such as *in vitro* methods, for human toxicokinetics in risk evaluations of pesticides [10,114].

5. Conclusions

The analysis of a large set of pesticides ($n = 338$) belonging to various main chemical classes using an online tool *in silico* predicting human intestine and brain permeation indicated that a high

percentage of pesticides (81.4%) was predicted to exhibit high intestinal absorption with a high accuracy (96%), whereas a lower, but substantial, percentage (38.5%) displayed brain permeation. Such data suggest that human exposure to pesticides through the oral way is likely to result in the intake of these environmental contaminants for most of them and brain permeation for some of them, thus supporting the well-established toxicity, including neurotoxicity, of pesticides for human health. They also highlight the interest of computational approaches for assessing pesticide pharmacokinetics and toxicity in humans.

Supplementary Materials: The following are available online at www.mdpi.com/1660-4601/14/7/708/s1, Figure S1: Comparison of physicochemical parameters of organochlorines ($n = 30$) predicted to display low or high intestinal absorption; Table S1: Pesticides-dataset; Table S2: Oxon organophosphorus pesticides-dataset.

Author Contributions: L.C., A.B., and O.F. conceived, designed, and performed the experiments and analyzed the data; D.M.-L. contributed analysis tools; L.C. and O.F. wrote the paper.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

Appendix A

R code used for drawing ellipsoidal regions defining intestine and brain permeation according to the graphical BOILED-Egg method.

```
library("plotrix")myW = 1200
myH = 1000
ps = 6
jpeg(width = myW, height = myH, "ALL.05.png", res = "300", pointsize = ps)
dataAll = read.table("20170530_pesticides_swissadme.csv", sep = "t",header = T, dec = ",")
datasize = read.table("20170530_pesticides_swissadme.csv", sep = "t",header = T, dec = ",")
plot(datasize$TPSA, datasize$WLOGP, col=rgb(1,1,1), xlab = "tPSA (A2)", ylab = "WLog P")
draw.ellipse(71.051, 2.292, 142.081/2, 8.740/2, -1.031325, deg = TRUE, col = "grey")
draw.ellipse(38.117, 3.177, 82.061/2, 5.557/2, -0.171887, deg = TRUE, col = "yellow")
points(dataAll$TPSA, dataAll$WLOGP, cex=0.5)
draw.ellipse(71.051, 2.292, 142.081/2, 8.740/2, -1.031325, deg = TRUE)
dev.off()
```

References

1. Damalas, C.A.; Eleftherohorinos, I.G. Pesticide exposure, safety issues, and risk assessment indicators. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **2011**, *8*, 1402–1419. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Winter, C.K. Dietary pesticide risk assessment. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* **1992**, *127*, 23–67. [[PubMed](#)]
3. Schafer, K.S.; Kegley, S.E. Persistent toxic chemicals in the US food supply. *J. Epidemiol. Community Health* **2002**, *56*, 813–817. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Hamilton, D.; Ambrus, A.; Dieterle, R.; Felsot, A.; Harris, C.; Petersen, B.; Racke, K.; Wong, S.S.; Gonzalez, R.; Tanaka, K.; et al. Pesticide residues in food—Acute dietary exposure. *Pest. Manag. Sci.* **2004**, *60*, 311–339. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Mostafalou, S.; Abdollahi, M. Pesticides: An update of human exposure and toxicity. *Arch. Toxicol.* **2017**, *91*, 549–599. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Kim, K.H.; Kabir, E.; Jahan, S.A. Exposure to pesticides and the associated human health effects. *Sci. Total Environ.* **2017**, *575*, 525–535. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Mostafalou, S.; Abdollahi, M. Pesticides and human chronic diseases: Evidences, mechanisms, and perspectives. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2013**, *268*, 157–177. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. Soderlund, D.M. Molecular mechanisms of pyrethroid insecticide neurotoxicity: Recent advances. *Arch. Toxicol.* **2012**, *86*, 165–181. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
9. Pope, C.N. Organophosphorus pesticides: Do they all have the same mechanism of toxicity? *J. Toxicol. Environ. Health B Crit. Rev.* **1999**, *2*, 161–181. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

10. Coecke, S.; Pelkonen, O.; Leite, S.B.; Bernauer, U.; Bessems, J.G.; Bois, F.Y.; Gundert-Remy, U.; Loizou, G.; Testai, E.; Zaldivar, J.M. Toxicokinetics as a key to the integrated toxicity risk assessment based primarily on non-animal approaches. *Toxicol. In Vitro* **2013**, *27*, 1570–1577. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
11. Jones, C.R.; Hatley, O.J.; Ungell, A.L.; Hilgendorf, C.; Peters, S.A.; Rostami-Hodjegan, A. Gut Wall Metabolism. Application of Pre-Clinical Models for the Prediction of Human Drug Absorption and First-Pass Elimination. *AAPS J.* **2016**, *18*, 589–604. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Abbott, N.J. Prediction of blood-brain barrier permeation in drug discovery from *in vivo*, *in vitro* and *in silico* models. *Drug Discov. Today Technol.* **2004**, *1*, 407–416. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Sjogren, E.; Abrahamsson, B.; Augustijns, P.; Becker, D.; Bolger, M.B.; Brewster, M.; Brouwers, J.; Flanagan, T.; Harwood, M.; Heinen, C.; et al. *In vivo* methods for drug absorption—Comparative physiologies, model selection, correlations with *in vitro* methods (IVIVC), and applications for formulation/API/excipient characterization including food effects. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2014**, *57*, 99–151. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Pellegatti, M. Preclinical *in vivo* ADME studies in drug development: A critical review. *Expert. Opin. Drug Metab. Toxicol.* **2012**, *8*, 161–172. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Nagpal, K.; Singh, S.K.; Mishra, D.N. Drug targeting to brain: A systematic approach to study the factors, parameters and approaches for prediction of permeability of drugs across BBB. *Expert. Opin. Drug Deliv.* **2013**, *10*, 927–955. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Cheng, F.; Li, W.; Liu, G.; Tang, Y. *In silico* ADMET prediction: Recent advances, current challenges and future trends. *Curr. Top. Med. Chem.* **2013**, *13*, 1273–1289. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Butina, D.; Segall, M.D.; Frankcombe, K. Predicting ADME properties *in silico*: Methods and models. *Drug Discov. Today* **2002**, *7*, S83–S88. [[CrossRef](#)]
18. Toropov, A.A.; Toropova, A.P.; Beeg, M.; Gobbi, M.; Salmona, M. QSAR model for blood-brain barrier permeation. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* **2017**, *88*, 7–18. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Toropova, M.A.; Raska, I.; Toropov, A.A.; Raskova, M. The Utilization of the Monte Carlo Technique for Rational Drug Discovery. *Comb. Chem. High. Throughput Screen.* **2016**, *19*, 676–687. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. Daina, A.; Michielin, O.; Zoete, V. SwissADME: A free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 42717. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
21. Daina, A.; Zoete, V. A BOILED-Egg to predict gastrointestinal absorption and brain penetration of small molecules. *ChemMedChem* **2016**, *11*, 1117–1121. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Wilkes, M.F.; Woollen, B.H.; Marsh, J.R.; Batten, P.L.; Chester, G. Biological monitoring for pesticide exposure—the role of human volunteer studies. *Int. Arch. Occup. Environ. Health* **1993**, *65*, S189–S192. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Kim, K.B.; Anand, S.S.; Kim, H.J.; White, C.A.; Bruckner, J.V. Toxicokinetics and tissue distribution of deltamethrin in adult Sprague-Dawley rats. *Toxicol. Sci.* **2008**, *101*, 197–205. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Musther, H.; Olivares-Morales, A.; Hatley, O.J.; Liu, B.; Rostami-Hodjegan, A. Animal versus human oral drug bioavailability: Do they correlate? *Eur. J. Pharm. Sci.* **2014**, *57*, 280–291. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Resnik, D.B.; Portier, C. Pesticide testing on human subjects: Weighing benefits and risks. *Environ. Health Perspect* **2005**, *113*, 813–817. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. London, L.; Coggon, D.; Moretto, A.; Westerholm, P.; Wilks, M.F.; Colosio, C. The ethics of human volunteer studies involving experimental exposure to pesticides: Unanswered dilemmas. *Environ. Health* **2010**, *9*, 50. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Hazardous Substances Data Bank (HSDB). Available online: <https://toxnet.nlm.nih.gov/newtoxnet/hsdb.htm> (accessed on 26 March 2017).
28. National Pesticide Information Center. Available online: <http://npic.orst.edu/> (accessed on 28 March 2017).
29. Holt, E.; Weber, R.; Stevenson, G.; Gaus, C. Formation of dioxins during exposure of pesticide formulations to sunlight. *Chemosphere* **2012**, *88*, 364–370. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. PubChem. Available online: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/> (accessed on 30 March 2017).
31. The R Project for Statistical Computing. Available online: <http://www.R-project.org/> (accessed on 18 April 2017).
32. Cheng, T.; Zhao, Y.; Li, X.; Lin, F.; Xu, Y.; Zhang, X.; Li, Y.; Wang, R.; Lai, L. Computation of octanol-water partition coefficients by guiding an additive model with knowledge. *J. Chem. Inf. Model.* **2007**, *47*, 2140–2148. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

33. Chedik, L.; Bruyere, A.; Le Vee, M.; Stieger, B.; Denizot, C.; Parmentier, Y.; Potin, S.; Fardel, O. Inhibition of Human Drug Transporter Activities by the Pyrethroid Pesticides Allethrin and Tetramethrin. *PLoS ONE* **2017**, *12*, e0169480. [CrossRef] [PubMed]
34. PubMed. Available online: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/> (accessed on 28 March 2017).
35. Fukuto, T.R. Mechanism of action of organophosphorus and carbamate insecticides. *Environ. Health Perspect.* **1990**, *87*, 245–254. [CrossRef] [PubMed]
36. Ellison, C.A.; Tian, Y.; Knaak, J.B.; Kostyniak, P.J.; Olson, J.R. Human hepatic cytochrome P450-specific metabolism of the organophosphorus pesticides methyl parathion and diazinon. *Drug Metab. Dispos.* **2012**, *40*, 1–5. [CrossRef] [PubMed]
37. Flaskos, J. The developmental neurotoxicity of organophosphorus insecticides: A direct role for the oxon metabolites. *Toxicol. Lett.* **2012**, *209*, 86–93. [CrossRef] [PubMed]
38. Norinder, U.; Haerberlein, M. Computational approaches to the prediction of the blood-brain distribution. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2002**, *54*, 291–313. [CrossRef]
39. Saeedi Saravi, S.S.; Dehpour, A.R. Potential role of organochlorine pesticides in the pathogenesis of neurodevelopmental, neurodegenerative, and neurobehavioral disorders: A review. *Life Sci.* **2016**, *145*, 255–264. [CrossRef] [PubMed]
40. Eadsforth, C.V.; Bragt, P.C.; van Sittert, N.J. Human dose-excretion studies with pyrethroid insecticides cypermethrin and alphacypermethrin: Relevance for biological monitoring. *Xenobiotica* **1988**, *18*, 603–614. [CrossRef] [PubMed]
41. Woollen, B.H.; Marsh, J.R.; Laird, W.J.; Lesser, J.E. The metabolism of cypermethrin in man: Differences in urinary metabolite profiles following oral and dermal administration. *Xenobiotica* **1992**, *22*, 983–991. [CrossRef] [PubMed]
42. Papalexioiu, P.; Bitar, N.; Stockis, A. *Absorption of Radiocarbon Labelled Deltamethrin Given Orally in Healthy Volunteers*, Unpublished Proprietary Report 50/22, submitted to WHO by Roussel Uclaf. 1984.
43. Sams, C.; Jones, K. Biological monitoring for exposure to deltamethrin: A human oral dosing study and background levels in the UK general population. *Toxicol. Lett.* **2012**, *213*, 35–38. [CrossRef] [PubMed]
44. Cridland, J.S.; Weatherley, B.C. *Urinary Excretion in Man of 3-(2,2-dichlorovinyl)-2,2-dimethylcyclopropane Carboxylic acid ("CVA") after Oral Ingestion of Permethrin (NRDC 143)—A First Report*, Wellcome Research Laboratories (Report No. BDPE-77-1), Unpublished data, submitted to WHO. 1977.
45. Adcock, J.W.; Challis, I.R. *The Pharmacokinetics and Metabolism of Bendiocarb in Man*, Report from Fisons Ltd. Unpublished Report, submitted to WHO by FBC Limited. 1976.
46. Sams, C.; Patel, K.; Jones, K. Biological monitoring for exposure to pirimicarb: Method development and a human oral dosing study. *Toxicol. Lett.* **2010**, *192*, 56–60. [CrossRef] [PubMed]
47. Vandekar, M.; Plestina, R.; Wilhelm, K. Toxicity of carbamates for mammals. *Bull. World Health Organ.* **1971**, *44*, 241–249. [PubMed]
48. Dawson, J.A.; Heath, D.F.; Rose, J.A.; Thain, E.M.; Ward, J.B. The excretion by humans of the phenol derived in vivo from 2-isopropoxyphenyl N-methylcarbamate. *Bull. World Health Organ.* **1964**, *30*, 127–134. [PubMed]
49. Hayes, W.J., Jr.; Dale, W.E.; Pirkle, C.I. Evidence of safety of long-term, high, oral doses of DDT for man. *Arch. Environ. Health* **1971**, *22*, 119–135. [CrossRef] [PubMed]
50. Braun, W.H.; Blau, G.E.; Chenoweth, M.B. The metabolism/pharmacokinetics of pentachlorophenol in man, and a comparison with the rat and monkey. *Dev. Toxicol. Environ. Sci.* **1979**, *4*, 289–296.
51. Poiger, H.; Schlatter, C. Pharmacokinetics of 2,3,7,8-TCDD in man. *Chemosphere* **1986**, *15*, 1489–1494. [CrossRef]
52. Nolan, R.J.; Rick, D.L.; Freshour, N.L.; Saunders, J.H. Chlorpyrifos: Pharmacokinetics in human volunteers. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **1984**, *73*, 8–15. [CrossRef]
53. Griffin, P.; Mason, H.; Heywood, K.; Cocker, J. Oral and dermal absorption of chlorpyrifos: A human volunteer study. *Occup. Environ. Med.* **1999**, *56*, 10–13. [CrossRef] [PubMed]
54. Garfitt, S.J.; Jones, K.; Mason, H.J.; Cocker, J. Exposure to the organophosphate diazinon: Data from a human volunteer study with oral and dermal doses. *Toxicol. Lett.* **2002**, *134*, 105–113. [CrossRef]
55. Hutson, D.H.; Hoadley, E.C. The comparative metabolism of (14 C-vinyl)dichlorvos in animals and man. *Arch. Toxicol.* **1972**, *30*, 9–18. [CrossRef] [PubMed]
56. Sanderson, D.M.; Edson, E.F. Toxicologic properties of the organophosphorus insecticide dimethoate. *Br. J. Ind. Med.* **1964**, *21*, 52–64. [PubMed]

57. Krieger, R.I.; Thongsinthusak, T. Metabolism and excretion of dimethoate following ingestion of overtolerance peas and a bolus dose. *Food Chem. Toxicol.* **1993**, *31*, 177–182. [[CrossRef](#)]
58. Meaklim, J.; Yang, J.; Drummer, O.H.; Killalea, S.; Staikos, V.; Horomidis, S.; Rutherford, D.; Ioannides-Demos, L.L.; Lim, S.; McLean, A.J.; et al. Fenitrothion: Toxicokinetics and toxicologic evaluation in human volunteers. *Environ. Health Perspect.* **2003**, *111*, 305–308. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
59. Morgan, D.P.; Hetzler, H.L.; Slach, E.F.; Lin, L.I. Urinary excretion of parnitrophenol and alkyl phosphates following ingestion of methyl or ethyl parathion by human subjects. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **1977**, *6*, 159–173. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
60. Garfitt, S.J.; Jones, K.; Mason, H.J.; Cocker, J. Oral and dermal exposure to propetamphos: A human volunteer study. *Toxicol. Lett.* **2002**, *134*, 115–118. [[CrossRef](#)]
61. Gehring, P.J.; Kramer, C.G.; Schwetz, B.A.; Rose, J.Q.; Rowe, V.K. The fate of 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid (2,4,5-T) following oral administration to man. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **1973**, *26*, 352–361. [[CrossRef](#)]
62. Sauerhoff, M.W.; Braun, W.H.; Blau, G.E.; Gehring, P.J. The fate of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) following oral administration to man. *Toxicology* **1977**, *8*, 3–11. [[CrossRef](#)]
63. Kohli, J.D.; Khanna, R.N.; Gupta, B.N.; Dhar, M.M.; Tandon, J.S.; Sircar, K.P. Absorption and excretion of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in man. *Xenobiotica* **1974**, *4*, 97–100. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
64. Woollen, B.H.; Hart, T.B.; Batten, P.L.; Laird, W.J.; Davies, D.S.; Dollery, C.T. Oral pharmacokinetics of fluazifop-butyl in human volunteers. *Hum. Exp. Toxicol.* **1991**, *10*, 39–43. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
65. Feldmann, R.J.; Wannag, A. Human urinary excretion of the herbicide 2-methyl-4-chloro-phenoxy-acetic acid. *Scand. J. Work Environ. Health* **1977**, *3*, 100–103.
66. Conning, D.A.; Fletcher, K.; Swan, A.A.B. Paraquat and related bipyridyls. *Br. Med. Bull.* **1969**, *25*, 245–249. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
67. Nolan, R.J.; Freshour, N.L.; Kastl, P.E.; Saunders, J.H. Pharmacokinetics of picloram in male volunteers. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **1984**, *76*, 264–269. [[CrossRef](#)]
68. Carmichael, N.G.; Nolan, R.J.; Perkins, J.M.; Davies, R.; Warrington, S.J. Oral and dermal pharmacokinetics of triclopyr in human volunteers. *Hum. Toxicol.* **1989**, *8*, 431–437. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
69. Breckenridge, A.; Orme, M. Kinetics of warfarin absorption in man. *Clin. Pharmacol. Ther.* **1973**, *14*, 955–961. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
70. Lipinski, C.A.; Lombardo, F.; Dominy, B.W.; Feeney, P.J. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2001**, *46*, 3–26. [[CrossRef](#)]
71. Lombardo, F.; Gifford, E.; Shalaeva, M.Y. *In silico* ADME prediction: Data, models, facts and myths. *Mini Rev. Med. Chem.* **2003**, *3*, 861–875. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
72. Veber, D.F.; Johnson, S.R.; Cheng, H.Y.; Smith, B.R.; Ward, K.W.; Kopple, K.D. Molecular properties that influence the oral bioavailability of drug candidates. *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 2615–2623. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
73. Mukunthan, K.S.; Bhattacharya, A.; Patel, T.N.C. Regression Analysis: Identifying Molecular Descriptors for HIA, MDCK and Caco-2. *Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res.* **2016**, *37*, 205–209.
74. Lipinski, C.A. Lead- and drug-like compounds: The rule-of-five revolution. *Drug Discov. Today Technol.* **2004**, *1*, 337–341. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
75. Brunet, J.L.; Maresca, M.; Fantini, J.; Belzunces, L.P. Intestinal absorption of the acetamiprid neonicotinoid by Caco-2 cells: Transepithelial transport, cellular uptake and efflux. *J. Environ. Sci. Health B* **2008**, *43*, 261–270. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
76. Brunet, J.L.; Maresca, M.; Fantini, J.; Belzunces, L.P. Human intestinal absorption of imidacloprid with Caco-2 cells as enterocyte model. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2004**, *194*, 1–9. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
77. Kelder, J.; Grootenhuis, P.D.; Bayada, D.M.; Delbressine, L.P.; Ploemen, J.P. Polar molecular surface as a dominating determinant for oral absorption and brain penetration of drugs. *Pharm. Res.* **1999**, *16*, 1514–1519. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
78. Amaraneni, M.; Sharma, A.; Pang, J.; Muralidhara, S.; Cummings, B.S.; White, C.A.; Bruckner, J.V.; Zastre, J. Plasma protein binding limits the blood brain barrier permeation of the pyrethroid insecticide, deltamethrin. *Toxicol. Lett.* **2016**, *250–251*, 21–28. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
79. Bartlett, R.M.; Holden, J.E.; Nickles, R.J.; Murali, D.; Barbee, D.L.; Barnhart, T.E.; Christian, B.T.; DeJesus, O.T. Paraquat is excluded by the blood brain barrier in rhesus macaque: An *in vivo* pet study. *Brain Res.* **2009**, *1259*, 74–79. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

80. La Merrill, M.; Emond, C.; Kim, M.J.; Antignac, J.P.; Le Bizec, B.; Clement, K.; Birnbaum, L.S.; Barouki, R. Toxicological function of adipose tissue: Focus on persistent organic pollutants. *Environ. Health Perspect.* **2013**, *121*, 162–169. [[PubMed](#)]
81. Lee, D.H.; Steffes, M.W.; Sjodin, A.; Jones, R.S.; Needham, L.L.; Jacobs, D.R., Jr. Low dose organochlorine pesticides and polychlorinated biphenyls predict obesity, dyslipidemia, and insulin resistance among people free of diabetes. *PLoS ONE* **2011**, *6*, e15977. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
82. Ruzzin, J.; Petersen, R.; Meugnier, E.; Madsen, L.; Lock, E.J.; Lillefosse, H.; Ma, T.; Pesenti, S.; Sonne, S.B.; Marstrand, T.T.; et al. Persistent organic pollutant exposure leads to insulin resistance syndrome. *Environ. Health Perspect.* **2010**, *118*, 465–471. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
83. Surak, J.G.; Bradley, R.L., Jr. Transport of organochlorine chemicals across cell membranes. *Environ. Res.* **1976**, *11*, 343–352. [[CrossRef](#)]
84. Moser, G.A.; McLachlan, M.S. Modeling digestive tract absorption and desorption of lipophilic organic contaminants in humans. *Environ. Sci. Technol.* **2002**, *36*, 3318–3325. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
85. Jamal, G.A. Neurological syndromes of organophosphorus compounds. *Adverse Drug React. Toxicol. Rev.* **1997**, *16*, 133–170. [[PubMed](#)]
86. Voorhees, J.R.; Rohlman, D.S.; Lein, P.J.; Pieper, A.A. Neurotoxicity in Preclinical Models of Occupational Exposure to Organophosphorus Compounds. *Front. Neurosci.* **2016**, *10*, 590. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
87. Abraham, M.H.; Takacs-Novak, K.; Mitchell, R.C. On the partition of ampholytes: Application to blood-brain distribution. *J. Pharm. Sci.* **1997**, *86*, 310–315. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
88. Clark, D.E. Rapid calculation of polar molecular surface area and its application to the prediction of transport phenomena. 2. Prediction of blood-brain barrier penetration. *J. Pharm. Sci.* **1999**, *88*, 815–821. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
89. Vilar, S.; Chakrabarti, M.; Costanzi, S. Prediction of passive blood-brain partitioning: Straightforward and effective classification models based on *in silico* derived physicochemical descriptors. *J. Mol. Graph. Model.* **2010**, *28*, 899–903. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
90. Nielsen, P.; Friis, C.; Gyrd-Hansen, N.; Kraul, I. Disposition of parathion in neonatal and young pigs. *Pharmacol. Toxicol.* **1991**, *69*, 233–237. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
91. Yang, J.; Mutkus, L.A.; Sumner, D.; Stevens, J.T.; Eldridge, J.C.; Strandhoy, J.W.; Aschner, M. Transendothelial permeability of chlorpyrifos in RBE4 monolayers is modulated by astrocyte-conditioned medium. *Brain Res. Mol. Brain Res.* **2001**, *97*, 43–50. [[CrossRef](#)]
92. Li, W.; Ehrich, M. Transient alterations of the blood-brain barrier tight junction and receptor potential channel gene expression by chlorpyrifos. *J. Appl. Toxicol.* **2013**, *33*, 1187–1191. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
93. Balbuena, P.; Li, W.; Rzigalinski, B.A.; Ehrich, M. Malathion/oxon and lead acetate increase gene expression and protein levels of transient receptor potential canonical channel subunits TRPC1 and TRPC4 in rat endothelial cells of the blood-brain barrier. *Int. J. Toxicol.* **2012**, *31*, 238–249. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
94. Fardel, O.; Kolasa, E.; Le Vee, M. Environmental chemicals as substrates, inhibitors or inducers of drug transporters: Implication for toxicokinetics, toxicity and pharmacokinetics. *Expert. Opin. Drug Metab. Toxicol.* **2012**, *8*, 29–46. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
95. Lacher, S.E.; Skagen, K.; Veit, J.; Dalton, R.; Woodahl, E.L. P-Glycoprotein Transport of Neurotoxic Pesticides. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2015**, *355*, 99–107. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
96. Bucher, S.; Le Vee, M.; Jouan, E.; Fardel, O. Regulation of hepatic drug transporter activity and expression by organochlorine pesticides. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* **2014**, *28*, 119–128. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
97. Bain, L.J.; LeBlanc, G.A. Interaction of structurally diverse pesticides with the human MDR1 gene product P-glycoprotein. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **1996**, *141*, 288–298. [[CrossRef](#)]
98. Chen, Y.; Zhang, S.; Sorani, M.; Giacomini, K.M. Transport of paraquat by human organic cation transporters and multidrug and toxic compound extrusion family. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2007**, *322*, 695–700. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
99. Chan, L.M.; Lowes, S.; Hirst, B.H. The ABCs of drug transport in intestine and liver: Efflux proteins limiting drug absorption and bioavailability. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2004**, *21*, 25–51. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
100. Zastre, J.; Dowd, C.; Bruckner, J.; Popovici, A. Lack of P-glycoprotein-mediated efflux and the potential involvement of an influx transport process contributing to the intestinal uptake of deltamethrin, cis-permethrin, and trans-permethrin. *Toxicol. Sci.* **2013**, *136*, 284–293. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

101. Kramer, R.E.; Wellman, S.E.; Rockhold, R.W.; Baker, R.C. Pharmacokinetics of methyl parathion: A comparison following single intravenous, oral or dermal administration. *J. Biomed. Sci.* **2002**, *9*, 311–320. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
102. Gammon, D.; Liu, Z.; Chandrasekaran, A.; ElNaggar, S. The pharmacokinetic properties of bifenthrin in the rat following multiple routes of exposure. *Pest. Manag. Sci.* **2015**, *71*, 835–841. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
103. Genuis, S.J.; Lane, K.; Birkholz, D. Human Elimination of Organochlorine Pesticides: Blood, Urine, and Sweat Study. *Biomed. Res. Int.* **2016**, *2016*, 1624643. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
104. Zhou, Q.; Yu, L.S.; Zeng, S. Stereoselectivity of chiral drug transport: A focus on enantiomer-transporter interaction. *Drug Metab. Rev.* **2014**, *46*, 283–290. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
105. Houston, J.B.; Upshall, D.G.; Bridges, J.W. Pharmacokinetics and metabolism of two carbamate insecticides, carbaryl and landrin, in the rat. *Xenobiotica* **1975**, *5*, 637–648. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
106. Eaton, D.L.; Daroff, R.B.; Atrup, H.; Bridges, J.; Buffler, P.; Costa, L.G.; Coyle, J.; McKhann, G.; Mobley, W.C.; Nadel, L.; et al. Review of the toxicology of chlorpyrifos with an emphasis on human exposure and neurodevelopment. *Crit. Rev. Toxicol.* **2008**, *38* (Suppl. 2), 1–125. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
107. Boobis, A.R.; Ossendorp, B.C.; Banasiak, U.; Hamey, P.Y.; Sebestyen, I.; Moretto, A. Cumulative risk assessment of pesticide residues in food. *Toxicol. Lett.* **2008**, *180*, 137–150. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
108. König, J.; Müller, F.; Fromm, M.F. Transporters and drug-drug interactions: Important determinants of drug disposition and effects. *Pharmacol. Rev.* **2013**, *65*, 944–966. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
109. Harris, R.Z.; Jang, G.R.; Tsunoda, S. Dietary effects on drug metabolism and transport. *Clin. Pharmacokinet.* **2003**, *42*, 1071–1088. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
110. Ruiz, P.; Sack, A.; Wampole, M.; Bobst, S.; Vracko, M. Integration of *in silico* methods and computational systems biology to explore endocrine-disrupting chemical binding with nuclear hormone receptors. *Chemosphere* **2017**, *178*, 99–109. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
111. Novic, M.; Vracko, M. QSAR models for reproductive toxicity and endocrine disruption activity. *Molecules* **2010**, *15*, 1987–1999. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
112. Greget, R.; Dadak, S.; Barbier, L.; Lauga, F.; Linossier-Pierre, S.; Pernot, F.; Legendre, A.; Ambert, N.; Bouteiller, J.M.; Dorandeu, F.; et al. Modeling and simulation of organophosphate-induced neurotoxicity: Prediction and validation by experimental studies. *Neurotoxicology* **2016**, *54*, 140–152. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
113. Knaak, J.B.; Dary, C.C.; Zhang, X.; Gerlach, R.W.; Tornero-Velez, R.; Chang, D.T.; Goldsmith, R.; Blancato, J.N. Parameters for pyrethroid insecticide QSAR and PBPK/PD models for human risk assessment. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* **2012**, *219*, 1–114. [[PubMed](#)]
114. Punt, A.; Peijnenburg, A.A.; Hoogenboom, R.L.; Bouwmeester, H. Non-animal approaches for toxicokinetics in risk evaluations of food chemicals. *ALTEX* **2017**, in press. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



IV. Discussion et Conclusion

L'imprégnation de la population française aux pesticides est importante et ces polluants sont de plus en plus suspectés d'effets neurotoxiques, cancérogènes et d'altérations du développement du fœtus et de l'enfant. Dans ce contexte, il apparaît important de caractériser la pénétration intestinale de ces contaminants de l'environnement ainsi que leur propension à traverser la BHE et leur degré de pénétration cérébrale.

Notre étude, basée sur des expérimentations *in silico*, fournit un éclairage sur la toxicocinétique et les potentiels effets toxiques des pesticides en s'affranchissant d'études expérimentales lourdes, coûteuses et longues. Ces résultats peuvent être mis en regard de l'exposition chronique et de l'imprégnation de la population générale.

A ce jour, aucune autre étude *in silico* ne s'était intéressée à l'absorption intestinale et à la perméabilité cérébrale des pesticides. Notre approche originale a permis de prédire le passage de ces deux barrières pour 338 pesticides, de toutes familles et de propriétés diverses (insecticides, fongicides, herbicides...) avec une bonne précision (96%). Les pesticides testés sont très représentatifs des composés utilisés en France et dans le monde et reflètent une majeure part des phytosanitaires autorisés en Union Européenne (493 substances autorisées en 2017).

Parmi les composés étudiés, figurent les grandes familles de pesticides très utilisées que sont les pyréthrinoïdes et les carbamates, mais également les composés organophosphorés et les organochlorés rémanents (notamment le lindane et le chlordécone).

Notre étude apporte de nouveaux éléments afin de mieux comprendre la toxicocinétique de ses produits et de mettre en lumière des produits potentiellement dangereux, capables de traverser les deux barrières. L'étude s'intéresse également à des pesticides qui font l'objet de possible interdiction par les autorités sanitaires comme le glyphosate ou les néonicotinoïdes.

La méthode de prédiction de cette étude est robuste. Elle a été bâtie sur un set de 660 médicaments et est donc pertinente pour modéliser la cinétique de petites molécules que sont les pesticides.

La précision de la prédiction est élevée (96%), même si ce chiffre se base sur des données de toxicocinétique humaines, sur volontaires sains, qui sont peu nombreuses dans la littérature (24 études).

Les pesticides possèdent des propriétés physico-chimiques communes pour exercer leurs effets toxiques sur les insectes, champignons et végétaux. Ils doivent en effet disposer d'une lipophilie élevée pour être absorbés par leurs organismes cibles, être transportés jusqu'à leur site d'action et interagir avec des protéines ou d'autres effecteurs.

Selon notre modèle, la majorité des pesticides étudiés seraient capables de traverser l'intestin, ce qui est cohérent avec les propriétés lipophiles de ces toxiques. La barrière hémato-encéphalique est, elle, plus sélective (notamment pour la polarité) et ne permet le passage que d'une part moindre, bien qu'importante (39%), des pesticides testés. Ces résultats sont cohérents avec les effets toxiques des pesticides observés chez l'homme, bien qu'au vu de la lipophilie élevée indispensable à leurs effets, nous aurions pu nous attendre à des perméabilités intestinales et cérébrales semblables pour toutes les classes de pesticides. Le degré de pénétration intestinale et cérébrale des pesticides diffèrent selon les classes du fait de la variété de structures et de propriétés des différentes familles de pesticides (notamment leur polarité).

Les pesticides absorbés au niveau intestinal présentent des propriétés physico-chimiques et des caractéristiques structurales cohérentes avec les données de la littérature pour le médicament (masse moléculaire, rotatable bonds, capacité de liaisons hydrogènes, lipophilie, réfractivité molaire). Il en est de même pour la BHE, pour laquelle la polarité est un facteur important du passage, ce qui a également été décrits pour le médicament.

Les pesticides les plus absorbés au niveau intestinal appartiennent aux classes des triazines et des carbamates. Concernant la pénétration cérébrale, ce sont les carbamates les plus prédits pour traverser la BHE (77%). Ces résultats peuvent paraître surprenants, du fait que la majorité des études épidémiologiques d'imprégnation des populations portent sur les familles des pyréthriinoïdes, organophosphorés et organochlorés. De la même manière, la plupart des études évaluant la toxicité neurologique des pesticides s'intéressent aux composés organophosphorés et peu aux méthyl-carbamates. Du fait de l'utilisation d'outils bio-informatiques, nos travaux permettent ainsi de mettre en lumière des pesticides peu étudiés qui pourraient se révéler à fort potentiel toxique, difficilement détectables avec des techniques expérimentales *in vitro* ou *in vivo* à cause de problématiques économiques, et d'attirer l'attention de la communauté scientifique sur la nécessité d'études complémentaires sur ces composés.

D'autre part, les organochlorés sont les moins susceptibles de traverser la barrière intestinale, du fait de leur très forte lipophilie et très faible polarité. Néanmoins, 40% d'entre eux, les plus polaires, sont susceptibles d'accéder à la circulation sanguine. A ces résultats, s'ajoutent le fait que les organochlorés subissent également un cycle entéro-hépatique renforçant leur perméabilité intestinale et accroissent

leur absorption s'ils sont ingérés avec un repas riche en graisse (237). Malgré le fait que ces pesticides sont peu nombreux à être prédits pour traverser l'intestin, les composés ayant franchi la barrière seraient tout de même capables de franchir la BHE. Ces pesticides pouvant être libérés au cours de la vie à partir des tissus riches en graisses (notamment en période de jeûne), leur accès au SNC est donc préoccupant même aujourd'hui, malgré leurs interdictions il y a 20 ans.

Les pesticides organophosphorés et les pyréthrinoïdes traversent facilement la barrière intestinale selon le modèle, ce qui concorde avec les études d'imprégnation de population, qui rapportent en grand nombre la présence de leurs métabolites urinaires. Certains pyréthrinoïdes sont trop lipophiles pour traverser la BHE, et certains organophosphorés trop polaires, puisque seuls 9% de ces derniers seraient susceptibles de traverser la barrière. Néanmoins, ces deux classes de pesticides sont largement suspectées de déclencher des troubles neurologiques. Ces divergences peuvent s'expliquer du fait que ces pesticides sont fortement métabolisés au niveau hépatique. Les oxons-métabolites d'organophosphorés étaient prédits légèrement plus perméants (20% versus 9%) que leurs molécules-mères au niveau de la BHE. De plus, certains pyréthrinoïdes et organophosphorés sont connus pour être pris en charge par des transporteurs, paramètre non pris en compte dans notre étude. A titre d'exemple, le diazinon, organophosphoré pris en charge par la P-gp, a une perméabilité apparente trois fois supérieure en présence d'un inhibiteur du transporteur sur lignée Caco-2 (238). La prise en charge par des transporteurs notamment d'efflux peut donc grandement influencer l'absorption intestinale et la pénétration cérébrale des pesticides. De même, il existe des polymorphismes génétiques affectant les gènes codant pour des transporteurs, qui peuvent être à l'origine de différences dans la susceptibilité individuelle aux pesticides transportés. Des modèles *in silico* permettant de prédire la prise en charge des xénobiotiques par un transporteur ont été développés (239), mais des progrès restent à faire pour prédire l'effet combiné des transporteurs et la part de la diffusion passive dans le passage des barrières par les xénobiotiques, et ces modèles s'intéressent peu aux variants génétiques. Des méthodes BOILED-Egg basées sur des descripteurs moléculaires peuvent être utilisées pour prédire les interactions entre xénobiotiques et transporteurs, et nous avons montré dans une étude précédente qu'une combinaison de descripteurs (masse moléculaire et logP, volume moléculaire et proportion d'atomes de carbones) permettait de discriminer les pesticides interagissant avec des transporteurs de ceux n'ayant pas d'effet (240).

Une des limites du modèle consiste à classer les pesticides selon un paramètre qualitatif (le composé traverse ou non la barrière). La perméabilité intestinale et cérébrale des xénobiotiques est en effet une variable continue qui est ici réduite à un critère binaire. Le critère d'évaluation de la perméabilité cérébrale de notre étude est aussi très stringent ($\log_{BB} > 0$ ou < 0) puisque des composés ayant des \log_{BB}

compris entre 0 et -1 peuvent quand même traverser la BHE. De ce fait, certains auteurs placent le cutoff à -1, les composés peu perméables ayant un $\log BB < -1$.

De même, les bornes utilisées pour caractériser le passage intestinal sont employées dans la littérature (241,242), mais différent des bornes très strictes définies par la FDA pour la classification BCS (Biopharmaceutics Classification System) du médicament (fraction absorbée > ou < 0,9) (243).

Des facteurs externes comme le contenu du bol alimentaire ne sont également pas pris en compte par le modèle et une étude plus complète de la toxicocinétique de ces polluants tenant compte de leur distribution, métabolisme, élimination permettrait une vision plus globale du devenir de ces toxiques dans l'organisme.

Ce travail apporte de nouveaux éléments concernant le devenir biologique des pesticides. Il met aussi en évidence l'absorption intestinale importante des pesticides de la famille des triazines et des carbamates et la pénétration cérébrale élevée de ces derniers. De façon paradoxale, peu d'études scientifiques se sont intéressées à ces deux familles en comparaison des autres classes de pesticides. Des études sont nécessaires notamment pour évaluer les conséquences toxiques du passage des méthyl-carbamates, puissants inhibiteurs d'acétylcholinestérase, au niveau cérébral.

Notre étude est informative pour l'exposition chronique de pesticides de la population générale, elle ne s'applique pas, à priori, aux cas d'intoxications aiguës aux pesticides à forte doses. De plus, elle est moins instructive quant aux conséquences des expositions professionnelles, survenant essentiellement par voie cutanée et respiratoire. D'autres études *in silico* sont nécessaires pour modéliser l'absorption cutanée et respiratoire de ces contaminants. De plus, du fait des effets toxiques présumés de ses polluants sur la fertilité et le développement de l'enfant, le développement de modèles *in silico* de prédiction du passage des barrières trans-placentaires et testiculaires seraient profitable pour caractériser l'accès des pesticides perturbateurs endocriniens aux organes reproducteurs et au fœtus.

D'autre part, pour le design de nouveaux pesticides il peut être intéressant d'utiliser des outils tel que le logiciel SwissADME® pour concevoir des composés peu absorbés au niveau intestinal et à faible perméabilité cérébrale mais conservant leurs propriétés insecticides, herbicides et fongicides.



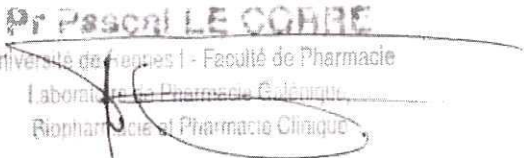
NOM et Prénom : ...CHEDIK Lisa.....


TITRE DE LA THESE


Prediction *in silico* de l'absorption intestinale et de la pénétration cérébrale des pesticides chez l'homme

.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....

Rennes, le 06/07/2017

Le Président de thèse 
Pr Pascal LE CORRE
Université de Rennes 1 - Faculté de Pharmacie
Laboratoire de Pharmacie Galénique
Biopharmacie et Pharmacie Clinique

Le Directeur de thèse :


31 AOUT 2017
VU et Permis d'imprimer
Le Président de l'Université de Rennes1.

D. ALIS

V. Références bibliographiques

1. Brannon LW. Piperonyl cyclonene and piperonyl butoxide as synergists with rotonene. *J Econ Entomol.* 1947 Dec;40(6):933.
2. Holt E, Weber R, Stevenson G, Gaus C. Polychlorinated Dibenzo-p-Dioxins and Dibenzofurans (PCDD/Fs) Impurities in Pesticides: A Neglected Source of Contemporary Relevance. *Environ Sci Technol.* 2010 Jul 15;44(14):5409–15.
3. Casida JE. Pest Toxicology: The Primary Mechanisms of Pesticide Action. *Chem Res Toxicol.* 2009 Apr 20;22(4):609–19.
4. Hobbiger F. The inhibition of acetylcholinesterase by organophosphorus compounds and its reversal. *Proc R Soc Med.* 1961 May;54:403–5.
5. Narahashi T. Modulation of nerve membrane sodium channels by chemicals. *J Physiol (Paris).* 1981 May;77(9):1093–101.
6. Abalis IM, Eldefrawi ME, Eldefrawi AT. Effects of insecticides on GABA-induced chloride influx into rat brain microsacs. *J Toxicol Environ Health.* 1986 Jan;18(1):13–23.
7. Casida JE. Mode of Action of Carbamates. *Annu Rev Entomol.* 1963 Jan;8(1):39–58.
8. Narahashi T. Nerve membrane Na⁺ channels as targets of insecticides. *Trends Pharmacol Sci.* 1992 Jun;13(6):236–41.
9. Bloomquist JR. Ion Channels as Targets for Insecticides. *Annu Rev Entomol.* 1996 Jan;41(1):163–90.
10. El-Sheekh MM, Kotkat HM, Hammouda OHE. Effect of atrazine herbicide on growth, photosynthesis, protein synthesis, and fatty acid composition in the unicellular green alga *Chlorella kessleri*. *Ecotoxicol Environ Saf.* 1994 Dec;29(3):349–58.
11. Bramley PM. Carotenoid biosynthesis: a target site for bleaching herbicides. *Biochem Soc Trans.* 1994 Aug;22(3):625–9.
12. Boocock MR, Coggins JR. Kinetics of 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase inhibition by glyphosate. *FEBS Lett.* 1983 Apr 5;154(1):127–33.
13. Aburai N, Abe K. Metabolic switching: synergistic induction of carotenogenesis in the aerial microalga, *Vischeria helvetica*, under environmental stress conditions by inhibitors of fatty acid biosynthesis. *Biotechnol Lett.* 2015 May;37(5):1073–80.
14. Hess D, Bayer D. The effect of trifluralin on the ultrastructure of dividing cells of the root meristem of cotton (*Gossypium hirsutum* L. "Acala 4-42"). *J Cell Sci.* 1974 Jul;15(2):429–41.
15. Moreland DE. Mechanisms of Action of Herbicides. *Annu Rev Plant Physiol.* 1980 Jun;31(1):597–638.
16. G. C. Papavizas, N. R. O'Neill, and J. A. Lewis. Fungistatic Activity of Propyl-N-(γ -dimethylaminopropyl) carbamate on *Pythium* spp. and its Reversal by Sterols. *Phytopathology.* 1978;1667–71.

17. Leroux P, Gredt M. Effect of imazalil (1-(2-(2,4-dichlorophenyl)-2-(2-propenyloxy) ethyl)-1H-imidazole) on biosynthesis of ergosterol in *Penicillium expansum* Link. *Comptes Rendus Hebdomadaire des Séances Acad Sci Ser Sci Nat.* 1978 Feb 6;286(5):427–9.
18. Davidse LC, Gerritsma OCM, Ideler J, Pie K, Velthuis GCM. Antifungal modes of action of metalaxyl, cyprofuram, benalaxyl and oxadixyl in phenylamide-sensitive and phenylamide-resistant strains of *Phytophthora megasperma* f. sp. *medicaginis* and *Phytophthora infestans*. *Crop Prot.* 1988 Dec;7(6):347–55.
19. Richmond DV, Pring RJ. Some cytological effects of systemic fungicides on fungi and plants. *Neth J Plant Pathol.* 1977 Jan;83(S1):403–10.
20. Akatsuka T, Kodama O, Yamada H. A Novel Mode of Action of Kitazin P in *Pyricularia oryzae*. *Agric Biol Chem.* 1977 Oct;41(10):2111–2.
21. European Union Pesticide Database [Internet]. Available from: <http://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/eu-pesticides-database/public/?event=activesubstance.selection&language=EN>
22. Collective Scientific Expert Report, Executive Summary of the Expert Report written by INRA and Cemagref, in response to a request from the Ministry of Agriculture and Fishery, and the Ministry of Ecology and Sustainable Development. Pesticides, agriculture and the environment Reducing the use of pesticides and limiting their environmental impact. 2005.
23. Müller G. History of the Discovery and Development of Triazine Herbicides. In: *The Triazine Herbicides*. 2008. p. 13–29.
24. Anses. Saisine n° 2015-SA-0093 Avis de l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail. 2016.
25. Damalas CA, Eleftherohorinos IG. Pesticide Exposure, Safety Issues, and Risk Assessment Indicators. *Int J Environ Res Public Health.* 2011 May 6;8(12):1402–19.
26. Morgan DP, Lin LI, Saikaly HH. Morbidity and mortality in workers occupationally exposed to pesticides. *Arch Environ Contam Toxicol.* 1980;9(3):349–82.
27. MacFarlane E, Carey R, Keegel T, El-Zaemay S, Fritschi L. Dermal Exposure Associated with Occupational End Use of Pesticides and the Role of Protective Measures. *Saf Health Work.* 2013 Sep;4(3):136–41.
28. Anses. Exposition de la population générale aux résidus de pesticides en France. Synthèse et recommandations du comité d'orientation et de prospective scientifique de l'observatoire des résidus de pesticides (ORP). Rapport scientifique; 2010.
29. Observations et statistiques du Commissariat Général au Développement Durable: Contamination globale des cours d'eau par les pesticides. <http://www.statistiques.developpement-durable.gouv.fr/essentiel/ar/246/211/contamination-globale-cours-deau-pesticides.html>. 2015.
30. Observations et statistiques du Commissariat Général au Développement Durable: Les pesticides les plus rencontrés dans les cours d'eau. <http://www.statistiques.developpement-durable.gouv.fr/essentiel/ar/246/211/pesticides-plus-rencontres-cours-deau.html>. 2015.

31. Observations et statistiques du Commissariat Général au Développement Durable: Contamination globale des eaux souterraines par les pesticides. <http://www.statistiques.developpement-durable.gouv.fr/lessentiel/ar/246/211/contamination-globale-eaux-souterraines-pesticides.html>. 2015.
32. Igue K, Farmer WJ, Spencer WF, Martin JP. Volatility of Organochlorine Insecticides from Soil: Effect of Relative Humidity and Soil Water Content on Dieldrin Volatility. *Soil Sci Soc Am J*. 1972;36(3):447.
33. Barthel WF, Murphy RT, Mitchell WG, Corley C. Insecticide Residue Studies, The Fate of Heptachlor in the Soil Following Granular Application to the Surface. *J Agric Food Chem*. 1960 Nov;8(6):445–7.
34. Fabrice Marlière. Exploitation de la base de données « pesticides », Rapport Inéris, DRC – 08 – 79914 – 08782A. 2008.
35. Ghislaine Bouvier. Contribution à l'évaluation de la population francilienne aux pesticides. Thèse de Doctorat. Université René Descartes - Paris V; 2005.
36. Orton TG, Saby NPA, Arrouays D, Jolivet CC, Villanneau EJ, Marchant BP, et al. Spatial distribution of Lindane concentration in topsoil across France. *Sci Total Environ*. 2013 Jan;443:338–50.
37. Rapport technique Direction de l'Alimentation, de l'Agriculture et de la Forêt de Guadeloupe et INRA. Cartographie de la pollution des sols de Guadeloupe par la chlordécone. http://daaf.guadeloupe.agriculture.gouv.fr/IMG/pdf/071005_DAF-SPV-OT_cartographie-pollution-sols-Guadeloupe-chlordecone_cle8da565.pdf. 2005.
38. European Food Safety Authority. The 2015 European Union report on pesticide residues in food. *EFSA J*. 2017 Apr;15(4).
39. Anses. Étude de l'alimentation totale française 2 (EAT 2) Tome 2 - Résidus de pesticides, additifs, acrylamide, hydrocarbures aromatiques polycycliques. Rapport d'expertise; 2011.
40. Anses. Avis de l'Anses relatif à l'actualisation des indicateurs de risque alimentaire lié aux résidus de pesticides. Saisine n°2013-SA-0138. 2014.
41. Anses. Avis de l'Anses relatif au programme 2013 de surveillance des résidus de pesticides dans les aliments, Saisine n°2012- SA-0178. 2012.
42. Tordoir WF, van Sittert NJ. Organochlorines. *Toxicology*. 1994 Jun;91(1):51–7.
43. Fréry N, Guldner L, Saoudi A, Garnier R, Zeghnoun A, Bidondo ML. Exposition de la population française aux substances chimiques de l'environnement. Tome 2 - Polychlorobiphényles (PCB-NDL) et pesticides. Institut de veille sanitaire; 2013.
44. Wittsiepe J, Schrey P, Lemm F, Eberwein G, Wilhelm M. Polychlorinated Dibenzo-p-Dioxins/Polychlorinated Dibenzofurans (PCDD/Fs), Polychlorinated Biphenyls (PCBs), and Organochlorine Pesticides in Human Blood of Pregnant Women from Germany. *J Toxicol Environ Health A*. 2008 Jun 2;71(11–12):703–9.

45. Zietz BP, Hoopmann M, Funcke M, Huppmann R, Suchenwirth R, Gierden E. Long-term biomonitoring of polychlorinated biphenyls and organochlorine pesticides in human milk from mothers living in northern Germany. *Int J Hyg Environ Health*. 2008 Oct 1;211(5):624–38.
46. CDC, Centers for Disease Control and Prevention. Fourth National Report on Human Exposure to Environmental Chemicals. Atlanta; 2009.
47. Heudorf U, Angerer J. Metabolites of Organophosphorous Insecticides in Urine Specimens from Inhabitants of a Residential Area. *Environ Res*. 2001 May;86(1):80–7.
48. CDC, Centers for Disease Control and Prevention. Fourth National Report on Human Exposure to Environmental Chemicals. Updated Tables. Atlanta; 2013.
49. Santé Canada. Rapport sur la biosurveillance humaine des substances chimiques de l'environnement au Canada. Résultats de l'Enquête canadienne sur les mesures de la santé Cycle 1 (2007 à 2009). 2010.
50. Becker K, Müssig-Zufika M, Conrad A, Lüdecke A, Schultz C, Seiwert M, Kolossa-Gehring M. German. German Environmental Survey for Children 2003/06 - GerES IV - Human Biomonitoring: Levels of selected substances in blood and urine of children in Germany. 2008.
51. Heudorf U, Butte W, Schulz C, Angerer J. Reference values for metabolites of pyrethroid and organophosphorous insecticides in urine for human biomonitoring in environmental medicine. *Int J Hyg Environ Health*. 2006 May;209(3):293–9.
52. Fortin M-C, Bouchard M, Carrier G. Comparaison de l'excrétion urinaire de biomarqueurs d'exposition aux pyrethrinoïdes et aux pyréthrinés chez les résidents de régions urbaine et rurale de la Province de Québec, Canada. *Rev Dépidémiologie Santé Publique*. 2009 Dec;57(6):395–401.
53. Egerer, E., Rossbach, B., Muttray, A., Schneider, M., and Letzel, S. Biomonitoring of pyrethroid metabolites in environmental medicine. *Umweltmed Forsh Prax*. 2004;
54. Heudorf U, Angerer J, Drexler H. Current internal exposure to pesticides in children and adolescents in Germany: urinary levels of metabolites of pyrethroid and organophosphorus insecticides. *Int Arch Occup Environ Health*. 2004 Jan 1;77(1):67–72.
55. Chevrier C, Petit C, Limon G, Monfort C, Durand G, Cordier S. Biomarqueurs urinaires d'exposition aux pesticides des femmes enceintes de la cohorte Pélagie réalisée en Bretagne, France (2002-2006). *BEH*; 2009.
56. Chevrier C, Limon G, Monfort C, Rouget F, Garlantézec R, Petit C, et al. Urinary Biomarkers of Prenatal Atrazine Exposure and Adverse Birth Outcomes in the PELAGIE Birth Cohort. *Environ Health Perspect*. 2011 Mar 2;119(7):1034–41.
57. Kadhel P, Monfort C, Costet N, Rouget F, Thomé J-P, Multigner L, et al. Chlordecone Exposure, Length of Gestation, and Risk of Preterm Birth. *Am J Epidemiol*. 2014 Mar 1;179(5):536–44.
58. Multigner L, Kadhel P. Exposition à des polluants environnementaux chez la femme enceinte et son enfant en Guadeloupe : Niveaux de chlordécone dans le sang maternel et étude des déterminants de l'imprégnation. Rapport; 2004.

59. Cao X, Gibbs ST, Fang L, Miller HA, Landowski CP, Shin H-C, et al. Why is it Challenging to Predict Intestinal Drug Absorption and Oral Bioavailability in Human Using Rat Model. *Pharm Res*. 2006 Aug 1;23(8):1675–86.
60. Takahashi M, Washio T, Suzuki N, Igeta K, Yamashita S. The species differences of intestinal drug absorption and first-pass metabolism between cynomolgus monkeys and humans. *J Pharm Sci*. 2009 Nov;98(11):4343–53.
61. Hosler J, Tschanz C, Hignite CE, Azarnoff DL. Topical application of lindane cream (Kwell) and antipyrine metabolism. *J Invest Dermatol*. 1980 Jan;74(1):51–3.
62. Braun WH, Blau GE, Chenoweth MB. The metabolism/pharmacokinetics of pentachlorophenol in man and a comparison with the rat and monkey. In: *Toxicology and Occupational Medicine*. 1979. p. 289–96.
63. Jandacek R, Tso P. Enterohepatic circulation of organochlorine compounds: a site for nutritional intervention? *J Nutr Biochem*. 2007 Mar;18(3):163–7.
64. Sasaki K, Ishizaka T, Suzuki T, Takeda M, Uchiyama M. Accumulation levels of organochlorine pesticides in human adipose tissue and blood. *Bull Environ Contam Toxicol*. 1991 May;46(5):662–9.
65. Mehmood Z, Williamson MP, Kelly DE, Kelly SL. Metabolism of organochlorine pesticides: the role of human cytochrome P450 3A4. *Chemosphere*. 1996 Aug;33(4):759–69.
66. Fariss MW, Blanke RV, Saady JJ, Guzelian PS. Demonstration of major metabolic pathways for chlordecone (kepone) in humans. *Drug Metab Dispos Biol Fate Chem*. 1980 Dec;8(6):434–8.
67. Kapoor IP, Metcalf RL, Nystrom RF, Sangha GK. Comparative metabolism of methoxychlor, methiochlor, and DDT in mouse, insects, and in a model ecosystem. *J Agric Food Chem*. 1970 Dec;18(6):1145–52.
68. Geueke B, Garg N, Ghosh S, Fleischmann T, Holliger C, Lal R, et al. Metabolomics of hexachlorocyclohexane (HCH) transformation: ratio of LinA to LinB determines metabolic fate of HCH isomers. *Environ Microbiol*. 2013 Apr;15(4):1040–9.
69. Boylan JJ, Cohn WJ, Egle JL, Blanke RV, Guzelian PS. Excretion of chlordecone by the gastrointestinal tract: evidence for a nonbiliary mechanism. *Clin Pharmacol Ther*. 1979 May;25(5 Pt 1):579–85.
70. Saxena MC, Siddiqui MK, Bhargava AK, Murti CR, Kutty D. Placental transfer of pesticides in humans. *Arch Toxicol*. 1981 Sep;48(2–3):127–34.
71. Jensen AA. Chemical contaminants in human milk. In: *Residue Reviews*. 1983. p. 1–128.
72. Ecobichon DJ, Ozere RL, Reid E, Crocker JF. Acute fenitrothion poisoning. *Can Med Assoc J*. 1977 Feb 19;116(4):377–9.
73. Sams C, Cocker J, Lennard MS. Biotransformation of chlorpyrifos and diazinon by human liver microsomes and recombinant human cytochrome P450s (CYP). *Xenobiotica Fate Foreign Compd Biol Syst*. 2004 Oct;34(10):861–73.
74. Kardos SA, Sultatos LG. Interactions of the organophosphates paraoxon and methyl paraoxon with mouse brain acetylcholinesterase. *Toxicol Sci Off J Soc Toxicol*. 2000 Nov;58(1):118–26.

75. Crow J, Borazjani A, Potter P, Ross M. Hydrolysis of pyrethroids by human and rat tissues: Examination of intestinal, liver and serum carboxylesterases. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2007 May 15;221(1):1–12.
76. Miyamoto J. Degradation, metabolism and toxicity of synthetic pyrethroids. *Environ Health Perspect*. 1976 Apr;14:15–28.
77. Gammon D, Liu Z, Chandrasekaran A, ElNaggar S. The pharmacokinetic properties of bifenthrin in the rat following multiple routes of exposure. *Pest Manag Sci*. 2015 Jun;71(6):835–41.
78. Ostrea EM, Bielawski DM, Posecion NC, Corrion M, Villanueva-Uy E, Bernardo RC, et al. 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*. 2009 Jan;109(1):116–22.
79. Gupta RC. Carbofuran toxicity. *J Toxicol Environ Health*. 1994 Dec;43(4):383–418.
80. Marshall TC, Dorough HW. Biliary excretion of carbamate insecticides in the rat. *Pestic Biochem Physiol*. 1979 Jul;11(1–3):56–63.
81. Lang DH, Rettie AE, Becker RH. Identification of Enzymes Involved in the Metabolism of Atrazine, Terbutylazine, Ametryne, and Terbutryne in Human Liver Microsomes. *Chem Res Toxicol*. 1997 Sep;10(9):1037–44.
82. Ikonen R, Kangas J, Savolainen H. Urinary atrazine metabolites as indicators for rat and human exposure to atrazine. *Toxicol Lett*. 1988 Nov;44(1–2):109–12.
83. Flaskos J. The developmental neurotoxicity of organophosphorus insecticides: A direct role for the oxon metabolites. *Toxicol Lett*. 2012 Feb;209(1):86–93.
84. Ryan AJ. The metabolism of pesticidal carbamates. *CRC Crit Rev Toxicol*. 1971 Sep;1(1):33–54.
85. Jeyaratnam J. Health problems of pesticide usage in the Third World. *Br J Ind Med*. 1985 Aug;42(8):505–6.
86. Chowdhary S, Bhattacharyya R, Banerjee D. Acute organophosphorus poisoning. *Clin Chim Acta*. 2014 Apr;431:66–76.
87. He F, Wang S, Liu L, Chen S, Zhang Z, Sun J. Clinical manifestations and diagnosis of acute pyrethroid poisoning. *Arch Toxicol*. 1989;63(1):54–8.
88. Kamel F, Hoppin JA. Association of Pesticide Exposure with Neurologic Dysfunction and Disease. *Environ Health Perspect*. 2004 Jun;112(9):950–8.
89. Bosma H, van Boxtel MP, Ponds RW, Houx PJ, Jolles J. Pesticide exposure and risk of mild cognitive dysfunction. *Lancet Lond Engl*. 2000 Sep 9;356(9233):912–3.
90. Lindsay J, Hebert R, Rockwood K. The Canadian Study of Health and Aging : Risk Factors for Vascular Dementia. *Stroke*. 1997 Mar 1;28(3):526–30.
91. Davignon LF, Saint-Pierre J, Charest G, Tourangeau FJ. A study of the chronic effects of insecticides in man. *Can Med Assoc J*. 1965 Mar 20;92:597–602.

92. Sack D, Linz D, Shukla R, Rice C, Bhattacharya A, Suskind R. Health status of pesticide applicators: postural stability assessments. *J Occup Med Off Publ Ind Med Assoc.* 1993 Dec;35(12):1196–202.
93. Ruijten MWMM, Sallé HJA, Verberk MM, Smink M. Effect of Chronic Mixed Pesticide Exposure on Peripheral and Autonomic Nerve Function. *Arch Environ Health Int J.* 1994 Jun;49(3):188–95.
94. Kamel F, Rowland AS, Park LP, Anger WK, Baird DD, Gladen BC, et al. Neurobehavioral performance and work experience in Florida farmworkers. *Environ Health Perspect.* 2003 Nov;111(14):1765–72.
95. Dowell I, Hill G, Lindsay J, Helliwell B, Costa L, Beattie L, et al. The Canadian Study of Health and Aging: risk factors for Alzheimer’s disease in Canada. *Neurology.* 1994 Nov;44(11):2073–80.
96. Gauthier E, Fortier I, Courchesne F, Pepin P, Mortimer J, Gauvreau D. Environmental Pesticide Exposure as a Risk Factor for Alzheimer’s Disease: A Case-Control Study. *Environ Res.* 2001 May;86(1):37–45.
97. Le Couteur DG, McLean AJ, Taylor MC, Woodham BL, Board PG. Pesticides and Parkinson’s disease. *Biomed Pharmacother.* 1999 Apr;53(3):122–30.
98. Priyadarshi A, Khuder SA, Schaub EA, Priyadarshi SS. Environmental Risk Factors and Parkinson’s Disease: A Metaanalysis. *Environ Res.* 2001 Jun;86(2):122–7.
99. Baldereschi M, Di Carlo A, Vanni P, Ghetti A, Carbonin P, Amaducci L, et al. Lifestyle-related risk factors for Parkinson’s disease: a population-based study. *Acta Neurol Scand.* 2003 Oct;108(4):239–44.
100. Baldi I, Cantagrel A, Lebailly P, Tison F, Dubroca B, Chrysostome V, et al. Association between Parkinson’s disease and exposure to pesticides in southwestern France. *Neuroepidemiology.* 2003 Oct;22(5):305–10.
101. Engel LS, Checkoway H, Keifer MC, Seixas NS, Longstreth WT, Scott KC, et al. Parkinsonism and occupational exposure to pesticides. *Occup Environ Med.* 2001 Sep;58(9):582–9.
102. Petrovitch H, Ross GW, Abbott RD, Sanderson WT, Sharp DS, Tanner CM, et al. Plantation work and risk of Parkinson disease in a population-based longitudinal study. *Arch Neurol.* 2002 Nov;59(11):1787–92.
103. Butterfield PG, Valanis BG, Spencer PS, Lindeman CA, Nutt JG. Environmental antecedents of young-onset Parkinson’s disease. *Neurology.* 1993 Jun;43(6):1150–8.
104. Gorell JM, Johnson CC, Rybicki BA, Peterson EL, Richardson RJ. The risk of Parkinson’s disease with exposure to pesticides, farming, well water, and rural living. *Neurology.* 1998 May;50(5):1346–50.
105. Semchuk KM, Love EJ, Lee RG. Parkinson’s disease and exposure to agricultural work and pesticide chemicals. *Neurology.* 1992 Jul;42(7):1328–35.
106. Baldi I, Lebailly P, Mohammed-Brahim B, Letenneur L, Dartigues J-F, Brochard P. Neurodegenerative diseases and exposure to pesticides in the elderly. *Am J Epidemiol.* 2003 Mar 1;157(5):409–14.

107. Behari M, Srivastava AK, Das RR, Pandey RM. Risk factors of Parkinson's disease in Indian patients. *J Neurol Sci*. 2001 Sep 15;190(1-2):49-55.
108. Kuopio AM, Marttila RJ, Helenius H, Rinne UK. Environmental risk factors in Parkinson's disease. *Mov Disord Off J Mov Disord Soc*. 1999 Nov;14(6):928-39.
109. Taylor CA, Saint-Hilaire MH, Cupples LA, Thomas CA, Burchard AE, Feldman RG, et al. Environmental, medical, and family history risk factors for Parkinson's disease: a New England-based case control study. *Am J Med Genet*. 1999 Dec 15;88(6):742-9.
110. McGuire V, Longstreth WT, Nelson LM, Koepsell TD, Checkoway H, Morgan MS, et al. Occupational exposures and amyotrophic lateral sclerosis. A population-based case-control study. *Am J Epidemiol*. 1997 Jun 15;145(12):1076-88.
111. Chancellor AM, Slattery JM, Fraser H, Warlow CP. Risk factors for motor neuron disease: a case-control study based on patients from the Scottish Motor Neuron Disease Register. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1993 Nov;56(11):1200-6.
112. Granieri E, Carreras M, Tola R, Paolino E, Tralli G, Eleopra R, et al. Motor neuron disease in the province of Ferrara, Italy, in 1964-1982. *Neurology*. 1988 Oct;38(10):1604-8.
113. Eskenazi B, Bradman A, Castorina R. Exposures of children to organophosphate pesticides and their potential adverse health effects. *Environ Health Perspect*. 1999 Jun;107 Suppl 3:409-19.
114. Weselak M, Arbuckle TE, Foster W. Pesticide Exposures and Developmental Outcomes: The Epidemiological Evidence. *J Toxicol Environ Health Part B*. 2007 Jan;10(1-2):41-80.
115. Provost D, Cantagrel A, Lebailly P, Jaffre A, Loyant V, Loiseau H, et al. Brain tumours and exposure to pesticides: a case-control study in southwestern France. *Occup Environ Med*. 2007 Aug 1;64(8):509-14.
116. Wigle DT, Turner MC, Krewski D. A Systematic Review and Meta-analysis of Childhood Leukemia and Parental Occupational Pesticide Exposure. *Environ Health Perspect*. 2009 Oct;117(10):1505-13.
117. O'Leary ES, Vena JE, Freudenheim JL, Brasure J. Pesticide exposure and risk of breast cancer: a nested case-control study of residentially stable women living on Long Island. *Environ Res*. 2004 Feb 1;94(2):134-44.
118. Reynolds P, Hurley SE, Goldberg DE, Yerabati S, Gunier RB, Hertz A, et al. Residential proximity to agricultural pesticide use and incidence of breast cancer in the California Teachers Study cohort. *Environ Res*. 2004 Oct;96(2):206-18.
119. Alavanja MCR, Bonner MR. Occupational pesticide exposures and cancer risk: a review. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev*. 2012;15(4):238-63.
120. Bazylewicz-Walczak B, Majczakowa W, Szymczak M. Behavioral effects of occupational exposure to organophosphorous pesticides in female greenhouse planting workers. *Neurotoxicology*. 1999 Oct;20(5):819-26.
121. Bellin JS, Chow I. Biochemical effects of chronic low-level exposure to pesticides. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol*. 1974 Oct;9(2):325-37.

122. Ohayo-Mitoko GJ, Kromhout H, Simwa JM, Boleij JS, Heederik D. Self reported symptoms and inhibition of acetylcholinesterase activity among Kenyan agricultural workers. *Occup Environ Med.* 2000 Mar;57(3):195–200.
123. Smit LAM, van-Wendel-de-Joode BN, Heederik D, Peiris-John RJ, van der Hoek W. Neurological symptoms among Sri Lankan farmers occupationally exposed to acetylcholinesterase-inhibiting insecticides. *Am J Ind Med.* 2003 Sep;44(3):254–64.
124. Misra UK, Nag D, Bhushan V, Ray PK. Clinical and biochemical changes in chronically exposed organophosphate workers. *Toxicol Lett.* 1985 Mar;24(2–3):187–93.
125. Steenland K, Dick RB, Howell RJ, Chrislip DW, Hines CJ, Reid TM, et al. Neurologic function among termiticide applicators exposed to chlorpyrifos. *Environ Health Perspect.* 2000 Apr;108(4):293–300.
126. Pilkington A, Buchanan D, Jamal GA, Gillham R, Hansen S, Kidd M, et al. An epidemiological study of the relations between exposure to organophosphate pesticides and indices of chronic peripheral neuropathy and neuropsychological abnormalities in sheep farmers and dippers. *Occup Environ Med.* 2001 Nov;58(11):702–10.
127. Levin HS, Rodnitzky RL, Mick DL. Anxiety associated with exposure to organophosphate compounds. *Arch Gen Psychiatry.* 1976 Feb;33(2):225–8.
128. Levin HS, Rodnitzky RL. Behavioral Effects of Organophosphate Pesticides in Man. *Clin Toxicol.* 1976 Jan;9(3):391–405.
129. Fiedler N, Kipen H, Kelly-McNeil K, Fenske R. Long-term use of organophosphates and neuropsychological performance. *Am J Ind Med.* 1997 Nov;32(5):487–96.
130. Korsak RJ, Sato MM. Effects of Chronic Organophosphate Pesticide Exposure on the Central Nervous System. *Clin Toxicol.* 1977 Jan;11(1):83–95.
131. Stephens R, Spurgeon A, Calvert IA, Beach J, Levy LS, Harrington JM, et al. Neuropsychological effects of long-term exposure to organophosphates in sheep dip. *The Lancet.* 1995 May;345(8958):1135–9.
132. Stokes L, Stark A, Marshall E, Narang A. Neurotoxicity among pesticide applicators exposed to organophosphates. *Occup Environ Med.* 1995 Oct;52(10):648–53.
133. Cole DC, Carpio F, Julian J, León N. Assessment of peripheral nerve function in an Ecuadorian rural population exposed to pesticides. *J Toxicol Environ Health A.* 1998 Sep 25;55(2):77–91.
134. Engel SM, Wetmur J, Chen J, Zhu C, Barr DB, Canfield RL, et al. Prenatal Exposure to Organophosphates, Paraoxonase 1, and Cognitive Development in Childhood. *Environ Health Perspect.* 2011 Aug;119(8):1182–8.
135. Bouchard MF, Chevrier J, Harley KG, Kogut K, Vedar M, Calderon N, et al. Prenatal Exposure to Organophosphate Pesticides and IQ in 7-Year-Old Children. *Environ Health Perspect.* 2011 Aug;119(8):1189–95.
136. Van Wendel de Joode B, Wesseling C, Kromhout H, Monge P, Garcia M, Mergler D. Chronic nervous-system effects of long-term occupational exposure to DDT. *The Lancet.* 2001 Mar;357(9261):1014–6.

137. Ribas-Fitó N, Cardo E, Sala M, Muga ME de, Mazón C, Verdú A, et al. Breastfeeding, Exposure to Organochlorine Compounds, and Neurodevelopment in Infants. *Pediatrics*. 2003 May 1;111(5):e580–5.
138. Høyer BB, Ramlau-Hansen CH, Pedersen HS, Góralczyk K, Chumak L, Jönsson BA, et al. Motor development following in utero exposure to organochlorines: a follow-up study of children aged 5–9 years in Greenland, Ukraine and Poland. *BMC Public Health*. 2015 Feb 14;15.
139. Ostrea Jr EM, Reyes A, Villanueva-Uy E, Pacifico R, Benitez B, Ramos E, et al. Fetal exposure to propoxur and abnormal child neurodevelopment at 2 years of age. *NeuroToxicology*. 2012 Aug;33(4):669–75.
140. Seidler A, Hellenbrand W, Robra BP, Vieregge P, Nischan P, Joerg J, et al. Possible environmental, occupational, and other etiologic factors for Parkinson's disease: a case-control study in Germany. *Neurology*. 1996 May;46(5):1275–84.
141. Bhatt MH, Elias MA, Mankodi AK. Acute and reversible parkinsonism due to organophosphate pesticide intoxication: five cases. *Neurology*. 1999 Apr 22;52(7):1467–71.
142. Barbosa ER, Leiros da Costa MD, Bacheschi LA, Scaff M, Leite CC. Parkinsonism after glycine-derivate exposure. *Mov Disord Off J Mov Disord Soc*. 2001 May;16(3):565–8.
143. Hoogenraad TU. Dithiocarbamates and Parkinson's disease. *Lancet Lond Engl*. 1988 Apr 2;1(8588):767.
144. Meco G, Bonifati V, Vanacore N, Fabrizio E. Parkinsonism after chronic exposure to the fungicide maneb (manganese ethylene-bis-dithiocarbamate). *Scand J Work Environ Health*. 1994 Aug;20(4):301–5.
145. Hertzman C, Wiens M, Bowering D, Snow B, Calne D. Parkinson's disease: a case-control study of occupational and environmental risk factors. *Am J Ind Med*. 1990;17(3):349–55.
146. Liou HH, Tsai MC, Chen CJ, Jeng JS, Chang YC, Chen SY, et al. Environmental risk factors and Parkinson's disease: a case-control study in Taiwan. *Neurology*. 1997 Jun;48(6):1583–8.
147. McCormack AL, Thiruchelvam M, Manning-Bog AB, Thiffault C, Langston JW, Cory-Slechta DA, et al. Environmental risk factors and Parkinson's disease: selective degeneration of nigral dopaminergic neurons caused by the herbicide paraquat. *Neurobiol Dis*. 2002 Jul;10(2):119–27.
148. Sanchez-Ramon J, Hefti F, Weiner WI. Paraquat and Parkinson disease. *Neurology*. 1987;
149. Sechi GP, Agnetti V, Piredda M, Canu M, Deserra F, Omar HA, et al. Acute and persistent parkinsonism after use of diquat. *Neurology*. 1992 Jan;42(1):261–3.
150. Betarbet R, Sherer TB, MacKenzie G, Garcia-Osuna M, Panov AV, Greenamyre JT. Chronic systemic pesticide exposure reproduces features of Parkinson's disease. *Nat Neurosci*. 2000 Dec;3(12):1301–6.
151. Corrigan FM, Wienburg CL, Shore RF, Daniel SE, Mann D. Organochlorine insecticides in substantia nigra in Parkinson's disease. *J Toxicol Environ Health A*. 2000 Feb 25;59(4):229–34.
152. Fleming L, Mann JB, Bean J, Briggles T, Sanchez-Ramos JR. Parkinson's disease and brain levels of organochlorine pesticides. *Ann Neurol*. 1994 Jul;36(1):100–3.

153. Loomis D, Guyton K, Grosse Y, El Ghissasi F, Bouvard V, Benbrahim-Tallaa L, et al. Carcinogenicity of lindane, DDT, and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. *Lancet Oncol*. 2015 Aug;16(8):891–2.
154. Monographies du CIRC sur l'évaluation des risques de cancérogénicité pour l'homme. [Internet]. Available from: <http://monographs.iarc.fr/FR/Classification/index.php>
155. Charlier C, Plomteux G. Effets perturbateurs endocriniens des pesticides organochlorés. *Acta Clin Belg*. 2002 Jan;57(sup1):2–7.
156. Mnif W, Hassine AIH, Bouaziz A, Bartegi A, Thomas O, Roig B. Effect of Endocrine Disruptor Pesticides: A Review. *Int J Environ Res Public Health*. 2011 Jun;8(6):2265–303.
157. Brandl M, Eide Flaten G, Bauer-Brandl A. Passive Diffusion Across Membranes. In: *Wiley Encyclopedia of Chemical Biology*. 2008.
158. Burger H, van Tol H, Boersma AWM, Brok M, Wiemer EAC, Stoter G, et al. Imatinib mesylate (STI571) is a substrate for the breast cancer resistance protein (BCRP)/ABCG2 drug pump. *Blood*. 2004 Nov 1;104(9):2940–2.
159. Membrane transporters in drug development. *Nat Rev Drug Discov*. 2010 Mar;9(3):215–36.
160. Tamai I, Takanaga H, Maeda H, Ogihara T, Yoneda M, Tsuji A. Proton-cotransport of pravastatin across intestinal brush-border membrane. *Pharm Res*. 1995 Nov;12(11):1727–32.
161. Khanvilkar K, Donovan MD, Flanagan DR. Drug transfer through mucus. *Adv Drug Deliv Rev*. 2001 Jun 11;48(2–3):173–93.
162. Thomson ABR, Dietschy JM. The Role of the Unstirred Water Layer in Intestinal Permeation. In: *Pharmacology of Intestinal Permeation II*. 1984. p. 165–269.
163. Crow J, Borazjani A, Potter P, Ross M. Hydrolysis of pyrethroids by human and rat tissues: Examination of intestinal, liver and serum carboxylesterases. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2007 May 15;221(1):1–12.
164. Back DJ, Rogers SM. Review: first-pass metabolism by the gastrointestinal mucosa. *Aliment Pharmacol Ther*. 1987 Oct;1(5):339–57.
165. Kaminsky LS. The small intestine as a xenobiotic metabolizing organ. *Drug Metab Dispos*. 2003 Dec 1;31(12):1520–5.
166. Wacher VJ, Salphati L, Benet LZ. Active secretion and enterocytic drug metabolism barriers to drug absorption. *Adv Drug Deliv Rev*. 2001 Mar 1;46(1–3):89–102.
167. Reichel A. Addressing Central Nervous System (CNS) Penetration in Drug Discovery: Basics and Implications of the Evolving New Concept. *Chem Biodivers*. 2009 Nov 1;6(11):2030–49.
168. Hashimoto K, Shimizu M. Epithelial properties of human intestinal Caco-2 cells cultured in a serum-free medium. *Cytotechnology*. 1993;13(3):175–84.
169. Artursson P, Karlsson J. Correlation between oral drug absorption in humans and apparent drug permeability coefficients in human intestinal epithelial (Caco-2) cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 1991 Mar 29;175(3):880–5.

170. Ren S, Lien EJ. Caco-2 cell permeability vs human gastro-intestinal absorption: QSPR analysis. In: *Progress in Drug Research*. 2000. p. 1–23.
171. Lennernäs H. Human intestinal permeability. *J Pharm Sci*. 1998 Apr;87(4):403–10.
172. Gonzalez-Vallina R, Wang H, Zhan R, Berschneider HM, Lee RM, Davidson NO, et al. Lipoprotein and apolipoprotein secretion by a newborn piglet intestinal cell line (IPEC-1). *Am J Physiol*. 1996 Aug;271(2 Pt 1):G249-259.
173. Madara JL, Stafford J, Barenberg D, Carlson S. Functional coupling of tight junctions and microfilaments in T84 monolayers. *Am J Physiol*. 1988 Mar;254(3 Pt 1):G416-423.
174. Wils P, Legrain S, Frenois E, Scherman D. HT29-18-C1 intestinal cells: a new model for studying the epithelial transport of drugs. *Biochim Biophys Acta*. 1993 Jun 6;1177(2):134–8.
175. Irvine JD, Takahashi L, Lockhart K, Cheong J, Tolan JW, Selick HE, et al. MDCK (Madin-Darby Canine Kidney) Cells: A Tool for Membrane Permeability Screening. *J Pharm Sci*. 1999 Jan;88(1):28–33.
176. Kansy M, Senner F, Gubernator K. Physicochemical High Throughput Screening: Parallel Artificial Membrane Permeation Assay in the Description of Passive Absorption Processes. *J Med Chem*. 1998 Mar;41(7):1007–10.
177. Flaten GE, Dhanikula AB, Luthman K, Brandl M. Drug permeability across a phospholipid vesicle based barrier: A novel approach for studying passive diffusion. *Eur J Pharm Sci*. 2006 Jan;27(1):80–90.
178. Fisher RB, Parsons DS. Glucose absorption from surviving rat small intestine. *J Physiol*. 1949 Dec 31;110(3–4):281–93.
179. Wilson TH, Wiseman G. The use of sacs of everted small intestine for the study of the transference of substances from the mucosal to the serosal surface. *J Physiol*. 1954 Jan 28;123(1):116–25.
180. Ussing HH, Zerahn K. Active Transport of Sodium as the Source of Electric Current in the Short-circuited Isolated Frog Skin. *Acta Physiol Scand*. 1951 Oct;23(2–3):110–27.
181. Bernard A, Carlier H. Métabolisme intraentérocytaire et absorption par la voie sanguine des acides caprique et oléique chez le rat témoin et traité par l'actidione-cycloheximide. *Reprod Nutr Dév*. 1984;24(5A):543–56.
182. Wilkes MF, Woollen BH, Marsh JR, Batten PL, Chester G. Biological monitoring for pesticide exposure--the role of human volunteer studies. *Int Arch Occup Environ Health*. 1993;65(1 Suppl):S189-192.
183. Serlin Y, Shelef I, Knyazer B, Friedman A. Anatomy and Physiology of the Blood-Brain Barrier. *Semin Cell Dev Biol*. 2015 Feb;38:2–6.
184. Clark DE. In silico prediction of blood–brain barrier permeation. *Drug Discov Today*. 2003 Oct 15;8(20):927–33.
185. Smith MW, Gumbleton M. Endocytosis at the blood-brain barrier: from basic understanding to drug delivery strategies. *J Drug Target*. 2006 May;14(4):191–214.

186. Abbott NJ. Blood-brain barrier structure and function and the challenges for CNS drug delivery. *J Inherit Metab Dis*. 2013 May;36(3):437–49.
187. Abbott NJ, Patabendige AAK, Dolman DEM, Yusof SR, Begley DJ. Structure and function of the blood-brain barrier. *Neurobiol Dis*. 2010 Jan;37(1):13–25.
188. Joó F, Karnushina I. A procedure for the isolation of capillaries from rat brain. *Cytobios*. 1973 Oct;8(29):41–8.
189. Méresse S, Dehouck MP, Delorme P, Bensaïd M, Tauber JP, Delbart C, et al. Bovine brain endothelial cells express tight junctions and monoamine oxidase activity in long-term culture. *J Neurochem*. 1989 Nov;53(5):1363–71.
190. Gumbleton M, Audus KL. Progress and limitations in the use of in vitro cell cultures to serve as a permeability screen for the blood-brain barrier. *J Pharm Sci*. 2001 Nov;90(11):1681–98.
191. Weksler BB. Blood-brain barrier-specific properties of a human adult brain endothelial cell line. *FASEB J*. 2005 Sep 15;
192. Sano Y, Shimizu F, Abe M, Maeda T, Kashiwamura Y, Ohtsuki S, et al. Establishment of a new conditionally immortalized human brain microvascular endothelial cell line retaining an in vivo blood-brain barrier function. *J Cell Physiol*. 2010 Nov;225(2):519–28.
193. Kamiichi A, Furihata T, Kishida S, Ohta Y, Saito K, Kawamatsu S, et al. Establishment of a new conditionally immortalized cell line from human brain microvascular endothelial cells: A promising tool for human blood-brain barrier studies. *Brain Res*. 2012 Dec;1488:113–22.
194. Cecchelli R, Aday S, Sevin E, Almeida C, Culot M, Dehouck L, et al. A Stable and Reproducible Human Blood-Brain Barrier Model Derived from Hematopoietic Stem Cells. *PLoS ONE*. 2014 Jun 17;9(6):e99733.
195. Li G, Simon MJ, Cancel LM, Shi Z-D, Ji X, Tarbell JM, et al. Permeability of Endothelial and Astrocyte Cocultures: In Vitro Blood-Brain Barrier Models for Drug Delivery Studies. *Ann Biomed Eng*. 2010 Aug;38(8):2499–511.
196. Garberg P, Ball M, Borg N, Cecchelli R, Fenart L, Hurst RD, et al. In vitro models for the blood-brain barrier. *Toxicol In Vitro*. 2005 Apr;19(3):299–334.
197. Lundquist S, Renftel M, Brillault J, Fenart L, Cecchelli R, Dehouck M-P. Prediction of drug transport through the blood-brain barrier in vivo: a comparison between two in vitro cell models. *Pharm Res*. 2002 Jul;19(7):976–81.
198. Poller B, Wagenaar E, Tang SC, Schinkel AH. Double-Transduced MDCKII Cells To Study Human P-Glycoprotein (ABCB1) and Breast Cancer Resistance Protein (ABCG2) Interplay in Drug Transport across the Blood-Brain Barrier. *Mol Pharm*. 2011 Apr 4;8(2):571–82.
199. Di L, Kerns EH, Fan K, McConnell OJ, Carter GT. High throughput artificial membrane permeability assay for blood-brain barrier. *Eur J Med Chem*. 2003 Mar;38(3):223–32.
200. Liu X, Smith BJ, Chen C, Callegari E, Becker SL, Chen X, et al. Evaluation of Cerebrospinal Fluid Concentration and Plasma Free Concentration As a Surrogate Measurement for Brain Free Concentration. *Drug Metab Dispos*. 2006 Sep 1;34(9):1443–7.

201. Takasato Y, Rapoport SI, Smith QR. An in situ brain perfusion technique to study cerebrovascular transport in the rat. *Am J Physiol.* 1984 Sep;247(3 Pt 2):H484-493.
202. Sasongko L, Link J, Muzi M, Mankoff D, Yang X, Collier A, et al. Imaging P-glycoprotein transport activity at the human blood-brain barrier with positron emission tomography. *Clin Pharmacol Ther.* 2005 Jun;77(6):503–14.
203. Takashima T, Yokoyama C, Mizuma H, Yamanaka H, Wada Y, Onoe K, et al. Developmental Changes in P-Glycoprotein Function in the Blood-Brain Barrier of Nonhuman Primates: PET Study with R-11C-Verapamil and 11C-Oseltamivir. *J Nucl Med.* 2011 Jun 1;52(6):950–7.
204. London L, Coggon D, Moretto A, Westerholm P, Wilks MF, Colosio C. The ethics of human volunteer studies involving experimental exposure to pesticides: unanswered dilemmas. *Environ Health.* 2010 Dec;9(1).
205. Seelig A, Gottschlich R, Devant RM. A method to determine the ability of drugs to diffuse through the blood-brain barrier. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994 Jan 4;91(1):68–72.
206. Norinder U, Haeberlein M. Computational approaches to the prediction of the blood-brain distribution. *Adv Drug Deliv Rev.* 2002 Mar 31;54(3):291–313.
207. Clark DE. Prediction of Intestinal Absorption and Blood-Brain Barrier Penetration by Computational Methods. *Comb Chem High Throughput Screen.* 2001 Aug 31;8(6):477-496.
208. Atkinson F, Cole S, Green C, van de Waterbeemd H. Lipophilicity and Other Parameters Affecting Brain Penetration. *Curr Med Chem - Cent Nerv Syst Agents.* 2002 Sep 1;2(3):229–40.
209. Palm K, Stenberg P, Luthman K, Artursson P. Polar molecular surface properties predict the intestinal absorption of drugs in humans. *Pharm Res.* 1997 May;14(5):568–71.
210. Wessel MD, Jurs PC, Tolan JW, Muskal SM. Prediction of human intestinal absorption of drug compounds from molecular structure. *J Chem Inf Comput Sci.* 1998 Aug;38(4):726–35.
211. Fujiwara S, Yamashita F, Hashida M. Prediction of Caco-2 cell permeability using a combination of MO-calculation and neural network. *Int J Pharm.* 2002 Apr;237(1–2):95–105.
212. Kulkarni A, Han Y, Hopfinger AJ. Predicting Caco-2 cell permeation coefficients of organic molecules using membrane-interaction QSAR analysis. *J Chem Inf Comput Sci.* 2002 Apr;42(2):331–42.
213. Platts JA, Abraham MH, Zhao YH, Hersey A, Ijaz L, Butina D. Correlation and prediction of a large blood-brain distribution data set--an LFER study. *Eur J Med Chem.* 2001 Sep;36(9):719–30.
214. Kaznessis YN, Snow ME, Blankley CJ. Prediction of blood-brain partitioning using Monte Carlo simulations of molecules in water. *J Comput Aided Mol Des.* 2001 Aug;15(8):697–708.
215. Ooms F, Weber P, Carrupt PA, Testa B. A simple model to predict blood-brain barrier permeation from 3D molecular fields. *Biochim Biophys Acta.* 2002 Jul 18;1587(2–3):118–25.
216. Rose K, Hall LH, Kier LB. Modeling blood-brain barrier partitioning using the electrotopological state. *J Chem Inf Comput Sci.* 2002 Jun;42(3):651–66.
217. Iyer M, Mishra R, Han Y, Hopfinger AJ. Predicting blood-brain barrier partitioning of organic molecules using membrane-interaction QSAR analysis. *Pharm Res.* 2002 Nov;19(11):1611–21.

218. Lobell M, Molnár L, Keserü GM. Recent advances in the prediction of blood-brain partitioning from molecular structure. *J Pharm Sci.* 2003 Feb;92(2):360–70.
219. Van De Waterbeemd H, Camenisch G, Folkers G, Raevsky OA. Estimation of Caco-2 Cell Permeability using Calculated Molecular Descriptors. *Quant Struct-Act Relatsh.* 1996;15(6):480–90.
220. Zhao YH, Le J, Abraham MH, Hersey A, Eddershaw PJ, Luscombe CN, et al. Evaluation of human intestinal absorption data and subsequent derivation of a quantitative structure-activity relationship (QSAR) with the Abraham descriptors. *J Pharm Sci.* 2001 Jun;90(6):749–84.
221. Palm K, Luthman K, Unge A-L, Strandlund G, Artursson P. Correlation of Drug Absorption with Molecular Surface Properties. *J Pharm Sci.* 1996 Jan;85(1):32–9.
222. Clark DE. Rapid calculation of polar molecular surface area and its application to the prediction of transport phenomena. 2. Prediction of blood–brain barrier penetration. *J Pharm Sci.* 1999 Aug;88(8):815–21.
223. Egan WJ, Merz KM, Baldwin JJ. Prediction of drug absorption using multivariate statistics. *J Med Chem.* 2000 Oct 19;43(21):3867–77.
224. Hou TJ, Zhang W, Xia K, Qiao XB, Xu XJ. ADME Evaluation in Drug Discovery. 5. Correlation of Caco-2 Permeation with Simple Molecular Properties. *J Chem Inf Comput Sci.* 2004 Sep;44(5):1585–600.
225. Artursson P, Ungell AL, Löfroth JE. Selective paracellular permeability in two models of intestinal absorption: cultured monolayers of human intestinal epithelial cells and rat intestinal segments. *Pharm Res.* 1993 Aug;10(8):1123–9.
226. Conradi RA, Burton PS, Borchardt RT. Physico-Chemical and Biological Factors that Influence a Drug's Cellular Permeability by Passive Diffusion. In: *Methods and Principles in Medicinal Chemistry.* 1996.
227. Conradi, R. A., Burton PS, Borchardt, R.T. Physico-Chemical and Biological Factors that Influence a Drug's Cellular Permeability by Passive Diffusion. In: *Methods and Principles in Medicinal Chemistry.* 1996. p. 233–52.
228. Ghuman J, Zunszain PA, Petitpas I, Bhattacharya AA, Otagiri M, Curry S. Structural Basis of the Drug-binding Specificity of Human Serum Albumin. *J Mol Biol.* 2005 Oct;353(1):38–52.
229. Veber DF, Johnson SR, Cheng H-Y, Smith BR, Ward KW, Kopple KD. Molecular properties that influence the oral bioavailability of drug candidates. *J Med Chem.* 2002 Jun 6;45(12):2615–23.
230. Oprea TI. Property distribution of drug-related chemical databases. *J Comput Aided Mol Des.* 2000 Mar;14(3):251–64.
231. Van de Waterbeemd H, Camenisch G, Folkers G, Chretien JR, Raevsky OA. Estimation of blood-brain barrier crossing of drugs using molecular size and shape, and H-bonding descriptors. *J Drug Target.* 1998;6(2):151–65.
232. Lipinski CA, Lombardo F, Dominy BW, Feeney PJ. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv Drug Deliv Rev.* 2001 Mar 1;46(1–3):3–26.

233. Ghose AK, Viswanadhan VN, Wendoloski JJ. A knowledge-based approach in designing combinatorial or medicinal chemistry libraries for drug discovery. 1. A qualitative and quantitative characterization of known drug databases. *J Comb Chem*. 1999 Jan;1(1):55–68.
234. Kelder J, Grootenhuis PD, Bayada DM, Delbressine LP, Ploemen JP. Polar molecular surface as a dominating determinant for oral absorption and brain penetration of drugs. *Pharm Res*. 1999 Oct;16(10):1514–9.
235. Mahar Doan KM, Humphreys JE, Webster LO, Wring SA, Shampine LJ, Serabjit-Singh CJ, et al. Passive permeability and P-glycoprotein-mediated efflux differentiate central nervous system (CNS) and non-CNS marketed drugs. *J Pharmacol Exp Ther*. 2002 Dec;303(3):1029–37.
236. Doniger S, Hofmann T, Yeh J. Predicting CNS Permeability of Drug Molecules: Comparison of Neural Network and Support Vector Machine Algorithms. *J Comput Biol*. 2002 Dec;9(6):849–64.
237. Volpenhein RA, Webb DR, Jandacek RJ. Effect of a nonabsorbable lipid, sucrose polyester, on the absorption of DDT by the rat. *J Toxicol Environ Health*. 1980 May;6(3):679–83.
238. Lecoeur S, Videmann B, Mazallon M. Effect of organophosphate pesticide diazinon on expression and activity of intestinal P-glycoprotein. *Toxicol Lett*. 2006 Mar 1;161(3):200–9.
239. Bikadi Z, Hazai I, Malik D, Jemnitz K, Veres Z, Hari P, et al. Predicting P-Glycoprotein-Mediated Drug Transport Based On Support Vector Machine and Three-Dimensional Crystal Structure of P-glycoprotein. *PLoS ONE*. 2011 Oct 4;6(10).
240. Chedik L, Bruyere A, Le Vee M, Stieger B, Denizot C, Parmentier Y, et al. Inhibition of Human Drug Transporter Activities by the Pyrethroid Pesticides Allethrin and Tetramethrin. Rodrigues-Lima F, editor. *PLOS ONE*. 2017 Jan 18;12(1):e0169480.
241. Hou T, Wang J, Zhang W, Xu X. ADME evaluation in drug discovery. 6. Can oral bioavailability in humans be effectively predicted by simple molecular property-based rules? *J Chem Inf Model*. 2007 Apr;47(2):460–3.
242. Pham-The H, González-Álvarez I, Bermejo M, Garrigues T, Le-Thi-Thu H, Cabrera-Pérez MÁ. The Use of Rule-Based and QSPR Approaches in ADME Profiling: A Case Study on Caco-2 Permeability. *Mol Inform*. 2013 Jun;32(5–6):459–79.
243. Food and Drug Administration. Waiver of In Vivo Bioavailability and Bioequivalence Studies for Immediate-Release Solid Oral Dosage Forms Based on a Biopharmaceutics Classification System Guidance for Industry. 2015.

CHEDIK, Lisa.- Prédiction *in silico* de l'absorption intestinale et de la pénétration cérébrale des pesticides chez l'homme.

74 feuilles, 8 illustrations, 3 tableaux, 30 cm.-Thèse : Pharmacie; Rennes 1; 2017;N°.

Résumé français: Les pesticides sont des produits largement utilisés dans l'agriculture et dans la sphère domestique pour leurs propriétés insecticides, fongicides ou herbicides. De plus en plus de recherches scientifiques suggèrent que l'exposition aux pesticides est à l'origine de troubles métaboliques, hormonaux et neurologiques chez l'homme. Ces effets néfastes sont tributaires de la capacité des pesticides ingérés à traverser une série de membranes biologiques très sélectives : la barrière intestinale pour accéder au flux sanguin, puis la barrière hémato-encéphalique pour accéder au système nerveux central. Contrairement aux médicaments, ces phases clés du passage intestinal et cérébral sont peu décrites dans la littérature. L'objectif de notre étude a été de prédire l'absorption gastro-intestinale et le passage cérébral de 338 pesticides (appartenant entre autres aux classes des pyrèthri-noïdes, des organophosphorés, des organochlorés, des carbamates et des triazines) en utilisant le logiciel en ligne SwissADME. Nos résultats montrent que 81% des pesticides étudiés seraient capables de traverser la barrière gastro-intestinale. Une proportion plus faible (39%) est prédite pour accéder au cerveau.

Résumé anglais : Pesticides are chemicals widely used in agriculture and domestic sphere for their insecticidal, fungicidal or herbicidal properties. There is a growing evidence that exposure to pesticide is linked to impaired human health and may cause neurological, metabolic or hormonal dysfunctions. Those adverse effects are tributary to the ability of ingered pesticides to cross a serie of selective barriers: gastro-intestinal barrier to access the blood stream and then blood brain barrier to access central nervous system and exert neurotoxicity. These key steps of gastro-intestinal and blood brain barriers crossing are poorly described for pesticides contrary to drugs. The objective of this study was to predict gastrointestinal absorption and brain blood barrier permeation of 338 pesticides (including pyrethroid, organophosphorus, organochlorine, carbamate, triazine and miscellaneous pesticides) using the online available tool SwissADME. Our results show that a large proportion of pesticides (81%) is predicted to cross gastro-intestinal barrier. A lower (but substantial) part of pesticides (about 39%) are predicted to cross blood brain barrier thus supporting their toxic effects for human health, including neurotoxic ones.

Rubrique de classement : TOXICOLOGIE

Mots-clés : Pesticide, toxicité, toxico-cinétique, absorption intestinale, pénétration cérébrale, *in silico*, prédiction

Mots-clés anglais MeSH : Pesticides, Blood-Brain Barrier, Toxicity, Gastrointestinal Absorption

Président : Monsieur Pascal LE CORRE

Assesseurs : Monsieur Olivier FARDEL [directeur de thèse]
Monsieur Arnaud BRUYERE [directeur de thèse]

JURY :
Monsieur Florian LEMAITRE
Monsieur Ronan GARLANTEZEC
Monsieur Cédric LOGÉ