ANNÉE 2017

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

pour le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE RENNES 1

Mention : Biologie et sciences de la santé

Ecole doctorale Biologie-Santé

Lisa Chedik

Préparée à l'unité de recherche UMR INSERM 1085 IRSET
Equipe « Contaminants environnementaux et barrière pulmomnaire »
Institut de Rechercher en Santé, Environnement et Travail

Nature et conséquences des interactions entre transporteurs membranaires et pesticides

Thèse dirigée par :

Olivier FARDEL
PU-PH, Université Rennes I
Arnaud BRUYERE
MCU, Université Rennes I

et soutenue à Rennes le 6 décembre 2017

devant le jury composé de :

Xavier DECLÈVES
PU-PH, Université Paris 5 / *rapporteur*
Anne LESPINE
DR, INRA / *rapporteur*
BARBARA LE BOT
PU, EHESP / *examinateur*
Ludovic LE HÉGARAT
DR, ANSES / *examinateur*
Julian BURSZTYKA
Directeur, HCS Pharma */ examinateur*
Olivier FARDEL
PU-PH, Univeristé Rennes I / *directeur de thèse*

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier toutes les personnes qui m'ont aidé pendant l'élaboration de ma thèse, en particulier mon directeur de thèse Olivier FARDEL, pour sa supervision et sa considération et mon codirecteur Arnaud BRUYÈRE pour son soutien, sa grande disponibilité et ses nombreux conseils durant ces années de doctorat.

Je remercie également chaleureusement Xavier DECLÈVES, Anne LESPINE, Barbara LE BOT, Ludovic LE HÉGARAT et Julian BURSZTYKA d'avoir accepté d'être membre du jury et de juger ce travail de thèse.

Merci aux collègues de l'Université Rennes 1, de l'IRSET et tout particulièrement de l'équipe 1. Marc et Elodie, qui sont les personnes les plus compétentes que je connaisse et ont réponse à tout (si, si, même à la question ultime sur le sens de la vie, de l'univers et du reste), Yu, qui a partagé mon bureau et qui a égayé mes journées avec sa bonne humeur à toutes épreuves, Abdullah pour son sourire Colgate et son sens de la mode et bien sûr les licornes pour avoir amené un peu de suspense dans nos vies. Je remercie les anciens-membres de l'équipe « Galénique », Vincent, Nolwenn, Gilles et Khair pour leur gentillesse et les bons moments passés ensemble et les « gens du sous-sol » de l'IGDR avec qui je déjeune le midi et qui sont fort sympathiques. J'en profite pour remercier chaleureusement Olivier DELALANDE pour sa gentillesse.

Merci aux personnes qui nous rendent la vie plus facile au laboratoire, je pense notamment à Maryline, Gwenaëlle, Christelle et Brigitte.

Je remercie les doctorants que j'ai côtoyés, Marie, Arnaud, Bassil, Sophie, Raphaël, Rémi, Cédric, Chloé, les thésards de l'Up-set, de l'association Nicomaque et du festival Sciences-en-courts.

Merci à toi Manuella pour LA MAYENNE, et aussi ta gentillesse, ta bonne humeur et tes relectures de manuscrit.

Merci à mes amis pour leurs attentions et encouragements durant ma thèse et particulièrement pendant la rédaction ! (Merci spécial à mon amie d'enfance Maya qui a fait beaucoup pour moi ces trois dernières années).

Je remercie mes parents pour leur soutien sans faille pendant la thèse et mon cursus de pharmacie, j'espère que vous serez fiers de moi (et que vous m'appelerez Dr-Dr-Chedik c'est la moindre des politesses !…).

Merci à Dominique, qui m'a supportée pendant les moments difficiles et m'a appris que « la bioinfo c'est la vie ! ».

Enfin, si vous ne figurez pas dans la liste ci-dessus, je vous invite à remplir le champ suivant :

Je remercie également……. pour tout ce que je lui dois et je lui dédie cette thèse.

Pour finir, je tiens à remercier les personnes qui prendront le temps de lire un passage de cette thèse et j'espère qu'elles y trouveront les informations qu'elles recherchent.

TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES ABRÉVIATIONS **7**

LISTE DES FIGURES **10**

LISTE DES TABLEAUX **11**

RÉSUMÉ **12**

ABSTRACT **14**

CHAPITRE I : INTRODUCTION **16**

1. LES PESTICIDES 18
1.1. Généralités *18*
1.1.1. Les différentes classes de pesticides 18
1.1.2. Utilisation des pesticides en France et en Europe 19
1.1.3. Exposition et imprégnation de la population aux pesticides 20
1.1.4. Toxicité des pesticides 22
1.2. Les pyréthrinoïdes *25*
1.2.1. Généralités 25
1.2.2. Mécanisme d'action 26
1.2.3. Utilisation et devenir des pyréthrinoïdes dans l'environnement 26
1.2.4. Toxicocinétique 28
1.2.5. Imprégnation de la population 28
1.2.6. Toxicité 28
1.3. Les organophosphorés *33*
1.3.1. Généralités 33
1.3.2. Mécanisme d'action 33
1.3.3. Utilisation et devenir des organophosphorés dans l'environnement 33
1.3.4. Toxicocinétique 34
1.3.5. Imprégnation de la population 35
1.3.6. Toxicité 35
2. TRANSPORT MEMBRANAIRE 39
2.1. Mécanismes de passage au travers des membranes *39*
2.1.1. Diffusion passive 40
2.1.2. Transport passif facilité 40
2.1.3. Transport actif 40
2.2. Les transporteurs membranaires *42*
2.2.1. Généralités 42
2.2.2. La famille des transporteurs ABC 43
2.2.3. La famille des transporteurs SLC 55
2.3. Transport des xénobiotiques au niveau des barrières *65*
2.3.1. Transport intestinal des xénobiotiques 65
2.3.2. Transport hépatique des xénobiotiques 67
2.3.3. Transport rénal des xénobiotiques 69
2.3.4. Transport des xénobiotiques au niveau de la BHE 72

3. INTERACTIONS ENTRE PESTICIDES ET TRANSPORTEURS MEMBRANAIRES 74
3.1. Interactions entre transporteurs et pesticides organochlorés 75
3.1.1. Prise en charge 75
3.1.2. Modulation d'activité 76
3.1.3. Régulation d'expression 78
3.2. Interactions entre transporteurs et pesticides organophosphorés 79
3.2.1. Prise en charge 79
3.2.2. Modulation d'activité 80
3.2.3. Régulation d'expression 81
3.3. Interactions entre transporteurs et pesticides pyréthrinoïdes 82
3.3.1. Prise en charge 82
3.3.2. Modulation d'activité 82
3.3.3. Régulation d'expression 83
3.4. Interactions entre transporteurs et pesticides carbamates 84
3.4.1. Prise en charge 84
3.4.2. Modulation d'activité 84
3.4.3. Régulation d'expression 84
3.5. Interactions entre transporteurs et les autres classes de pesticides 85
3.5.1. Prise en charge 85
3.5.2. Modulation d'activité 87
3.5.3. Régulation d'expression 88
3.6. Effets de combinaisons de pesticides sur les transporteurs 91
4. OBJECTIFS DE L'ETUDE 92

CHAPITRE II : INTERACTIONS DES PYRÉTHRINOÏDES AVEC LES TRANSPORTEURS ABC ET SLC 94

1. RESUME 96
***ARTICLE.* INHIBITION DES ACTIVITES DES TRANSPORTEURS HUMAINS PAR LES PYRETHRINOÏDES ALLETHRINE ET TETRAMETHRINE** 98

CHAPITRE III : INTERACTIONS DES ORGANOPHOSPHORÉS AVEC LES TRANSPORTEURS ABC ET SLC 140

***ARTICLE.* INTERACTION DES PESTICIDES ORGANOPHOSPHORES AVEC LES TRANSPORTEURS SLC** 142
1. RESUME 144
2. RESULTATS COMPLEMENTAIRES 200

CHAPITRE IV : DISCUSSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES 210

CHAPITRE V : BIBLIOGRAPHIE 220

CHAPITRE VI : AUTRES CONTRIBUTIONS SCIENTIFIQUES 262

***ARTICLE.* IN SILICO PREDICTION FOR INTESTINAL ABSORPTION AND BRAIN PENETRATION OF CHEMICAL PESTICIDES IN HUMANS** 264
***ARTICLE.* INHIBITION OF SLC DRUG TRANSPORTER ACTIVITIES BY ENVIRONMENTAL BISPHENOLS.** 282

LISTE DES ABRÉVIATIONS

2,4-D	Acide 2,4-dichlorophénoxyacétique
3-PBA	Acide 3-phénoxybenzoïque
AASQA	Associations Agréées de Surveillance de la Qualité de l'Air
ABC	ATP-binding cassette
AChE	Acétylcholinestérase
ADP	Adénosine diphosphate
AHR	Aryl hydrocarbon receptor (Récepteur aux hydrocarbures aromatiques)
AMPc	Adénosine monophosphate cyclique
ATP	Adénosine triphosphate
BCRP	Breast cancer resistance protein
BHE	BHE : Barrière hémato-encéphalique
BR_2CA	Acide cis-3-(2,2-dibromo-vinyl)-2,2-diméthylcyclopropane-carboxylique
BSEP	Bile Salt Export Pump
BSP	Bromosulfophthaléine
CAR	Constitutive androstane receptor (Récepteur constitutif des androstanes)
CCK8	Cholécystokinine octapeptide
CE50	Concentration efficace 50%
CI50	Concentration inhibitrice 50%
CIRC	Centre international de recherche sur le cancer
CNT	Concentrative nucleoside transporter
CYP3A4	Cytochrome P450 3A4
DAPI	4',6-diamidino-2-phénylindole
DDD	Dichlorodiphényldichloroéthane
DDE	Dichlorodiphényldichloroéthylène
DDT	Dichlorodiphényltrichloroéthane
DHEAS	Déhydroépiandrostérone sulfate
DJA	Dose journalière admissible
EAT2	Etude de l'alimentation totale 2

EFSA	Autorité européenne de sécurité des aliments
EMA	European Medicines Agency
ENNS	Etude nationale nutrition santé
ENT	Equilibrative nucleoside transporter
EPA	Environmental protection agency
FSH	Follicle Stimulating Hormone (Hormone folliculo-stimulante)
FTC	Fumitremorgin C
GABA	Acide γ-aminobutyrique
GMPc	Guanosine monophosphate cyclique
GSSG	Glutathion oxydé
HUGO	Human genome organisation
INVS	Institut national de veille sanitaire
LCR	Liquide céphalo-rachidien
LH	Luteinizing hormone (Hormone lutéinisante)
LMR	Limite maximale de résidus
LogP	Coefficient de partage octanol/eau
MATE	Multidrug and toxin extrusion transporter
MCPA	Acide 2-méthyl-4-chlorophénoxyacétique
MCT	Monocarboxylate transporter
MDR1	Multidrug resistance protein 1
MPP+	1-méthyl-4-phénylpyridinium
MRP	Multidrug resistance-associated protein
NBD	Nucleotide binding domain (Domaine de liaison au nucléotide)
NMN	N-méthyl-nicotinamide
Nrf2	Nuclear factor erythroid-2-related factor 2
NTCP	Na^+-taurocholate cotransporting polypeptide
NTE	Neuropathy target esterase
OAT	Organic anion transporter
OATP	Organic anion-transporting polypeptide
OCT	Organic cation transport
OCTN	Organic cation/carnitine transporter

PAH	Acide para-aminohippurique
Papp	Perméabilité apparente
PEPT	Peptide transporter
PGE_1	Prostaglandine E1
PGE_2	Prostaglandine E2
PGF_2	Prostaglandine F2
P-gp	P-glycoprotéine
PPAR-α	Peroxisome proliferator-activated receptor (Récepteur activé par les prolifératéurs de peroxysomes)
PXR	Pregnane X receptor
SLC	Solute carrier
SNC	Système nerveux central
T3	Triiodothyronine
T4	Thyroxine
TEA	Tétraéthylammonium
TMD	Transmembrane domaine (Domaine transmembranaire)
UE	Union européenne
URAT1	Urate Anion Exchanger 1
VMAT	Vesicular monoamine transporter
VSSC	Voltage-sensitive sodium channels (Canaux sodiques voltage-dépendant)

LISTE DES FIGURES

Figure 1: Historique d'utilisation des pesticides 19
Figure 2: Structures chimiques des pyréthrines naturelles et des pyréthrinoïdes 25
Figure 3: Représentation des différents modes de passage des membranes par les xénobiotiques ... 39
Figure 4: Structures des transporteurs ABC 44
Figure 5: Représentation des TMDs et NBDs de la P-gp 44
Figure 6: Mécanismes « vacuum cleaner » ou « flippase » de la P-glycoprotéine 46
Figure 7: Mécanisme général de l'efflux médié par P-gp 47
Figure 8: Structures des transporteurs SLC22, SLCO et SLC47 56
Figure 9: Mécanisme de transport « rocker switch » suggéré pour les SLC 57
Figure 10: Transporteurs exprimés au niveau entérocytaire 66
Figure 11: Transporteurs exprimés au niveau hépatocytaire 68
Figure 12: Transporteurs exprimés au niveau des cellules tubulaires proximales rénales 70
Figure 13: Transporteurs exprimés dans les cellules endothéliales des capillaires de la BHE 73

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1: Exemples de pesticides classés par le CIRC 24
Tableau 2: Classification des principaux transporteurs ABC de médicaments 43
Tableau 3: Exemples de substrats et modulateurs de la P-glycoprotéine 48
Tableau 4: Exemples de substrats et modulateurs des transporteurs MRPs..... 51
Tableau 5: Distribution tissulaire des transporteurs MRPs..... 52
Tableau 6: Exemples de substrats et modulateurs de BCRP 53
Tableau 7: Classification des principaux transporteurs SLC de médicaments 55
Tableau 8: Exemples de substrats et modulateurs des transporteurs OCTs 58
Tableau 9: Distribution tissulaire des transporteurs OCTs..... 59
Tableau 10: Exemples de substrats et modulateurs des transporteurs OATs 60
Tableau 11: Distribution tissulaire des transporteurs OAT1, OAT2, OAT3 et OAT4 61
Tableau 12: Exemples de substrats et de modulateurs des transporteurs OATPs 62
Tableau 13: Distribution tissulaire d'OATP1B1, OATP1B3 et OATP2B1 62
Tableau 14: Exemples de substrats et de modulateurs des transporteurs MATEs..... 64
Tableau 15: Organochlorés substrats, modulateurs et régulateurs d'expression de transporteurs ABC et SLC 79
Tableau 16: Organophosphorés substrats, modulateurs et régulateurs d'expression de transporteurs ABC et SLC..... 81
Tableau 17: Pyréthrinoïdes substrats, modulateurs et régulateurs d'expression de transporteurs ABC et SLC 83
Tableau 18: Carbamates substrats, modulateurs et régulateurs d'expression de transporteurs ABC et SLC 84
Tableau 19: Autres pesticides substrats, modulateurs et régulateurs d'expression de transporteurs ABC et SLC..... 90

RÉSUMÉ

Les pyréthrinoïdes et les organophosphorés sont des pesticides très utilisés, à l'origine d'une imprégnation forte de la population, exposée à ces contaminants principalement via l'alimentation. De plus en plus d'études scientifiques suggèrent des liens entre l'exposition à ces composés et des maladies chroniques ou des troubles du développement de l'enfant.

Paradoxalement, leur devenir biologique chez l'homme est mal connu. Certaines études suggèrent que ces insecticides sont susceptibles d'intéragir avec les transporteurs membranaires ABC et SLC, protéines localisées au niveau d'interfaces hémato-tissulaires qui prennent en charge de nombreux substrats endogènes, médicaments et contaminants de l'environnement.

L'objectif de notre étude a été de caractériser les effets d'insecticides des familles des pyréthrinoïdes et des organophosphorés sur l'activité de nombreux transporteurs ABC et SLC prenant en charge des médicaments (P-gp, BCRP, MRPs, OATP-1B1,-2B1,-1B3, OCT1-3, OAT1, OAT3, MATE1 et MATE2K) par une approche *in vitro*. Nous nous sommes également attachés à caractériser par des expérimentations *in vitro* et *in silico,* les mécanismes des interactions et les éléments structuraux des pesticides à l'origine de ces effets.

Nous avons montré que de nombreux organophosphorés et pyréthrinoïdes étaient capables d'inhiber des transporteurs d'efflux (MRP, BCRP, P-gp) et d'influx (OATP1B1, OAT3, MATE1, OCT1-2) et de stimuler l'activité de certains OATPs. Les pesticides testés inhibaient très fortement l'activité des transporteurs de cations (OCT1 et OCT2) et ont pu bloquer le transport de catécholamines médiés par ces protéines. Une approche qSAR a permis de définir des paramètres physicochimiques associés aux effets modulateurs des pesticides et une approche d'amarrage moléculaire (docking) a mise en évidence les sites de liaisons de la P-gp impliquées dans ces interactions.

Les conséquences des modulations de l'activité des transporteurs, en termes d'effets toxiques et d'interactions médicamenteuses, restent à définir pour les populations exposées à de fortes doses de pesticides. Toutefois, la contribution des interactions observées aux effets toxiques de ces insecticides est peu probable car nécessitant des concentrations nettement supérieures à celles atteintes dans le cadre d'une exposition environnementale de la population générale.

ABSTRACT

The general population is chronically exposed to pyrethroids and organophosphorus insecticides, mainly through alimentation. Several epidemiological studies have found an association between non-occupational exposure to these pesticides and chronic diseases and developmental disorders.

Paradoxically, their biological fate in humans is poorly understood. Some studies suggest that these insecticides could interact with ABC and SLC membrane transporters. These membrane proteins, located at blood-tissue interfaces (liver, kidney, intestine ...), handle many endogenous substrates, drugs and pollutants.

The objective of our study was to characterize, using an *in vitro* approach, the effects of pyrethroid and organophosphorus insecticides on the activity of numerous ABC and SLC human drug-transporters (P-gp, BCRP, MRPs, OATP-1B1, -2B1, -1B3, OCT1-3, OAT1, OAT3, MATE1 and MATE2K). We have also tried to analyze the mechanisms of interactions and the structural requirements for insecticides-mediated modulation of drug transporters activities using *in vitro* and *in silico* approach.

We have shown that many organophosphorus and pyrethroids are able to inhibit ABC (MRP, BCRP, P-gp) and SLC (OATP1B1, OAT3, MATE1, OCT1-2) transporters and can stimulate the activity of some OATPs. Moreover, the tested pesticides inhibited very strongly the activity of OCT1 and OCT2 and blocked catecholamine transport mediated by these transporters. A qSAR approach allowed to define physicochemical parameters associated with the modulating effects of pesticides and a molecular docking approach revealed the P-gp binding sites involved in these interactions.

The consequences of transporter activitie modulation, in terms of toxic effects and drug interactions, remain to be defined for populations exposed to high doses of pesticides, occurring notably in response to poisoning. However the alterations of these transporter activities by insecticides are unlikely to contribute to organophosphorus or pyrethroids toxicities of chronic low-dose exposure.

CHAPITRE I : INTRODUCTION

1. Les pesticides

1.1. 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, nématicides, bactéricides, antifouling ou encore régulateurs de croissance.

Très utilisés dans l'agriculture, ils le sont également 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 (nématicide, molluscicide..) et certains sont, ou ont été, utilisés comme médicaments (warfarine, métrifonate).

Les produits commerciaux contiennent souvent, en plus de ces substances actives, des adjuvants, des solvants, des conservateurs et parfois des impuretés ou des métabolites des molécules mères (1,2). A titre d'exemple, l'association avec du pipéronyl butoxide empêche la dégradation du pesticide avec lequel il est formulé, et permet de potentialiser les effets du produit (3). Les pesticides peuvent être commercialisés séparément ou sous forme de mélanges, et les pesticides possédant des stéréoisomères sont souvent formulés sous forme racémique.

1.1.1. Les différentes classes de pesticides

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

Les pesticides ont des mécanismes d'action variable (4). Les insecticides agissent notamment sur le système cholinergique et les canaux sodiques et chlores (5–7). Les herbicides agissent sur la photosynthèse, la production de pigments, d'acides aminés et d'acides gras, ou encore la division cellulaire (8–12). Les fongicides altèrent la synthèse de stérols, la traduction et la division cellulaire, la synthèse protéique et lipidique et la perméabilité cellulaire (13–17).

1.1.2. Utilisation des pesticides en France et en Europe

En 2017, dans les pays de l'Union Européenne (UE), 493 substances actives phytopharmaceutiques sont approuvées et 28 sont en cours d'évaluation (18). La France est le troisième pays utilisateur de pesticides au monde (19), principalement dans un cadre agricole. Les pesticides aux propriétés fongicides sont les plus employés en France, notamment dans les exploitations vigneronnes et céréalières, suivis des herbicides (culture du maïs et du colza) puis des insecticides (19).

En termes de familles chimiques, les organochlorés introduits dans les années 40 ont été largement utilisés comme insecticides en France jusqu'à leur interdiction progressive 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. Les pyréthrinoïdes constituent de nos jours la classe d'insecticide la plus utilisée en France et en Europe, du fait de leur faible coût, leur relative faible toxicité et leur impact environnemental négligeable en termes de rémanence (Figure 1). Les néonicotinoïdes font quant à eux l'objet d'un moratoire européen et sont en passe d'être interdits en France et dans l'Union Européenne.

En ce qui concerne les herbicides, les triazines ont été très utilisés depuis les années 50 puis progressivement interdits dans les années 2000 (20). Le glyphosate est le désherbant le plus utilisé en France (deuxième pesticide le plus utilisé en termes de tonnage) (21). Concernant les fongicides c'est le soufre qui est majoritairement employé en France (pesticide le plus utilisé en tonnage).

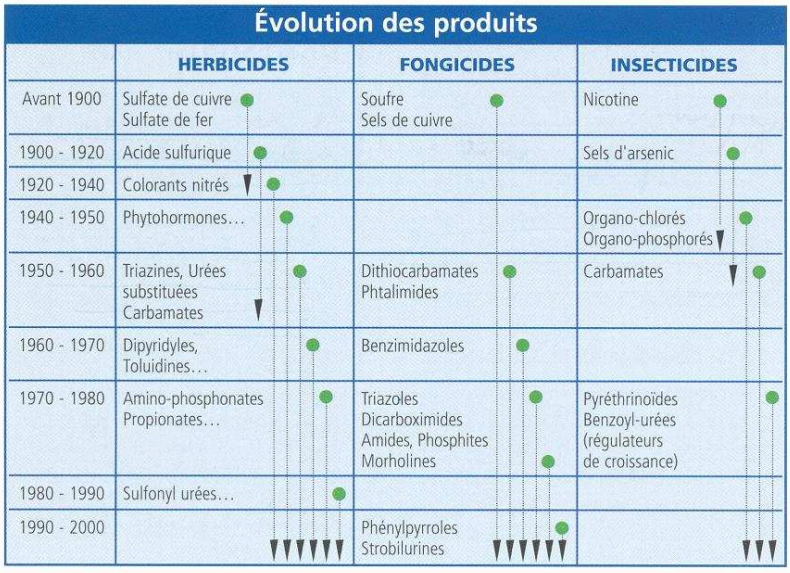


Figure 1: Historique d'utilisation des pesticides (Source Union des Industries de la protection des plantes)

1.1.3. 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 contenants des traces de pesticides (22). L'exposition professionnelle aux pesticides concerne essentiellement les professionnels de l'industrie phytosanitaire, de l'industrie du bois et les agriculteurs, mais également les personnels d'entretien de la voirie ou encore les jardiniers (23). Ce type d'exposition intervient surtout par voie cutanée (24). 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 (22).

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 (25).

1.1.3.1. Devenir des pesticides dans l'environnement

1.1.3.1.1. Contamination aux pesticides des eaux françaises

Les pesticides les plus hydrosolubles/polaires sont susceptibles de contaminer les eaux souterraines et les cours d'eau. Les composés les plus retrouvés dans les cours d'eau et eaux souterraines français en 2014 sont majoritairement des herbicides. On y retrouve à forte concentration le glyphosate et son métabolite AMPA (acide aminométhylphosphonique), mais aussi certains métabolites de dithiocarbamates (éthylurée), des chloroacétanilides (métolachlore, métazachlore), des organochlorés. Des triazines persistantes comme la simazine ou l'atrazine et ses métabolites (interdits depuis 2003) sont à l'origine de dépassements de norme de qualité DCE (Directive-cadre européenne sur l'eau) (26,27). Les régions les plus touchées sont les régions du nord de la France, l'Île de France, les pays de la Loire et le Sud-Ouest (28). La Martinique est elle aussi touchée, du fait d'une contamination historique au chlordécone, pesticide persistant utilisé autrefois dans les bananeraies (28).

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

Certains pesticides sont des composés volatils, propriété qui facilite le transport de ces contaminants sur de longues distances dans l'atmosphère (29,30). Les pesticides volatils sont ainsi susceptibles de se répandre dans l'atmosphère et de contaminer l'air extérieur. Sur près de 100 000 mesures réalisées dans l'atmosphère entre 2002 et 2006 par les AASQA (Associations Agréées de surveillance de la Qualité de l'Air), 12% ont permis de détecter au moins un pesticide (25). Parmi les pesticides les plus

souvent retrouvés à fortes concentrations : certains organophosphorés (chlorpyrifos, dichlorvos, malathion, phosmet, parathion méthyl), le captane et l'organochloré endosulfan (31). Les concentrations en pesticides varient en fonction de la zone géographique (urbaine ou rurale) et de la proximité des exploitations agricoles (31). Il convient de noter l'absence de normes européennes ou françaises concernant les pesticides dans l'air. Concernant l'air intérieur, ce sont les organochlorés (le lindane et ses isomères, l'endosulfan, la dieldrine, le DDT (dichlorodiphényltrichloroéthane)), les organophosphorés (diazinon, dichlorvos, malathion, chlorpyrifos), certains carbamates (propoxur, carbaryl) et la trifluraline qui font partie des pesticides les plus fréquemment retrouvés dans les logements franciliens d'après une étude de 2005 (32).

1.1.3.1.3. Contamination des sols aux pesticides

Les données concernant la contamination des sols aux pesticides portent essentiellement sur le lindane (33) pour la France métropolitaine et le chlordécone pour les départements d'outre-mer (34). Le lindane, pesticide organochloré utilisé pendant 50 ans a été interdit en 1998 en France mais peut persister jusque 40 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 (33). Le chlordécone, insecticide utilisé jusqu'en 1993 dans les bananeraies, contaminerait près de 8250 hectares de terrain sur toute la Guadeloupe avec des zones à fortes concentrations (supérieures à 1µg/kg de sol) (34).

1.1.3.1.4. 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 analysées en Union Européenne, 97% étaient dépourvues de résidus de pesticides dépassant la limite légale (35). Dans les fruits et légumes, sur 156 pesticides recherchés, 120 ont pu être détectés au moins une fois ; les plus fréquemment retrouvés sont l'imazalil, le thiabendazole, l'azoxystrobin, le boscalid et le chlorpyrifos (35). Concernant les produits d'origine animale, les organochlorés DDT et hexachlorobenzène sont les composés les plus fréquemment retrouvés, du fait de leur bioaccumulation dans les graisses (35). Les pesticides les plus fréquemment retrouvés dans les aliments dans l'étude française EAT2 (Étude de l'alimentation totale 2), sont des organophosphorés utilisés dans le stockage des céréales ainsi que l'iprodione, le carbendazime et l'imazalil (36). 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) (36). Le seul composé retrouvé à des concentrations dépassant la DJA (Dose Journalière Admissible) était le diméthoate (36).

1.1.3.2. Imprégnation de la population française

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 (37)) 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 l'environnement.

Différentes études épidémiologiques se sont attachées à caractériser l'imprégnation de la population française aux pesticides ; c'est le cas de l'étude nationale nutrition santé (ENNS) menée en 2007 par l'Institut national de veille sanitaire (InVS) et qui met en évidence la présence de pyréthrinoïdes, d'organophosphorés et d'organochlorés dans la quasi-totalité des prélèvements urinaires (38). 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 liée à la consommation de viandes et de poissons contenant des résidus d'organochlorés suite à leur bioaccumulation dans les graisses animales. Des triazines (atrazine, simazine) ont été également retrouvés dans les échantillons urinaires de femmes enceintes bretonnes de la cohorte « Pélagie » (39), et des organochlorés (DDT, chlordécone) ont été détectés dans les prélèvements biologiques des femmes enceintes guadeloupéennes des cohortes « Ti Moun » et « Hibiscus », entre 2003 et 2007 (40,41). Cette imprégnation des femmes enceintes au chlordécone et à l'atrazine, interdits respectivement en 1993 et en 2003, traduit la grande persistance dans l'environnement de ces pesticides.

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.

1.1.4.Toxicité des pesticides

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 détoxication, propriétés physicochimiques de la molécule, ratio isomères) qui vont impacter la quantité de pesticides absorbée, 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) (42,43). Certaines manifestations toxiques sont également dues à d'autres pesticides, adjuvants et solvants présents dans la formulation commerciale qui peuvent potentialiser les effets toxiques.

Le nombre d'intoxications aiguës aux pesticides en France et dans le monde est difficile à estimer. Une étude estimait à 2,9 millions le nombre de cas par an, à l'origine de 220 000 décès chaque année dans les pays en développement (44). 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), de troubles digestifs, mais aussi neurologiques (maux de tête, nausées, tremblements, salivation, choréo-athétose, convulsions…) et cardiovasculaires (hypotension artérielle, bradycardie, troubles de la conduction cardiaque…) pouvant aller jusqu'à la mort (45,46). L'intensité et le type des symptômes provoqués sont dépendants du degré d'exposition aux pesticides et de la voie d'exposition.

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) (47).

La plupart des études indiquent que l'exposition chronique aux pesticides est associée à un déficit des fonctions cognitives (48,49) et psychomotrices (50–52), mais aucun lien n'est retrouvé concernant les fonctions somato-sensorielles périphériques (53).

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 (54,55), de maladie de Parkinson (56–68) ou encore de sclérose latéral

amyotrophique (69–71). Certaines études ont associé l'exposition aux pesticides à des malformations et des altérations du développement du système nerveux de l'enfant (72,73).

L'exposition de la population générale aux pesticides a été associée dans certaines études à une augmentation du risque de tumeurs cérébrales (74) et de certaines hématopathies malignes, notamment chez l'enfant (75). Le lien entre cancer du sein et exposition aux pesticides est controversé (76,77) 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) (78). Actuellement, le centre international de recherche sur le cancer (CIRC) a classé une soixantaine de pesticides (Tableau1), dont de nombreux organochlorés et organophosphorés (79), et récemment le glyphosate en groupe 2A « cancérogènes probables » (80).

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 Deltamethrine Deltaméthrine Fenvalérate Fluometuron Manèbe Perméthrine Thirame Zirame

Tableau 1: Exemples de pesticides classés par le CIRC

Certaines études suggèrent des effets perturbateurs endocriniens de certains pesticides, notamment des classes des pyréthrinoïdes, organophosphorés, carbamates, organochlorés et du paraquat (81,82). Certains pesticides peuvent ainsi être agonistes ou antagonistes de récepteurs d'hormones (récepteurs des œstrogènes (ER (Estrogen receptor), ERRα (Estrogen-related receptor alpha)), récepteurs des androgènes (AR (Androgen receptor))…) ou interférer avec la synthèse, le transport, le métabolisme et l'élimination d'hormones, altérant leurs concentrations endogènes (82).

1.2. Les pyréthrinoïdes

1.2.1. Généralités

Les pyréthrinoïdes sont des composés organiques de synthèse dérivés des pyréthrines naturelles issues des fleurs de chrysanthème (83). Ce sont des esters d'acides carboxyliques et plusieurs générations ont été successivement synthétisées dans le but d'améliorer leur stabilité dans l'environnement et leur potentiel insecticide (Figure 2) (83). Ces composés ont été substitués par des groupements alkyles/aryles, puis par des halogènes (Cl, Br, F…) et des groupements cyano pour améliorer leur stabilité et leur pouvoir insecticide (84). Ces pesticides sont généralement neutres et lipophiles, et ont une structure chimique relativement flexible comprenant souvent des carbones asymétriques (85). Ils sont généralement commercialisés sous forme de mélange d'isomères, bien que les différents stéréo-isomères n'aient pas forcément les mêmes propriétés insecticides et toxicologiques (86). Cette famille peut être subdivisée en deux catégories selon des caractéristiques toxiques ; les pyréthrinoïdes de type II, dénués de groupement cyano, n'auront pas le même profil toxicologique que les pyréthrinoïdes de type I qui en possèdent un (87) (Figure 2).

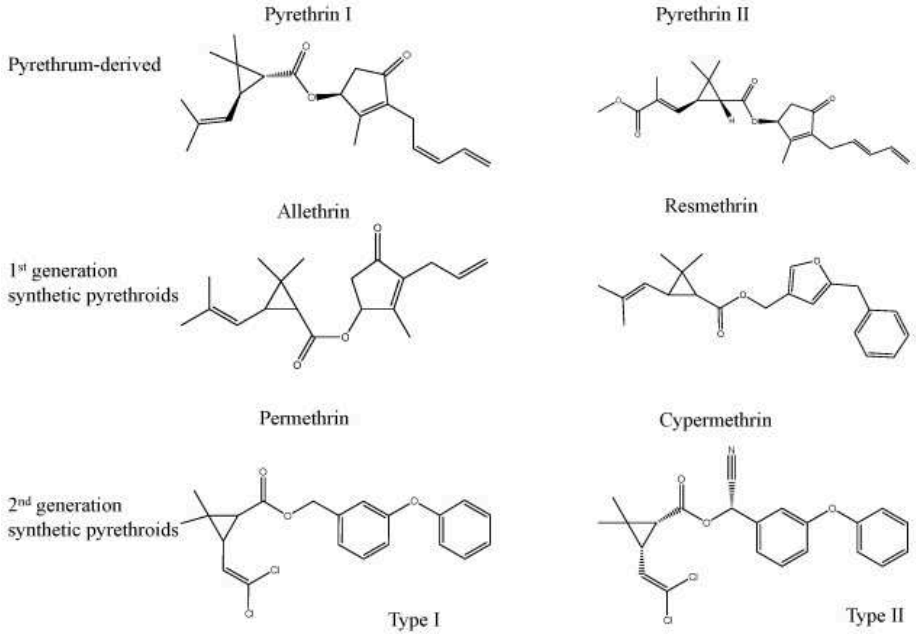


Figure 2: Structures chimiques des pyréthrines naturelles et des pyréthrinoïdes d'après Wakeling et al, 2012 (88)

1.2.2. Mécanisme d'action

Les propriétés insecticides des pyréthrinoïdes sont dues à leur effets sur les canaux sodiques voltage dépendant (VSSC) à l'origine d'altération de la perméabilité des ions sodium et potassium au niveau des membranes des neurones de l'insecte (89). Ce sont de puissantes neurotoxines qui ralentissent l'activation/ouverture du VSSC ou diminuent le rythme d'inactivation/fermeture du canal (89,90). Le VSSC est maintenu ouvert plus longtemps, permettant à plus d'ions sodium de traverser le canal, entrainant un allongement de la dépolarisation de la membrane neuronale (état d'hyperexcitation) (89,90). Les pyréthrinoïdes de type I maintiennent le canal ouvert assez longtemps pour permettre l'apparition de séries de potentiels d'action ou « repetitive firing » (90). Les pyréthrinoïdes de type II maintiennent le canal ouvert plus longtemps encore que les types I et sont responsables d'une dépolarisation plus longue de la membrane à l'origine de potentiels d'actions d'amplitude plus faible voire nulle (90). Dans les deux cas, leurs effets sur le VSSC causent la paralysie puis la mort de l'insecte.

1.2.3. Utilisation et devenir des pyréthrinoïdes dans l'environnement

Les pyréthrinoïdes sont très largement utilisés pour leur propriété insecticide dans l'entretien des jardins, en usage domestique et dans le traitement des parasitoses des animaux domestiques et d'élevage depuis les années 1970. Contrairement aux pyréthrines naturelles, les pyréthrinoïdes, plus stables à la lumière et à la chaleur, sont aussi très utilisés en usage agricole (grandes cultures, vignes, horticulture, stockage). Ces pesticides sont également utilisés dans le traitement du bois, des bâtiments recevant du public (hôpitaux, bureaux, commerces…), de véhicules de transport (trains, bâteaux, aéronefs…), et comme antiparasitaire chez l'homme (pédiculoses). Ils constituent aujourd'hui la classe d'insecticides la plus utilisée, tant pour le traitement des cultures que pour les applications domestiques. Les pyréthrinoïdes sont la classe d'insecticide la plus présente dans les foyers (88,5 % des logements) (32).

Les principaux pyréthrinoïdes utilisés sont la bifenthrine (entretien des jardins), la cyperméthrine (insecticide ménager ou traitement du bois) et d'autres pyréthrinoïdes utilisés comme insecticides ménagers ou en usage vétérinaire (cyfluthrine, d-phénothrine, perméthrine, tétraméthrine, pralléthrine et l'alléthrine) (91,92).

Les pyréthrinoïdes ont un spectre large et sont actifs contre une grande variété de nuisibles (insectes volants, rampants, puces, tiques, poux, gale…). Les formulations commerciales associent généralement aux pyréthrinoïdes d'autres familles de pesticides, mais également des solvants organiques (ou vecteurs, généralement des mélanges d'hydrocarbures) et des synergistes (pipéronyl butoxide)(93). Les synergistes permettent d'augmenter le potentiel insecticide et le spectre d'espèces

sensibles, notamment en ralentissant leur dégradation (inhibiteurs de monooxygénases, estérases) (94,95).

Les pyréthrinoïdes sont sensibles à la lumière et à l'oxydation et sont rapidement dégradés dans l'environnement (en quelques heures dans l'air, en quelques mois au plus dans les sols) (85). Faiblement volatils, ils sont peu retrouvés dans l'atmosphère, ou à des niveaux faibles (<ng/m3), mais peuvent contaminer les sols et potentiellement les eaux de surface (31,38). Les pyréthrinoïdes étant peu hydrosolubles, ils sont peu retrouvés dans les eaux de boisson (38). Ces pesticides sont, par contre, susceptibles de contaminer les fruits et légumes, et s'accumulent dans les organismes aquatiques (35,85).

L'étude de l'EFSA de 2015, s'attachant à déterminer les résidus de pesticides dans les aliments en UE, relève peu de pyréthrinoïdes dans l'alimentation (35). La cyperméthrine, la bifenthrine, la cyhalothrine, la deltaméthrine et la perméthrine sont les plus retrouvés dans les aliments analysés, essentiellement des fruits et légumes et des dépassements de LMR sont rapportés pour la cyperméthrine et la perméthrine, notamment dans des produits importés par l'UE (35). A noter que l'EFSA n'a pas recherché ces contaminants dans les viandes et produits de la mer, mais uniquement dans des produits d'origine animale (œufs, beurre) (35). Les analyses menées dans le cadre de plan de surveillance alimentaire par la DGCCRF (Direction Générale de la Concurrence, de la Consommation et de la Répression des Fraudes) et la DGAL (Direction générale de l'alimentation), montrent que les pyréthrinoïdes sont essentiellement présents dans les céréales, les fruits et légumes, les denrées d'origine animale et dans les produits de la mer (36,38). Le raisin et le vin sont également de gros contributeurs à l'exposition alimentaire aux pyréthrinoïdes (36,38). L'acrinathrine et la cyfluthrine ont également été détectées dans des fruits dans EAT2 (36).

L'exposition de la population générale aux pyréthrinoïdes se fait majoritairement par voie orale, via l'alimentation principalement, mais aussi par l'ingestion de poussières contaminées au sein du logement lors d'une application récente d'insecticide (38,96). L'exposition par voie respiratoire est plus négligeable, et provient de l'utilisation d'aérosols au sein du foyer ou d'inhalation d'air extérieur après utilisation dans les jardins ou épandage agricole (38). De la même manière, l'exposition par voie cutanée est très limitée, et est généralement due à l'utilisation de produits anti-parasitaires ou à des contacts avec des sols ou des tapis traités, notamment chez les enfants (38).

1.2.4. Toxicocinétique

Il existe peu d'études sur la toxicocinétique des pyréthrinoïdes chez l'homme, la plupart des données sont issues d'expérimentations *in vivo*. Il n'y a pas de données évaluant l'absorption par voie respiratoire dans la littérature, mais l'absorption des pyréthrinoïdes semble être rapide par voie digestive et plus limitée par voie cutanée (38,97). Ces composés peuvent être hydrolysés par des estérases dès le tube digestif (98). Une fois absorbés, ces pesticides, très lipophiles, se distribuent faiblement dans les tissus riches en graisse (tissu adipeux, système nerveux central (SNC)...) car ils sont rapidement métabolisés au niveau du foie (hydrolyse, oxydation, conjugaison) (99). L'effet de premier passage hépatique est important pour ces pesticides (100), les pyréthrinoïdes ont des demi-vies courtes et sont rapidement excrétés, essentiellement par voie urinaire (97). Les métabolites de pyréthrinoïdes peuvent être spécifiques d'une molécule mère (comme le Br_2CA (acide cis-3-(2,2-dibromo-vinyl)-2,2-diméthylcyclopropane-carboxylique) pour la deltaméthrine) mais aussi communs à plusieurs pyréthrinoïdes (3-PBA (acide 3-phénoxybenzoïque), F-PBA (acide 4-fluoro-3-phenoxybenzoïque), Cl_2CA (acide 3-(2,2dichlorovinyl)-2,2-diméthylcyclopropane-carboxylique)). D'autre part, certains composés traversent la barrière hémato-placentaire, et certaines molécules mères peuvent être excrétées dans le lait maternel (101).

1.2.5. Imprégnation de la population

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 pyréthrinoïdes (38).

Les pyréthrinoïdes et leurs métabolites sont détectés dans plus de 90% des échantillons biologiques d'ENNS (38) et les concentrations urinaires retrouvées étaient plus élevées que celles des études allemandes, canadiennes et américaines (102–105). Comme dans les autres pays, c'est le 3-PBA, métabolite commun à de nombreux pyréthrinoïdes, qui a été le plus fréquemment détecté (98,5%). Le métabolite de la deltaméthrine (Br_2CA) a été plus fréquemment retrouvé (83%) que dans les études étrangères (106,107) et le métabolite de la cyfluthrine n'a été que rarement détecté, dans l'étude ENNS française (30%) comme dans les études allemande et américaine (105,108).

1.2.6.Toxicité

Les pyréthrinoïdes ont une toxicité élevée pour les espèces aquatiques (109) mais leur toxicité envers les mammifères est faible, du fait de la présence d'estérases et de cytochromes qui vont dégrader/inactiver rapidement ces pesticides (110). De plus, les canaux sodiques des insectes, cibles des pyréthrinoïdes, sont cent fois plus sensibles à leurs effets que les canaux murins (111), ce qui explique aussi en partie la moindre toxicité chez les mammifères. Les pyréthrinoïdes sont considérés comme relativement sans danger d'utilisation pour l'homme par l'US EPA (Environmental Protection

Agency) (112), cependant certains d'entre eux (deltaméthrine, flucythrinate…) peuvent avoir des effets néfastes chez l'homme et chez l'animal, notamment à fortes doses.

Leurs effets sur le système nerveux central et périphérique, sont à l'origine de symptômes peu spécifiques chez l'homme (paresthésies, vertiges, maux de tête, fatigue, vomissements, diarrhées, irritabilité, faiblesses musculaires) et dépendants de la voie d'exposition (113). L'intoxication aux pyréthrinoïdes est moins sévère par voie respiratoire et cutanée. L'exposition aiguë par voie orale entraine des douleurs abdominales, des vomissements et des diarrhées (113). Des paresthésies, des engourdissements et des irritations locales sont fréquentes en cas d'exposition par voie cutanée (113). A fortes doses, des syndromes typiques de l'intoxication aux pyréthrinoïdes apparaissent.

Les pyréthrinoïdes ont été classés en deux sous-groupes en fonction des syndromes cliniques qu'ils déclenchent (type I et type II) (114). L'intoxication aux pyréthrinoïdes de type II est généralement plus sévère que l'intoxication aux types I. Les intoxications aux pyréthrinoïdes de type I sont à l'origine d'un syndrome de tremor caractérisé par des tremblements, une hyperthermie et une hyperexcitabilité reflexe marquée (113). Les pyréthrinoïdes de type II sont à l'origine d'un syndrome de choréo-athétose, caractérisé par une salivation aqueuse profuse, une hyperexcitabilité reflexe, des tremblements, un tonus musculaire augmenté, une hypothermie et une choréo-athétose (mouvements incoordonnés) (46,113). Dans les cas les plus sévères, le patient peut présenter un opisthotonos, des crises convulsives, un œdème pulmonaire, des fasciculations musculaires, et parfois un coma et la mort (46,113).

De multiples mécanismes sont responsables de la toxicité de ces pesticides. Les cibles principales des pyréthrinoïdes sont les canaux sodiques du système nerveux central et périphérique. Une altération de seulement 1% des canaux sodiques de la cellule par les pyréthrinoïdes suffit pour rendre une cellule hyper-excitable (115,116). Le gradient sodique va alors diminuer jusqu'à submerger les capacités des pompes sodiques. La cellule, normalement à l'origine d'un seul potentiel d'action, va à la place générer une série de décharges éléctriques dans le nerf ou le muscle. Certains pyréthrinoïdes vont, au contraire, être à l'origine d'un bloc de conduction nerveux avec l'abolition totale de conduction de potentiels d'action (117).

Les canaux sodiques des nerfs périphériques sont aussi très sensibles aux pyréthrinoïdes. Ainsi, l'exposition par voie cutanée à la cyperméthrine provoque des paresthésies à des concentrations très faibles, de l'ordre du nanomolaire (117). A noter qu'il existe différentes isoformes de canaux sodiques, qui présentent des sensibilités différentes selon le pyréthrinoïde (118) et même selon l'isomère (86).

Les pyréthrinoïdes affectent également d'autres cibles cérébrales. Ils antagonisent les effets inhibiteurs du GABA (acide γ-aminobutyrique), modulent la transmission cholinergique nicotinique,

augmentent la libération d'adrénaline et de noradrénaline et ont également des effets directs sur les canaux chlores et calciques et les récepteurs aux benzodiazépines. Certaines études suggèrent que les pyréthrinoïdes (perméthrine, cyperméthrine) peuvent être à l'origine de morts neuronales, mais à concentrations très élevées. Leurs effets sur les canaux chlores sont importants même à faibles concentrations (117) et sont donc probablement à l'origine de certains signes cliniques de l'intoxication aux pyréthrinoïdes. Il a été montré que certains composés comme l'ivermectine ou le pentobarbitone, qui agissent sur les canaux chlores, peuvent atténuer certains symptômes d'intoxication aux pyréthrinoïdes de type II (salivation, chloréo-athétose, « repetitive firing » dans les muscles squelettiques) (117). L'effet des pyréthrinoïdes sur les canaux calciques semble spécifique aux pyréthrinoïdes de type I, mais leurs contributions aux effets toxiques de ces pesticides ne sont pas avérées (117). Le mécanisme par lequel les pyréthrinoïdes altèrent les canaux ioniques est inconnu mais pourrait être médié par des phénomènes de phosphorylation (119).

En cas d'intoxications très sévères aux pyréthrinoïdes de type II, leurs effets sur le système GABAergique, contribuent probablement aux crises convulsives observées en clinique (120). La liaison des pyréthrinoïdes aux récepteurs périphériques aux benzodiazépines pourrait également contribuer aux tremblements et aux symptômes de salivation observés en cas d'intoxication (121).

En dehors des effets néfastes dus aux intoxications aiguës à fortes doses aux pyréthrinoïdes, ces pesticides sont susceptibles d'avoir des effets toxiques suite à une exposition chronique à faibles concentrations.

Des études ont montré que de nombreux pyréthrinoïdes ont des effets perturbateurs endocriniens. Des pesticides de cette famille présentent des effets estrogéniques (fenvalérate, cyperméthrine, perméthrine, deltaméthrine, phénothrine) et sont susceptibles de moduler la prolifération de cellules sensibles aux estrogènes (122–127). Certains seraient des agonistes des récepteurs aux estrogènes (cyperméthrine, perméthrine et deltaméthrine) (122), d'autres auraient la capacité à moduler l'expression de ses récepteurs hormonaux (phénothrine) (126). Des pyréthrinoïdes ont également des effets anti-estrogèniques (alléthrine et tétraméthrine) (126,127) et anti-progestérones (fenvalérate, alléthrine) (125,128). Ils peuvent se lier aux récepteurs aux androgènes (alléthrine, fenvalérate, phénothrine, fluvalinate, perméthrine, resméthrine) (123) ou se lier à des protéines qui fixent les hormones sexuelles (alléthrine) (123) et affecter la concentration circulante de certaines hormones comme la testostérone (cyperméthrine, alléthrine) (123,129) ou les hormones thyroïdiennes (triiodothyronine (T3), thyroxine (T4)) (fenvalérate, bifenthrine, cyhalothrine) (130,131). Les métabolites de pyréthrinoïdes ont eux aussi des effets perturbateurs endocriniens (estrogéniques notamment) (132), avec des effets encore plus marqués que les molécules mères (133). Les

concentrations urinaires en 3-PBA et en DCCA (acide 3-(2,2-dichlorovinyl)-2,2-diméthylycycl opropanecarboxylique), métabolites communs à plusieurs pyréthrinoïdes, ont été par ailleurs corrélées à une baisse de la qualité du sperme chez l'homme (134,135) et à une altération des concentrations circulantes de certaines hormones (FSH (Follicle Stimulating Hormone), LH, testostérone) (136). Les pyréthrinoïdes et leurs métabolites seraient donc susceptibles d'agir comme modulateurs endocriniens que ce soit pour les humains ou les autres organismes vivants mais il convient de noter que les effets estrogèniques observés pour les pyréthrinoïdes *in vitro* étaient bien moins puissants que l'estradiol endogène (137) et que les effets observés varient selon les énantiomères (138). L'exposition aux pyréthrinoïdes pendant la grossesse serait également à l'origine de troubles du développement du fœtus et de l'enfant. La plupart des études épidémiologiques ne montrent pas de lien entre exposition prénatale aux pyréthrinoïdes et troubles allergiques et respiratoires de l'enfant (139), mais des études ont montré une baisse du poids à la naissance (140) et des troubles du développement neurologique chez les enfants de mères exposées à ces pesticides (retard mental, autisme, déficit cognitif…) (141–143).

Des études *in vivo* montrent que les systèmes cholinergiques et dopaminergiques, qui se développent rapidement chez le nouveau-né, sont très sensibles aux pyréthrinoïdes. Ainsi, l'exposition prénatale à la perméthrine altère les concentrations en dopamine et noradrénaline chez la souris nouveau-née (144). La deltaméthrine affecte la densité des récepteurs nicotiniques et modifie l'affinité des récepteurs muscariniques dans le cortex cérébral de souriceaux (145). De plus, la cyperméthrine empêche le bon développement de la barrière hémato-encéphalique chez le rat (146) et l'exposition prénatale à la perméthrine entraine des altérations du développement des vaisseaux cérébraux chez la souris nouveau-née (144). Les études chez le rongeur démontrent une plus grande vulnérabilité des nouveaux-nés aux effets toxiques neurologiques des pyréthrinoïdes, comparés aux adultes, qui serait liée à leur moindre capacité de détoxification métabolique (90). Il en résulterait des concentrations plus élévées en pyréthrinoïdes dans le cerveau en développement, à l'origine d'effets délétères. De plus, l'expression des canaux sodiques voltage-dépendants varie au cours du développement ; certaines isoformes, fortement exprimés chez le nouveau-né, pourraient être plus sensibles à ces pesticides, même à faibles concentrations (90). Chez l'homme, certaines mutations génétiques altérant la fonction des VSSC, cibles des pyréthrinoïdes, sont associées à des pathologies comme l'épilepsie et à des troubles neurologiques (147).

Le potentiel cancérogène des pyréthrinoïdes apparait faible, la plupart des pyréthrinoïdes classés par le CIRC sont en groupe 3 « non classés en l'état des connaissances actuelles» (perméthrine, fenvalérate, deltaméthrine…). Seule la perméthrine a été classée « probablement cancérogène chez l'homme » par l'US EPA en 2006 sur la base d'études *in vivo*. La majorité des études épidémiologiques

ne montrent pas de lien entre exposition aux pyréthrinoïdes et cancer (cancer du colon, du rectum, du poumon, de la prostate, mélanome, lymphome non-hodgkinien, leucémie) (148–150). Une étude a montré un risque augmenté de leucémie aiguë lymphoïde chez les enfants ayant des concentrations urinaires en métabolites de pyréthrinoïdes élevées (151) et un lien entre exposition à la perméthrine et développement de cancer est suggéré pour le myélome multiple (148), le lymphome non-hodgkinien (152) et le cancer de la prostate chez les personnes ayant des antécédents familiaux (153).

1.3. Les organophosphorés

1.3.1. Généralités

Les pesticides organophosphorés sont des composés organiques contenant au moins un atome de phosphore (généralement dérivés esters, amides ou thiols d'acide phosphoreux ou d'acide phosphorique). Ces pesticides de synthèse ont été développés suite aux recherches sur les neurotoxiques de guerre effectuées pendant la seconde guerre mondiale. Ils sont essentiellement utilisés pour leurs propriétés insecticides, mais certains d'entre-eux sont des acaricides, rodenticides, nématicides, avicides ou herbicides. Les organophosphorés sont relativement lipophiles, peu solubles dans l'eau et faiblement volatils et constituent une famille très hétérogène en termes de structures et de propriétés physicochimiques.

1.3.2. Mécanisme d'action

Les organophosphorés ont la particularité d'inhiber l'acétylcholinestérase (AChE), enzyme présente notamment au niveau des synapses cholinergiques et des jonctions neuromusculaires (5). L'AChE permet la dégradation de l'acétylcholine présente dans la synapse de neurones cholinergiques et met ainsi un terme à l'activation des récepteurs cholinergiques (récepteurs muscariniques et nicotiniques) (154). L'inactivation irréversible de l'enzyme par ces pesticides engendre une accumulation toxique d'acétylcholine intra-synaptique à chaque influx nerveux, et donc une sur-stimulation des récepteurs cholinergiques. La transmission du signal nerveux s'en trouve perturbée menant à la mort de l'insecte (5,155).

1.3.3. Utilisation et devenir des organophosphorés dans l'environnement

Les pesticides organophosphorés ont été très utilisés depuis les années 1950. Leur grande efficacité insecticide et leur dégradation rapide dans l'environnement les ont imposées comme une alternative aux organochlorés interdits du fait de leur persistance environnementale et de leurs propriétés de bio-accumulation. Les organophosphorés sont utilisés dans le milieu agricole et l'entretien des jardins des particuliers, mais également dans l'industrie pour le traitement des textiles et en additifs des plastiques, et comme anti-parasitaires pour les animaux d'élevages et domestiques. Certains organophosphorés (comme le malathion) sont également utilisés dans le traitement de la pédiculose humaine (shampoing anti-poux). Leurs utilisations sont de plus en plus restreintes, tant en usage agricole que domestique, du fait de l'introduction des pyréthrinoïdes.

Les organophosphorés sont peu rémanents, ils sont hydrolysés rapidement dans l'environnement et ont une demi-vie de quelques semaines à quelques mois dans l'eau et les sols. Ils sont modérément solubles dans l'eau, et de fait, l'exposition de la population par ces pesticides via l'eau de boisson est négligeable.

Ces pesticides sont peu volatils, avec une demi-vie de quelques jours à quelques mois dans l'air, mais ils font tout de même partie des pesticides les plus retrouvés dans l'air intérieur des logements franciliens (39% des logements) à des concentrations supérieures à celle de l'air extérieur selon une étude de 2005 (32). Les pesticides les plus détectés sont le diazinon, le dichlorvos, le malathion et le chlorpyrifos avec des fréquences de détection importantes dans l'air intérieur (jusqu'à 20 % pour le diazinon) (32). De nombreux pesticides de la famille sont également régulièrement détectés par les AASQA dans l'air extérieur à fortes concentrations (supérieures à 10ng/m^3) (chlorpyrifos, dichlorvos, malathion, phosmet, parathion-méthyl) (31).

Les composés organophosphorés sont également susceptibles de contaminer l'alimentation, notamment les fruits et légumes, les produits de la mer et les produits d'origine animale.

En 2015, l'EFSA a recherché les résidus d'organophosphorés dans les denrées alimentaires en Union Européenne. Le chlorpyrifos fait partie des pesticides les plus fréquemment retrouvés dans les fruits et légumes (4,1%) (35). Dans l'étude EAT2, le pyrimiphos-méthyl, le chlorpyrifos-méthyl et le chlorpyrifos-éthyl font partie des pesticides les plus fréquemment retrouvés dans les aliments (36). Le seul composé retrouvé à des concentrations dépassant la DJA dans l'étude EAT2 était également un organophosphoré: le diméthoate (fruits et légumes) (36). Les organophosphorés utilisés dans le stockage des céréales (pyrimiphos-méthyl et chlorpyrifos-méthyl) sont retrouvés respectivement dans 24% et 13% des échantillons de céréales en 2010 (156,157). Ils peuvent s'accumuler dans les graisses animales du fait de leur propriété lipophile, notamment dans les organismes aquatiques, mais l'étude EAT2 montre une présence faible des organophosphorés dans les denrées animales.

L'exposition aux organophosphorés de la population générale, s'effectue essentiellement par voie orale, via l'alimentation, l'inhalation de poussière contaminée par ces pesticides représente une contribution mineure à l'exposition. La voie cutanée est plus négligeable mais une absorption percutanée est possible en cas d'utilisation des organophosphorés dans la sphère domestique (insecticide ménager, produit antipoux, activité de jardinage).

1.3.4.Toxicocinétique

Les données *in vivo* montrent que les pesticides organophosphorés sont relativement bien absorbés quelle que soit la voie d'exposition même si l'absorption percutanée est plus faible que l'absorption gastro-intestinale. 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 (158). Ces pesticides sont rapidement métabolisés (mono-oxygénases et estérases, glutathione S-transferase) en des produits plus hydrosolubles éliminés dans les urines (159). La plupart des organophosphorés sont métabolisés en

dialkylphosphates (diméthylphosphate (DMP), diméthylthiophosphate (DMTP), diméthyldithiophosphate (DMDTP), diéthylphosphate (DEP), diéthylthiophosphate (DETP) et diéthyldithiophosphate (DEDTP)). La détoxication des organophosphorés soufrés (diazinon, fonofos, chlorpyrifos...) aboutit à la formation de dérivés oxons (160), qui peuvent être finalement transformés en dialkylphosphates.

1.3.5. Imprégnation de la population

Les organophosphorés et leurs métabolites (dialkylphosphates) sont majoritairement retrouvés dans les échantillons urinaires de la population (plus de 96% des prélèvements de l'étude ENNS (38) et 70% à 80% des échantillons de l'étude « Expope » (32)). Les concentrations urinaires retrouvées sont inférieures à celles des études allemandes (161) mais supérieures à celles des études américaines (162) et canadiennes (104). Les dialkylphosphates étant des métabolites communs à plusieurs organophosphorés, ils sont des marqueurs précoces d'une exposition aux organophosphorés mais il est difficile de déterminer le ou les composés à l'origine de l'imprégnation de la population de l'étude. L'étude EAT2 ayant mis en évidence la contamination majeure de l'alimentation par trois organophosphorés : le pyrimiphos-méthyl et le chlorpyrifos-méthyl et le diméthoate (36). Ces trois insecticides pourraient contribuer de façon importante aux niveaux d'imprégnations rapportés dans ENNS.

L'imprégnation des femmes enceintes aux organophosphorés 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 phoxime) et des métabolites (dialkylphosphates et chlorpyrifos-oxon) (163).

1.3.6.Toxicité

Les organophosphorés sont toxiques pour les insectes, les oiseaux, les amphibiens et les mammifères du fait de leurs actions sur l'acétylcholinestérase.

La toxicité des pesticides organophosphorés chez l'homme réside également essentiellement dans leur capacité à se lier au site catalytique de l'AChE (5). L'inhibition de l'enzyme, au niveau du système nerveux central et périphérique, cause une accumulation d'acétylcholine dans les synapses et donc une hyperstimulation des muscles et des nerfs des systèmes nerveux centraux, périphériques et végétatifs (5). Paradoxalement, certaines voies métaboliques vont transformer des organophosphorés en métabolites oxons (substitution de la fonction P=S par une fonction P=O), qui ont une affinité différente pour l'enzyme et peuvent être plus toxiques encore que la molécule mère (42,164). L'enzyme est également impliquée dans d'autres processus que la transmission de l'influx nerveux,

entre autre pendant les phases de développement du système nerveux, agissant sur la prolifération et l'apoptose des cellules nerveuses et la formation des synapses (165,166).

Les organophosphorés ont également été décrits comme pouvant interagir avec une autre enzyme du système nerveux: la NTE pour « neuropathy target esterase » (167). Cette inhibition peut être à l'origine d'effets neurotoxiques voire d'une dégénérescence neuronale (168,169). De manière générale, toutes les sérine-hydrolases peuvent être des cibles potentielles des organophosphorés (13). C'est le cas des butyrylcholinestérases, très sensibles aux organophosphorés et aux carboxylestérases (170) dont l'inhibition pourrait potentiellement avoir des effets sur la synthèse de testostérone et affecter les fonctions reproductives (171). De plus, l'atteinte des carboxylestérases cérébrales pourrait avoir des conséquences neurotoxiques. Ces pesticides peuvent également induire un stress oxydant et des dommages à l'ADN (acide désoxyribonucléique) à l'origine d'effets délétères pour les cellules (172).

L'intoxication aiguë aux organophosphorés est à l'origine de symptômes peu spécifiques (maux de tête, fatigue, vertiges) puis d'un syndrome cholinergique aigu chez l'homme (173). Ce syndrome est dû à une sur-stimulation des neurones cholinergiques et apparaît au-delà de 70% d'inhibition de l'AChE (174). Les symptômes apparaissent plus rapidement en cas d'intoxication par voie respiratoire que par voie orale, et l'apparition des symptômes est tardive par voie cutanée.

L'action stimulatrice rapide des organophosphorés sur les récepteurs nicotiniques des jonctions neuromusculaires, des ganglions autonomes et des glandes surrénales, va engendrer des signes comme des faiblesses musculaires, des fasciculations musculaires, des crampes, une paralysie, une tachycardie et une hypertension artérielle (173). Ces pesticides vont également agir sur les récepteurs muscariniques, du SNC, mais également du cœur, des glandes exocrines, des muscles lisses et des pupilles, et être à l'origine de sécrétions excessives (salive, larmes, transpiration), de dysfonctionnement des sphincters (miction, défécation), d'une abolition du réflexe pupillaire (myosis), de tremblements, de mouvements incoordonnés, de dysarthrie, de signes digestifs (douleurs gastriques, vomissements) et cardiovasculaires (bradycardie, hypotension) ainsi que de bronchospasme, d'apathie, de confusion et de dépression respiratoire pouvant mener au coma et à la mort (souvent par arrêt respiratoire) (173).

Les organophosphorés peuvent s'accumuler dans le tissu adipeux, et être relargués par la suite (158). Cette propriété de « libération prolongée » explique l'apparition de syndromes retardés par rapport à l'exposition. Jusqu'à 96 heures après exposition, un syndrome « intermédiaire » peut apparaître et durer plusieurs jours (175), avec une reprise des symptômes cholinergiques, des faiblesses et paralysies des muscles des membres, du cou et des muscles respiratoires, des manifestations extra-

pyramidales. Ces effets sont dus aux dysfonctionnements de transmissions neuromusculaire pré et post-synaptiques (173,176).

L'intoxication aiguë aux organophosphorés peut conduire à une « (poly) neuropathie retardée », qui peut apparaître jusqu'à quatre semaines après l'exposition et persister plusieurs mois voire années (169,177). Cette pathologie rare est due aux effets des pesticides sur les NTE et se caractérise par une dégénération des axones des systèmes nerveux centraux et périphériques, à l'origine de douleurs et faiblesses musculaires, d'engourdissements, de paresthésies, d'abolition des réflexes ostéotendineux et de paraplégies dans les cas sévères. Ces symptômes sont partiellement réversibles selon la sévérité de l'intoxication (177).

En dehors des effets toxiques d'une intoxication aiguë aux organophosphorés, l'exposition chronique à ces pesticides pourrait être à l'origine d'effets néfastes.

Une augmentation de la prévalence de symptômes neurologiques est largement retrouvée dans le cadre d'expositions professionnelles aux organophosphorés (178–184). Certaines études ont relié exposition à ces pesticides à des troubles de l'humeur (178,183,185,186), des troubles cognitifs et psychomoteurs (178,183,187–189) et sensitifs (190,191). Peu d'études établissent un lien entre exposition au organophosphorés et maladie d'Alzheimer (192) mais un risque accru de maladie de Parkinson a été suggéré dans plusieurs études (193,194), notamment avec le chlorpyrifos et le diazinon (195,196).

L'exposition aux organophosphorés et à leurs métabolites a été reliée à des troubles du développement de l'enfant (42), notamment à un plus petit poids de naissance (chlorpyrifos) (197) et à une augmentation de risque de malformations (hypospadias) (diméthoate, phorate) (198). L'exposition à ces pesticides serait également à l'origine d'atteintes du neuro-développement : troubles autistiques (chlorpyrifos), difficultés attentionnelles (chlorpyrifos, chlorpyrifos-méthyl) (199,200), troubles cognitifs, psychomoteurs et mnésiques (malathion, chlorpyrifos, parathion-méthyl) (201–205).

Les organophosphorés ont été reliés à certains cancers dans plusieurs études. Le dichlorvos, le tetrachlorvinphos et la parathion sont notamment classés en groupe 2B « possiblement cancérogène pour l'homme » et le diazinon et le malathion en groupe 2A « probablement cancérogène pour l'homme » par le CIRC (80). Un lien est retrouvé entre expositions professionnelles aux organophosphorés et lymphome non hodgkinien (terbufos, diazinon, malathion) (206–208), cancer de la prostate (fonofos, terbufos, malathion, phorate, coumaphos) (209–211), cancer du poumon (diazinon, chlorpyrifos, terbufos) (212–215), tumeur cérébrale (chlorpyrifos) (216), mélanome (parathion) (217) et leucémie (diazinon, fonofos, chlorpyrifos, terbufos) (213–215,218). Dans la

population générale, l'exposition aux organophosphorés augmenterait le risque de lymphome non hodgkinien (chlorpyrifos) (219), et de leucémie aiguë lymphoïde chez l'enfant (220).

L'exposition aux organophosphorés a été associée à des altérations des fonctions endocrines, notamment à des modulations des concentrations circulantes de FSH et LH (221), de testostérone (222), d'estradiol (223) et d'hormones thyroïdiennes (224). Certaines études mettent en évidence un lien entre expositions aux organophosphorés et baisse de la qualité du sperme, notamment pour le diazinon (225–227). Des études chez l'animal montrent des effets anti-androgèniques (chlorpyrifos-méthyl, dichlorvos, fénitrothion), avec des effets potentiels sur le développement des organes sexuels (124,228,229). De nombreux organophosphorés ont des effets estrogèniques (diazinon, chlorpyrifos, tolclofos-méthyl, prothiophos, EPN (O-éthyl-O-(4-nitrophényl)phénylphosphonothioate)) ou antiestrogéniques (fénitrothion) (124,230,231). L'acéphate et le méthamidophos altèrent la regulation et la libération d'hormones hypothalimiques chez le rat (232). Le diméthoate, le malathion et le chlorpyrifos altèrent les concentrations d'hormones thyroïdiennes circulantes (notamment T4), agissent sur la TSH (thyréostimuline) ou se lient à des protéines de fixation des hormones (transthyrétine), avec parfois des altérations histologiques de la thyroïde et des effets importants sur le poids du rongeur (233–235). Certains organophosphorés ont également des effets sur les concentrations plasmatiques de cortisol (chlorpyrifos) (235), d'insuline (diméthoate) (235), de LH (diméthoate) (235), sur la sécrétion de catécholamines (parathion-méthyl, malathion) (236), notamment sur les concentrations cérébrales de sérotonine (parathion) (237) et sur la synthèse de mélatonine (parathion) (237,238). Ces effets perturbateurs endocriniens peuvent avoir des conséquences sur le développement, notamment des organes sexuels, et sur la reproduction. A titre d'exemple, le parathion altère la différenciation cellulaire au niveau testiculaire (239).

2. Transport membranaire

2.1. Mécanismes de passage au travers des membranes

Les membranes cellulaires sont constituées de deux couches de lipides (cholestérol, phospholipides, sphingolipides…) dans lesquelles sont enchâssées des protéines (récepteurs, transporteurs, canaux, glycoprotéines...). Elles jouent un rôle majeur en filtrant l'entrée dans la cellule de molécules endogènes (sucres, vitamines, hormones, peptides...) ou exogènes (médicaments, polluants).

Plusieurs mécanismes permettent aux xénobiotiques de passer ces membranes. En fonction de leurs propriétés physico-chimiques, ils pourront traverser par diffusion passive, transport passif facilité ou par transport actif (Figure 3). D'autres modes de transport existent (transcytose, endocytose…) mais concernent essentiellement des macromolécules (immunoglobulines…) et ne seront pas développés dans cette section.

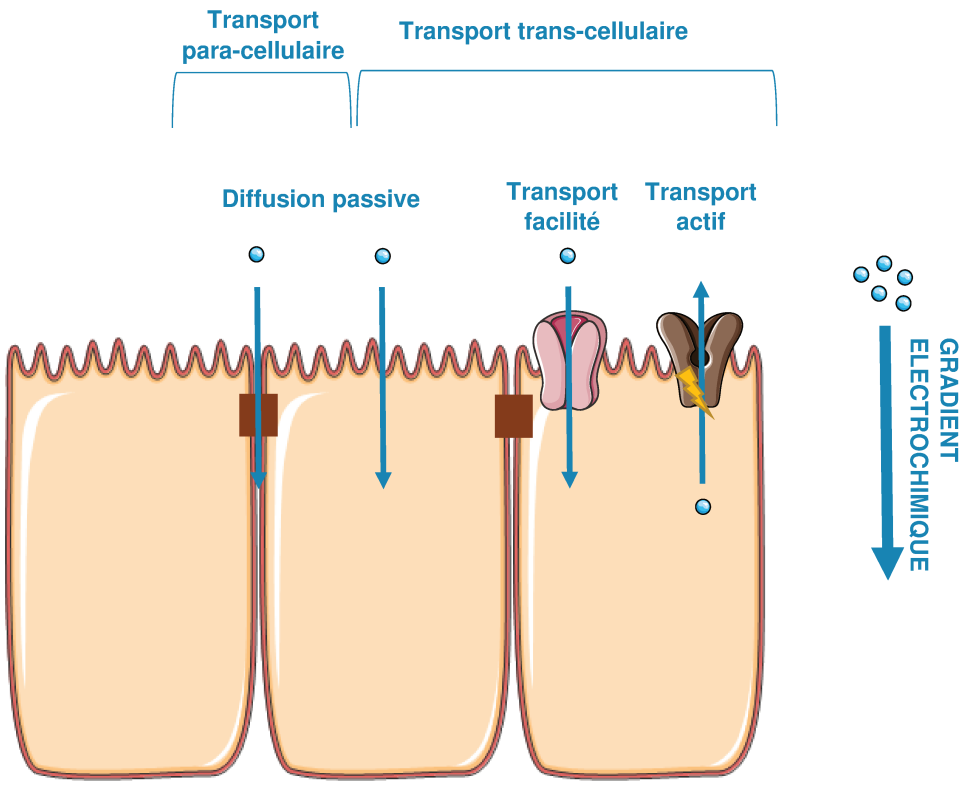


Figure 3: Représentation des différents modes de passage des membranes par les xénobiotiques

2.1.1. Diffusion passive

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, sans apport d'énergie (240). Le passage est influencé par la surface de diffusion et la composition lipidique de la membrane cellulaire (240). La diffusion est également fonction de la taille de la molécule, de sa polarité, de son état d'ionisation et de sa solubilité dans l'eau (eux-mêmes 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.

Les molécules incapables de diffuser passivement dans la membrane pourront la traverser grâce à des protéines de transport, via un mécanisme passif ou actif.

2.1.2. Transport passif facilité

La diffusion passive facilitée est un mode de passage des membranes qui permet le transport d'une molécule de façon spécifique, dans le sens du gradient de concentration, par le biais de protéines de transport (notamment de la famille des SLC (Solute Carrier transporters)). 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.

2.1.3. Transport actif

Les transporteurs actifs permettent également à certains xénobiotiques de traverser les membranes cellulaires (241). Ces protéines transmembranaires prennent en charge des xénobiotiques de façon sélective, et les transportent contre le gradient de concentration. Ces protéines, qui facilitent l'entrée de certaines molécules dans la cellule (transport d'influx ou uptake) ou au contraire s'opposent à leur entrée (transport d'efflux), appartiennent à la famille des transporteurs ABC (ATP-Binding Cassette transporters) et SLC (242). Les transporteurs actifs peuvent générer l'énergie nécessaire à la translocation du substrat de l'hydrolyse de nucléotides ou bien tirer partie du gradient électrochimique généré par le transport d'un autre soluté par une autre protéine de transport (transport actif secondaire ou tertiaire).

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 (Km) constituent les facteurs limitant la vitesse de pénétration cellulaire (Vmax) et la quantité de xénobiotiques transportés (phénomène de saturation) (243).

En fonction de leurs propriétés physico-chimiques et de leurs concentrations locales, 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.

2.2. Les transporteurs membranaires

2.2.1. Généralités

Les transporteurs membranaires sont des protéines intégrales enchâssées dans la membrane des cellules et de certains organites. Ces protéines sont particulièrement exprimées au niveau des cellules intestinales, hépatiques, rénales et au niveau de nombreuses interfaces hémato-tissulaires (242). Elles contrôlent l'entrée (influx) et la sortie (efflux) de molécules endogènes (glucides, peptides, lipides, vitamines, hormones…) indispensables pour maintenir l'homéostasie et l'équilibre hormonal nécessaires à la survie de la cellule. Les transporteurs permettent également à des composés exogènes (médicaments, polluants environnementaux…) de traverser les membranes biologiques (242). Ce sont, de ce fait, des effecteurs pharmacocinétiques majeurs qui contrôlent les phases d'absorption, de distribution et d'élimination de nombreux médicaments et donc conditionnent leur efficacité thérapeutique (242). Ces transporteurs protègent les cellules des xénobiotiques potentiellement toxiques en restreignant leur absorption et facilitant leur élimination.

L'activité de ces transporteurs peut être inhibée par certains composés de manière compétitive, non compétitive ou mixte. Certaines molécules sont également susceptibles de moduler l'expression de ces protéines en interagissant notamment avec des récepteurs nucléaires (pregnane X receptor (PXR), constitutive androstane receptor (CAR), peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR-α), liver X receptor (LXR), farnesoid X receptor (FXR)) qui interagissent avec des régions régulatrices de gènes de transporteurs (244). Les transporteurs d'uptake, notamment les OATPs (organic anion-transporting polypeptide), contrôlent l'accès de certains xénobiotiques à ces sites nucléaires et donc à l'induction d'expression de certains transporteurs (245).

Il existe plus de 400 transporteurs d'influx et d'efflux répartis en deux superfamilles : la famille des transporteurs ABC et la famille des transporteurs Solute Carrier (SLC) (246,247).

Les transporteurs ABC sont des transporteurs actifs qui possèdent un ou plusieurs domaines de liaison à l'ATP (adénosine triphosphate) dont l'hydrolyse permet l'efflux du substrat contre le gradient éléctrochimique. Les transporteurs SLC peuvent transporter un substrat dans le sens du gradient éléctrochimique ou tirer leur énergie d'un gradient créé par une autre protéine membranaire. Nous nous intéresserons plus particulièrement aux transporteurs de xénobiotiques.

2.2.2. La famille des transporteurs ABC

La famille des transporteurs ABC a été décrite pour la première fois en 1986 (248) et représente aujourd'hui une grande famille de protéines comprenant 48 membres (249). Ces protéines sont largement conservées au cours de l'évolution et sont présentes chez toutes les espèces, de la bactérie aux espèces animales et végétales, pour leur fonction de détoxification des organismes (250). La famille des transporteurs ABC compte des transporteurs d'efflux ATP-dépendant prenant en charge de nombreux substrats et permettent leurs expulsions de la cellule contre le gradient de concentration.

2.2.2.1. Nomenclature

Les 48 membres de la famille des transporteurs ABC ont pu être classés en sept sous-familles (de A à G) en fonction de leurs homologies structurales (similarité en acides aminés) selon la nomenclature HUGO (HUman Genome Organisation) (246). Parmi ceux-ci, les transporteurs ABC impliqués dans l'efflux des xénobiotiques, appartiennent aux sous-familles B, C et G (Tableau 2) : les plus importants sont la P-glycoprotéine (P-gp), BCRP (Breast Cancer Resistance Protein), et les MRPs (Multidrug Resistance associated Proteins).

	Famille de transporteur	Membre	Gène
SUPERFAMILLE DES ABC TRANSPORTEURS	ABCB	P-gp	MDR1/ABCB1
	ABCC	MRP1	ABCC1
		MRP2	ABCC2
		MRP3	ABCC3
		MRP4	ABCC4
		MRP5	ABCC5
		MRP6	ABCC6
		MRP7	ABCC10
		MRP8	ABCC11
		MRP9	ABCC12
	ABCG	BCRP	ABCG2

Tableau 2: Classification des principaux transporteurs ABC de médicaments

2.2.2.2. Structure des transporteurs ABC

On dispose aujourd'hui de données de cristallographie et de microscopie de certains transporteurs ABC (P-gp murine (251), MRP1 et BCRP humains (252,253)) qui ont permis de mieux comprendre la structure de ces protéines. Les transporteurs ABC sont constitués de domaines transmembranaires (TMD) hydrophobes formant le ou les site(s) de reconnaissance du substrat et de domaines cytoplasmiques hydrophiles (les NBD (nucleotide binding domain)), impliqués dans la liaison et l'hydrolyse de l'ATP, source d'énergie du transport (Figure 4) (254). Les domaines transmembranaires sont variables selon les transporteurs, alors que le domaine NBD intracellulaire est généralement très conservé pour toute la famille et est essentiel à la fonction du transporteur. Il contient trois motifs caractéristiques : les motifs Walker A et B communs à toutes les protéines fixant des nucléotides triphosphates (255) et la séquence signature C spécifique à la famille des ABC (256). Ces trois motifs sont importants pour la liaison et l'hydrolyse de l'ATP. Certains ABC présentent des sites de N-glycosylations et de phosphorylations qui auraient un rôle dans l'adressage du transporteur à la membrane et sa fonctionnalité (257,258).

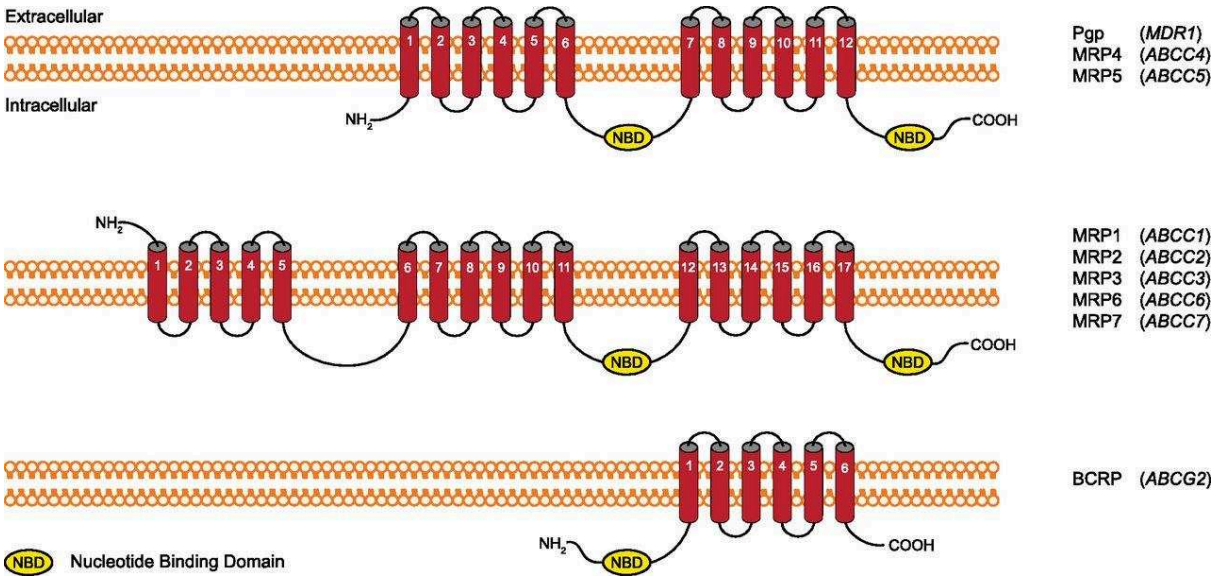


Figure 4: Structures des transporteurs ABC, d'après Walsh et al, 2015 (259)

La P-gp est constituée de deux domaines comprenant chacun six segments transmembranaires et un site de fixation au nucléotide (NBD) cytoplasmique (Figure 4, Figure 5) (254).

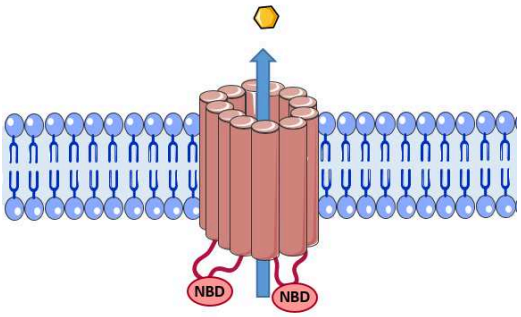


Figure 5: Représentation des TMDs et NBDs de la P-gp

Les transporteurs MRPs possèdent deux sites de liaisons au nucléotide (NBD) cytoplasmiques et selon l'isoforme deux ou trois domaines transmembranaires (254). Certains MRPs (MRP4, MRP5) partageraient ainsi la même structure que la P-gp (deux TMD) alors que d'autres (MRP1-3, MRP6-7) contiennent un domaine transmembranaire supplémentaire (254).

BCRP est considérée comme un demi-transporteur, et ne contient que six segments transmembranaires et un domaine de liaison au nucléotide (254). Son organisation est inversée par rapport à la structure des autres familles d'ABC, avec un domaine NBD N-terminal et un TMD en C-terminal (254).

2.2.2.3. Importance clinique

Les transporteurs ABC prennent en charge une grande variété de composés comprenant des ions, glucides, lipides, vitamines et permettent, par exemple, l'expulsion des porphyrines des cellules hématopoïétiques et la sécrétion de vitamines dans le lait maternel (260,261). Ils ont également une fonction de détoxification en excluant de la cellule des molécules potentiellement toxiques (polluants, médicaments) limitant leurs absorptions intestinales et facilitant leurs excrétions urinaires et biliaires. Ils ont donc un rôle central dans l'absorption, la distribution et l'élimination *in vivo* et peuvent réduire drastiquement l'absorption intestinale et donc la biodisponibilité de certains médicaments et polluants. Ces pompes d'efflux sont également impliquées dans de nombreux phénomènes de résistance aux médicaments anti-infectieux et anticancéreux (262) et dans des interactions médicamenteuses. Leur dysfonctionnement est à l'origine d'un certain nombre de pathologies comme la mucoviscidose (CFTR/ABCC7) (263), la maladie de Tangier (ABCA1) (264) ou le syndrome de Dubin-Johnson (MRP2/ABCC2) (265).

2.2.2.4. La P-glycoprotéine

La P-glycoprotéine (P-gp) est le transporteur le plus étudié de la superfamille des ABC de par son implication dans le phénotype de résistance de lignées cellulaires à certains médicaments (266). Il s'agit d'un transporteur actif qui permet le relargage du substrat à l'extérieur de la cellule contre le gradient de concentration.

2.2.2.4.1. Mécanisme de transport

La poche de liaison au substrat (251,267,268) de P-gp est localisée au niveau d'un pore de 50Å de diamètre formé par les hélices transmembranaires des deux domaines du transporteur. Cette poche de liaison est accessible depuis le milieu extracellulaire mais aussi depuis la phase lipidique à l'interface entre les deux TMD (269). Les substrats de la P-gp étant hydrophobes ou amphiphiles, ils sont susceptibles de diffuser passivement à travers la membrane et de s'y accumuler à fortes

concentrations (270). Ils auraient ainsi accès au site de liaison, situé au niveau du feuillet interne de la membrane, à partir de « portes » formées entre les hélices transmembranaires 5/8 et 2/11 (271).

Des interactions de type hydrophobes, aromatiques, et de van der Waals induiraient des modifications conformationnelles du site de liaison qui se déformeraient de façon spécifique pour accueillir différents substrats de structure diverse (induced-fiting) (271) et entraineraient des modifications conformationnelles des deux NBD rendant possible l'hydrolyse de l'ATP (272). On dénombre au moins deux sites de fixation au substrat au sein de la protéine : le site H qui lie le Hoechst 33342 et le site R qui permet le transport de la rhodamine 123 (273–275). Les deux sites sont susceptibles d'interagir entre eux de façon allostérique (274,276) ; deux molécules peuvent se lier simultanément à la protéine, la fixation d'un substrat sur un site module le transport médié par l'autre site (277). Par contre, deux molécules interagissant toutes les deux avec le même site (H ou R) vont bloquer leur transport mutuel. D'autres sites ont été définis (site-M, site-D, site-P) selon leurs interactions avec le vérapamil, la digoxine et la prazosine/progestérone (276).

Des études de mutagénèse ont montré que la mutation de certains acides aminés situés au niveau des domaines transmembranaires pouvait moduler la spécificité de substrat de la P-gp, (278–281) et semblent importants pour la reconnaissance du substrat, la liaison et son transport.
Deux hypothèses concernant le mécanisme de transport de la P-gp ont été avancées (Figure 6). Le mécanisme de « vaccum cleaner » suggère que la P-gp agirait comme un aspirateur. Les substrats hydrophobes ayant diffusé dans la membrane seraient transférés au niveau du feuillet interne de la membrane, entrainés jusqu'à la grande poche de liaison flexible et efflués sans même atteindre le cytosol (282). Le mécanisme de « flippase » propose que les substrats soient interceptés au niveau du feuillet interne de la membrane et transférés par la protéine au feuillet externe puis relargués dans le milieu extracellulaire (283,284).

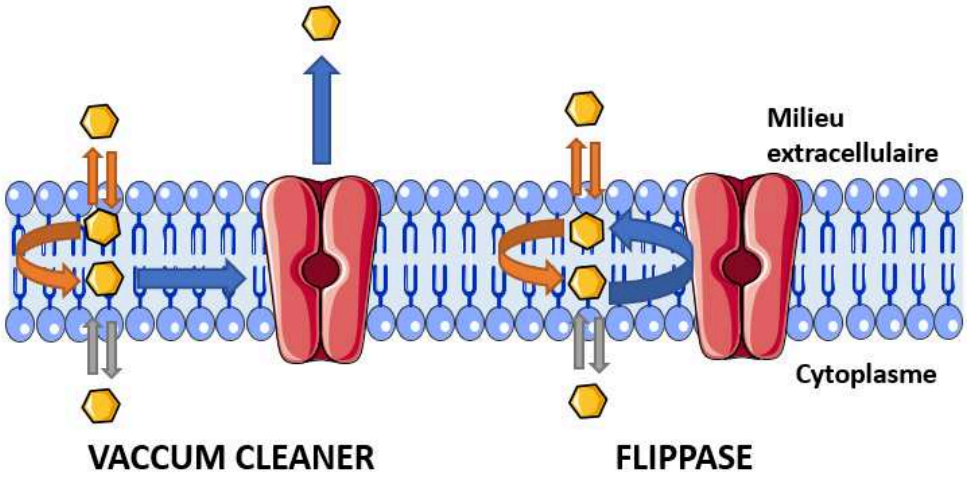


Figure 6: Mécanismes « vacuum cleaner » ou « flippase » de la P-glycoprotéine

La translocation du substrat nécessite un apport d'énergie générée par l'hydrolyse de nucléotide (ATP, cytidine triphosphate (CTP) ou guanosine triphosphate (GTP)) en présence d'un cation divalent (Mg^{2+}). Deux molécules d'ATP peuvent se lier dans des cavités distinctes formées par le motif Walker A d'un NBD et la séquence signature du NBD opposé; deux molécules d'ATP sont ainsi prises en sandwich entre les deux NBD (285) (Figure 7). Il y a une coopérativité étroite entre les deux sites catalytiques qui doivent être tous deux fonctionnels pour permettre l'hydrolyse de l'ATP (286). Le cycle d'hydrolyse de l'ATP nécessite la dimérisation des NBD et plusieurs modèles ont été proposés pour le cycle catalytique (modèle "alternating site" (287), modèle "switch" (288), et modèle "constant contact" (289,290)).

L'étape spécifique du cycle catalytique qui fournit l'énergie permettant la translocation du substrat fait toujours l'objet de débats (liaison de l'ATP, dimérisation des deux NBD, hydrolyse d'une ou de deux molécules d'ATP, relaxation du dimère de NBD, libération de l'ADP (adénosine diphosphate) et de phosphate inorganique (Pi)). L'énergie libérée induirait des changements de conformation des NBD, transmis aux TMD et à la poche de liaison du substrat. Ces modifications conformationnelles induiraient une baisse de l'affinité de la P-gp pour son substrat permettant son expulsion dans le milieu extracellulaire (291).

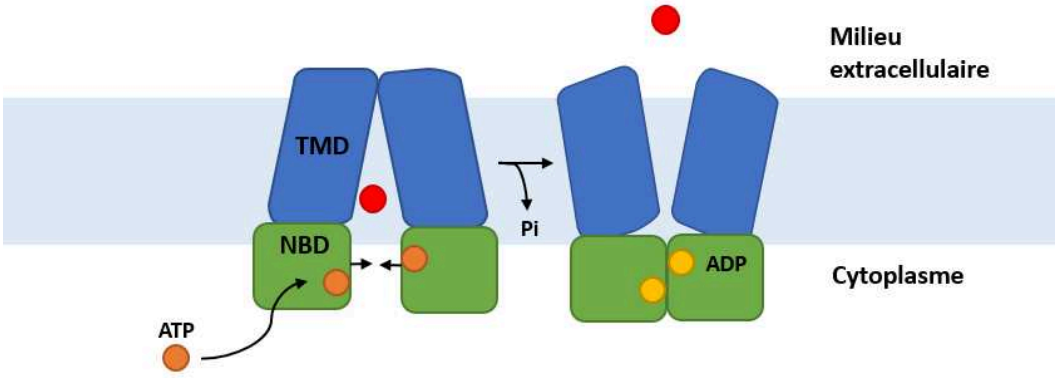


Figure 7: Mécanisme général de l'efflux médié par P-gp

Au final, le transport de substrat médié par P-gp semble être un mécanisme concerté plutôt qu'un enchaînement de différentes phases.

2.2.2.4.2. Substrats

La P-gp a la particularité de transporter des centaines de substrats de structures très diverses. Ils sont généralement peu polaires, neutres ou chargés positivement, hydrophobes ou amphiphiles, même si certains sont hydrophiles (colchicine). Les substrats de la P-gp peuvent être de grandes molécules comme le paclitaxel ou la ciclosporine A ou des molécules de plus petites tailles comme la doxorubicine. La P-gp interagit également avec des peptides linéaires et cycliques (valinomycine). La plupart des substrats contiennent des cycles aromatiques plans, et des atomes d'azotes tertiaires chargés positivement. Les substrats endogènes de P-gp peuvent être des peptides, des lipides, des hormones stéroïdiennes ou des cytokines (interleukine-2, interleukine-4, interféron-ɣ) et les substrats exogènes incluent des médicaments (anticancéreux, inhibiteurs de protéases, analgésiques, inhibiteurs calciques, anti-infectieux, antagonistes des récepteurs H2) dont certains à fenêtre thérapeutique étroite comme les glycosides cardiaques ou les immunosuppresseurs (Tableau 3).

Les modulateurs susceptibles d'inhiber ou stimuler la pompe d'efflux sont de structures aussi variées que les substrats de la P-gp. Certains modulateurs sont transportés par la P-gp (vérapamil, ciclosporine A…), d'autres semblent interagir de façon allostérique avec les différents sites de liaison (Tableau 3). Etant donné que la poche de liaison au substrat de la P-gp contient de multiples sites de liaison, l'inhibition du transport par un composé est substrat dépendant.

Substrats de référence	Rhodamine 123 Tétraméthylrosamine Hoechst 33342
Substrats endogènes	*Hormones stéroïdiennes:* dexaméthasone, aldostérone *Cytokines :* interleurkine-2, interleukine-4, interféron- γ
Substrats exogènes	*Anticancéreux :* doxorubicine, daunorubicine, vincristine, vinblastine, etoposide, teniposide, paclitaxel, docétaxel, mitoxantrone *Inhibiteurs de tyrosine-kinases:* imatinib, nilotinib, dasatinib *Immunosuppresseurs:* ciclosporine A *Glycosides cardiaques:* digoxine *Antiinfectieux:* érythromycine, saquinavir, indinavir, ritonavir, ivermectine, itraconazole *β-bloquant:* talinolol, celiprolol *Statines:* atorvastatine, simvastatine
Modulateurs	*Inhibiteurs calciques :* vérapamil, nifédipine *Inhibiteurs de phosphodiesterase 5* : sildenafil, vardenafil *Produits naturels* : flavonoïdes, curcuminoïdes Ciclosporine A Chlorpromazine Quinidine

Tableau 3: Exemples de substrats et modulateurs de la P-glycoprotéine

2.2.2.4.3. Distribution tissulaire

La P-gp est présente dans la plupart des tissus de l'organisme mais est fortement exprimée au pôle apical des cellules épithéliales ayant des rôles d'excrétion, au niveau du colon, de l'intestin grêle, des canaux pancréatiques et biliaires, du tubule proximal rénal et de la glande surrénale (292). La P-gp limite ainsi l'accès des xénobiotiques présents dans la lumière intestinale à la circulation sanguine, notamment des médicaments. Pour autant, tous les substrats de P-gp ne présentent pas forcément une faible absorption ; la P-gp peut, en effet, être saturée à fortes concentrations et ne pas influer l'absorption intestinale de ses substrats, d'autant plus s'ils diffusent rapidement à travers la membrane (vérapamil).

La P-gp permet également d'excréter les métabolites et les molécules mères de nombreux composés dans la bile, l'urine et transporte les hormones de la glande surrénale et de l'épithélium utérin (292).

Le transporteur est également localisé au niveau des cellules barrières de l'organisme : cellules endothéliales de la barrière hémato-encéphalique (BHE) , de la barrière testiculaire, materno-foetale et est présente au niveau des cellules endothéliales cochléaires et vestibulaires de l'oreille interne (293). Le transporteur protège ainsi les tissus sensibles des toxiques ayant eu accès à la circulation sanguine. La présence de P-gp au niveau de la barrière hémato-encéphalique réduit par exemple considérablement l'entrée et l'accumulation des xénobiotiques (médicament, polluants) au niveau du SNC.

D'autre part, de nombreux substrats de P-gp sont également pris en charge par les cytochromes P450 et de nombreux inducteurs de P-gp induisent également les cytochromes P450 (via PXR) (294). Une inhibition intestinale de la P-gp induira souvent une hausse du métabolisme médié par le CYP3A4 (cytochrome P450 3A4) et il en sera de même au niveau hépatique. La régulation coordonnée des enzymes métaboliques et de P-gp doit permettre de protéger les entérocytes et les hépatocytes de l'accumulation intracellulaire de toxiques.

La P-gp est un transporteur très important d'un point de vue clinique et est à l'origine de certaines intéractions médicamenteuses (295,296).

2.2.2.5. La famille des MRPs

La sous-famille des transporteurs ABCC/MRPs comprend douze membres : neuf MRPs, un canal ionique (CFTR) et deux récepteurs (SUR1-2) (297). Quatre des neuf gènes des MRPs sont localisés sur un chromosome de façon adjacente suggérant une évolution commune par duplication (298). MRP1 et MRP3 partagent 57% d'identité en acides aminés et sont les transporteurs les plus proches de la famille (uniprot id : P33527 et O15438). Les familles ABCB et ABCC sont très distantes l'une de l'autre

en termes de séquence en acides aminés et de spécificité de substrats. Pour exemple, l'identité de séquence de MRP1 avec la P-gp est seulement de 25% (uniprot id : P33527 et P08183).

Les MRPs possédant des structures diverses, ces transporteurs diffèrent considérablement en termes de spécificité de substrats, distribution tissulaire et localisation membranaire sur les cellules polarisées. La plupart des membres de la famille des ABCCs sont impliqués dans des phénomènes de résistance à des anticancéreux et antiviraux.

2.2.2.5.1. Mécanisme de transport

Les MRPs transportent de façon unidirectionnelle de nombreux substrats notamment conjugués, mais leurs mécanismes de transport sont mal compris et différent selon les isoformes. Les MRPs contiendraient plusieurs sites de fixation aux substrats. Un site modulateur a été mis en évidence pour MRP2 par la stimulation du transport de saquinavir par le sulfanitran (299) et le glutathion module l'activité de plusieurs MRPS. Le rôle du glutathion dans le transport médié par les MRPs est mal défini ; il peut être un substrat de certains MRPs (MRP4-5), il peut être co-transporté (MRP1, MRP4) et peut stimuler l'activité des MRPs (MRP1) (300–302).

2.2.2.5.2. Substrats

Les transporteurs MRPs prennent en charge des substrats variés, majoritairement des anions organiques hydrophobes ou amphiphiles, conjugués ou non (glutathion, glucuronate, sulfate) (Tableau 4) (303). Ils possèdent des spectres de substrats se chevauchant et permettent la sécrétion biliaire et l'élimination rénale de nombreux composés.

Les substrats endogènes des MRPs incluent les sels biliaires (cholylglycine, cholyltaurine) en permettant notamment leur efflux dans le sang à travers la membrane de l'hépatocyte, mais également la bilirubine conjuguée. MRP2 est essentiel pour l'efflux de la bilirubine conjuguée, son défaut d'expression à la membrane canaliculaire des hépatocytes peut causer une hyperbilirubinémie (304). Certains MRPs prennent également en charge des leucotriènes, des prostaglandines et des vitamines (folates). Le glutathion est transporté par MRP1-2, MRP4-5 (305). Les MRPs interviennent dans l'efflux du glutathion oxydé (GSSG) suggérant leur rôle dans la lutte contre le stress oxydant. Certains MRPs (MRP4, MRP5) sont capables de prendre en charge des composés monophosphorylés AMPc (adénosine monophosphate cyclique), GMPc (guanosine monophosphate cyclique) et joueraient un rôle important dans la régulation des concentrations tissulaires de GMPc et plaquettaire d'ADP. MRP4 a également un rôle dans l'excrétion de l'urate et de la PAH (acide para-aminohippurique) dans l'urine. Les MRPs prennent aussi en charge de nombreux médicaments anticancéreux, antiviraux et des contaminants environnementaux comme l'ochratoxine A transportée par MRP2.

Substrats de référence	Substrats endogènes	Substrats exogènes	Modulateurs
Carboxy-2',7'-dichlorofluorescein (MRP1-3) Cholécystokinine octapeptide (CCK8) (MRP2) Fluorescéine (MRP1) PAH (MRP2, MRP4)	AMPc, GMPc (MRP4-5, MRP8) Bilirubine glucuronide (MRP1-3) Cobalamine (MRP1) Estrone-3-sulfate (MRP2, MRP8) Folates (MRP1,MRP4-5) Glutathion (MRP1-2, MRP4) GSSG (MRP1-2) Leucotriène B_4 (MRP4) Leucotriène C_4 (MRP1-4, MRP6-8) Prostaglandines E1 (PGE_1) (MRP4) Prostaglandines E2 (PGE_2) (MRP4) Sels biliaires (MRP3-4, MRP8) Stéroïdes sulfatés (MRP1-4, MRP8) Thromboxane B_2 (MRP4) Urate (MRP4)	Cisplatine (MRP2) Doxorubicine (MRP1, MRP6) Féxofénadine (MRP2-3) Furosémide (MRP4) Melphalan (MRP1) Méthotrexate (MRP1-4, MRP8) Ochratoxine A (MRP2) Rifampicine (MRP2) Statines (MRP2, MRP4)	Ciclosporine (MRP1) Etoposide (MRP3) Indométhacine (MRP1, MRP6) Probénécide (MRP1-6)

Tableau 4: Exemples de substrats et modulateurs des transporteurs MRPs

2.2.2.5.3. Distribution tissulaire

Les MRPs sont fortement exprimés au niveau de tissus richement vascularisés qui forment des sanctuaires pharmacologiques notamment le foie, le rein, la BHE ou la barrière testiculaire et materno-fœtale (306–309). Les transporteurs MRPs sont nécessaires à l'excrétion terminale et la détoxification des anions organiques notamment au niveau hépatique, intestinal et rénal (306,307) (Tableau 5).

Au niveau intestinal, les MRPs sont exprimés au niveau de l'intestin grêle et du colon (MRP1-3, MRP5) (310). Ces transporteurs sont aussi localisés au niveau basolatéral et canaliculaire des hépatocytes (MRP1-4,6) (311–314) et des cellules de la vésicule biliaire (MRP2-3) et pancréatiques (MRP1,MRP3-4) (315–317). Ils ont un rôle majeur dans l'efflux biliaire d'anions organiques et sont importants dans le transport de la bilirubine (MRP2-3) et des sels biliaires (MRP2 (313,318). MRP1, MRP3 et MRP5 ont un rôle important dans la protection du foie et participeraient à la réponse à des lésions hépatiques notamment à la cholestase.

Les MRPs sont également exprimés au niveau de l'anse de Henlé et du tubule proximal du rein (principalement MRP2 et MRP4) et au niveau des conduits urinaires et prostatiques (MRP4-5) et de la glande surrénale (MRP3-4) (319–324). Cette localisation rénale leur confère un rôle dans l'excrétion des anions organiques dans l'urine, notamment de l'urate et de la PAH (325,326).

Au niveau du SNC, MRP1, MRP4-5 et MRP8 sont présents dans le parenchyme cérébral (astrocytes et neurones) et au niveau des capillaires cérébraux de la BHE et de la barrière sang-LCR (Liquide Céphalo-Rachidien) (MRP1, MRP4-5) leur conférant un rôle important dans la protection du SNC (327,328).

MRP1 et MRP2 sont présents dans l'épithélium bronchique et MRP4 est aussi présent au niveau des érythrocytes et des plaquettes, dans lesquelles il régule le stock d'ADP (329). MRP5 est aussi détecté dans des cellules musculaires lisses, dans les myocytes et cellules endothéliales du cœur (330).

Certains MRPs sont également exprimés au niveau du syncytiotrophoblaste du placenta et autour des vaisseaux fœtaux comme MRP1, MRP2, MRP3 et MRP5 (309,331,332), et ce dernier pourrait jouer un rôle dans le développement du placenta (333). MRP1 et MRP4 sont présents au niveau des cellules de Sertoli de la barrière testiculaire et limiteraient l'accès des xénobiotiques aux tubules séminifères (308).

En termes de localisation, les transporteurs MRP1-5 ont une distribution tissulaire plus large que MRP6 et MRP8. De plus, MRP1, MRP3 et MRP6 sont exprimés au niveau basolatéral des cellules polarisées contrairement à MRP2 et MRP8 présents au niveau apical (309,311,312,327,334). MRP4 et MRP5 peuvent être exprimés aussi bien au niveau du pôle apical que basolatéral en fonction du tissu et du type de cellules (320,333,335). La distribution et localisation d'MRP1 sont pratiquement inverses de MRP2, MRP1 jouerait de ce fait un rôle important pour les cellules n'exprimant pas MRP2.

MRPs	Foie	Rein	Intestin	Poumon	Cerveau	Placenta	Autres tissus
MRP1 (BL)	+	**+**	+	+	+	+	Macrophages, testicules
MRP2 (A)	+	**+**	+	+		+	
MRP3 (BL)	+		+			+	Pancréas
MRP4 (A/BL)	+	**+**			+		Pancréas, prostate, vésicule séminale, uretère, muscles lisses, cellules sanguines, testicules
MRP5 (A/BL)	+		**+**		+	+	Coeur, muscles lisses, urètres
MRP6 (BL)	+	+					
MRP8 (A)					+		Tissu mammaire

Tableau 5: Distribution tissulaire des transporteurs MRPs

2.2.2.6. La BCRP

BCRP est le second membre de la sous-famille G des transporteurs ABC, et a été identifié pour la première fois dans des lignées cellulaires mammaires résistantes aux anticancéreux (336). La famille ABCG compte six transporteurs, impliqués dans le transport de cholestérol, de stérols et dont certains nécessitent une dimérisation pour transporter leur substrat (249,337). C'est le cas de BCRP qui fonctionne sous forme d'homodimères ou de multimères (tétramères, dodécamères) (338). Les analyses phylogénétiques des séquences en acides aminés indiquent que BCRP est relativement proche de la P-gp (339). BCRP est impliqué dans la résistance à certains agents anticancéreux comme la mitoxantrone, le topotecan ou la doxorubicine.

2.2.2.6.1. Mécanisme de transport

BCRP est considéré comme un «demi-transporteur» et doit s'homodimériser pour fonctionner en formant des ponts disulfures (338,340). Une boucle extracellulaire entre les hélices transmembranaires 5-6 contenant des résidus cystéines est importante pour la dimérisation de BCRP, son insertion à la membrane et sa spécificité de substrats (340,341). Peu de choses sont connues sur les mécanismes de liaison au substrat et son transport. Les données suggèrent que comme pour la P-gp, les substrats se lient à une large cavité centrale plutôt qu'une conformation clé-serrure et que la cavité contient plusieurs sites de fixation aux substrats (au moins deux) (342).

2.2.2.6.2. Substrats

La spécificité de substrat de BCRP est comparable à celle de la P-gp. BCRP transporte certains stéroïdes endogènes, conjugués du 17-β-estradiol et de l'estrone, DHEAS (déhydroépiandrostérone sulfate) (343–345) (Tableau 6). Les substrats de BCRP comprennent également des médicaments (agents anticancéreux, antibiotiques, certains antiviraux et des inhibiteurs de l'HMG-CoA reductase), des composés issus de l'alimentation (flavonoïdes, pheophorbide) et des toxiques (346).

Le premier inhibiteur décrit de BCRP fut la FTC (Fumitremorgin C) (347) ; de nombreux inhibiteurs de BCRP ont été identifiés par la suite (tamoxifène, inhibiteurs de tyrosine-kinase, des flavonoïdes, glucocorticoïdes, dihydropyridines et pyridines antihypertensives, benzimidazoles), dont certains sont égalements inhibiteurs de P-gp (Tableau 6).

Substrats de référence	Rhodamine 123, hoechst 33342
Substrats endogènes	Estradiol-17-β, hormones stéroïdiennes, acide folique, β-amyloïde, porphyrines
Substrats exogènes	*Anticancéreux :* mitoxantrone, topotecan, daunorubicine, doxorubicine, etoposide, methotrexate *Inhibiteurs de tyrosine-kinase :* imatinib, gefitinib, dasatinib *Anti-infectieux :* zidovudine, lamivudine, aciclovir, érythromycine, ciprofloxacine, ofloxacine, norfloxacine, rifampicine, nitrofurantoïne *Statines :* rosuvastatine *Autres:* Aflatoxine B1, flavonoïdes, ochratoxine A, phéophorbide, sildenafil
Modulateurs	FTC, Ko143 *Stéroïdes:* corticostérone, beclométhasone, dexaméthasone *Anti-infectieux :* ritonavir, saquinavir, itraconazole, ketoconazole *Immunosuppresseurs* : tacrolimus, ciclosporine A *Inhibiteurs de tyrosine kinase :* gefitinib, imatinib, erlotinib, dasatinib *Inhibiteurs de pompe à protons :* pantoprazole, omeprazole *Inhibiteurs de phosphodiestérases :* sildenafil Curcumine, flavonoïdes

Tableau 6: Exemples de substrats et modulateurs de BCRP

2.2.2.6.3. Distribution tissulaire

BCRP est exprimé à haut niveau à la surface de la membrane apicale des cellules de l'intestin grêle et du colon, des hépatocytes et canaux biliaires, ce qui implique un rôle important dans l'absorption intestinale et dans l'efflux de substrat (notamment des métabolites) du foie vers la bile et la lumière intestinale (348,349).

BCRP est également localisé au niveau de nombreuses barrières de l'organisme et permet la protection des cellules contre les xénobiotiques. Le transporteur serait présent à la surface luminale de l'endothélium vasculaire cérébral (expression à plus haut niveau que la P-gp (350)) et permettrait d'effluer les composés hors de l'interstitium cérébral (351). BCRP est aussi très fortement exprimé au niveau du placenta (syncitiotrophoblaste) (352) et permettrait de transporter les hormones stéroïdiennes produites par le placenta (estrone-3-sulfate et DHEAS) (345) et de protéger le fœtus des toxiques endogènes et exogènes présents dans la circulation maternelle (353).

BCRP est fortement exprimé dans le tissu mammaire pendant les périodes d'allaitement (354). BCRP participe ainsi à la sécrétion de vitamines dans le lait maternel, mais de façon surprenante permettrait également de concentrer certains toxiques en les excrétant dans le lait maternel (260,354).
Présent au niveau des cellules du testicule (348,355), BCRP aurait un rôle dans la spermatogénèse (356) et permettrait de protéger les cellules germinales des toxiques présents dans la circulation générale (351).

BCRP est aussi suspecté d'avoir un rôle protecteur de cellules souches (hématopoïétiques et embryonnaires) et participe à l'expulsion des porphyrines des cellules hématopoïétiques (261,352).

BCRP est également exprimé à plus bas niveau dans le rein, la prostate, l'ovaire, la glande surrénale, l'utérus, l'endothélium vasculaire, les pneumocytes et les glandes sébacées (348,357).

2.2.3. La famille des transporteurs SLC

2.2.3.1. Nomenclature

Les transporteurs Solute Carrier (SLC) constituent une vaste famille de protéines membranaires qui comptent environ 400 membres (358). La famille est composée de transporteurs passifs facilités et de transporteurs actifs, qui sont essentiellement des pompes d'influx mais dont certains fonctionnent en efflux. Dans cette section, ne seront abordés que les SLC impliqués dans le transport des xénobiotiques. Il s'agit des transporteurs OCTs (organic cations transporters) et OATs (organic anion transporters) qui appartiennent à la famille SLC22A, des OATPs de la famille SLCO et des MATEs (multidrug and toxin extrusion transporteurs) de la famille SLC47A (242) (Tableau 7).

	Famille de transporteur	Membre	Gène
SUPERFAMILLE DES SLC TRANSPORTEURS	OCTs	OCT1	SLC22A1
		OCT2	SLC22A2
		OCT3	SLC22A3
	OATs	OAT1	SLC22A6
		OAT2	SLC22A7
		OAT3	SLC22A8
		OAT4	SLC22A11
	OATPs	OATP1B1	SLCO1B1
		OATP1A2	SLCO1A2
		OATP1B3	SLCO1B3
		OATP2B1	SLCO2B1
	MATEs	MATE1	SLC47A1
		MATE2	SLC47A2

Tableau 7: Classification des principaux transporteurs SLC de médicaments

2.2.3.2. Structure

La structure protéique des transporteurs SLC est variable d'une sous-famille à l'autre. Ces protéines comprennent douze ou treize domaines transmembranaires et une ou plusieurs boucles intra- et extracellulaires qui contiennent des sites de N-glycosylations, de phosphorylations et des résidus cystéines, essentiels pour l'adressage de la protéine à la membrane, sa fonctionnalité et sa spécificité de substrats (359–361).

Les transporteurs de la famille SLC22A (OCTs et OATs) et SLCO (OATPs) sont constitués de 12 domaines trans-membranaires avec C terminal et N terminal cytoplasmique (Figure 8), contrairement aux transporteurs MATEs qui possèderaient 13 segments transmembranaires et une extrémité N- terminal intracellulaire, et C-terminal extracellulaire (362). La 13ème hélice des MATEs ne serait pas essentielle à la fonctionnalité du transporteur mais son absence entraine une réduction de la vitesse du transport (362,363).

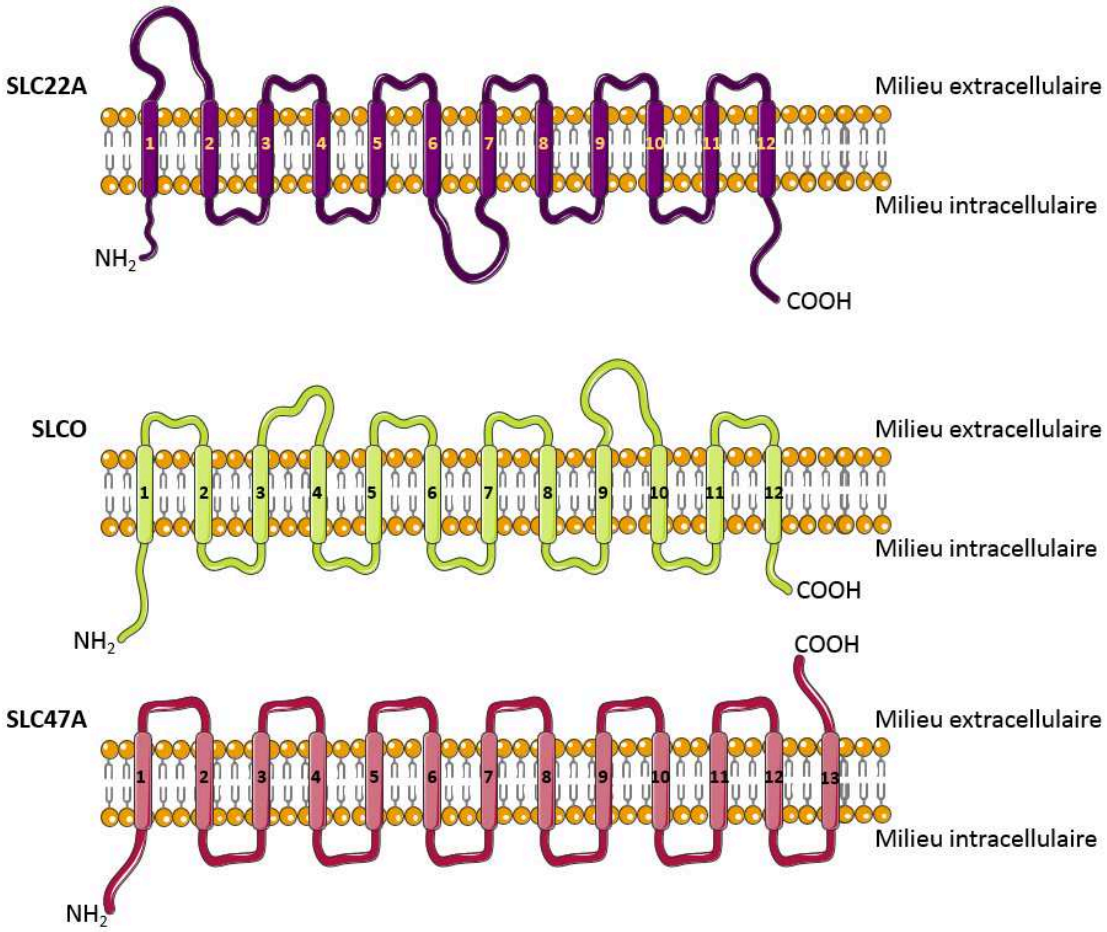


Figure 8: Structures des transporteurs SLC22, SLCO et SLC47

Peu de choses sont connues sur la structure tertiaire et quaternaire des transporteurs de ces familles et leurs structures cristallines n'ont pas encore été déterminées.

Des approches *in silico* suggèrent que les transporteurs SLC22 et SLCO partagent les mêmes caractéristiques que des protéines homologues d'origines bactériennes cristallisées (G3P, LacY, OxlT) (364). Ces transporteurs seraient constitués d'un pore central, formé par les hélices transmembranaires, qui contiendrait les résidus situés à l'interface entre les moitiés N et C terminal de la protéine, importants à la liaison et au transport de substrat (364). Des résidus polaires, aromatiques et basiques (chargés positivement) des hélices transmembranaires 7-8 pour les OATPs et des hélices transmembranaires 1-8-11 pour les OATs interagiraient avec des résidus hydrophobes et anioniques des substrats et seraient substitués par des résidus acides ou neutres au niveau des OCTs. Les transporteurs de la famille SLC47 auraient une structure homologue à l'échangeur Na+ bactérien NorM (365). Selon ce modèle, les MATEs possèderaient une large cavité interne, dont le volume est d'environ 4300Å^3 et ouvert à l'extrémité extracellulaire (365). Des résidus glutamates, histidines et cystéines sont hautement conservés et semblent importants dans la reconnaissance de substrats et dans l'interaction avec les protons (site de liaison H+) (366–368).

2.2.3.3. Mécanisme de transport

Les transporteurs SLC utilisent divers mécanismes pour le transport de leurs substrats (transport facilité, transport actif secondaire/tertiaire, de type symport ou antiport). Dans tous les cas, il s'agit d'un processus dynamique d'accès alterné : le transporteur alterne entre des conformations ouvertes vers l'intérieur et vers l'extérieur, avec de nombreux états intermédiaires (notamment une phase fermée où le site de liaison n'est accessible ni de l'extérieur ni du cytoplasme). Trois types de mécanismes ont été décrits pour les SLC : le mécanisme « rocker-switch », « elevator » et « Gated-pore » (369–371). Des approches *in silico* font l'hypothèse d'un mode de transport de type « rocker-switch » pour les OATPs, OCTs, OATs et MATEs (372–374) (Figure 9).

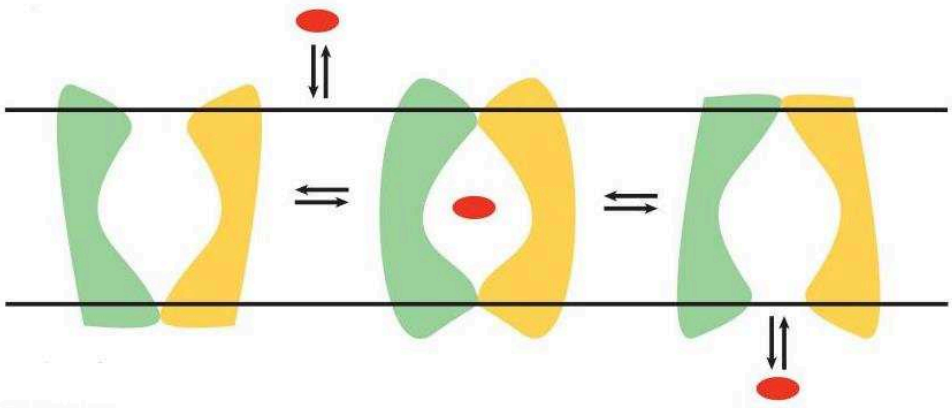


Figure 9: Mécanisme de transport « rocker switch » suggéré pour les SLC, d'après Colas et al, 2016 (375)

Dans le mécanisme « rocker-switch », le rapprochement et l'éloignement des extrémités N et C terminales du transporteur (en vert et jaune) permettraient à la protéine de passer d'une conformation (face à l'extérieur) à une autre (face à l'intérieur) permettant la traversée du substrat (en rouge).

2.2.3.4. Importance clinique

Les transporteurs SLC sont impliqués dans le transport de nombreux solutés, ions (Na+, Cl-…), acides aminés, peptides, vitamines, neurotransmetteurs (glutamate, noradrénaline, sérotonine…) et hormones (thyroïdiennes, stéroïdiennes…). Ils prennent en charge de nombreux médicaments, notamment des anti-infectieux et des statines, au niveau intestinal, hépatique et rénal et permettent le passage cérébral de médicaments d'action central et de certaines neurotoxines (paraquat, MPP+ (1-méthyl-4-phényl pyridinium)) (242). Des altérations des transporteurs SLC sont associées à des pathologies, comme le syndrome de Rotor, lié au dysfonctionnement d'OATP1B1 et OATP1B3 au niveau hépatique (376).

2.2.3.5. La famille SLC22A

La famille des transporteurs SLC22A comprend entre autres les transporteurs OATs et OCTs qui sont similaires en termes structurel et fonctionnel.

2.2.3.5.1. La famille des transporteurs OCTs

OCT1 a été le premier membre identifié de la famille SLC22 (377). Les trois OCTs partagent une structure trans-membranaire, un spectre de substrats proche et un même mécanisme de transport électrogénique et dépendant du potentiel de membrane.

Les OCTs sont des uniports et le transport de cations organiques s'effectue par diffusion facilitée dans le sens du gradient électrochimique et est sensible au potentiel de membrane (378).

2.2.3.5.1.1. Substrats

En termes de substrats, les OCTs présentent une spécificité large. Les substrats des OCTs incluent des molécules de petits poids moléculaires assez hydrophiles essentiellement des cations organiques comme le TEA (tetraéthylammonium), le MPP+ ou le NMN (N-méthyl-nicotinamide), mais également certains anions (prostaglandines), et des composés non chargés (Tableau 8) (379).

Ces transporteurs jouent un rôle dans le transport de nombreux composés endogènes, hormones et neurotransmetteurs (acétylcholine, histamine, dopamine, adrénaline, noradrénaline, sérotonine…) et permettraient ainsi la clairance des monoamines extra-neuronales (380). Ils influencent également la pharmacocinétique de nombreux médicaments comme la metformine, le cisplatine, la quinine et l'aciclovir (381). Bien que les OCTs aient des spectres chevauchant, certains substrats et inhibiteurs sont spécifiques d'une isoforme. L'isoforme OCT3 possède la sélectivité de substrat la plus importante de la famille, et ses substrats semblent plus limités à des composés endogènes notamment aux neurotransmetteurs (dopamine et noradrénaline) (382,383) et est inhibée sélectivement par la corticostérone.

Substrats de référence	Substrats endogènes	Substrats exogènes	Modulateurs
4',6-diamidino-2-phénylindole (DAPI) (OCT1) MPP (OCT1-3) Rhodamine 123 (OCT1-2) TEA (OCT1-2)	Acétylcholine (OCT2-3) Adrénaline (OCT1-3) Agmatine (OCT1-3) Choline (OCT2-3) Créatinine (OCT2-3) Dopamine (OCT1-3) Histamine (OCT1-3) Noradrénaline (OCT1-3) Sérotonine (OCT2-3) Tryptophane (OCT2)	Aciclovir (OCT1) Aflatoxine B1 (OCT1-2) Amantadine (OCT2) Cimétidine (OCT2) Lamivudine (OCT1-3) Lamotrigine (OCT1) Mémantine (OCT2) Metformine (OCT1-3) Paraquat (OCT1-2)	Abacavir (OCT1-3) Amitriptyline (OCT1-2) Atropine (OCT1) Clonidine (OCT1) Corticostérone (OCT3) Fluoxetine (OCT1) Imipramine (OCT1-2) Mémantine (OCT1-2) Paroxétine (OCT1) Vérapamil (OCT1-2)

Tableau 8: Exemples de substrats et modulateurs des transporteurs OCTs

2.2.3.5.1.2. Distribution tissulaire

Malgré leur similitude structurelle et fonctionnelle, la distribution tissulaire diffère selon les isoformes d'OCTs (Tableau 9). OCT1 est exprimé majoritairement dans le foie au niveau du pôle basolatéral des hépatocytes, et a des niveaux plus faibles dans les autres tissus (muscles squelettiques, poumon, rein, intestin...) (384,385).

OCT2 est exprimé presque exclusivement dans le rein au niveau du pôle basolatéral des cellules du tubule proximal (386,387).

OCT3 a une distribution tissulaire plus large et est exprimé dans les muscles squelettiques, la prostate, les glandes salivaires et surrénales, le foie, le rein, l'intestin, le placenta, le cœur et le poumon (388).

OCTs	Foie	Rein	Intestin	Poumon	Cerveau	Muscle squelettique	Placenta	Autres tissus
OCT1	**++**	+	+	+	+	+		Tissu adipeux, cellules immunitaires
OCT2		**++**	**+**	+	+		+	Thymus, oreille interne
OCT3	+	+	+	+	+	+	+	Cœur, vésicule biliaire, peau, vaisseaux sanguins, prostate, glandes mammaires

Tableau 9: Distribution tissulaire des transporteurs OCTs

2.2.3.5.2. La famille des transporteurs OATs

La famille comprend neuf transporteurs (OAT1-7, OAT10 et URAT1 (Urate Anion Exchanger 1)) (378). Les gènes codant pour les protéines de cette famille se trouvent par paires ou groupements au sein du génome (OAT1 et OAT3; OAT4-URAT1; OAT5-UST3), ce qui suggère une transcription coordonnée, co-régulée, de ces gènes exprimés essentiellement au niveau rénal. Les transporteurs OATs sont des transporteurs actifs secondaires (ou tertiaires) qui transfèrent leur substrat à travers la membrane en utilisant le gradient électrochimique du substrat lui-même ou d'un autre soluté (échange de dicarboxylates intracellulaires) (389). Les OATs sont d'importants modulateurs de la pharmacocinétique des médicaments notamment au niveau rénal.

2.2.3.5.2.1. Substrats

Les OATs sont des transporteurs à spécificité large qui se lient à une variété de substrats en fonction de propriétés physicochimiques (charge, hydrophobie, potentiel de liaisons hydrogènes) plutôt que des caractéristiques structurales. Les OAT prennent en charge de nombreux composés anioniques de petites tailles, plutôt hydrophiles, et les échangent contre la PAH (OAT2), des dicarboxylates

intracellulaires (OAT1, OAT3, OAT4 et OAT7), ou du lactate, du nicotinate ou du glutathion (OAT10) (390–393) (Tableau 10).

OAT1 prend en charge des composés endogènes comme l'urate, les prostaglandines, des nucléotides cycliques, des métabolites de neurotransmetteurs, métabolites du tryptophane et des stéroïdes sulfatés (390), ainsi que de nombreux médicaments (diurétiques, antiviraux, β-lactamines, méthotrexate, AINS…) (390). Les substrats d'OAT2 sont des salicylates, acetylsalicylate, les prostaglandines (PGE_2, prostaglandines F2 (PGF_2)) et la PAH (394) mais également de nombreux antiviraux et antibiotiques (395). OAT3 possède un large spectre de substrats, chevauchant OAT1, mais présente généralement une affinité moindre. Les substrats OAT3 incluent l'ochratoxin A, la benzylpénicilline, le méthotrexate, et des statines mais également des composés cationiques comme la cimétidine ou la famotidine et le zwitterion fexofénadine (390,391). OAT4 transporte l'estrone sulfate, la déhydroepiandrostérone sulfate (DHEAS), l'ochratoxin A, et les prostaglandines PGE_2 et PGF_2 (396–399).

Substrats de référence	Substrats endogènes	Substrats exogènes	Modulateurs
6-Carboxy-fluorésceine (OAT1, OAT3) Estrone-3-Sulfate (OAT3-4, OAT7) Fluorésceine (OAT1, OAT3) Nicotine (OAT10) PAH (OAT1-2)	Cortisol (OAT3) DHEAS (OAT3-4, OAT7) Glutamate (OAT2) Cholate (OAT3) Nicotinate (OAT10) PGE_2 (OAT1-4) PGF_2 (OAT2-4) Taurocholate (OAT3) Urate (OAT1-4)	Aciclovir (OAT1-2) Benzylpenicilline (OAT3) Bumétanide (OAT1-4) Ceftizoxime (OAT1, OAT3) Cimétidine (OAT1-3) Erythromycin (OAT2) Furosémide (OAT1, OAT3) Ganciclovir (OAT1-2) Indométhacine (OAT1, OAT3) Méthotrexate (OAT1-4) Olmesartan (OAT1, OAT3) Pravastatine (OAT3) Ranitidine (OAT1-3) Tétracycline (OAT2-4)	Candesartan (OAT1, OAT3-4) Ceftriaxone (OAT2, OAT4) Doxycycline (OAT1-2) Fluvastatine (OAT1, OAT3) Losartan (OAT1, OAT3-4) Pravastatine (OAT1, OAT3-4) Probénécide (OAT1-4) Telmisartan (OAT1, OAT3-4) Tétracycline (OAT1) Valsartan (OAT1, OAT3-4)

Tableau 10: Exemples de substrats et modulateurs des transporteurs OATs

2.2.3.5.2.2. Distribution tissulaire

Les OATs sont exprimés majoritairement dans le rein, et ont un rôle majeur dans le maintien de l'homéostasie endogène (400) (Tableau 11). Ils sont également présents dans une moindre mesure dans le foie, le cerveau, la rétine et le placenta (400). OAT2 est exprimé dans le foie et le rein, au niveau du pôle basolateral (394,395). OAT1 et OAT3 sont exprimés majoritairement au pôle basolatéral des cellules du tubule rénal proximal et sont responsables de l'excrétion urinaire des anions organiques

(401) alors qu'OAT4 est localisé à la membrane apicale et serait impliqué dans la réabsorption de substrats au niveau du tubule proximal même si son rôle est mal connu.

Transporteur	Foie	Rein	Intestin	Cerveau	Placenta	Autres tissus
OAT1 (BL)		+		+		
OAT2 (BL)	+	+				
OAT3 (BL)		+		+		Endothélium, oeil
OAT4 (A)		+			+	

Tableau 11: Distribution tissulaire des transporteurs OAT1, OAT2, OAT3 et OAT4

2.2.3.6. La famille SLCO

La famille des transporteurs SLCO comprend les transporteurs OATPs qui ont un spectre de substrats plutôt large et un mode de transport indépendant du sodium (402). Onze isoformes humaines ont été identifiées (403). Les OATPs sont classés selon la nomenclature HUGO en fonction de leur similarité de séquence d'acides aminés. Ils sont classés en six familles (40% d'identité de séquence en acides aminés) (OATP1 à 6) et sous-familles (60% identité de séquence en acides aminés) (A-C). Les transporteurs sont ensuite identifiés individuellement par un chiffre. Les transporteurs OATPs sont codés par les gènes SLCO, et bon nombre d'entre eux seraient des variants d'épissage.

Le transport médié par les OATPs est indépendant du sodium et peut être bi-directionnel (400). La source d'énergie qui permet au transporteur de faire entrer son substrat dans la cellule n'est pas clairement établi. Ces transporteurs pourraient fonctionner comme échangeur électriquement neutre, via l'efflux de bicarbonate, glutathion ou de lactate, présents en intracellulaire (400). Contrairement à OATP1B1 et OATP1B3, le transport médié par OATP2B1 a la particularité d'être affecté par des variations de pH ; une acidification extra-cellulaire, favorise l'entrée de substrat par OATP2B1 (404). Une hypothèse suggère également que certains transporteurs OATPs fonctionnent sous forme d'homo ou d'hétéro-oligomères (405).

2.2.3.6.1. Substrats

Les OATPs contiendraient de multiples sites de reconnaissance de substrats et sont des transporteurs à spectre large. Ces transporteurs prennent en charge différents composés organiques pouvant être de grandes tailles (jusqu'à 1143 Da pour le CCK8), préférentiellement hydrophobes ou amphiphiles, acides et présentant des fonctions donneurs et accepteurs d'hydrogènes (400). Les substrats sont généralement chargés négativement mais certains peuvent être neutres (digoxine, stéroïdes neutres) ou cationique (quinidine) (Tableau 12).

Les substrats endogènes des OATPs sont des hormones stéroïdiennes et thyroïdiennes, des acides biliaires, des prostaglandines, certains polypeptides anioniques et la bilirubine. Plusieurs classes de médicaments sont transportées par les OATPs (statines, antagonistes des récepteurs de l'angiotensine II, fluoroquinolones…) ainsi que des contaminants environnementaux (phalloïdine).

Certains OATPs partagent les mêmes substrats ; l'estrone-3-sulfate, le DHEAS et la BSP (bromosulfophthaléine) peuvent être transportés par de nombreux OATPs, alors que le CCK8 est spécifique d'OATP1B3. OATP1B1 et OATP1B3 présentent des spécificités de substrats similaires.

Substrats de référence	Substrats endogènes	Substrats exogènes	Modulateurs
BSP (1B1, 1B3, 2B1) CCK8 (1B3) Estrone-3-sulfate (1B1, 1B3, 2B1) Fluorescéine (1B1, 1B3)	Bilirubine (1B1,1B3) Bilirubine glucuronide (1B1) DHEAS (1B1, 1B3, 2B1) Leucotriène C4 (1B1,1B3) Leucotriène E4 (1B1) Prostaglandine E2 (1B1, 2B1) T3 (1B1,1B3) T4 (1B1,1B3, 2B1)	Arsenic (1B1) Atorvastatine (1B1 ,2B1) Benzylpénicilline (1B1,1B3,2B1) Bosentan (1B1,1B3, 2B1) Capsofungine (1B1) Fluvastatine (1B3, 2B1) Imatinib (1B3) Methotrexate (1B1, 1B3) Phalloïdine (1B1,1B3) Pravastatine (1B1, 2B1) Rifampicine (1B1) Rosuvastatine (1B1, 1B3, 2B1) Valsartan (1B1,1B3)	Cimétidine (2B1) Clarithromycine (1B1,1B3) Digoxine (1B1) Erythromycine (1B1,1B3) Glimépiride (1B1,1B3, 2B1) Acide glycyrrhizique (1B1,1B3) Kétoconazole (1B1,1B3) PAH (2B1) Probénécide (1B1, 1B3, 2B1) Ritonavir (1B1) Saquinavir (1B1) Vérapamil (1B1) Warfarine (1B1)

Tableau 12: Exemples de substrats et de modulateurs des transporteurs OATPs

2.2.3.6.2. Distribution tissulaire

Des OATPs sont exprimés dans différents tissus de l'organisme comme la BHE, les plexus choroïdes, les poumons, le cœur, l'intestin, les reins, le placenta et le testicule (notamment OATP2B1). D'autres semblent plus spécifiques d'un tissu, comme OATP1B1 et OATP1B3 exprimés majoritairement dans le foie, qui contrôlent l'entrée au niveau de l'hépatocyte de nombreux composés (242,403).

Dans le foie, OATP1B1, OATP1B3, OATP1A2 et OATP2B1 sont exprimés au niveau du pôle basolatéral des hépatocytes. Ils participent au transport des acides biliaires et influencent grandement la clairance hépatobiliaire des médicaments. OATP2B1 et OATP1A2 sont présents au niveau de l'intestin et de la BHE et OATP4C1 et OATP1A2 au niveau rénal (406).

OATPs	Foie	Rein	Intestin	Cerveau	Placenta	Poumon	Autres tissus
OATP1B1 (BL)	+						
OATP1B3 (BL)	+				+		
OATP2B1 (A/BL)	+	+	+	+	+	+	Cœur, muscle squelettique, yeux, peau, tissu mammaire, pancréas

Tableau 13: Distribution tissulaire d'OATP1B1, OATP1B3 et OATP2B1

2.2.3.7. La famille SLC47A

Alors que le premier OCT a été cloné et caractérisé en 1994 (377), il a fallu attendre 2005 pour que le premier membre de la famille SLC47A soit décrit (407). La famille SLC47A est constituée des transporteurs MATE1 et de trois isoformes de MATE2: MATE2, MATE2K ((isoforme plus courte suite à un épissage alternatif) et MATE2B (isoforme tronquée, qui semble n'avoir aucun rôle de transport) (408,409). Les transporteurs de cette famille sont proches en termes de structure et de spécificité de substrats, MATE1 et MATE2 partagent 48% d'identité de séquence.

Les transporteurs MATEs sont des échangeurs de cations organiques/proton impliqués dans les étapes de sécrétion hépatique et rénale des cations organiques (407).

Le transport de cations organiques médié par les MATEs s'effectue contre le gradient électrochimique et est couplé à un échange de proton (410). Le transport implique un échange électriquement neutre d'un H+ contre un cation organique monovalent mais la stœchiométrie de l'échange OC/H+ pourrait être plus flexible (1 : 2) pour le transport de cations divalents (agmatine^{2+}, paraquat^{2+}) (410–412). L'uptake médié par MATE-1 est indépendant du sodium, insensible au potentiel de membrane (413) et inhibé par une acidification du milieu extracellulaire et une alcalinisation intracellulaire (407,409). Les transporteurs MATEs peuvent fonctionner en efflux ou en influx selon le sens du gradient de proton ; la vitesse de l'efflux médié par MATE1 est stimulée par un gradient H+ dirigé vers l'intérieur et l'influx est stimulé par un gradient H+ dirigé vers l'extérieur (414).

2.2.3.7.1. Substrats

Les transporteurs MATEs ont un rôle majeur dans l'élimination des composés cationiques (basiques) de structures diverses, préférentiellement hydrophobes (415). MATE1 et MATE2-K ont une spécificité de substrat proche (416). Les cations organiques pris en charge par les MATEs peuvent être des amines mais également des composés dépourvus d'azote (phosphonium) (415). Les substrats endogènes des MATEs sont par exemple le N-methylnicotinamide (NMN), la créatinine, la vitamine B1 (415). Les MATEs prennent également en charge des xénobiotiques, comme les alcaloïdes, des composés hétérocycliques alimentaires, des médicaments et des toxiques environnementaux (paraquat) (417) (Tableau 14).

Substrats de référence	Substrats endogènes	Substrats exogènes	Modulateurs
DAPI (MATE1, MATE2K) TEA (MATE1, MATE2K)	Agmatine (MATE1, MATE2K) Créatinine (MATE1, MATE2K) NMN (MATE1, MATE2K) Thiamine (MATE1, MATE2K)	Aciclovir (MATE1, MATE2K) Céphalexine (MATE1) Cimétidine (MATE1, MATE2K) Ganciclovir (MATE1, MATE2K) Metformine (MATE1, MATE2K) Oxaliplatine (MATE2K) Paraquat (MATE1) Procaïnamide (MATE1, MATE2K) Topotecan (MATE1, MATE2K)	Cimétidine (MATE1, MATE2K) Dasatinib (MATE1, MATE2K) Famotidine (MATE1) Imatinib (MATE1, MATE2K) Irinotecan (MATE1) Kétoconazole (MATE1, MATE2K) Propranolol (MATE1, MATE2K) Quinine (MATE1, MATE2K) Ranitidine (MATE1, MATE2K) Vérapamil (MATE1, MATE2K)

Tableau 14: Exemples de substrats et de modulateurs des transporteurs MATEs

2.2.3.7.2. Distribution tissulaire

Exprimés principalement dans le foie et le rein, les transporteurs MATEs ont un rôle majeur dans l'élimination active de composés cationiques (407). Le travail coordonné de MATE1/MATE2K et d'OCT2 des cellules tubulaires proximales rénales, et de MATE1 et d'OCT1 des hépatocytes permet l'échange OC/H+ et donc la sécrétion rénale et biliaire de nombreux xénobiotiques. MATE1 est exprimé essentiellement dans le foie et le rein (pôle apical des cellules du tubule proximal rénal et des canalicules biliaires (et tubule contourné distal)), mais également dans une moindre mesure au niveau des muscles squelettiques, de la glande surrénale et des testicules (407,408). L'isoforme MATE2K, spécifique du rein, est exprimée au pôle apical des cellules du tubule proximal rénal (408). MATE2 est exprimé majoritairement au niveau du tubule proximal rénal mais la fonctionnalité de la protéine au niveau rénal n'est pas avérée (408).

2.3. Transport des xénobiotiques au niveau des barrières

Les transporteurs ABC et SLC sont présents de façon ubiquitaire dans l'organisme, souvent au niveau d'interfaces hémato-tissulaires (foie, rein, épithélium intestinal, barrière hémato-encéphalique…). Ces protéines ont de fait un impact important sur la pharmacocinétique des médicaments et la toxicocinétique des contaminants environnementaux.

2.3.1. Transport intestinal des xénobiotiques

L'absorption intestinale des xénobiotiques a lieu principalement au niveau de l'intestin grêle, le colon ayant un rôle essentiellement dans la réabsorption des fluides. L'intestin est composé d'une population hétérogène de cellules (entérocytes, cellules caliciformes, cellules de Paneth, cellules M, cellules neuroendocrines) qui sécrètent des mucines, de l'eau, et ont un rôle de filtre pour l'entrée des nutriments et des xénobiotiques. Les entérocytes sont les cellules les plus nombreuses et sont responsables de la fonction d'absorption intestinale. Ce sont des cellules polarisées, présentant des microvillosités à leur pôle apical et qui sont liées entre elles par des jonctions serrées.

En plus de la barrière constituée par les entérocytes, l'absorption intestinale des composés solubilisés implique le passage de barrières pré-épithéliales comme des couches d'eaux, de mucus, la lamina propria et le glycocalyx, ainsi que des intéractions avec des enzymes de la muqueuse gastro-intestinale et de la flore bactérienne, qui peuvent limiter significativement l'entrée des composés (98,418,419).

Une fois qu'une molécule a traversé ces différentes barrières, elle sera relarguée dans le sang ou la circulation lymphatique. La circulation de ces fluides créant des conditions « siphon » qui permettent de maintenir un gradient de concentration favorable à l'absorption.

Pour traverser la barrière entérocytaire, les xénobiotiques peuvent emprunter différentes voies d'entrées ; ils peuvent diffuser passivement ou être pris en charge par des protéines de transport.

La diffusion passive paracellulaire est très limitée au niveau intestinal du fait de la présence de jonctions serrées et de la surface d'échange restreinte (≈0,01% de la surface totale de l'intestin grêle). Certains xénobiotiques pourront traverser l'intestin par diffusion transcellulaire, le gradient de concentration étant favorable à leur absorption. Les composés peu perméables qui sont substrats de transporteurs intestinaux pourront traverser la membrane entérocytaire via des transporteurs d'uptake. Une fois entrés dans l'entérocyte, certains xénobiotiques vont parfois être métabolisés par les cytochromes P450 et/ou être pris en charge par des transporteurs d'efflux exprimés au pôle apical

et basolatéral de l'entérocyte (420–422). Ces transporteurs permettront le passage sanguin ou lymphatique de certains composés ou leur expulsion dans la lumière intestinale.

L'entérocyte exprime essentiellement des transporteurs des familles des OATPs, OCTs, MRPs ainsi que la P-gp et BCRP (Figure 10) (242). L'expression de ces transporteurs varie le long du tractus gastro-intestinal.

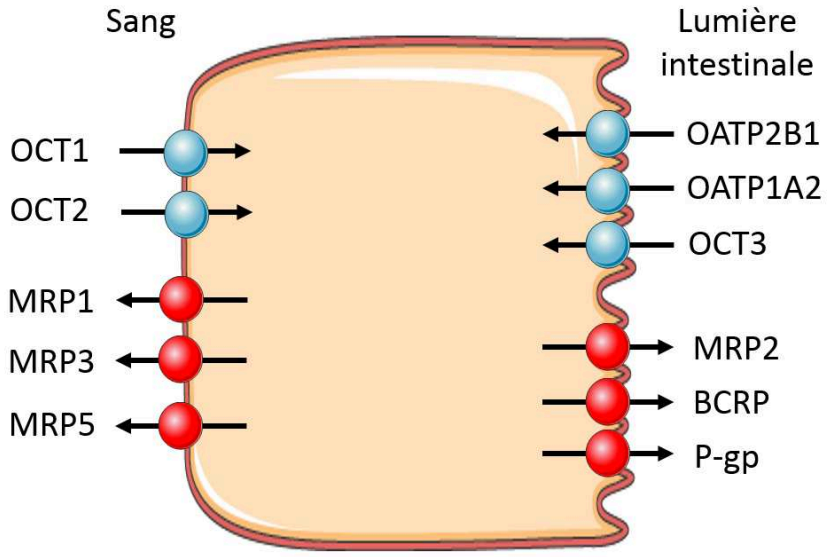


Figure 10: Transporteurs exprimés au niveau entérocytaire

L'entrée apicale des xénobiotiques est médiée, entres autres, par OATP1A2 et OATP2B1, bien que ce dernier semble être l'OATP intestinal majeur (423). Des OATs et OCTs ont également été détectés mais leur relevance dans l'absorption intestinale reste incertaine. D'autres transporteurs participent à l'entrée de peptides, de monocarboxylates etc… (PEPTs (Peptide transporters), MCTs (Monocarboxylate transporters), ASBTs (Apical sodium-dependent bile acid transporters)) (423).

Des transporteurs d'efflux permettent ensuite le passage de la membrane basolatérale, étape finale de l'absorption intestinale (MRP1, MRP3, MRP5) ou la sécrétion des xénobiotiques dans la lumière intestinale (P-gp, MRP2, BCRP) (242). Ils ont, de fait, un rôle important dans la protection des cellules des toxiques notamment issus de l'alimentation (PhIP, pheophorbide a) et peuvent être à l'origine de la faible absorption intestinale de nombreux médicaments (346,424). La P-gp est très exprimée au niveau de l'iléon terminal où les ratios d'efflux de P-gp sont maximaux, mais est également présente au niveau du duodénum, du jéjunum et du colon. BCRP est exprimé à haut niveau des cellules épithéliales de l'intestin grêle (jejunum) et du colon. Les MRPs sont présents dans tous les segments de l'intestin, mais MRP1 est plus fortement exprimé au niveau de l'iléon et du colon, MRP2 au niveau du jéjunum et MRP3 au niveau du duodénum et du colon, MRP5 au niveau du colon.

Les principaux facteurs influençant l'absorption intestinale sont liés aux propriétés physicochimiques de la molécule (taille, lipophilie, solubilité, polarité, état d'ionisation), à la dose administrée et à des

facteurs physiologiques (temps de vidange gastrique, motilité intestinale, bol alimentaire, flux sanguin gastrique et intestinal, enzymes métaboliques, transporteurs). D'autres paramètres peuvent influencer l'entrée des xénobiotiques comme l'intégrité de la barrière cellulaire (fluidité, jonctions, inflammation, pathologies) et la présence éventuelle d'inhibiteurs de transporteurs (médicaments, toxiques, aliments).

Le transport intestinal des xénobiotiques est dépendant de plusieurs paramètres: la concentration intestinale du substrat, la perméabilité passive du composé, l'affinité substrat-transporteur (Km) et la capacité de transport par protéine (vitesse maximal du transporteur). Un composé diffusant passivement, mais disposant de faibles concentrations intestinales, aura une absorption limitée s'il est pris en charge par un transporteur d'efflux, alors que de fortes concentrations satureront les transporteurs, qui n'influenceront pas l'absorption intestinale du composé. La diffusion passive deviendra donc le facteur dominant l'absorption du xénobiotique. Un xénobiotique substrat d'une pompe d'efflux n'aura donc pas forcément une faible absorption intestinale et biodisponibilité.

Au final, les xénobiotiques absorbés accéderont à la circulation et seront ensuite transportés jusqu'au foie, où certains d'entre eux subiront un effet de premier passage.

2.3.2. Transport hépatique des xénobiotiques

Le foie est un organe clé dans la toxico-cinétique des xénobiotiques. Il est l'organe responsable de l'effet de premier passage, et a pour rôle de détoxifier l'organisme des composés endogènes et exogènes qui pourraient lui être nuisibles par le biais d'étapes de métabolisme et d'excrétion.

Les hépatocytes constituent le type cellulaire prédominant du foie. Ce sont des cellules polarisées constituées d'un pôle basolatéral (ou sinusoïdal) et d'un pôle apical (ou canaliculaire), qui contiennent les protéines de transport et les enzymes nécessaires à l'élimination des xénobiotiques. Ceux-ci, vont ainsi être importés dans la cellule hépatique depuis le sang à travers la membrane sinusoïdale, subir ou non des modifications (métabolisme, conjugaison) et ensuite être excrétés. Bien que certains composés lipophiles puissent diffuser passivement au sein de l'hépatocyte, ce sont essentiellement les transporteurs qui vont permettre l'extraction des composés du sang puis leur expulsion (sous forme de métabolite ou non) dans le sang ou la bile.

Au niveau du pôle basolatéral de l'hépatocyte, sont présents des transporteurs SLC (OCTs, OATPs, OATs) qui vont permettre l'entrée des composés endogènes et de xénobiotiques (242) (Figure 11). D'autres transporteurs, actifs, sont présents au pôle canaliculaire, pour excréter ces molécules dans la bile afin de les éliminer dans les fécès (BCRP, MATE1, P-gp, MRP2), ou au niveau du pôle sinusoïdal (MRPs) pour exporter ces composés vers le sang afin de les éliminer par voie rénale (242) (Figure 11). D'autres transporteurs hépatiques permettent le transport des sels biliaires, phospholipides ou

d'autres composés choléphiliques (NTCP (Na+-taurocholate cotransporting polypeptide), MDR3, BSEP (Bile Salt Export Pump)) mais ne seront pas abordés dans cette section.

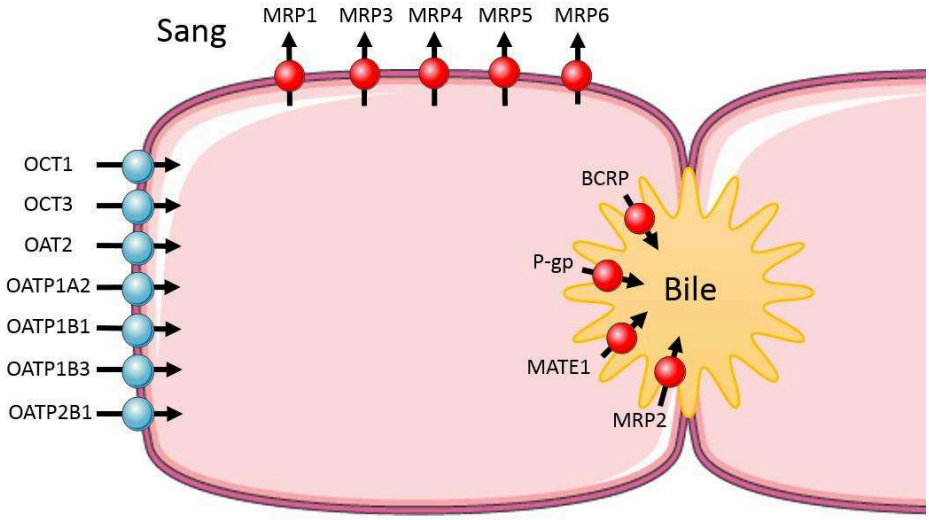


Figure 11: Transporteurs exprimés au niveau hépatocytaire

Entrée des xénobiotiques dans l'hépatocyte

Les OATPs (OATP1A2, OATP1B1, OATP1B3, OATP2B1) permettent l'entrée de nombreux substrats (stéroïdes, acides biliaires, bilirubine et de nombreux médicaments) dans l'hépatocyte et apparaissent souvent comme facteur limitant dans la clairance hépatobiliaire des xénobiotiques, notamment anioniques. OAT2 est également exprimé à la membrane basolatérale et transporte certains anions notamment des prostaglandines et de nombreux médicaments.

Les OCTs (OCT1 et OCT3) présents à la surface de la membrane basolatérale de l'hépatocyte vont permettre l'entrée de petites molécules cationiques, notamment des substrats endogènes, neurotransmetteurs et médicaments dans les hépatocytes. Le transport des cations organiques est majoritairement médié par OCT1 et permet une accumulation intra-hépatocytaire cinq fois supérieure à la concentration plasmatique, du fait du potentiel de la membrane (environ −40 mV) (425).

Certains transporteurs sont également présents au niveau de compartiments intracellulaires et jouent un rôle dans la distribution intra-hépatocytaire des xénobiotiques. Pour exemple, la P-gp serait présente au niveau du Golgi et de la mitochondrie (426). D'autre part, certains xénobiotiques peuvent également être séquestrés dans des compartiments intracellulaires, ce qui peut influer leur biodisponibilité hépatobiliaire ; c'est par exemple le cas de la daunorubicine (427).

L'excrétion hépatique des xénobiotiques peut se faire à travers la membrane basolatérale dans le sang ou à travers la membrane canaliculaire vers la bile.

Efflux canaliculaire

Les transporteurs d'efflux responsables de l'excrétion biliaire des xénobiotiques sont la P-gp, la BCRP, MRP2 et MATE1. P-gp et BCRP prennent en charge de très nombreux xénobiotiques, préférentiellement cationiques et MRP2 joue un rôle dans le transport d'anions organiques (conjugués ou non).

MATE1 va expulser dans la bile les cations organiques entrés dans l'hépatocyte via OCT1 à travers la membrane apicale. Comme le pH canaliculaire est de 7,2 ou plus (428), il n'y a pas de gradient de proton dirigé vers l'intérieur, donc l'efflux de cations organiques repose entièrement sur l'échange électriquement neutre de cations organiques accumulés à fortes concentrations en intracellulaire par OCT1. Les gradients électriques et protoniques sont plus faibles que dans le rein, de ce fait, le foie a un rôle moindre quantitativement dans la sécrétion des cations organiques que le rein.

Efflux basolatéral

Des transporteurs MRPs (MRP1, MRP3-6) permettent d'expulser les xénobiotiques intra-hépatocytaire dans le sang à travers la membrane basolatérale. Ils sont impliqués dans le transport de molécules anioniques ou neutres, souvent conjugués (glucuronide, glutathion, sulfate). MRP1, MRP3 et MRP5 pourraient participer à la réponse à certains dommages hépatiques comme la cholestase.

Les transporteurs du pôle canaliculaire sont d'importants effecteurs de la circulation entérohépatique de certains xénobiotiques. Il convient de noter que l'excrétion biliaire, qui limite la biodisponibilité des xénobiotiques et de leurs métabolites, peut paradoxalement contribuer à exposer l'épithélium intestinal à ces mêmes substances potentiellement toxiques.

Aussi, de nombreux substrats de P-gp sont également pris en charge par le CYP3A4 et certains xénobiotiques induisent concomitamment P-gp et le CYP3A4 (via PXR) (294). Le CYP3A4 et P-gp agiraient donc de façon coordonnée pour contrôler l'élimination hépatique de leurs substrats et protéger les hépatocytes de l'accumulation intracellulaire de toxiques.

2.3.3. Transport rénal des xénobiotiques

Le rein, comme le foie, est un organe central pour l'élimination des xénobiotiques de la circulation générale. Deux mécanismes entrent en jeu pour l'élimination rénale: la filtration glomérulaire et la sécrétion tubulaire. Ces étapes peuvent être suivies d'une phase de réabsorption permettant de récupérer des nutriments comme le glucose, des acides aminés ou des vitamines de l'urine primitive.

La filtration glomérulaire est dépendante du débit sanguin rénal, et de la taille et de la charge du composé ; ne seront filtrées que les molécules non liées aux protéines plasmatiques, de taille inférieure à 65kDa, préférentiellement cationiques ou neutres.

Des transporteurs sont impliqués dans les étapes de sécrétion tubulaire des xénobiotiques du sang vers l'urine, et de réabsorption à travers les tubules proximaux (OATs, OATPs, OCTs, MATEs, P-gp, MRPs) (Figure 12) (429).

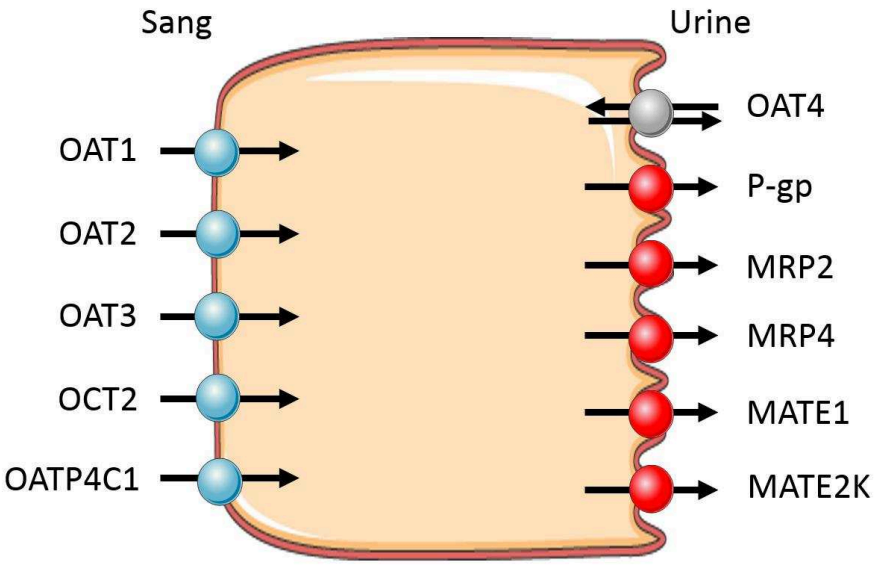


Figure 12: Transporteurs exprimés au niveau des cellules tubulaires proximales rénales

Transport des anions organiques

De nombreux anions organiques sont pris en charge par des transporteurs rénaux, la plupart sont des acides faibles, hydrophobes (430). Les transporteurs OAT1, OAT2, OAT3 et OATP4C1 vont permettre l'entrée de ces composés dans la cellule tubulaire rénale depuis le sang (401)(400)(394,395,401). Les spécificités de substrats des OATs sont très proches, mais diffèrent d'OATP4C1, ce qui est déterminant pour l'élimination des anions organiques circulantes. L'entrée basolatérale des anions organiques médiée par OAT1 et OAT3 est dépendante du gradient de concentration en dicarboxylates intracellulaires (α-cétoglutarates) et s'effectue en échange de ces dicarboxylates sans apport d'énergie (389). Le gradient de concentration élevé en dicarboxylates est maintenu par le co-transporteur sodium-dicarboxylate, qui lui est dépendant du gradient sodique généré par les pompes Na^+/K^+/ATPase (431). OAT4 peut opérer en influx ou en efflux, son rôle dans la réabsorption ou la sécrétion d'anions dans l'urine primitive est mal compris (431).

Plusieurs isoformes de MRP (notamment MRP2 et MRP4) sont présents à la membrane en brosse des cellules tubulaires proximales rénales où ils expulsent des anions organiques dans la lumière du tubule (326).

Transport des cations organiques

De nombreux substrats cationiques, souvent azotés, sont également pris en charge par des transporteurs au niveau du tubule rénal (430).

Leur entrée est médiée majoritairement par OCT2, par diffusion facilitée, du fait du potentiel négatif de la membrane basolatérale (de l'ordre de −60 mV) (386,432,433). Il en résulte une accumulation intracellulaire de cations organiques (majoritairement monovalents) environ dix fois supérieure à la concentration plasmatique.

La seconde étape de sécrétion des cations organiques dans l'urine primitive à travers la membrane apicale est essentiellement assurée par les transporteurs MATEs (MATE1 et MATE2-K) (396,408). Ces transporteurs fonctionnent en efflux dans le rein (434) et permettent l'expulsion des cations en échange d'un proton (410). Cette phase constitue l'étape limitante pour la sécrétion tubulaire des cations organiques (435,436). L'efflux apical de ces composés est dépendant du flux sanguin rénal (qui diffère dans les différents segments du tubule rénal) et non du gradient de protons. Ainsi, au niveau des premiers segments du tubule proximal, le pH du filtrat du tubulaire et du sang sont identiques (7,4), et pourtant la sécrétion tubulaire est supérieure à ceux des segments terminaux (435) qui possèdent pourtant de forts gradients de protons (437). L'accumulation intracellulaire des cations médiée par OCT2 permet le fonctionnement des MATEs en efflux avec un échange électriquement neutre (cation/proton), même en l'absence de gradient de proton dirigé vers l'intérieur de la cellule.

P-gp sécrète également de nombreux composés dans la lumière à travers la membrane apicale (292). BCRP est lui aussi exprimé faiblement au pôle apical des cellules tubulaires mais son rôle dans l'excrétion des xénobiotiques parait limité.

Des transporteurs de composés endogènes (PEPT1-2, OCTN1-2 (organic cation/carnitine transporter), URAT1, SGLT2 (transporteurs sodium glucose de type 2), ENTs (equilibrative nucleoside transporter), CNTs (concentrative nucleoside transporter)) sont également exprimés au pôle apical et permettent la sécrétion et la réabsorption de composés essentiels (nutriments, nucléosides, carnitine, urate, glucose) depuis l'urine (397,438–440).

L'activité des transporteurs rénaux est déterminante pour la clairance rénale de leurs substrats. Certains xénobiotiques, notamment des médicaments, peuvent moduler l'activité des transporteurs, et par là, la clairance rénale de nombreux composés. Il en résulte en une demi-vie plasmatique augmentée de certains xénobiotiques toxiques. Aussi, l'action des transporteurs modulent l'effet néphrotoxique de certains xénobiotiques.

2.3.4. Transport des xénobiotiques au niveau de la BHE

Pour accéder au SNC, les composés endogènes et les xénobiotiques présents dans la circulation, doivent traverser la barrière hémato-encéphalique et la barrière sang-liquide cérébro-spinal. La traversée peut s'effectuer par diffusion passive (pour les composés lipophiles de petites tailles non ionisés) ou via des transporteurs. Les différents compartiments du parenchyme cérébral (astrocytes, microglie, oligodendrocytes, neurones) jouent ensuite un rôle important dans la distribution cérébrale des composés. L'environnement cérébral est contrôlé de façon très fine et les cellules présentes au niveau des barrières et dans le tissu cérébral possèdent un set d'enzyme métaboliques et de transporteurs bien spécifiques qui permettent de maintenir l'homéostasie cérébrale et limitent l'accumulation cérébrale des xénobiotiques.

La BHE est composée d'une monocouche de cellules endothéliales non fenestrées, entourées de péricytes et d'astrocytes et constitue une barrière physique et biochimique entre le sang et le cerveau. Les cellules endothéliales sont reliées par des jonctions serrées, maintenues grâce à des facteurs de croissance sécrétés par les astrocytes, et expriment des transporteurs limitant le passage des xénobiotiques. La diffusion paracellulaire à travers la barrière est négligeable du fait de la présence des jonctions serrées.

La barrière sang-liquide cérébro-spinal est formée par les cellules épithéliales des plexus choroïdes qui constituent une interface entre le sang et le LCR. Les plexus choroïdes sont constitués de capillaires entourés de cellules épithéliales reliés par des jonctions serrées et produisent le LCR qui est ensuite sécrété dans les ventricules cérébraux. En plus des transporteurs présents à la surface des plexus choroïdes, le flux continu du LCR à travers les ventricules jusqu'au système veineux, permet d'évacuer les xénobiotiques et composés endogènes potentiellement toxiques.

Des protéines de transport sont exprimées au niveau des deux barrières et du parenchyme cérébral. Les composés hydrophiles ou ionisés pénètrent dans le SNC grâce à des systèmes de transporteurs d'influx, notamment des familles des OATPs, OATs, OCTs et sont expulsés par des transporteurs ABC (441) (Figure 13). D'autres familles de transporteurs sont également exprimées (OCTNs, MCTs, ENTs, CNTs, PEPTs, LATs (L-type amino acid transporter)) au niveau du SNC (441).

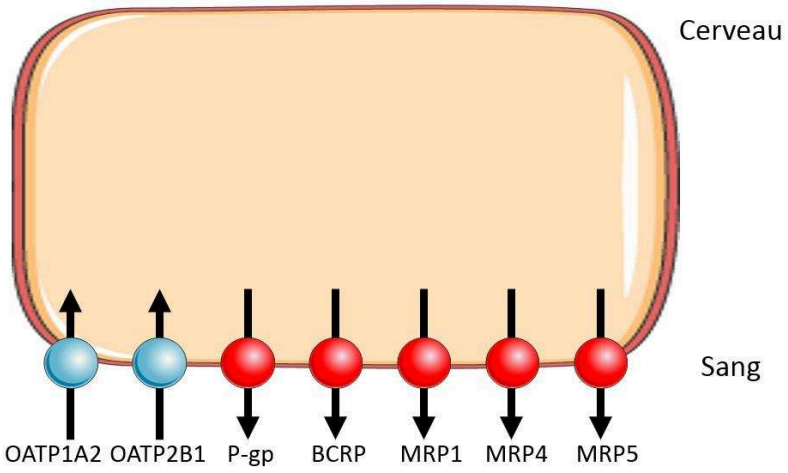


Figure 13: Transporteurs exprimés dans les cellules endothéliales des capillaires de la BHE

Certains OATPs sont présents au niveau de la BHE et des tissus cérébraux, notamment OATP1A2 et OATP2B1, (mais aussi OATP3A1,-4A1,-1C1), ils pourraient avoir un rôle dans l'entrée de certains opioïdes d'action centrale (442). Les OATs (OAT1, OAT3) sont essentiellement exprimés dans les plexus choroïdes et le parenchyme cérébral et seraient impliqués dans l'élimination d'anions du LCR dans le sang, notamment de métabolites de neurotransmetteurs (443).

OCT1-3 sont également présents au niveau du cerveau, même si l'expression d'OCT1 est controversée. Ces transporteurs permettraient l'entrée de certains neurotransmetteurs au niveau neuronal, le transport de la choline au niveau des plexus choroïdes, mais également le transport de certains médicaments (amantadine) et toxiques (MPP+) (444,445). OCT2-3, localisés au niveau des neurones et des astrocytes, joueraient un rôle dans la clairance des monoamines (sérotonine, noradrénaline, dopamine, histamine) et permettraient de protéger les cellules d'une surstimulation des récepteurs post-synaptiques due à des médicaments antidépresseurs ou des psychostimulants (444).

Des transporteurs d'efflux sont également exprimés au niveau du SNC et régulent ainsi l'accumulation intracérébrale de médicaments et toxiques. La P-gp et la BCRP sont localisées au niveau des cellules épithéliales des plexus choroïdes et dans les cellules endothéliales de la BHE (441). Ces deux transporteurs joueraient aussi un rôle dans la clairance cérébrale de la protéine bêta-amyloïde, qui s'accumule dans la maladie d'Alzheimer (446).

MRP1, MRP4-5 seraient exprimés dans les cellules endothéliales de la BHE et dans les cellules épithéliales des plexus choroïdes et MRP1, MRP4-5, MRP8 dans le parenchyme cérébral. Les MRPs limitent le passage cérébral de nombreux anions organiques, notamment des opioïdes (447).

3. Interactions entre pesticides et transporteurs membranaires

Les transporteurs sont présents au niveau de nombreuses interfaces hémato-tissulaires et facilitent ou restreignent l'accès de nombreux composés à des tissus sensibles comme le cerveau ou le testicule, mais également au fœtus et aux tissus à rôle de détoxification de l'organisme (foie, rein).

Certains médicaments sont pris en charge par ces transporteurs et d'autres peuvent inhiber l'activité ou moduler l'expression de ces protéines. Ces interactions ont des conséquences dans la pharmacocinétique des médicaments et peuvent être à l'origine d'effets indésirables et d'interactions médicamenteuses.

Des différences dans la biodisponibilité de la digoxine, substrat de P-gp, ont été, par exemple, attribuées à des différences génétiques du gène MDR1 de la P-gp (448). L'inhibition de transporteurs hépatiques (NTCP, BSEP, MRP2) par des médicaments peut également conduire à une cholestase ou une hyperbilirubinémie du fait du défaut d'élimination des acides biliaires et de la bilirubine. De même, la coadministration de la ciclosporine A (inhibiteur de la P-gp) avec le paclitaxel, conduit à une augmentation importante de la biodisponibilité de l'anticancéreux (449). D'autre part, la baisse d'expression de transporteurs prenant en charge des hormones peut conduire à des effets perturbateurs endocriniens (450) et des effets délétères dus au dysfonctionnement du transport des leucotriènes et des cobalamines par MRP1 (451,452) ont été reportés.

De la même manière, il a été montré que des polluants environnementaux peuvent également interagir avec des transporteurs, en tant que substrats ou inhibiteurs de l'activité de ces transporteurs. Certains contaminants environnementaux peuvent aussi induire la production de cytokines pro-inflammatoires ou interagir avec des récepteurs intracellulaires (AhR (aryl hydrocarbon receptor), PXR, CAR, PPAR-α) qui altèrent l'expression des transporteurs. Ces interactions peuvent avoir des conséquences sur la toxicocinétique de ses polluants et être à l'origine d'effets toxiques en perturbant leur propre transport et donc leur accumulation cellulaire et/ou leur élimination notamment au niveau des cellules tubulaires rénales et des hépatocytes. Ces composés peuvent également perturber le transport de substrats endogènes ou de toxiques et médicaments co-pris en charge par ces transporteurs, par un mécanisme compétitif ou non, et être à l'origine d'effets néfastes.

A titre d'exemple, des altérations du fonctionnement de la P-gp, transporteur au niveau de la BHE pourraient résulter en une accumulation intracérébrale de neurotoxiques, normalement efflués. C'est la raison pour laquelle les interactions transporteurs-pesticides neurotoxiques ont été proposées comme hypothèse mécanistique dans la physiopathologie de maladies neurodégénératives comme la maladie de Parkinson (453).

Alors que les agences sanitaires (Food and Drug Administration (FDA), European Medicines Agency (EMA)) s'accordent sur l'obligation de caractérisation des candidats médicaments vis-à-vis de nombreux transporteurs ABC et SLC, on peut s'interroger du manque de réglementation concernant les interactions entre produits phytosanitaires et transporteurs.

Les pesticides, sont en règle générale, des composés relativement lipophiles, de petites tailles, susceptibles de diffuser à travers les membranes et d'être pris en charge par des transporteurs ABC et SLC. Du fait des faibles doses d'exposition de la population, ces composés ne saturent probablement pas les transporteurs intestinaux, hépatiques, rénaux et cérébraux, qui jouent donc un rôle majeur dans leur toxicocinétique. Leurs interactions avec les transporteurs pourraient avoir des conséquences néfastes, du fait de l'exposition chronique de la population à ces polluants et de la demi-vie longue de certains pesticides capables de s'accumuler dans les tissus. Les données disponibles dans la littérature concernant leurs interactions avec les transporteurs ABC et SLC sont répertoriées ci-dessous.

3.1. Interactions entre transporteurs et pesticides organochlorés

Les organochlorés sont des composés très lipophiles et très peu polaires et certains vont donc pouvoir traverser les membranes par diffusion passive. Leur caractère lipophile augmente également leur probabilité d'être pris en charge par des transporteurs d'efflux.

Des études ont montré un lien entre exposition aux organochlorés, variants P-gp, et risque accru de maladie de Parkinson : les interactions entre organochlorés et P-glycoprotéine ont, de ce fait, fait l'objet de beaucoup d'études dans la littérature (454). Ainsi, de nombreux organochlorés modérément lipophiles sont susceptibles de se lier efficacement au transporteur avec une haute affinité mais les composés trop lipophiles (LogP (coefficient de partage octanol/eau) du DDT≈7) ne pourront pas interagir avec la P-gp.

3.1.1. Prise en charge

Le **DDT et ses métabolites** (dichlorodiphényldichloroéthylène (DDE) et dichlorodiphényldichloroéthane (DDD)), ne sont pas substrats de P-gp ni de BCRP mais peuvent diffuser passivement et s'accumuler en intracellulaire (455–457). De même, la **dieldrine**, pesticide impliqué dans la physiopathologie de la maladie de Parkinson, n'est pas pris en charge par P-gp (456–458) et probablement pas par BCRP (456). L'endrine, son stéréoisomère, n'a pas d'effet sur l'activité ATPase de la P-gp et n'est donc probablement pas non plus pris en charge par le transporteur (457). Le DDT et le lindane sont efflués par abcc4/mrp4 chez le zebrafish (459).

La prise en charge de l'**endosulfan** par P-gp reste controversée. Lacher et al, ont montré que l'endosulfan ne module pas l'activité ATPasique de P-gp dans un modèle de membrane surexprimant P-gp et qu'il n'entraine pas de différences de toxicité entre une lignée transfectée par MDR1 et une lignée native, suggérant que le pesticide n'est pas substrat de P-gp (458). Une autre étude suggère que

l'endosulfan serait efflué par la P-gp, et est plus toxique dans les cellules natives que surexprimant le transporteur d'efflux (460). Il est donc difficile de savoir si la P-gp joue ou non un rôle important dans la détoxification des cellules exposées à l'endosulfan et potentiellement dans la protection du SNC contre ce pesticide impliqué dans la physiopathologie de la maladie de Parkinson.

Le **méthoxychlor** et ses métabolites sont des organochlorés à l'origine d'effets perturbateurs endocriniens (effets estrogéniques et anti-androgéniques) et de stress oxydant dans les cellules exposées à ses composés. Il a été montré que MRP1 jouerait un rôle important dans la protection des tubules séminifères et des spermatozoïdes contre les lésions causées par le méthoxychlor et ses métabolites (461). Les cellules NIH3T3 surexprimants MRP1 étaient 2,5 fois plus résistantes à la toxicité du méthoxychlor que les cellules MOCK, suggérant la prise en charge de ce pesticide par MRP1 (461). Des souris KO pour MRP1 exposées au methoxychlor présentaient également des altérations des spermatocytes, des spermatogonies, des spermatozoïdes, des cellules de Sertoli et des dégénérations des tubules séminifères probablement liées à un stress oxydant. A l'inverse les cellules sur-exprimant MRP1 n'étaient pas plus résistantes à la toxicité du **chlordécone**, ce qui suggère que le pesticide n'est pas pris en charge par MRP1 (461).

3.1.2.Modulation d'activité

De nombreux pesticides organochlorés subissent un cycle entérohépatique (462), et peuvent s'accumuler à fortes concentrations au niveau hépatocytaire. Ils peuvent donc interagir avec certains transporteurs hépatiques, notamment responsables de leurs sécrétions biliaires. Certains organochlorés interagissent au niveau hépatique avec OCT1, MRP2, P-gp et BCRP en bloquant leurs activités (463).

L'**heptachlor** inhibe certains transporteurs hépatiques (OCT1, MRPs, BCRP) à 100 µM mais est sans effet sur l'activité NTCP ou OATP (OATP1B1 OATP2B1) dans les cellules HepaRG (463). L'effet de l'heptachlor sur l'activité P-gp est controversé, une étude ne retrouve aucune inhibition de P-gp à 100 µM (463) alors qu'une autre montre un effet inhibiteur du pesticide et de son métabolite (heptachlor epoxyde), mais à très fortes concentrations (250 µM) (460).

Le **chlordécone** semble s'accumuler au niveau hépatique (464) à fortes concentrations (465). Ce pesticide est un inhibiteur de transporteurs d'efflux présents au niveau hépatique (P-gp (CI50=138 µM), MRP2 (MRPs) et BCRP (concentration inhibitrice 50% (CI50)=90 µM))(460,463) mais est sans effet sur l'activité des transporteurs SLC OCT1, NTCP et OATPs (OATP1B1 OATP2B1) dans les cellules HepaRG (463).

Le lindane et la dieldrine à 100 µM inhibent l'activité OCT1 (CI50=1,5 µM et CI50=0,9 µM) dans la lignée HepaRG mais ces pesticides n'ont pas d'effets sur l'activité P-gp, BCRP, MRP2 (MRPs), NTCP et OATP (OATP1B1-OATP2B1) (458,460,463).

Le **chlordane** inhibe l'activité des transporteurs MRP2 (MRPs), BCRP, OCT1 à 100 µM (463) mais n'a pas d'effet sur l'activité de la P-gp, de NTCP ou d'OATP (OATP1B1 OATP2B1) dans les cellules HepaRG (463).

Les effets inhibiteurs des isomères du **DDT** et de ses métabolites sur l'activité de la P-gp et de BCRP sont controversés (455–457,460,463,466). D'autre part, les isomères du DDT et le DDD ne modulent pas ou peu l'activité de MRP2 (456,463) et le DDT n'a pas d'effet sur l'activité des transporteurs hépatiques OCT1, NTCP et OATP (OATP1B1 OATP2B1) dans la lignée HepaRG (463). Une étude a montré que le DDT perturbe la clairance et la dégradation extracellulaire des protéines β-amyloïde en altérant la fonction du transporteur ABCA1, argument en faveur du rôle du DDT dans la physiopathologie de la maladie d'Alzheimer (467).

Le **chlordécone** 100 µM peut inhiber l'activité de MRP2 et de P-gp (463). Une étude suggère qu'une exposition à la chlordécone stimulerait l'activité des transporteurs abcg5/abcg8 chez la souris, entrainant une augmentation de la sécrétion biliaire de cholestérol (468).

L'exposition des hépatocytes de rat au **mirex** inhibe le transport d'anion organique (469) mais ce pesticide très lipophile n'est pas inhibiteur de P-gp (460).

L'**endosulfan** inhibe l'activité ATPase de BCRP (CI50=6,9 µM) et ne module pas ou peu l'activité ATPase de MRP2 (456). Le pesticide inhibe également l'activité d'OCT1, MRP2 et BCRP (CI50=24,8 µM) à 100 µM, mais n'a pas d'effet sur l'activité NTCP ou OATP (OATP1B1-OATP2B1) dans la lignée HepaRG (463). Certaines études montrent que l'endosulfan se fixe sur P-gp avec une forte affinité et est un inhibiteur puissant (CI50 de 2,8 µM à 33,6 µM) (456,460,466,470) mais deux autres études indiquent que l'endosulfan n'est pas inhibiteur de P-gp même à fortes concentrations et qu'il n'altère pas l'efflux de rhodamine 123 (458,463).

Des études indiquent que la puissance de l'inhibition de l'activité de transporteurs par les organochlorés peut varier selon le stéréoisomère testé. Ainsi, la dieldrine et son stéréoisomère l'endrine inhibent tous deux la P-gp, mais ce dernier a un effet inhibiteur plus important que la dieldrine (457).

3.1.3.Régulation d'expression

De nombreux **organochlorés** peuvent moduler l'expression de transporteurs. Le chlordane, l'heptachlor, le lindane et la dieldrine peuvent induire l'expression de la P-gp dans des lignées hépatiques (463), de même que les isomères du DDT et son métabolite le DDE (455,463) qui modulent l'expression du transporteur probablement via PXR/CAR/SXR (Steroid and Xenobiotic Receptor) (471). Certains organochlorés induisent également certains MRPs (459,463) et BCRP (463) et peuvent également réprimer l'expression de transporteurs hépatiques (OCT1, NTCP) dans la lignée HepaRG (463). Un traitement par la dieldrine ou le chlordécone induit également l'expression de transporteurs hépatiques non identifiés, augmentant ainsi la sécrétion biliaire de certains polluants (métabolites du benzo[a]pyrène) ou du pesticide lui-même (472,473).

Organochloré	Substrat	Inhibition	Régulation d'expression	Références
Chlordane		Inhibiteur MRP2 (MRPs), BCRP, OCT1 Non-Inhibiteur P-gp, NTCP, OATP (OATP1B1 OATP2B1)	Induction P-gp, MRP2, BCRP Repression NTCP et OCT1	(463)
Chlordécone	Non Substrat MRP1 Stimule activité abcg5/abcg8	Inhibiteur P-gp, MRP2 (MRPs) et BCRP Non inhibiteur OCT1, NTCP, OATP (OATP1B1 OATP2B1)	Induction de transporteurs hépatiques non identifiés chez le rat	(460,461,463 ,468,473)
DDD	Non substrat P-gp Non substrat BCRP	Inhibiteur P-gp Inhibiteur activité ATPase BCRP Non inhibiteur de MRP2		(455–457,463) (456,463)
DDE	Non substrat P-gp Non substrat BCRP	Non inhibiteur P-gp / Inhibiteur P-gp Inhibiteur activité ATPase BCRP	Induction P-gp	(455–457,460,463, 466)
DDT	Non substrat P-gp Non substrat BCRP Substrat mrp4 zebra	Inhibiteur activité ATPase BCRP / Non inhibiteur BCRP Non inhibiteur P-gp/ Inhibiteur P-gp Non inhibiteur MRP2 Non inhibiteur OCT1 Non inhibiteur NTCP Non inhibiteur OATP (OATP1B1 OATP2B1) Inhibiteur ABCA1	Induction P-gp Induction MRP2 Induction BCRP Répression NTCP Répression OCT1 Induction abcc4 zebra	(455–457,459,460, 463,466,467)
Dieldrine	Non substrat P-gp Non substrat BCRP	Inhibiteur OCT1 (CI50=0,9 µM) Non inhibiteur P-gp / inhibiteur P-gp Non inhibiteur BCRP Non inhibiteur MRP2 (MRPs) Non inhibiteur NTCP Non inhibiteur OATP (OATP1B1 OATP2B1)	Induction P-gp Induction MRP2 Induction BCRP Répression NTCP Répression OCT1 Induction de transporteurs hépatiques non identifiés chez le poisson	(456–458,460,463, 472)

Endosulfan	Substrat P-gp /Non-substrat P-gp	Inhibiteur P-gp /Non inhibiteur P-gp Inhibiteur BCRP Non inhibiteur activité ATPase MRP2/ Inhibiteur MRP2 (MRPs) Inhibiteur OCT1 Non Inhibiteur NTCP Non Inhibiteur OATP (OATP1B1 OATP2B1)	Répression NTCP Répression OCT1	(456,458,460,463,466,470)
Endrine	Non substrat P-gp	Inhibiteur P-gp		(457)
Heptachlor		Inhibiteur OCT1 Inhibiteur MRP2 (MRPs) Inhibiteur BCRP Inhibiteur P-gp/Non inhibiteur P-gp Non-inhibiteur NTCP Non-inhibiteur OATP (OATP1B1 OATP2B1)	Induction P-gp Induction MRP2 Répression NTCP Répression OCT1	(460,463)
Heptachlor epoxyde		Inhibiteur P-gp		(460)
Lindane	Substrat mrp4 zebra	Inhibiteur OCT1 (CI50=1,5 µM) Non inhibiteur P-gp Non inhibiteur BCRP Non inhibiteur MRP2 (MRPs) Non inhibiteur NTCP Non inhibiteur OATP (OATP1B1 OATP2B1)	Induction P-gp Induction MRP2 Induction BCRP Répression NTCP Répression OCT1 Induction abcc4 zebra	(458–460,463)
Méthoxychlor	Substrat MRP1	Non inhibiteur P-gp		(460,461)
Mirex		Non inhibiteur P-gp Inhibiteur de transporteur d'anions organiques non identifié		(460,469)
Toxaphène		Non- Inhibiteur P-gp		(460)

Tableau 15: Organochlorés substrats, modulateurs et régulateurs d'expression de transporteurs ABC et SLC

3.2. Interactions entre transporteurs et pesticides organophosphorés

Des études ont montré un lien entre exposition aux organophosphorés, variants P-gp et risque accru de maladie de Parkinson (454).

3.2.1.Prise en charge

Plusieurs études se sont intéressées au **diazinon**, impliqué dans la physiopathologie de la maladie de Parkinson, et ont identifié ce pesticide, comme substrat de P-gp (458,474). Le diazinon a une affinité faible (10 fois moindre que le vérapamil) pour P-gp (458) mais est efflué activement au pôle apical des cellules intestinales Caco-2 (ratio perméabilité apparente (Papp) ~1,4) pour être sécrété dans la lumière intestinale (474,475). Un OATP pourrait être impliqué dans l'uptake de diazinon dans un modèle zebrafish (476).

Le **chlorpyrifos** subit un effet de premier passage hépatique résultant en sa transformation par les cytochromes P450 en chlorpyrifos oxon (477), métabolite neurotoxique à forte affinité pour l'AchE. Le chlorpyrifos et le chlorpyrifos-oxon sont des pesticides hydrophobes qui contiennent un atome d'azote, caractéristique de xénobiotiques susceptibles d'intéragir avec la P-gp. Une étude a montré

que le chlorpyrifos-oxon à 100 µM se lie à la P-gp et stimule son activité ATPase (concentration efficace 50% (CE50)=20 µM) dans des cellules d'insectes Sf9 exprimant P-gp, pouvant suggérer sa prise en charge par la P-gp (478). A l'inverse, le chlorpyrifos ne semble pas être substrat de la P-gp (460,478), de même que le trichloropyridinol, un métabolite inactif du chlorpyrifos-oxon (478). Le chlorpyrifos et le chlorpyrifos-oxon diffèrent par la substitution d'un oxygène par un atome de soufre, rendant plus électrophile le groupement du métabolite, pouvant expliquer les différences dans les interactions avec P-gp des deux composés. Toutefois, le chlorpyrifos-oxon étant 1000 fois plus soluble dans l'eau que le chlorpyrifos, il est difficile de conclure quant aux données *in-vitro* de ces études sur le chlorpyrifos qui est ici utilisé (100 µM-1 mM) bien au-delà de sa limite de solubilité située autour de 2-5 µM (479). Le chlorpyrifos est pris en charge par le transporteur rbABCG2 chez le lapin (480).

Une étude suggère que le **fenitrothion** est pris en charge par MRP1 (modèle zebra) (461).

Des études faites sur le modèle zebrafish montrent que le **malathion** est pris en charge par le transporteur oatp1d1 du zebrafish (476) et le **parathion-méthyl** pourrait être pris en charge par P-gp et mrp4 (481).

3.2.2.Modulation d'activité

De nombreux organophosphorés ont été montrés inhibiteurs de P-gp (**chlorthiophos** (250 µM), **leptophos** (250 µM), **fénamiphos** (250 µM), **dicapthon** (250 µM), **parathion** (250 µM), dans une lignée murine B16/F10 transfecté avec le gène codant pour la P-gp (460). Les organophosphorés de plus faible poids moléculaire et plus hydrophiles comme le **mévinphos** (250 µM), le **diméthoate** 100 µM, le **malathion** 100 µM ou le **phosmet** (250 µM) n'inhibent pas P-gp (182,334). Le **phosalone** (CI50=3,0 µM) et le **parathion-méthyl** (CI50=3,4 µM) sont des inhibiteurs puissants de P-gp *in vitro,* ayant une forte affinité pour cette pompe (466,470). Le **chlorpyrifos** et le **chlorpyrifos-méthyl** sont des inhibiteurs de P-gp (460,466), le chlorpyrifos inhibe l'efflux médié par rbABCG2 (480) et le **chlorpyrifos-méthyl** et le **malathion** bloquent l'activité de l'oatp1d1 de zebrafish (476).

Une étude sur cellules MDCK exprimant le transporteur rbABCG2 de lapin a montré que le **diméthoate**, et le **toclofos-méthyl** étaient capables d'inhiber l'efflux médié par rbABCG2 (480).

Les données de la littérature divergent quant à l'effet inhibiteur du **diazinon** vis-à-vis de la P-gp *in vitro*, une étude montre que le diazinon n'altère pas l'efflux de rhodamine 123 même à fortes concentrations (458). Deux autres études suggèrent que le diazinon est un inhibiteur faible de la P-gp dans une lignée de fibroblaste murin transfectée avec MDR1 (CI50 = 58,4 µM) et dans la lignée Caco-2 (466,474). Le diazinon est également inhibiteur de l'oatp1d1 du zebrafish (476).

3.2.3.Régulation d'expression

De nombreux organophosphorés sont également susceptibles de réguler l'expression de transporteurs ABC. Ainsi, l'exposition au **diazinon** induit l'expression de P-gp notamment dans des lignées humaines intestinales et chez le rat, causant une hausse de l'efflux médié par le transporteur (474,475,482). La cytotoxicité du pesticide s'en trouve diminuée (475). De même, le chlorpyrifos active CAR (483) et l'exposition au pesticide augmente l'expression de la P-gp dans le rein (tubule proximal), la glande surrénale, le foie (canaux biliaires) et le système gastrointestinal chez le rat (478) et dans les cellules intestinales et placentaires humaines (484,485). Comme le **chlorpyrifos** est rapidement métabolisé en chlorpyrifos-oxon, ce dernier est peut être également responsable de la hausse d'expression de P-gp *in vivo*, mais cela n'a pas pu être vérifié du fait de la forte toxicité du composé administré par voie orale (478). D'autres études semblent indiquer une induction transitoire de P-gp par le **chlorpyrifos-oxon** sur cellules Caco-2 et cellules de zebrafish (484). Le chlorpyrifos induit également l'expression de BCRP dans des cellules placentaires humaines (485,486) et induit l'expression d'un transporteur mrp chez l'oiseau (487).

Pesticide	**Substrat**	**Inhibition**	**Régulation d'expression**	**Références**
Chlorpyrifos	Non substrat de P-gp Substrat de rbABCG2	Inhibiteur de P-gp Inhibiteur de rbABCG2	Active CAR Induction abcc1 chez l'oiseau Induction P-gp Induction BCRP	(460,478,480, 483–487)
Chlorpyrifos-oxon	Stimulation activité ATPase de la P-gp (CE50=20 µM)		Induction transitoire et faible de P-gp	(478,484)
Chlorpyrifos-méthyl		Inhibiteur de P-gp Inhibiteur oatp1d1 zebra		(466,476)
Chlorthiophos		Inhibiteur de P-gp		(460)
Diazinon	Substrat de P-gp Substrat d'un OATP (oatp1d1 zebra)	Non inhibiteur de P-gp / Inhibiteur de P-gp Inhibiteur oatp1d1 zebra	Induction P-gp	(458,466,474–476,482)
Dicapthon	Non substrat de P-gp	Inhibiteur de P-gp		(460)
Diméthoate		Non-Inhibiteur de P-gp Inhibiteur rbABCG2		(460,466,480)
Fenamiphos		Inhibiteur de P-gp		(460)
Fenitrothion	Substrat MRP1			(461)
Leptophos		Inhibiteur de P-gp		(460)
Malathion	Substrat oatp1d1 zebra	Non-Inhibiteur de P-gp Inhibiteur oatp1d1 zebra		(460,466,480)
Mevinphos		Non-Inhibiteur de P-gp		(460,466)
Parathion	Non substrat de P-gp	Inhibiteur de P-gp		(460)
Parathion-méthyl	Substrat P-gp zebra Substrat mrp4 zebra	Inhibiteur de P-gp		(466,470,481)
Phosalone		Inhibiteur de P-gp		(466,470)
Phosmet		Non-Inhibiteur de P-gp		(182,334)
Toclofos-méthyl		Inhibiteur rbABCG2		(480)
Trichloropyridinol	Non substrat de P-gp			(478)

Tableau 16: Organophosphorés substrats, modulateurs et régulateurs d'expression de transporteurs ABC et SLC

3.3. Interactions entre transporteurs et pesticides pyréthrinoïdes

Peu de choses sont connues sur la toxicocinétique des pyréthrinoïdes. Leur importante lipophilie pourrait suggérer une diffusion passive importante au niveau des barrières biologiques, et de potentielles interactions avec les transporteurs d'influx et d'efflux au niveau intestinal, hépatique et rénal. Des publications récentes indiquent que certains pyréthrinoïdes sont susceptibles d'interagir avec certains transporteurs membranaires notamment au niveau intestinal.

3.3.1. Prise en charge

Un travail récent sur cellules Caco-2 a mis en évidence que la **deltaméthrine, cis-perméthrine**, et la **trans-perméthrine** seraient substrats de transporteur(s) d'influx, non identifié(s), localisés au pôle luminal des cellules intestinales (488). Les valeurs de Papp sur lignée Caco-2 de ces trois pesticides sont proches du mannitol, indiquant une perméabilité faible de ces composés et donc une absorption réduite au niveau intestinal malgré leur prise en charge par un transporteur d'influx (488).

Les études s'intéressant aux interactions des pyréthrinoïdes avec la P-gp montrent que cette classe de pesticide est peu prise en charge par ce transport d'efflux, du fait, entre autre, de la trop haute lipophilie de certains pyréthrinoïdes. En effet, les pyréthrinoides très lipophiles (LogP> 4,5), sont probablement piégés dans la double couche de la membrane plasmique limitant leur potentiel de transport avec la P-gp.

Ainsi, le transport de la **deltaméthrine** et de la **perméthrine** (LogP 6,1 et 6,5 respectivement) au niveau intestinal n'implique pas la P-gp ou de façon très marginale pour la trans-perméthrine (488). Les deux pesticides ne stimulant pas l'activité ATPase de BCRP, ils ne sont probablement pas substrats de ces deux transporteurs (456). De même que la **resméthrine**, sans effet sur l'activité ATPase de BCRP et P-gp, n'est probablement pas substrat de ces deux transporteurs (456).

La **cyperméthrine** et le **fenvalérate** stimulent l'activité ATPase de la P-gp, ce qui pourrait indiquer leurs prises en charge par P-gp, mais aucune différence de toxicité de ces pesticides n'a été détectée *in vitro* entre cellules surexprimant P-gp et cellules natives (470). Aussi, la cyperméthrine ne module pas l'activité ATPase de BCRP et n'est donc probablement pas substrat de ce transporteur (456).

3.3.2.Modulation d'activité

La **cis-perméthrine** et la **trans-perméthrine** n'inhibent pas la P-gp sur cellules Caco-2 à 10 µM (488). De très fortes concentrations (250 µM) de perméthrine inhibent modestement l'efflux de doxorubicine dans la lignée murine B16/F10 transfectées avec le gène MDR1 (460). La perméthrine n'inhibe pas l'activité ATPase de la P-gp (456) mais elle inhibe l'activité ATPase de la BCRP (CI50=7 µM) (456).

La **deltaméthrine**, n'est pas un inhibiteur de P-gp (à 10 µM sur cellules Caco-2 et activité ATPase à 100 µM) (456,488) et n'inhibe pas l'activité ATPase de BCRP (456).

La **resméthrine** n'inhibe pas l'activité ATPase de la P-gp (456) mais inhibe l'activité ATPase de la BCRP (CI50= 5,6 µM) (456).

La **cyperméthrine** et le **fenvalérate** possèdent une affinité élevée pour P-gp et inhibent l'efflux médié par ce transporteur (cyperméthrine CI50=5,3 µM ; fenvalérate CI50=33 µM) selon certaines études (466,470) mais d'autres travaux ne retrouvent pas ces inhibitions (pas d'inhibition de l'activité ATPase par la cyperméthrine) (456,460). Ces différences peuvent s'expliquer par les différences de substrats utilisés (doxorubicine et tetramethylrosamine), de concentrations utilisées et/ou l'espèce de la P-gp (hamster) du modèle.

Quant au **fluvalinate**, à très fortes concentrations (250µM), il inhibe modestement l'efflux de doxorubicine dans la lignée murine B16/F10 transfectée avec le gène MDR1 (460).

3.3.3. Régulation d'expression

Les pyréthrinoïdes ont été peu étudiés en ce qui concerne la régulation d'expression des transporteurs. La **cyperméthrine** et la **deltaméthrine** interagissent avec CAR et la voie Nrf2 (nuclear factor erythroid-2-related factor 2) (483,489) et seraient donc susceptibles de moduler l'expression de certains transporteurs notamment certains MRPs, OATPs ou la BCRP.

Pyréthrinoïde	**Substrat**	**Inhibition**	**Régulation d'expression**	**Références**
Cyperméthrine	stimule l'activité ATPase P-gp ne stimule pas l'activité ATPase BCRP	Inhibiteur P-gp Non inhibiteur activité ATPase P-gp	Active CAR	(456,470,483)
Deltaméthrine	Substrat de transporteur(s) d'influx intestinaux non identifié(s) Non substrat de P-gp Ne stimule pas l'activité ATPase de BCRP	Non inhibiteur de P-gp Non inhibiteur activité ATPase de BCRP	Active voie Nrf2	(456,488,489)
Fenvalérate	stimule modéremment l'activité ATPase de la P-gp	Inhibiteur P-gp/Non inhibiteur P-gp		(460,466,470)
Fluvalinate		Inhibiteur P-gp		(460)
Perméthrine	Substrat de transporteur(s) d'influx intestinaux non identifié(s) Non substrat de P-gp ou substrat faible pour la trans-perméthrine ne stimule pas l'activité ATPase de BCRP	Non inhibiteur P-gp / Inhibiteur P-gp Inhibiteur activité ATPase BCRP		(456,460,488)
Resméthrine	ne stimule pas l'activité ATPase de BCRP ni de P-gp	Non inhibiteur activité ATPase P-gp Inhibiteur activité ATPase BCRP		(456)

Tableau 17: Pyréthrinoïdes substrats, modulateurs et régulateurs d'expression de transporteurs ABC et SLC

3.4. Interactions entre transporteurs et pesticides carbamates

La famille des carbamates est peu étudiée du point de vue du transport.

3.4.1. Prise en charge

Peu de données sont disponibles concernant la prise en charge des carbamates par les transporteurs ABC et SLC. Ces pesticides étant peu lipophiles et de petites tailles, ils sont moins susceptibles d'interagir avec la P-gp. Ainsi, le **maneb** (LogP~0,6)**,** dithiocarbamate impliqué dans la physiopathologie de la maladie de Parkinson, n'est pas substrat de P-gp (458). Une étude a également montré que des cellules NIH3T3 surexprimant MRP1 étaient trois fois plus résistantes à la toxicité du **chlorpropham** que les cellules MOCK, ce qui suggère que ce pesticide est pris en charge par MRP1 (461). Aussi, le **carbaryl** est pris en charge par un OATP dans un modèle zebrafish (476).

3.4.2. Modulation d'activité

Peu de carbamates semblent interagir avec la P-gp. Ainsi, l'**aldicarbe** (250 µM), l'**aldoxycarbe** (100 µM), l'**aminocarbe** (250 µM), le **carbaryl** (100 µM), le **méthomyl** (100 µM), le **O-Nitrophenyl N,N-diméthylcarbamate** (100 µM) et le **propoxur** (250 µM) et le **maneb** (250 µM) ne sont pas inhibiteurs de P-gp (458,460,466). Le **fénoxicarbe**, plus lipophile (LogP~4,3), semble être un inhibiteur faible de P-gp (466) et le **carbofuran** inhibe l'activité P-gp dans une lignée cellulaire de zebrafish ZF-L (490). Des données *in vivo* indiquent que certains carbamates (**méthiocarbe, propamocarbe**) peuvent inhiber l'efflux médié par la BCRP chez le lapin (480) et le **carbaryl** est capable de bloquer l'activité de l'oatp1d1 de zebrafish (476).

3.4.3. Régulation d'expression

Seul le **carbofuran** a été montré modulateur de l'expression de la P-gp dans un modèle zebrafish (490).

Carbamates	Substrat	Inhibition	Régulation d'expression	Références
Aldicarbe		Non Inhibiteur P-gp		(460,466)
Aldoxycarbe		Non Inhibiteur P-gp		(460,466)
Aminocarbe		Non Inhibiteur P-gp		(460,466)
Carbaryl	Substrat oatp1d1 zebra	Non Inhibiteur P-gp Inhibiteur oatp1d1 zebra		(460,466,476)
Carbofuran		Inhibiteur P-gp zebra	Induction P-gp zebrafish	(490)
Chlorpropham	Substrat MRP1			(461)
Fénoxicarbe		Inhibiteur P-gp		(466)
Maneb	Non substrat de P-gp	Non inhibiteur de P-gp		(458)
Méthiocarbe		Inhibiteur rbABCG2		(480)
Méthomyl		Non Inhibiteur P-gp		(460,466)
O-Nitrophenyl-N,N-dimethylcarbamate		Non Inhibiteur P-gp		(460,466)
Propamocarbe		Inhibiteur rbABCG2		(480)
Propoxur		Non Inhibiteur P-gp		(460,466)

Tableau 18: Carbamates substrats, modulateurs et régulateurs d'expression de transporteurs ABC et SLC

3.5. Interactions entre transporteurs et les autres classes de pesticides

3.5.1. Prise en charge

Les **pesticides néonicotinoïdes** sont très peu étudiés dans la littérature du point de vue de leur transport. Une étude a montré que l'imidacloprid était rapidement et massivement absorbé sur cellules Caco-2 (Papp 21,6 x 10^{-6} cm/s) suggérant une absorption rapide et complète *in vivo* chez l'humain (491). L'uptake apical de l'imidacloprid impliquerait des transporteurs actifs et passifs, et le pesticide serait également efflué activement par un transporteur non identifié, qui n'est pas bloqué par les inhibiteurs de P-gp et des MRPs (491).

Les **chloroacétanilides** sont des composés relativement lipophiles (log P∼3) qui diffusent passivement à travers les membranes. L'**acétochlor** a une perméabilité apparente (A–B) de 6×10^{-5} cm/s sur cellules Caco-2. Les métabolites conjugués de l'**acétochlor** et du **métolachlor** sont pris en charge par MRP1 (492,493). Ce transporteur a donc probablement un rôle important dans la détoxification de l'acétochlor chez l'humain, en sécrétant le métabolite dans le sang et en empêchant la bioactivation de l'acétochlor notamment au niveau hépatique (492). Le **prynachlor** stimule de façon minime l'activité ATPasique de P-gp (492), suggérant sa prise en charge par le transporteur, à l'inverse du **propachlor** et du **dimétachlor**, qui ne stimulent pas l'activité ATPasique de P-gp (492). Une étude a montré que le métolachlor est transporté par oatp1d1 du zebrafish (476).

Les **herbicides chlorophénoxylés** sont généralement rapidement absorbés par voie orale (494,495). Le **MCPA** (acide 2-méthyl-4-chlorophénoxyacétique)**, le 2,4-D** (acide 2,4-dichlorophénoxyacétique)**, le 2,4,5-T** (acide 2,4,5-trichlorophénoxyacétique), le **4-CPA** (acide 4-chlorophénoxyacétique) et le **triclopyr**, sont absorbés au niveau du pôle apical des lignées intestinales Caco-2 via des transporteurs MCTs distincts de MCT1–MCT4 (496–498). L'influx du **dicamba** par les cellules Caco-2 apparaît être majoritaire par diffusion passive, et dans une moindre mesure via des MCTs (496). Le 2,4-D est pris en charge par oat3 dans un modèle murin (499).

Le **paraquat** est un cation divalent qui induit, entre autres, un stress oxydant responsable d'effets toxiques chez l'homme, notamment en s'accumulant au niveau du poumon, du foie et du rein. Le paraquat est éliminé par voie rénale, et est responsable d'altérations morphologiques tubulaires et de perturbations du fonctionnement du rein (500,501). Le pesticide a été montré substrat des transporteurs OCT2 et MATE1 qui permettent son excrétion rénale (412,502). Dans une étude chez la souris KO-mate1, le pesticide s'accumule au niveau intracellulaire et sa néphrotoxicité apparaît augmentée (502). OCT2 et MATE1 jouent un rôle majeur dans l'accumulation rénale du paraquat et de ce fait dans sa demi-vie systémique et sa toxicité rénale (412,502). Des individus possédant un polymorphisme pour OCT2 n'ont pas le même profil de toxicité lié au paraquat (412). D'autre part, le

paraquat semble être un substrat faible d'OCT1 mais son accumulation hépatique est probablement due à un autre transporteur de cations (412).

Du fait de sa relative hydrophilie, le **paraquat** n'interagit pas avec la P-gp : il n'est probablement pas transporté par le transporteur d'efflux (503) même si certaines études suggèrent sa prise en charge (504–508). Des études montrent que le paraquat traverse l'intestin et la BHE via un système de transport des acides aminés non identifiés (système L, y+, b0, A et ASC…) (506,509,510).

L'herbicide cyperquat **MPP+** a été montré comme étant à l'origine de symptômes parkinsoniens (511,512) et une étude l'a identifié comme substrat de P-gp (458), avec une augmentation de la toxicité du pesticide observée dans les cellules exprimant P-gp par rapport aux cellules natives (458). D'autre part, OCT1, OCT2 et OCT3 sont responsables de l'uptake du MPP+ chez l'homme et le rongeur (513–515). Une étude a montré que les effets délétères du MPP+ sur les neurones dopaminergiques sont atténués par sa prise en charge par VMAT2 (Vesicular monoamine transporter 2) (516). VMAT2 séquestre MPP+ dans des vésicules l'empêchant ainsi d'atteindre la mitochondrie et d'exercer ces effets toxiques (516) ; VMAT2 a donc un rôle dans la neuroprotection des toxiques.

Des études sur lignée Caco-2 (517), chez la souris KO- MDR1 (518) et chez certains chiens (colleys) ayant une P-gp non fonctionnelle (519,520), ont montré que l'**ivermectine** est efflué par la P-gp, notamment au niveau de la BHE (521), mais d'autres études *in vitro* n'ont pas retrouvé ce résultat (458,460). Chez des souris KO-mdr1 exposées au pesticide, l'ivermectine s'accumule à fortes concentrations dans le cerveau et le foie et est à l'origine d'effets toxiques (518,521). Les chiens hypersensibles à l'ivermectine n'effluent pas correctement le pesticide au niveau de la BHE (519) et présentent des concentrations cérébrales 10 à 100 fois plus élevées que les autres chiens exposés à la même dose de pesticide, entrainant des symptômes neurologiques pouvant conduire à la mort de l'animal. Il n'y a pas de preuve de l'existence de variants de P-gp qui résulteraient en une perte de fonction du transporteur chez l'homme, comme cela a pu être observé chez la souris ou le chien. De ce fait, même les individus porteurs de gènes variants de la P-gp ne devraient pas avoir une plus grande sensibilité à la toxicité neurologique de l'ivermectine que le reste de la population (522). D'autres antihelminthiques de la famille des avermectines sont substrats de la P-gp, c'est le cas de la **selamectine** (517,521). La selamectine s'accumule fortement dans le cerveau des souris KO pour mdr1, mais dans une moindre mesure que l'ivermectine (521). La P-gp endothéliale de la BHE a un rôle important dans la protection des neurones contre les lésions générées par ces pesticides.

Des études ont identifié le **spinosad** et le **roténone** comme substrats de haute affinité pour P-gp (comparable à celle du verapamil pour le roténone) (458,523).

L'**arsenic** a été montré comme substrat d'OATP1B1 (524), de la P-gp sur souris KO MDR1 (525), de MRP1 (526,527) et MRP2 (528,529), mais des études sur souris KO ont montré que MRP1 ne prend pas en charge l'arsenic et l'antimoine (530).

3.5.2. Modulation d'activité

Les **triazines** sont des pesticides très hydrophiles et de ce fait interagissent peu avec la P-gp (460), probablement du fait de leur faible diffusion dans les cellules. Ainsi, l'**atrazine** (250 µM) n'est pas inhibiteur de P-gp dans une lignée murine B16/F10 transfectée avec le gène codant pour la P-gp (460).

Les **chloroacétanilides** interagissent facilement avec la P-gp du fait de leur lipophilie ≈3 (plusieurs études montrent que les inhibiteurs de P-gp ont un LogP compris entre 3,6 et 4,5 (460)). **L'acétochlor, l'alachlor, le métazachlor et le métolachlor** sont des inhibiteurs de P-gp, le métazachlor ayant une affinité plus faible pour P-gp que les autres composés (492). Ces pesticides peuvent inhiber l'efflux médié par la P-gp et augmentent la perméabilité apparente de la digoxine dans les cellules intestinales Caco-2 suggérant leur faculté de moduler l'absorption de médicaments ou de xénobiotiques substrats de P-gp (492). Ces inhibiteurs ont un comportement biphasique. Ils stimulent l'activité ATPase à faibles concentrations et la diminuent aux concentrations supérieures à 100 µM (492). Le métolachlor a également été montré inhibiteur de l'activité oatp dans un modèle zebrafish (476).

Les modulations d'activités des transporteurs par les **néonicotinoïdes** ne sont pas caractérisées, seule une étude montre que l'**imidacloprid** ne module pas l'activité ATPase de BCRP (456).

MPP+ n'est pas inhibiteur de P-gp (efflux de rhodamine 123) même à fortes concentrations (458) mais est inhibiteur d'OCT2 (531).

L'**ivermectine** a également été identifié comme un puissant inhibiteur des activités P-gp et BCRP (CI50=0,1-0,25 µM pour P-gp et 1-1,5 µM pour BCRP) (458,460,517,532,533). D'autres antihelminthiques de la famille des avermectines sont inhibiteurs de la P-gp, c'est le cas de la **selamectine** (CI50=0,1 µM) (517,521).

Le **spinosad** est un inhibiteur puissant de P-gp (523) et le **propiconazole et ses métabolites** sont des inhibiteurs de P-gp *in vitro* selon deux études (466,534), mais ce résultat n'est pas retrouvé dans une autre étude (460). Le **glyphosate** n'inhibe pas, ou faiblement, l'activité P-gp dans une lignée de zebrafish ZF-L (490).

3.5.3. Régulation d'expression

De nombreux pesticides sont également susceptibles de réguler l'expression de transporteurs ABC et SLC. Le fongicide **prochloraz** induit l'expression de la P-gp et BCRP (via AhR) (535,536), alors que l'imazalil, pesticide de la même classe n'est pas un ligand d'AhR (537). Le néonicotinoïde **imidacloprid** pourrait être à l'origine d'induction de MRPs (induit l'expression d'abcc1 chez l'oiseau) (487) et l'exposition au **fipronil** conduit à une induction d'expression médiée par CAR et PXR de nombreux transporteurs hépatiques chez le rat pouvant potentiellement contribuer à une hausse de la clairance des hormones thyroïdiennes (538). L'**arsenic** induit l'expression de MRP2 au niveau hépatique (539) peut être via Nrf2 (540), ce qui pourrait accélérer sa propre élimination hépatique et l**'arsenite de sodium et le chloride de cadmium** peuvent induire P-gp au niveau rénal potentiellement par la voie Nrf2 (541).

Pesticide	Substrat	Inhibition	Régulation d'expression	Références
2,4,5-T	Substrat MCTs		Induction rmrp2	(496,498,542)
2,4-D	Substrat MCTs Substrat oat3			(496,498,499)
4-CPA	Substrat MCTs			(498)
Acétochlor	Substrat de MRP1 (métabolites conjugués)	Inhibiteur P-gp Non inhibiteur de BCRP Non inhibiteur de MRP1-2		(492)
Acide perfluorooctane sulfonique (PFOS)	Substrat oatp1d1 zebra	Inhibiteur oatp1d1 zebra		(476)
Acide perfluoro-octanoïque (PFOA)		Inhibiteur oatp1d1		(476)
Alachlor		Inhibiteur P-gp Non inhibiteur de BCRP Non inhibiteur de MRP1-2		(492)
Antimoine	Substrat MRP1 /Non substrat MRP1			(526,527,530,543)
Arsenic	Substrat d'OATP1B1 Substrat de la P-gp Substrat MRP1 Non substrat MRP1 Substrat MRP2		Induction MRP2 Induction P-gp	(524–530,539,541,543)
Atrazine		Non inhibiteur P-gp Inhibiteur oatp1d1 zebra		(460,476)
Azoxystrobin		Inhibiteur rbABCG2		(480)
Cadmium chloride			Induction P-gp	(541)
Carbendazim		Inhibiteur rbABCG2		(480)
Chlorméquat		Inhibiteur rbABCG2		(480)
Clotrimazole	Non substrat de P-gp	Inhibiteur P-gp		(460)
Dicamba	Substrat MCTs			(496)
Diflufenican		Inhibiteur rbABCG2		(480)
Dimétachlor	Ne stimule pas l'activité ATPasique de P-gp	Non inhibiteur de BCRP Non inhibiteur de MRP1-2		(492)
Diméthomorph		Inhibiteur rbABCG2		(480)
Dinocap	Non substrat MRP1			(461)
Dithianon		Inhibiteur rbABCG2		(480)
Diuron	Substrat oatp1d1 zebra	Inhibiteur oatp1d1 zebra		(476)
Fipronil			Induction transporteurs hépatiques chez le rat (Abcc2, Abcc3, Abcg5, Abcg8, Slco1a1 et Slco1a4)	(538)
Glyphosate		Non inhibiteur ou inhibiteur faible P-gp zebra		(490)
Hydraméthylnon	Non substrat de P-gp	Inhibiteur P-gp		(460)
Imazalil		Non inhibiteur MRP2/BCRP Non inhibiteur P-gp		(537)
Imidacloprid	Substrat de transporteurs d'influx et d'efflux non identifiés sur Caco-2 Non substrat P-gp Non subtrat MRP Ne module pas l'activité ATPase de BCRP		Induction abcc1 chez l'oiseau	(456,487,491)
Ioxynil		Inhibiteur rbABCG2		(480)

Pesticide	Substrat	Inhibition	Régulation d'expression	Références
Ivermectine	Substrat P-gp / Non substrat P-gp Non substrat rbcrp	Inhibiteur P-gp Inhibiteur BCRP		(458,460,517,519,521,532,533)
Linuron		Non inhibiteur P-gp		(466)
MCPA	Substrat MCTs distinct de MCT1–MCT4			(497)
Mercure	Substrat MRP1			(526)
Métazachlor		Inhibiteur P-gp Non inhibiteur de BCRP Non inhibiteur de MRP1-2		(492)
Métolachlor	Substrat de MRP1 (métabolites conjugués) Substrat oatp1d1 zebra	Inhibiteur P-gp Inhibiteur oatp1d1 zebra Non inhibiteur de BCRP Non inhibiteur de MRP1-2		(476,492,493)
MPP+	Substrat OCT1 Substrat OCT2 Substrat OCT3 Substrat P-gp Substrat VMAT2 Ne stimule pas activité ATPase P-gp	Inhibiteur OCT2		(458,513–516,531)
Paraquat	Substrat P-gp /Non Substrat P-gp Substrat OCT2 Substrat MATE1 Substrat faible OCT1 Substrat d'un système de transport des acides aminés non identifié	Non inhibiteur P-gp		(412,460,502–510)
Pentachlorophénol	Non substrat MRP1	Non inhibiteur de P-gp		(460,461)
Prochloraz			Induction p-gp Induction ABCG2	(535,536)
Propachlor	Ne stimule pas l'activité ATPasique de P-gp	Non inhibiteur de BCRP Non inhibiteur de MRP1-2		(492)
Propiconazole	Non substrat de P-gp	Inhibiteur P-gp / Non inhibiteur P-gp		(460,466,534)
Prynachlor	Stimule légèrement activité ATPasique de P-gp	Non inhibiteur de BCRP Non inhibiteur de MRP1-2		(492)
Rimsulfuron		Inhibiteur rbABCG2		(480)
Roténone	Substrat P-gp	Non inhibiteur P-gp		(458)
Sélamectine	Substrat P-gp Non substrat bcrp murin	Inhibiteur P-gp		(517,521)
Spinosad	Substrat P-gp	Inhibiteur P-gp		(523)
Tétrachlorohydroquinone		Inhibiteur P-gp		(460)
Triclopyr	Substrat MCTs distincts de MCT1–MCT4			(496)
Vinclozolin		Non inhibiteur de P-gp		(460)
Warfarin	Non substrat MRP1			(461)

Tableau 19: Autres pesticides substrats, modulateurs et régulateurs d'expression de transporteurs ABC et SLC

3.6. Effets de combinaisons de pesticides sur les transporteurs

Certains composés peuvent avoir des effets additifs, synergiques ou antagonistes quand ils sont formulés sous forme de mélange. L'association binaire de certains pesticides a été montrée synergique sur l'inhibition de P-gp. Le diazinon en combinaison avec l'endosulfan, le phosalone ou le propiconazole a un effet synergique sur l'inhibition de P-gp (466).

Les cellules exposées à un mélange carbofuran-glyphosate présentaient une inhibition plus importante de l'activité de la P-gp par rapport au glyphosate seul mais plus faible que celle du carbofuran seul (490). Les auteurs de l'article en ont conclu que le mélange cause une synergie des effets du glyphosate et un antagonisme des effets du carbofuran (490). Le mélange de carbofuran-glyphosate induisait également une augmentation de l'expression de la P-gp dans cette étude (490).

Au final, les interactions de ces pesticides avec les transporteurs d'influx et d'efflux restent peu étudiées alors qu'elles pourraient avoir des conséquences en termes d'interactions avec des substrats endogènes comme des hormones (catécholamines), ou exogènes comme les médicaments ou des co-contaminants environnementaux. Ces interactions pourraient être à l'origine d'effets perturbateurs endocriniens ou neurotoxiques décrits pour les pesticides. Il convient de noter également que très peu d'interactions potentielles avec les transporteurs d'influx ont été recherchées.

4. Objectifs de l'étude

Les pyréthrinoïdes et les organophosphorés sont des insecticides très largement employés en France et dans le monde et sont à l'origine d'une imprégnation forte de la population, exposée à ces contaminants via l'alimentation.

La toxicité aiguë de ces pesticides chez l'homme est très largement documentée. En revanche, les conséquences sanitaires d'une exposition chronique de la population font l'objet de débat et de plus en plus d'études les impliquent dans des maladies chroniques et des troubles du développement de l'enfant.

Paradoxalement, peu de données de toxicocinétique sont disponibles pour ces pesticides et leur devenir biologique chez l'homme est mal connu. Nous avons une connaissance limitée de leur mode d'entrée et d'expulsion des cellules et de leur passage des barrières hémato-tissulaires. Ces dernières ont pour fonction de leur restreindre l'accès à la circulation générale et à des sanctuaires comme le cerveau, les testicules ou encore au fœtus. Les transporteurs ABC et SLC sont très présents au niveau de ces barrières biologiques et sont susceptibles d'affecter la biodisponibilité des contaminants environnementaux ainsi que leur distribution tissulaire et leur élimination, paramètres conditionnant leur potentiel toxique. Un des objectifs de notre étude a été de déterminer si des insecticides de ces deux familles, pouvaient être pris en charge par ces transporteurs (P-gp, OCTs), et ainsi appréhender la relevance des transporteurs dans la toxicocinétique de ces pesticides.

D'autre part, il a été montré dans la littérature que la fonctionnalité des transporteurs membranaires peut être affectée par des xénobiotiques (polluants, médicaments). L'inhibition ou la stimulation de l'activité d'un transporteur peut ainsi conduire à des perturbations du transport de substrats endogènes (hormones, neurotransmetteurs) et à l'altération de la pharmacocinétique de médicaments et de la toxicocinétique de polluants, pris en charge par ces protéines de transport. Ces dérèglements peuvent être à l'origine d'effets néfastes pour les cellules, et aboutir à des effets indésirables ou des interactions médicamenteuses. Un objectif de notre étude a donc été de caractériser les effets d'insecticides des familles des pyréthrinoïdes et des organophosphorés sur l'activité de transporteurs ABC et SLC prenant en charge des médicaments (P-gp, BCRP, MRPs, OATP-1B1,-2B1,-1B3, OCT1-3, OAT1, OAT3, MATE1 et MATE2K) et d'envisager leurs potentielles contributions aux effets toxiques de ces pesticides. Notre étude s'est également attachée à définir les effets de combinaison de pesticides sur l'activité des transporteurs, et à caractériser, par des expérimentations *in vitro* et *in silico,* les mécanismes des interactions et les éléments structuraux des pesticides à l'origine de ces effets.

CHAPITRE II : INTERACTIONS DES PYRÉTHRINOÏDES AVEC LES TRANSPORTEURS ABC et SLC

1. Résumé

Les pyréthrinoïdes sont des insecticides très utilisés et auquels les humains sont fortement exposés. Ces pesticides sont susceptibles d'altérer l'expression de certaines enzymes métaboliques et certaines données suggèrent que les transporteurs de médicaments, effecteurs majeurs du système de détoxification des xénobiotiques, puissent être également une cible de ces pesticides.

Notre étude a, par conséquent, été conçue dans le but de déterminer les effets de ces insecticides sur l'activité des principaux transporteurs ABC et SLC *in vitro*.

Nos résultats montrent que les pyréthrinoïdes alléthrine et tétraméthrine peuvent bloquer l'activité de nombreux transporteurs ABC et SLC, parmi lesquels MRP2, BCRP, OATP1B1, OAT3, MATE1, OCT1 et OCT2. Les CI50 obtenues vont de 2,6 µM (inhibition d'OCT1 par l'alléthrine) à 77,6 µM (inhibition d'OAT3 par la tétraméthrine) et sont de fait plus élevées que les concentrations plasmatiques de pyréthrinoïdes détectées chez l'homme exposé à ces pesticides (de l'ordre du nanomolaire). De plus, l'alléthrine et la tétraméthrine ont cis-stimulé l'activité OATP2B1, faiblement inhibé l'activité P-gp et n'ont eu aucun effet sur l'activité des transporteurs OATP1B3, OAT1 et MATE2K. Douze autres pyréthrinoïdes utilisés à 100 µM ont inhibés faiblement (moins de 50%) ou n'ont pas eu d'effet sur l'activité des transporteurs testés.

L'analyse *in silico* des relations structure-activité a mise en évidence des paramètres moléculaires, notamment la masse moléculaire et la lipophilie, associés à l'inhibition de l'activité des transporteurs par l'alléthrine et la tétraméthrine, et a permis de prédire l'effet inhibiteur de deux pyréthrinoïdes, la pralléthrine et l'imiprothrine, sur les transporteurs d'intérêt.

Au final, notre étude montre que deux pyréthrinoïdes, l'alléthrine et la tétraméthrine, peuvent altérer l'activité de nombreux transporteurs ABC et SLC, mais uniquement à fortes concentrations. De ce fait, la contribution de ces effets à la toxicité de ces pesticides chez l'homme exposé de façon environnementale est peu probable.

Article. Inhibition des activités des transporteurs humains par les pyréthrinoïdes alléthrine et tétraméthrine

"Inhibition of Human Drug Transporter Activities by the Pyrethroid Pesticides Allethrin and Tetramethrin"

Lisa Chedik, Arnaud Bruyere , Marc Le Vee , Bruno Stieger , Claire Denizot , Yannick Parmentier , Sophie Potin, Olivier Fardel

Publication dans le journal: *Plos One 2017 Jan 18;12(1):e0169480*

PLOS ONE

RESEARCH ARTICLE

Inhibition of Human Drug Transporter Activities by the Pyrethroid Pesticides Allethrin and Tetramethrin

Lisa Chedik[1,2], Arnaud Bruyere[1], Marc Le Vee[1], Bruno Stieger[3], Claire Denizot[4], Yannick Parmentier[4], Sophie Potin[1,2], Olivier Fardel[1,5]*

1 Institut de Recherches en Santé, Environnement et Travail (IRSET), UMR INSERM U1085, Faculté de Pharmacie, 2 Avenue du Pr Léon Bernard, Rennes, France, **2** Pôle Pharmacie, Centre Hospitalier Universitaire, 2 rue Henri Le Guilloux, Rennes, France, **3** Department of Clinical Pharmacology and Toxicology, University Hospital Zurich, University of Zurich, Rämistrasse 100, Zurich, Switzerland, **4** Centre de Pharmacocinétique, Technologie Servier, 25–27 rue Eugène Vignat, Orléans, France, **5** Pôle Biologie, Centre Hospitalier Universitaire, 2 rue Henri Le Guilloux, Rennes, France

* olivier.fardel@univ-rennes1.fr

Check for updates

OPEN ACCESS

Citation: Chedik L, Bruyere A, Le Vee M, Stieger B, Denizot C, Parmentier Y, et al. (2017) Inhibition of Human Drug Transporter Activities by the Pyrethroid Pesticides Allethrin and Tetramethrin. PLoS ONE 12(1): e0169480. doi:10.1371/journal.pone.0169480

Editor: Fernando Rodrigues-Lima, Universite Paris Diderot, FRANCE

Received: August 17, 2016

Accepted: December 16, 2016

Published: January 18, 2017

Copyright: © 2017 Chedik et al. This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

Funding: The authors received no specific funding for this work.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

Abstract

Pyrethroids are widely-used chemical insecticides, to which humans are commonly exposed, and known to alter functional expression of drug metabolizing enzymes. Limited data have additionally suggested that drug transporters, that constitute key-actors of the drug detoxification system, may also be targeted by pyrethroids. The present study was therefore designed to analyze the potential regulatory effects of these pesticides towards activities of main ATP-binding cassette (ABC) and solute carrier (SLC) drug transporters, using transporter-overexpressing cells. The pyrethroids allethrin and tetramethrin were found to inhibit various ABC and SLC drug transporters, including multidrug resistance-associated protein (MRP) 2, breast cancer resistance protein (BCRP), organic anion transporter polypeptide (OATP) 1B1, organic anion transporter (OAT) 3, multidrug and toxin extrusion transporter (MATE) 1, organic cation transporter (OCT) 1 and OCT2, with IC_{50} values however ranging from 2.6 μM (OCT1 inhibition by allethrin) to 77.6 μM (OAT3 inhibition by tetramethrin) and thus much higher than pyrethroid concentrations (in the nM range) reached in environmentally pyrethroid-exposed humans. By contrast, allethrin and tetramethrin *cis*-stimulated OATP2B1 activity and failed to alter activities of OATP1B3, OAT1 and MATE2-K, whereas P-glycoprotein activity was additionally moderately inhibited. Twelve other pyrethoids used at 100 μM did not block activities of the various investigated transporters, or only moderately inhibited some of them (inhibition by less than 50%). *In silico* analysis of structure-activity relationships next revealed that molecular parameters, including molecular weight and lipophilicity, are associated with transporter inhibition by allethrin/tetramethrin and successfully predicted transporter inhibition by the pyrethroids imiprothrin and prallethrin. Taken together, these data fully demonstrated that two pyrethoids, *i.e.*, allethrin and tetramethrin, can act as regulators of the activity of various ABC and SLC drug transporters, but only when used at high and non-relevant concentrations, making unlikely any contribution of these transporter activity alterations to pyrethroid toxicity in environmentally exposed humans.

Introduction

Pyrethroid insecticides constitute presently one of the most widespread class of synthetic pesticides [1]. These compounds are structurally divided into two types, *i.e.*, type I pyrethroids containing a cyclopropane carboxylic acid structure, and type II pyrethroids having an α-cyano group attached to a benzylic carbon. They are commonly used in agriculture, in food storage and transportation and in indoor and outdoor residential settings. Humans are thought to be widely exposed to these pesticides [2, 3], especially through the diet [4], because pyrethroids are frequently detected in some fruits and vegetables [5]. Additionally, dusts and surfaces can contribute to pyrethroid exposure at residences [6], whereas occupational exposure to pyrethroids has also to be taken into account, notably in agricultural workers [7].

The insecticidal actions of pyrethroids depend on their ability to bind to voltage-gated sodium channels of insect nerves and to prevent their closure, leading by this way to permanent depolarization of axonal membranes and paralysis [8]. Pyrethroids can also impair mammal ionic channels, including voltage-gated sodium or calcium channels and voltage- and ligand-gated chloride channels [9]. Mammals, including humans, are however considered as rather poorly sensitive to toxic effects of pyrethroids, even if human poisoning can lead to severe neurotoxicity, resulting in tremor syndrome for type I pyrethroids and choreoathetosis with salivation syndrome for type II pyrethroids [10]. Chronic exposure to some pyrethroids may moreover result in developmental neurotoxicity and nigrostriatal dopaminergic neurodegeneration, thus favoring Parkinson's disease and other neurodegenerative diseases [11], that are also thought to be promoted by other chemical classes of pesticides [12]. Pyrethroids may additionally contribute in a notable way to deleterious effects of pesticide mixtures [13].

Besides ion channels, other molecular targets of pyrethroids have been described in mammals. It is notably the case for γ-aminobutyric acid receptors [14] and for several hormone receptors [15], which may contribute to endocrine disruption properties of pyrethroids [16]. Pyrethroids can also activate drug sensing receptors such as pregnane X receptor (PXR) [17] and constitutive androstane receptor (CAR) [18]; by this way, they have been shown to up-regulate expression and activity of some major drug metabolizing enzymes like cytochrome P-450 (CYP) 3A4 and CYP2B6 in human hepatic cells [19, 20], and thus to modulate drug metabolizing pathways [21]. In addition to CYPs, pyrethroids may impact mammalian drug transporters, which contribute in a major way to xenobiotic detoxification [22] and are often coordinately regulated with drug metabolizing enzymes [23]. Indeed, activity of P-glycoprotein (P-gp), an ATP-binding cassette (ABC) efflux pump encoded by the multidrug resistance (MDR) 1 gene/*ABCB1* and handling a broad range of amphiphilic cationic drugs as well as various endogenous lipids [24, 25], has been shown to be inhibited by some pyrethroids [26, 27]. The ABC efflux pump breast cancer resistance protein (BCRP/*ABCG2*) may also interfere with pyrethroids because its ATPase activity is blocked by the pyrethroids permethrin and cypermethrin [28]. Moreover, indirect evidence for the handling of the pyrethroids deltamethrin, *cis*-permethin and *trans*-permethrin by an uncharacterized influx transporter in intestinal Caco-2 cells has been recently reported [29]. Data about interactions of pyrethroids with human drug transporters remain however yet rather scarce and limited. The present study was therefore designed to more extensively analyze the potential inhibitory effects of fourteen pyrethroids towards activity of main ABC and solute carrier (SLC) drug transporters. These insecticides correspond to type I pyrethroids (seven compounds: allethrin (also known as allethrin 1), bifenthrin, *cis*-permethrin, *trans*-permethrin, resmethrin, tefluthrin and tetramethrin) or type II pyrethroids (seven compounds: β-cyfluthrin, λ-cyhalothrin, β-cypermethrin, deltamethrin, esfenvalerate, fenpropathrin and τ-fluvalinate) and can be considered as adequately reflecting the structural and historical diversity of these pesticides. Moreover, at least some of

them are insecticides used in large-scale commercial agricultural and domestic applications and have already been tested in *in vitro* toxicity assays [30–33]. Our data demonstrate that the pyrethroids allethrin and tetramethrin are inhibitors of various drug transporters, but only when used at relative high concentrations likely not reached in humans environmentally exposed to these insecticides.

Materials and Methods

Chemicals

Pyrethroids were provided by Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France) and Cluzeau Info Labo (Sainte-Foy-La-Grande, France). The chemical structures of the fourteen pyrethroids whose the potential inhibitory effects towards activity of drug transporters were extensively tested are shown in S1 Fig. It is noteworthy that pyrethroid insecticides generally have complex configurations and contain one to three chiral centers, thus resulting in two to eight stereoisomers, with only some of them displaying insecticide properties [9, 34, 35]. Most, if not all, of these insecticides can therefore be theoretically considered as mixtures of geometric and optical isomers, knowing however that some commercial preparations of pyrethroids available on the market may contain only one or some of possible stereoisomers [34]. Unfortunately, the exact composition and stereoisomer proportion of the pyrethroids used in the present study were not provided by the suppliers. The total number of possible stereoisomers for each of the fourteen pyrethroids extensively analyzed in the study is given in S1 Table. Pyrethroids were initially prepared as stock solutions (50 mM) in dimethyl sulfoxide. Such stock solutions were next dissolved in the transport assay medium described below, for getting working pyrethroid concentrations tested on transporter activities. Rhodamine 123, verapamil, probenecid, amitriptyline, fumitremorgin C, fluorescein, 4',6'-diamidino-2-phenylindole (DAPI), and tetra-ethylammonium bromide (TEA) were purchased by Sigma-Aldrich, whereas carboxy-2,7-dichlorofluorescein (CF) diacetate and Hoechst 33342 were from Life Technologies (Saint Aubin, France). [1-^{14}C]-TEA (sp. act. 3.5 mCi/mmol), [6,7-^{3}H(N)]-estrone-3-sulfate (E3S) (sp. act. 54 Ci/mmol) and 3,4-[Ring-2,5,6-^{3}H]-dihydroxyphenylethylamine (dopamine) (sp. act. 46 Ci/mmol) were from Perkin-Elmer (Boston, MA, USA). All other chemicals were commercial products of the highest purity available.

Cell culture

P-gp-overexpressing mammary MCF7R cells, parental MCF7 cells [36] and multidrug resistance-associated protein (MRP) 2/*ABCC2*-expressing human hepatoma HuH-7 cells [37] were cultured in Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) (Life Technologies), supplemented with 10% (vol/vol) fetal calf serum, 20 IU/mL penicillin and 20 μg/mL streptomycin. BCRP-transfected HEK293 cells (HEK-BCRP cells) [38], kindly donated by Pr X. Decleves (Faculty of Pharmacy, University Paris-Descartes, Paris, France), were cultured in DMEM supplemented with 10% (vol/vol) fetal calf serum, 100 IU/mL amoxicillin, 100 μg/mL erythromycin and 2000 μg/mL G418. Organic anion transporter polypeptide (OATP) 1B1/*SLCO1B1*- and OATP1B3/*SLCO1B3*- transfected CHO cells (CHO-OATP1B1 and CHO-OATP1B3 cells) were cultured in DMEM-low glucose (1 g/L) containing 20 IU/mL penicillin, 20 μg/mL streptomycin, 10% (vol/vol) fetal calf serum, 50 μg/mL proline and 500 μg/mL G418, as previously reported [39]; CHO wild type cells were maintained in the cell medium, without however G418. HEK293 cells overexpressing organic cation transporter (OCT) 1/*SLC22A1* (HEK-OCT1 cells), OCT2/*SLC22A2* (HEK-OCT2 cells), multidrug and toxin extrusion transporter (MATE)1/*SLC47A1* (HEK-MATE1 cells), organic anion transporter (OAT) 1/*SLC22A6* (HEK-OAT1 cells), OAT3/*SLC22A8* (HEK-OAT3 cells) and OATP2B1/*SLCO2B1* (HEK-OATP2B1 cells) were prepared by transduction of HEK293 cells by lentiviral pLV-EF1-hOCT1-hPGK-GFP, pLV-EF1-hOCT2-

hPGK-GFP, pLV-EF1-hMATE1-hPGK-GFP, pLV-EF1-hOAT1-hPGK-GFP, pLV-EF1-hOAT3-hPGK-GFP, pLV-EF1-hOATP2B1-hPGK-GFP or pLV-EF1-hNTCP-hPGK-GFP vector, as previously described [40]. Control HEK293 cells (HEK-MOCK cells) were obtained in parallel by transduction of an empty lentiviral PLV-EF1-hPGK-GFP vector. Construction of the lentiviral vectors, production of lentivirus supernatants, transduction of HEK293 cells, cloning and initial characterization of HEK-OCT1, HEK-OCT2, HEK-MATE1, HEK-OAT1, HEK-OAT3 and HEK-OATP2B1 cells were performed by Vectalys (Labège, France). Transduced HEK293 cells were next routinely cultured in DMEM medium supplemented with 10% (vol/vol) fetal calf serum, 20 IU/mL penicillin, 20 μg/mL streptomycin, 1% (vol/vol) MEM non-essential amino acids solution (Life Technologies) and 1 μg/mL insulin.

For transport assays, cells were usually seeded in 48-multiwell Falcon™ tissue culture-treated polystyrene or Corning™ BioCoat™ poly-D-lysine plates (Corning Incorporated, NY, USA). The type of multiwell plates, the initial cell seeding and the number of culture days before performing transport assays are indicated for each cell line/clone in S2 Table.

ABC and SLC transporter activity

The effects of pyrethroids on activity of ABC and SLC transporters were determined through measuring cellular accumulation or retention of fluorescent or radiolabeled reference substrates for transporters, in the presence or absence of reference inhibitors, as previously described [41]. The nature of cells and reference substrates and inhibitors used for transport assays are summarized in S3 Table.

For accumulation assays (performed for all transporters, excepted BCRP), transporter-expressing cells usually cultured in 48-well plates were first incubated at 37˚C with reference substrates in the absence (control) or presence of pyrethroids or reference inhibitors, in a well-defined transport assay medium [42], consisting of 136 mM NaCl, 5.3 mM KCl, 1.1mM KH_2PO_4, 0.8 mM $MgSO_4$, 1.8 mM $CaCl_2$, 10 mM HEPES, 11 mM D-glucose and adjusted to pH = 7.4 (excepted for MATE transporter assays, for which pH was set to 8.4). The nature of substrates and reference inhibitors and the incubation times with substrates, that varied according to the transporter, were selected in agreement with previous studies [41, 43] and are indicated in S3 Table. The total incubation volume with substrates was 200 μL/well. After washing twice in phosphate-buffered saline (PBS) (200 μL/well/washing), cells were lysed in distilled water (155 μL/well). An aliquot of cell lysate (5 μL) was then taken for determining cellular protein content by the Bradford method [44]. The rest of lysate (150 μL/well) was used for measuring intracellular accumulation of reference substrates by scintillation counting or spectrofluorimetry using a SpectraMax Gemini SX spectrofluorometer (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) (excitation and emission wavelengths were 485 and 535 nm, respectively, for rhodamine 123 and fluorescein, and 355 and 460 nm, respectively, for DAPI).

For retention assay (used for BCRP activity), HEK-BCRP cells cultured in 48-well plates were first loaded at 37˚C with transport assay (200 μL/well) containing 16.2 μM Hoechst 33342 for 30 min. After washing twice in PBS (200 μL/well/washing), cells were reincubated in Hoechst 33342-free transport assay medium (200 μL/well) at 37˚C for 90 min in the absence or presence of pyrethroids or of the BCRP reference inhibitor fumitremorgin C used at 10 μM. Cells were next lysed in distilled water (155 μL/well) after washing twice in PBS (200 μL/well/washing). The cell lysate was finally used for determining cellular protein content and intracellular retention of Hoechst 33342 (by spectrofluorimetry: excitation and emission wavelengths were 355 and 460 nm, respectively), as described above.

Intracellular concentrations of reference substrates were initially expressed as fluorescence arbitrary units (for fluorescent dye substrates) or as moles (for radiolabeled substrates) and normalized

to cellular protein content, determined by the Bradford method [44]. They were finally used for calculating percentage of transporter activity, according to the following equations [41, 45]:

$$\%\ \text{ABC transporter activity} = \frac{([\text{Substrate}_{\text{ref inh}}] - [\text{Substrate}_{\text{pyrethroid}}]) \times 100}{([\text{Substrate}_{\text{ref inh}}] - [\text{Substrate}_{\text{control}}])} \quad (1)$$

$$\%\ \text{SLC transporter activity} = \frac{([\text{Substrate}_{\text{pyrethroid}}] - [\text{Substrat}_{\text{ref inh}}]) \times 100}{([\text{Substrate}_{\text{control}}] - [\text{Substrate}_{\text{ref inh}}])} \quad (2)$$

with $[\text{Substrate}_{\text{pyrethroid}}]$ = cellular concentration of reference substrate in the presence of pyrethroid, $[\text{Substrate}_{\text{ref inh}}]$ = cellular concentration of reference substrate in the presence of reference inhibitor and $[\text{Substrate}_{\text{control}}]$ = cellular concentration of reference substrate in control cells not exposed to pyrethroid or reference inhibitor.

For OCT1-mediated transport inhibition by pyrethroids, data were also expressed as percentages of inhibition of OCT1 activity using the following equation:

$$\%\ \text{OCT1 activity inhibition} = 100\% - \%\ \text{OCT1 activity (in the presence of pyrethroid)} \quad (3)$$

The initial tested concentration of pyrethroids was 100 μM. When a pyrethroid used a this concentration modulated transporter activity by more than 50%, the effects of various additional concentrations of the pyrethroid (from 0.1 to 300 μM) on transporter activity were analyzed, in order to determine half maximal inhibitory concentration (IC_{50}) (for inhibitory effects of pyrethroids) or half maximal effective concentration (EC_{50}) (for stimulatory effects of pyrethroids). Such concentrations were calculated using GraphPad Prism software (GraphPad Software, La Jolla, CA), through nonlinear regression based on the four parameter logistic function using the following equations:

For IC_{50}:

$$A = \frac{100}{1 + 10^{((\text{[I]} - \text{LogIC}_{50})\text{x Hill slope})}} \quad (4)$$

For EC_{50}:

$$A = \frac{100}{1 + 10^{((\text{[I]} - \text{LogEC}_{50})\text{x Hill slope})}} \quad (5)$$

where A is the percentage of transporter activity for a given concentration of pyrethroid determined as described in Eq (1) for ABC transporters and in Eq (2) for SLC transporters, [I] is the pyrethroid concentration in the medium, and Hill slope is a coefficient describing the steepness of the curve.

Dopamine accumulation in OCT1-transfected HEK293 cells

HEK-MOCK and HEK-OCT1 cells were incubated with transport assay medium containing 11 nM 3,4-[Ring-2,5,6-^{3}H]-dopamine, in the absence or presence of the reference OCT1 inhibitor verapamil or of pyrethroids for 5 min at 37°C in the transport assay medium described above. After washing twice with PBS, cells were lysed in distilled water and intracellular accumulation of dopamine was finally measured by scintillation counting.

Trans-stimulation assays in OCT1-transfected HEK293 cells

Trans-stimulation assays were performed as previously described [46]. Briefly, OCT1-transfected HEK293 cells were first preloaded with 2 mM unlabeled TEA or 100 μM pyrethroid for

60 min at 37˚c in the transport assay medium described above. After washing twice with PBS, cells were next re-incubated in transport assay medium containing 29 μM [1-^{14}C]-TEA for 5 min at 37˚C. After washing twice with PBS, cells were lysed in distilled water and intracellular accumulation of [1-^{14}C]-TEA was then determined by scintillation counting.

Molecular descriptor generation

Molecular descriptors were evaluated using the Dragon 6 software (Talete, Milano, Italy), that provides 4885 molecular descriptors divided into 29 blocks (See http://www.talete.mi.it/products/dragon_molecular_descriptor_list.pdf for a complete list of these descriptors). Pyrethroids, initially expressed in SMILES format, were converted to 3D format using the MarvinView software (ChemAxon, Budapest, Hungary) before processing by Dragon 6 to obtain molecular descriptors.

Statistical analysis

Experimental data were expressed as means ± SEM of at least three independent experiments, each being usually performed in triplicate (for transport assays, one typical independent experiment therefore corresponded to 3 independent wells on the same multiwell plate). They were statistically analysis through the Student's *t*-test or analysis of variance (ANOVA) followed by a Dunnett's or a Newman-Keuls post-hoc test; the criterion of significance was $p < 0.05$. Correlation between molecular descriptor indexes and percentages of OCT1 activity inhibition by pyrethroids was initially done with Dragon 6 software through Pearson correlation, using a cut-off for Pearson's correlation coefficient of $r > 0.8$ (positive correlation) or $r < -0.8$ (negative correlation), as recommended by the software user's manual and as previously described [47]. *P*-values for Pearson correlations, as well as linear regressions for molecular descriptors exhibiting a high level of correlation with OCT1 activity inhibition ($|r| > 0.92$), were next determined using GraphPad Prism software after confirmation of normality of data distribution by D'Agostino and Pearson omnibus normality test. The statistical analysis of molecular descriptors belonging to the block of constitutional indices or to that of molecular properties and allowing to discriminate allethrin/tetramethrin from the other pyrethroids was performed using the unpaired Student's *t*-test, which is applicable to very small sample sizes [48, 49].

Results

Effects of pyrethroids on ABC transporter activity

For investigating the effects of pyrethroids on ABC transporter activity, we used MCF7R, HuH-7 and HEK-BCRP cells. Such cells exhibited increased accumulation (MCF7R and HuH-7 cells) or retention (HEK-BCRP cells) of dyes substrates for P-gp (rhodamine 123), MRP2 and MRP2-like transporters (CF) or BCRP (Hoechst 33342) in response to reference inhibitors of the pumps (verapamil for P-gp, probenecid for MRP2 and fumitremorgin C for BCRP) (S2 Fig), thus demonstrating that P-gp, MRP2 and BCRP are fully functional in these cells, as previously described [45]. By contrast, verapamil failed to enhance rhodamine 123 accumulation in parental MCF7 cells (S2 Fig), which is fully consistent with the absence of detectable P-gp activity in these cells; in the same way, fumitremorgin C did not augment Hoechst 33342 retention in HEK-MOCK cells (data not shown).

Pyrethroids were routinely used at 100 μM for screening their potential effects towards drug transporter activity. This 100 μM concentration was retained because it was in the range of those previously used to interact with the pharmacological targets of pyrethroids, *i.e.*, voltage-gated sodium channels, in cultured cells [50, 51], thus underlining its potential relevance

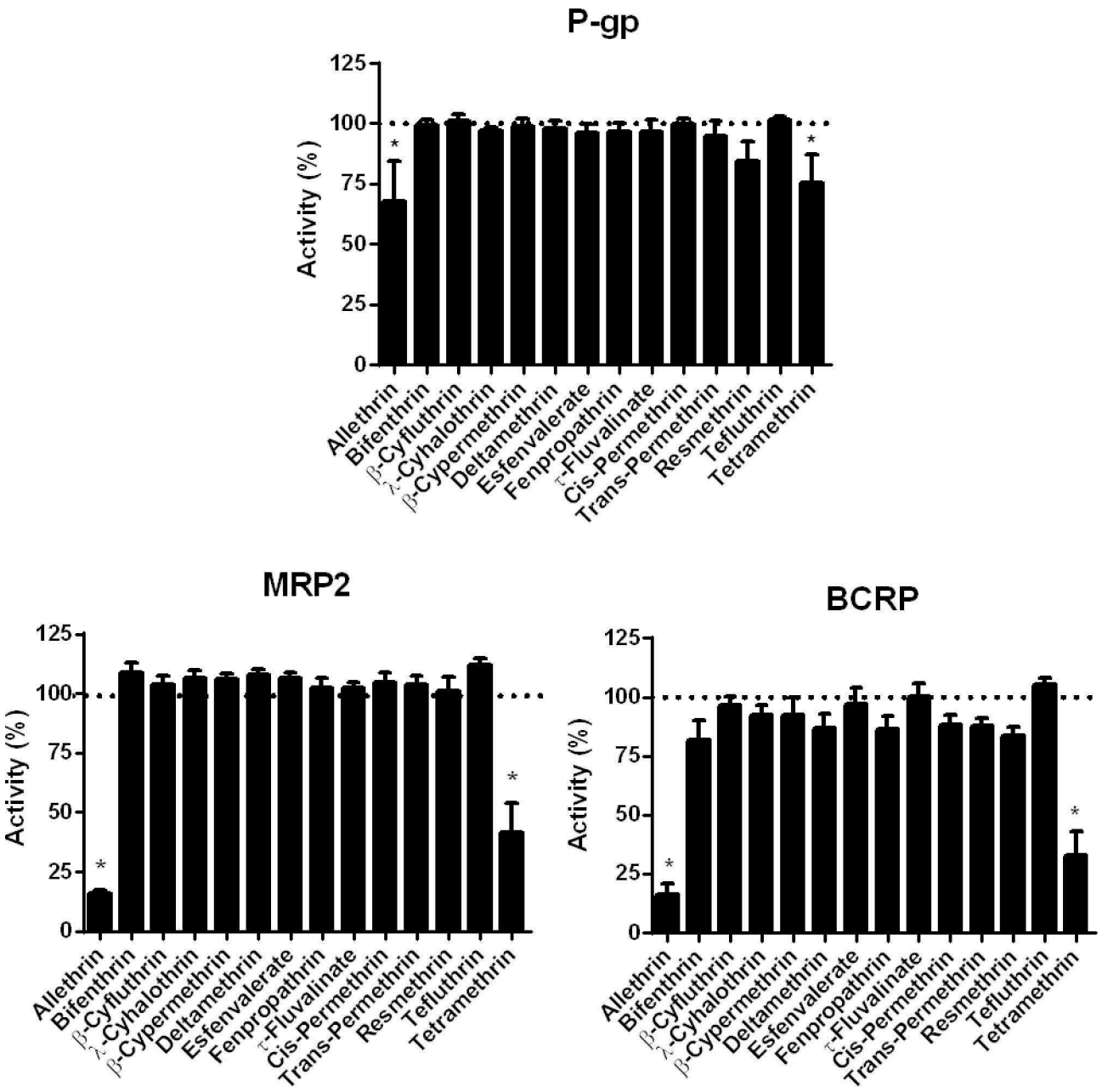


Fig 1. Effects of pyrethroids on ABC drug transporter activities. Activities of P-gp, MRP2 and BCRP were determined in ABC transporter-expressing cells (MCF7R cells for P-gp, HuH-7 cells for MRP2 and HEK-BCRP cells), in the absence or presence of reference inhibitors or various pyrethroids (each used at 100 μM), as described in Materials and Methods. Data are expressed as percentages of activities found in untreated control cells, arbitrarily set at 100% and indicated by dotted lines on graphs; they are the means ± SEM of three independent assays, each being performed in triplicate. *, $p<0.05$ when compared to untreated control cells.

doi:10.1371/journal.pone.0169480.g001

for *in vitro* studying interactions of pyrethroids with membrane proteins. P-gp activity was found to be moderately, but significantly, inhibited (32.7% inhibition) by 100 μM allethrin (Fig 1), whereas MRP2 and BCRP activity were more potently inhibited (83.8% and 83.9% inhibition for MRP2 and BCRP, respectively) by the pyrethroid (Fig 1). For MRP2 inhibition, allethrin IC_{50} value was 48.2 μM (S3A Fig) whereas it was 42.5 μM for BCRP inhibition (S3B Fig). The pyrethroid tetramethrin used at 100 μM also notably decreased MRP2 activity

(58.3% inhibition) and BCRP activity (67.1% inhibition), whereas P-gp activity was more weakly impaired (24.5% inhibition) (Fig 1); tetramethrin IC_{50} values were 65.5 μM (for MRP2 inhibition) (S3A Fig) and 72.5 μM (for BCRP inhibition) (S3B Fig). For P-gp, because 100 μM allethrin and 100 μM tetramethrin inhibited activity by less than 50%, IC_{50} values may be predicted to be higher than 100 μM. Other pyrethroids used at 100 μM did not significantly inhibit P-gp, MRP2 or BCRP activity (Fig 1).

Effects of pyrethroids on organic anion SLC transporter activity

For investigating effects of pyrethroids on activity of organic anion SLC transporters, *i.e.*, OATPs and OATs, we used OATP1B1-, OATP1B3-, OATP2B1-, OAT1- and OAT3-transfected cells. As shown in S4 Fig, these cells exhibited increased accumulation of reference substrates, *i.e.*, E3S for OATP1B1 and OATP2B1 and fluorescein for OATP1B3, OAT1 and OAT3, when compared to OATP- or OAT-untransfected counterparts; moreover, the OATP inhibitor probenecid was able to reduce accumulation of reference substrates only in OATP- and OAT-transfected cells (S4 Fig). Taken together, these data indicated that OATPs and OATs were fully functional in OATP- and OAT-transfected cells.

As shown in Fig 2, allethrin and tetramethrin used at 100 μM, were found to markedly inhibit OATP1B1 activity, by more than 85%; corresponding IC_{50} values were 16.5 μM and 5.7 μM for allethrin and tetramethrin, respectively (S5A Fig). Other pyrethroids did not inhibit OATP1B1 activity or only moderately inhibited it (by less than 50%), without reaching statistical significance, except for esfenvalerate (Fig 2). None of pyrethroids was found to impair OATP1B3 activity (Fig 2). With respect to OATP2B1 activity, it was unexpectedly stimulated by allethrin (EC_{50} = 37.8 μM) and tetramethrin (EC_{50} = 10.1 μM) (Fig 2 and S5B Fig), whereas other pyrethroids had no significant effect (Fig 2).

τ-fluvalinate, used at 100 μM, was the only pyrethroid that decreased OAT1 activity (Fig 3); the percentage of inhibition (42.8%) was however less than 50%, which precluded determination of IC_{50} value. τ-fluvalinate also inhibited OAT3 activity, but only in a marginal and non-significant manner (15.6% inhibition) (Fig 3). By contrast, OAT3 activity was more strongly and significantly inhibited by 100 μM allethrin (74.8% inhibition) and 100 μM tetramethrin (69.3% inhibition), whereas other pyrethroids failed to impair it (Fig 3); IC_{50} values for OAT3 inhibition were 69.4 μM (allethrin) and 77.6 μM (tetramethrin) (S5C Fig).

Effects of pyrethroids on organic cation SLC transporter activity

For analyzing effects of pyrethroids on activity of organic cation SLC transporters, *i.e.*, MATEs and OCTs, we used MATE1-, MATE2-K-, OCT1- and OCT2-transfected HEK293 cells. As shown in S6 Fig, these cells exhibited increased accumulation of reference substrates, *i.e.*, TEA for MATE1 and MATE2-K, DAPI for OCT1 and rhodamine 123 for OCT2 when compared to HEK-MOCK cells; moreover, reference inhibitors (verapamil for MATEs and OCT1 and amitriptyline for OCT2) reduced accumulation of reference substrates in MATE- and OCT-transfected cells, but not in HEK-MOCK cells (S6 Fig). Taken together, these data indicated that MATEs and OCTs were fully functional in MATE- and OCT-transfected cells.

As shown in Fig 4, allethrin and tetramethrin, used at 100 μM, markedly inhibited MATE1 activity, by more than 79%; corresponding IC_{50} values were 50.2 μM and 47.5 μM for allethrin and tetramethrin, respectively (S7A Fig). Other pyrethroids did not significantly inhibit MATE1 activity (Fig 4). None of pyrethroids was found to impair MATE2-K activity (Fig 4).

With respect to OCT1 activity, it was markedly inhibited by 100 μM allethrin (87.9% inhibition) and 100 μM tetramethrin (73.8% inhibition); corresponding IC_{50} values, *i.e.*, 2.6 μM (allethrin) and 4.9 μM (tetramethrin), were rather low (S7B Fig). Pyrethroids such as β-cyfluthrin,

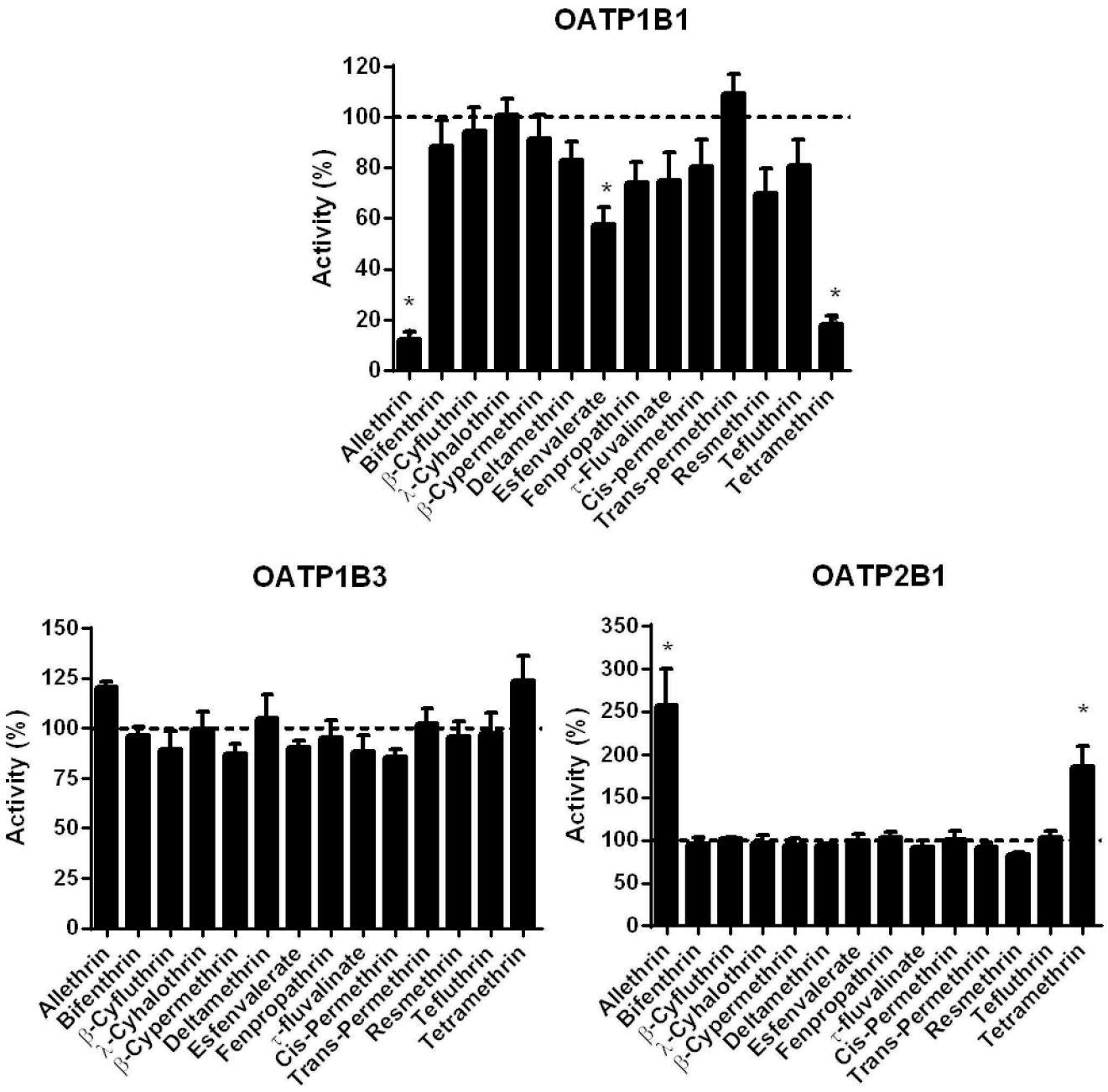


Fig 2. Effects of pyrethroids on OATP activities. Activities of OATP1B1, OATP1B3 and OATP2B1 were determined in OATP-transfected-cells in the absence or presence of reference inhibitors or various pyrethroids (each used at 100 μM), as described in Materials and Methods. Data are expressed as percentages of activities found in untreated control cells, arbitrarily set at 100% and indicated by dotted lines on graphs; they are the means ± SEM of three independent assays, each being performed in triplicate. *, $p<0.05$ when compared to untreated control cells.

doi:10.1371/journal.pone.0169480.g002

λ-cyhalothrin, β-cypermethrin, deltamethrin, fenpropathrin, *trans*-permethrin, resmethrin and tefluthrin also significantly inhibited OCT1 activity, but in a weaker manner; OCT1 inhibition thus ranged from 30.1% (β-cypermethrin) to 48.8% (resmethrin) (Fig 4). By contrast, bifenthrin, *cis*-permethrin, esfenvalerate and τ-fluvalinate failed to significantly alter OCT1 activity (Fig 4). Allethrin and tetramethrin were finally also shown to markedly inhibit OCT2 activity (Fig 4); IC_{50} values were 42.6 μM (allethrin) and 11.2 μM (tetramethrin) (S7C Fig). OCT2 activity was

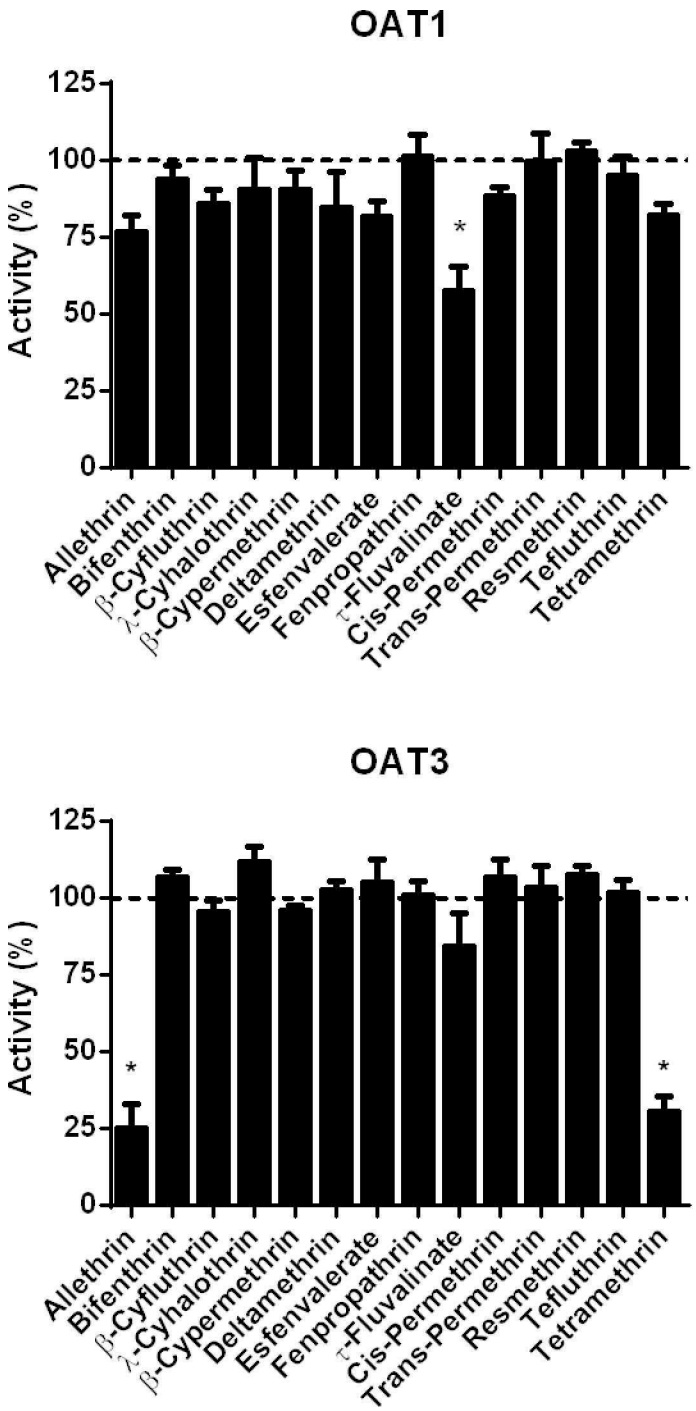


Fig 3. Effects of pyrethroids on OAT activities. Activities of OAT1 and OAT3 were determined in OAT-transfected HEK cells in the absence or presence of reference inhibitors or various pyrethroids (each used at 100 μM), as described in Materials and Methods. Data are expressed as percentages of activities found in untreated control cells, arbitrarily set at 100% and indicated by dotted lines on graphs; they are the means ± SEM of three independent assays, each being performed in triplicate. *, $p<0.05$ when compared to untreated control cells.

doi:10.1371/journal.pone.0169480.g003

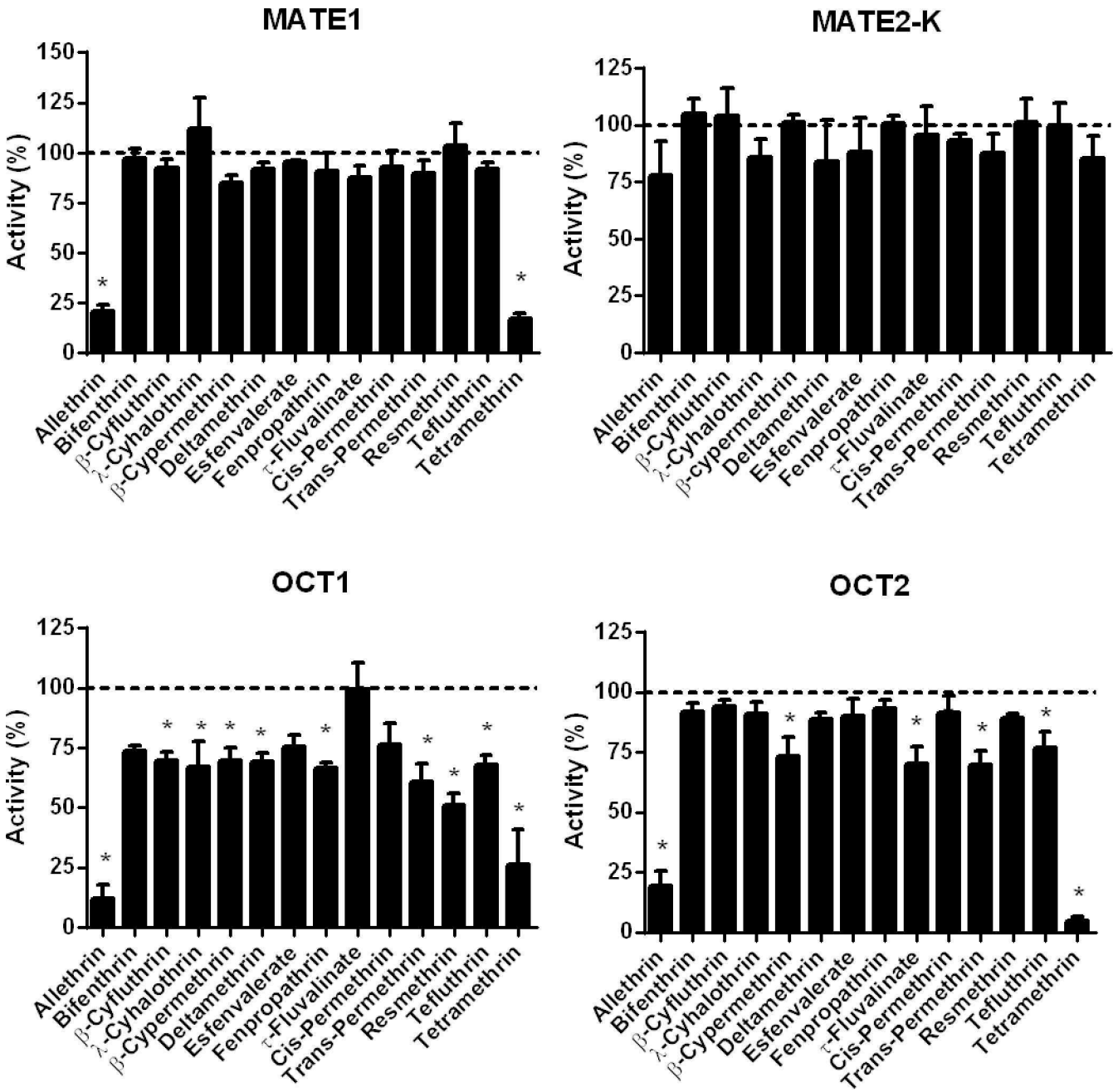


Fig 4. Effects of pyrethroids on MATE and OCT activities. Activities of MATE1, MATE2-K, OCT1 and OCT2 were determined in MATE- or OCT-transfected HEK cells, in the absence or presence of reference inhibitors or various pyrethroids (each used at 100 μM), as described in Materials and Methods. Data are expressed as percentages of activities found in untreated control cells, arbitrarily set at 100% and indicated by dotted lines on graphs; they are the means ± SEM of three independent assays, each being usually performed in triplicate. *, $p<0.05$ when compared to untreated control cells.

doi:10.1371/journal.pone.0169480.g004

also counteracted by β-cypermethrin, τ-fluvalinate, *trans*-permethrin and tefluthrin, but in a weaker manner with a percentage of inhibition around 25% (Fig 4). Other pyrethroids failed to impair OCT2-mediated transport (Fig 4).

Characterization of pyrethroids-mediated OCT1 inhibition

We next focused on pyrethroids-mediated OCT1 inhibition. Indeed, OCT1 can be considered as the drug transporter most impacted by pyrethroids because it was the transporter most sensitive to allethrin and tetramethrin according to IC_{50} values (S7B Fig) and it was also the transporter significantly inhibited by the largest number of pyrethroids, as 10/14 pyrethroids significantly impaired its activity (Fig 4).

We first determined whether allethrin and tetramethrin can inhibit OCT1-mediated transport of endogenous substrates such as dopamine. HEK-OCT1 cells exhibited enhanced verapamil-inhibitable accumulation of dopamine comparatively to HEK-MOCK cells (Fig 5A), thus fully confirming that OCT1 handles dopamine [52]. Allethrin used at 10, 100 or 300 μM was found to significantly inhibit this OCT1-mediated transport of dopamine (Fig 5B); tetramethrin also decreased it, but only when used at 100 or 300 μM (Fig 5B). Allethrin and tetramethrin used at 100 μM were next shown to markedly *cis*-inhibit accumulation of the reference OCT1 substrate TEA in HEK-OCT1 cells (Fig 6A). Finally, we investigated whether allethrin and tetramethrin can *trans*-stimulate TEA uptake, which may constitute an argument in favor of the transport of the two pyrethroids by OCT1 [46]. Pre-loading with allethrin and tetramethrin however resulted in *trans*-inhibition, and not *trans*-stimulation, of radiolabeled TEA uptake (Fig 6B). By contrast, pre-loading with unlabeled TEA led to a *trans*-stimulation of radiolabeled TEA uptake (Fig 6B), as expected for an OCT1 substrate like TEA [46].

In order to identify the specific physico-chemical properties associated to OCT1 inhibition by pyrethroids, molecular descriptors, including 0D-constitutional, 1D-structural, 2D-topological and 3D-geometrical descriptors, were determined using Dragon 6 software. Putative correlations with OCT1 activity inhibition were next analyzed using Pearson's correlation test. Using a cutoff of $|r| > 0.8$, 602 molecular descriptors were found to be correlated with inhibition of OCT1 activity; the correlation was positive ($r > 0.8$) or negative ($r < -0.8$) for 93 and 509 descriptors, respectively (Table 1). These molecular descriptors associated with OCT1 inhibition belong to different blocks of descriptors, especially those of 2D-matrix based descriptors (n = 350), of edge adjacency indices (n = 85), of topological indices (n = 26), of 3D-MoRSE descriptors (n = 24) and of walk and path counts (n = 20) (Table 1). A complete list of these descriptors is given in S1 File. Notably, lipophilicity, evaluated through octanol-water partition coefficients (LogP) calculated using Moriguchi LogP model (MLOGP), was negatively correlated to OCT1 inhibition, whereas no correlation was found for molecular weight (MW) or number of hydrogen bond acceptors (nHAcc) and donors (nHDon) (S1 File). When a more stringent cut-off value of $|r| > 0.92$ was applied, 9 molecular descriptors were found to be correlated with OCT1 activity inhibition (S4 Table); linear regression analysis next confirmed a highly significant linear relation between the index values of these descriptors and the percentages of OCT1 activity inhibition (S8 Fig). Such molecular descriptors exclusively belong to the category of 2D topological indexes, notably to walk and path counts (S4 Table).

Determination of basic molecular descriptors discriminating multi-transporter-interacting pyrethroids (allethrin/tetramethrin) from other pyrethroids

Allethrin and tetramethrin exhibit a rather large, but specific, profile of transporter inhibition, because they markedly decreased activity of various transporters, including MRP2, BCRP, OATP1B1, OAT3, MATE1, OCT1 and OCT2, whereas other pyrethroids concomitantly exerted no, or only moderate or marginal, inhibitory effects. In addition, allethrin and tetramethrin, unlike other pyrethroids, stimulated OATP2B1 activity (Fig 2). Molecular features restricted to allethrin and tetramethrin may therefore be hypothesized to be involved in the

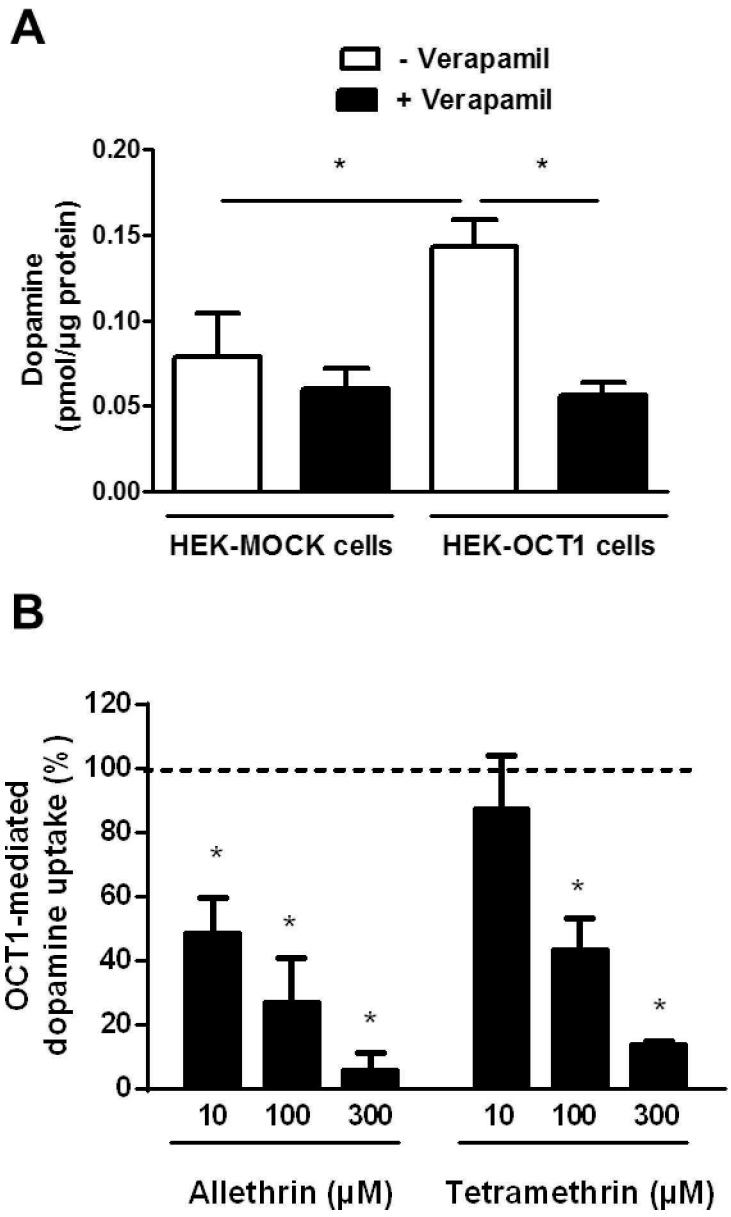


Fig 5. Effects of allethrin and tetramethrin on OCT1-mediated transport of dopamine. (A) HEK-OCT1 and HEK-MOCK cells were incubated with 11 nM 3,4-[Ring-2,5,6-^{3}H]-dopamine in the absence or presence of the reference OCT1 inhibitor verapamil (100 µM) for 5 min at 37˚C. Intracellular accumulation of 3,4-[Ring-2,5,6-^{3}H]-dopamine was then determined by scintillation counting. Data are expressed as pmol/µg protein and are the means ± SEM of three independent experiments, each being performed in triplicate. *, $p<0.05$. (B) HEK-OCT1 cells were incubated with 11 nM 3,4-[Ring-2,5,6-^{3}H]-dopamine in the absence or presence of various concentrations (10, 100 and 300 µM) of allethrin or tetramethrin. Intracellular accumulation of 3,4-[Ring-2,5,6-^{3}H]-dopamine was then determined by scintillation counting. Data are expressed as percentages of OCT1-mediated transport of dopamine in control pyrethroid-unexposed cells, determined by subtracting accumulation of dopamine in HEK-MOCK cells from that in HEK-OCT1 cells in the absence of pyrethroids, arbitrarily set at 100% and indicated by a dotted line on the graph. They are the means ± SEM of at least three independent assays, each being performed in triplicate. *, $p<0.05$ when compared to untreated control cells.

doi:10.1371/journal.pone.0169480.g005

regulations of drug transporter activities caused by the two pyrethroids. In order to identify such physical-chemical parameters, we compared constitutional indices and molecular properties from allethrin and tetramethrin with those of other pyrethroids, because important

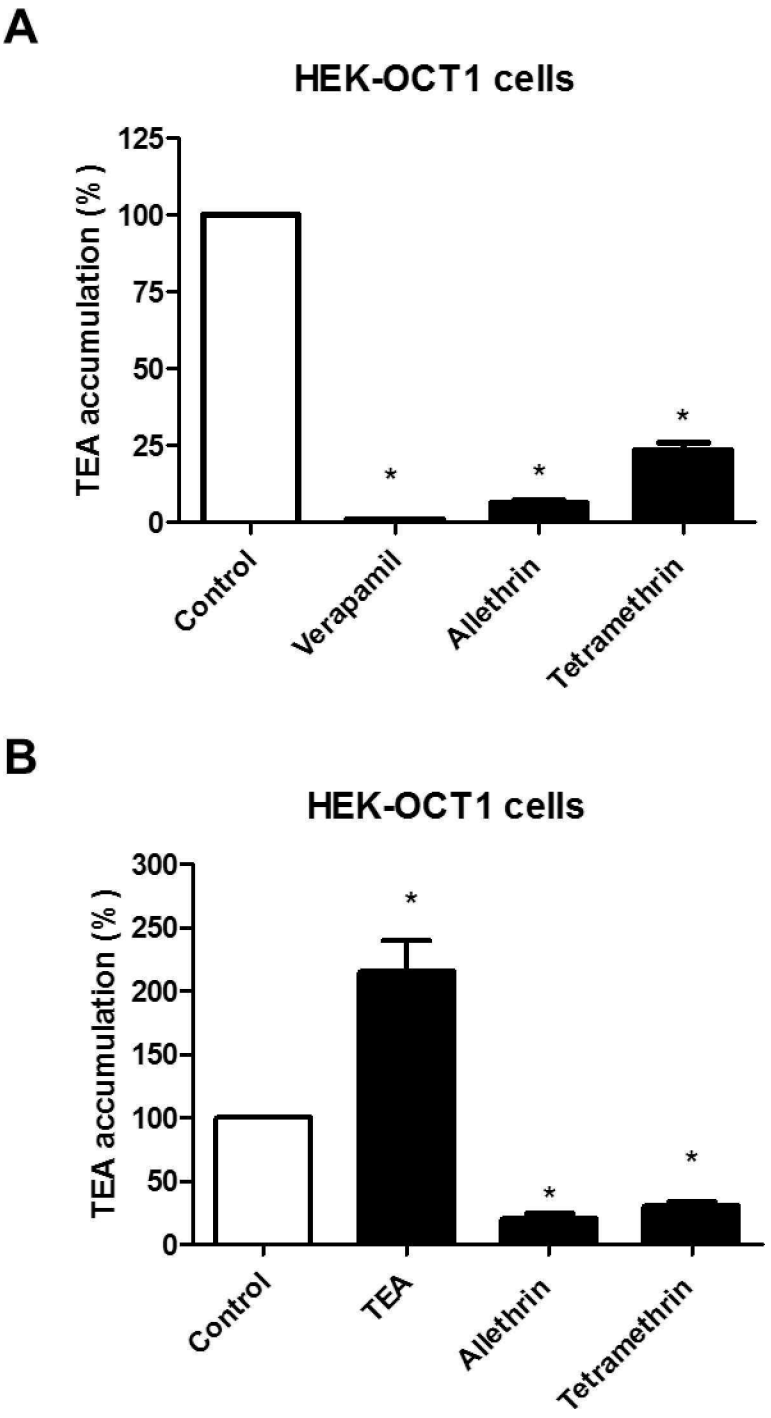


Fig 6. *Cis*- and *trans*-inhibitory effects of allethrin and tetramethrin towards OCT1-mediated transport of TEA. (A) HEK-OCT1 cells were incubated with 29 μM [1-^{14}C]-TEA for 5 min at 37˚C in the absence (control) or presence of 100 μM verapamil, 100 μM allethrin or 100 μM tetramethrin. Intracellular accumulation of TEA was then determined by scintillation counting. Data are expressed as percentages of TEA accumulation in control cells and are the means ± SEM of three independent experiments, each being performed in triplicate. *, p<0.05 when compared to control cells. (B) HEK-OCT1 cells were first incubated for 60 min at 37˚c in the absence (control) or presence of 2 mM unlabeled TEA, 100 μM allethrin or 100 μM tetramethrin. After washing, cells were next re-incubated with 29 μM [1-^{14}C]-TEA for 5 min at 37˚C. Intracellular accumulation of [1-^{14}C]-TEA was then determined by scintillation counting. Data are expressed as percentages of TEA accumulation in control cells and are the means ± SEM of three independent experiments, each being performed in triplicate. *, p<0.05 when compared to control cells.

doi:10.1371/journal.pone.0169480.g006

Table 1. Repartition of molecular descriptors correlated with OCT1 activity inhibition by pyrethroids (|r|>0.80).

Dragon ID Block	Block category	Block description	Number of descriptors	Number of correlated descriptors		Percentage of Correlated descriptors in each block	Percentage of total correlated descriptors
				Positive Correlation (r > 0.8)	Negative Correlation (r < -0.8)		
1	0D-descriptors	Constitutional descriptors	43	2	7	20.9	1.5
2	0D-descriptors	Ring descriptors	32	1	4	15.6	0.8
3	2D-descriptors	Topological indices	75	1	25	34.7	4.3
4	2D-descriptors	Walk and path counts	46	0	20	43.5	3.3
5	2D-descriptors	Connectivity indices	37	0	7	18.9	1.2
6	2D-descriptors	Information indices	48	0	9	18.8	1.5
7	2D-descriptors	2D matrix-based descriptors	550	36	314	63.6	58.1
8	2D-descriptors	2D autocorrelations	213	4	3	3.3	1.2
9	2D-descriptors	Burden eigenvalues	96	0	6	6.3	1.0
10	2D-descriptors	P_VSA-like descriptors	45	1	1	4.4	0.3
11	2D-descriptors	ETA indices	23	1	8	39.1	1.5
12	2D-descriptors	Edge adjacency indices	324	8	77	26.2	14.1
13	3D-descriptors	Geometrical descriptors	38	0	5	13.2	0.8
14	3D-descriptors	3D matrix-based descriptors	90	3	2	5.6	0.8
15	3D-descriptors	3D autocorrelations	80	1	0	1.3	0.2
16	3D-descriptors	RDF descriptors	210	0	2	1.0	0.3
17	3D-descriptors	3D-MoRSE descriptors	224	20	4	10.7	4.0
18	3D-descriptors	WHIM descriptors	114	0	0	0.0	0.0
19	3D-descriptors	GETAWAY descriptors	273	0	9	3.3	1.5
20	3D-descriptors	Randic molecular profiles	41	1	0	2.4	0.2
21	0D-descriptors	Functional group counts	154	2	2	2.6	0.7
22	1D-descriptors	Atom-centred fragments	115	3	0	2.6	0.5
23	1D-descriptors	Atom-type E-state indices	170	1	1	1.2	0.3
24	2D-descriptors	CATS 2D	150	0	0	0.0	0.0
25	2D-descriptors	2D Atom Pairs	1596	3	0	0.2	0.5

(*Continued*)

Table 1. (*Continued*)

Dragon ID Block	Block category	Block description	Number of descriptors	Number of correlated descriptors		Percentage of Correlated descriptors in each block	Percentage of total correlated descriptors
				Positive Correlation (r > 0.8)	Negative Correlation (r < -0.8)		
26	3D-descriptors	3D Atom Pairs	36	0	0	0.0	0.0
27	others	Charge descriptors	15	0	0	0.0	0.0
28	others	Molecular properties	20	0	3	15	0.5
29	others	Drug-like indices	27	5	0	18.5	0.9

doi:10.1371/journal.pone.0169480.t001

descriptors for transporter inhibition are usually comprised among these basic descriptors [53]. As shown in Table 2, values for 19 descriptors, *i.e.*, 15 constitutional indices and 4 molecular properties, were found to significantly differ between allethrin/tetramethrin and other pyrethroids. These discriminating molecular descriptors notably correspond to molecular weight (MW), van der Waals volume (Mv), polarizability (Mp), rotatable bond fraction (RBF), percentage of C atoms (C%) and lipophilicity/LogP, calculated using either Moriguchi (MLOGP) or Ghose-Crippen-Viswanadhan (ALOGP) LogP models. Allethrin/tetramethrin thus exhibit reduced molecular weight, van der Waals volume, polarizability, percentage of C atoms and lipophilicity when compared to other pyrethroids (Table 2). Interestingly, when some of these descriptors were combined pairwise, they allowed to easily graphically discriminate allethrin/tetramethrin from other pyrethroids (Fig 7). Applying this graphically discrimination based on MW versus ALOGP or on C% versus Mv to three type I pyrethroids not previously analyzed in the present study, *i.e.*, imiprothrin, prallethrin and phenothrin, allowed to predict that imiprothrin and prallethrin, unlike phenothrin, may interact with drug transporter activities (Fig 8A). This prediction was next validated through demonstrating that imiprothrin and prallethrin, but not phenothrin, inhibited OCT1, OCT2 and OAT3 activities and cis-stimulated that of OATP2B1 when used at 100 μM (Fig 8B); imiprothrin and prallethrin, like allethrin and tetramethrin (Fig 3), however failed to alter OAT1 activity (Fig 8B).

Discussion

Previous studies have shown that some pesticides, including pyrethroids, may interact with drug transporters [26, 27, 54, 55]. The data reported in the present study fully support this hypothesis through demonstrating that the type I pyrethroids allethrin and tetramethrin inhibited various ABC and SLC drug transporters (See Table 3 for a summary of drug transporter activity regulation by these two pyrethroids). The type I pyrethroids imiprothrin and prallethrin were additionally shown to interact with OCT1, OCT2, OAT3 and OATP2B1 activities. By contrast, other type I or type II pyrethroids, did not, or only rather very moderately or marginally, impair drug transporter activities.

Allethrin and tetramethrin significantly inhibited activities of the drug efflux pumps P-gp, MRP2 and BCRP and those of the SLC transporters OATP1B1, OAT3, MATE1, OCT1 and OCT2. The potency of inhibition nevertheless depends on transporters (Table 3). According to IC_{50} values, that constitute the main parameter to be considered for drug transporter inhibition, notably under a regulatory point of view [22], transporter ranking (from the most inhibited to the less inhibited transporter) was OCT1>OATP1B1>BCRP>OCT2>MRP2>MATE1>OAT3>P-gp for allethrin and OCT1>OATP1B1>OCT2>MATE1>MRP2>BCRP>OAT3>P-gp for tetramethrin. The two pyrethroids also interacted with OATP2B1

Table 2. Molecular descriptors discriminating allethrin/tetramethrin from other pyrethroids.

Molecular descriptor			Index mean		*p*-value[a]
Name	Description	Block	Allethrin- Tetramethrin	Other pyrethroids	
MW	molecular weight	CI[b]	317.0	422.7	0.0198
AMW	average molecular weight	CI	6.5	8.7	0.0321
Mv	mean atomic van der Waals volume (scaled on Carbon atom)	CI	0.590	0.666	0.0021
Mp	mean atomic polarizability (scaled on Carbon atom)	CI	0.631	0.691	0.135
nSK	number of non-H atoms	CI	23.0	28.5	0.0221
nBO	number of non-H bonds	CI	24.5	30.5	0.0223
SCBO	sum of conventional bond orders (H-depleted)	CI	29.5	39.7	0.0123
RBF	rotatable bond fraction	CI	0.110	0.136	0.0348
nH	number of Hydrogen atoms	CI	25.50	20.36	0.0478
H%	percentage of H atoms	CI	52.60	41.51	0.008
C%	percentage of C atoms	CI	39.20	45.49	0.0008
O%	percentage of O atoms	CI	7.25	5.78	0.0488
nCsp3	number of sp3 hybridized Carbon atoms	CI	11.50	6.82	0.0004
nCsp2	number of sp2 hybridized Carbon atoms	CI	7.50	14.82	0.004
AMR	Ghose-Crippen molar refractivity	MP[c]	89.45	107.59	0.0447
MLOGP	Moriguchi octanol-water partition coeff.(logP)	MP	3.478	4.497	0.0017
ALOGP	Ghose-Crippen octanol-water partition coeff.(logP)	MP	3.676	5.814	0.0034
ALOGP2	squared Ghose-Crippen octanol-water partition coeff. (logP^2)	MP	13.567	34.581	0.0131
PDI	packing density index	MP	0.900	0.928	0.0196

[a] given by Student's *t* test.

[b] constitutional indice.

[c] molecular property.

doi:10.1371/journal.pone.0169480.t002

activity, which was *cis*-stimulated. Only OATP1B3, OAT1 and MATE2-K activities were not altered by the two pyrethroids. The fact that allethrin and tetramethrin failed to interact with these drug transporters, associated to the stimulation of OATP2B1 and to the differential sensitivities of inhibited transporters, discards any general and non-discriminating inhibitory effect of allethrin and tetramethrin towards membrane transporter activities. In addition, IC_{50} for transporter inhibition by allethrin and tetramethrin range from 2.6 μM to 77.6 μM, and such values are generally much higher than pyrethroid concentrations (around 0.5–2 μM) usually required for interacting with sodium channels in primary cultured mammalian cells [56], making unlikely that drug transporter inhibition by pyrethroids may be due to alteration of sodium channel activity. This conclusion is also fully supported by the fact that the majority of pyrethroids, excepted allethrin, tetramethrin, imiprothrin and prallethrin, failed to inhibit transporters in a major and notable way, even if they are all presumed to efficiently alter sodium channel activity [35]. Interactions of some pyrethroids such as allethrin and tetramethrin with various drug transporters can rather be considered as specific, most likely reflecting direct and transporter-dependent interactions of these two pyrethroids with substrate and/or regulatory binding sites on drug transporters, as classically thought for drug transporter inhibitors [57]. In this context, it can be speculated that binding of allethrin and tetramethrin to targeted transporters reflects physico-chemical properties specific to these two pyrethroids. Such properties are likely unrelated to those underlying activity of allethrin and tetramethrin towards sodium channels. Indeed, the sodium channels-based insecticidal activity of allethrin and tetramethrin is strictly dependent upon the entire stereospecific structure of these insecticides [9, 34], as for other pyrethroids inactive or poorly active on transporters. It is consequently

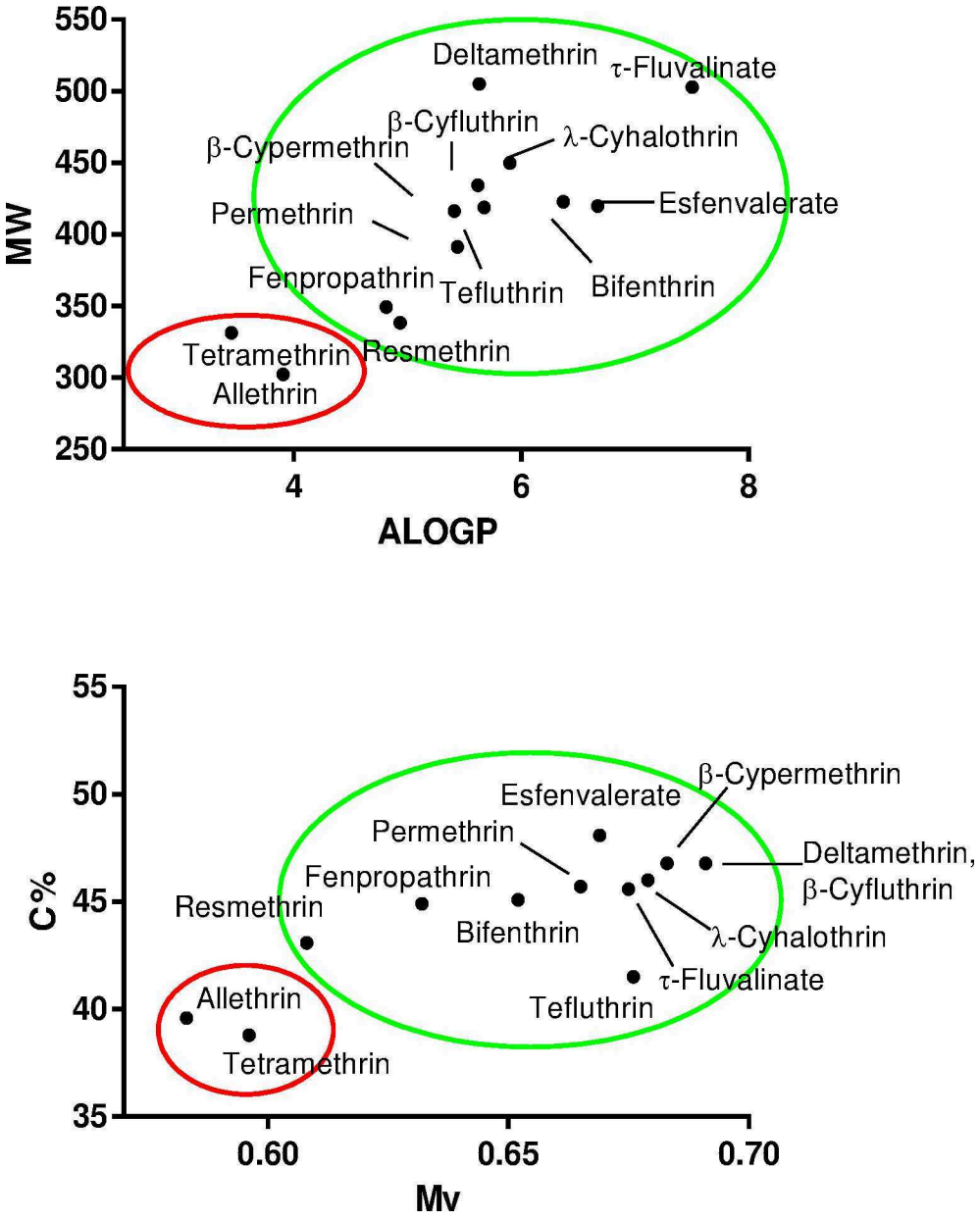


Fig 7. Graphical pairwise representation of some molecular descriptors allowing to discriminate allethrin/tetramethrin from other pyrethoids. Allethrin/tetramethrin are graphically included in a red circle, whereas other pyrethoids are included in a green circle. MW, molecular weight; ALOGP, Ghose-Crippen-Viswanadhan octanol-water partition coefficient; Mv, mean atomic van der Waals volume (scaled on Carbon atom); C%, percentage of C atoms.

doi:10.1371/journal.pone.0169480.g007

restricted to some stereoisomers and did not rely on a specific substructure reactive entity or molecular moiety that could be identified as the toxophore conferring pyrethroid-like insecticidal activity [35]. The inhibitory effects against transporter activities of allethrin and tetramethrin can therefore not been specifically ascribed to the pyrethroid isomers within these mixtures that are insecticides and mammalian neurotoxicants. Further studies are therefore likely required to investigate the exact contribution of the various tetramethrin and allethrin stereoisomers not implicated in primary insecticidal and neurotoxic effects to drug transporter

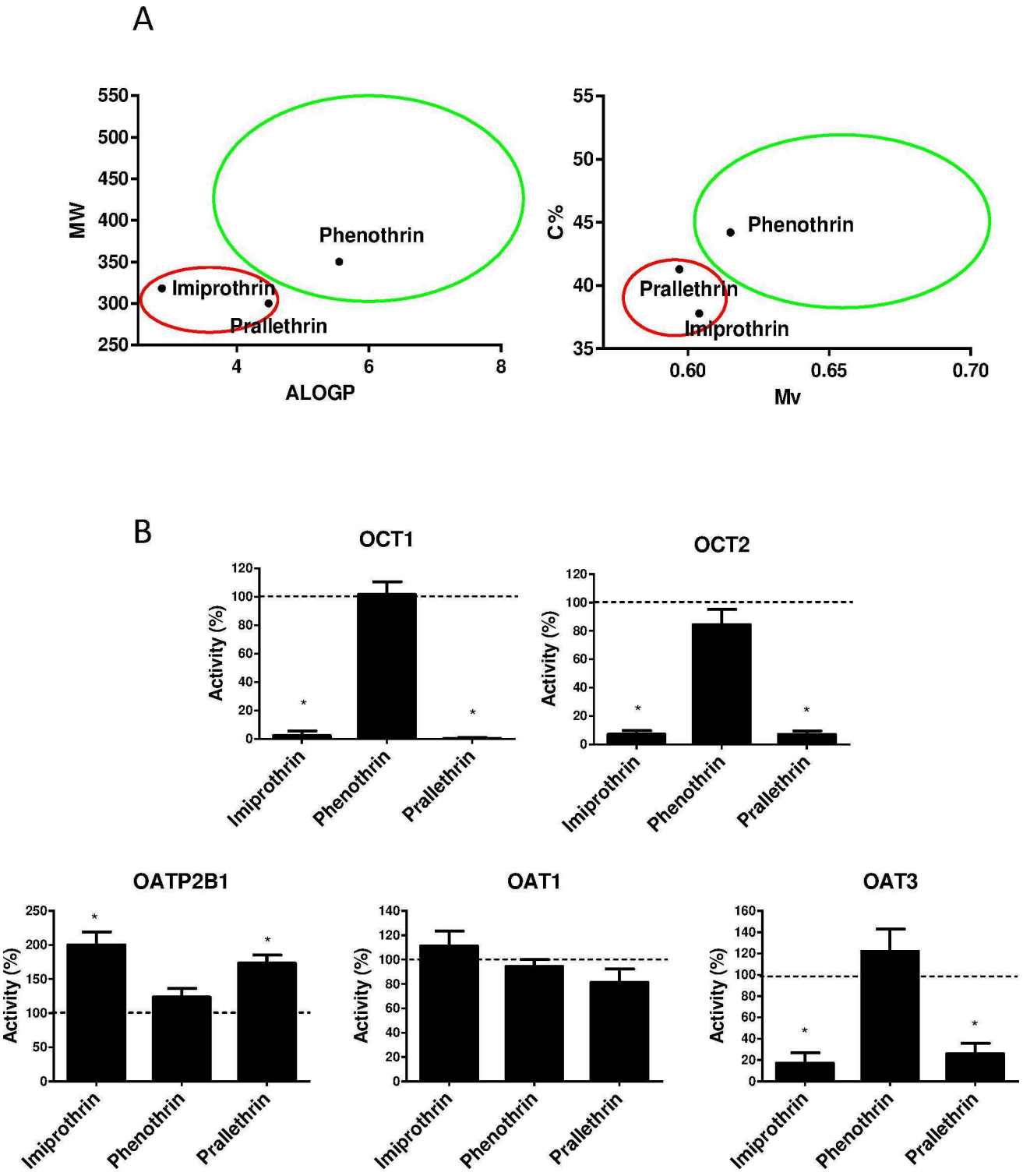


Fig 8. Effects of imiprothrin, phenothrin and prallethrin on OCT1, OCT2, OATP2B1, OAT1 and OAT3 activities. (A) Imiprothrin, phenothrin and prallethrin were projected on graphs MW (molecular weight) versus ALOGP (Ghose-Crippen-Viswanadhan octanol-water partition coefficient) (Right panel) and C % (percentage of C atoms) versus Mv (mean atomic van der Waals volume, scaled on Carbon atom) (Left panel). Red and green circles were placed exactly as defined in Fig 7 and putatively discriminated pyrethroids interacting with drug transporters (red circle) from those that do not it (green circle). (B) Activities of OCT1, OCT2, OATP2B1, OAT1 and OAT3 were determined in transporter-transfected HEK cells in the absence or presence of reference inhibitors or of imiprothrin, phenothrin or prallethrin (each used at 100 μM), as described in Materials and Methods. Data are expressed as percentages of activities found in untreated control cells, arbitrarily set

at 100% and indicated by dotted lines on graphs; they are the means ± SEM of at least three independent assays, each being usually performed in triplicate. *, p<0.05 when compared to untreated control cells.

doi:10.1371/journal.pone.0169480.g008

inhibition, knowing that the effects of drug transporter inhibitors may exhibit stereoselectivity [58].

Physicochemical parameters involved in drug transporter inhibitory effects exerted by allethrin and tetramethrin likely include constitutional indices, such as molecular weight and polarizability, and molecular properties, such as hydrophobicity (LogP), which were found to significantly discriminate allethrin/tetramethrin from other pyrethroids. Importantly, these basic descriptors have already been shown to be crucial for inhibition of the transporters targeted by the two pyrethroids. Lipophilicity/LogP, molecular weight and/or molecular polarizability thus constitute important parameters to consider for inhibiting MRP2, BCRP, OATP1B1, OAT3, MATE1, OCT1 or OCT2 [59–65]. Interestingly, pairwise association of some of these basic descriptors allow to easily and graphically differentiate allethrin/tetramethrin from other pyrethroids not, or only poorly interacting with drug transporters. Such a graphical discrimination was moreover used to successfully predict whether pyrethroids such as imiprothrin, phenothrin and prallethrin may interact with activity of transporters like OCT1, OCT2, OATP2B1, OAT1 and OAT3. This suggests that taking into consideration various descriptors together, including not only basic descriptors but also 2D- and 3D-molecular descriptors, would help to precisely and more extensively characterize the molecular basis of the specific interactions of some pyrethroids with drug transporters. In particular, this may lead to a better knowledge of the molecular features involved in *cis*-stimulation of OATP2B1 by pyrethroids like allethrin and tetramethrin. *Cis*-stimulation of OATP transporters has already been reported for other chemicals [60]. Similarly, other transporters like MRP2, OAT1, OAT3 and MATE1 are also subjected to *cis*-stimulation by some chemicals [61, 62, 66]. The molecular mechanisms that underlie such *cis*-stimulatory effects remain however yet poorly characterized.

Among transporters targeted by allethrin and tetramethrin, OCT1 is likely a major one. Indeed, allethrin and tetramethrin inhibited OCT1-mediated transport of DAPI with IC_{50} in the 2–5 μM range. Moreover, OCT1-mediated transport of the dye was similarly markedly inhibited by 100 μM imiprothrin and prallethrin, whereas other pyrethoids also impacted OCT1 activity, although in a weaker manner. Allethrin and tetramethrin also blocked

Table 3. Summary of allethrin and tetramethrin effects towards drug transporters.

Drug transporter		Allethrin	Tetramethrin
ABC transporter	P-gp	Inhibition (IC_{50}>100 μM)	Inhibition (IC_{50}>100 μM)
	MRP2	Inhibition (IC_{50} = 48.2 μM)	Inhibition (IC_{50} = 65.5 μM)
	BCRP	Inhibition (IC_{50} = 42.5 μM)	Inhibition (IC_{50} = 72.5 μM)
SLC transporter	OATP1B1	Inhibition (IC_{50} = 16.5 μM)	Inhibition (IC_{50} = 5.7 μM)
	OATP1B3	No effect (up to 100 μM)	No effect (up to 100 μM)
	OATP2B1	Stimulation (EC_{50} = 37.8 μM)	Stimulation (EC_{50} = 10.1 μM)
	OAT1	No effect (up to 100 μM)	No effect (up to 100 μM)
	OAT3	Inhibition (IC_{50} = 69.4 μM)	Inhibition (IC_{50} = 77.6 μM)
	MATE1	Inhibition (IC_{50} = 50.2 μM)	Inhibition (IC_{50} = 47.5 μM)
	MATE2-K	No effect (up to 100 μM)	No effect (up to 100 μM)
	OCT1	Inhibition (IC_{50} = 2.6 μM)	Inhibition (IC_{50} = 4.9 μM)
	OCT2	Inhibition (IC_{50} = 42.6 μM)	Inhibition (IC_{50} = 11.2 μM)

doi:10.1371/journal.pone.0169480.t003

OCT1-mediated transport of the reference OCT1 substrate TEA, as well as that of the endogenous substrate dopamine. Inhibition of OCT1-related transport of dopamine by the two pyrethroids was however rather less marked than that of DAPI; indeed, allethrin used at 10 μM reduced OCT1-mediated DAPI and dopamine accumulation by 73.7% and 51.6%, respectively, whereas 10 μM tetramethrin decreased DAPI uptake by 66.4%, but failed to significantly alter that of dopamine (S7B Fig and Fig 5). This likely illustrates the fact that inhibitory profiles for a transporter can vary according to the nature of the substrate and of drug binding sites, as already established for various transporters, including organic cation transporters [67–69]. The mechanism by which pyrethroids like allethrin and tetramethrin down-regulate OCT1 activity remain to be determined. Because the two pyrethroids failed to *trans*-stimulate OCT1 activity, but rather *trans*-inhibited it, they are likely not substrate for OCT1. This may suggest that they do not act through a competitive mechanism toward the transport drug binding site on OCT1. High lipophilicity has been previously shown to be positively correlated to OCT1 inhibition, whereas a high molecular dipole moment and many hydrogen bonds were negatively correlated and molecular weight was not correlated [63]. In agreement with these data, we have found that molecular weight was also not correlated with OCT1 inhibition by pyrethroids. By contrast, LogP was negatively correlated for pyrethroids, whereas the number of hydrogen bonds as well as those of hydrogen bond acceptors and donors were not correlated. The reason for these discrepancies between our study and that of Ahlin et al. [63] is unclear, but could be linked to the small number and the relative structural homology of pyrethroids analyzed in the present study (n = 14) when compared to the larger number of structurally-diverse chemicals (n = 191) previously investigated [63]. Moreover, all the analyzed pyrethroids are rather lipophilic and non-charged compounds. Nevertheless, a great number of molecular descriptors, notably 2D-matrix based descriptors, has been found to be correlated to OCT1 activity inhibition by pyrethroids; some of them, notably some walk and path counts, were moreover demonstrated to exhibit a highly significant linear relationship with the percentage of OCT1 activity inhibition. Beyond pyrethroids, further studies are likely required to evaluate the relevance of these molecular descriptors for predicting OCT1 inhibition by diverse structurally-unrelated chemicals.

The putative relevance of the transporter inhibitions described *in vitro* in the present study to human exposure to environmental pyrethroids is probably a key-point that has to be considered. In this context, it is first noteworthy that only some of the pyrethroids tested, *i.e.*, allethrin, tetramethrin, imiprothrin and prallethrin, exhibit significant inhibitory effects towards transporters; this indicates that such effects on drug transporters are likely idiosyncratic off-target effects of a limited number of compounds rather than representative of effects relevant to the toxicology of pyrethroids as a class. Moreover, blood concentrations of pyrethroids are very low or not detected in human subjects environmentally exposed to these pesticides (<5μg/L, *i.e.*, <12.8 nM for cyfluthrin, cypermethrin, deltamethrin or permethrin [70]). This makes very unlikely that pyrethroid concentrations required to inhibit drug transporters, which range from 2.6 μM to 77.6 μM for allethrin/tetramethrin according to IC_{50} values, and are therefore much higher than those targeting ion channels [56], may be reached *in vivo*. Moreover, following systemic absorption, pyrethroids are rapidly and extensively metabolized through oxidation, ester hydrolysis and conjugation, which precludes their accumulation in any specific tissues or organs [71]. Transporter inhibition in response to environmental exposure to pyrethroids such as allethrin and tetramethrin is therefore unlikely to occur at first view, which discards any drug-drug interactions due to drug transport impairment or any alteration of endogenous substrate transport by environmental pyrethroids. Putative consideration of the inhibitory effects of pyrethroids like allethrin and tetramethrin towards drug transporters under a regulatory point of view for pyrethroid risk assessment can therefore be

excluded. It should be however kept in mind that humans are likely exposed not only to a single pyrethroid, but to other pesticides and xenobiotics, that may also interact with drug transporters [55], as recently demonstrated for notably organochlorine pesticides [43], polychlorinated biphenyls [72], diesel exhaust particle components [41] and perfluorinated surfactants [73]. Plasma levels of pyrethroids, especially allethrin and tetramethrin, associated with those of other pollutants, may therefore be sufficient to contribute to synergic or additive inhibitory effects towards drug transporters, as already described for pesticide combinations [74]. In addition, concentrations of pyrethroids may be much higher in the gastro-intestinal tract (before first-pass metabolism) than in plasma, and activities of drug transporters notably expressed at the intestinal level, especially P-gp, MRP2, BCRP, OATP2B1 and OCT1 [22, 75], may therefore be hypothesized to be impacted by ingested pyrethroids. Moreover, characterizing concentration-dependence of transporter activity inhibition by allethrin and tetramethrin in the present study was based on IC_{50} values; because IC_{50} values rely on substrate concentrations [76], the relevance of potential transporter inhibition has likely to be challenged according to the nature and *in vivo* concentrations of putative substrates. Finally, elevated concentrations of pyrethroids are likely to occur during acute poisoning [77] and, in this case, inhibition of transport of endogenous substrates like dopamine by allethrin or tetramethrin may contribute to the toxicity of these pesticides.

Another points that should be considered are the putative handling of pyrethroids by drug transporters, notably by intestinal transporters which in case of food and drinking water exposure would first be encountered [29], and the consequences for toxicokinetics of these insecticides. In this context, it is noteworthy that whether pyrethroids or their metabolites can be substrates for drug transporters remains to be determined. As already discussed above, transport of allethrin and tetramethrin by OCT1 is however unlikely to occur, as demonstrated by the failure of these two chemicals to *trans*-stimulate OCT1 activity. In the same way, deltamethrin has been recently shown to be not effluxed by P-gp [78], which agrees with the fact that this pyrethroid did not inhibit this ABC efflux pump in the present study and also failed to alter P-gp ATPase activity [28]. Conflicting results have however been reported with respect to interactions of pyrethroids with P-gp. Cypermethrin, esfenvalerate, fluvalinate and permethrin have thus been shown to inhibit P-gp activity or ATPase activity [26, 27], but they did not alter P-gp activity in the present study. Similarly, permethrin and resmethrin inhibited BCRP ATPase activity [28], without inhibiting BCRP activity in our study. The reasons of such discrepancies are unclear, but they could be linked to the high concentrations of pyrethroids used in some previous studies [26] or to the different methodological approaches retained for investigating ABC efflux pump, *i.e.*, ATPase activity versus effective transport of reference substrates.

Finally, the hypothesis that pyrethroids may alter expression of drug transporters, notably in the liver, has likely to be additionally considered. Indeed, pyrethroids can activate drug sensing receptors like PXR and CAR [17, 18], which are well-known to be implicated in drug transporter expression regulation [79, 80]. Activation of PXR or CAR by pyrethroids may consequently result in up-regulation of transporters targeted by these receptors such as P-gp [81], MRP2 [82] or MRP3 [83]. Whether such putative regulations may occur in response to environmental concentrations of pyrethroids and may have functional consequences would deserve further studies.

In summary, the pyrethroids allethrin and tetramethrin were found to inhibit activity of various ABC and SLC drug transporters. Such inhibitions of drug transporters however occurred for concentrations of the two pyrethroids much higher than those commonly expected in response to environmental exposure, making unlikely any relevant contribution of transporter inhibition to pyrethroid toxicity in environmentally exposed humans.

Supporting Information

S1 File. List of molecular descriptors correlated with OCT1 activity inhibition by pyrethroids ((|r|>0.80).
(XLSX)

S1 Table. Number of possible stereoisomers for pyrethroids.
(DOCX)

S2 Table. Parameters for transporter-expressing cell culture.
(DOCX)

S3 Table. Parameters of drug transport assays.
(DOCX)

S4 Table. Molecular descriptors highly correlated with OCT1 activity inhibition by pyrethroids ((|r|>0.92).
(DOCX)

S1 Fig. Chemical structures of pyrethroids.
(TIF)

S2 Fig. ABC transporter activities in ABC transporter-expressing reference cell lines. P-gp, MRP2 and BCRP activities were determined through measuring cellular accumulation (P-gp and MRP2 activities) or retention (BCRP activity) of reference substrates (rhodamine 123 for P-gp, CF for MRP2 and Hoechst 33342 for BCRP), in the absence or presence of reference inhibitors (50 μM verapamil for P-gp, 2 mM probenecid for MRP2 and 10 μM fumitremorgin C for BCRP), in parental MCF7 and P-gp-positive MCF7R cells, in MRP2-positive HuH-7 cells and in HEK-BCRP cells. Data shown are the means ± SEM of at least three independent assays, each being performed in triplicate. *, $p<0.05$. FAU, fluorescence arbitrary unit.
(TIF)

S3 Fig. Concentration-dependent effects of allethrin and tetramethrin towards MRP2 and BCRP activities. (A) MRP2 and (B) BCRP activities were determined in the absence or presence of various concentrations of allethrin or tetramethrin, as described in Materials and Methods. Data are expressed as percentages of transporter activity found in control untreated cells, arbitrarily set at 100%; they are the means ± SEM of three independent assays, each being performed in triplicate. IC_{50} values are indicated at the top of graphs.
(TIF)

S4 Fig. OATP/OAT activities in transporter-expressing reference cell clones. OATP1B1, OATP1B3, OATP2B1, OAT1 and OAT3 activities were determined through measuring intracellular accumulation of reference substrates (E3S for OATP1B1 and OATP2B1 and fluorescein for OATP1B3, OAT1 and OAT3), in the absence or presence of the reference inhibitor probenecid, in OATP- or OAT-transfected cells and in control parental transporter-untransfected cells. Data shown are the means ± SEM of at least three independent assays, each being performed in triplicate. *, $p<0.05$. FAU, fluorescence arbitrary unit.
(TIF)

S5 Fig. Concentration-dependent effects of allethrin and tetramethrin towards OATP1B1, OATP2B1 and OAT3 activities. (A) OATP1B1, (B) OATP2B1 and (C) OAT3 activities were determined in the absence or presence of various concentrations of allethrin or tetramethrin, as described in Materials and Methods. Data are expressed as percentages of transporter activity found in control untreated cells, arbitrarily set at 100%; they are the means ± SEM of three

independent assays, each being performed in triplicate. (A, C) IC_{50} and (B) EC_{50} values are indicated at the top of graphs.
(TIF)

S6 Fig. MATE/OCT activities in transporter-expressing reference cell clones. MATE1, MATE2-K, OCT1 and OCT2 activities were determined through measuring intracellular accumulation of reference substrates (TEA for MATE1 and MATE2-K, DAPI for OCT1 and rhodamine 123 for OCT2), in the absence or presence of reference inhibitors (verapamil for MATEs and OCT1 and amitriptyline for OCT2), in MATE- or OCT-transfected HEK293 cells and in control HEK-MOCK cells. Data shown are the means ± SEM of at least three independent assays, each being usually performed in triplicate. *, $p<0.05$. FAU, fluorescence arbitrary unit.
(TIF)

S7 Fig. Concentration-dependent effects of allethrin and tetramethrin towards MATE1, OCT1 and OCT2 activities. (A) MATE1, (B) OCT1 and (C) OCT2 activities were determined in the absence or presence of various concentrations of allethrin or tetramethrin, as described in Materials and Methods. Data are expressed as percentages of transporter activity found in control untreated cells, arbitrarily set at 100%; they are the means ± SEM of three independent assays, each being performed in triplicate. IC_{50} values are indicated at the top of graphs.
(TIF)

S8 Fig. Linear regression analysis of percentage of OCT1 activity inhibition by pyrethroids versus molecular descriptor values. Linear regression analysis was performed for percentages of OCT1 activity inhibition versus values of the molecular descriptors piPC02, piPC03, piPC04, piPC05, piPC06, SpDiam_X, JGI3, SM02_EA(bo) and SM04_EA(bo). The r^2 value, a measure of the goodness of the fit, and the *p*-value are indicated at the top of graphs.
(TIF)

Author Contributions

Conceptualization: LC AB SP OF.

Data curation: LC.

Formal analysis: LC AB OF.

Investigation: LC AB.

Methodology: LC AB MLV OF.

Project administration: OF.

Resources: BS CD YP.

Software: AB.

Supervision: OF.

Validation: LC AB MLV SP OF.

Visualization: LC OF.

Writing – original draft: OF.

Writing – review & editing: LC AB BS SP OF.

References

1. Katsuda Y. Progress and future of pyrethroids. Top Curr Chem. 2012; 314:1–30. Epub 2011/11/04. doi: 10.1007/128_2011_252 PMID: 22048685
2. Heudorf U, Angerer J. Metabolites of pyrethroid insecticides in urine specimens: current exposure in an urban population in Germany. Environ Health Perspect. 2001; 109(3):213–7. Epub 2001/05/03. PubMed Central PMCID: PMC1240237. PMID: 11333180
3. Bouvier G, Seta N, Vigouroux-Villard A, Blanchard O, Momas I. Insecticide urinary metabolites in non-occupationally exposed populations. J Toxicol Environ Health B Crit Rev. 2005; 8(6):485–512. Epub 2005/09/29. doi: 10.1080/10937400591007284 PMID: 16188732
4. Riederer AM, Hunter RE Jr., Hayden SW, Ryan PB. Pyrethroid and organophosphorus pesticides in composite diet samples from Atlanta, USA adults. Environ Sci Technol. 2010; 44(1):483–90. Epub 2009/12/10. doi: 10.1021/es902479h PMID: 19994894
5. Peruga A, Hidalgo C, Sancho JV, Hernandez F. Development of a fast analytical method for the individual determination of pyrethrins residues in fruits and vegetables by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. J Chromatogr A. 2013; 1307:126–34. Epub 2013/08/14. doi: 10.1016/j.chroma.2013.07.090 PMID: 23938081
6. Morgan MK. Children's exposures to pyrethroid insecticides at home: a review of data collected in published exposure measurement studies conducted in the United States. Int J Environ Res Public Health. 2012; 9(8):2964–85. Epub 2012/10/16. PubMed Central PMCID: PMC3447599. doi: 10.3390/ijerph9082964 PMID: 23066409
7. Thiphom S, Prapamontol T, Chantara S, Mangklabruks A, Suphavilai C, Ahn KC, et al. Determination of the pyrethroid insecticide metabolite 3-PBA in plasma and urine samples from farmer and consumer groups in northern Thailand. J Environ Sci Health B. 2014; 49(1):15–22. Epub 2013/10/22. PubMed Central PMCID: PMC4020914. doi: 10.1080/03601234.2013.836862 PMID: 24138464
8. Soderlund DM, Bloomquist JR. Neurotoxic actions of pyrethroid insecticides. Annu Rev Entomol. 1989; 34:77–96. Epub 1989/01/01. doi: 10.1146/annurev.en.34.010189.000453 PMID: 2539040
9. Clark JM, Symington SB. Advances in the mode of action of pyrethroids. Top Curr Chem. 2012; 314:49–72. Epub 2011/10/26. doi: 10.1007/128_2011_268 PMID: 22025067
10. Bradberry SM, Cage SA, Proudfoot AT, Vale JA. Poisoning due to pyrethroids. Toxicol Rev. 2005; 24 (2):93–106. Epub 2005/09/27. PMID: 16180929
11. Baltazar MT, Dinis-Oliveira RJ, de Lourdes Bastos M, Tsatsakis AM, Duarte JA, Carvalho F. Pesticides exposure as etiological factors of Parkinson's disease and other neurodegenerative diseases—a mechanistic approach. Toxicol Lett. 2014; 230(2):85–103. Epub 2014/02/08. doi: 10.1016/j.toxlet.2014.01.039 PMID: 24503016
12. Kamel F, Hoppin JA. Association of pesticide exposure with neurologic dysfunction and disease. Environ Health Perspect. 2004; 112(9):950–8. Epub 2004/06/17. PubMed Central PMCID: PMC1247187. doi: 10.1289/ehp.7135 PMID: 15198914
13. Rizzati V, Briand O, Guillou H, Gamet-Payrastre L. Effects of pesticide mixtures in human and animal models: An update of the recent literature. Chem Biol Interact. 2016; 254:231–46. Epub 2016/06/18. doi: 10.1016/j.cbi.2016.06.003 PMID: 27312199
14. Crofton KM, Reiter LW. Pyrethroid insecticides and the gamma-aminobutyric acidA receptor complex: motor activity and the acoustic startle response in the rat. J Pharmacol Exp Ther. 1987; 243(3):946–54. Epub 1987/12/01. PMID: 2826762
15. Du G, Shen O, Sun H, Fei J, Lu C, Song L, et al. Assessing hormone receptor activities of pyrethroid insecticides and their metabolites in reporter gene assays. Toxicol Sci. 2010; 116(1):58–66. Epub 2010/04/23. doi: 10.1093/toxsci/kfq120 PMID: 20410157
16. Chen H, Xiao J, Hu G, Zhou J, Xiao H, Wang X. Estrogenicity of organophosphorus and pyrethroid pesticides. J Toxicol Environ Health A. 2002; 65(19):1419–35. Epub 2002/10/25. doi: 10.1080/00984100290071243 PMID: 12396874
17. Lemaire G, de Sousa G, Rahmani R. A PXR reporter gene assay in a stable cell culture system: CYP3A4 and CYP2B6 induction by pesticides. Biochem Pharmacol. 2004; 68(12):2347–58. Epub 2004/11/19. doi: 10.1016/j.bcp.2004.07.041 PMID: 15548381
18. Abass K, Lamsa V, Reponen P, Kublbeck J, Honkakoski P, Mattila S, et al. Characterization of human cytochrome P450 induction by pesticides. Toxicology. 2012; 294(1):17–26. Epub 2012/02/09. doi: 10.1016/j.tox.2012.01.010 PMID: 22310298
19. Das PC, Streit TM, Cao Y, Rose RL, Cherrington N, Ross MK, et al. Pyrethroids: cytotoxicity and induction of CYP isoforms in human hepatocytes. Drug Metabol Drug Interact. 2008; 23(3–4):211–36. Epub 2008/01/01. PMID: 19326768

20. Yang D, Wang X, Chen YT, Deng R, Yan B. Pyrethroid insecticides: isoform-dependent hydrolysis, induction of cytochrome P450 3A4 and evidence on the involvement of the pregnane X receptor. Toxicol Appl Pharmacol. 2009; 237(1):49–58. Epub 2009/03/03. PubMed Central PMCID: PMC2728345. doi: 10.1016/j.taap.2009.02.012 PMID: 19249324

21. Morisseau C, Derbel M, Lane TR, Stoutamire D, Hammock BD. Differential induction of hepatic drug-metabolizing enzymes by fenvaleric acid in male rats. Toxicol Sci. 1999; 52(2):148–53. Epub 2000/01/12. PMID: 10630566

22. Giacomini KM, Huang SM, Tweedie DJ, Benet LZ, Brouwer KL, Chu X, et al. Membrane transporters in drug development. Nat Rev Drug Discov. 2010; 9(3):215–36. Epub 2010/03/02. PubMed Central PMCID: PMC3326076. doi: 10.1038/nrd3028 PMID: 20190787

23. Fardel O, Payen L, Courtois A, Vernhet L, Lecureur V. Regulation of biliary drug efflux pump expression by hormones and xenobiotics. Toxicology. 2001; 167(1):37–46. Epub 2001/09/15. PMID: 11557128

24. Lecureur V, Courtois A, Payen L, Verhnet L, Guillouzo A, Fardel O. Expression and regulation of hepatic drug and bile acid transporters. Toxicology. 2000; 153(1–3):203–19. Epub 2000/11/25. PMID: 11090958

25. Foucaud-Vignault M, Soayfane Z, Menez C, Bertrand-Michel J, Martin PG, Guillou H, et al. P-glycoprotein dysfunction contributes to hepatic steatosis and obesity in mice. PLoS One. 2011; 6(9):e23614. Epub 2011/09/29. PubMed Central PMCID: PMC3174940. doi: 10.1371/journal.pone.0023614 PMID: 21949682

26. Bain LJ, LeBlanc GA. Interaction of structurally diverse pesticides with the human MDR1 gene product P-glycoprotein. Toxicol Appl Pharmacol. 1996; 141(1):288–98. Epub 1996/11/01. doi: 10.1006/taap.1996.0286 PMID: 8917702

27. Sreeramulu K, Liu R, Sharom FJ. Interaction of insecticides with mammalian P-glycoprotein and their effect on its transport function. Biochim Biophys Acta. 2007; 1768(7):1750–7. Epub 2007/05/11. doi: 10.1016/j.bbamem.2007.04.001 PMID: 17490606

28. Bircsak KM, Richardson JR, Aleksunes LM. Inhibition of human MDR1 and BCRP transporter ATPase activity by organochlorine and pyrethroid insecticides. J Biochem Mol Toxicol. 2013; 27(2):157–64. Epub 2012/11/22. PubMed Central PMCID: PMC4001733. doi: 10.1002/jbt.21458 PMID: 23169446

29. 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(2):284–93. Epub 2013/09/10. doi: 10.1093/toxsci/kft193 PMID: 24014652

30. Romero A, Ares I, Ramos E, Castellano V, Martinez M, Martinez-Larranaga MR, et al. Evidence for dose-additive effects of a type II pyrethroid mixture. In vitro assessment. Environ Res. 2015; 138:58–66. Epub 2015/02/18. doi: 10.1016/j.envres.2015.02.008 PMID: 25688004

31. Ramos-Chavez LA, Sordo M, Calderon-Aranda E, Castaneda-Saucedo E, Ostrosky-Wegman P, Moreno-Godinez ME. A permethrin/allethrin mixture induces genotoxicity and cytotoxicity in human peripheral blood lymphocytes. J Toxicol Environ Health A. 2015; 78(1):7–14. Epub 2014/11/27. doi: 10.1080/15287394.2015.956025 PMID: 25424543

32. He B, Soderlund DM. Differential state-dependent modification of rat Na(v)1.6 sodium channels expressed in human embryonic kidney (HEK293) cells by the pyrethroid insecticides tefluthrin and deltamethrin. Toxicol Appl Pharmacol. 2011; 257(3):377–87. Epub 2011/10/11. PubMed Central PMCID: PMC3226847. doi: 10.1016/j.taap.2011.09.021 PMID: 21983428

33. Choi JS, Soderlund DM. Structure-activity relationships for the action of 11 pyrethroid insecticides on rat Na v 1.8 sodium channels expressed in Xenopus oocytes. Toxicol Appl Pharmacol. 2006; 211(3):233–44. Epub 2005/07/30. doi: 10.1016/j.taap.2005.06.022 PMID: 16051293

34. Knaak JB, Dary CC, Zhang X, Gerlach RW, Tornero-Velez R, Chang DT, et al. Parameters for pyrethroid insecticide QSAR and PBPK/PD models for human risk assessment. Rev Environ Contam Toxicol. 2012; 219:1–114. Epub 2012/05/23. doi: 10.1007/978-1-4614-3281-4_1 PMID: 22610175

35. Soderlund DM, Clark JM, Sheets LP, Mullin LS, Piccirillo VJ, Sargent D, et al. Mechanisms of pyrethroid neurotoxicity: implications for cumulative risk assessment. Toxicology. 2002; 171(1):3–59. Epub 2002/01/29. PMID: 11812616

36. Morjani H, Aouali N, Belhoussine R, Veldman RJ, Levade T, Manfait M. Elevation of glucosylceramide in multidrug-resistant cancer cells and accumulation in cytoplasmic droplets. Int J Cancer. 2001; 94(2):157–65. Epub 2001/10/23. PMID: 11668492

37. Olsavsky KM, Page JL, Johnson MC, Zarbl H, Strom SC, Omiecinski CJ. Gene expression profiling and differentiation assessment in primary human hepatocyte cultures, established hepatoma cell lines, and human liver tissues. Toxicol Appl Pharmacol. 2007; 222(1):42–56. Epub 2007/05/22. PubMed Central PMCID: PMC2974173. doi: 10.1016/j.taap.2007.03.032 PMID: 17512962

38. Tournier N, Chevillard L, Megarbane B, Pirnay S, Scherrmann JM, Decleves X. Interaction of drugs of abuse and maintenance treatments with human P-glycoprotein (ABCB1) and breast cancer resistance protein (ABCG2). Int J Neuropsychopharmacol. 2010; 13(7):905–15. Epub 2009/11/06. doi: 10.1017/S1461145709990848 PMID: 19887017

39. Gui C, Miao Y, Thompson L, Wahlgren B, Mock M, Stieger B, et al. Effect of pregnane X receptor ligands on transport mediated by human OATP1B1 and OATP1B3. Eur J Pharmacol. 2008; 584(1):57–65. Epub 2008/03/07. PubMed Central PMCID: PMC2376123. doi: 10.1016/j.ejphar.2008.01.042 PMID: 18321482

40. Jouan E, Le Vee M, Denizot C, Da Violante G, Fardel O. The mitochondrial fluorescent dye rhodamine 123 is a high-affinity substrate for organic cation transporters (OCTs) 1 and 2. Fundam Clin Pharmacol. 2014; 28(1):65–77. Epub 2012/08/24. doi: 10.1111/j.1472-8206.2012.01071.x PMID: 22913740

41. Le Vee M, Jouan E, Stieger B, Lecureur V, Fardel O. Regulation of human hepatic drug transporter activity and expression by diesel exhaust particle extract. PLoS One. 2015; 10(3):e0121232. Epub 2015/03/25. PubMed Central PMCID: PMC4372591. doi: 10.1371/journal.pone.0121232 PMID: 25803276

42. Jigorel E, Le Vee M, Boursier-Neyret C, Bertrand M, Fardel O. Functional expression of sinusoidal drug transporters in primary human and rat hepatocytes. Drug Metab Dispos. 2005; 33(10):1418–22. Epub 2005/07/15. doi: 10.1124/dmd.105.004762 PMID: 16014767

43. 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(3):119–28. Epub 2014/01/28. doi: 10.1002/jbt.21543 PMID: 24464585

44. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem. 1976; 72:248–54. Epub 1976/05/07. PMID: 942051

45. Fardel O, Le Vee M, Jouan E, Denizot C, Parmentier Y. Nature and uses of fluorescent dyes for drug transporter studies. Expert Opin Drug Metab Toxicol. 2015; 11(8):1233–51. Epub 2015/06/09. doi: 10.1517/17425255.2015.1053462 PMID: 26050735

46. Zhang L, Gorset W, Dresser MJ, Giacomini KM. The interaction of n-tetraalkylammonium compounds with a human organic cation transporter, hOCT1. J Pharmacol Exp Ther. 1999; 288(3):1192–8. Epub 1999/02/23. PMID: 10027858

47. Mayati A, Bruyere A, Moreau A, Jouan E, Denizot C, Parmentier Y, et al. Protein Kinase C-Independent Inhibition of Organic Cation Transporter 1 Activity by the Bisindolylmaleimide Ro 31–8220. PLoS One. 2015; 10(12):e0144667. Epub 2015/12/15. PubMed Central PMCID: PMC4675551. doi: 10.1371/journal.pone.0144667 PMID: 26657401

48. Janusonis S. Comparing two small samples with an unstable, treatment-independent baseline. J Neurosci Methods. 2009; 179(2):173–8. Epub 2009/05/12. doi: 10.1016/j.jneumeth.2009.01.017 PMID: 19428524

49. de Winters JCF. Using the Student's t-test with extremely small sample sizes. Practical Assessment, Research & Evaluation. 2013; 18(2). Available: http://pareonline.net/getvn.asp?v=18&n=10).

50. Tan J, Choi JS, Soderlund DM. Coexpression with Auxiliary beta Subunits Modulates the Action of Tefluthrin on Rat Na(v)1.6 and Na(v)1.3 Sodium Channels. Pestic Biochem Physiol. 2011; 101(3):256–64. Epub 2012/05/12. PubMed Central PMCID: PMC3346283. doi: 10.1016/j.pestbp.2011.10.003 PMID: 22577241

51. Soderlund DM, Tan J, He B. Functional reconstitution of rat Nav1.6 sodium channels in vitro for studies of pyrethroid action. Neurotoxicology. 2016. Epub 2016/03/26.

52. Boxberger KH, Hagenbuch B, Lampe JN. Common drugs inhibit human organic cation transporter 1 (OCT1)-mediated neurotransmitter uptake. Drug Metab Dispos. 2014; 42(6):990–5. Epub 2014/04/02. PubMed Central PMCID: PMC4014663. doi: 10.1124/dmd.113.055095 PMID: 24688079

53. Ose A, Toshimoto K, Ikeda K, Maeda K, Yoshida S, Yamashita F, et al. Development of a Support Vector Machine-Based System to Predict Whether a Compound Is a Substrate of a Given Drug Transporter Using Its Chemical Structure. J Pharm Sci. 2016; 105(7):2222–30. Epub 2016/06/06. doi: 10.1016/j.xphs.2016.04.023 PMID: 27262201

54. Halwachs S, Schafer I, Kneuer C, Seibel P, Honscha W. Assessment of ABCG2-mediated transport of pesticides across the rabbit placenta barrier using a novel MDCKII in vitro model. Toxicol Appl Pharmacol. 2016; 305:66–74. Epub 2016/06/12. doi: 10.1016/j.taap.2016.06.007 PMID: 27288731

55. 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(1):29–46. Epub 2011/12/20. doi: 10.1517/17425255.2012.637918 PMID: 22176607

56. Cao Z, Shafer TJ, Crofton KM, Gennings C, Murray TF. Additivity of pyrethroid actions on sodium influx in cerebrocortical neurons in primary culture. Environ Health Perspect. 2011; 119(9):1239–46. Epub 2011/06/15. PubMed Central PMCID: PMC3230403. doi: 10.1289/ehp.1003394 PMID: 21665567

57. Montanari F, Ecker GF. Prediction of drug-ABC-transporter interaction—Recent advances and future challenges. Adv Drug Deliv Rev. 2015; 86:17–26. Epub 2015/03/15. doi: 10.1016/j.addr.2015.03.001 PMID: 25769815

58. Zhou Q, Yu LS, Zeng S. Stereoselectivity of chiral drug transport: a focus on enantiomer-transporter interaction. Drug Metab Rev. 2014; 46(3):283–90. Epub 2014/05/07. doi: 10.3109/03602532.2014.887094 PMID: 24796860

59. Matsson P, Englund G, Ahlin G, Bergstrom CA, Norinder U, Artursson P. A global drug inhibition pattern for the human ATP-binding cassette transporter breast cancer resistance protein (ABCG2). J Pharmacol Exp Ther. 2007; 323(1):19–30. Epub 2007/07/10. doi: 10.1124/jpet.107.124768 PMID: 17616561

60. De Bruyn T, van Westen GJ, Ijzerman AP, Stieger B, de Witte P, Augustijns PF, et al. Structure-based identification of OATP1B1/3 inhibitors. Mol Pharmacol. 2013; 83(6):1257–67. Epub 2013/04/11. doi: 10.1124/mol.112.084152 PMID: 23571415

61. Duan P, Li S, Ai N, Hu L, Welsh WJ, You G. Potent inhibitors of human organic anion transporters 1 and 3 from clinical drug libraries: discovery and molecular characterization. Mol Pharm. 2012; 9(11):3340–6. Epub 2012/09/15. PubMed Central PMCID: PMC3490050. doi: 10.1021/mp300365t PMID: 22973893

62. Wittwer MB, Zur AA, Khuri N, Kido Y, Kosaka A, Zhang X, et al. Discovery of potent, selective multidrug and toxin extrusion transporter 1 (MATE1, SLC47A1) inhibitors through prescription drug profiling and computational modeling. J Med Chem. 2013; 56(3):781–95. Epub 2012/12/18. PubMed Central PMCID: PMC4068829. doi: 10.1021/jm301302s PMID: 23241029

63. Ahlin G, Karlsson J, Pedersen JM, Gustavsson L, Larsson R, Matsson P, et al. Structural requirements for drug inhibition of the liver specific human organic cation transport protein 1. J Med Chem. 2008; 51(19):5932–42. Epub 2008/09/16. doi: 10.1021/jm8003152 PMID: 18788725

64. Pedersen JM, Matsson P, Bergstrom CA, Norinder U, Hoogstraate J, Artursson P. Prediction and identification of drug interactions with the human ATP-binding cassette transporter multidrug-resistance associated protein 2 (MRP2; ABCC2). J Med Chem. 2008; 51(11):3275–87. Epub 2008/05/07. doi: 10.1021/jm7015683 PMID: 18457386

65. Kido Y, Matsson P, Giacomini KM. Profiling of a prescription drug library for potential renal drug-drug interactions mediated by the organic cation transporter 2. J Med Chem. 2011; 54(13):4548–58. Epub 2011/05/24. PubMed Central PMCID: PMC3257218. doi: 10.1021/jm2001629 PMID: 21599003

66. Heredi-Szabo K, Jemnitz K, Kis E, Ioja E, Janossy J, Vereczkey L, et al. Potentiation of MRP2/Mrp2-mediated estradiol-17beta-glucuronide transport by drugs—a concise review. Chem Biodivers. 2009; 6(11):1970–4. Epub 2009/11/26. doi: 10.1002/cbdv.200900102 PMID: 19937833

67. Hacker K, Maas R, Kornhuber J, Fromm MF, Zolk O. Substrate-Dependent Inhibition of the Human Organic Cation Transporter OCT2: A Comparison of Metformin with Experimental Substrates. PLoS One. 2015; 10(9):e0136451. Epub 2015/09/04. PubMed Central PMCID: PMC4556614. doi: 10.1371/journal.pone.0136451 PMID: 26327616

68. Thevenod F, Ciarimboli G, Leistner M, Wolff NA, Lee WK, Schatz I, et al. Substrate- and cell contact-dependent inhibitor affinity of human organic cation transporter 2: studies with two classical organic cation substrates and the novel substrate cd2+. Mol Pharm. 2013; 10(8):3045–56. Epub 2013/06/15. doi: 10.1021/mp400113d PMID: 23763587

69. Martinez-Guerrero LJ, Wright SH. Substrate-dependent inhibition of human MATE1 by cationic ionic liquids. J Pharmacol Exp Ther. 2013; 346(3):495–503. Epub 2013/06/21. PubMed Central PMCID: PMC3876781. doi: 10.1124/jpet.113.204206 PMID: 23785176

70. Leng G, Ranft U, Sugiri D, Hadnagy W, Berger-Preiss E, Idel H. Pyrethroids used indoors—biological monitoring of exposure to pyrethroids following an indoor pest control operation. Int J Hyg Environ Health. 2003; 206(2):85–92. Epub 2003/04/24. doi: 10.1078/1438-4639-00199 PMID: 12708229

71. Kaneko H. Pyrethroids: mammalian metabolism and toxicity. J Agric Food Chem. 2011; 59(7):2786–91. Epub 2010/12/08. doi: 10.1021/jf102567z PMID: 21133409

72. Nicklisch SC, Rees SD, McGrath AP, Gokirmak T, Bonito LT, Vermeer LM, et al. Global marine pollutants inhibit P-glycoprotein: Environmental levels, inhibitory effects, and cocrystal structure. Sci Adv. 2016; 2(4):e1600001. Epub 2016/05/07. PubMed Central PMCID: PMC4846432. doi: 10.1126/sciadv.1600001 PMID: 27152359

73. Nakagawa H, Terada T, Harada KH, Hitomi T, Inoue K, Inui K, et al. Human organic anion transporter hOAT4 is a transporter of perfluorooctanoic acid. Basic Clin Pharmacol Toxicol. 2009; 105(2):136–8. Epub 2009/04/18. doi: 10.1111/j.1742-7843.2009.00409.x PMID: 19371258

74. Pivcevic B, Zaja R. Pesticides and their binary combinations as P-glycoprotein inhibitors in NIH 3T3/MDR1 cells. Environ Toxicol Pharmacol. 2006; 22(3):268–76. Epub 2006/11/01. doi: 10.1016/j.etap.2006.04.002 PMID: 21783720

75. Stieger B, Meier PJ. Pharmacogenetics of drug transporters in the enterohepatic circulation. Pharmacogenomics. 2011; 12(5):611–31. Epub 2011/05/31. doi: 10.2217/pgs.11.53 PMID: 21619426

76. Cheng Y, Prusoff WH. Relationship between the inhibition constant (K1) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition (I50) of an enzymatic reaction. Biochem Pharmacol. 1973; 22 (23):3099–108. Epub 1973/12/01. PMID: 4202581

77. Gotoh Y, Kawakami M, Matsumoto N, Okada Y. Permethrin emulsion ingestion: clinical manifestations and clearance of isomers. J Toxicol Clin Toxicol. 1998; 36(1–2):57–61. Epub 1998/04/16. PMID: 9541045

78. Amaraneni M, Sharma A, Pang J, Muralidhara S, Cummings BS, White CA, et al. Plasma protein binding limits the blood brain barrier permeation of the pyrethroid insecticide, deltamethrin. Toxicol Lett. 2016; 250–251:21–8. Epub 2016/03/27. doi: 10.1016/j.toxlet.2016.03.006 PMID: 27016408

79. Klaassen CD, Slitt AL. Regulation of hepatic transporters by xenobiotic receptors. Curr Drug Metab. 2005; 6(4):309–28. Epub 2005/08/17. PMID: 16101571

80. Staudinger JL, Woody S, Sun M, Cui W. Nuclear-receptor-mediated regulation of drug- and bile-acid-transporter proteins in gut and liver. Drug Metab Rev. 2013; 45(1):48–59. Epub 2013/01/22. PubMed Central PMCID: PMC4557796. doi: 10.3109/03602532.2012.748793 PMID: 23330541

81. Geick A, Eichelbaum M, Burk O. Nuclear receptor response elements mediate induction of intestinal MDR1 by rifampin. J Biol Chem. 2001; 276(18):14581–7. Epub 2001/04/12. doi: 10.1074/jbc.M010173200 PMID: 11297522

82. Kast HR, Goodwin B, Tarr PT, Jones SA, Anisfeld AM, Stoltz CM, et al. Regulation of multidrug resistance-associated protein 2 (ABCC2) by the nuclear receptors pregnane X receptor, farnesoid X-activated receptor, and constitutive androstane receptor. J Biol Chem. 2002; 277(4):2908–15. Epub 2001/11/14. doi: 10.1074/jbc.M109326200 PMID: 11706036

83. Teng S, Jekerle V, Piquette-Miller M. Induction of ABCC3 (MRP3) by pregnane X receptor activators. Drug Metab Dispos. 2003; 31(11):1296–9. Epub 2003/10/23. doi: 10.1124/dmd.31.11.1296 PMID: 14570758

S1 File. List of molecular descriptors correlated with OCT1 activity inhibition by pyrethroids (($|r|>0.80$).xlsx https://doi.org/10.1371/journal.pone.0169480.s001

S1 Table. Number of possible stereoisomers for pyrethroids.

Pyrethroid	Number of chiral carbons	Number of possible stereoisomers
Allethrin	3	8
Bifenthrin	2	4
β-Cyfluthrin	1	2
λ-Cyhalothrin	1	2
β-Cypermethrin	2[a]	4[a]
Deltamethrin	3	8[b]
Esfenvalerate	2	4[c]
Fenproprathin	1	2
τ-Fluvalinate	1[d]	2[d]
cis-Permethrin	1[e]	2[e]
trans-Permethrin	1[e]	2[e]
Resmethrin	2	4
Tefluthrin	2	4[f]
Tetramethrin	2	4

[a]Cypermethrin contains 3 chiral carbons and corresponds to 8 possible stereoisomers
[b]Technical deltamethrin preparation contains only one stereoisomer [33]
[c]Esfenvalerate is comprised of 84% of one stereoisomer (SS configuration) [33]
[d]Fluvalinate contains 2 chiral carbons and corresponds to 4 possible stereoisomers
[e]Permethrin contains 2 chiral carbons and corresponds to 4 possible stereoisomers
[f]Technical tefluthrin preparation is a mixture of only two cis-stereoisomers [33]

S2 Table. Parameters for transporter-expressing cell culture.

Cells	Nature of cell culture surface	Initial cell seeding/well[a]	Number of days in culture before performing transporter assays
MCF7R	polystyrene	80000	3
HuH-7	polystyrene	70000	3
HEK-MOCK	poly-D-lysine	40000	5
HEK-BCRP	poly-D-lysine	110000	3
HEK-OCT1	poly-D-lysine	50000	5
HEK-OCT2	poly-D-lysine	40000	5
HEK-OAT1	poly-D-lysine	50000	5
HEK-OAT3	poly-D-lysine	30000	5
HEK-MATE1	poly-D-lysine	30000	5
HEK-MATE2-K	poly-D-lysine	40000	5
HEK-OATP2B1	poly-D-lysine	40000	5
CHO wild-type	polystyrene	15000	5
CHO-OATP1B1	polystyrene	15000	5
CHO-OATP1B3	polystyrene	18000	5

[a]Cells were plated in 48-multiwell plates

S3 Table. Parameters of drug transport assays.

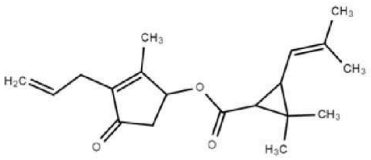
Cells	Transporter	Substrate	Reference inhibitor	Incubation time
MCF7R	P-gp	Rhodamine 123 (5.3 µM)	Verapamil (50 µM)	30 min
HuH-7	MRP2	CF[a] (3.0 µM)	Probenecid (2 mM)	30 min
HEK-BCRP	BCRP	Hoechst 33342 (16.2 µM)	Fumitremorgin C (10 µM)	30 min (+ 90 min efflux)
HEK-OCT1	OCT1	DAPI (1.0 µM)	Verapamil (100 µM)	5 min
HEK-OCT2	OCT2	Rhodamine 123 (1.0 µM)	Amitriptyline (100 µM)	5 min
HEK-OAT1	OAT1	Fluorescein (10.0 µM)	Probenecid (1 mM)	5 min
HEK-OAT3	OAT3	Fluorescein (10.0 µM)	Probenecid (1 mM)	5 min
HEK-MATE1	MATE1	[^{14}C]-TEA (29.0 µM)	Verapamil (100 µM)	5 min
HEK-MATE2-K	MATE2K	[^{14}C]-TEA (29.0 µM)	Verapamil (200 µM)	5 min
CHO-OATP1B1	OATP1B1	[^{3}H]-E3S (3.7 nM)	Probenecid (10 mM)	5 min
CHO-OATP1B3	OATP1B3	Fluorescein (10.0 µM)	Probenecid (10 mM)	5 min
HEK-OATP2B1	OATP2B1	[^{3}H]-E3S (3.7 nM)	Probenecid (10 mM)	5 min

[a] CF is used under its non-fluorescent diacetate form for cell incubation.

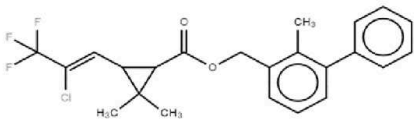
S4 Table. Molecular descriptors highly correlated with OCT1 activity inhibition by pyrethroids (($|r|>0.92$).

Block description	Descriptor ID	Significance	r	*p*-value
Walk and path counts	piPC02	molecular multiple path count of order 2	- 0.9325	< 0.0001
	piPC03	molecular multiple path count of order 3	-0.9275	< 0.0001
	piPC04	molecular multiple path count of order 4	-0.9258	< 0.0001
	piPC05	molecular multiple path count of order 5	-0.946	< 0.0001
	piCO6	molecular multiple path count of order 6	-0.9406	< 0.0001
2D matrix-based descriptors	SpDiam_X	spectral diameter from chi matrix	-0.9321	<0.0001
2D autocorrelations	JGI3	mean topological charge index of order 3	0.9368	<0.0001
Edge adjacency indices	SM02_EA(bo)	spectral moment of order 2 from edge adjacency mat. weighted by bond order	-0,9321	<0.0001
	SM04_EA(bo)	spectral moment of order 4 from edge adjacency mat. weighted by bond order	-0,9255	<0.0001

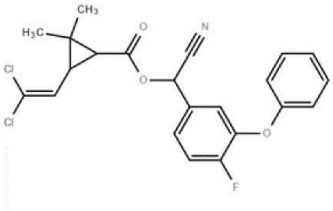
S1 Fig. Chemical structures of pyrethroids.



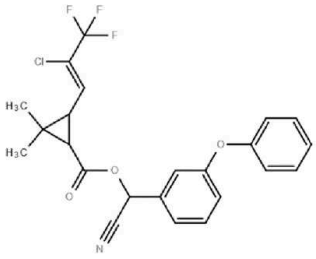
Allethrin



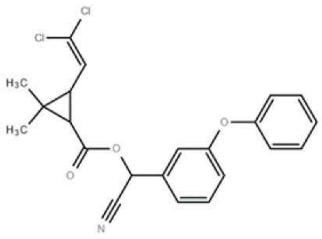
Bifenthrin



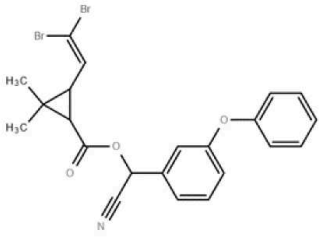
β-Cyfluthrin



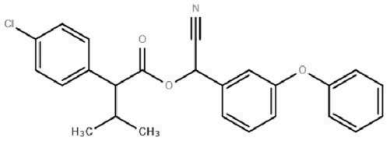
λ-Cyhalothrin



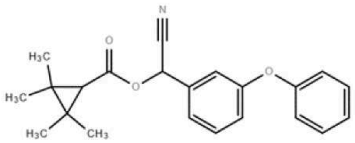
β-Cypermethrin



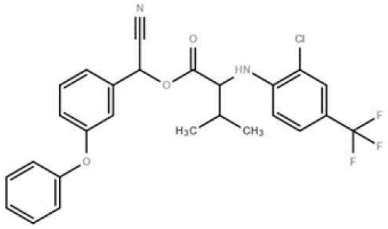
Deltamethrin



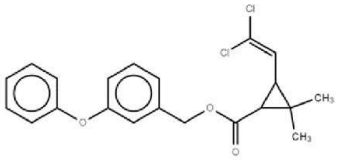
Esfenvalerate



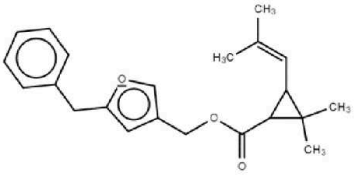
Fenpropathrin



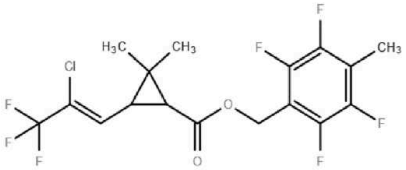
τ-Fluvalinate



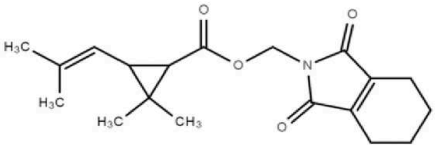
Permethrin



Resmethrin

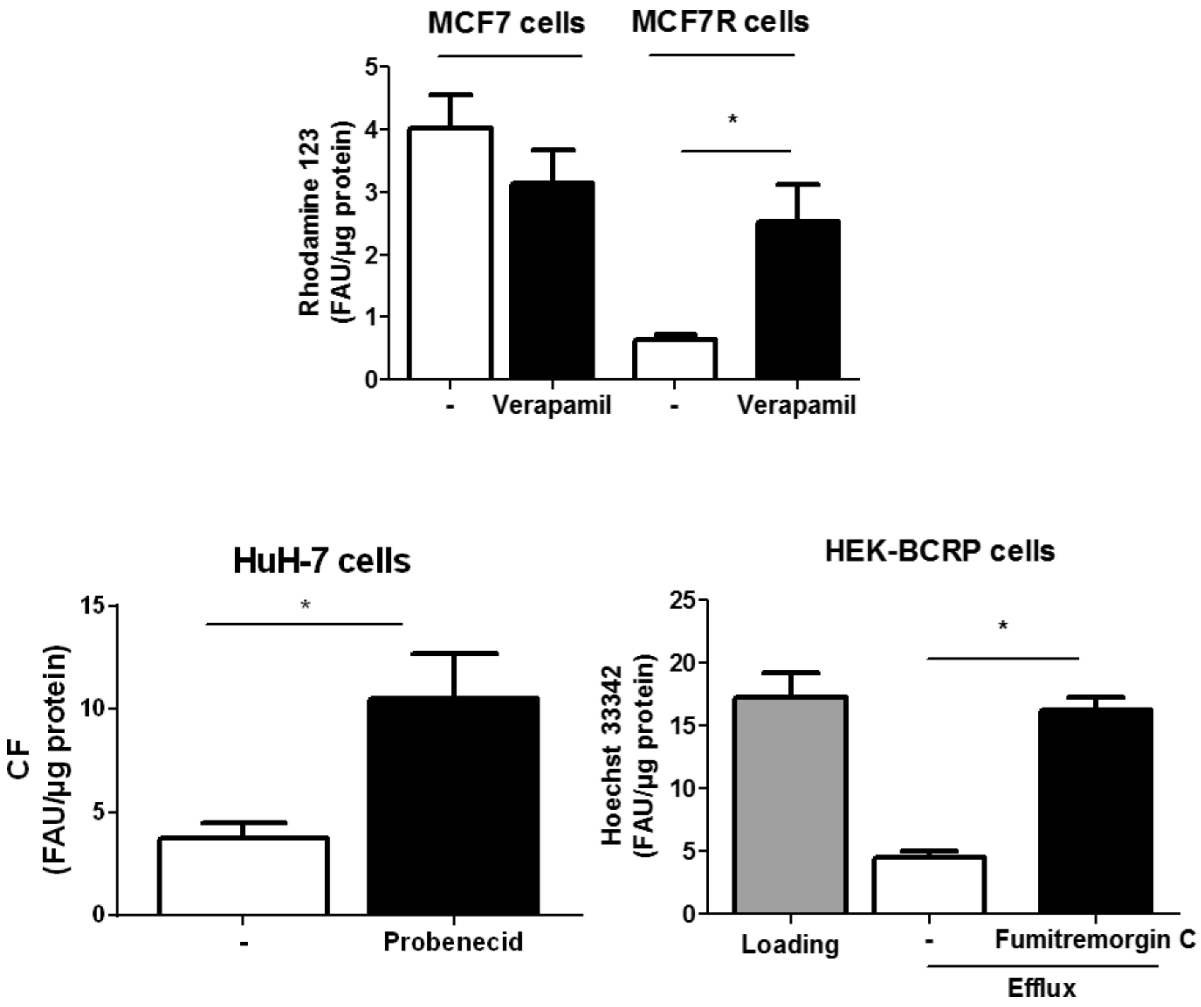


Tefluthrin



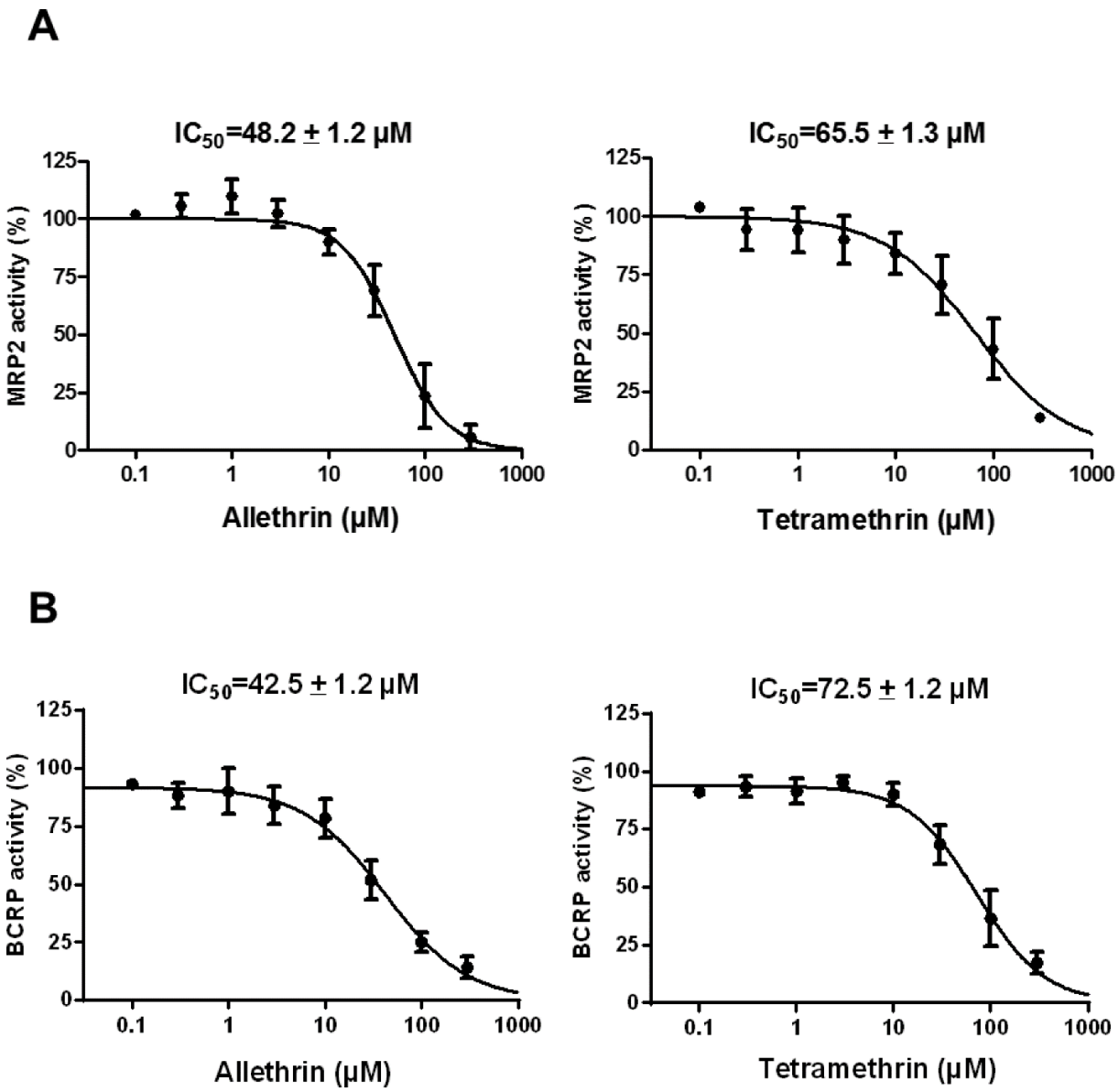
Tetramethrin

S2 Fig. ABC transporter activities in ABC transporter-expressing reference cell lines.



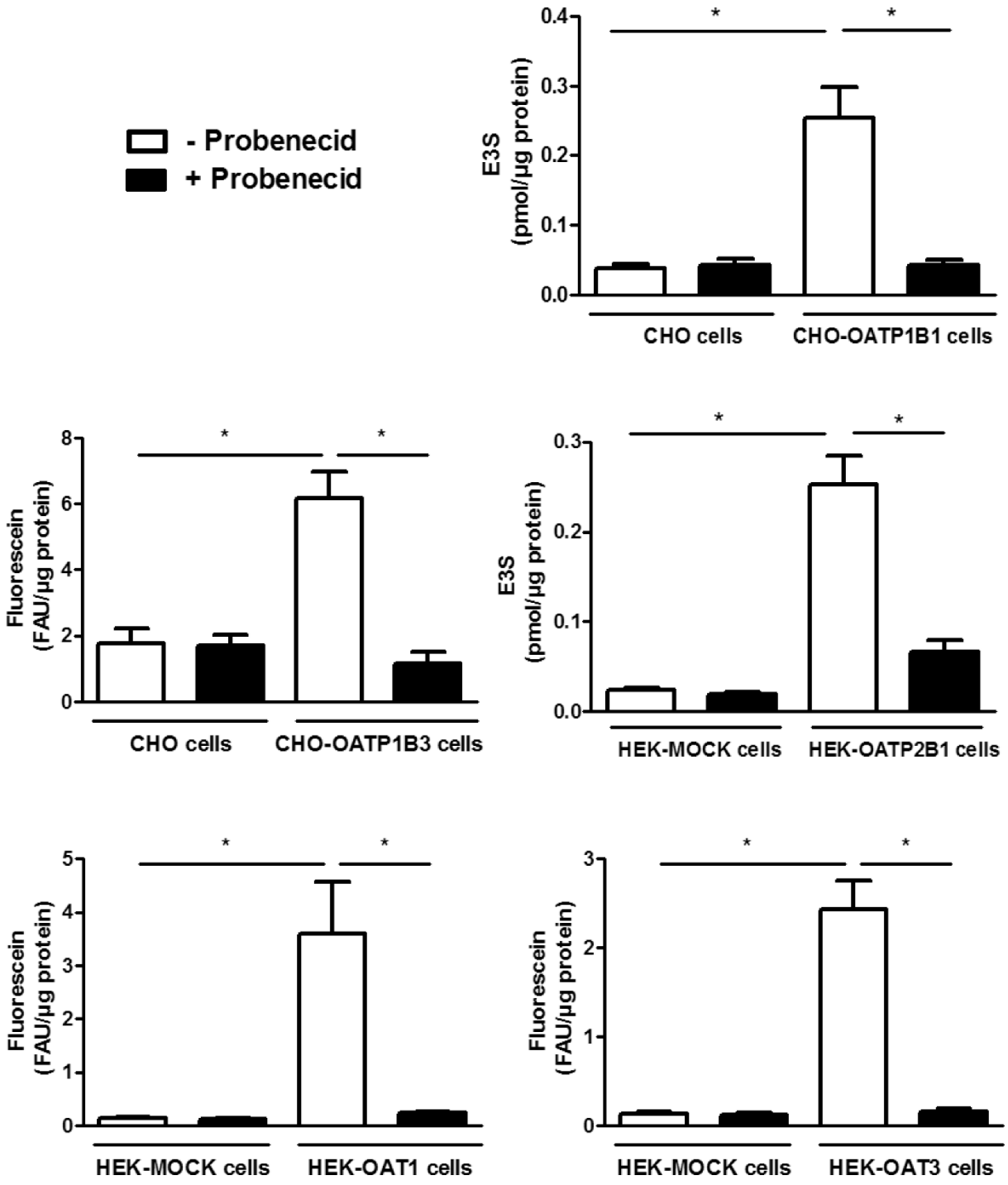
P-gp, MRP2 and BCRP activities were determined through measuring cellular accumulation (P-gp and MRP2 activities) or retention (BCRP activity) of reference substrates (rhodamine 123 for P-gp, CF for MRP2 and Hoechst 33342 for BCRP), in the absence or presence of reference inhibitors (50 µM verapamil for P-gp, 2 mM probenecid for MRP2 and 10 µM fumitremorgin C for BCRP), in parental MCF7 and P-gp-positive MCF7R cells, in MRP2-positive HuH-7 cells and in HEK-BCRP cells. Data shown are the means ± SEM of at least three independent assays, each being performed in triplicate. *, $p<0.05$. FAU, fluorescence arbitrary unit.

S3 Fig. Concentration-dependent effects of allethrin and tetramethrin towards MRP2 and BCRP activities.



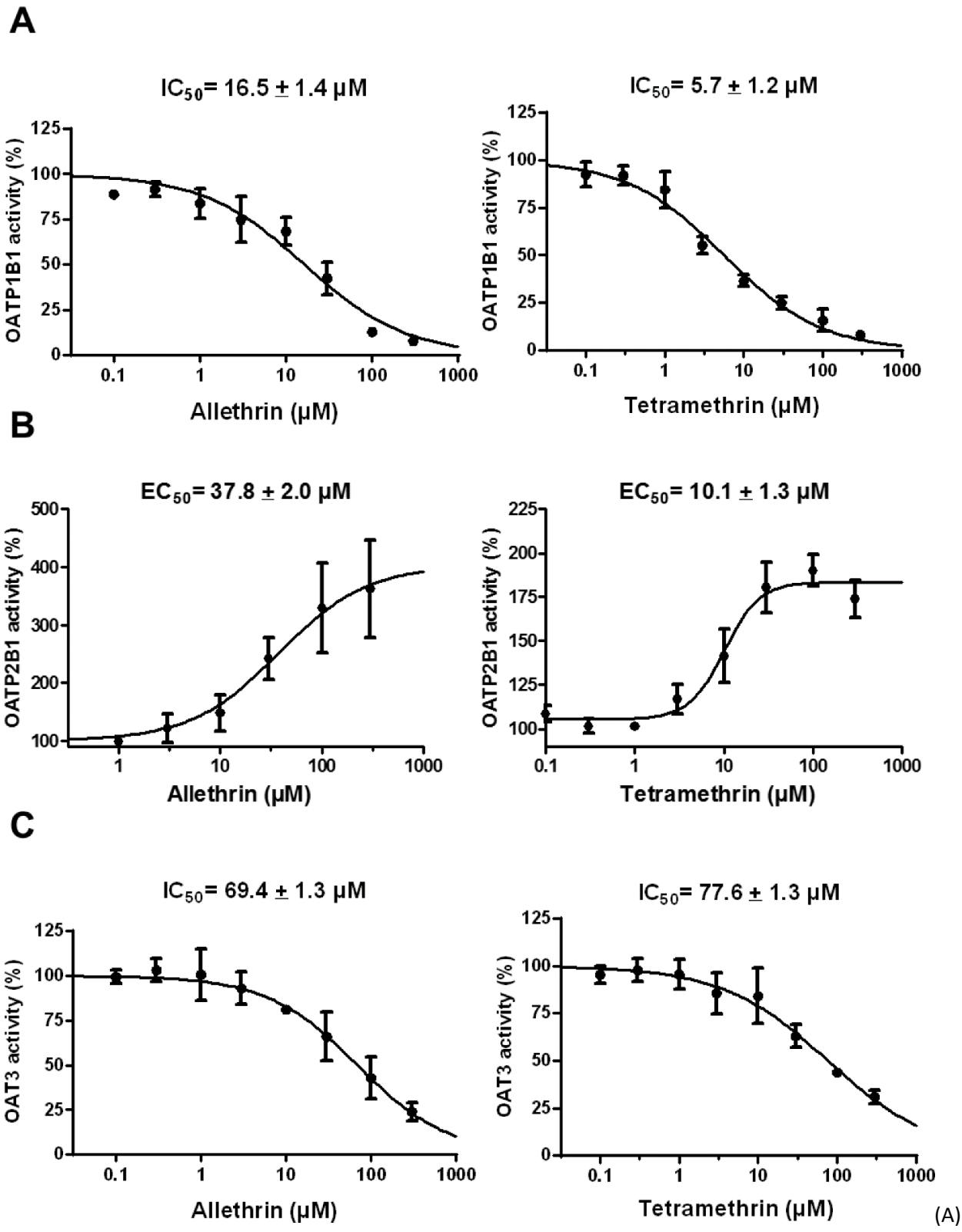
(A) MRP2 and (B) BCRP activities were determined in the absence or presence of various concentrations of allethrin or tetramethrin, as described in Materials and Methods. Data are expressed as percentages of transporter activity found in control untreated cells, arbitrarily set at 100%; they are the means ± SEM of three independent assays, each being performed in triplicate. IC_{50} values are indicated at the top of graphs.

S4 Fig. OATP/OAT activities in transporter-expressing reference cell clones.



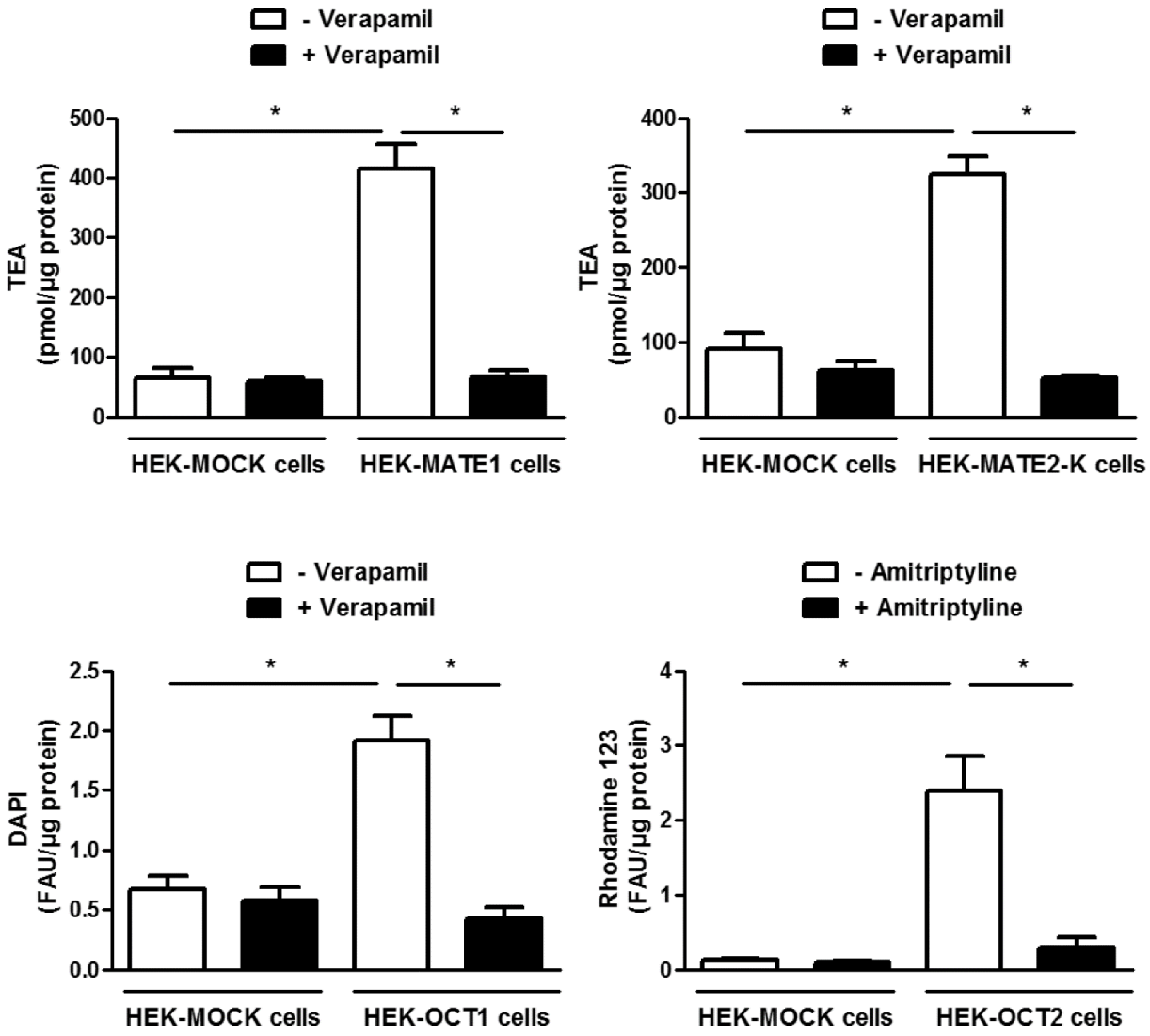
OATP1B1, OATP1B3, OATP2B1, OAT1 and OAT3 activities were determined through measuring intracellular accumulation of reference substrates (E3S for OATP1B1 and OATP2B1 and fluorescein for OATP1B3, OAT1 and OAT3), in the absence or presence of the reference inhibitor probenecid, in OATP- or OAT-transfected cells and in control parental transporter-untransfected cells. Data shown are the means ± SEM of at least three independent assays, each being performed in triplicate. *, $p<0.05$. FAU, fluorescence arbitrary unit.

S5 Fig. Concentration-dependent effects of allethrin and tetramethrin towards OATP1B1, OATP2B1 and OAT3 activities.



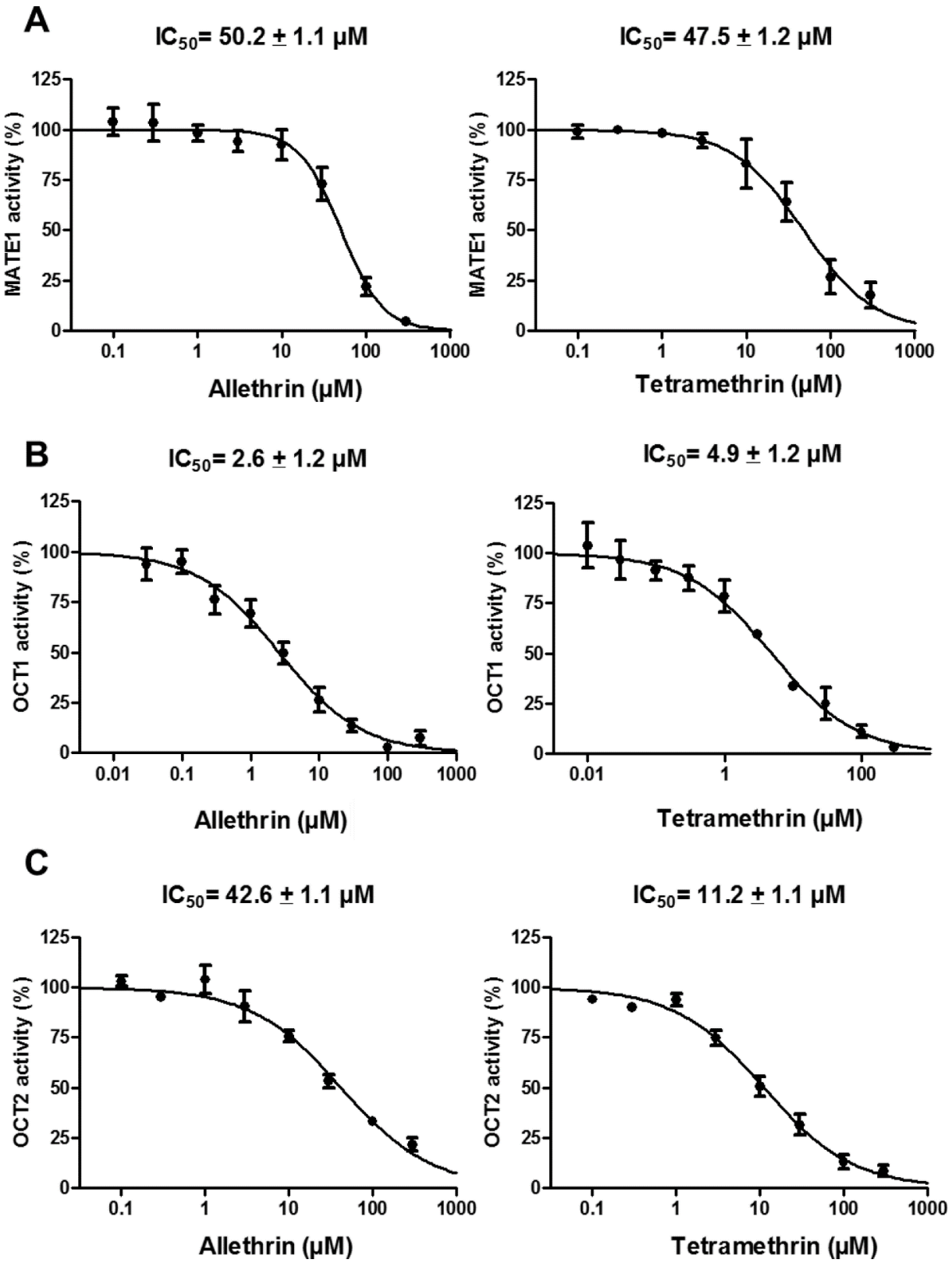
(A) OATP1B1, (B) OATP2B1 and (C) OAT3 activities were determined in the absence or presence of various concentrations of allethrin or tetramethrin, as described in Materials and Methods. Data are expressed as percentages of transporter activity found in control untreated cells, arbitrarily set at 100%; they are the means ± SEM of three independent assays, each being performed in triplicate. (A, C) IC_{50} and (B) EC_{50} values are indicated at the top of graphs.

S6 Fig. MATE/OCT activities in transporter-expressing reference cell clones.



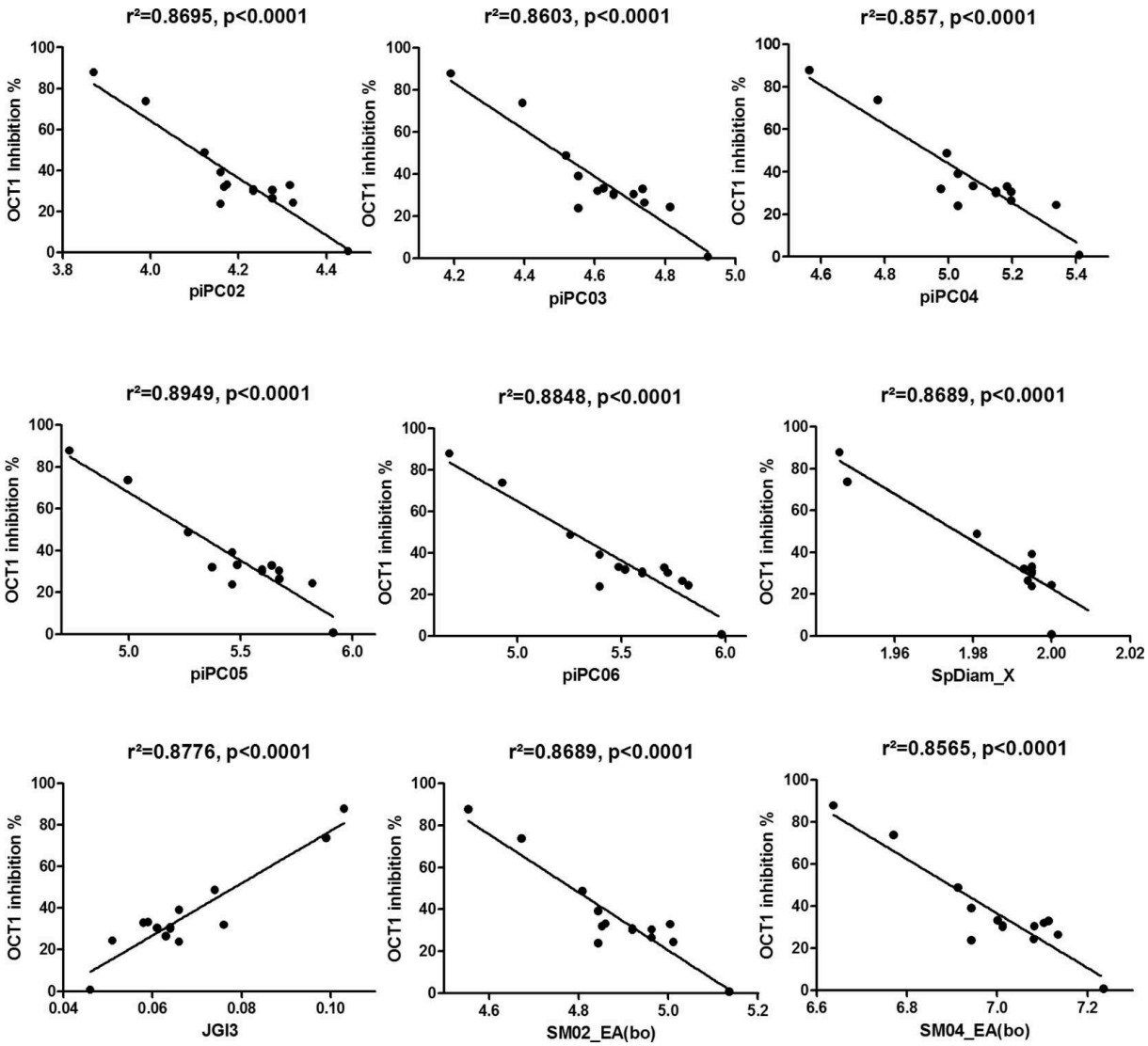
MATE1, MATE2-K, OCT1 and OCT2 activities were determined through measuring intracellular accumulation of reference substrates (TEA for MATE1 and MATE2-K, DAPI for OCT1 and rhodamine 123 for OCT2), in the absence or presence of reference inhibitors (verapamil for MATEs and OCT1 and amitriptyline for OCT2), in MATE- or OCT-transfected HEK293 cells and in control HEK-MOCK cells. Data shown are the means ± SEM of at least three independent assays, each being usually performed in triplicate. *, $p<0.05$. FAU, fluorescence arbitrary unit.

S7 Fig. Concentration-dependent effects of allethrin and tetramethrin towards MATE1, OCT1 and OCT2 activities.



(A) MATE1, (B) OCT1 and (C) OCT2 activities were determined in the absence or presence of various concentrations of allethrin or tetramethrin, as described in Materials and Methods. Data are expressed as percentages of transporter activity found in control untreated cells, arbitrarily set at 100%; they are the means ± SEM of three independent assays, each being performed in triplicate. IC_{50} values are indicated at the top of graphs.

S8 Fig. Linear regression analysis of percentage of OCT1 activity inhibition by pyrethroids versus molecular descriptor values.



Linear regression analysis was performed for percentages of OCT1 activity inhibition versus values of the molecular descriptors piPC02, piPC03, piPC04, piPC05, piPC06, SpDiam_X, JGI3, SM02_EA(bo) and SM04_EA(bo). The r^2 value, a measure of the goodness of the fit, and the *p*-value are indicated at the top of graphs.

CHAPITRE III : INTERACTIONS DES ORGANOPHOSPHORÉS AVEC LES TRANSPORTEURS ABC ET SLC

Article. Interaction des pesticides organophosphorés avec les transporteurs SLC

"Interactions of organophosphorus pesticides with solute carrier (SLC) drug transporters"

Lisa CHEDIK, Arnaud BRUYERE, Olivier FARDEL

En cours de soumission

1. Résumé

Les composés organophosphorés sont des pesticides très utilisés associés à des effets toxiques chez l'homme.

Nos travaux ont pour objectif de déterminer les effets de treize organophosphorés sur l'activité de transporteurs de médicaments de la famille SLC, effecteurs majeurs de la pharmacocinétique des médicaments et de la toxicocinétique des polluants.

Nos résultats montrent des effets inhibiteurs importants (>50%) de certains pesticides organophosphorés sur l'activité des transporteurs OCT1, OCT2, OAT3, OATP1B1 et MATE1 et des effets stimulateurs sur le transporteur OATP2B1. Ces pesticides n'ont eu pas ou peu d'effets sur les transporteurs OAT1 et MATE2-K.

OCT1 et OCT2 étaient les transporteurs les plus touchés, inhibés par les mêmes huit composés, dont le fenamiphos et le phosmet. Les valeurs de CI50 de ces deux organophosphorés vis-à-vis du transport de dopamine médié par OCT1 et OCT2 étaient cependant de l'ordre du micromolaire et donc beaucoup plus élevées que les concentrations plasmatiques d'insecticides retrouvées dans la population générale (de 1 à 200 pM). Le mélange fenamiphos/phosmet conduit cependant à une inhibition synergique d'OCT2 pour de faibles concentrations de pesticides.

Nous avons également démontré que le fenamiphos et le phosmet ne sont pas pris en charge par OCT1 et OCT2. Des descripteurs moléculaires associés à l'inhibition des activités d'OCT1 et d'OCT2 par ces insecticides ont pu être identifiés par une approche *in silico*. Au final, notre étude a démontré que les pesticides organophosphorés pouvaient interagir avec les activités de transporteurs SLC de médicaments, en particulier avec OCT1 et OCT2, mais seulement lorsqu'ils sont utilisés à de fortes concentrations, à priori non-relevante d'une exposition environnementale.

Interactions of organophosphorus pesticides with solute carrier (SLC) drug transporters

Lisa CHEDIK[a], Arnaud BRUYERE[a] and Olivier FARDEL[a,b,*]

[a]Institut de Recherches en Santé, Environnement et Travail (IRSET), UMR INSERM U1085, Université de Rennes 1, 2 Avenue du Pr Léon Bernard, 35043 Rennes, France

[e]Pôle Biologie, Centre Hospitalier Universitaire, 2 rue Henri Le Guilloux, 35033 Rennes, France

* Corresponding author. Tel : 33 2 23 23 48 90. Fax : 33 2 23 23 47 94. E-mail: olivier.fardel@univ-rennes1.fr

Summary

Organophosphorus compounds are widely-used chemical pesticides, to which humans are commonly exposed, and known to exert various deleterious effects towards health. The present study was designed to determine whether they can interact with activities of solute carrier (SLC) drug transporters, now recognized as major actors of pharmacokinetics. Using transporter-expressing cell lines, thirteen organosphosphorus pesticides (OPs) were demonstrated to differentially interact with various SLC drug transporters. When considering a cut-off value of at least 50% modulation of transporter activity by 100 µM OPs, OAT1 and MATE2-K were not impacted by any OP, whereas OATP1B1 and MATE1 were inhibited by two and three OPs, respectively. OAT3 activity was similarly blocked by three OPs, and was additionally stimulated by one OP. Six various OPs stimulated OATP2B1 activity. Both OCT1 and OCT2 were the most impacted transporters, i.e., their activity was inhibited by the same eight OPs, including fenamiphos and phosmet. IC50 values of these two organophosphorus compounds for OCT1 and OCT2-mediated transport of dopamine were however in the 3 µM range, and thus much higher than OPs concentrations (in the 1-200 pM range) commonly reached in blood of environmentally-exposed humans. Fenamiphos and phosmet were additionally shown to be not handled by OCT1 and OCT2. Molecular descriptors associated with OPs-mediated inhibition of OCT1/OCT2 activities were finally identified through in silico analysis. Taken together, these data demonstrated that OPs can interact with SLC drug transporter activities, especially OCT1 and OCT2, but only when used at concentrations higher than those occurring in response to environmental exposure.

Key-words: organophosphorus pesticide; drug transporter; solute carrier; dopamine; molecular descriptors.

Abbreviations: ABC, ATP-binding cassette; BCRP, breast cancer resistance protein; BSEP, bile salt export pump; CI, combination index; DAPI, 4',6'-diamidino-2-phenylindole; DMSO, dimethyl sulfoxide; E3S, estrone-3-sulfate; IC50, half maximal inhibitory concentration; MATE, multidrug and toxin extrusion protein; MRP, multidrug resistance-associated protein; OAT, organic anion transporter; OATP, organic anion transporting polypeptide; OCT, organic cation transporter; OP, organophosphorus pesticide; PBS, phosphate-buffered saline; SLC, solute carrier; TEA, tetra-ethylammonium.

1. Introduction

Drug transporters are protein membranes involved in drug uptake or efflux across membranes, mainly the plasma membrane. They belong to the ATP-binding cassette (ABC) or to the solute carrier (SLC) transporter families (Doring and Petzinger 2014). ABC transporters such as P-glycoprotein, encoded by the MDR1/ABCB1 gene, multidrug resistance-associated protein (MRP/ABCC) 1 (ABCC1) and breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2), are ATPases acting as drug efflux pumps (Schinkel and Jonker 2003). SLC transporters mediate either facilitated diffusion or secondary active transport; most of them are implicated in drug uptake into cells (Colas et al. 2016). Both ABC and SLC transporters play a major role in pharmacokinetics of drugs (Giacomini et al. 2010). They are notably involved in the different steps of drug disposition, i.e., intestinal absorption, passage across blood-tissue barriers such as the blood-brain barrier, and hepatic and renal excretion (Shitara et al. 2006; Szakacs et al. 2008). Drug-mediated inhibition of their activity can consequently cause pharmacokinetics-based drug-drug interactions (Konig et al. 2013), which has led drug regulatory agencies to edict guidances for the study of putative interactions of new molecular entities with clinically-relevant drug transporters (Prueksaritanont et al. 2013). Blockage of drug transporters can additionally result in altered transport of endogenous substrates, which can cause drug toxicity (DeGorter et al. 2012). Besides, overexpression of some ABC transporters can decrease anticancer drug accumulation in cancer cells, thus conferring multidrug resistance to tumor cells (Wu et al. 2011).

In addition to drugs, various environmental chemicals have been shown to interact with drug transporters, i.e., they are substrates and/or modulators of ABC and/or SLC transporters (Fardel et al. 2012). This notably concerns chemical pesticides, to which humans are widely exposed and which are through to exert deleterious effects towards human health, including endocrine disruption, carcinogenicity and development of neurologic diseases (Maroni and Fait 1993; Mostafalou and Abdollahi 2017). Indeed, diverse structurally- and pharmacologically-unrelated pesticides have been demonstrated to interfere with P-glycoprotein activity (Bain and LeBlanc 1996), whereas various organochlorine insecticides and the pyrethroids allethrin and tetramethrin block activities of the SLC transporter organic cation transporter (OCT) 1 (SLC22A1) and of the ABC transporters MRP2 (ABCC2) and BCRP (Bucher et al. 2014; Chedik et al. 2017). Herbicides such as chloroacetanilide compounds have additionally been shown to interfere with various ABC transporters proteins (Oosterhuis et al. 2008), as well as organophosphorus pesticides (OPs), a major and widely-used class of insecticides or herbicides (Mostafalou and Abdollahi 2017), whose primary toxicological action towards insects arises from irreversible inhibition of the enzyme acetylcholinesterase (Natoff 1971). Indeed, some OPs are thought to be transported by human ABC pumps; diazinon is thus most likely a substrate for P-glycoprotein (Cavret et al. 2005; Lacher et al. 2015), whereas MRP1 may handle fenitrothion (Tribull et

al. 2003). Moreover, chlorpyrifos may be transported by rabbit BCRP (Tribull et al. 2003), and methyl parathion has been suggested to be expelled by P-glycoprotein and MRP4/ABCC4 in Zebrafish liver cells (Nornberg et al. 2015). Various OPs have additionally been demonstrated to inhibit ABC transporter activities. For example, coumaphos, chlorthiophos, leptophos, fenamiphos, dicapthon, parathion, phosalone, methyl parathion, chlorpyrifos and chlorpyrifos-methyl block P-glycoprotein (Bain and LeBlanc 1996; Bain et al. 1997; Pivcevic and Zaja 2006; Sreeramulu et al. 2007). By contrast, whether OPs may interact with SLC drug transporters remains unknown, but is probably important to determine owing to the relevance of SLC drug transporters in toxicokinetics and toxicity of environmental chemicals (Fardel et al. 2012) and to the wide exposure of humans to OPs, which may result in adverse health effects (Androutsopoulos et al. 2013; Munoz-Quezada et al. 2013). The present study was therefore designed to characterize the interactions of thirteen OPs with main SLC drug transporters, handling organic cations, like OCT1, OCT2/SLC22A2, multidrug and toxin extrusion protein (MATE) 1 (SLC47A1) and MATE2-K (SLC47A2), or organic anions, like organic anion transporter (OAT) 1 (SLC22A6), OAT3 (SLC22A8), organic anion transporting polypeptide (OATP) 1B1 (SLCO1B1) and OATP2B1 (SLCO2B1). Our data indicate that OPs differentially interact with SLC transporters, knowing that OCT1 and OCT2 are the most impacted transporters, i.e., 8/13 OPs, inhibit the functional activity of these transporters, without, at least for fenamiphos and phosmet, being substrates.

2. Materials and Methods

2.1. Chemicals

OPs, rhodamine 123, verapamil, probenecid, amitriptyline, fluorescein, 4',6'-diamidino-2-phenylindole (DAPI), and tetra-ethylammonium bromide (TEA) were provided by Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France). [1-14C]-TEA (sp. act. 3.5 mCi/mmol), [6,7-3H(N)]-estrone-3-sulfate (E3S) (sp. act. 51,8 Ci/mmol) and 3,4-[Ring-2,5,6-3H]-dihydroxyphenylethylamine (dopamine) (sp. act. 46 Ci/mmol) were purchased from Perkin-Elmer (Boston, MA, USA). Stocked solutions of chemicals were commonly prepared in dimethyl sulfoxide (DMSO); final concentrations of solvent in transport assay medium did not exceed 0.2 % (vol/vol). The chemical structures of the thirteen OPs analyzed in the study are shown in Fig. S1. Even if all these OPs are esters of phosphoric acid, their chemical structure are relatively diverse. According to the PubChem database (U.S. National Library of Medicine, Bethesda, MA, USA), all OPs tested in the study were predicted to be water-soluble at 100 µM, which was the OP concentration retained for initially screening their potential inhibitory effects towards activities of SLC transporters.

2.2 Cell culture

Human HEK293 cells stably overexpressing OCT1 (HEK-OCT1 cells), OCT2 (HEK-OCT2), MATE1 (HEK-MATE1 cells), MATE2-K (HEK-MATE2-K cells), OAT1 (HEK-OAT1 cells), OAT3 (HEK-OAT3 cells), OATP1B1 (HEK-OATP1B1) or OATP2B1 (HEK-OATP2B1 cells), as well as control HEK-MOCK cells were cultured in DMEM medium (Thermo Fisher Scientific, Villebon sur Yvette, France) containing 4.5 g/L D-glucose and supplemented with 10% (vol/vol) fetal calf serum, 1% (vol/vol) MEM non-essential amino acids solution (Thermo Fisher Scientific), 1 µg/ml insulin, 20 UI/ml penicillin and 20 µg/ml streptomycin. Generation and characterization of these SLC transporter-overexpressing HEK293 cells have been previously described (Chedik et al. 2017; Jouan et al. 2014). For functional assays, cells were plated in 48-wells multiplates coated with poly-D-lysine to enhance cell adhesion, at a density of 4.104 cells/well, and were used when reaching confluency.

Human hepatocytes were obtained from adult donors undergoing hepatic resection for tumors. The processing of biological samples was performed through the Centre de Ressources Biologiques (CRB) Santé of Rennes BB-0033-00056, conducted under French legal guidelines and fulfilled the requirements of the local institutional ethics committee. They were seeded at a density of 2.105 cells/cm2 in Williams' E medium (Thermo Fisher Scientifics), supplemented with 10% (vol/vol) fetal calf serum, 5 µg/mL bovine insulin (Sigma–Aldrich), 20 IU/mL penicillin, 20 µg/mL streptomycin, and 2 mM glutamine. After 24 h, this seeding medium was discarded, and primary hepatocytes were routinely cultured in the fetal calf serum-containing Williams' E medium defined above and supplemented with 5.10-5 M hydrocortisone hemisuccinate (SERB laboratoires, Paris, France) and 2% (vol/vol) DMSO, as previously reported (Le Vee et al. 2015).

Human highly differentiated hepatoma HepaRG cells were routinely cultured in Williams' E medium supplemented with 10% (vol/vol) fetal calf serum, 20 IU/mL penicillin, 20 µg/mL streptomycin, 2 mM glutamine, and 5.10-5 M hydrocortisone hemisuccinate; additional culture for two weeks in the same medium supplemented with 2 % (vol/vol) DMSO

was performed in order to get a full hepatocytic differentiation of the cells (Le Vee et al. 2013).

2.3 Transporter assays

Transporter assays were performed essentially as previously described (Chedik et al. 2017).

Briefly, for cis-inhibition studies, cells were incubated for 5 min at 37°C in a transport assay buffer containing a radiolabeled or fluorescent substrate of the considered transporter, in the presence or

absence of a reference inhibitor or OPs. The transport assay buffer was composed of 136 mM NaCl, 5.3 mM KCl, 1.1mM KH2PO4, 0.8 mM MgSO4, 1.8 mM CaCl2, 10 mM HEPES, 11 mM D-glucose, adjusted to pH=7.4 (excepted for organic cation/proton exchangers MATEs for which pH was set at 8.4). Nature and concentrations of substrates and inhibitors used for each investigated SLC transporter are indicated in Table S1. Cells were next washed twice with ice-cold phosphate-buffered saline (PBS), and lysed in distilled water. For fluorescent substrates, their intracellular accumulations were determined by spectrofluorimetry using a SpectraMax Gemini SX spectrofluorometer (Molecular Devices, Sunnyvale, CA); excitation and emission wavelengths were 485 and 535 nm, respectively, for rhodamine 123 and fluorescein, and 355 and 460 nm, respectively, for DAPI. For radiolabeled substrates, their intracellular accumulations were measured using a Beckman LS65000 scintillation counter (Beckman Coulter, Villepinte, France). Data were finally normalized to total protein content, determined by the Bradford's method and were routinely expressed as % of transporter activity according of the following equation:

$$\% \text{ Transporter activity} = \frac{([\text{Substrate}_{\text{organophosphorus pesticide}}]-[\text{Substrate}_{\text{ref inh}}])\times 100}{([\text{Substrate}_{\text{control}}]-[\text{Substrate}_{\text{ref inh}}])} \quad (A)$$

with "$[\text{Substrate}_{\text{organophosphorus pesticide}}]$" = cellular concentration of reference substrate in the presence of a defined concentration of OP, "$[\text{Substrate}_{\text{ref inh}}]$" = cellular concentration of reference substrate in the presence of reference inhibitor and "$[\text{Substrate}_{\text{control}}]$" = cellular concentration of reference substrate in control cells not exposed to OP or reference inhibitor.

Some data were also expressed as % of SLC transporter activity inhibition or as % of SLC transporter activity stimulation, according to the following equations:

$$\% \text{ Transporter activity inhibition} = 100\% - \% \text{ Transporter activity}_{\text{(in the presence of OP)}} \quad (B)$$

$$\% \text{ Transporter activity stimulation} = \% \text{ Transporter activity}_{\text{(in the presence of OP)}} - 100\% \quad (C)$$

with % Transporter activity (in the presence of OP) determined according to the equation (A).

For dopamine accumulation assays, data were expressed as percentage of OCT1- or OCT2-mediated transport of dopamine in control OP-unexposed cells, determined by subtracting accumulation of dopamine in HEK-MOCK cells from that in HEK-OCT1 or HEK-OCT2 cells in the absence of OPs, arbitrarily set at 100 %.

For OCT1- and OCT2-related trans-stimulation assays, HEK-OCT1 and HEK-OCT2 cells were initially loaded with 10 mM unlabeled TEA or 100 µM OPs for 60 min at 37°C. After washing with ice-cold PBS, cells were re-incubated in the transport assay medium described above containing 29 µM [1-14C]-TEA.

After PBS washing, intracellular accumulation of radiolabeled TEA was monitored by scintillation counting as reported above. Data were expressed as % of TEA accumulation in control cells not loaded with unlabeled TEA or OPs, arbitrarily set at 100%.

2.4 Determination of half maximal inhibitory concentrations (IC50)

IC50 values of OPs towards transporter activities were determined using Prism 5.0 software through nonlinear regression based on the following four-parameter logistic equation:

$$A = \frac{100}{1 + 10^{((\log[I] - \log IC50) \times \text{Hill slope})}} \qquad (D)$$

where A is the percentage of transporter activity for a given concentration of OP determined as described in equation (A), [I] is the OP concentration in the medium, and Hill slope is a coefficient describing the steepness of the curve.

2.5 Chemical combination assays

The combined effects of the OPs fenamiphos and phosmet on OCT2 activity were evaluated by median drug effect analysis, as previously described (Chou 2010). Briefly, the inhibitory effects of combinations of fenamiphos and phosmet towards OCT2-mediated transport were studied as a fixed constant ratio (1:1), chosen according to the IC50 value of each chemical, using 2-fold serial dilutions with several concentration points below and above IC50 values of each OP used as a single chemical (Chou 2010). Data from combination and single chemical effects towards OCT2 activity were then processed using the CompuSyn software (ComboSyn, Inc., Paramus, NJ, USA), allowing thus to determine combination index (CI) values. The CI is a numerical index that is calculated using the following equation (Zhao et al. 2004):

$$CI = \frac{C_{Fenamiphos/Mixture}}{C_{Fenamiphos}} + \frac{C_{Phosmet/Mixture}}{C_{Phosmet}} \qquad (E)$$

where $C_{Fenamiphos/Mixture}$ and $C_{Phosmet/Mixture}$ are the concentrations of fenamiphos and phosmet applied in combination to achieve x % of OCT2 activity inhibition, whereas $C_{Fenamiphos}$ and $C_{Phosmet}$ represent the concentrations of individual agents to accomplish the same efficacy. Combinations were considered as synergistic when CI<0.8, additive when 0.8<CI<1.2 and antagonistic when CI>1.2 (Bijnsdorp et al. 2011).

193 *2.6 OP accumulation assays*

194 HEK-MOCK, HEK-OCT1 and HEK-OCT2 cells were incubated with 100 µM fenamiphos or 100 µM
195 phosmet, in the absence or presence of reference inhibitors (100 µM verapamil for OCT1 inhibition
196 and 100 µM amitriptyline for OCT2 inhibition), for 5 min at 37°C, in the transport assay medium defined
197 above. Cells were next washed twice in ice-cold PBS and lysed in distilled water. An acetonitrile-based
198 extraction of cell lysates was further performed, following by OP quantification through liquid
199 chromatography-tandem mass spectroscopy, using an high-performance liquid chromatography Aria
200 system (Agilent, Les Ulis, France), equipped with a Kromasyl® C18 (4.6 × 150 mm) column (Interchim,
201 Montluçon, France) and coupled to a tandem mass spectrometry TSQ Quantum Ultra (Thermo Fisher
202 Scientific) fitted with an electrospray ionization source (ESI+). Monitored ion transitions were at 304.1
203 > 217.1 m/z for fenamiphos and 318.0 > 160.0 m/z for phosmet. Amounts of OPs were finally
204 normalized to total protein cell content.

205

206 *2.7 Molecular descriptor generation*

207 Molecular descriptor generation for OPs was performed as previously described (Chedik et al. 2017).
208 Briefly, OPs, initially expressed in SMILES format, were converted to 3D format using the Marvin View
209 software (ChemAxon, Budapest, Hungary). Molecular descriptors were then generated using the
210 Dragon® 7 software (Talete, Milano, Italy), which provides 5270 molecular descriptors, divided on 30
211 blocks (See https://chm.kode-solutions.net/products_dragon_descriptors.php for a complete list of
212 these descriptors).

213

214 *2.8 Statistical analysis*

215 Experimental data were routinely expressed as means ± SEM. They were statistically analysis through
216 ANOVA followed by a Dunnett's or a Bonferroni post-hoc test. Statistical analysis of molecular
217 descriptors discriminating inhibitors from non-inhibitors of OCT1/OCT2 activities was performed using
218 the non-parametric Mann-Whitney test. The criterion of significance was $p < 0.05$.

219

220

221

222

3. Results

3.1 Effects of OPs on organic anion transporter activities

The effects of 100 µM OPs on uptakes of the OAT substrate fluorescein and of the OATP substrate E3S were studied in OAT1-, OAT3-, OATP1B1- and OATP2B1-overexpressing HEK293 cells. As shown in Fig 1, phosmet was the only OP which significantly impair fluorescein uptake in HEK-OAT1 cells. It however reduced OAT1 activity by only 48.45%, and thus failed to reach the threshold of 50% transporter activity reduction, commonly admitted for defining drug transporter inhibition (Ahlin et al. 2008; De Bruyn et al. 2013; Kido et al. 2011); this precludes to consider it as a relevant OAT1 inhibitor (Table 1). With respect to OAT3-mediated uptake of fluorescein, it was significantly inhibited by fenamiphos, malathion and profenofos (Fig. 1), which blocked OAT3 activity by more than 50 % and can therefore be considered as OAT3 inhibitors (Table 1). By contrast, metasystox and parathion methyl cis-stimulated fluorescein accumulation in HEK-OAT3 cells. With a cut-off of 50 % increase for validating SLC transporter activity stimulation, only metasystox can however be considered as an OAT3 stimulator (Table 1).

Various OPs such as fenitrothion, parathion-methyl, parathion, phosmet, prorofenofos and tenophos significantly decreased E3S accumulation in HEK-OATP1B1 cells (Fig. 2). Only profenofos and temephos however inhibited OATP1B1 activity by more than 50% (Table 1), i.e., by 70.3% and 62.2%, respectively. For OATP2B1-mediated transport of E3S, several OPs, such as fenamiphos, malathion, parathion, phosmet and profenofos, significantly cis-stimulated it (Fig. 2); these cis-stimulations of OATP2B1 activity were higher than 50%, thus indicating that implicated OPs can be considered as OATP2B1 stimulators (Table 1). None of OPs significantly decreased E3S uptake in HEK-OATP2B1 cells (Fig. 2).

3.2 Effects of OPs on organic cation transporter activities

The effects of 100 µM OPs on uptakes of the OCT1 substrate DAPI, the OCT2 substrate rhodamine 123 and the MATE substrate TEA were studied in OCT1-, OCT2-, MATE1- and MATE2-K-overexpressing HEK293 cells.

Various OPs used at 100 µM were found to markedly cis-inhibited DAPI uptake in HEK-OCT1 cells and rhodamine 123 uptake in HEK-OCT2 cells (Fig. 3). Fenamiphos, fenitrothion, malathion, parathion, parathion methyl, phosmet, profenofos and propetamphos thus blocked OCT1 and OCT2 activity by more than 50% and appear therefore as OCT1 and OCT2 inhibitors (Table 1). Some of these inhibitors, notably fenamiphos and phosmet, led to an inhibition of OCT1 and OCT2 activity similar or close to those observed in response to the reference OCT1 inhibitor verapamil or to the reference OCT2

inhibitor amitriptyline because residual OCT1 or OCT2 activity was less than 10% in the presence of these OPs (Fig. 3). Temephos also significantly inhibited DAPI uptake in HEK-OCT1 cells (Fig. 1); the reduction of OCT1 activity (29.1%) caused by this OP was however rather weak, thus precluding to consider it as an OCT1 inhibitor (Table 1). The same conclusion can also be drawn for the slight, but significant, temephos-mediated inhibition of rhodamine 123 in HEK-OCT2 cells (Fig. 3). Similarly, dichlorvos, methamidofos and metasystox only weakly inhibited OCT2 activity (Fig. 3), by less than 50% (Table 1).

With respect to MATE1-mediated transport of TEA, it was significantly inhibited by various OPs, including fenamiphos, fenitrothion, malathion, parathion methyl, parathion, phosmet, profenos and propetamphos (Fig. 4). However, according to the 50 % inhibition cut-off, only fenamiphos, phosmet and propetamphos, be considered as MATE1 inhibitors among the tested OPs (Table 1). None of OPs were found to inhibit uptake of TEA in HEK-MATE2-K cells, (Fig. 4), thus indicating that these OPs did not block MATE2-K activity (Table 1).

3.3 Characterization of fenamiphos and phosmet interactions with OCT1 and OCT2.

Because OCT1 and OCT2 are the most highly impacted SLC transporters by OPs, i.e., 8/13 OPs were found to be OCT1 and OCT2 inhibitors (Table 1), we next focused on OPs-OCT1 and OCT2 interactions. For this purpose, we retained fenamiphos and phosmet are prototypical OPs inhibiting OCT1 and OCT2.

As shown in Fig. 5, fenamiphos and phosmet used at 100 µM were found to inhibit uptake of the OCT1 substrate in both primary human hepatocytes and hepatoma HepaRG cells, which constitutively express functional OCT1 (Jigorel et al. 2005; Le Vee et al. 2013); this suggests that these two OPs can efficiently block TEA in physiologically-expressing OCT1 cells such as hepatocytes. Fenamiphos and phosmet were next shown to block uptake of the endogenous OCT1/OCT2 substrate dopamine in both HEK-OCT1 and HEK-OCT2 cells (Fig. 6). Such effects, as well as fenamiphos- and phosmet-mediated inhibitions of DAPI and rhodamine 123 transport, were concentrations-dependent, with IC50 values ranging, for fenamiphos, from 2.8 µM (for inhibition of OCT2-mediated transport of dopamine) to 27.5 µM (for inhibition of OCT1-mediated transport of DAPI), and for phosmet, from 3.6 µM (for inhibition of OCT2-mediated transport of dopamine) to 10.4 µM (for inhibition of OCT1-mediated transport of rhodamine 123) (Fig. 7). Besides fenamiphos and phosmet, other OPs displayed IC50 values towards OCT1 or OCT2 activity in the 3-10 µM range; thus, IC50 values of malathion and parathion against OCT1-mediated transport of DAPI were 5.3 µM and 3.0 µM, respectively (Fig. S2), whereas those of fenitrothion and parathion-methyl against OCT2-mediated transport of rhodamine 123 were 11.9 µM and 6.2 µM, respectively (Fig. S3).

Because humans are usually exposed to mixtures of pesticides (Hernandez et al. 2013), the putative combined effect of these chemicals towards transporters have likely to be considered. In this context, the exact nature of pesticide mixture effects, i.e., synergistic, additive or antagonistic, may be important to determine. To get initial information about this point, we characterized the effects of the combination fenamiphos/phosmet towards OCT2 activity through calculating CI using the CompuSyn software. As shown in Table 2, low concentrations of fenamiphos/phosmet (up to 8.40 µM) were found to exert synergistic inhibition towards OCT2-mediated transport (CI<0.8), whereas higher concentrations (14.18-26.85 µM) were additive (0.8<CI<1.2). Only the very high mixture concentration of 70.22 µM exhibited antagonistic effect (CI>1.2) (Table 2).

The putative transport of fenamiphos and phosmet by OCT1 and OCT2 was next investigated. For this, we first analyzed whether the two OPs may trans-stimulate radiolabeled TEA uptake in HEK-OCT1 and HEK-OCT2 cells, which may constitute an argument in favor of the transport of the OPs by OCT1 and/or OCT2 (Grundemann et al. 2003; Zhang et al. 1999). Pre-loading with fenamiphos and tetramethrin however did not result in trans-stimulation of radiolabeled TEA uptake in both HEK-OCT1 and HEK-OCT2 cells (Fig 8). By contrast, pre-loading with unlabeled TEA trans-stimulated radiolabeled TEA uptake (Fig. 8), as expected for an OCT1 and OCT2 substrate like TEA (Zhang et al. 1999). Accumulation of fenamiphos and phosmet was next measured in HEK-MOCK, HEK-OCT1 and HEK-OCT2 cells (Fig. 9). HEK-MOCK, HEK-OCT1 and HEK-OCT2 exhibited similar cellular uptake of the two OPs (Fig. 9), whereas, by contrast, HEK-OCT1 and HEK-OCT2 cells exhibit much higher accumulation of the reference substrates DAPI and rhodamine 123, respectively (Fig. S4). Moreover, the reference OCT1 inhibitor verapamil as well as the reference OCT2 inhibitor amitriptyline failed to impair accumulation of fenamiphos and phosmet in HEK-OCT1 and HEK-OCT2 cells, respectively (Fig. 9). By contrast, verapamil inhibited DAPI accumulation in HEK-OCT1 cells and amitriptyline blocked that of rhodamine 123 in HEK-OCT2 cells (Fig. S4).

3.4 Determination of molecular descriptors associated with OCT1 and OCT2 inhibition by OPs.

In order to identify the specific physico-chemical properties associated to OCT1 and OCT2 inhibition by 8/13 OPs, molecular descriptors, including 0D-constitutional, 1D-structural, 2D-topological and 3D-geometrical descriptors, were determined using Dragon® 7 software. Putative associations with OCT1/OCT2 activity inhibition were next analyzed using the nonparametric Mann-Whitney test. As shown in Table 3, OCT1/OCT2 inhibition by OPs was significantly associated with 234 molecular descriptors, representing 4.4% of the total number of descriptors. The values for the five most discriminating factors, i.e., those exhibiting the highest significance levels (p<0.002), are shown in Fig.

S5. These highly discriminating factors correspond to one information indice (mean information content on the distance degree equality/IDDE), two 2D matrix-based descriptors (spectral mean absolute deviation from chi matrix/SpMAD_X and spectral diameter from Burden matrix weighted by I-State/ SpDiam_B(s)) and two 2D autocorrelations (Moran autocorrelation of lag 1 weighted by Sanderson electronegativity/MATS1e and Geary autocorrelation of lag 3 weighted by mass/GATS3m). The complete list of discriminating molecular factors is provided in Table S2. Among blocks of descriptors, three of them, i.e., 2D autocorrelations, Edge adjacency indices and GETAWAY (GEometry, Topology, and Atom Weights AssemblY) blocks, contained the highest numbers of discriminating descriptors, representing together 53.9% of the total number of descriptors differently expressed in OPs inhibiting OCT1/OCT2 activity versus non-inhibitor OPs (Table 3). By contrast, none of constitutional indices, that represent descriptors that are commonly considered with respect to transporter inhibition (Ahlin et al. 2008; Kido et al. 2011), was found to discriminate OCT1/OCT2 inhibitors and non-inhibitors among OPs (for example, p=0.09 for molecular weight/MW, p=0.09 for van der Waals volume/Sv and p=0.33 for the number of rotatable bonds). In the same way, the numbers of hydrogen bond donors (nHDon, p=0.53) and acceptors (nHAcc, p=0.76) did not segregate inhibitors and non-inhibitors OPs. Lipophilicity-related descriptors were also not significantly associated to OCT1/OCT2 inhibition by OPs (for example, p=0.17 for MLOGP), as well as total polar surface area (TPSA) (p=0.42).

2D autocorrelations descriptors are calculated from molecular graph by summing the products of atom weights of the terminal atoms of all the paths of the considered path length, i.e., the lag. These 2D-autocorrelation descriptors in general explain how the values of certain functions, at intervals equal to the lag, are correlated; they are thus topological descriptors that not only encodes the structure of the molecule but also numerical properties assigned to atoms (Moreau and Broto 1980). 2D-autocorrelations descriptors discriminating OCT1/2 inhibitors from non-inhibitors among OPs corresponded notably to 2D-autocorrelation parameters weighted by various parameters, such as mass, ionization potential, electronegativity and polarizability (Table S2). Edge adjacency indices are topological molecular descriptors derived from the edge adjacency matrix, which encodes the connectivity between graph edges (Estrada and Ramirez 1996). Most of those associated with OCT1/OCT2 activity blockage were weighted by various factors, including dipole moment, resonance integral, edge degree and bond degree (Table S2). With respect to GETAWAY descriptors, they are primarily based on a molecular influence matrix, proposed as a new molecular representation calculated from the spatial coordinates of the molecule atoms in a chosen conformation. They try to match 3D molecular geometry provided by the molecular influence matrix and atom relatedness by topology with chemical information by using different atomic weighting schemes (atomic mass,

polarizability, van der Waals volume, and electronegativity, together with unit weights) (Consonni et al. 2002). Two types of GETAWAY descriptors have been described; the first one, called H-GETAWAY, is derived by using only the information provided by the molecular influence matrix, while the second one, called R-GETAWAY, combines this information with geometric interatomic distances in the molecule. For GETAWAY descriptors discriminating OCT1/OCT2 inhibitors and non-inhibitors among OPs, 16 belong to the H-GATEWAY subfamily and 19 to the R-GATEWAY subfamily (Table S2).

4. Discussion

The present study demonstrated that various OPs can directly interact with activities of SLC drug transporters, thus fulling confirming the hypothesis that these derivatives of phosphoric or thiophosphoric acids can interact with this family of drug transporters, like other pesticides, such as organochlorine and pyrethroid pesticides (Bucher et al. 2014; Chedik et al. 2017). SLC drug transporters can therefore be included in the growing list of off-targets of OPs, primarily designed as acetylcholinesterase inhibitors, but known to interfere with various molecular and biochemical processes (Elersek 2011), notably related to enzymes, including carboxylases, lipases and drug metabolizing enzymes such as cytochromes P-450 (Hodgson and Rose 2006), to endocrine receptors (Tamura et al. 2003) or to genotoxicity (Hreljac et al. 2008).

Any general and non-specific effects of OPs towards membrane SLC transporter activities can be discarded, because interactions of OPs with SLC transporters greatly vary according to the nature of transporters and OPs, as summarized in Table 1. Thus, when considering a cut-off value of at least 50% modulation of transporter activity, OAT1 and MATE2-K were not impacted by any OP, whereas OATP1B1 and MATE1 were inhibited by two and three OPs, respectively. OAT3 activity was similarly blocked by three OPs, and was additionally stimulated by one OP, i.e., metasystox. Six various OPs stimulated OATP2B1 activity. Both OCT1 and OCT2 were the most impacted transporters, i.e., their activity was inhibited by the same eight OPs. In addition, when considering OPs, some of them, like dichlorvos, methamidophos and monocrotophos, failed to inhibit activity of any transporter, whereas others impacted one (metasystox), two (fenitrothion, parathion methyl and temephos), three (propetamphos and parathion), four (fenamiphos, malathion and phosmet) or five transporters (profenofos) (Table 1). Importantly a same OP, like for example phosmet and profenofos, can stimulate one SLC transporter, i.e., OATP2B1, and concomitantly inhibit others, such as OCT1 and OCT2. Taken together, these data illustrate the fact that structural requirements for interacting with SLC transporters are likely transporter-specific and are rather stringent, thus explicating why various OPs can differentially affect a same transporter. For OCT1 and OCT2 inhibition, the nature of inhibitory OPs

was however exactly the same, thus highlighting that these two related transporters exhibiting marked similarities for both substrates and inhibitors, as previously underlined (Jonker and Schinkel 2004).

The structural requirements for both OCT1 and OCT2 inhibition by OPs have been investigated in a more detailed manner. They include various molecular descriptors, which belong to different blocks, thus highlighting their diversity. It is however noteworthy that the exact signification and/or practical relevance of most of these descriptors may be rather complex to apprehend. More intuitive descriptors, notably those linked to lipophilicity (LogP), polar surface area or number of hydrogen bond donors or acceptors, failed to discriminate OPs inhibitors from non-inhibitors for OCT1/OCT2 activity. By contrast, some of these basic molecular descriptors have been demonstrated to contribute to OCT1 or OCT2 inhibition in previous studies (Ahlin et al. 2008; Kido et al. 2011). Such studies are however based on the analysis of much larger sets of chemicals (n=191 (Ahlin et al. 2008) or n=910 (Kido et al. 2011)), than that of OPs (n=13) used in the present study. Moreover, they include compounds belonging to various and diverse structurally-unrelated chemical classes, whereas our study was restricted to one structural chemical family, i.e., that of OPs. Such differences in the number, the nature and the perimeter of analyzed chemicals may contribute to the discrepancies observed in terms of relevant discriminating molecular factors for OCT1/OCT2 inhibition. Whether at least some of the molecular descriptors identified for OPs-mediated OCT1/OCT2 inhibition may be generalizable to other structurally-unrelated chemicals is likely to deserve further studies.

OPs are suspected to exert various adverse effects towards human health (Koureas et al. 2012). Besides severe parasympathetic system dysfunction and mortality due to marked inhibition of acetylcholinesterase enzyme activity observed in acute OP poisoning (Chowdhary et al. 2014; Vale 2015), chronic exposure to OPs, which may occur in an occupational, domestic or environmental context, is thought to cause or promote cancers (Alavanja et al. 2004) (Guyton et al. 2015), immunotoxicity (Li et al. 2002), endocrine disruption (Kang et al. 2004), alterations of child development (Gonzalez-Alzaga et al. 2015) and neurologic, cognitive and psychiatric disorders (Fiedler et al. 1997; Stephens et al. 1995). The possible contribution of SLC transporter activity alteration by OPs to these toxic effects is currently unknown. An implication of OPs-mediated changes in transport of endogenous substrates for the SLC transporters targeted by OPs may however be considered. The fact that both fenamiphos and phosmet markedly inhibit OCT1- and OCT2-mediated transport of dopamine in a concentration-dependent manner may be consistent with this hypothesis, knowing that alteration of dopaminergic ways play a crucial role in Parkinson's disease, for which OP exposure is well-established to be a risk factor (Paul et al. 2016). A potential link between this neurodegenerative disorder, OPs and the ABC transporter P-glycoprotein, has moreover been recently suggested (Narayan et al. 2015), thus supporting the assertion that the interplay drug transporter-pesticides may

contribute to pesticide toxicity. Besides OP-mediated alteration of dopamine transport, that of the endocrine compound E3S membrane transport, which is either inhibited or stimulated by OPs, may deserve special attention, notably in relation with putative hormonal effects caused by OPs.

It should however kept in mind that a major criteria to consider for putatively linking OPs-SLC transporters interactions with some OP toxic effects is the in vivo relevance of SLC transporter activity modulations by OPs established from in vitro assays. In this context, the in vitro IC50 values of various OPs such as fenamiphos, fenitrothion, malathion, parathion, parathion methyl and phosmet, required for inhibiting OCT1 and/or OCT2 activity are in the 3-30 µM range and are thus much higher than OP concentrations commonly measured in blood samples of humans environmentally exposed to pesticides, which are in the 1-200 pM range (Barr et al. 2002; Naksen et al. 2016; Whyatt et al. 2003). By contrast, blood OP concentrations may reach 1-10 µM after acute poisoning (Salm et al. 2009). According to the US Food and Drug Administration criteria for evaluating the clinical relevance of in vitro transporter inhibition by chemicals (Giacomini et al. 2010), an in vivo transporter inhibition has to be considered when the ratio [I]/IC50 >0.1 (with IC50 as the xenobiotic concentration inhibiting in vitro 50% of the activity of the considered transporter and [I] as the Cmax maximal plasma concentration of the xenobiotic). When applying this regulatory criteria to OPs-mediated inhibition of OCT1/OCT2 activities, clinical inhibition of OCT1 and OCT2 by OPs may occur after acute poisoning ([I]/IC50 around 0.3-3), but not in response to environmental exposure ([I]/IC50<0.0001). Implication of SLC transporter inhibition, especially those of OCT1 and OCT2, in chronic toxicity of OPs can therefore be excluded. In the same way, SLC transporter-based alteration of pharmacokinetics of administrated drugs is unlikely to occur in humans environmentally exposed to OPs, thus excluding any potential OP-drug interactions. Besides OPs, inhibition of drug transporter activity by the pyrethroids allethrin and tetramethrin, well-characterized in in vitro systems, are predicted to not occur in humans exposed to these pesticides (Chedik et al. 2017). Such a probable lack of in vivo effects of single pesticides towards SLC transporter activity may however be relativized by the fact that humans are generally exposed to mixtures of pesticides and other environmental chemicals, which may also interact with drug transporters (Bucher et al. 2014; Chedik et al. 2017; Nicklisch et al. 2016). Plasma levels of a single OP associated with those of other OPs, pesticides of other pollutants, may therefore be sufficient to contribute to synergic or additive inhibitory effects towards drug transporters, as already described for pesticide combinations (Pivcevic and Zaja 2006). The fact that the combination of low concentrations of fenamiphos and phosmet exerts synergistic inhibition towards OCT2 activity fully supports this hypothesis.

ABC drug transporters have been shown to handle some OPs (Lacher et al. 2015; Tribull et al. 2003), and by this way, may be implicated in their pharmacokinetics. With respect to SLC transporters, OPs

such as fenamiphos and phosmet failed to trans-stimulate OCT1 and OCT2 activity. In addition, intracellular accumulations of these OPs in HEK-MOCK, HEK-OCT1 and HEK-OCT2 cells were similar and not impaired by reference OCT1 and OCT2 inhibitors. Taken together, these data indicate that fenamiphos and phosmet are not transported by OCT1 or OCT2. OPs may consequently modulate SLC transporter activities, without being transported, as already suggested for pyrethroids (Chedik et al. 2017). A major contribution of SLC drug transporters to OP pharmacokinetics is therefore unlikely. The fact that metabolites of OPs, including oxon derivatives, may be substrates for SLC transporters may however challenge this assertion.

Finally, the fact that OPs may alter expression of SLC transporters has likely to be additionally considered. Indeed, some OPs can activate drug sensing receptors, like pregnane X receptor (PXR), constitutive androstane receptor (CAR)and aryl hydrocarbon receptor (AhR) (Abass et al. 2012) (Tripathi et al. 2017; Vrzal et al. 2015), which regulate expression of drug transporters, including that of SLC transporters (Jigorel et al. 2006; Svoboda et al. 2011). Whether environmental concentrations of OPs may regulate SLC transporter expression through activation of drug sensing receptors would consequently deserve further studies.

In summary, OPs were found to modulate activity of various SLC drug transporters. In particular, fenamiphos and phosmet inhibited activities of OCT1 and OCT2, without however being handled by these transporters. Such interactions with SLC transporters however occurred for OP concentrations much higher than those commonly expected in response to environmental exposure, making unlikely any relevant contribution of SLC transporter modulation to OP toxicity in environmentally exposed humans.

Acknowledgements

We thank Dr D. Mias-Lucquin for his kind help for statistical analysis of molecular descriptor data.

References

Abass, K., Lamsa, V., Reponen, P., Kublbeck, J., Honkakoski, P., Mattila, S., Pelkonen, O. and Hakkola, J. 2012. Characterization of human cytochrome P450 induction by pesticides. Toxicology 294, 17-26.

Ahlin, G., Karlsson, J., Pedersen, J.M., Gustavsson, L., Larsson, R., Matsson, P., Norinder, U., Bergstrom, C.A. and Artursson, P. 2008. Structural requirements for drug inhibition of the liver specific human organic cation transport protein 1. J Med Chem 51, 5932-5942.

Alavanja, M.C., Dosemeci, M., Samanic, C., Lubin, J., Lynch, C.F., Knott, C., Barker, J., Hoppin, J.A., Sandler, D.P., Coble, J., Thomas, K. and Blair, A. 2004. Pesticides and lung cancer risk in the agricultural health study cohort. Am J Epidemiol 160, 876-885.

Androutsopoulos, V.P., Hernandez, A.F., Liesivuori, J. and Tsatsakis, A.M. 2013. A mechanistic overview of health associated effects of low levels of organochlorine and organophosphorous pesticides. Toxicology 307, 89-94.

Bain, L.J. and LeBlanc, G.A. 1996. Interaction of structurally diverse pesticides with the human MDR1 gene product P-glycoprotein. Toxicol Appl Pharmacol 141, 288-298.

Bain, L.J., McLachlan, J.B. and LeBlanc, G.A. 1997. Structure-activity relationships for xenobiotic transport substrates and inhibitory ligands of P-glycoprotein. Environ Health Perspect 105, 812-818.

Barr, D.B., Barr, J.R., Maggio, V.L., Whitehead, R.D., Jr., Sadowski, M.A., Whyatt, R.M. and Needham, L.L. 2002. A multi-analyte method for the quantification of contemporary pesticides in human serum and plasma using high-resolution mass spectrometry. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci 778, 99-111.

Bijnsdorp, I.V., Giovannetti, E. and Peters, G.J. 2011. Analysis of drug interactions. Methods Mol Biol 731, 421-434.

Bucher, S., Le Vee, M., Jouan, E. and Fardel, O. 2014. Regulation of hepatic drug transporter activity and expression by organochlorine pesticides. J Biochem Mol Toxicol 28, 119-128.

Cavret, S., Videmann, B., Mazallon, M. and Lecoeur, S. 2005. Diazinon cytotoxicity and transfer in Caco-2 cells: Effect of long-term exposure to the pesticide. Environ Toxicol Pharmacol 20, 375-380.

Chedik, L., Bruyere, A., Le Vee, M., Stieger, B., Denizot, C., Parmentier, Y., Potin, S. and Fardel, O. 2017. Inhibition of Human Drug Transporter Activities by the Pyrethroid Pesticides Allethrin and Tetramethrin. PLoS One 12, e0169480.

Chou, T.C. 2010. Drug combination studies and their synergy quantification using the Chou-Talalay method. Cancer Res 70, 440-446.

Chowdhary, S., Bhattacharyya, R. and Banerjee, D. 2014. Acute organophosphorus poisoning. Clin Chim Acta 431, 66-76.

Colas, C., Ung, P.M. and Schlessinger, A. 2016. SLC Transporters: Structure, Function, and Drug Discovery. Medchemcomm 7, 1069-1081.

Consonni, V., Todeschini, R. and Pavan, M. 2002. Structure/response correlations and similarity/diversity analysis by GETAWAY descriptors. 1. Theory of the novel 3D molecular descriptors. J Chem Inf Comput Sci 42, 682-692.

De Bruyn, T., van Westen, G.J., Ijzerman, A.P., Stieger, B., de Witte, P., Augustijns, P.F. and Annaert, P.P. 2013. Structure-based identification of OATP1B1/3 inhibitors. Mol Pharmacol 83, 1257-1267.

DeGorter, M.K., Xia, C.Q., Yang, J.J. and Kim, R.B. 2012. Drug transporters in drug efficacy and toxicity. Annu Rev Pharmacol Toxicol 52, 249-273.

Doring, B. and Petzinger, E. 2014. Phase 0 and phase III transport in various organs: combined concept of phases in xenobiotic transport and metabolism. Drug Metab Rev 46, 261-282.

Elersek, T.a.F., O. 2011. Organophosphorous Pesticides - Mechanisms of Their Toxicity, Pesticides - The Impacts of Pesticides Exposure, Prof. Margarita Stoytcheva (Ed.), InTech, DOI: 10.5772/14020. Available from: https://www.intechopen.com/books/pesticides-the-impacts-of-pesticides-exposure/organophosphorous-pesticides-mechanisms-of-their-toxicity.

Estrada, E. and Ramirez, A. 1996. Edge Adjacency Relationships and Molecular Topographic Descriptors. Definition and QSAR Applications. J Chem Inf Comput Sci 36, 837-843.

Fardel, O., Kolasa, E. and Le Vee, M. 2012. Environmental chemicals as substrates, inhibitors or inducers of drug transporters: implication for toxicokinetics, toxicity and pharmacokinetics. Expert Opin Drug Metab Toxicol 8, 29-46.

Fiedler, N., Kipen, H., Kelly-McNeil, K. and Fenske, R. 1997. Long-term use of organophosphates and neuropsychological performance. Am J Ind Med 32, 487-496.

Giacomini, K.M., Huang, S.M., Tweedie, D.J., Benet, L.Z., Brouwer, K.L., Chu, X., Dahlin, A., Evers, R., Fischer, V., Hillgren, K.M., Hoffmaster, K.A., Ishikawa, T., Keppler, D., Kim, R.B., Lee, C.A., Niemi, M., Polli, J.W., Sugiyama, Y., Swaan, P.W., Ware, J.A., Wright, S.H., Yee, S.W., Zamek-Gliszczynski, M.J. and Zhang, L. 2010. Membrane transporters in drug development. Nat Rev Drug Discov 9, 215-236.

Gonzalez-Alzaga, B., Hernandez, A.F., Rodriguez-Barranco, M., Gomez, I., Aguilar-Garduno, C., Lopez-Flores, I., Parron, T. and Lacasana, M. 2015. Pre- and postnatal exposures to pesticides and neurodevelopmental effects in children living in agricultural communities from South-Eastern Spain. Environ Int 85, 229-237.

Grundemann, D., Hahne, C., Berkels, R. and Schomig, E. 2003. Agmatine is efficiently transported by non-neuronal monoamine transporters extraneuronal monoamine transporter (EMT) and organic cation transporter 2 (OCT2). J Pharmacol Exp Ther 304, 810-817.

547 Guyton, K.Z., Loomis, D., Grosse, Y., El Ghissassi, F., Benbrahim-Tallaa, L., Guha, N., Scoccianti, C.,
548 Mattock, H. and Straif, K. 2015. Carcinogenicity of tetrachlorvinphos, parathion, malathion, diazinon,
549 and glyphosate. Lancet Oncol 16, 490-491.

550 Hernandez, A.F., Parron, T., Tsatsakis, A.M., Requena, M., Alarcon, R. and Lopez-Guarnido, O. 2013.
551 Toxic effects of pesticide mixtures at a molecular level: their relevance to human health. Toxicology
552 307, 136-145.

553 Hodgson, E. and Rose, R.L. 2006. Organophosphorus chemicals: potent inhibitors of the human
554 metabolism of steroid hormones and xenobiotics. Drug Metab Rev 38, 149-162.

555 Hreljac, I., Zajc, I., Lah, T. and Filipic, M. 2008. Effects of model organophosphorous pesticides on DNA
556 damage and proliferation of HepG2 cells. Environ Mol Mutagen 49, 360-367.

557 Jigorel, E., Le Vee, M., Boursier-Neyret, C., Bertrand, M. and Fardel, O. 2005. Functional expression of
558 sinusoidal drug transporters in primary human and rat hepatocytes. Drug Metab Dispos 33, 1418-1422.

559 Jigorel, E., Le Vee, M., Boursier-Neyret, C., Parmentier, Y. and Fardel, O. 2006. Differential regulation
560 of sinusoidal and canalicular hepatic drug transporter expression by xenobiotics activating drug-
561 sensing receptors in primary human hepatocytes. Drug Metab Dispos 34, 1756-1763.

562 Jonker, J.W. and Schinkel, A.H. 2004. Pharmacological and physiological functions of the polyspecific
563 organic cation transporters: OCT1, 2, and 3 (SLC22A1-3). J Pharmacol Exp Ther 308, 2-9.

564 Jouan, E., Le Vee, M., Denizot, C., Da Violante, G. and Fardel, O. 2014. The mitochondrial fluorescent
565 dye rhodamine 123 is a high-affinity substrate for organic cation transporters (OCTs) 1 and 2. Fundam
566 Clin Pharmacol 28, 65-77.

567 Kang, H.G., Jeong, S.H., Cho, J.H., Kim, D.G., Park, J.M. and Cho, M.H. 2004. Chlropyrifos-methyl shows
568 anti-androgenic activity without estrogenic activity in rats. Toxicology 199, 219-230.

569 Kido, Y., Matsson, P. and Giacomini, K.M. 2011. Profiling of a prescription drug library for potential
570 renal drug-drug interactions mediated by the organic cation transporter 2. J Med Chem 54, 4548-4558.

571 Konig, J., Muller, F. and Fromm, M.F. 2013. Transporters and drug-drug interactions: important
572 determinants of drug disposition and effects. Pharmacol Rev 65, 944-966.

573 Koureas, M., Tsakalof, A., Tsatsakis, A. and Hadjichristodoulou, C. 2012. Systematic review of
574 biomonitoring studies to determine the association between exposure to organophosphorus and
575 pyrethroid insecticides and human health outcomes. Toxicol Lett 210, 155-168.

576 Lacher, S.E., Skagen, K., Veit, J., Dalton, R. and Woodahl, E.L. 2015. P-Glycoprotein Transport of
577 Neurotoxic Pesticides. J Pharmacol Exp Ther 355, 99-107.

578 Le Vee, M., Jouan, E., Noel, G., Stieger, B. and Fardel, O. 2015. Polarized location of SLC and ABC drug
579 transporters in monolayer-cultured human hepatocytes. Toxicol In Vitro 29, 938-946.

580 Le Vee, M., Noel, G., Jouan, E., Stieger, B. and Fardel, O. 2013. Polarized expression of drug transporters
581 in differentiated human hepatoma HepaRG cells. Toxicol In Vitro 27, 1979-1986.

582 Li, Q., Nagahara, N., Takahashi, H., Takeda, K., Okumura, K. and Minami, M. 2002. Organophosphorus
583 pesticides markedly inhibit the activities of natural killer, cytotoxic T lymphocyte and lymphokine-
584 activated killer: a proposed inhibiting mechanism via granzyme inhibition. Toxicology 172, 181-190.

585 Maroni, M. and Fait, A. 1993. Health effects in man from long-term exposure to pesticides. A review
586 of the 1975-1991 literature. Toxicology 78, 1-180.

587 Moreau, G. and Broto, P. 1980. The autocorrelation of a topological structure: A new molecular
588 descriptor. Nouv J Chim 4, 359-360.

589 Mostafalou, S. and Abdollahi, M. 2017. Pesticides: an update of human exposure and toxicity. Arch
590 Toxicol 91, 549-599.

591 Munoz-Quezada, M.T., Lucero, B.A., Barr, D.B., Steenland, K., Levy, K., Ryan, P.B., Iglesias, V., Alvarado,
592 S., Concha, C., Rojas, E. and Vega, C. 2013. Neurodevelopmental effects in children associated with
593 exposure to organophosphate pesticides: a systematic review. Neurotoxicology 39, 158-168.

594 Naksen, W., Prapamontol, T., Mangklabruks, A., Chantara, S., Thavornyutikarn, P., Robson, M.G., Ryan,
595 P.B., Barr, D.B. and Panuwet, P. 2016. A single method for detecting 11 organophosphate pesticides in
596 human plasma and breastmilk using GC-FPD. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci 1025, 92-
597 104.

598 Narayan, S., Sinsheimer, J.S., Paul, K.C., Liew, Z., Cockburn, M., Bronstein, J.M. and Ritz, B. 2015.
599 Genetic variability in ABCB1, occupational pesticide exposure, and Parkinson's disease. Environ Res
600 143, 98-106.

601 Natoff, I.L. 1971. Organophosphorus pesticides: pharmacology. Prog Med Chem 8, 1-37.

602 Nicklisch, S.C., Rees, S.D., McGrath, A.P., Gokirmak, T., Bonito, L.T., Vermeer, L.M., Cregger, C., Loewen,
603 G., Sandin, S., Chang, G. and Hamdoun, A. 2016. Global marine pollutants inhibit P-glycoprotein:
604 Environmental levels, inhibitory effects, and cocrystal structure. Sci Adv 2, e1600001.

Nornberg, B.F., Batista, C.R., Almeida, D.V., Trindade, G.S. and Marins, L.F. 2015. ABCB1 and ABCC4 efflux transporters are involved in methyl parathion detoxification in ZFL cells. Toxicol In Vitro 29, 204-210.

Oosterhuis, B., Vukman, K., Vagi, E., Glavinas, H., Jablonkai, I. and Krajcsi, P. 2008. Specific interactions of chloroacetanilide herbicides with human ABC transporter proteins. Toxicology 248, 45-51.

Paul, K.C., Sinsheimer, J.S., Rhodes, S.L., Cockburn, M., Bronstein, J. and Ritz, B. 2016. Organophosphate Pesticide Exposures, Nitric Oxide Synthase Gene Variants, and Gene-Pesticide Interactions in a Case-Control Study of Parkinson's Disease, California (USA). Environ Health Perspect 124, 570-577.

Pivcevic, B. and Zaja, R. 2006. Pesticides and their binary combinations as P-glycoprotein inhibitors in NIH 3T3/MDR1 cells. Environ Toxicol Pharmacol 22, 268-276.

Prueksaritanont, T., Chu, X., Gibson, C., Cui, D., Yee, K.L., Ballard, J., Cabalu, T. and Hochman, J. 2013. Drug-drug interaction studies: regulatory guidance and an industry perspective. AAPS J 15, 629-645.

Salm, P., Taylor, P.J., Roberts, D. and de Silva, J. 2009. Liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the simultaneous quantitative determination of the organophosphorus pesticides dimethoate, fenthion, diazinon and chlorpyrifos in human blood. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci 877, 568-574.

Schinkel, A.H. and Jonker, J.W. 2003. Mammalian drug efflux transporters of the ATP binding cassette (ABC) family: an overview. Adv Drug Deliv Rev 55, 3-29.

Shitara, Y., Horie, T. and Sugiyama, Y. 2006. Transporters as a determinant of drug clearance and tissue distribution. Eur J Pharm Sci 27, 425-446.

Sreeramulu, K., Liu, R. and Sharom, F.J. 2007. Interaction of insecticides with mammalian P-glycoprotein and their effect on its transport function. Biochim Biophys Acta 1768, 1750-1757.

Stephens, R., Spurgeon, A., Calvert, I.A., Beach, J., Levy, L.S., Berry, H. and Harrington, J.M. 1995. Neuropsychological effects of long-term exposure to organophosphates in sheep dip. Lancet 345, 1135-1139.

Svoboda, M., Riha, J., Wlcek, K., Jaeger, W. and Thalhammer, T. 2011. Organic anion transporting polypeptides (OATPs): regulation of expression and function. Curr Drug Metab 12, 139-153.

633 Szakacs, G., Varadi, A., Ozvegy-Laczka, C. and Sarkadi, B. 2008. The role of ABC transporters in drug
634 absorption, distribution, metabolism, excretion and toxicity (ADME-Tox). Drug Discov Today 13, 379-
635 393.

636 Tamura, H., Yoshikawa, H., Gaido, K.W., Ross, S.M., DeLisle, R.K., Welsh, W.J. and Richard, A.M. 2003.
637 Interaction of organophosphate pesticides and related compounds with the androgen receptor.
638 Environ Health Perspect 111, 545-552.

639 Tribull, T.E., Bruner, R.H. and Bain, L.J. 2003. The multidrug resistance-associated protein 1 transports
640 methoxychlor and protects the seminiferous epithelium from injury. Toxicol Lett 142, 61-70.

641 Tripathi, V.K., Kumar, V., Pandey, A., Vatsa, P., Dhasmana, A., Singh, R.P., Appikonda, S.H.C., Hwang, I.
642 and Lohani, M. 2017. Monocrotophos Induces the Expression of Xenobiotic Metabolizing Cytochrome
643 P450s (CYP2C8 and CYP3A4) and Neurotoxicity in Human Brain Cells. Mol Neurobiol 54, 3633-3651.

644 Vale, A. 2015. Organophosphorus insecticide poisoning. BMJ Clin Evid 2015.

645 Vrzal, R., Zenata, O., Doricakova, A. and Dvorak, Z. 2015. Environmental pollutants parathion, paraquat
646 and bisphenol A show distinct effects towards nuclear receptors-mediated induction of xenobiotics-
647 metabolizing cytochromes P450 in human hepatocytes. Toxicol Lett 238, 43-53.

648 Whyatt, R.M., Barr, D.B., Camann, D.E., Kinney, P.L., Barr, J.R., Andrews, H.F., Hoepner, L.A., Garfinkel,
649 R., Hazi, Y., Reyes, A., Ramirez, J., Cosme, Y. and Perera, F.P. 2003. Contemporary-use pesticides in
650 personal air samples during pregnancy and blood samples at delivery among urban minority mothers
651 and newborns. Environ Health Perspect 111, 749-756.

652 Wu, C.P., Hsieh, C.H. and Wu, Y.S. 2011. The emergence of drug transporter-mediated multidrug
653 resistance to cancer chemotherapy. Mol Pharm 8, 1996-2011.

654 Zhang, L., Gorset, W., Dresser, M.J. and Giacomini, K.M. 1999. The interaction of n-
655 tetraalkylammonium compounds with a human organic cation transporter, hOCT1. J Pharmacol Exp
656 Ther 288, 1192-1198.

657 Zhao, L., Wientjes, M.G. and Au, J.L. 2004. Evaluation of combination chemotherapy: integration of
658 nonlinear regression, curve shift, isobologram, and combination index analyses. Clin Cancer Res 10,
659 7994-8004.

660

661

662

Legends to figures

Fig. 1. Effects of OPs on OAT activities. Activities of OAT1 and OAT3 were determined in OAT-transfected HEK293 cells, using fluorescein as a reference OAT substrate, in the absence or presence of the reference OAT inhibitor probenecid or of various OPs (each used at 100 µM), as described in Materials and Methods. Data are expressed as percentages of activities found in untreated control cells, arbitrarily set at 100% and indicated by dotted lines on graphs; they are the means ± SEM of three independent assays, each being performed in triplicate. *, $p<0.05$ when compared to untreated control cells.

Fig. 2. Effects of OPs on OATP activities. Activities of OAT1B1 and OAT2B1 were determined in OATP-transfected HEK293 cells, using E3S as a reference OATP substrate, in the absence or presence of the reference OATP inhibitor probenecid or of various OPs (each used at 100 µM), as described in Materials and Methods. Data are expressed as percentages of activities found in untreated control cells, arbitrarily set at 100% and indicated by dotted lines on graphs; they are the means ± SEM of three independent assays, each being performed in triplicate. *, $p<0.05$ when compared to untreated control cells.

Fig. 3. Effects of OPs on OCT activities. Activities of OCT1 and OCT2 were determined in OCT-transfected HEK293 cells, using DAPI (OCT1) or rhodamine 123 (OCT2), as reference substrates, in the absence or presence of the reference inhibitor verapamil (OCT1) or amitriptyline (OCT2) or of various OPs (each used at 100 µM), as described in Materials and Methods. Data are expressed as percentages of activities found in untreated control cells, arbitrarily set at 100% and indicated by dotted lines on graphs; they are the means ± SEM of three independent assays, each being performed in triplicate. *, $p<0.05$ when compared to untreated control cells.

Fig. 4. Effects of OPs on MATE activities. Activities of MATE1 and MATE2-K were determined in MATE-transfected HEK293 cells, using TEA as a reference substrate, in the absence or presence of the reference inhibitor verapamil or of various OPs (each used at 100 µM), as described in Materials and Methods. Data are expressed as percentages of activities found in untreated control cells, arbitrarily set at 100% and indicated by dotted lines on graphs; they are the means ± SEM of three independent assays, each being performed in triplicate. *, $p<0.05$ when compared to untreated control cells.

Fig. 5. Effects of fenamiphos and phosmet on accumulation of the OCT1 substrate TEA in primary human hepatocytes and HepaRG cells. Primary human hepatocytes and human HepaRG cells were incubated with 29 µM [3H]-TEA in the absence (control) or presence of 100 µM verapamil (used as a reference OCT1 inhibitor), 100 µM fenamiphos or 100 µM phosmet for 5 min at 37°C. Intracellular accumulation of TEA was then determined by scintillation counting and normalized to protein content. Data are expressed as percentage of TEA accumulation in control cells, arbitrarily set at 100%; they are the means ± SEM of three independent assays, each being performed in triplicate. *, $p<0.05$ when compared to untreated control cells.

Fig. 6. Effects of fenamiphos and phosmet on accumulation of dopamine in HEK-OCT1 and HEK-OCT2 cells. HEK-OCT1, HEK-OCT2 and HEK-MOCK cells were incubated were incubated with 11 nM 3,4-[Ring-2,5,6-3H]-dopamine in the absence (control) or presence of 100 µM verapamil (used a reference OCT1 and OCT2 inhibitor), 100 µM fenamiphos or 100 µM phosmet. Intracellular accumulation of dopamine was next determined by scintillation counting and normalized to protein content. Data are expressed as percentages of OCT1- or OCT2-mediated transport of dopamine in control cells, determined by subtracting accumulation of dopamine in HEK-MOCK cells from that in HEK-OCT1 or HEK-OCT2 cells, in the absence of verapamil or OP, arbitrarily set at 100% and indicated by a dotted line on the graph. They are the means ± SEM of four independent assays, each being performed in triplicate. *, $p<0.05$ when compared to untreated control cells.

Fig. 7. Concentration-dependent effects of fenamiphos and phosmet towards OCT1 and OCT2 activities. OCT1 and OCT2 activities were determined using dopamine (OCT1 and OCT2), DAPI (OCT1) or rhodamine 123 (OCT2) as substrates, in the absence or presence of various concentrations of fenamiphos or phosmet (from 0.1 to 300 µM), as described in Materials and Methods. Data are expressed as percentages of transporter activities found in control untreated cells, arbitrarily set at 100%; they are the means ± SEM of three independent assays, each being performed in triplicate. IC50 values are indicated at the top of graphs.

Fig. 8. Lack of trans-stimulating effect of fenamiphos and phosmet towards OCT1- and OCT2-mediated TEA uptake. HEK-OCT1 and HEK-OCT2 cells were first incubated for 60 min at 37°c in the absence (control) or presence of 10 mM unlabeled TEA, 100 µM fenamiphos or 100 µM phosmet. After washing, cells were re-incubated with 29 µM [1-14C]-TEA for 5 min at 37°C. Intracellular accumulation of [1-14C]-TEA was then determined by scintillation counting. Data are expressed as % of TEA accumulation in control cells, arbitrarily set at 100%; they are the means ± SEM of three independent experiments. *, $p<0.05$ when compared to control cells.

Fig. 9. Accumulation of fenamiphos and phosmet in HEK-OCT1, HEK-OCT2 and HEK-MOCK cells. HEK-MOCK, HEK-OCT1 and HEK-OCT2 cells were incubated with 100 µM fenamiphos or 100 µM phosmet, in the absence or presence of reference inhibitors (100 µM verapamil for OCT1 inhibition and 100 µM amitriptyline for OCT2 inhibition), for 5 min at 37°C. Intracellular accumulated levels of fenamiphos and phosmet were then quantified by liquid chromatography-tandem mass spectroscopy. Data are the means ± SEM of three independent assays. NS, not statistically significant.

Fig. S1. Chemical structures of OPs analyzed in the study

Fig. S2. Concentration-dependent inhibitory effects of malathion and parathion towards OCT1 activity. OCT1 activities were determined using DAPI as substrate, in the absence or presence of various concentrations of malathion or parathion (from 0.1 to 300 µM), as described in Materials and Methods. Data are expressed as percentages of transporter activities found in control untreated cells, arbitrarily set at 100%; they are the means ± SEM of three independent assays, each being performed in triplicate. IC50 values are indicated at the top of graphs.

Fig. S3. Concentration-dependent inhibitory effects of fenitrothion and parathion methyl towards OCT2 activity. OCT2 activities were determined using rhodamine 123 as substrate, in the absence or presence of various concentrations of fenitrothion or parathion methyl (from 0.1 to 300 µM), as described in Materials and Methods. Data are expressed as percentages of transporter activities found in control untreated cells, arbitrarily set at 100%; they are the means ± SEM of three independent assays, each being performed in triplicate. IC50 values are indicated at the top of graphs.

Fig. S4. Accumulation of (A) DAPI in HEK-OCT1 and HEK-MOCK cells and (B) rhodamine 123 in HEK-OCT2 and HEK-MOCK cells. (A) HEK-OCT1 and HEK-MOCK cells were incubated with 1 µM DAPI in the absence or presence of 100 µM verapamil, used here as a reference OCT1 inhibitor, for 5 min. (B) HEK-OCT2 and HEK-MOCK cells were incubated with 1 µM rhodamine 123 in the absence or presence of 100 µM amitriptyline, used here as a reference OCT2 inhibitor, for 5 min. (A, B) After washing, intracellular levels of fluorescent dyes were determined by spectrofluorimetry. Data are expressed as fluorescence arbitrary units (FAU)/mg protein and are the means ± SEM of three independent assays.*, $p<0.05$.

Fig. S5. OP values for molecular descriptors highly discriminating OCT1/OCT2 inhibitors from non-inhibitors among OPs. Molecular descriptor values for OPs were determined using the Dragon® 7 software, as described in Material and Methods. Statistical comparison of values between OCT1/OCT2 inhibitors (n=8) and non-inhibitors (n=5) was performed using the non-parametric Mean-Whitney test.

Table 1

Summary of OP effects towards SLC transporter activities

OP	Modulation of SLC transporter activity[a]							
	OAT1	OAT3	OATP1B1	OATP2B1	OCT1	OCT2	MATE1	MATE2-K
Dichlorvos	=	=	=	=	=	=	=	=
Fenamiphos	=	-	=	+	-	-	-	=
Fenitrothion	=	=	=	=	-	-	=	=
Malathion	=	-	=	+	-	-	=	=
Metasystox	=	+	=	=	=	=	=	=
Methamidophos	=	=	=	=	=	=	=	=
Monocrotophos	=	=	=	=	=	=	=	=
Parathion	=	=	=	+	-	-	=	=
Parathion methyl	=	=	=	=	-	-	=	=
Phosmet	=	=	=	+	-	-	-	=
Profenofos	=	-	-	+	-	-	=	=
Propetamphos	=	=	=	=	-	-	-	=
Temephos	=	=	-	+	=	=	=	=

[a]The cut-off value was at least 50% increase (stimulation) or 50% decrease (inhibition) of transporter activity by OPs (tested at 100 µM). +, stimulation; -, inhibition; =, no change.

Table 2

Combination index (CI) values for OCT2 inhibition by combined treatment with fenamiphos and phosmet

% inhibition OCT2 activity	CI[a]	Mixture concentration[b]	Nature of effect[c]
10	0.43	0.38 µM	Synergistic
20	0.51	1.00 µM	Synergistic
30	0.58	1.90 µM	Synergistic
40	0.64	3.21 µM	Synergistic
50	0.71	5.19 µM	Synergistic
60	0.79	8.40 µM	Synergistic
70	0.90	14.18 µM	Additive
80	1.05	26.85 µM	Additive
90	1.34	70.22 µM	Antagonistic

[a]CI values were calculated using CompuSyn software.
[b]The ratio [Fenamiphos]:[Phosmet] is 1:1.
[C]Synergistic effect: CI<0.8; additive effect: 0.8≤CI≤1.2; antagonistic effect: CI>1.2.

836 **Table 3**

837 Repartition of molecular descriptors discriminating OCT1/OCT2 inhibitors from non-inhibitors for OPs
838 among descriptor blocks

Molecular descriptor blocks	Descriptors discriminating OCT1/OCT2 inhibitors (n=8) and non-inhibitors (n=5) for OPs		
	Number	% per block	% total number of discriminating descriptors
Constitutional (n=47)	0	0.0	0.0
Ring descriptors (n=32)	0	0.0	0.0
Topological indices (n=75)	3	4.0	1.3
Walk and path counts (n=46)	0	0.0	0.0
Connectivity indices (n=37)	1	2.7	0.4
Information indices (n=50)	12	24.0	5.1
2D matrix-based descriptors (n=607)	23	3.8	9.8
2D autocorrelations (n=213)	40	18.8	17.1
Burden eigenvalues (n=96)	4	4.2	1.7
P-VSA-like descriptors (n=55)	1	1.8	0.4
ETA indices (n=23)	2	8.7	0.9
Edge adjacency indices (n=324)	51	15.7	21.8
Geometrical descriptors (n=38)	4	10.5	1.7
3D matrix-based descriptors (n=99)	0	0.0	0.0
3D autocorrelations (n=80)	15	18.8	6.4
RDF descriptors (n=210)	8	3.8	3.4
3D-MoRSE descriptors (n=224)	7	3.1	3.0
WHIM descriptors (n=114)	9	7.9	3.8
GETAWAY descriptors (n=273)	35	12.8	15.0
Randic molecular profiles (n=41)	0	0.0	0.0
Functional groups count (n=154)	0	0.0	0.0
Atom-centred fragments (n=115)	1	0.9	0.4
Atom-type E-state indices (n=172)	0	0.0	0.0
CATS 2D (n=150)	1	0.7	0.4
2D Atom Pairs (n=1596)	12	0.8	5.1
3D Atom Pairs (n=36)	1	2.8	0.4
Charge descriptors (n=15)	1	6.7	0.4
Molecular properties (n=20)	0	0.0	0.0
Drug-like indices (n=28)	0	0.0	0.0
CATS 3D (n=300)	3	1.0	1.3
Total	234	Not applicable	4.4

839

840

841

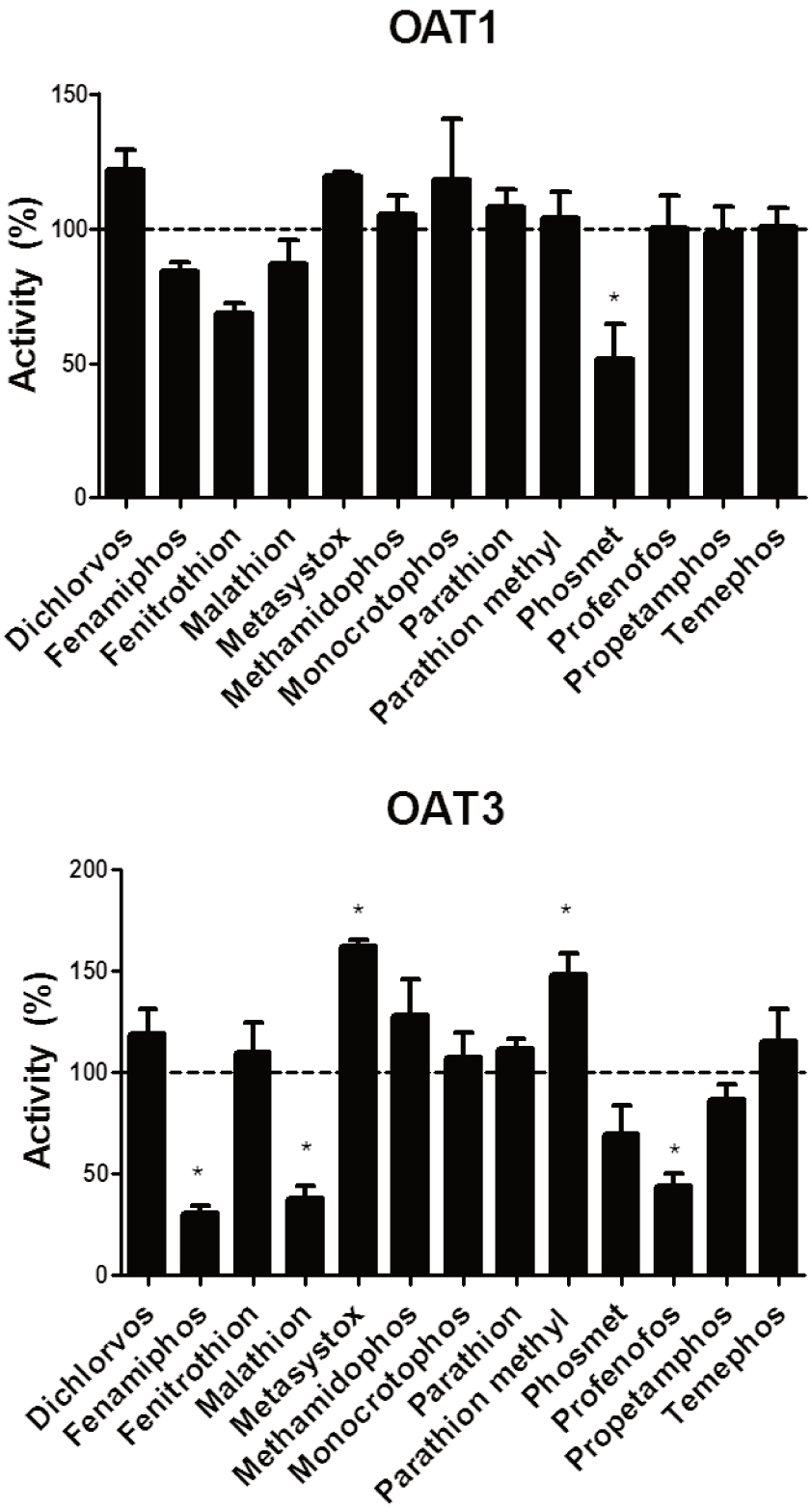

OAT1
Activity (%)
150
100
50
0
*
Dichlorvos
Fenamiphos
Fenitrothion
Malathion
Metasystox
Methamidophos
Monocrotophos
Parathion
Parathion methyl
Phosmet
Profenofos
Propetamphos
Temephos
OAT3
Activity (%)
200
150
100
50
0
*
*
*
*
*
Dichlorvos
Fenamiphos
Fenitrothion
Malathion
Metasystox
Methamidophos
Monocrotophos
Parathion
Parathion methyl
Phosmet
Profenofos
Propetamphos
Temephos

Fig. 1

842

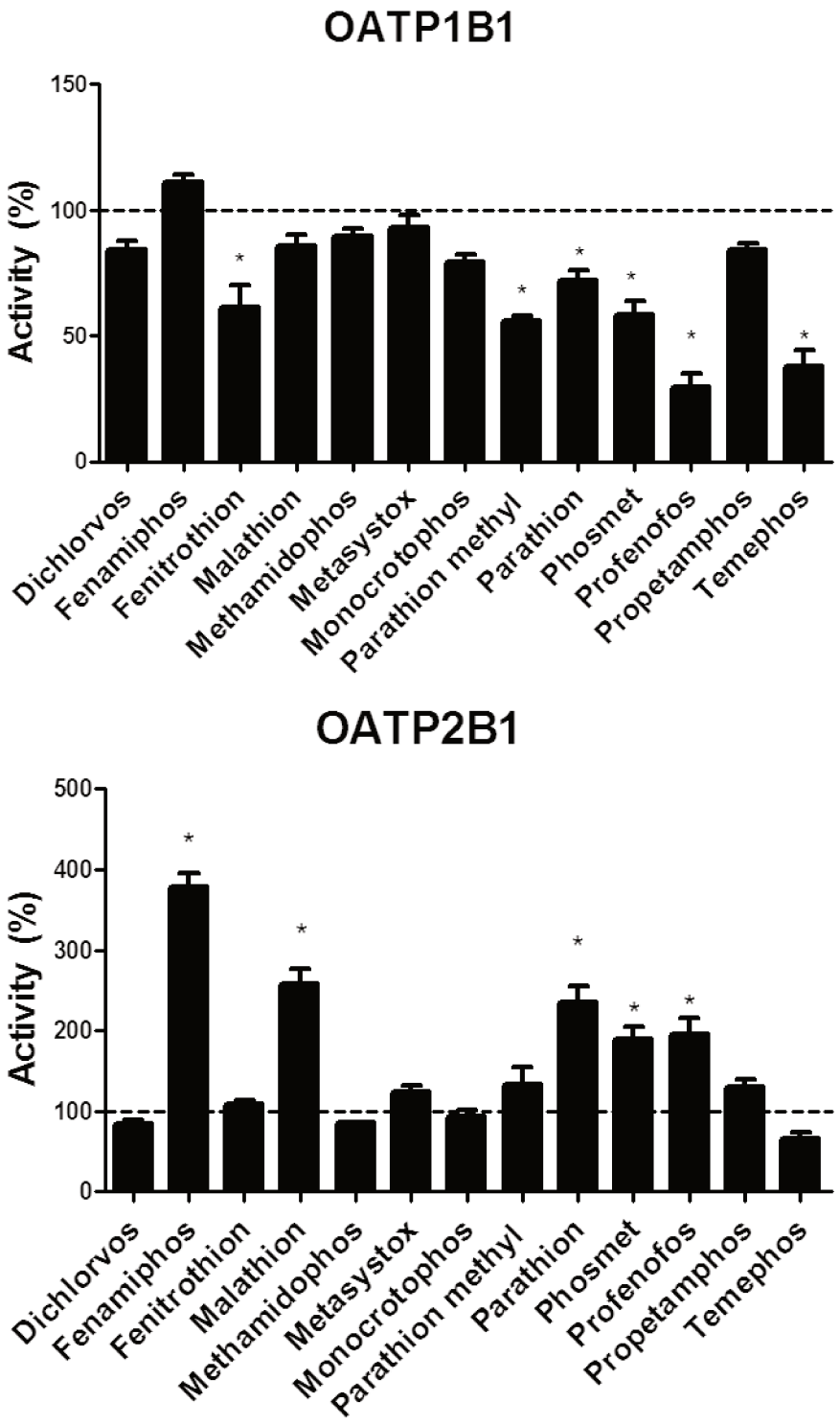

OATP1B1
Activity (%)
150
100
50
0
Dichlorvos
Fenamiphos
Fenitrothion
Malathion
Methamidophos
Metasystox
Monocrotophos
Parathion methyl
Parathion
Phosmet
Profenofos
Propetamphos
Temephos
OATP2B1
Activity (%)
500
400
300
200
100
0
Dichlorvos
Fenamiphos
Fenitrothion
Malathion
Methamidophos
Metasystox
Monocrotophos
Parathion methyl
Parathion
Phosmet
Profenofos
Propetamphos
Temephos

Fig. 2

843

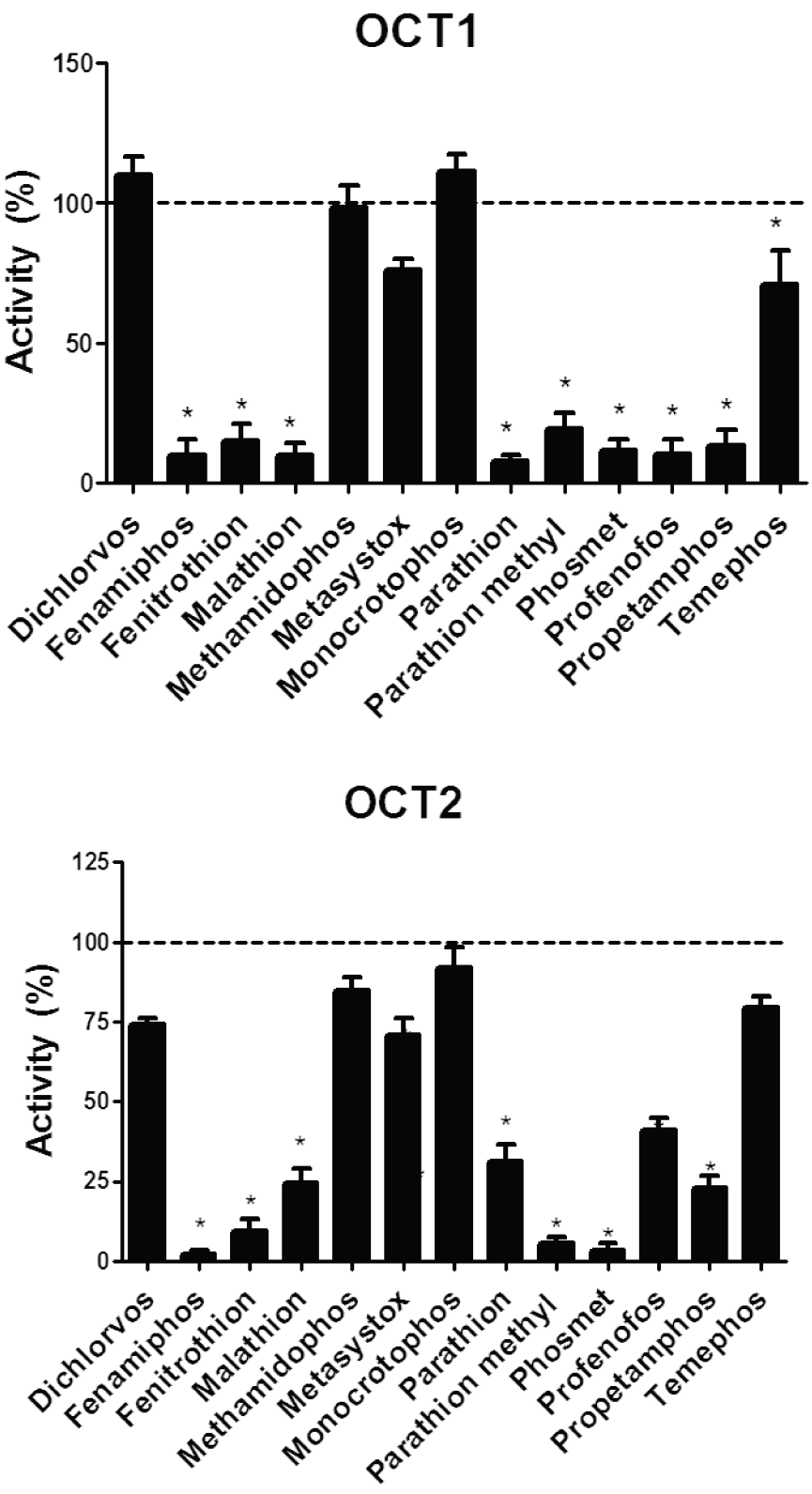

OCT1
Activity (%)
150
100
50
0
Dichlorvos
Fenamiphos
Fenitrothion
Malathion
Methamidophos
Metasystox
Monocrotophos
Parathion
Parathion methyl
Phosmet
Profenofos
Propetamphos
Temephos
OCT2
Activity (%)
125
100
75
50
25
0
Dichlorvos
Fenamiphos
Fenitrothion
Malathion
Methamidophos
Metasystox
Monocrotophos
Parathion
Parathion methyl
Phosmet
Profenofos
Propetamphos
Temephos

Fig. 3

844

845

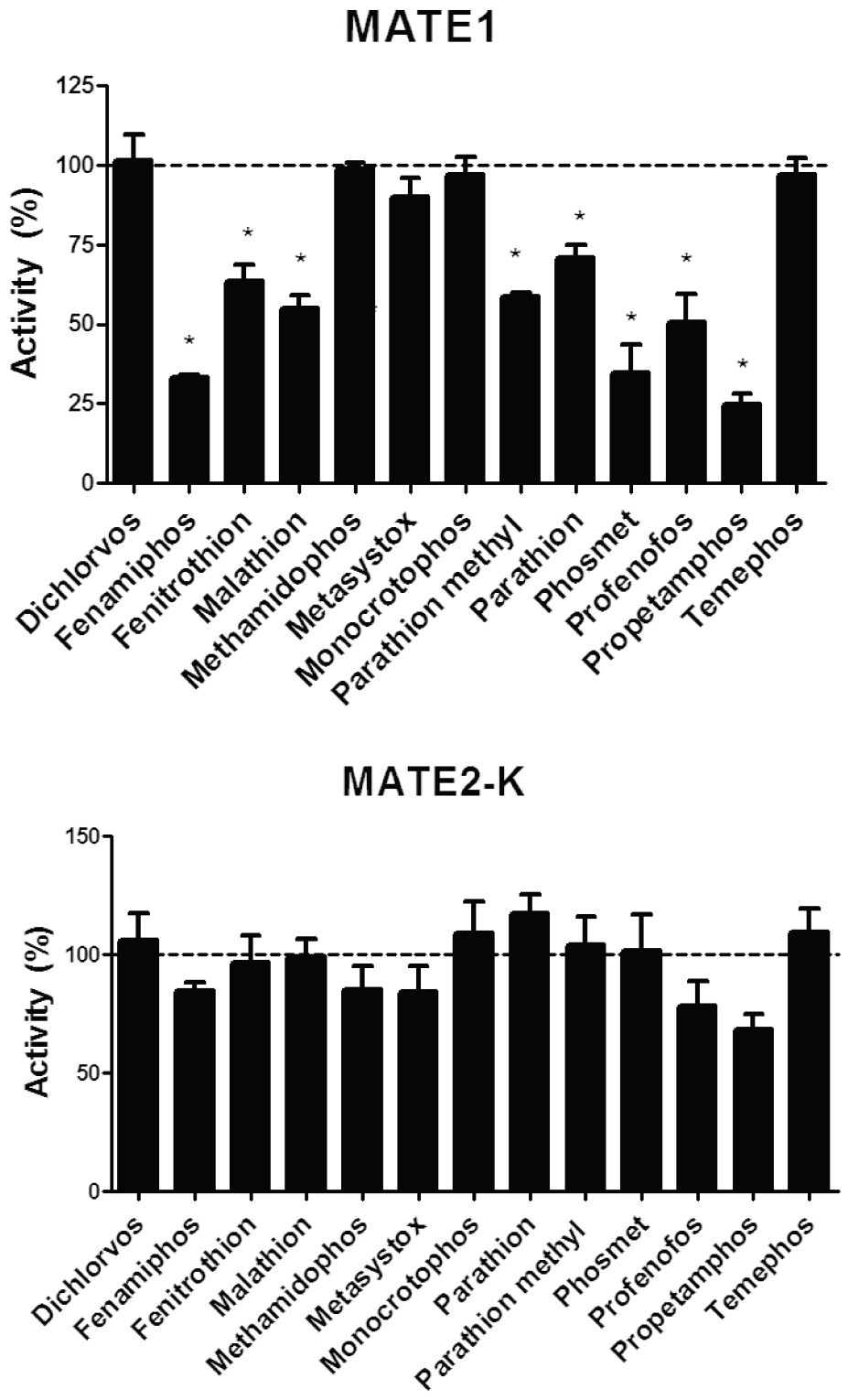

MATE1
Activity (%)
125
100
75
50
25
0
Dichlorvos
Fenamiphos
Fenitrothion
Malathion
Methamidophos
Metasystox
Monocrotophos
Parathion methyl
Parathion
Phosmet
Profenofos
Propetamphos
Temephos
MATE2-K
Activity (%)
150
100
50
0
Dichlorvos
Fenamiphos
Fenitrothion
Malathion
Methamidophos
Metasystox
Monocrotophos
Parathion
Parathion methyl
Phosmet
Profenofos
Propetamphos
Temephos

Fig. 4

846

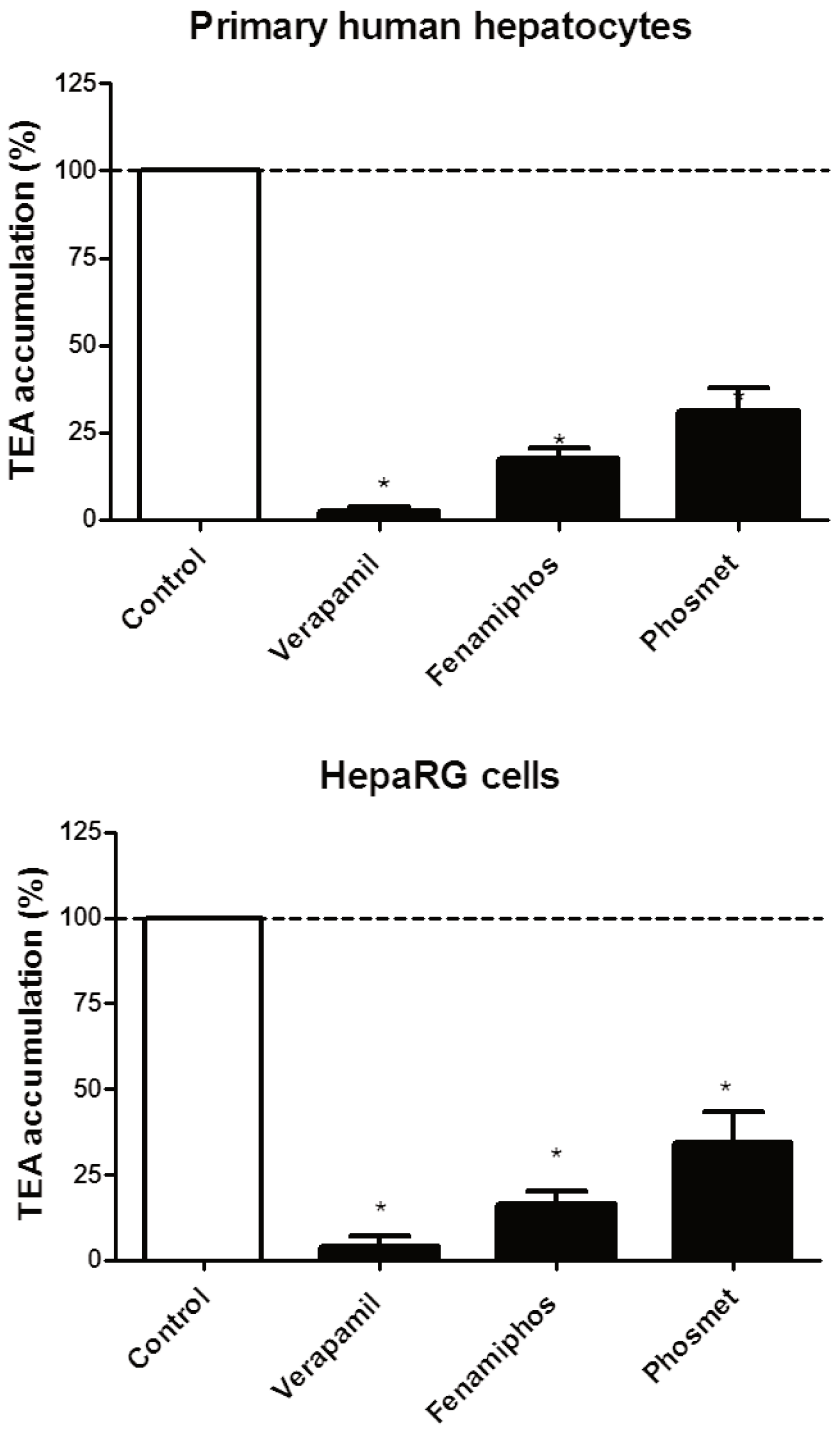

Primary human hepatocytes
TEA accumulation (%)
125
100
75
50
25
0
Control
Verapamil
Fenamiphos
Phosmet
HepaRG cells
TEA accumulation (%)
125
100
75
50
25
0
Control
Verapamil
Fenamiphos
Phosmet

Fig. 5

847

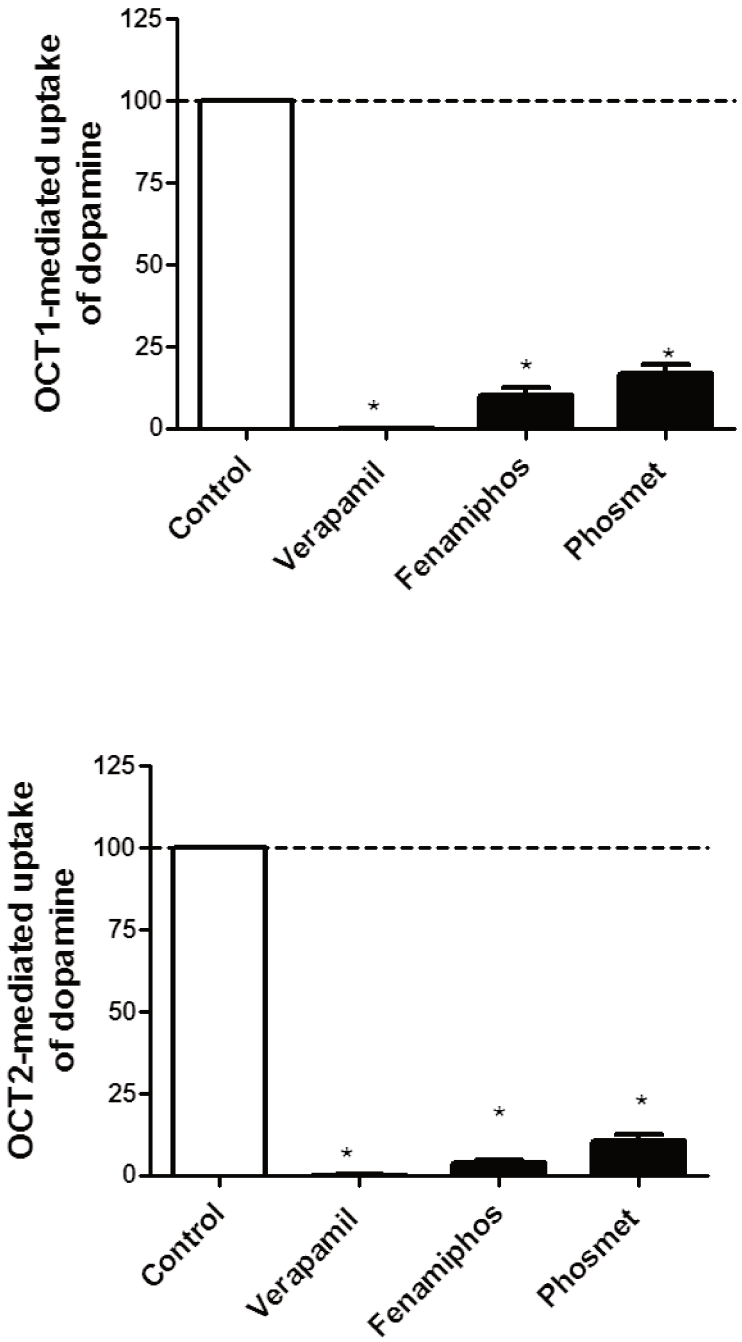

OCT1-mediated uptake of dopamine
125
100
75
50
25
0
*
*
*
Control
Verapamil
Fenamiphos
Phosmet
OCT2-mediated uptake of dopamine
125
100
75
50
25
0
*
*
*
Control
Verapamil
Fenamiphos
Phosmet

Fig. 6

848

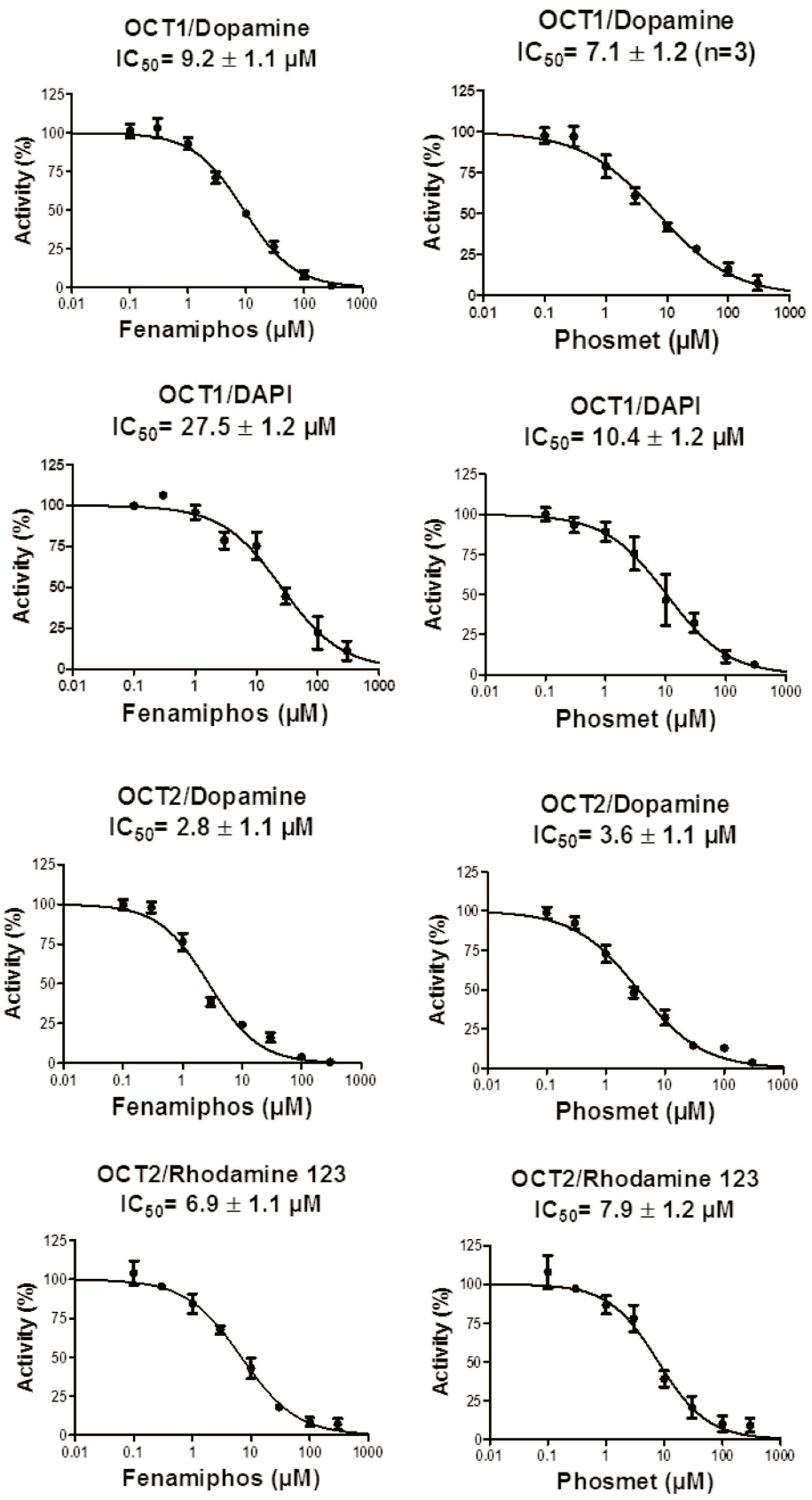

OCT1/Dopamine
IC50= 9.2 ± 1.1 µM
Activity (%)
Fenamiphos (µM)
OCT1/Dopamine
IC50= 7.1 ± 1.2 (n=3)
Activity (%)
Phosmet (µM)
OCT1/DAPI
IC50= 27.5 ± 1.2 µM
Activity (%)
Fenamiphos (µM)
OCT1/DAPI
IC50= 10.4 ± 1.2 µM
Activity (%)
Phosmet (µM)
OCT2/Dopamine
IC50= 2.8 ± 1.1 µM
Activity (%)
Fenamiphos (µM)
OCT2/Dopamine
IC50= 3.6 ± 1.1 µM
Activity (%)
Phosmet (µM)
OCT2/Rhodamine 123
IC50= 6.9 ± 1.1 µM
Activity (%)
Fenamiphos (µM)
OCT2/Rhodamine 123
IC50= 7.9 ± 1.2 µM
Activity (%)
Phosmet (µM)

Fig. 7

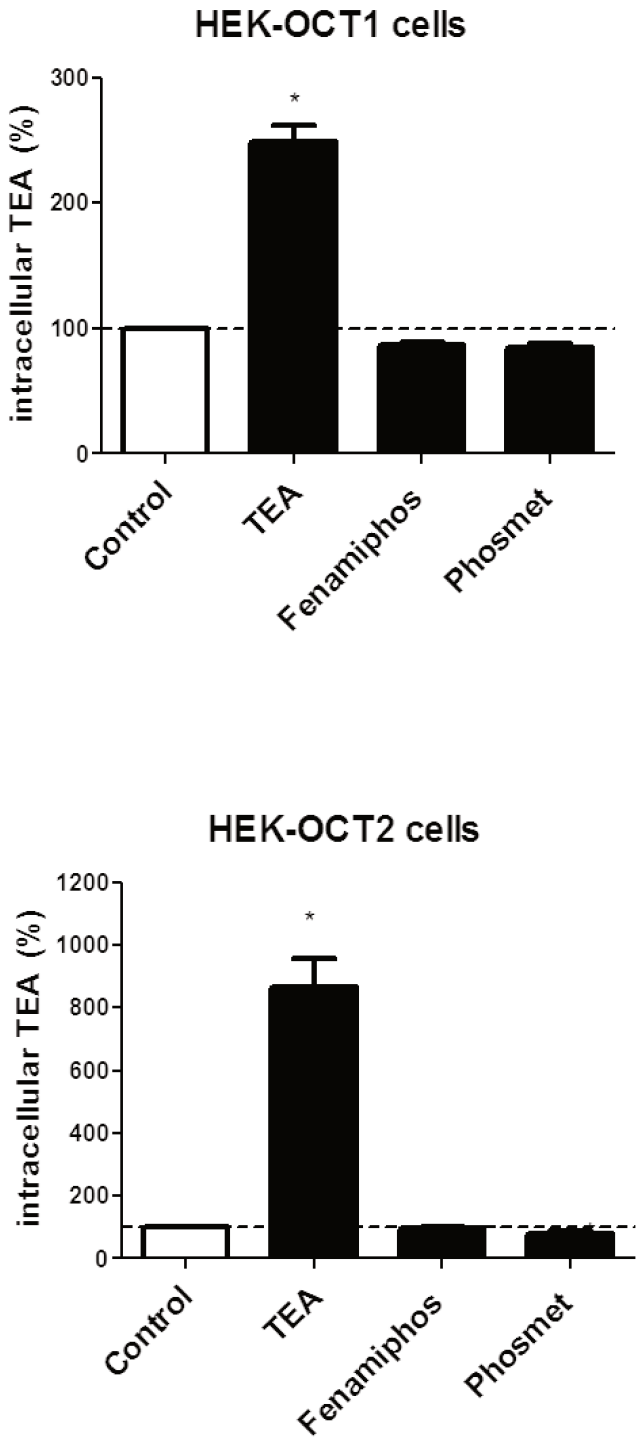

HEK-OCT1 cells
intracellular TEA (%)
300
200
100
0
*
Control
TEA
Fenamiphos
Phosmet
HEK-OCT2 cells
intracellular TEA (%)
1200
1000
800
600
400
200
0
*
Control
TEA
Fenamiphos
Phosmet

Fig. 8

851

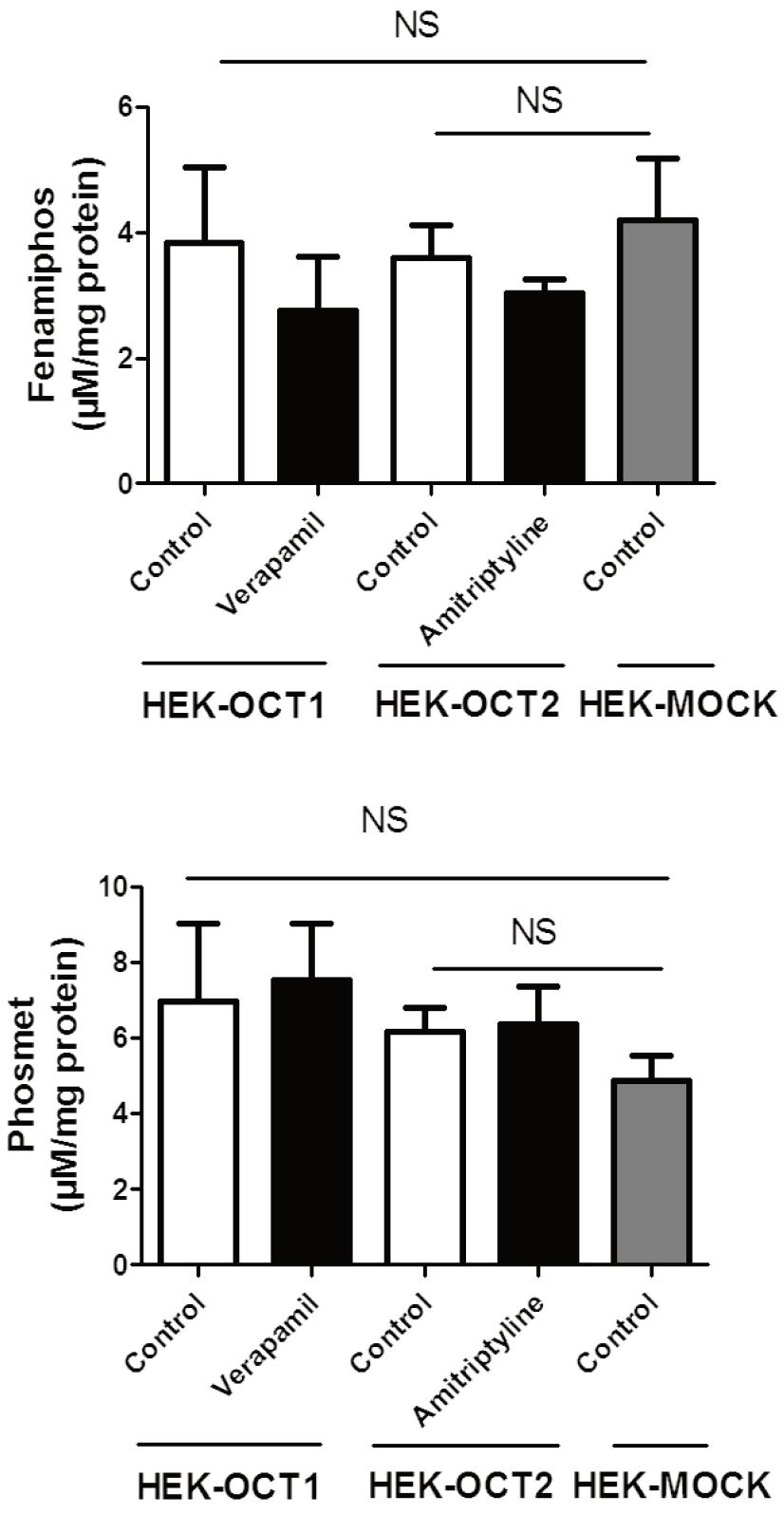

NS
NS
Fenamiphos (µM/mg protein)
6
4
2
0
Control
Verapamil
Control
Amitriptyline
Control
HEK-OCT1
HEK-OCT2
HEK-MOCK
NS
NS
Phosmet (µM/mg protein)
10
8
6
4
2
0
Control
Verapamil
Control
Amitriptyline
Control
HEK-OCT1
HEK-OCT2
HEK-MOCK

Fig. 9

852

853

854 **Supporting information**

855 **Table S1**

856 Summary of experimental conditions for transport assays used for analyzing potential *cis*-modulating
857 effects of OPs on SLC transporter activities

Transporter	Cell system	Substrate	Reference inhibitor	Incubation time
OAT1	HEK-OAT1 cells	Fluorescein (10 µM)	Probenecid (1 mM)	5 min
OAT3	HEK-OAT3 cells			
OATP1B1	HEK-OATP1B1 cells	E3S (3.4 nM)	Probenecid (2 mM)	
OATP2B1	HEK-OATP2B1 cells		Probenecid (10 mM)	
OCT1	HEK-OCT1 cells	DAPI (1 µM)	Verapamil (100 µM)	
		Dopamine (11 nM)		
	Primary human hepatocytes	TEA (29 µM)		
	HepaRG cells			
OCT2	HEK-OCT2 cells	Rhodamine 123 (1 µM)	Amitriptyline (100 µM)	
		Dopamine (11 nM)	Verapamil (100 µM)	
MATE1	HEK-MATE1 cells	TEA (29 µM)		
MATE2-K	HEK-MATE2-K cells		Verapamil (200 µM)	

858
859
860
861
862
863
864
865
866
867
868
869
870
871
872

873 **Table S2**

874 List of molecular descriptors discriminating OCT1/OCT2 inhibitors from non-inhibitors for OPs

Molecular descriptors discriminating OCT1/OCT2 inhibitors (n=8) among OPs (n=13)			P value
Name	Descriptor	Block	
IDDE	mean information content on the distance degree equality	Information indices	0.002
SpMAD_X	spectral mean absolute deviation from chi matrix	2D matrix-based descriptors	0.002
SpDiam_B(s)	spectral diameter from Burden matrix weighted by I-State	2D matrix-based descriptors	0.002
MATS1e	Moran autocorrelation of lag 1 weighted by Sanderson electronegativity	2D autocorrelations	0.002
GATS3m	Geary autocorrelation of lag 3 weighted by mass	2D autocorrelations	0.002
IC3	Information Content index (neighborhood symmetry of 3-order)	Information indices	0.003
IC4	Information Content index (neighborhood symmetry of 4-order)	Information indices	0.003
IC5	Information Content index (neighborhood symmetry of 5-order)	Information indices	0.003
MATS3m	Moran autocorrelation of lag 3 weighted by mass	2D autocorrelations	0.003
MATS4i	Moran autocorrelation of lag 4 weighted by ionization potential	2D autocorrelations	0.003
GATS1e	Geary autocorrelation of lag 1 weighted by Sanderson electronegativity	2D autocorrelations	0.003
GATS3p	Geary autocorrelation of lag 3 weighted by polarizability	2D autocorrelations	0.003
GATS4i	Geary autocorrelation of lag 4 weighted by ionization potential	2D autocorrelations	0.003
H3s	H autocorrelation of lag 3 / weighted by I-state	GETAWAY descriptors	0.003
Eig15_AEA(dm)	eigenvalue n. 15 from augmented edge adjacency mat. weighted by dipole moment	Edge adjacency indices	0.003
SM10_AEA(ri)	spectral moment of order 10 from augmented edge adjacency mat. weighted by resonance integral	Edge adjacency indices	0.004
Eig15_EA(ed)	eigenvalue n. 15 from edge adjacency mat. weighted by edge degree	Edge adjacency indices	0.004
SM08_AEA(dm)	spectral moment of order 8 from augmented edge adjacency mat. weighted by dipole moment	Edge adjacency indices	0.004

SM09_AEA(dm)	spectral moment of order 9 from augmented edge adjacency mat. weighted by dipole moment	Edge adjacency indices	0.004
SM09_AEA(ri)	spectral moment of order 9 from augmented edge adjacency mat. weighted by resonance integral	Edge adjacency indices	0.004
Eig14_EA	eigenvalue n. 14 from edge adjacency mat.	Edge adjacency indices	0.004
Eig15_EA	eigenvalue n. 15 from edge adjacency mat.	Edge adjacency indices	0.004
Eig14_EA(ed)	eigenvalue n. 14 from edge adjacency mat. weighted by edge degree	Edge adjacency indices	0.004
Eig14_EA(bo)	eigenvalue n. 14 from edge adjacency mat. weighted by bond order	Edge adjacency indices	0.004
Eig15_EA(bo)	eigenvalue n. 15 from edge adjacency mat. weighted by bond order	Edge adjacency indices	0.004
Eig14_EA(ri)	eigenvalue n. 14 from edge adjacency mat. weighted by resonance integral	Edge adjacency indices	0.004
Eig15_EA(ri)	eigenvalue n. 15 from edge adjacency mat. weighted by resonance integral	Edge adjacency indices	0.004
Eig14_AEA(bo)	eigenvalue n. 14 from augmented edge adjacency mat. weighted by bond order	Edge adjacency indices	0.004
Eig15_AEA(bo)	eigenvalue n. 15 from augmented edge adjacency mat. weighted by bond order	Edge adjacency indices	0.004
Eig14_AEA(dm)	eigenvalue n. 14 from augmented edge adjacency mat. weighted by dipole moment	Edge adjacency indices	0.004
Eig14_AEA(ri)	eigenvalue n. 14 from augmented edge adjacency mat. weighted by resonance integral	Edge adjacency indices	0.004
Eig15_AEA(ri)	eigenvalue n. 15 from augmented edge adjacency mat. weighted by resonance integral	Edge adjacency indices	0.004
HATS8v	leverage-weighted autocorrelation of lag 8 / weighted by van der Waals volume	GETAWAY descriptors	0.004
Eta_sh_x	eta x shape index	ETA indices	0.004
G2s	2nd component symmetry directional WHIM index / weighted by I-state	WHIM descriptors	0.004
HATS8u	leverage-weighted autocorrelation of lag 8 / unweighted	GETAWAY descriptors	0.004
HATS8e	leverage-weighted autocorrelation of lag 8 / weighted by Sanderson electronegativity	GETAWAY descriptors	0.004
HATS8p	leverage-weighted autocorrelation of lag 8 / weighted by polarizability	GETAWAY descriptors	0.004
HATS8i	leverage-weighted autocorrelation of lag 8 / weighted by ionization potential	GETAWAY descriptors	0.004

R8e	R autocorrelation of lag 8 / weighted by Sanderson electronegativity	GETAWAY descriptors	0.004
SpMax_AEA(ri)	leading eigenvalue from augmented edge adjacency mat. weighted by resonance integral	Edge adjacency indices	0.005
Eig01_AEA(ri)	eigenvalue n. 1 from augmented edge adjacency mat. weighted by resonance integral	Edge adjacency indices	0.005
SpPosA_X	normalized spectral positive sum from chi matrix	2D matrix-based descriptors	0.005
SpDiam_EA(ed)	spectral diameter from edge adjacency mat. weighted by edge degree	Edge adjacency indices	0.005
SpMax_AEA(ed)	leading eigenvalue from augmented edge adjacency mat. weighted by edge degree	Edge adjacency indices	0.005
Eig01_AEA(ed)	eigenvalue n. 1 from augmented edge adjacency mat. weighted by edge degree	Edge adjacency indices	0.005
ATSC5s	Centred Broto-Moreau autocorrelation of lag 5 weighted by I-state	2D autocorrelations	0.006
MATS4s	Moran autocorrelation of lag 4 weighted by I-state	2D autocorrelations	0.006
GATS3v	Geary autocorrelation of lag 3 weighted by van der Waals volume	2D autocorrelations	0.006
GGI5	topological charge index of order 5	2D autocorrelations	0.006
Mor27s	signal 27 / weighted by I-state	3D-MoRSE descriptors	0.006
ATS8s	Broto-Moreau autocorrelation of lag 8 (log function) weighted by I-state	2D autocorrelations	0.007
GATS8p	Geary autocorrelation of lag 8 weighted by polarizability	2D autocorrelations	0.007
GATS8i	Geary autocorrelation of lag 8 weighted by ionization potential	2D autocorrelations	0.007
Eta_sh_y	eta y shape index	ETA indices	0.007
SpMax_EA	leading eigenvalue from edge adjacency mat.	Edge adjacency indices	0.007
SM09_AEA(bo)	spectral moment of order 9 from augmented edge adjacency mat. weighted by bond order	Edge adjacency indices	0.007
Eig01_EA	eigenvalue n. 1 from edge adjacency mat.	Edge adjacency indices	0.007
TDB08u	3D Topological distance based descriptors - lag 8 unweighted	3D autocorrelations	0.007
HATS8m	leverage-weighted autocorrelation of lag 8 / weighted by mass	GETAWAY descriptors	0.007
R8m+	R maximal autocorrelation of lag 8 / weighted by mass	GETAWAY descriptors	0.007

R8v	R autocorrelation of lag 8 / weighted by van der Waals volume	GETAWAY descriptors	0.007
R8s	R autocorrelation of lag 8 / weighted by I-state	GETAWAY descriptors	0.007
SpMax_EA(ed)	leading eigenvalue from edge adjacency mat. weighted by edge degree	Edge adjacency indices	0.008
SM10_AEA(dm)	spectral moment of order 10 from augmented edge adjacency mat. weighted by dipole moment	Edge adjacency indices	0.008
Eig01_EA(ed)	eigenvalue n. 1 from edge adjacency mat. weighted by edge degree	Edge adjacency indices	0.008
Ges	Number of symmetry classes (based on electrotopological state)	Information indices	0.010
TDB08e	3D Topological distance based descriptors - lag 8 weighted by Sanderson electronegativity	3D autocorrelations	0.010
TDB08i	3D Topological distance based descriptors - lag 8 weighted by ionization potential	3D autocorrelations	0.010
TDB09s	3D Topological distance based descriptors - lag 9 weighted by I-state	3D autocorrelations	0.010
RDF070s	Radial Distribution Function - 070 / weighted by I-state	RDF descriptors	0.010
G2p	2nd component symmetry directional WHIM index / weighted by polarizability	WHIM descriptors	0.010
R8u	R autocorrelation of lag 8 / unweighted	GETAWAY descriptors	0.010
R8p	R autocorrelation of lag 8 / weighted by polarizability	GETAWAY descriptors	0.010
R8i	R autocorrelation of lag 8 / weighted by ionization potential	GETAWAY descriptors	0.010
R8s+	R maximal autocorrelation of lag 8 / weighted by I-state	GETAWAY descriptors	0.010
X3A	average connectivity index of order 3	Connectivity indices	0.011
IC2	Information Content index (neighborhood symmetry of 2-order)	Information indices	0.011
SIC5	Structural Information Content index (neighborhood symmetry of 5-order)	Information indices	0.011
SpDiam_B(m)	spectral diameter from Burden matrix weighted by mass	2D matrix-based descriptors	0.011
VE1sign_B(s)	coefficient sum of the last eigenvector from Burden matrix weighted by I-State	2D matrix-based descriptors	0.011
MATS1s	Moran autocorrelation of lag 1 weighted by I-state	2D autocorrelations	0.011

GATS4e	Geary autocorrelation of lag 4 weighted by Sanderson electronegativity	2D autocorrelations	0.011
GATS4p	Geary autocorrelation of lag 4 weighted by polarizability	2D autocorrelations	0.011
GATS3i	Geary autocorrelation of lag 3 weighted by ionization potential	2D autocorrelations	0.011
GATS4s	Geary autocorrelation of lag 4 weighted by I-state	2D autocorrelations	0.011
SpDiam_EA	spectral diameter from edge adjacency mat.	Edge adjacency indices	0.011
SpMax_EA(bo)	leading eigenvalue from edge adjacency mat. weighted by bond order	Edge adjacency indices	0.011
SpMAD_AEA(bo)	spectral mean absolute deviation from augmented edge adjacency mat. weighted by bond order	Edge adjacency indices	0.011
SM11_AEA(ri)	spectral moment of order 11 from augmented edge adjacency mat. weighted by resonance integral	Edge adjacency indices	0.011
Eig01_EA(bo)	eigenvalue n. 1 from edge adjacency mat. weighted by bond order	Edge adjacency indices	0.011
L2s	2nd component size directional WHIM index / weighted by I-state	WHIM descriptors	0.011
R3u	R autocorrelation of lag 3 / unweighted	GETAWAY descriptors	0.011
R7v	R autocorrelation of lag 7 / weighted by van der Waals volume	GETAWAY descriptors	0.011
R3e	R autocorrelation of lag 3 / weighted by Sanderson electronegativity	GETAWAY descriptors	0.011
R3i	R autocorrelation of lag 3 / weighted by ionization potential	GETAWAY descriptors	0.011
R8p+	R maximal autocorrelation of lag 8 / weighted by polarizability	GETAWAY descriptors	0.012
PW4	path/walk 4 - Randic shape index	Topological indices	0.013
SpMax_AEA(bo)	leading eigenvalue from augmented edge adjacency mat. weighted by bond order	Edge adjacency indices	0.013
Eig01_AEA(bo)	eigenvalue n. 1 from augmented edge adjacency mat. weighted by bond order	Edge adjacency indices	0.013
SpMax_EA(ri)	leading eigenvalue from edge adjacency mat. weighted by resonance integral	Edge adjacency indices	0.013
SpDiam_EA(ri)	spectral diameter from edge adjacency mat. weighted by resonance integral	Edge adjacency indices	0.013
Eig01_EA(ri)	eigenvalue n. 1 from edge adjacency mat. weighted by resonance integral	Edge adjacency indices	0.013

R8u+	R maximal autocorrelation of lag 8 / unweighted	GETAWAY descriptors	0.015
R8i+	R maximal autocorrelation of lag 8 / weighted by ionization potential	GETAWAY descriptors	0.015
SpMax_L	leading eigenvalue from Laplace matrix	2D matrix-based descriptors	0.016
SpMin1_Bh(m)	smallest eigenvalue n. 1 of Burden matrix weighted by mass	Burden eigenvalues	0.016
TDB08m	3D Topological distance based descriptors - lag 8 weighted by mass	3D autocorrelations	0.016
TDB08r	3D Topological distance based descriptors - lag 8 weighted by covalent radius	3D autocorrelations	0.016
RDF090m	Radial Distribution Function - 090 / weighted by mass	RDF descriptors	0.016
R8m	R autocorrelation of lag 8 / weighted by mass	GETAWAY descriptors	0.016
VE2sign_B(s)	average coefficient of the last eigenvector from Burden matrix weighted by I-State	2D matrix-based descriptors	0.018
CATS3D_02_AL	CATS3D Acceptor-Lipophilic BIN 02 (2.000 - 3.000 Å)	CATS 3D	0.018
SpMax_A	leading eigenvalue from adjacency matrix (Lovasz-Pelikan index)	2D matrix-based descriptors	0.019
SpDiam_A	spectral diameter from adjacency matrix	2D matrix-based descriptors	0.019
SpDiam_B(p)	spectral diameter from Burden matrix weighted by polarizability	2D matrix-based descriptors	0.019
ATSC5e	Centred Broto-Moreau autocorrelation of lag 5 weighted by Sanderson electronegativity	2D autocorrelations	0.019
MATS3p	Moran autocorrelation of lag 3 weighted by polarizability	2D autocorrelations	0.019
MATS4p	Moran autocorrelation of lag 4 weighted by polarizability	2D autocorrelations	0.019
SpDiam_EA(bo)	spectral diameter from edge adjacency mat. weighted by bond order	Edge adjacency indices	0.019
TDB07v	3D Topological distance based descriptors - lag 7 weighted by van der Waals volume	3D autocorrelations	0.019
TDB07r	3D Topological distance based descriptors - lag 7 weighted by covalent radius	3D autocorrelations	0.019
RDF055s	Radial Distribution Function - 055 / weighted by I-state	RDF descriptors	0.019
G3m	3rd component symmetry directional WHIM index / weighted by mass	WHIM descriptors	0.019

G2i	2nd component symmetry directional WHIM index / weighted by ionization potential	WHIM descriptors	0.019
H3e	H autocorrelation of lag 3 / weighted by Sanderson electronegativity	GETAWAY descriptors	0.019
CATS3D_05_AA	CATS3D Acceptor-Acceptor BIN 05 (5.000 - 6.000 Å)	CATS 3D	0.019
B04[C-S]	Presence/absence of C - S at topological distance 4	2D Atom Pairs	0.021
B04[C-P]	Presence/absence of C - P at topological distance 4	2D Atom Pairs	0.021
B05[C-O]	Presence/absence of C - O at topological distance 5	2D Atom Pairs	0.021
B06[C-C]	Presence/absence of C - C at topological distance 6	2D Atom Pairs	0.021
B06[C-O]	Presence/absence of C - O at topological distance 6	2D Atom Pairs	0.021
B07[C-C]	Presence/absence of C - C at topological distance 7	2D Atom Pairs	0.021
R8v+	R maximal autocorrelation of lag 8 / weighted by van der Waals volume	GETAWAY descriptors	0.023
SpMAD_L	spectral mean absolute deviation from Laplace matrix	2D matrix-based descriptors	0.023
ATSC8m	Centred Broto-Moreau autocorrelation of lag 8 weighted by mass	2D autocorrelations	0.023
GATS5s	Geary autocorrelation of lag 5 weighted by I-state	2D autocorrelations	0.023
TDB08v	3D Topological distance based descriptors - lag 8 weighted by van der Waals volume	3D autocorrelations	0.023
TDB08p	3D Topological distance based descriptors - lag 8 weighted by polarizability	3D autocorrelations	0.023
G2v	2nd component symmetry directional WHIM index / weighted by van der Waals volume	WHIM descriptors	0.023
HATS8s	leverage-weighted autocorrelation of lag 8 / weighted by I-state	GETAWAY descriptors	0.023
R8e+	R maximal autocorrelation of lag 8 / weighted by Sanderson electronegativity	GETAWAY descriptors	0.027
CATS3D_04_AL	CATS3D Acceptor-Lipophilic BIN 04 (4.000 - 5.000 Å)	CATS 3D	0.027
JGI7	mean topological charge index of order 7	2D autocorrelations	0.028
SpMin1_Bh(p)	smallest eigenvalue n. 1 of Burden matrix weighted by polarizability	Burden eigenvalues	0.028
SIC4	Structural Information Content index (neighborhood symmetry of 4-order)	Information indices	0.028
GATS1s	Geary autocorrelation of lag 1 weighted by I-state	2D autocorrelations	0.028
SpMAD_AEA(ri)	spectral mean absolute deviation from augmented edge adjacency mat. weighted by resonance integral	Edge adjacency indices	0.028
IC1	Information Content index (neighborhood symmetry of 1-order)	Information indices	0.030

SpMax_B(i)	leading eigenvalue from Burden matrix weighted by ionization potential	2D matrix-based descriptors	0.030
SM4_B(s)	spectral moment of order 4 from Burden matrix weighted by I-State	2D matrix-based descriptors	0.030
MATS3i	Moran autocorrelation of lag 3 weighted by ionization potential	2D autocorrelations	0.030
SpMin1_Bh(v)	smallest eigenvalue n. 1 of Burden matrix weighted by van der Waals volume	Burden eigenvalues	0.030
SpMAD_EA	spectral mean absolute deviation from edge adjacency mat.	Edge adjacency indices	0.030
TDB07p	3D Topological distance based descriptors - lag 7 weighted by polarizability	3D autocorrelations	0.030
RDF055u	Radial Distribution Function - 055 / unweighted	RDF descriptors	0.030
RDF055e	Radial Distribution Function - 055 / weighted by Sanderson electronegativity	RDF descriptors	0.030
RDF055i	Radial Distribution Function - 055 / weighted by ionization potential	RDF descriptors	0.030
Mor03u	signal 03 / unweighted	3D-MoRSE descriptors	0.030
Mor27e	signal 27 / weighted by Sanderson electronegativity	3D-MoRSE descriptors	0.030
Mor06s	signal 06 / weighted by I-state	3D-MoRSE descriptors	0.030
H3u	H autocorrelation of lag 3 / unweighted	GETAWAY descriptors	0.030
H4u	H autocorrelation of lag 4 / unweighted	GETAWAY descriptors	0.030
H4e	H autocorrelation of lag 4 / weighted by Sanderson electronegativity	GETAWAY descriptors	0.030
H3i	H autocorrelation of lag 3 / weighted by ionization potential	GETAWAY descriptors	0.030
H4i	H autocorrelation of lag 4 / weighted by ionization potential	GETAWAY descriptors	0.030
C-005	CH3X	Atom-centred fragments	0.031
F04[C-O]	Frequency of C - O at topological distance 4	2D Atom Pairs	0.033
CATS2D_02_AL	CATS2D Acceptor-Lipophilic at lag 02	CATS 2D	0.033
IVDE	mean information content on the vertex degree equality	Information indices	0.034
SpMax_B(v)	leading eigenvalue from Burden matrix weighted by van der Waals volume	2D matrix-based descriptors	0.034

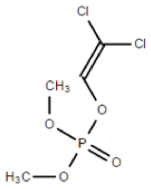
SpDiam_B(v)	spectral diameter from Burden matrix weighted by van der Waals volume	2D matrix-based descriptors	0.034
SpMax_B(e)	leading eigenvalue from Burden matrix weighted by Sanderson electronegativity	2D matrix-based descriptors	0.034
SpDiam_B(i)	spectral diameter from Burden matrix weighted by ionization potential	2D matrix-based descriptors	0.034
EE_B(s)	Estrada-like index (log function) from Burden matrix weighted by I-State	2D matrix-based descriptors	0.034
ATSC8s	Centred Broto-Moreau autocorrelation of lag 8 weighted by I-state	2D autocorrelations	0.034
JGI3	mean topological charge index of order 3	2D autocorrelations	0.034
CMBL	conjugated maximum bond length	Geometrical descriptors	0.037
G(N..S)	sum of geometrical distances between N..S	3D Atom Pairs	0.038
B08[C-N]	Presence/absence of C - N at topological distance 8	2D Atom Pairs	0.038
F02[C-N]	Frequency of C - N at topological distance 2	2D Atom Pairs	0.039
Eig07_AEA(dm)	eigenvalue n. 7 from augmented edge adjacency mat. weighted by dipole moment	Edge adjacency indices	0.040
R3e+	R maximal autocorrelation of lag 3 / weighted by Sanderson electronegativity	GETAWAY descriptors	0.040
F08[C-N]	Frequency of C - N at topological distance 8	2D Atom Pairs	0.041
T(N..S)	sum of topological distances between N..S	2D Atom Pairs	0.042
SM03_EA(dm)	spectral moment of order 3 from edge adjacency mat. weighted by dipole moment	Edge adjacency indices	0.044
SM05_EA(dm)	spectral moment of order 5 from edge adjacency mat. weighted by dipole moment	Edge adjacency indices	0.044
SM07_EA(dm)	spectral moment of order 7 from edge adjacency mat. weighted by dipole moment	Edge adjacency indices	0.044
SM09_EA(dm)	spectral moment of order 9 from edge adjacency mat. weighted by dipole moment	Edge adjacency indices	0.044
SM11_EA(dm)	spectral moment of order 11 from edge adjacency mat. weighted by dipole moment	Edge adjacency indices	0.044
SM13_EA(dm)	spectral moment of order 13 from edge adjacency mat. weighted by dipole moment	Edge adjacency indices	0.044
SM15_EA(dm)	spectral moment of order 15 from edge adjacency mat. weighted by dipole moment	Edge adjacency indices	0.044
JGI8	mean topological charge index of order 8	2D autocorrelations	0.044
F02[C-O]	Frequency of C - O at topological distance 2	2D Atom Pairs	0.044
CIC5	Complementary Information Content index (neighborhood symmetry of 5-order)	Information indices	0.045

ATSC1s	Centred Broto-Moreau autocorrelation of lag 1 weighted by I-state	2D autocorrelations	0.045
MATS5m	Moran autocorrelation of lag 5 weighted by mass	2D autocorrelations	0.045
MATS4e	Moran autocorrelation of lag 4 weighted by Sanderson electronegativity	2D autocorrelations	0.045
GATS4m	Geary autocorrelation of lag 4 weighted by mass	2D autocorrelations	0.045
GATS5e	Geary autocorrelation of lag 5 weighted by Sanderson electronegativity	2D autocorrelations	0.045
GATS5p	Geary autocorrelation of lag 5 weighted by polarizability	2D autocorrelations	0.045
GATS7i	Geary autocorrelation of lag 7 weighted by ionization potential	2D autocorrelations	0.045
GATS2s	Geary autocorrelation of lag 2 weighted by I-state	2D autocorrelations	0.045
SpMax5_Bh(v)	largest eigenvalue n. 5 of Burden matrix weighted by van der Waals volume	Burden eigenvalues	0.045
SpDiam_AEA(bo)	spectral diameter from augmented edge adjacency mat. weighted by bond order	Edge adjacency indices	0.045
QXXv	quadrupole x-component value / weighted by van der Waals volume	Geometrical descriptors	0.045
QXXp	quadrupole x-component value / weighted by polarizability	Geometrical descriptors	0.045
QXXs	quadrupole x-component value / weighted by I-state	Geometrical descriptors	0.045
TDB07m	3D Topological distance based descriptors - lag 7 weighted by mass	3D autocorrelations	0.045
TDB06v	3D Topological distance based descriptors - lag 6 weighted by van der Waals volume	3D autocorrelations	0.045
RDF065p	Radial Distribution Function - 065 / weighted by polarizability	RDF descriptors	0.045
Mor27u	signal 27 / unweighted	3D-MoRSE descriptors	0.045
Mor03i	signal 03 / weighted by ionization potential	3D-MoRSE descriptors	0.045
Mor26s	signal 26 / weighted by I-state	3D-MoRSE descriptors	0.045
L2u	2nd component size directional WHIM index / unweighted	WHIM descriptors	0.045
L2m	2nd component size directional WHIM index / weighted by mass	WHIM descriptors	0.045
L2i	2nd component size directional WHIM index / weighted by ionization potential	WHIM descriptors	0.045

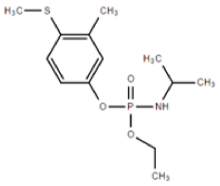
H3v	H autocorrelation of lag 3 / weighted by van der Waals volume	GETAWAY descriptors	0.045
Q2	total squared charge	Charge descriptors	0.045
PW5	path/walk 5 - Randic shape index	Topological indices	0.047
H8s	H autocorrelation of lag 8 / weighted by I-state	GETAWAY descriptors	0.047
Psi_i_t	intrinsic state pseudoconnectivity index - type T	Topological indices	0.047
ATSC8e	Centred Broto-Moreau autocorrelation of lag 8 weighted by Sanderson electronegativity	2D autocorrelations	0.048
P_VSA_MR_2	P_VSA-like on Molar Refractivity. bin 2	P_VSA-like descriptor	0.048
BIC5	Bond Information Content index (neighborhood symmetry of 5-order)	Information indices	0.048
VE1sign_Dt	coefficient sum of the last eigenvector from detour matrix	2D matrix-based descriptors	0.048
SpDiam_B(e)	spectral diameter from Burden matrix weighted by Sanderson electronegativity	2D matrix-based descriptors	0.048
VE2sign_B(p)	average coefficient of the last eigenvector from Burden matrix weighted by polarizability	2D matrix-based descriptors	0.048
SM5_B(s)	spectral moment of order 5 from Burden matrix weighted by I-State	2D matrix-based descriptors	0.048
VE2_B(s)	average coefficient of the last eigenvector (absolute values) from Burden matrix weighted by I-State	2D matrix-based descriptors	0.048
ATSC8v	Centred Broto-Moreau autocorrelation of lag 8 weighted by van der Waals volume	2D autocorrelations	0.048
TDB08s	3D Topological distance based descriptors - lag 8 weighted by I-state	3D autocorrelations	0.048
TDB10s	3D Topological distance based descriptors - lag 10 weighted by I-state	3D autocorrelations	0.048
RDF070m	Radial Distribution Function - 070 / weighted by mass	RDF descriptors	0.048

875

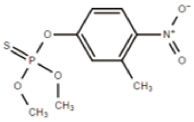
876



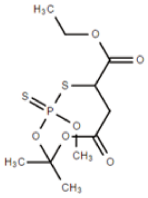
Dichlorvos



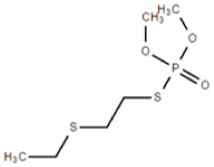
Fenamiphos



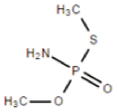
Fenitrothion



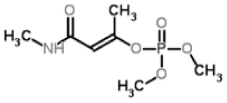
Malathion



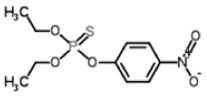
Metasystox



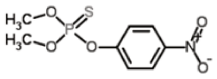
Methamidophos



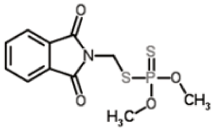
Monocrotophos



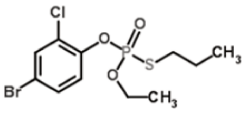
Parathion



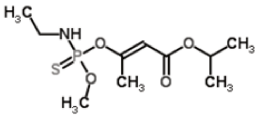
Parathion methyl



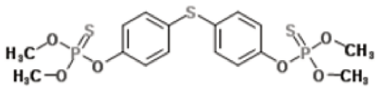
Phosmet



Profenofos



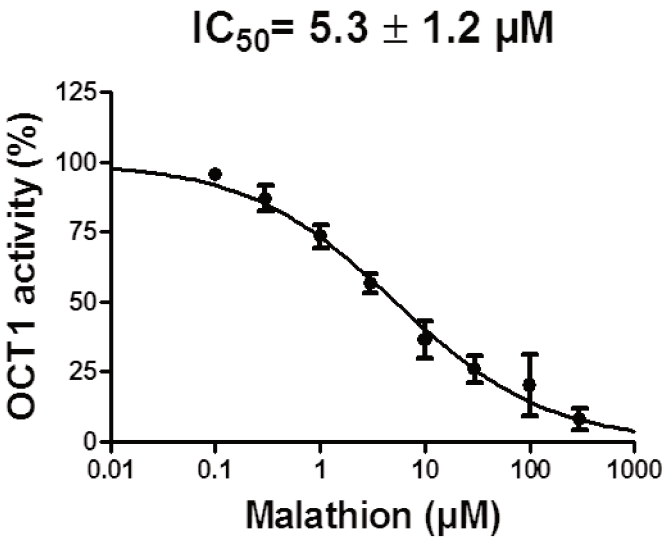
Propetamphos



Temefos

Fig. S1

877


IC50= 5.3 ± 1.2 µM
OCT1 activity (%)
125
100
75
50
25
0
0.01
0.1
1
10
100
1000
Malathion (µM)

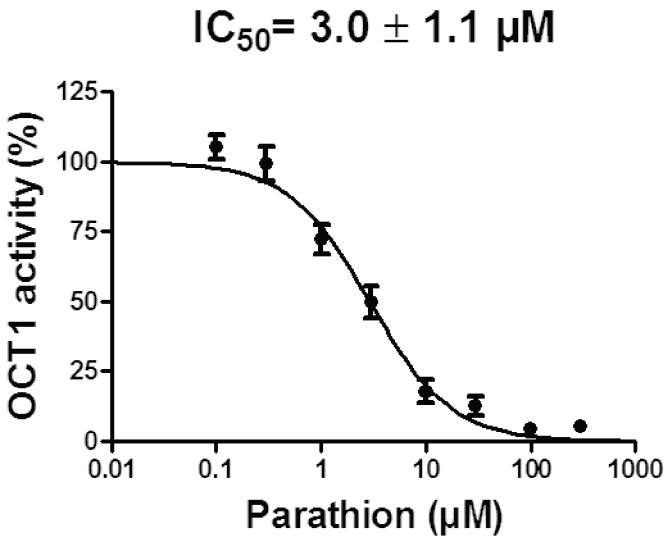

IC50= 3.0 ± 1.1 µM
OCT1 activity (%)
125
100
75
50
25
0
0.01
0.1
1
10
100
1000
Parathion (µM)

Fig. S2

878

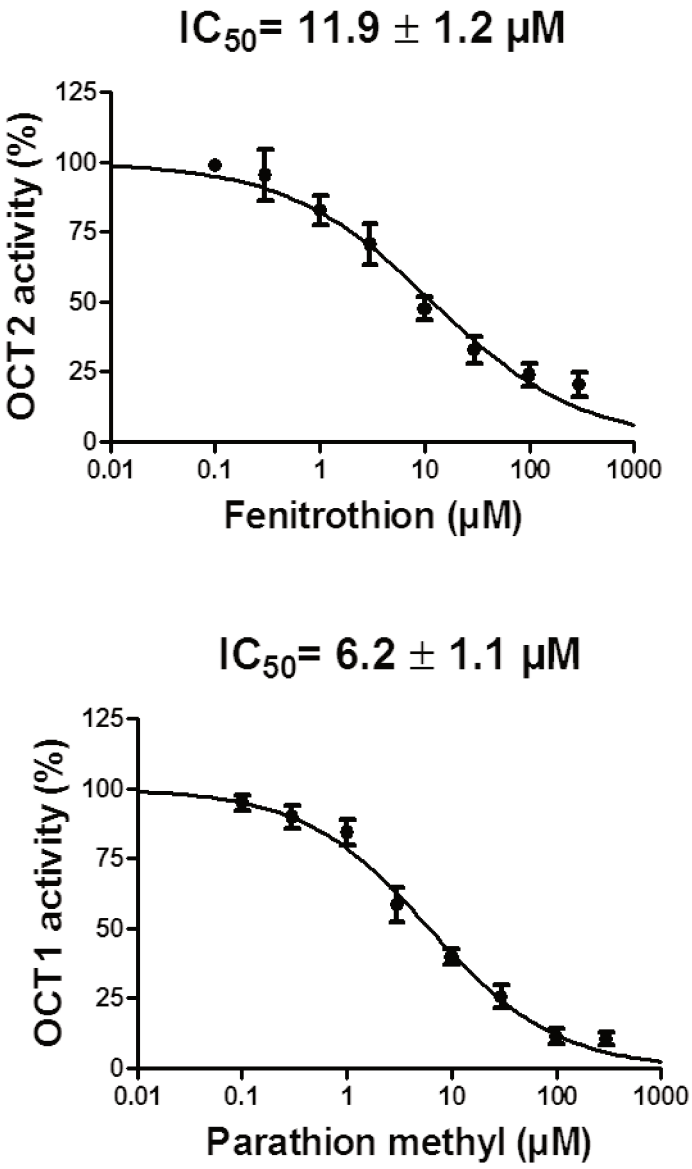

IC50= 11.9 ± 1.2 µM
OCT2 activity (%)
125
100
75
50
25
0
0.01
0.1
1
10
100
1000
Fenitrothion (µM)
IC50= 6.2 ± 1.1 µM
OCT1 activity (%)
125
100
75
50
25
0
0.01
0.1
1
10
100
1000
Parathion methyl (µM)

Fig. S3

879

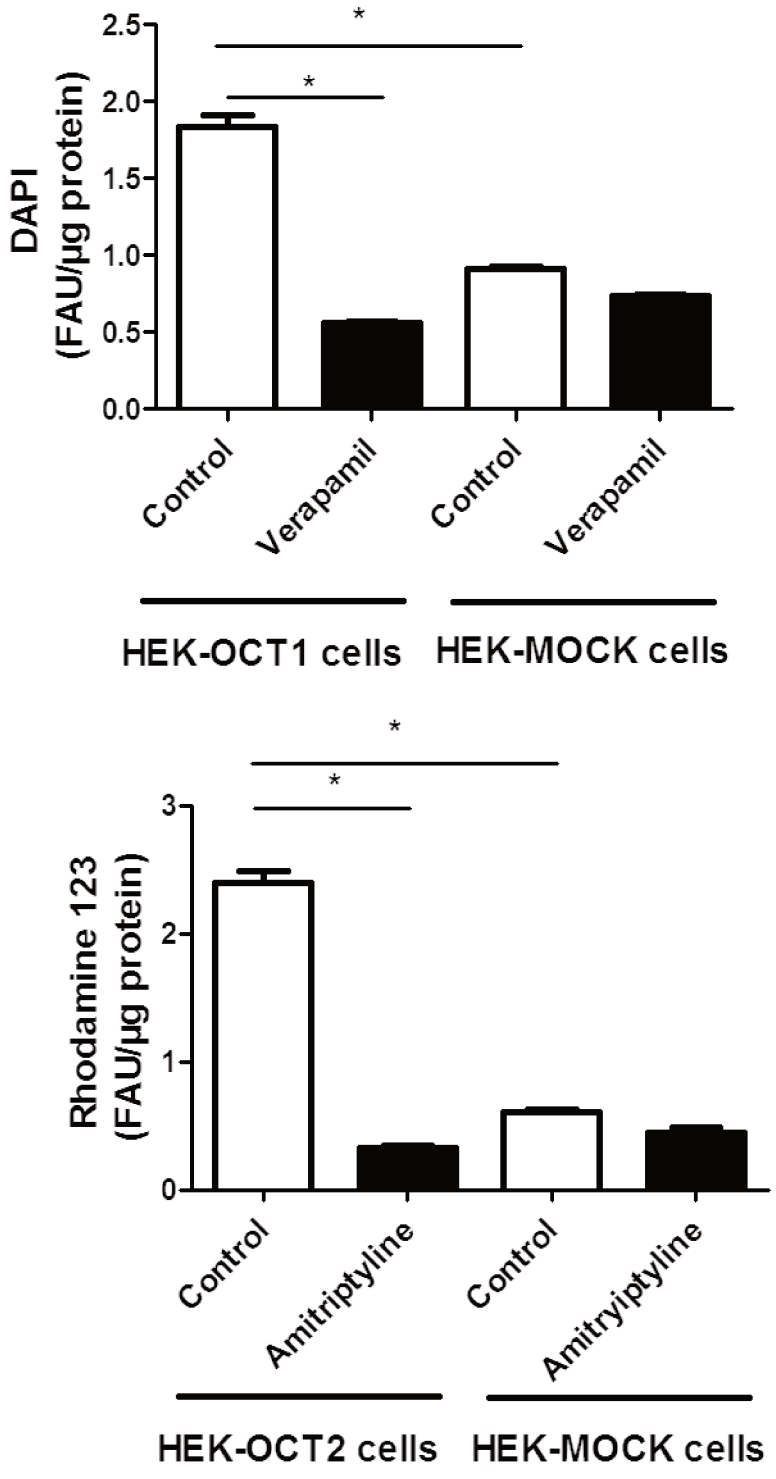

DAPI
(FAU/µg protein)
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
*
*
Control
Verapamil
Control
Verapamil
HEK-OCT1 cells
HEK-MOCK cells
Rhodamine 123
(FAU/µg protein)
3
2
1
0
*
*
Control
Amitriptyline
Control
Amitryiptyline
HEK-OCT2 cells
HEK-MOCK cells

Fig. S4

880

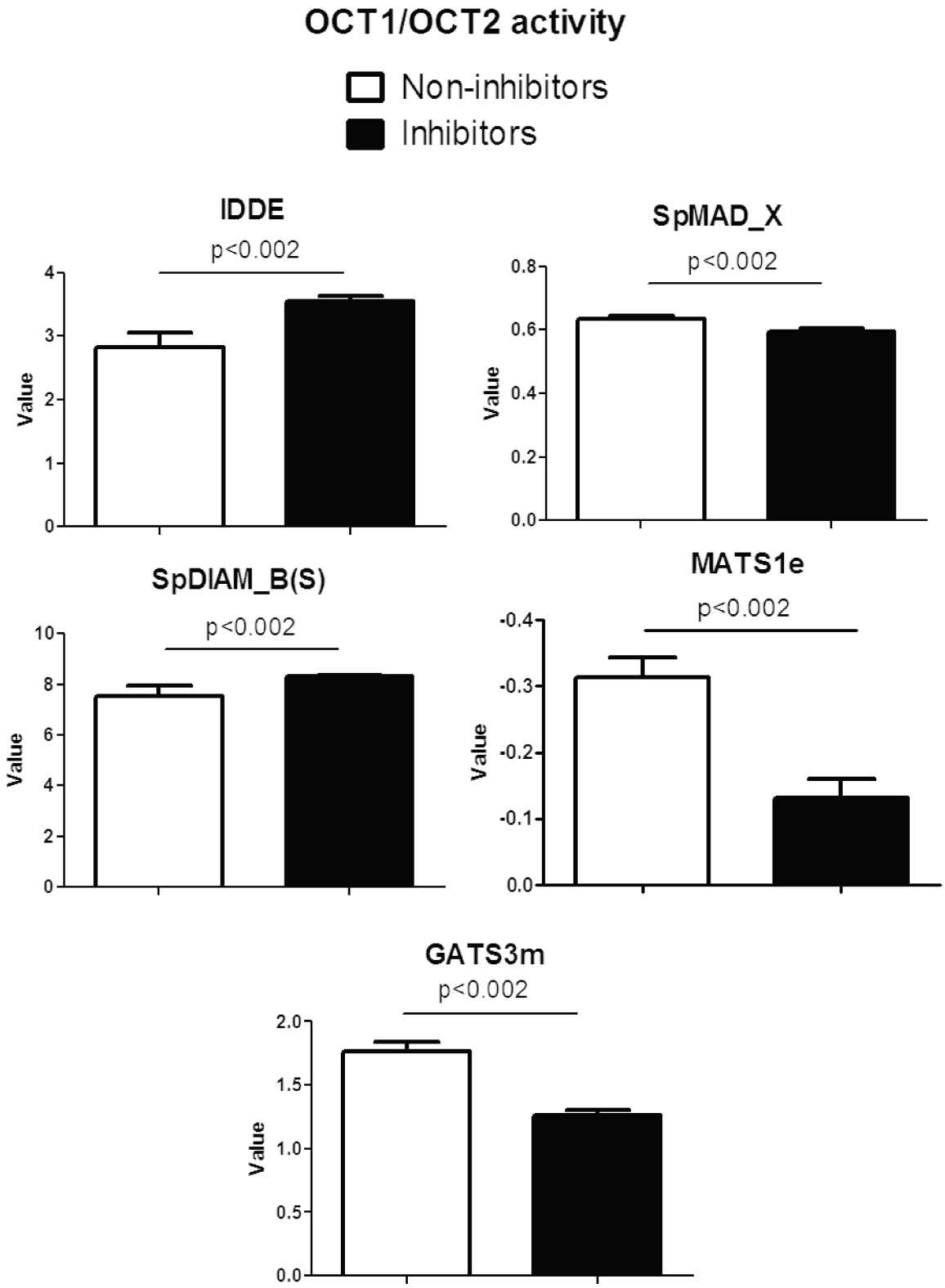

OCT1/OCT2 activity
Non-inhibitors
Inhibitors
IDDE
p<0.002
Value
SpMAD_X
p<0.002
Value
SpDIAM_B(S)
p<0.002
Value
MATS1e
p<0.002
Value
GATS3m
p<0.002
Value

Fig. S5

881

2. Résultats complémentaires

Interactions des organophosphorés avec le transporteur OCT3

Nous avons montré que les organophosphorés inhibaient fortement le transport médié par les transporteurs OCT1 et OCT2. Pour une vision plus complète des interactions de ces insecticides avec les transporteurs de cations OCTs, nous avons cherché à déterminer leurs effets sur l'activité d'un troisième transporteur de la famille SLC22A : le transporteur OCT3 (Figure 10).

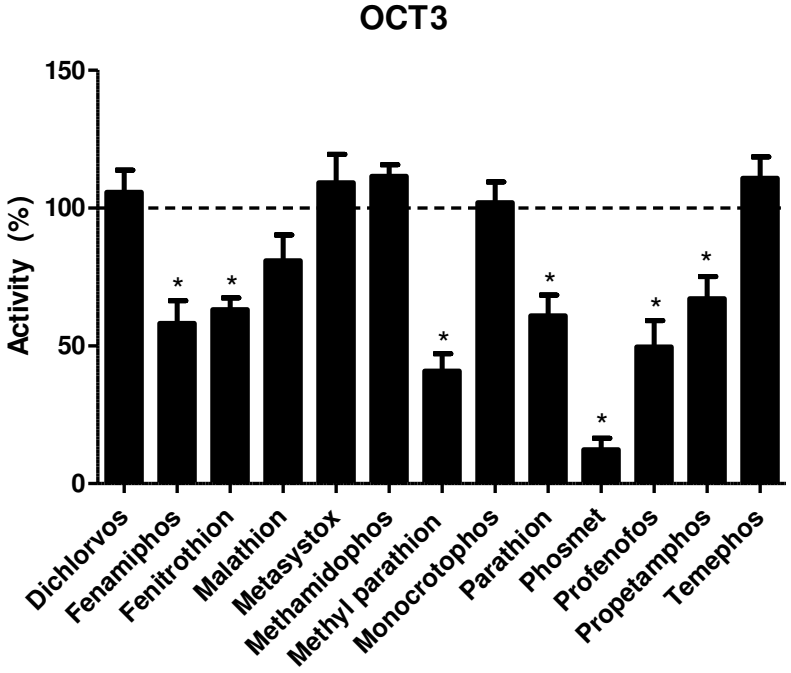


Figure 10: Effets des organophosphorés sur l'activité du transporteur OCT3. L'activité OCT3 a été determinée dans des cellules HEK-OCT3, en l'absence ou en présence d'inhibiteurs de références ou de composés organophosphorés utilisés à 100 µM (comme décrit dans le paragraphe « matériels et méthodes » du manuscript précédent intitulé «Interactions of organophosphorus pesticides with solute carrier (SLC) drug transporters »). Les données sont exprimées en pourcentages d'activités par rapport aux cellules non traitées (l'activité des cellules non traitée est fixée à 100% et indiquée par une ligne pointillée). Les données sont les moyennes ± erreur-type de la moyenne de trois expériences indépendantes, chacune effectuées en triplicate. Un effet statistiquement significatif est signalé par une * (seuil de significativité $p<0,05$).

Plusieurs organophosphorés inhibent l'activité OCT3, mais les effets sont moins marqués que pour les transporteurs OCT1 et OCT2. Seuls le parathion méthyl et le phosmet ont bloqués plus de 50% de l'activité du transporteur. Ces mêmes pesticides étaient à l'origine d'inhibitions puissantes d'OCT1 et d'OCT2, transporteurs de spécificité proche d'OCT3.

Interactions des organophosphorés avec les transporteurs ABC

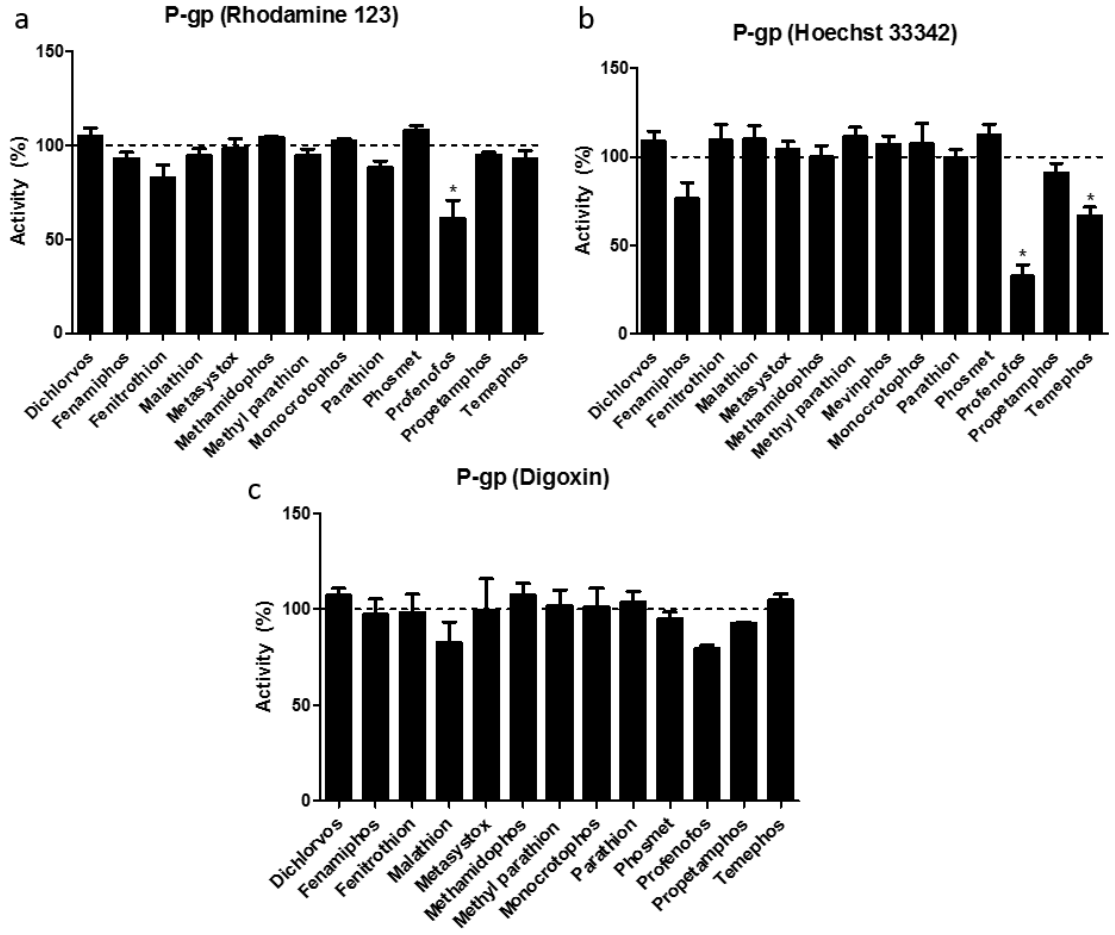
Pour la suite de notre étude, nous nous sommes interessés aux effets des organophosphorés sur les transporteurs ABC. Plusieurs études ont mises en évidence des interactions entre cette famille de transporteurs et les pesticides, mais peu de données sont disponibles dans la littérature concernant cette famille d'insecticides. Des travaux ont suggérés la prise en charge du diazinon et du parathion méthyl par la P-gp (458,481), du fenitrothion par MRP1 (461) et du parathion méthyl par mrp4 (481). La prise en charge de organophosphorés par BCRP est peu étudié, et son implication dans le transport d'insecticide de cette famille n'a été démontrée que pour un composé à notre connaissance, le chlorpyrifos, dans un modèle animal (480).

L'objectif de ces travaux était de caractériser les interactions potentielles de treize organophosphorés sur les transporteurs ABC et de définir les domaines d'interactions de certains d'entre eux avec la P-gp par une approche in silico dans le but de définir le mécanisme de ces interactions.

Effets des organophosphorés sur l'activité des transporteurs ABC

Nous avons mesuré les effets des treize composés organophosphorés sur l'activité de P-gp, BCRP et des MRPs en utilisant des lignées cellulaires surexprimant le transporteur d'intérêt (MCF7 pour P-gp, HEK293-BCRP pour BCRP et HUH7 pour les MRPs). Nous avons vérifié que les transporteurs ABC étudiés étaient bien fonctionnels ; les cellules surexprimant les transporteurs présentaient une accumulation (MCF7 et HUH7) ou une rétention (HEK293-BCRP) plus faibles de substrats de référence (la rhodamine 123, le Hoechst 33342 et la digoxine pour P-gp, le carboxy-2,7-dichlorofluorescéine (CF) pour les MRPs et le Hoechst 33342 pour BCRP), comparativement aux cellules natives et comme en partie précédemment décrit (544) (données non présentées). De plus, les inhibiteurs de référence de ces transporteurs (le vérapamil et le carvédilol pour P-gp, la FTC pour BCRP et le probénécide pour les MRPs), ont significativement augmenté l'accumulation ou la rétention intracellulaire du substrat de référence dans les cellules surexprimant les transporteurs ABC.

Concernant l'activité de la P-gp, la plupart des composés organophosphorés de l'étude n'ont pas altérer l'activité du transporteur à la dose de 100µM. Seul le profenofos inhibe significativement le transport de la rhodamine 123 médié par la P-gp (Figure 11a), le transport de Hoechst 33342 est bloqué par le profenofos (CI50 = 19,8 µM) et le temefos (Figure 11b et Figure 13a). Aucun composé organophosphoré n'a altéré le transport de la digoxine médié par la P-gp (Figure 11c).



931

932 Figure 11: L'activité de la P-gp a été déterminée dans des cellules MCF7R pour la prise en charge de trois
933 substrats: la rhodamine 123 (a), le Hoescht 33342 (b) et la digoxine (c), en l'absence ou en présence de pesticides
934 organophosphorés à 100 µM ou d'inhibiteurs de référence (vérapamil 50 µM, vérapamil 100 µM et carvédilol
935 100 µM, respectivement). Les données sont exprimées en pourcentages d'activités par rapport aux cellules non
936 traitées (l'activité des cellules non traitée est fixée à 100% et indiquée par une ligne pointillée). Les données sont
937 les moyennes ± erreur-type de la moyenne de trois expériences indépendantes, chacune effectuée en triplicate.
938 Un effet statistiquement significatif est signalé par une étoile (*) (seuil de significativité $p<0,05$).

939

940 En ce qui concerne l'activité de BCRP, plusieurs pesticides organophosphorés ont modérément, bien
941 que significativement, inhibé l'activité du transporteur, à l'exception du phosmet et du profenofos qui
942 ont bloqué plus de 50% du transport (Figure 12a). Les CI50 ont été déterminées pour les deux
943 composés (CI50 = 19,8 µM pour le profenofos Figure 13b et CI50 = 42,5 µM pour le phosmet (données
944 non présentées)). L'activité MRP s'est révélée modérément inhibée par plusieurs organophosphorés
945 utilisés à 100 µM.

Seul le profenofos a inhibé plus de 50% de l'activité du transporteur (Figure 12b) (CI50 = 41,3 µM) (Figure 13c).

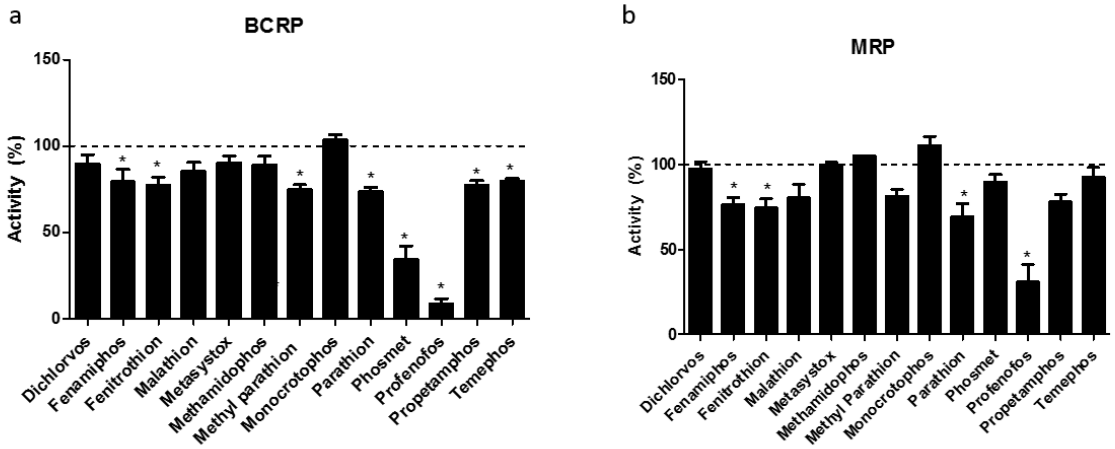
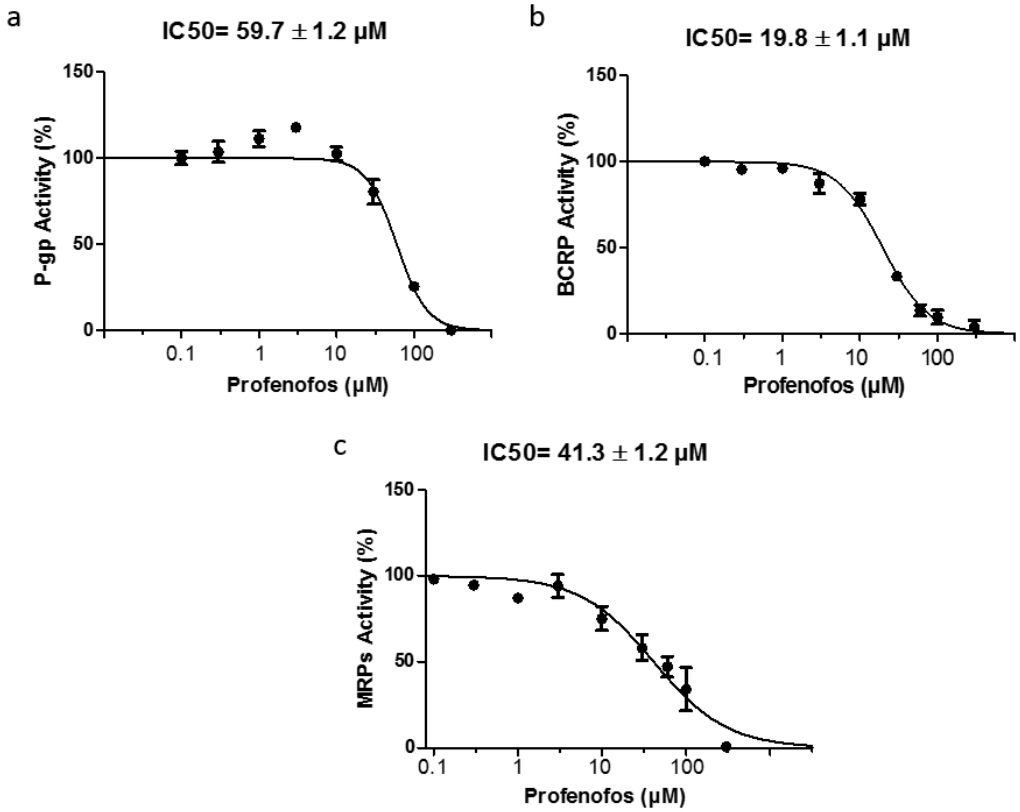


Figure 12: Les activités de BCRP (a) et de MRP (b) ont été déterminées respectivement dans des cellules HEK-BCRP et HUH7 en l'absence ou en présence de pesticides organophosphorés utilisés à 100 µM ou d'inhibiteurs de référence (FTC 10 µM et probénécide 4 mM pour BCRP er MRP, respectivement). Les données sont exprimées en pourcentages d'activité par rapport à celle des cellules non traitées (l'activité des cellules non traitée est fixée à 100% et indiquée par une ligne pointillée). Les données sont les moyennes ± erreur-type de la moyenne de trois expériences indépendantes, chacune effectuée en triplicate. Un effet statistiquement significatif est signalé par une étoile (*) (seuil de significativité $p<0,05$).

Le profenofos est l'organophosphoré le plus actif de notre étude vis à vis des activités des transporteurs ABC. Ce pesticide est capable d'inhiber spécifiquement le transport de Hoescht 33342 et de rhodamine médié par P-gp, mais est sans effet sur le transport de digoxine. De ce fait, nous avons entrepris de caractériser l'inhibition du profenofos vis-à-vis de la P-gp, plus spécifiquement de déterminer les résidus de la P-gp impliqués dans les interactions avec l'insecticide par une approche *in silico*.

969



970 Figure 13: Courbes doses-réponses des effets du profenofos sur le transport de Hoescht 33342 médié par P-gp
971 et BCRP et sur l'activité MRP. Les activités des transporteurs ABC ont été déterminées en l'absence ou en
972 présence de plusieurs concentrations d'organophosphorés (de 0,1 à 300 µM). Les données sont exprimées en
973 pourcentages d'activités par rapport aux cellules non traitées (l'activité des cellules non traitée est fixée
974 arbitrairement à 100%). Les données sont les moyennes ± erreur-type de la moyenne de trois expériences
975 indépendantes, chacune effectuée en triplicate.

976

977 **Etude d'amarrage moléculaire du profenofos sur la P-gp**

978 Un modèle structural de la P-gp a été généré par homologie en utilisant le serveur en ligne I-TASSER
979 (https://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/). Le modèle a été crée à partir de la séquence en
980 acides aminés du transporteur humain (identifiant UniProt P08183) et de structures de la PDB (Protein
981 Data Bank) https://www.rcsb.org/. Pour prendre en compte la diversité conformationnelle de la
982 protéine, cinq conformères ont été produits par analyses des cinq premiers modes normaux (NMA)
983 (http://www.sciences.univ-nantes.fr/elnemo/). Nous avons effectué des simulations d'amarrage
984 moléculaire (docking) de sept composés (ligands) sur ces six modèles structuraux de la P-gp avec le
985 logiciel YASARA (www.YASARA.org). Les ligands testés sont des substrats de P-gp (la rhodamine 123,

le Hoechst 33342, la digoxine, la doxorubicine), le profenofos et deux organophosphorés sans effet sur son activité (le dichlorvos et le monocrotophos).

A partir des résultats de simulations d'amarrage, la comparaison des fréquences de contacts entre chacun des ligands et les acides aminés de la protéine (Figure 14) permet de proposer que seuls les substrats de P-gp se lient au domaine de liaison à l'ATP, alors qu'aucun des pesticides testés ne se fixe à ce site.

Si l'on s'intéresse aux sites de liaison précédemment décrits dans la littérature (site M (Modulateur), site H (Hoechst 33342) et site R (Rhodamine123)), nos résultats montrent bien une liaison partielle de la rhodamine 123 aux résidus du site R mais le Hoechst 33342 ne cible aucun résidu présent sur le site H.

Les résidus présents aux environs de la position 350 interagissent avec tous les ligands testés. Les fréquences de contact sont importantes, plus particulièrement pour le profenofos, la digoxine et la doxorubicine. Ces résidus correspondent à la 6ème hélice transmembranaire formant les domaines H et M. Cette hélice est située à l'interface entre les deux domaines transmembranaires de la P-gp. En raison de sa localisation, les interactions avec cette hélice pourraient conduire à des changements importants de la conformation globale de la protéine ou modifier l'accessibilité à la poche formée entre les deux domaines transmembranaires.

En comparant la localisation des résidus interagissant avec le profenofos avec celles des deux autres pesticides non inhibiteurs (Figure 15), on constate que le dichlorvos et de monocrotophos s'accumulent au niveau de l'interface lipide/cytoplasme, alors que profenofos est principalement retrouvé dans les régions transmembranaires. De plus, les résidus de liaison au profenofos sont bien mieux répartis sur la région transmembranaire de la protéine, enfouie à l'intérieur de la P-gp et à l'interface protéine-lipides.

Du fait de sa pénétration plus profonde dans la membrane, le profenofos s'amarre à des résidus des trois sites H, M et R, alors que le dichlorvos et le monocrotophos sont seulement voisins des sites M et R. Cette observation est confortée par l'analyse du potentiel hydrophobe de surface et le logP du profenofos (LogP=4,7), bien supérieur à ceux du monocrotophos et du dichlorvos (LogP de respectivement -0,2 et 1,43) qui sont plus hydrophiles.

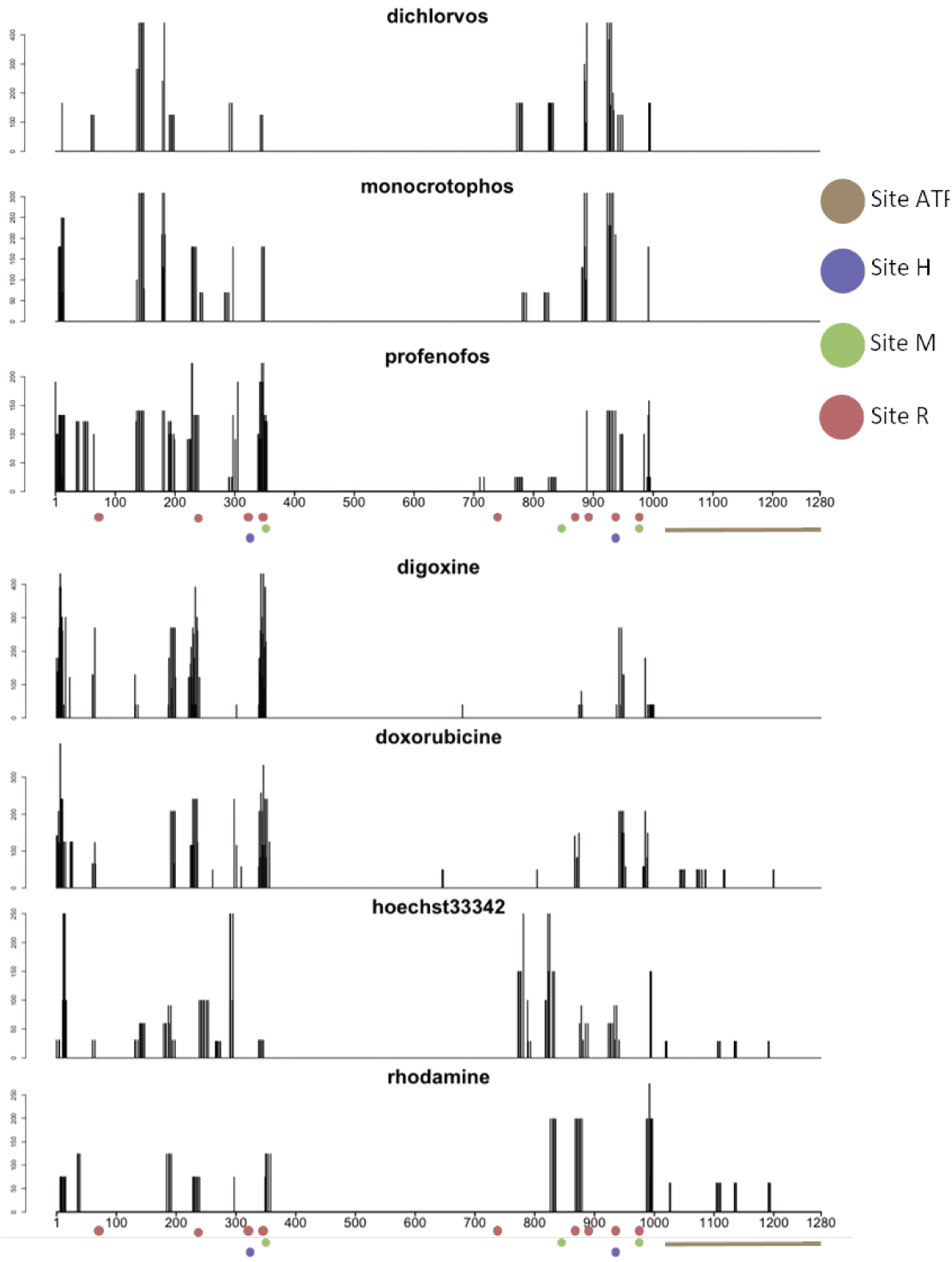


Figure 14: Fréquences absolues de contacts avec les résidus impliqués dans l'amarrage des composés sur la P-gp; L'axe horizontal représente la position dans la séquence le la P-gp; l'axe vertical représente les fréquences absolues de contacts

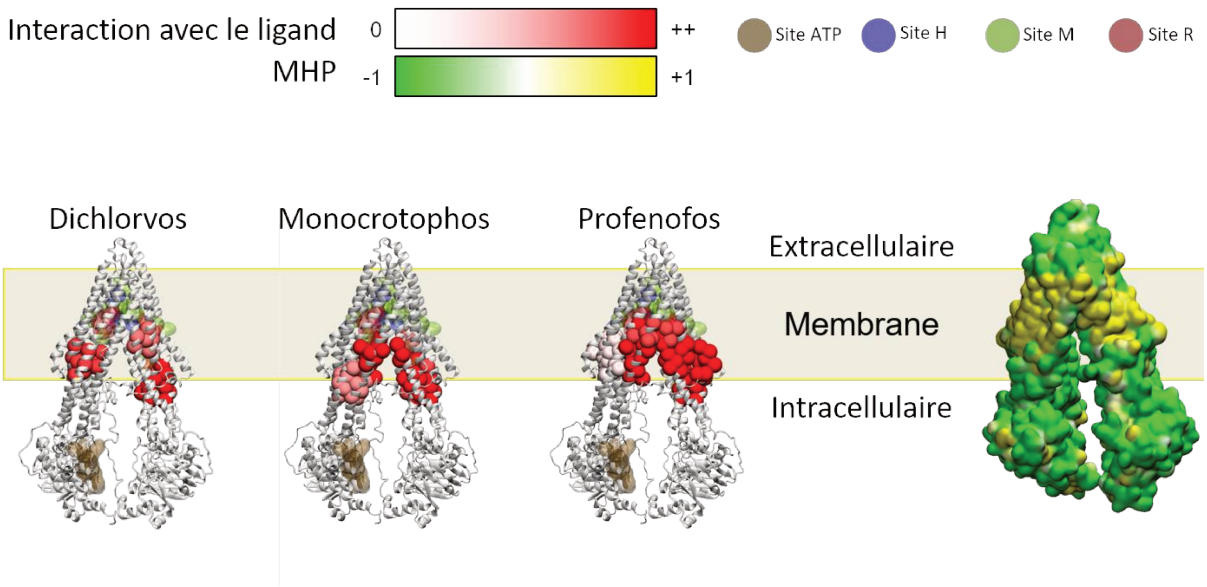


Figure 15 : Localisation spatiale des résidus au contact des ligands amarés sur la P-gp (de gauche à droite: dichlorvos, monocrotophos et profenofos); En beige, violet, vert et rose, les sites d'amarrages décrits dans la littérature (sites ATP, H, M et R respectivement); En dégradé de rouge : fréquence d'amarrage du ligand à la P-gp. A droite : Potentiel hydrophobe de surface (MHP : molecular hydrophoby potential) ; en blanc : régions amphiphiles; en vert : régions hydrophiles; en jaune : régions hydrophobes.

Pour comprendre l'effet spécifique du profenofos sur le transport de Hoechst 33342 ou de la rhodamine 123, nous avons effectué une analyse plus poussée des données de simulation d'amarrage. Nous avons transformé les fréquences de contact quantitatives en points de contact binaires par le filtrage des interactions énergétiquement peu favorables (Figure 16). Cette analyse a révélé six régions spécifiques à ces trois composés, absentes pour le dichlorvos, le monocrotophos, la doxorubicine et la digoxine.

Il en ressort deux groupes de trois contacts géométriquement proches, répartis symétriquement entre les deux domaines transmembranaires. Les trois premiers spots forment une grappe sur l'un des TMD, le troisième (autour des résidus 352 à 355) étant situé sur la sixième hélice, décrite précédemment comme à l'interface entre les deux TMD. Le résidu 190, sur la troisième hélice, est le plus enfoui dans la membrane et est proche de résidus du site H et R. Les trois derniers résidus sont localisés sur le second TMD. Le résidu 835, situé sur la neuvième hélice, se trouve à l'interface entre les deux TMD, opposé à l'hélice à laquelle appartiennent les résidus 352 à 355. C'est aussi le point le plus profond de la membrane, proche des résidus des sites H et M.

Ces résultats suggèrent un effet allostérique du profenofos sur l'inhibition du transport de la rhodamine 123 et du Hoechst 33342 par la P-gp.

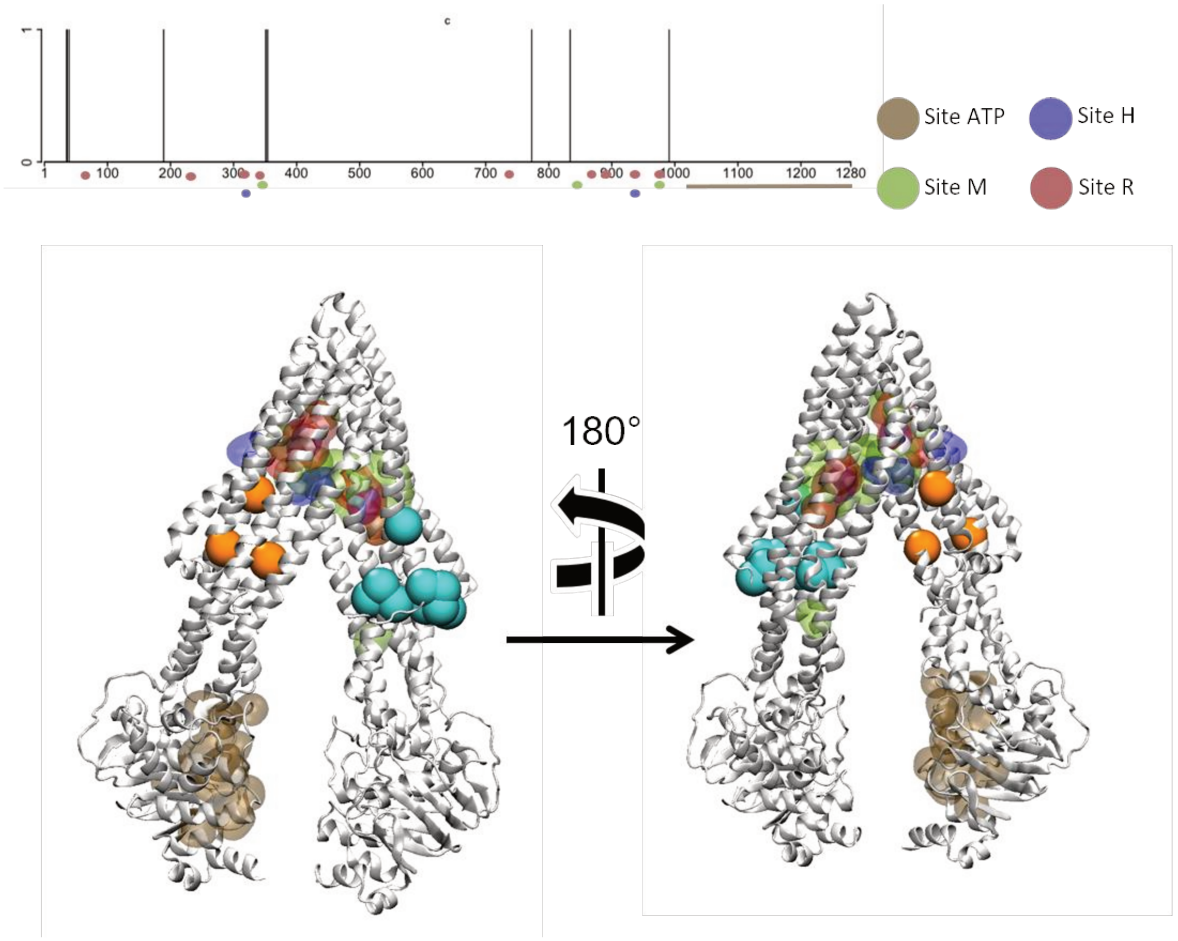


Figure 16 : Zones d'amarrages retrouvées chez le profenofos, la rhodamine 123 et le hoechst 33342 mais absentes pour la digoxine, la doxorubicine, le monocrotophos et le dichlorvos. En beige, violet, vert et rose : sites d'amarrages décrits dans la littérature (ATP, H, M et R respectivement). En turquoise : sites d'interactions N-terminaux; En orange : sites d'interactions C-terminaux

CHAPITRE IV : DISCUSSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES

De nombreux travaux ont montré que les xénobiotiques sont susceptibles d'interagir avec les transporteurs ABC et SLC. Néanmoins, la plupart des données de la littérature concerne les médicaments et peu d'études se sont intéressées à leurs interactions avec les contaminants environnementaux. L'objectif premier de notre étude était de caractériser les effets d'insecticides des familles des pyréthrinoïdes et des organophosphorés sur l'activité de transporteurs ABC et SLC prenant en charge des médicaments, et leurs potentielles contributions aux effets toxiques de ces pesticides.

Les insecticides de ces deux familles ont été peu étudiés du point de vue du transport, malgré leur présence démontrée dans la quasi-totalité des foyers (32). Nous avons montré que plusieurs pesticides des classes des organophosphorés et des pyréthrinoïdes étaient capables d'inhiber de nombreux transporteurs d'efflux (MRP, BCRP, P-gp) et d'influx (OATP1B1, OAT3, MATE1, OCT1-2) et de stimuler l'activité de certains transporteurs OATPs. Les effets des pesticides sur l'activité des transporteurs étaient relativement marqués, avec des CI50/CE50 de l'ordre du micromolaire, comme souvent obsrvés pour les médicaments modulant l'activité des transporteurs. Aucune étude ne s'était intéressée précédemment aux effets de l'alléthrine, de la tétraméthrine ou du phosmet, inhibiteurs puissants de notre étude, sur l'activité des transporteurs ABC et SLC.

Les effets que nous rapportons sont bien spécifiques de l'action directe des insecticides sur les transporteurs membranaires, un même pesticide présentant des effets différents (inhibiteurs, stimulateurs ou sans effet) et d'intensité variable selon l'activité mesurée et certains pesticides n'ayant aucun effet. De plus, ces résultats écartent l'existence d'un effet général de classe lié aux mécanismes d'actions de ces insecticides (actions sur les canaux sodiques des pyréthrinoïdes). De même, du fait des temps courts des mesures d'activité (5 min pour les transporteurs SLC, 30 à 90 min pour les transporteurs ABC), les effets que nous rapportons ne peuvent être dus à des altérations de l'expression des transporteurs par les pesticides testés.

Nos travaux montrent que les transporteurs de cations sont les plus impactés par les pyréthrinoïdes et organophosphorés utilisés dans notre étude. Plus spécifiquement, ce sont les activités OCT1 et OCT2 qui sont altérées par le plus grand nombre de pesticides, et présentent les inhibitions les plus importantes. Les transporteurs OCTs sont très exprimés au niveau du foie et du rein, mais également au niveau de la BHE. Ils prennent en charge de nombreux substrats endogènes comme les catécholamines et des substrats exogènes, comme des médicaments (metformine) ou des pesticides (paraquat). Les altérations du fonctionnement des OCTs observées dans notre étude pourraient donc avoir des conséquences néfastes en perturbant le transport de neurotransmetteurs, la pharmacocinétique de médicaments ou la toxicocinétique de polluants. C'est avec cela à l'esprit que nous avons pu démontrer que l'alléthrine, la tétraméthrine, le fenamiphos et le phosmet, pouvaient

bloquer le transport de la dopamine médié par les OCTs. Ces insecticides sont donc susceptibles d'altérer le transport de cette neuro-hormone, impliquée dans de nombreuses voies neurologiques, précurseur d'autres catécholamines (adrénaline, noradrénaline) et responsable de la libération d'hormones hypophysaires. Le blocage du transport de dopamine peut donc être mis en regard des effets neurologiques et perturbateurs endocriniens de ces familles de pesticides. Les effets inhibiteurs de ces transporteurs au niveau des organes détoxification (foie, rein) pourraient également engendrer des perturbations du métabolisme et de l'élimination de médicaments pris en charge par les OCTs (modifications d'aire sous courbe, demi-vie…), à l'origine d'effets indésirables ou d'interactions médicamenteuses. La prise en charge de ces insecticides par des transporteurs d'influx comme les OCTs pourrait avoir des conséquences dans la toxicocinétique de ces polluants ; toutefois, ces quatre pesticides ne sont, à priori, pas substrats de ces transporteurs de cations, comme l'indiquent nos expériences de trans-stimulations et les dosages effectués.

D'autre part, notre étude a mis en évidence des stimulations de l'activité de certains transporteurs d'anions, notamment le transporteur OATP2B1, cis-stimulé par l'alléthrine, la tétraméthrine, le fenamiphos, le malathion, le parathion, le phosmet et le profenofos. Ces stimulations d'activité peuvent potentiellement conduire à un passage accru des substrats d'OATP2B1 au niveau des entérocytes, des hépatocytes et de la BHE, sites d'expression du transporteur. Ce transporteur prend en charge notamment des hormones stéroïdiennes et thyroïdiennes et des médicaments comme les statines. Des stimulations d'activité de transporteurs ont déjà été rapportés dans la littérature, notamment pour MRP1-2, la P-gp et des OATPs (545–548). Plus particulièrement, Pizzagalli et al ont rapporté le même type d'effet avec une stimulation du transport d'estrone-3-sulfate médié par OATP2B1 par les prostaglandines A1 et A2 (546). Les données de la littérature indiquent que ces effets stimulateurs sont dépendants du substrat utilisé ; certaines études rapportent qu'un même composé peut être à l'origine d'un effet stimulateur du transport de rhodamine 123 médié par P-gp, tout en inhibant le transport du Hoechst 33342 (547). Ces effets sont probablement associés à la présence d'un ou plusieurs sites allostériques sur ces protéines de transport (P-gp, MRPs) (549). Les données actuelles sur les différents sites de fixations des transporteurs OATPs sont limitées mais s'accordent sur la présence d'au moins deux sites de fixation (404). Les insecticides à l'origine de stimulation d'activité se lient donc probablement à un site allostérique du transporteur OATP2B1 et pourraient être à l'origine d'effets, non pas stimulateurs mais inhibiteurs, du transport d'autres substrats que l'estrone-3-sulfate. Il serait, de fait, intéressant d'investiguer les effets de ces insecticides sur le transport d'autres substrats d'OATP2B1, et plus généralement d'identifier les déterminants structuraux permettant la liaison au(x) site(s) allostérique(s) du transporteur.

En ce qui concerne les effets des insecticides sur les transporteurs MATEs, nous avons montré des effets inhibiteurs de certains pyréthrinoïdes et organophosphorés sur l'activité MATE1 et nous n'avons observé aucun effet inhibiteur sur le transport médié par MATE2-K. Il convient de noter que nos expérimentations ont été faites à pH= 8,4, donc avec un gradient de protons dirigé vers l'extérieur de la cellule et donc un transporteur opérant en « influx », et non en efflux comme cela est observé au niveau rénal et hépatique. Ces résultats reposent sur l'hypothèse que ces transporteurs interagissent de la même manière avec leurs substrats quelque soit le domaine de la protéine exposée (domaines en contact avec le cytoplasme ou avec le milieu extracellulaire).

Les effets des insecticides observés dans notre étude sont vraisemblablement la conséquence d'interactions directes de ces pesticides avec les sites de liaisons de substrat ou des sites allostériques des protéines de transport. Toutefois, le mécanisme exact de ces modulations d'activité n'a pas été déterminé. Il est établi que certains inhibiteurs de l'activité des transporteurs peuvent agir de façon allostérique ou être eux même substrats et bloquer le transport médié par la protéine par un mécanisme compétitif ; c'est le cas par exemple du vérapamil, substrat et inhibiteur de P-gp.

A notre connaissance, seuls deux pesticides ont été montrés substrats d'OCTs dans la littérature: le cyperquat MPP+ (substrat OCT1-3) et le paraquat (substrat faible OCT1 et substrat OCT2) (412,513,515,531). Nos résultats indiquent que le fenamiphos et le phosmet ne sont pas substrats d'OCT1-2 et les expériences de trans-stimulation suggèrent que l'alléthrine et la tétraméthrine ne le sont pas non plus. Une approche directe (dosage) permettrait de valider cette hypothèse pour ces deux pyréthrinoïdes. De plus, la détermination des paramètres de Michaelis-Menten caractérisant les effets inhibiteurs observés sur l'activité OCT, permettrait de définir le mécanisme de ces interactions (compétitif, non compétitif, mixte).

Au-delà de l'approche *in vitro*, il serait tout à fait possible de construire un modèle par homologie des transporteurs OCT1 et OCT2 à partir de la structure cristallisée du symporteur glucose/H^+ de S.Epidermidis (identifiant pdb : 4LDS) (550). En effet, OCT1 et OCT2 ont respectivement 23% et 24% d'identité de séquences avec le transporteur bactérien, ce qui est suffisant pour déduire une structure tridimensionnelle (>10% d'identité) (551). Une approche par amarrage moléculaire pourrait permettre de définir des sites de liaisons des insecticides inhibiteurs, de déterminer leurs énergies de liaisons, et la proximité des résidus impliqués dans leurs interactions avec les sites de fixation du substrat. Cette approche a l'avantage de pouvoir être appliquée aux différents stéréoisomères de pyréthrinoïdes et d'organophosphorés en s'exemptant des problématiques de synthèse chimique de ces composés qui peut s'avérer complexe et couteuse.

En ce qui concerne les mécanismes des interactions du profenofos avec la P-gp, nos expérimentations de docking moléculaire mettent en évidence un profil énergétique très différent des substrats de la P-gp et une fixation sur un site proche des sites de substrats connus, ce qui suggère que ce pesticide n'est pas pris en charge par le transporteur. Cette hypothèse sera vérifiée par des mesures de dosages de l'accumulation intracellulaire du profenofos sur cellules MCF7R/S en présence ou en absence d'inhibiteurs de la P-gp.

La structure chimique proche des pyréthrinoïdes les plus inhibiteurs, appartenant à la même génération de synthèse, et partageant un même mécanisme toxicologique, nous a conduit à investiguer une éventuelle relation structure activité. Nos travaux ont mis en évidence des descripteurs moléculaires associés aux modulations d'activité des transporteurs par les insecticides, et la combinaison de plusieurs paramètres (MW/logP et %C/Mv) nous a permis de prédire avec succès les effets inhibiteurs de pyréthrinoïdes non testés dans la première partie de l'étude. La prise en compte de ces descripteurs devrait permettre de mieux comprendre les bases moléculaires des interactions des pesticides avec les transporteurs et gagneraient à être investigué dans de plus grosses séries de contaminants plus hétérogènes d'un point de vue structurale. D'autre part, les propriétés lipophiles de ces molécules laissent penser que la diffusion passive est un mode de passage important de ces pesticides, notamment au niveau intestinal. Des études de perméabilité à travers des monocouches de cellules intestinales ou des membranes lipidiques synthétiques, permettraient de déterminer la contribution de la diffusion passive et du transport actif dans leur passage des barrières biologiques.

Nos travaux ont montré des modulations doses-dépendantes de l'activité des transporteurs ABC et SLC par les pyréthrinoïdes et organophosphorés, avec des CI50 mesurées de l'ordre du micromolaire. Toutefois, il convient de noter que ces effets ne peuvent être généralisés à tous les composés de ces familles d'insecticides ou même à des sous-catégories (générations, types). La plupart des insecticides de notre étude possèdent également des carbones asymétriques ; les effets inhibiteurs observés pourraient être liés à l'action d'un isomère particulier et des études supplémentaires sont nécessaires pour déterminer la contribution des différents stéréo-isomères.

De plus, la modulation de l'activité des transporteurs par ces insecticides doit être mise en regard des niveaux d'imprégnation à ces contaminants de la population. L'intoxication aiguë intentionnelle ou accidentelle aux pyréthrinoïdes et aux organophosphorés peut donner lieu à des concentrations plasmatiques élevées. Les effets modulateurs des transporteurs, notamment l'altération de transport de catécholamines que nous avons mis en évidence, pourraient contribuer aux effets toxiques de ces pesticides. Dans le cadre d'une exposition chronique de la population générale à faibles doses, les concentrations en pesticides seront très inférieures. De plus, les pyréthrinoïdes et les

organophosphorés sont rapidement métabolisés et éliminés après absorption chez l'homme, ont des demi-vies courtes et s'accumulent pas ou peu dans l'organisme. De fait, les concentrations plasmatiques atteintes par ces contaminants sont faibles (de l'ordre du nanomolaire ou picomolaire), voire indétectables dans la population générale, et donc très inférieures aux concentrations requises pour moduler l'activité des transporteurs. Aussi, la relevance de ces effets et leur contribution à la toxicité des insecticides est peu probable dans le cadre d'une exposition chronique à faible dose. Il en va de même pour le risque d'interactions médicamenteuses avec des principes actifs médicamenteux pris en charge par ces transporteurs, qui peut être écarté du fait des concentrations atteintes chez l'homme.

Néanmoins, certains processus biologiques peuvent aboutir à la concentration de polluants environnementaux dans certains compartiments de l'organisme. L'alimentation étant la source d'exposition majoritaire aux pesticides, les concentrations de ces contaminants sont probablement les plus élevées au niveau du tractus gastro-intestinal, avant l'effet de premier passage hépatique ; ces polluants seraient donc susceptibles d'interagir avec des transporteurs entérocytaires présents au pôle apical (comme OATP2B1 ou OATP1A2). Nous avons également montré par une approche *in silico* que les organophosphorés et les pyréthrinoïdes traversent probablement l'épithélium intestinal par diffusion passive et pénètrent dans les entérocytes (552). S'ajoute à cela le fait que certains pesticides de ces familles subissent un cycle entérohépatique et sont mis au contact répété de la muqueuse intestinale. Il est toutefois difficile d'estimer leurs niveaux d'accumulation au sein des entérocytes et donc leurs potentielles interactions avec les transporteurs d'efflux intestinaux. Il en va de même pour les concentrations intra-hépatocytaires de ces contaminants à fort coefficient d'extraction hépatique, qui sont très difficilement estimables.

Il est aussi important de conserver à l'esprit que les formulations commerciales sont souvent constituées de mélanges complexes de pesticides et d'adjuvants ; la population est ainsi exposée à des pesticides (molécules mères, métabolites et produits de dégradation), de toutes catégories chimiques, présentes dans l'environnement. Ces combinaisons de pesticides peuvent avoir des effets additifs, antagonistes ou synergiques sur l'activité des transporteurs. Nos travaux ont mis en avant des effets synergiques de mélange binaire de pesticides organophosphorés sur l'activité du transporteur OCT2. Ces synergies à faibles doses pourraient conduire à des effets inhibiteurs à des concentrations en mélange inférieures à celles ayant un effet par les pesticides isolés, ces effets synergiques sont à prendre en compte pour appréhender les effets réels de l'exposition aux pesticides sur les transporteurs membranaires.

En dehors des pesticides, d'autres classes chimiques de contaminants environnementaux peuvent interagir avec les transporteurs (être pris en charge, moduler leur expression ou leur activité). La dioxine (2,3,7,8-tétrachlorodibenzo-p-dioxin), contaminant environnemental présent dans l'alimentation, a été montré modulateur de l'expression de nombreux transporteurs (P-gp, BCRP, MRPs, OCT1, OATP2B1, OATP1B3, OAT2, BSEP, NTCP) (536,553–555). De plus, certaines toxines produites par les champignons, contaminant les denrées alimentaires, sont substrats de BCRP, de MRPs, d'OATPs, d'OATs et d'OCTs (556–560). Notre équipe a également montré des effets inhibiteurs des bisphénols, ou encore des composants de la fumée de cigarette, sur les transporteurs SLC (561,562).

Très peu de travaux portent sur les effets des contaminants de l'environnement sur les transporteurs SLC dans la littérature. Un appel à des recherches systématiques sur les SLC a été passé dans le journal Cell par César-Razquin et al en 2015 (563) invitant la communauté scientifique a porter leur attention sur cette famille de transporteurs sous-étudiée et peu comprise en terme de fonctionnalité et de spécificité en comparaison d'autres familles de protéines d'envergure similaire.

De la même manière, les interactions des polluants avec les transporteurs ABC humains sont préoccupantes et mériteraient d'être examiné plus attentivement. Les recherches sur le sujet se focalisent essentiellement sur des polluants dont les effets toxiques sont supposés ou démontrés. Or, des contaminants environnementaux a priori inoffensifs pour l'homme, donc peu étudiés, pourraient bloquer ces transporteurs d'efflux et exposer les cellules à des polluants normalement efflués. Des effets sanitaires ou épidémiologiques inexpliqués pourraient être la manifestation clinique de ces aspects négligés des recherches en toxicologie.

Un autre aspect préoccupant réside dans le champ d'action des transporteurs ABC. En effet, de nombreux polluants environnementaux sont lipophiles et ont la faculté de diffuser passivement à travers les membranes. Nos travaux, s'attachant à prédire la diffusion passive de 338 pesticides de toutes classes, par une approche *in silico*, ont ainsi montré que la majorité des pesticides serait capables de diffuser à travers la barrière intestinale (552). Leur prise en charge par les transporteurs d'efflux est donc déterminante pour réduire leur biodisponibilité et leur accumulation dans l'organisme. Paradoxalement, de nombreuses études rapportent l'absence de prise en charge des polluants par P-gp, BCRP et les MRPs, notamment du fait de leur lipophilie excessive (voir « Partie III. Interactions entre pesticides et transporteurs membranaires »). De fait, les principaux facteurs conduisant à l'accumulation de contaminants chez l'homme comme le DDT, les PCB ou les PFA, sont leur persistance et leur perméabilité passive. Nos systèmes de détoxification biologiques ne sont peut-être pas adaptés à la prise en charge de ces contaminants relativement nouveaux. Si cette hypothèse

est vérifiée, l'évaluation de la diffusion passive et de la prise en charge des polluants par les transporteurs d'efflux, pourrait fournir un éclairage sur les composés susceptibles de s'accumuler chez l'homme, notamment sur leurs paramètres pharmacocinétiques. Ces données permettraient d'identifier des produits sensibles et de limiter l'imprégnation de la population mondiale à ces polluants. Les agences sanitaires, qui délivrent les autorisations de commercialisation notamment pour les pesticides, pourraient le cas échéant intégrer l'obligation de caractérisation des interactions avec les transporteurs dans leurs procédures d'évaluations. A noter que la FDA et l'EMA exigent déjà l'évaluation de la prise en charge des candidats médicaments par P-gp, BCRP, OATP1B1, OATP1B3, OAT1, OAT3 et OCT2.

En définitive, et en perspectives, il est sans doute nécessaire de caractériser davantage les potentielles interactions des transporteurs avec les pesticides (de différentes classe), et plus largement les contaminants de l'environnement, ainsi que leurs effets stéréospécifiques et combinatoires pour pouvoir estimer de façon plus fine leurs conséquences biologiques. La notion d'exposome, désignant la totalité des expositions à des facteurs environnementaux subis par une personne au cours de la vie, va dans le sens d'une vision plus holistique de ces problématiques environnementales. Cette caractérisation des effets des polluants sur les transporteurs membranaires est un vrai défi, complexifiée encore par la prise en compte des modulations d'expression des transporteurs par de nombreux polluants (voir « Partie III. Interactions entre pesticides et transporteurs membranaires ») et par les actions coordonnées (et parfois l'expression co-régulée) des enzymes métaboliques et des transporteurs. La question de l'exposition individuelle aux polluants se doit également de prendre en compte les sensibilités individuelles accrues de certaines personnes du à des polymorphismes dans les gènes codant les transporteurs. Ceux-ci peuvent n'avoir aucun effet sur la fonctionnalité des transporteurs mais ils peuvent parfois altérer leur expression ou leur fonction, et donc entrainer une sensibilité accrue à certains composés substrats ou inhibiteurs du transporteur.

.

CHAPITRE V : BIBLIOGRAPHIE

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. Fakoorziba MR, Eghbal F, Vijayan VA. Synergist efficacy of piperonyl butoxide with deltamethrin as pyrethroid insecticide on Culex tritaeniorhynchus (Diptera: Culicidae) and other mosquitoe species. Environ Toxicol. 2009 Feb;24(1):19–24.

4. Casida JE. Pest Toxicology: The Primary Mechanisms of Pesticide Action. Chem Res Toxicol. 2009 Apr 20;22(4):609–19.

5. Hobbiger F. The inhibition of acetylcholinesterase by organophosphorus compounds and its reversal. Proc R Soc Med. 1961 May;54:403–5.

6. Narahashi T. Modulation of nerve membrane sodium channels by chemicals. J Physiol (Paris). 1981 May;77(9):1093–101.

7. 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.

8. 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.

9. Bramley PM. Carotenoid biosynthesis: a target site for bleaching herbicides. Biochem Soc Trans. 1994 Aug;22(3):625–9.

10. 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.

11. 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.

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. G. C. Papavizas, N. R. O'Neill, and J. A. Lewis. Fungistatic Activity of Propyl-N-(y-dimethylaminopropyl) carbamate on Pythium spp. and its Reversal by Sterols. Phytopathology. 1978;1667–71.

14. 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 Hebd Seances Acad Sci Ser Sci Nat. 1978 Feb 6;286(5):427–9.

15. 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.

16. Richmond DV, Pring RJ. Some cytological effects of systemic fungicides on fungi and plants. Neth J Plant Pathol. 1977 Jan;83(S1):403–10.

17. 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.

18. European Union Pesticide Database [Internet]. Available from: http://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/eu-pesticides-database/public/?event=activesubstance.selection&language=EN

19. 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.

20. Müller G. History of the Discovery and Development of Triazine Herbicides. In: The Triazine Herbicides. 2008. p. 13–29.

21. Anses. Saisine n° 2015-SA-0093 Avis de l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail. 2016.

22. 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.

23. Morgan DP, Lin LI, Saikaly HH. Morbidity and mortality in workers occupationally exposed to pesticides. Arch Environ Contam Toxicol. 1980;9(3):349–82.

24. 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.

25. 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.

26. Observations et statistiques du Commissariat Général au Developpement Durable: Les pesticides les plus rencontrés dans les eaux. http://www.statistiques.developpement-durable.gouv.fr/lessentiel/ar/246/0/pesticides-plus-rencontres-eaux-continentales.html. 2017.

27. Observations et statistiques du Commissariat Général au Developpement Durable: Conformité des eaux continentales au regard des pesticides. http://www.statistiques.developpement-durable.gouv.fr/lessentiel/ar/246/0/conformite-eaux-continentales-regard-pesticides.html. 2017.

28. Observations et statistiques du Commissariat Général au Developpement Durable: Présence des pesticides dans les eaux en 2014. http://www.statistiques.developpement-durable.gouv.fr/lessentiel/ar/246/0/presence-pesticides-eaux-2014-evolution-depuis-2008.html. 2017.

29. 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.

30. 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.

31. Fabrice Marlière. Exploitation de la base de données « pesticides », Rapport Inéris, DRC – 08 – 79914 – 08782A. 2008.

32. Ghislaine Bouvier. Contribution à l'évaluation de la population francilienne aux pesticides. Thèse de Doctorat. Université René Descartes - Paris V; 2005.

33. 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.

34. 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.

35. European Food Safety Authority. The 2015 European Union report on pesticide residues in food. EFSA J. 2017 Apr;15(4).

36. Anses. Étude de l'alimentation totale française 2 (EAT 2) Tome 2 - Résidus de pesticides, additifs, acrylamide, hydrocarbures aromatiques polycycliques. Rapport d'expertise; 2011.

37. Tordoir WF, van Sittert NJ. Organochlorines. Toxicology. 1994 Jun;91(1):51–7.

38. 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.

39. 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.

40. 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.

41. 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.

42. Flaskos J. The developmental neurotoxicity of organophosphorus insecticides: A direct role for the oxon metabolites. Toxicol Lett. 2012 Feb;209(1):86–93.

43. Ryan AJ. The metabolism of pesticidal carbamates. CRC Crit Rev Toxicol. 1971 Sep;1(1):33–54.

44. Jeyaratnam J. Health problems of pesticide usage in the Third World. Br J Ind Med. 1985 Aug;42(8):505–6.

45. Chowdhary S, Bhattacharyya R, Banerjee D. Acute organophosphorus poisoning. Clin Chim Acta. 2014 Apr;431:66–76.

46. 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.

47. Kamel F, Hoppin JA. Association of Pesticide Exposure with Neurologic Dysfunction and Disease. Environ Health Perspect. 2004 Jun;112(9):950–8.

48. 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.

49. 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.

50. 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.

51. 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.

52. 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.

53. 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.

54. 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.

55. 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.

56. Le Couteur DG, McLean AJ, Taylor MC, Woodham BL, Board PG. Pesticides and Parkinson's disease. Biomed Pharmacother. 1999 Apr;53(3):122–30.

57. 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.

58. 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.

59. 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.

60. 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.

61. 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.

62. 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.

63. 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.

64. Semchuk KM, Love EJ, Lee RG. Parkinson's disease and exposure to agricultural work and pesticide chemicals. Neurology. 1992 Jul;42(7):1328–35.

65. 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.

66. 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.

67. 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.

68. 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.

69. 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.

70. 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.

71. 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.

72. 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.

73. 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.

74. 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.

75. 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.

76. 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.

77. 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.

78. Alavanja MCR, Bonner MR. Occupational pesticide exposures and cancer risk: a review. J Toxicol Environ Health B Crit Rev. 2012;15(4):238–63.

79. 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.

80. Monographies du CIRC sur l'évaluation des risques de cancérogénicité pour l'homme. [Internet]. Available from: http://monographs.iarc.fr/FR/Classification/index.php

81. Charlier C, Plomteux G. Effets perturbateurs endocriniens des pesticides organochlorés. Acta Clin Belg. 2002 Jan;57(sup1):2–7.

82. 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.

83. Casida JE. Pyrethrum flowers and pyrethroid insecticides. Environ Health Perspect. 1980 Feb;34:189–202.

84. Casida JE, Gammon DW, Glickman AH, Lawrence LJ. Mechanisms of selective action of pyrethroid insecticides. Annu Rev Pharmacol Toxicol. 1983;23:413–38.

85. Laskowski DA. Physical and chemical properties of pyrethroids. Rev Environ Contam Toxicol. 2002;174:49–170.

86. Soderlund DM. Pyrethroid-receptor interactions: stereospecific binding and effects on sodium channels in mouse brain preparations. Neurotoxicology. 1985;6(2):35–46.

87. Valentine WM. Toxicology of selected pesticides, drugs, and chemicals. Pyrethrin and pyrethroid insecticides. Vet Clin North Am Small Anim Pract. 1990 Mar;20(2):375–82.

88. Wakeling E, P. A, D. W. Pyrethroids and Their Effects on Ion Channels. In: Pesticides - Advances in Chemical and Botanical Pesticides [Internet]. InTech; 2012 [cited 2017 Oct 15]. Available from: http://www.intechopen.com/books/pesticides-advances-in-chemical-and-botanical-pesticides/pyrethroids-and-their-effects-on-ion-channels

89. Narahashi T. Nerve membrane Na+ channels as targets of insecticides. Trends Pharmacol Sci. 1992 Jun;13(6):236–41.

90. Shafer TJ, Meyer DA, Crofton KM. Developmental Neurotoxicity of Pyrethroid Insecticides: Critical Review and Future Research Needs. Environ Health Perspect. 2005 Feb;113(2):123–36.

91. Horton MK, Jacobson JB, McKelvey W, Holmes D, Fincher B, Quantano A, et al. Characterization of residential pest control products used in inner city communities in New York City. J Expo Sci Environ Epidemiol. 2011;21(3):291–301.

92. Grey CNB, Nieuwenhuijsen MJ, Golding J, ALSPAC Team. Use and storage of domestic pesticides in the UK. Sci Total Environ. 2006 Sep 15;368(2–3):465–70.

93. Jorgenson BC, Young TM. Formulation Effects and the Off-target Transport of Pyrethroid Insecticides from Urban Hard Surfaces. Environ Sci Technol. 2010 Jul 1;44(13):4951–7.

94. Kumar S, Thomas A, Pillai MK. Involvement of mono-oxygenases as a major mechanism of deltamethrin-resistance in larvae of three species of mosquitoes. Indian J Exp Biol. 1991 Apr;29(4):379–84.

95. McALISTER LC, Jones HA, Moore DH. Piperonyl butoxide with pyrethrins in wettable powders to control certain agricultural and household insects. J Econ Entomol. 1947 Dec;40(6):906–9.

96. Becker K, Seiwert M, Angerer J, Kolossa-Gehring M, Hoppe H-W, Ball M, et al. GerES IV pilot study: assessment of the exposure of German children to organophosphorus and pyrethroid pesticides. Int J Hyg Environ Health. 2006 May;209(3):221–33.

97. Eadsforth CV, Bragt PC, van Sittert NJ. Human dose-excretion studies with pyrethroid insecticides cypermethrin and alphacypermethrin: relevance for biological monitoring. Xenobiotica Fate Foreign Compd Biol Syst. 1988 May;18(5):603–14.

98. 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.

99. Miyamoto J. Degradation, metabolism and toxicity of synthetic pyrethroids. Environ Health Perspect. 1976 Apr;14:15–28.

100. 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.

101. 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.

102. 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.

103. 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.

104. 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.

105. CDC, Centers for Disease Control and Prevention. Fourth National Report on Human Exposure to Environmental Chemicals. Atlanta; 2009.

106. Egerer, E., Rossbach, B., Muttray, A., Schneider, M., and Letzel, S. Biomonitoring of pyrethroid metabolites in environmental medicine. Umweltmed Forsh Prax. 2004;

107. Fortin M-C, Bouchard M, Carrier G. Comparaison de l'excrétion urinaire de biomarqueurs d'exposition aux pyrethrinoïdes et aux pyréthrines chez les résidents de régions urbaine et rurale de la Province de Québec, Canada. Rev Dépidémiologie Santé Publique. 2009 Dec;57(6):395–401.

108. 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.

109. Coats JR, Symonik DM, Bradbury SP, Dyer SD, Timson LK, Atchison GJ. Toxicology of synthetic pyrethroids in aquatic organisms: An overview. Environ Toxicol Chem. 1989 Aug 1;8(8):671–9.

110. Kaneko H. Pyrethroids: mammalian metabolism and toxicity. J Agric Food Chem. 2011 Apr 13;59(7):2786–91.

111. Warmke JW, Reenan RA, Wang P, Qian S, Arena JP, Wang J, et al. Functional expression of Drosophila para sodium channels. Modulation by the membrane protein TipE and toxin pharmacology. J Gen Physiol. 1997 Aug;110(2):119–33.

112. US Environmental Protection Agency. Pyrethroid cumulative risk assessment. 2011.

113. Soderlund DM, Clark JM, Sheets LP, Mullin LS, Piccirillo VJ, Sargent D, et al. Mechanisms of pyrethroid neurotoxicity: implications for cumulative risk assessment. Toxicology. 2002 Feb 1;171(1):3–59.

114. Gammon DW, Brown MA, Casida JE. Two classes of pyrethroid action in the cockroach. Pestic Biochem Physiol. 1981 Apr;15(2):181–91.

115. Song JH, Narahashi T. Modulation of sodium channels of rat cerebellar Purkinje neurons by the pyrethroid tetramethrin. J Pharmacol Exp Ther. 1996 Apr;277(1):445–53.

116. Narahashi T. Neuronal Ion Channels as the Target Sites of Insecticides. Pharmacol Toxicol. 1996 Jul;79(1):1–14.

117. Ray DE, Fry JR. A reassessment of the neurotoxicity of pyrethroid insecticides. Pharmacol Ther. 2006 Jul;111(1):174–93.

118. Song JH, Nagata K, Tatebayashi H, Narahashi T. Interactions of tetramethrin, fenvalerate and DDT at the sodium channel in rat dorsal root ganglion neurons. Brain Res. 1996 Feb 5;708(1–2):29–37.

119. Enan E, Matsumura F. Activation of phosphoinositide/protein kinase C pathway in rat brain tissue by pyrethroids. Biochem Pharmacol. 1993 Feb 9;45(3):703–10.

120. Narahashi T, Frey JM, Ginsburg KS, Roy ML. Sodium and GABA-activated channels as the targets of pyrethroids and cyclodienes. Toxicol Lett. 1992 Dec;64–65 Spec No:429–36.

121. Devaud LL, Szot P, Murray TF. PK 11195 antagonism of pyrethroid-induced proconvulsant activity. Eur J Pharmacol. 1986 Feb 18;121(2):269–73.

122. Chen H, Xiao J, Hu G, Zhou J, Xiao H, Wang X. Estrogenicity of organophosphorus and pyrethroid pesticides. J Toxicol Environ Health A. 2002 Oct 11;65(19):1419–35.

123. Eil C, Nisula BC. The binding properties of pyrethroids to human skin fibroblast androgen receptors and to sex hormone binding globulin. J Steroid Biochem. 1990 Mar;35(3–4):409–14.

124. Andersen HR, Vinggaard AM, Rasmussen TH, Gjermandsen IM, Bonefeld-Jørgensen EC. Effects of currently used pesticides in assays for estrogenicity, androgenicity, and aromatase activity in vitro. Toxicol Appl Pharmacol. 2002 Feb 15;179(1):1–12.

125. Garey J, Wolff MS. Estrogenic and antiprogestagenic activities of pyrethroid insecticides. Biochem Biophys Res Commun. 1998 Oct 29;251(3):855–9.

126. Kim IY, Shin JH, Kim HS, Lee SJ, Kang IH, Kim TS, et al. Assessing estrogenic activity of pyrethroid insecticides using in vitro combination assays. J Reprod Dev. 2004 Apr;50(2):245–55.

127. Kim SS, Kwack SJ, Lee RD, Lim KJ, Rhee GS, Seok JH, et al. Assessment of estrogenic and androgenic activities of tetramethrin in vitro and in vivo assays. J Toxicol Environ Health A. 2005 Dec 10;68(23–24):2277–89.

128. Chen J, Chen H, Liu R, He J, Song L, Bian Q, et al. Effects of fenvalerate on progesterone production in cultured rat granulosa cells. Reprod Toxicol Elmsford N. 2005 Aug;20(2):195–202.

129. Ye X, Li F, Zhang J, Ma H, Ji D, Huang X, et al. Pyrethroid Insecticide Cypermethrin Accelerates Pubertal Onset in Male Mice via Disrupting Hypothalamic-Pituitary-Gonadal Axis. Environ Sci Technol. 2017 Sep 5;51(17):10212–21.

130. Kaul PP, Rastogi A, Hans RK, Seth TD, Seth PK, Srimal RC. Fenvalerate-induced alterations in circulatory thyroid hormones and calcium stores in rat brain. Toxicol Lett. 1996 Dec 1;89(1):29–33.

131. Akhtar N, Kayani SA, Ahmad MM, Shahab M. Insecticide-induced changes in secretory activity of the thyroid gland in rats. J Appl Toxicol JAT. 1996 Oct;16(5):397–400.

132. McCarthy AR, Thomson BM, Shaw IC, Abell AD. Estrogenicity of pyrethroid insecticide metabolites. J Environ Monit JEM. 2006 Jan;8(1):197–202.

133. Brander SM, Gabler MK, Fowler NL, Connon RE, Schlenk D. Pyrethroid Pesticides as Endocrine Disruptors: Molecular Mechanisms in Vertebrates with a Focus on Fishes. Environ Sci Technol. 2016 Sep 6;50(17):8977–92.

134. Meeker JD, Barr DB, Hauser R. Human semen quality and sperm DNA damage in relation to urinary metabolites of pyrethroid insecticides. Hum Reprod Oxf Engl. 2008 Aug;23(8):1932–40.

135. Xia Y, Han Y, Wu B, Wang S, Gu A, Lu N, et al. The relation between urinary metabolite of pyrethroid insecticides and semen quality in humans. Fertil Steril. 2008 Jun;89(6):1743–50.

136. Meeker JD, Barr DB, Hauser R. Pyrethroid insecticide metabolites are associated with serum hormone levels in adult men. Reprod Toxicol Elmsford N. 2009 Apr;27(2):155–60.

137. Saillenfait A-M, Ndiaye D, Sabaté J-P. The estrogenic and androgenic potential of pyrethroids in vitro. Review. Toxicol In Vitro. 2016 Aug 1;34(Supplement C):321–32.

138. Wang L, Liu W, Yang C, Pan Z, Gan J, Xu C, et al. Enantioselectivity in Estrogenic Potential and Uptake of Bifenthrin. Environ Sci Technol. 2007 Sep 1;41(17):6124–8.

139. Liu B, Jung KH, Horton MK, Camann DE, Liu X, Reardon AM, et al. Prenatal exposure to pesticide ingredient piperonyl butoxide and childhood cough in an urban cohort. Environ Int. 2012 Nov 1;48(Supplement C):156–61.

140. Hanke W, Romitti P, Fuortes L, Sobala W, Mikulski M. The use of pesticides in a Polish rural population and its effect on birth weight. Int Arch Occup Environ Health. 2003 Oct;76(8):614–20.

141. Shelton JF, Geraghty EM, Tancredi DJ, Delwiche LD, Schmidt RJ, Ritz B, et al. Neurodevelopmental disorders and prenatal residential proximity to agricultural pesticides: the CHARGE study. Environ Health Perspect. 2014 Oct;122(10):1103–9.

142. Xue Z, Li X, Su Q, Xu L, Zhang P, Kong Z, et al. Effect of synthetic pyrethroid pesticide exposure during pregnancy on the growth and development of infants. Asia Pac J Public Health. 2013 Jul;25(4 Suppl):72S–9S.

143. Viel J-F, Warembourg C, Le Maner-Idrissi G, Lacroix A, Limon G, Rouget F, et al. Pyrethroid insecticide exposure and cognitive developmental disabilities in children: The PELAGIE mother-child cohort. Environ Int. 2015 Sep;82:69–75.

144. Imanishi S, Okura M, Zaha H, Yamamoto T, Akanuma H, Nagano R, et al. Prenatal exposure to permethrin influences vascular development of fetal brain and adult behavior in mice offspring. Environ Toxicol. 2013 Nov;28(11):617–29.

145. Eriksson P, Nordberg A. Effects of two pyrethroids, bioallethrin and deltamethrin, on subpopulations of muscarinic and nicotinic receptors in the neonatal mouse brain. Toxicol Appl Pharmacol. 1990 Mar 1;102(3):456–63.

146. Gupta null, Agarwal null, Shukla1 null. Effect of quinalphos and cypermethrin exposure on developing blood-brain barrier: role of nitric oxide. Environ Toxicol Pharmacol. 2000 Jan 1;8(2):73–8.

147. Meisler MH, Kearney JA, Sprunger LK, MacDonald BT, Buchner DA, Escayg A. Mutations of voltage-gated sodium channels in movement disorders and epilepsy. Novartis Found Symp. 2002;241:72-81; discussion 82-86, 226–32.

148. Rusiecki JA, Patel R, Koutros S, Beane-Freeman L, Landgren O, Bonner MR, et al. Cancer incidence among pesticide applicators exposed to permethrin in the Agricultural Health Study. Environ Health Perspect. 2009 Apr;117(4):581–6.

149. Lee WJ, Sandler DP, Blair A, Samanic C, Cross AJ, Alavanja MCR. Pesticide use and colorectal cancer risk in the agricultural health study. Int J Cancer. 2007 Jul 15;121(2):339–46.

150. Ortiz-Pérez MD, Torres-Dosal A, Batres LE, López-Guzmán OD, Grimaldo M, Carranza C, et al. Environmental Health Assessment of Deltamethrin in a Malarious Area of Mexico: Environmental Persistence, Toxicokinetics, and Genotoxicity in Exposed Children. Environ Health Perspect. 2005 Jun;113(6):782–6.

151. Ding G, Shi R, Gao Y, Zhang Y, Kamijima M, Sakai K, et al. Pyrethroid pesticide exposure and risk of childhood acute lymphocytic leukemia in Shanghai. Environ Sci Technol. 2012 Dec 18;46(24):13480–7.

152. Alavanja M, Hofmann J, Lynch C, Hines C, Barry K, Barker J, et al. Occupational use of insecticides, fungicides and fumigants and risk of non-Hodgkin lymphoma and multiple myeloma in the Agricultural Health Study. Occup Environ Med. 2014 Jun;71(Suppl 1):A36.1-A36.

153. Alavanja MCR, Samanic C, Dosemeci M, Lubin J, Tarone R, Lynch CF, et al. Use of Agricultural Pesticides and Prostate Cancer Risk in the Agricultural Health Study Cohort. Am J Epidemiol. 2003 May 1;157(9):800–14.

154. Nachmansohn D, Wilson IB. The enzymic hydrolysis and synthesis of acetylcholine. Adv Enzymol Relat Subj Biochem. 1951;12:259–339.

155. Casida JE. Mode of Action of Carbamates. Annu Rev Entomol. 1963 Jan;8(1):39–58.

156. 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.

157. Anses. Avis de l'Anses relatif au programme 2013 de surveillance des résidus de pesticides dans les aliments, Saisine n°2012- SA-0178. 2012.

158. Ecobichon DJ, Ozere RL, Reid E, Crocker JF. Acute fenitrothion poisoning. Can Med Assoc J. 1977 Feb 19;116(4):377–9.

159. 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.

160. 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.

161. 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.

162. CDC, Centers for Disease Control and Prevention. Fourth National Report on Human Exposure to Environmental Chemicals. Updated Tables. Atlanta; 2013.

163. 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.

164. Kaushik R, Rosenfeld CA, Sultatos LG. Concentration-dependent interactions of the organophosphates chlorpyrifos oxon and methyl paraoxon with human recombinant acetylcholinesterase. Toxicol Appl Pharmacol. 2007 Jun 1;221(2):243–50.

165. Olivera S, Rodriguez-Ithurralde D, Henley JM. Acetylcholinesterase promotes neurite elongation, synapse formation, and surface expression of AMPA receptors in hippocampal neurones. Mol Cell Neurosci. 2003 May;23(1):96–106.

166. Paraoanu LE, Layer PG. Acetylcholinesterase in cell adhesion, neurite growth and network formation: Non-classical roles of acetylcholinesterase. FEBS J. 2008 Feb;275(4):618–24.

167. Lotti M, Johnson MK. Neurotoxic Esterase in Human Nervous Tissue. J Neurochem. 1980 Mar;34(3):747–9.

168. Johnson MK. The delayed neurotoxic effect of some organophosphorus compounds. Identification of the phosphorylation site as an esterase. Biochem J. 1969 Oct;114(4):711–7.

169. Aiuto LA, Pavlakis SG, Boxer RA. Life-threatening organophosphate-induced delayed polyneuropathy in a child after accidental chlorpyrifos ingestion. J Pediatr. 1993 Apr;122(4):658–60.

170. Chanda SM, Mortensen SR, Moser VC, Padilla S. Tissue-specific effects of chlorpyrifos on carboxylesterase and cholinesterase activity in adult rats: an in vitro and in vivo comparison. Fundam Appl Toxicol Off J Soc Toxicol. 1997 Aug;38(2):148–57.

171. Jewell WT, Miller MG. Identification of a carboxylesterase as the major protein bound by molinate. Toxicol Appl Pharmacol. 1998 Apr;149(2):226–34.

172. Bagchi D, Bagchi M, Hassoun EA, Stohs SJ. In vitro and in vivo generation of reactive oxygen species, DNA damage and lactate dehydrogenase leakage by selected pesticides. Toxicology. 1995 Dec 15;104(1–3):129–40.

173. Peter JV, Sudarsan TI, Moran JL. Clinical features of organophosphate poisoning: A review of different classification systems and approaches. Indian J Crit Care Med Peer-Rev Off Publ Indian Soc Crit Care Med. 2014 Nov;18(11):735–45.

174. Clegg DJ, van Gemert M. Expert panel report of human studies on chlorpyrifos and/or other organophosphate exposures. J Toxicol Environ Health B Crit Rev. 1999 Sep;2(3):257–79.

175. Senanayake N, Karalliedde L. Neurotoxic effects of organophosphorus insecticides. An intermediate syndrome. N Engl J Med. 1987 Mar 26;316(13):761–3.

176. Jayawardane P, Senanayake N, Dawson A. Electrophysiological correlates of intermediate syndrome following acute organophosphate poisoning. Clin Toxicol Phila Pa. 2009 Mar;47(3):193–205.

177. Lotti M, Moretto A. Organophosphate-induced delayed polyneuropathy. Toxicol Rev. 2005;24(1):37–49.

178. 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.

179. Bellin JS, Chow I. Biochemical effects of chronic low-level exposure to pesticides. Res Commun Chem Pathol Pharmacol. 1974 Oct;9(2):325–37.

180. 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.

181. 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.

182. 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.

183. 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.

184. 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.

185. Levin HS, Rodnitzky RL, Mick DL. Anxiety associated with exposure to organophosphate compounds. Arch Gen Psychiatry. 1976 Feb;33(2):225–8.

186. Levin HS, Rodnitzky RL. Behavioral Effects of Organophosphate Pesticides in Man. Clin Toxicol. 1976 Jan;9(3):391–405.

187. 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.

188. Korsak RJ, Sato MM. Effects of Chronic Organophosphate Pesticide Exposure on the Central Nervous System. Clin Toxicol. 1977 Jan;11(1):83–95.

189. 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.

190. Stokes L, Stark A, Marshall E, Narang A. Neurotoxicity among pesticide applicators exposed to organophosphates. Occup Environ Med. 1995 Oct;52(10):648–53.

191. Cole DC, Carpio F, Julian J, Léon 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.

192. Hayden KM, Norton MC, Darcey D, Østbye T, Zandi PP, Breitner JCS, et al. Occupational exposure to pesticides increases the risk of incident AD. Neurology. 2010 May 11;74(19):1524–30.

193. 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.

194. Narayan S, Liew Z, Paul K, Lee P-C, Sinsheimer JS, Bronstein JM, et al. Household organophosphorus pesticide use and Parkinson's disease. Int J Epidemiol. 2013 Oct;42(5):1476–85.

195. Gatto NM, Cockburn M, Bronstein J, Manthripragada AD, Ritz B. Well-water consumption and Parkinson's disease in rural California. Environ Health Perspect. 2009 Dec;117(12):1912–8.

196. Manthripragada AD, Costello S, Cockburn MG, Bronstein JM, Ritz B. Paraoxonase 1, agricultural organophosphate exposure, and Parkinson disease. Epidemiol Camb Mass. 2010 Jan;21(1):87–94.

197. Whyatt RM, Rauh V, Barr DB, Camann DE, Andrews HF, Garfinkel R, et al. Prenatal Insecticide Exposures and Birth Weight and Length among an Urban Minority Cohort. Environ Health Perspect. 2004 Jul;112(10):1125–32.

198. Michalakis M, Tzatzarakis MN, Kovatsi L, Alegakis AK, Tsakalof AK, Heretis I, et al. Hypospadias in offspring is associated with chronic exposure of parents to organophosphate and organochlorine pesticides. Toxicol Lett. 2014 Oct 15;230(2):139–45.

199. Bouchard MF, Bellinger DC, Wright RO, Weisskopf MG. Attention-deficit/hyperactivity disorder and urinary metabolites of organophosphate pesticides. Pediatrics. 2010 Jun;125(6):e1270-1277.

200. Fortenberry GZ, Meeker JD, Sánchez BN, Barr DB, Panuwet P, Bellinger D, et al. Urinary 3, 5, 6-trichloro-2-pyridinol (TCPY) in pregnant women from Mexico City: distribution, temporal variability, and relationship with child attention and hyperactivity. Int J Hyg Environ Health. 2014 Mar;217(0):405–12.

201. Engel SM, Berkowitz GS, Barr DB, Teitelbaum SL, Siskind J, Meisel SJ, et al. Prenatal organophosphate metabolite and organochlorine levels and performance on the Brazelton Neonatal Behavioral Assessment Scale in a multiethnic pregnancy cohort. Am J Epidemiol. 2007 Jun 15;165(12):1397–404.

202. Eskenazi B, Marks AR, Bradman A, Harley K, Barr DB, Johnson C, et al. Organophosphate Pesticide Exposure and Neurodevelopment in Young Mexican-American Children. Environ Health Perspect. 2007 May;115(5):792–8.

203. Young JG, Eskenazi B, Gladstone EA, Bradman A, Pedersen L, Johnson C, et al. Association between in utero organophosphate pesticide exposure and abnormal reflexes in neonates. Neurotoxicology. 2005 Mar;26(2):199–209.

204. Rauh V, Arunajadai S, Horton M, Perera F, Hoepner L, Barr DB, et al. Seven-Year Neurodevelopmental Scores and Prenatal Exposure to Chlorpyrifos, a Common Agricultural Pesticide. Environ Health Perspect. 2011 Aug;119(8):1196–201.

205. Ruckart PZ, Kakolewski K, Bove FJ, Kaye WE. Long-term neurobehavioral health effects of methyl parathion exposure in children in Mississippi and Ohio. Environ Health Perspect. 2004 Jan;112(1):46–51.

206. Schinasi L, Leon ME. Non-Hodgkin lymphoma and occupational exposure to agricultural pesticide chemical groups and active ingredients: a systematic review and meta-analysis. Int J Environ Res Public Health. 2014 Apr 23;11(4):4449–527.

207. Alavanja MCR, Hofmann JN, Lynch CF, Hines CJ, Barry KH, Barker J, et al. Non-hodgkin lymphoma risk and insecticide, fungicide and fumigant use in the agricultural health study. PloS One. 2014;9(10):e109332.

208. McDuffie HH, Pahwa P, McLaughlin JR, Spinelli JJ, Fincham S, Dosman JA, et al. Non-Hodgkin's lymphoma and specific pesticide exposures in men: cross-Canada study of pesticides and health. Cancer Epidemiol Biomark Prev Publ Am Assoc Cancer Res Cosponsored Am Soc Prev Oncol. 2001 Nov;10(11):1155–63.

209. Koutros S, Beane Freeman LE, Lubin JH, Heltshe SL, Andreotti G, Barry KH, et al. Risk of total and aggressive prostate cancer and pesticide use in the Agricultural Health Study. Am J Epidemiol. 2013 Jan 1;177(1):59–74.

210. Mahajan R, Bonner MR, Hoppin JA, Alavanja MCR. Phorate exposure and incidence of cancer in the agricultural health study. Environ Health Perspect. 2006 Aug;114(8):1205–9.

211. Christensen CH, Platz EA, Andreotti G, Blair A, Hoppin JA, Koutros S, et al. Coumaphos exposure and incident cancer among male participants in the Agricultural Health Study (AHS). Environ Health Perspect. 2010 Jan;118(1):92–6.

212. Jones RR, Barone-Adesi F, Koutros S, Lerro CC, Blair A, Lubin J, et al. Incidence of solid tumours among pesticide applicators exposed to the organophosphate insecticide diazinon in the Agricultural Health Study: an updated analysis. Occup Environ Med. 2015 Jul;72(7):496–503.

213. Beane Freeman LE, Bonner MR, Blair A, Hoppin JA, Sandler DP, Lubin JH, et al. Cancer incidence among male pesticide applicators in the Agricultural Health Study cohort exposed to diazinon. Am J Epidemiol. 2005 Dec 1;162(11):1070–9.

214. Lee WJ, Blair A, Hoppin JA, Lubin JH, Rusiecki JA, Sandler DP, et al. Cancer incidence among pesticide applicators exposed to chlorpyrifos in the Agricultural Health Study. J Natl Cancer Inst. 2004 Dec 1;96(23):1781–9.

215. Bonner MR, Williams BA, Rusiecki JA, Blair A, Beane Freeman LE, Hoppin JA, et al. Occupational exposure to terbufos and the incidence of cancer in the Agricultural Health Study. Cancer Causes Control CCC. 2010 Jun;21(6):871–7.

216. Lee WJ, Colt JS, Heineman EF, McComb R, Weisenburger DD, Lijinsky W, et al. Agricultural pesticide use and risk of glioma in Nebraska, United States. Occup Environ Med. 2005 Nov;62(11):786–92.

217. Dennis LK, Lynch CF, Sandler DP, Alavanja MCR. Pesticide use and cutaneous melanoma in pesticide applicators in the agricultural heath study. Environ Health Perspect. 2010 Jun;118(6):812–7.

218. Mahajan R, Blair A, Lynch CF, Schroeder P, Hoppin JA, Sandler DP, et al. Fonofos exposure and cancer incidence in the agricultural health study. Environ Health Perspect. 2006 Dec;114(12):1838–42.

219. Karunanayake CP, Spinelli JJ, McLaughlin JR, Dosman JA, Pahwa P, McDuffie HH. Hodgkin lymphoma and pesticides exposure in men: a Canadian case-control study. J Agromedicine. 2012 Jan;17(1):30–9.

220. Soldin OP, Nsouly-Maktabi H, Genkinger JM, Loffredo CA, Ortega-Garcia JA, Colantino D, et al. Pediatric Acute Lymphoblastic Leukemia and Exposure to Pesticides. Ther Drug Monit. 2009 Aug;31(4):495–501.

221. Recio R, Ocampo-Gómez G, Morán-Martínez J, Borja-Aburto V, López-Cervantes M, Uribe M, et al. Pesticide Exposure Alters Follicle-Stimulating Hormone Levels in Mexican Agricultural Workers. Environ Health Perspect. 2005 Sep;113(9):1160–3.

222. Omoike OE, Lewis RC, Meeker JD. Association between urinary biomarkers of exposure to organophosphate insecticides and serum reproductive hormones in men from NHANES 1999-2002. Reprod Toxicol Elmsford N. 2015 Jun;53:99–104.

223. Meeker JD, Ravi SR, Barr DB, Hauser R. Circulating estradiol in men is inversely related to urinary metabolites of nonpersistent insecticides. Reprod Toxicol Elmsford N. 2008 Feb;25(2):184–91.

224. Meeker JD, Barr DB, Hauser R. Thyroid hormones in relation to urinary metabolites of non-persistent insecticides in men of reproductive age. Reprod Toxicol Elmsford N. 2006 Oct;22(3):437–42.

225. Swan SH, Kruse RL, Liu F, Barr DB, Drobnis EZ, Redmon JB, et al. Semen quality in relation to biomarkers of pesticide exposure. Environ Health Perspect. 2003 Sep;111(12):1478–84.

226. Perry MJ, Venners SA, Barr DB, Xu X. Environmental pyrethroid and organophosphorus insecticide exposures and sperm concentration. Reprod Toxicol Elmsford N. 2007 Jan;23(1):113–8.

227. Recio-Vega R, Ocampo-Gómez G, Borja-Aburto VH, Moran-Martínez J, Cebrian-Garcia ME. Organophosphorus pesticide exposure decreases sperm quality: association between sperm parameters and urinary pesticide levels. J Appl Toxicol JAT. 2008 Jul;28(5):674–80.

228. Kang HG, Jeong SH, Cho JH, Kim DG, Park JM, Cho MH. Chlropyrifos-methyl shows anti-androgenic activity without estrogenic activity in rats. Toxicology. 2004 Jul 1;199(2–3):219–30.

229. Tamura H, Yoshikawa H, Gaido KW, Ross SM, DeLisle RK, Welsh WJ, et al. Interaction of organophosphate pesticides and related compounds with the androgen receptor. Environ Health Perspect. 2003 Apr;111(4):545–52.

230. Manabe M, Kanda S, Fukunaga K, Tsubura A, Nishiyama T. Evaluation of the estrogenic activities of some pesticides and their combinations using MtT/Se cell proliferation assay. Int J Hyg Environ Health. 2006 Sep;209(5):413–21.

231. Okubo T, Yokoyama Y, Kano K, Soya Y, Kano I. Estimation of estrogenic and antiestrogenic activities of selected pesticides by MCF-7 cell proliferation assay. Arch Environ Contam Toxicol. 2004 May;46(4):445–53.

232. Singh AK. Acute effects of acephate and methamidophos and interleukin-1 on corticotropin-releasing factor (CRF) synthesis in and release from the hypothalamus in vitro. Comp Biochem Physiol Toxicol Pharmacol CBP. 2002 May;132(1):9–24.

233. Mahjoubi-Samet A, Hamadi F, Soussia L, Fadhel G, Zeghal N. Dimethoate effects on thyroid function in suckling rats. Ann Endocrinol. 2005 Apr;66(2 Pt 1):96–104.

234. Ishihara A, Nishiyama N, Sugiyama S, Yamauchi K. The effect of endocrine disrupting chemicals on thyroid hormone binding to Japanese quail transthyretin and thyroid hormone receptor. Gen Comp Endocrinol. 2003 Oct 15;134(1):36–43.

235. Rawlings NC, Cook SJ, Waldbillig D. Effects of the pesticides carbofuran, chlorpyrifos, dimethoate, lindane, triallate, trifluralin, 2,4-D, and pentachlorophenol on the metabolic endocrine and reproductive endocrine system in ewes. J Toxicol Environ Health A. 1998 May 8;54(1):21–36.

236. Liu PS, Kao LS, Lin MK. Organophosphates inhibit catecholamine secretion and calcium influx in bovine adrenal chromaffin cells. Toxicology. 1994 May 31;90(1–2):81–91.

237. Attia AM, Mostafa MH, Richardson BA, Reiter RJ. Changes in nocturnal pineal indoleamine metabolism in rats treated with parathion are prevented by β-adrenergic antagonist administration. Toxicology. 1995 Mar;97(1–3):183–9.

238. Attia AM, Reiter RJ, Stokkan KA, Mostafa MH, Soliman SA, el-Sebae AK. Parathion (O,O-dimethyl-O-p-nitrophenyl phosphorothioate) induces pineal melatonin synthesis at night. Brain Res Bull. 1991 Apr;26(4):553–7.

239. Rojas M, Bustos-Obregón E, Martínez-García F, Contreras H, Regadera J. The effect of parathion on mouse testicular and epididymal development cultured in chicken allantochorion. Adv Exp Med Biol. 1998;444:201–6.

240. Brandl M, Eide Flaten G, Bauer-Brandl A. Passive Diffusion Across Membranes. In: Wiley Encyclopedia of Chemical Biology. 2008.

241. 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.

242. Membrane transporters in drug development. Nat Rev Drug Discov. 2010 Mar;9(3):215–36.

243. 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.

244. Urquhart BL, Tirona RG, Kim RB. Nuclear Receptors and the Regulation of Drug-Metabolizing Enzymes and Drug Transporters: Implications for Interindividual Variability in Response to Drugs. J Clin Pharmacol. 2007 May;47(5):566–78.

245. Meyer zu Schwabedissen HE, Kim RB. Hepatic OATP1B Transporters and Nuclear Receptors PXR and CAR: Interplay, Regulation of Drug Disposition Genes, and Single Nucleotide Polymorphisms. Mol Pharm. 2009 Dec 7;6(6):1644–61.

246. Klein I, Sarkadi B, Váradi A. An inventory of the human ABC proteins. Biochim Biophys Acta. 1999 Dec 6;1461(2):237–62.

247. Schlessinger A, Yee SW, Sali A, Giacomini KM. SLC classification: an update. Clin Pharmacol Ther. 2013 Jul;94(1):19–23.

248. Higgins CF, Hiles ID, Salmond GP, Gill DR, Downie JA, Evans IJ, et al. A family of related ATP-binding subunits coupled to many distinct biological processes in bacteria. Nature. 1986 Oct 2;323(6087):448–50.

249. Dean M, Rzhetsky A, Allikmets R. The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. Genome Res. 2001 Jul;11(7):1156–66.

250. Moussatova A, Kandt C, O'Mara ML, Tieleman DP. ATP-binding cassette transporters in Escherichia coli. Biochim Biophys Acta BBA - Biomembr. 2008 Sep;1778(9):1757–71.

251. Aller SG, Yu J, Ward A, Weng Y, Chittaboina S, Zhuo R, et al. Structure of P-glycoprotein reveals a molecular basis for poly-specific drug binding. Science. 2009 Mar 27;323(5922):1718–22.

252. Rosenberg MF, Mao Q, Holzenburg A, Ford RC, Deeley RG, Cole SP. The structure of the multidrug resistance protein 1 (MRP1/ABCC1). crystallization and single-particle analysis. J Biol Chem. 2001 May 11;276(19):16076–82.

253. Taylor NMI, Manolaridis I, Jackson SM, Kowal J, Stahlberg H, Locher KP. Structure of the human multidrug transporter ABCG2. Nature. 2017 Jun 22;546(7659):504-509.

254. Sharom FJ. ABC multidrug transporters: structure, function and role in chemoresistance. Pharmacogenomics. 2008 Jan;9(1):105–27.

255. Walker JE, Saraste M, Runswick MJ, Gay NJ. Distantly related sequences in the alpha- and beta-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. EMBO J. 1982;1(8):945–51.

256. Carson MR, Welsh MJ. Structural and functional similarities between the nucleotide-binding domains of CFTR and GTP-binding proteins. Biophys J. 1995 Dec;69(6):2443–8.

257. Draheim V, Reichel A, Weitschies W, Moenning U. N-glycosylation of ABC transporters is associated with functional activity in sandwich-cultured rat hepatocytes. Eur J Pharm Sci Off J Eur Fed Pharm Sci. 2010 Oct 9;41(2):201–9.

258. Stolarczyk EI, Reiling CJ, Paumi CM. Regulation of ABC Transporter Function Via Phosphorylation by Protein Kinases. Curr Pharm Biotechnol. 2011 Apr 1;12(4):621–35.

259. Walsh DR, Nolin TD, Friedman PA. Drug Transporters and Na+/H+ Exchange Regulatory Factor PSD-95/Drosophila Discs Large/ZO-1 Proteins. Pharmacol Rev. 2015 Jun 19;67(3):656–80.

260. Van Herwaarden AE, Wagenaar E, Merino G, Jonker JW, Rosing H, Beijnen JH, et al. Multidrug transporter ABCG2/breast cancer resistance protein secretes riboflavin (vitamin B2) into milk. Mol Cell Biol. 2007 Feb;27(4):1247–53.

261. Krishnamurthy P, Ross DD, Nakanishi T, Bailey-Dell K, Zhou S, Mercer KE, et al. The stem cell marker Bcrp/ABCG2 enhances hypoxic cell survival through interactions with heme. J Biol Chem. 2004 Jun 4;279(23):24218–25.

262. Cole SP, Bhardwaj G, Gerlach JH, Mackie JE, Grant CE, Almquist KC, et al. Overexpression of a transporter gene in a multidrug-resistant human lung cancer cell line. Science. 1992 Dec 4;258(5088):1650–4.

263. Riordan JR, Rommens JM, Kerem B, Alon N, Rozmahel R, Grzelczak Z, et al. Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. Science. 1989 Sep 8;245(4922):1066–73.

264. Rust S, Rosier M, Funke H, Real J, Amoura Z, Piette JC, et al. Tangier disease is caused by mutations in the gene encoding ATP-binding cassette transporter 1. Nat Genet. 1999 Aug;22(4):352–5.

265. Paulusma CC, Bosma PJ, Zaman GJ, Bakker CT, Otter M, Scheffer GL, et al. Congenital jaundice in rats with a mutation in a multidrug resistance-associated protein gene. Science. 1996 Feb 23;271(5252):1126–8.

266. Juliano RL, Ling V. A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. Biochim Biophys Acta BBA - Biomembr. 1976 Nov 11;455(1):152–62.

267. Loo TW, Bartlett MC, Clarke DM. The drug-binding pocket of the human multidrug resistance P-glycoprotein is accessible to the aqueous medium. Biochemistry (Mosc). 2004 Sep 28;43(38):12081–9.

268. Loo TW, Clarke DM. Determining the dimensions of the drug-binding domain of human P-glycoprotein using thiol cross-linking compounds as molecular rulers. J Biol Chem. 2001 Oct 5;276(40):36877–80.

269. Rosenberg MF, Velarde G, Ford RC, Martin C, Berridge G, Kerr ID, et al. Repacking of the transmembrane domains of P-glycoprotein during the transport ATPase cycle. EMBO J. 2001 Oct 15;20(20):5615–25.

270. Romsicki Y, Sharom FJ. The membrane lipid environment modulates drug interactions with the P-glycoprotein multidrug transporter. Biochemistry (Mosc). 1999 May 25;38(21):6887–96.

271. Loo TW, Clarke DM. Do drug substrates enter the common drug-binding pocket of P-glycoprotein through “gates”? Biochem Biophys Res Commun. 2005 Apr 8;329(2):419–22.

272. Liu R, Sharom FJ. Site-directed fluorescence labeling of P-glycoprotein on cysteine residues in the nucleotide binding domains. Biochemistry (Mosc). 1996 Sep 10;35(36):11865–73.

273. Dey S, Ramachandra M, Pastan I, Gottesman MM, Ambudkar SV. Evidence for two nonidentical drug-interaction sites in the human P-glycoprotein. Proc Natl Acad Sci U S A. 1997 Sep 30;94(20):10594–9.

274. Martin C, Berridge G, Higgins CF, Mistry P, Charlton P, Callaghan R. Communication between multiple drug binding sites on P-glycoprotein. Mol Pharmacol. 2000 Sep;58(3):624–32.

275. Shapiro AB, Ling V. Positively cooperative sites for drug transport by P-glycoprotein with distinct drug specificities. Eur J Biochem. 1997 Nov 15;250(1):130–7.

276. Shapiro AB, Fox K, Lam P, Ling V. Stimulation of P-glycoprotein-mediated drug transport by prazosin and progesterone. Evidence for a third drug-binding site. Eur J Biochem. 1999 Feb;259(3):841–50.

277. Loo TW, Bartlett MC, Clarke DM. Simultaneous binding of two different drugs in the binding pocket of the human multidrug resistance P-glycoprotein. J Biol Chem. 2003 Oct 10;278(41):39706–10.

278. Loo TW, Clarke DM. Location of the rhodamine-binding site in the human multidrug resistance P-glycoprotein. J Biol Chem. 2002 Nov 15;277(46):44332–8.

279. Loo TW, Bartlett MC, Clarke DM. Transmembrane segment 1 of human P-glycoprotein contributes to the drug-binding pocket. Biochem J. 2006 Jun 15;396(3):537–45.

280. Loo TW, Clarke DM. Defining the drug-binding site in the human multidrug resistance P-glycoprotein using a methanethiosulfonate analog of verapamil, MTS-verapamil. J Biol Chem. 2001 May 4;276(18):14972–9.

281. Taguchi Y, Kino K, Morishima M, Komano T, Kane SE, Ueda K. Alteration of substrate specificity by mutations at the His61 position in predicted transmembrane domain 1 of human MDR1/P-glycoprotein. Biochemistry (Mosc). 1997 Jul 22;36(29):8883–9.

282. Shapiro AB, Ling V. Extraction of Hoechst 33342 from the cytoplasmic leaflet of the plasma membrane by P-glycoprotein. Eur J Biochem. 1997 Nov 15;250(1):122–9.

283. Lugo MR, Sharom FJ. Interaction of LDS-751 with P-glycoprotein and mapping of the location of the R drug binding site. Biochemistry (Mosc). 2005 Jan 18;44(2):643–55.

284. Higgins CF, Gottesman MM. Is the multidrug transporter a flippase? Trends Biochem Sci. 1992 Jan;17(1):18–21.

285. Chen J, Lu G, Lin J, Davidson AL, Quiocho FA. A tweezers-like motion of the ATP-binding cassette dimer in an ABC transport cycle. Mol Cell. 2003 Sep;12(3):651–61.

286. Senior AE, Bhagat S. P-glycoprotein shows strong catalytic cooperativity between the two nucleotide sites. Biochemistry (Mosc). 1998 Jan 20;37(3):831–6.

287. The catalytic cycle of P-glycoprotein. FEBS Lett. 1995 Dec 27;377(3):285–9.

288. Higgins CF, Linton KJ. The ATP switch model for ABC transporters. Nat Struct Mol Biol. 2004 Oct;11(10):918–26.

289. Siarheyeva A, Liu R, Sharom FJ. Characterization of an asymmetric occluded state of P-glycoprotein with two bound nucleotides: implications for catalysis. J Biol Chem. 2010 Mar 5;285(10):7575–86.

290. Sauna ZE, Kim I-W, Nandigama K, Kopp S, Chiba P, Ambudkar SV. Catalytic cycle of ATP hydrolysis by P-glycoprotein: evidence for formation of the E.S reaction intermediate with ATP-gamma-S, a nonhydrolyzable analogue of ATP. Biochemistry (Mosc). 2007 Dec 4;46(48):13787–99.

291. Ramachandra M, Ambudkar SV, Chen D, Hrycyna CA, Dey S, Gottesman MM, et al. Human P-glycoprotein exhibits reduced affinity for substrates during a catalytic transition state. Biochemistry (Mosc). 1998 Apr 7;37(14):5010–9.

292. Thiebaut F, Tsuruo T, Hamada H, Gottesman MM, Pastan I, Willingham MC. Cellular localization of the multidrug-resistance gene product P-glycoprotein in normal human tissues. Proc Natl Acad Sci U S A. 1987 Nov;84(21):7735–8.

293. Cordon-Cardo C, O'Brien JP, Boccia J, Casals D, Bertino JR, Melamed MR. Expression of the multidrug resistance gene product (P-glycoprotein) in human normal and tumor tissues. J Histochem Cytochem Off J Histochem Soc. 1990 Sep;38(9):1277–87.

294. Huwyler J, Wright MB, Gutmann H, Drewe J. Induction of cytochrome P450 3A4 and P-glycoprotein by the isoxazolyl-penicillin antibiotic flucloxacillin. Curr Drug Metab. 2006 Feb;7(2):119–26.

295. Jalava KM, Partanen J, Neuvonen PJ. Itraconazole decreases renal clearance of digoxin. Ther Drug Monit. 1997 Dec;19(6):609–13.

296. Wakasugi H, Yano I, Ito T, Hashida T, Futami T, Nohara R, et al. Effect of clarithromycin on renal excretion of digoxin: interaction with P-glycoprotein. Clin Pharmacol Ther. 1998 Jul;64(1):123–8.

297. Keppler D. Multidrug resistance proteins (MRPs, ABCCs): importance for pathophysiology and drug therapy. Handb Exp Pharmacol. 2011;(201):299–323.

298. Tammur J, Prades C, Arnould I, Rzhetsky A, Hutchinson A, Adachi M, et al. Two new genes from the human ATP-binding cassette transporter superfamily, ABCC11 and ABCC12, tandemly duplicated on chromosome 16q12. Gene. 2001 Jul 25;273(1):89–96.

299. Zimmermann C, van de Wetering K, van de Steeg E, Wagenaar E, Vens C, Schinkel AH. Species-dependent transport and modulation properties of human and mouse multidrug resistance protein 2 (MRP2/Mrp2, ABCC2/Abcc2). Drug Metab Dispos Biol Fate Chem. 2008 Apr;36(4):631–40.

300. Renes J, de Vries EGE, Nienhuis EF, Jansen PLM, Müller M. ATP- and glutathione-dependent transport of chemotherapeutic drugs by the multidrug resistance protein MRP1. Br J Pharmacol. 1999 Feb;126(3):681–8.

301. Loe DW, Deeley RG, Cole SP. Characterization of vincristine transport by the M(r) 190,000 multidrug resistance protein (MRP): evidence for cotransport with reduced glutathione. Cancer Res. 1998 Nov 15;58(22):5130–6.

302. Rius M, Nies AT, Hummel-Eisenbeiss J, Jedlitschky G, Keppler D. Cotransport of reduced glutathione with bile salts by MRP4 (ABCC4) localized to the basolateral hepatocyte membrane. Hepatol Baltim Md. 2003 Aug;38(2):374–84.

303. Jedlitschky G, Leier I, Buchholz U, Center M, Keppler D. ATP-dependent Transport of Glutathione *S*-Conjugates by the Multidrug Resistance-associated Protein. Cancer Res. 1994 Sep 15;54(18):4833–6.

304. Keppler D. The roles of MRP2, MRP3, OATP1B1, and OATP1B3 in conjugated hyperbilirubinemia. Drug Metab Dispos Biol Fate Chem. 2014 Apr;42(4):561–5.

305. Loe DW, Almquist KC, Deeley RG, Cole SP. Multidrug resistance protein (MRP)-mediated transport of leukotriene C4 and chemotherapeutic agents in membrane vesicles. Demonstration of glutathione-dependent vincristine transport. J Biol Chem. 1996 Apr 19;271(16):9675–82.

306. Roelofsen H, Müller M, Jansen PL. Regulation of organic anion transport in the liver. Yale J Biol Med. 1997 Aug;70(4):435–45.

307. Van de Water FM, Masereeuw R, Russel FGM. Function and regulation of multidrug resistance proteins (MRPs) in the renal elimination of organic anions. Drug Metab Rev. 2005;37(3):443–71.

308. Klein DM, Wright SH, Cherrington NJ. Localization of multidrug resistance-associated proteins along the blood-testis barrier in rat, macaque, and human testis. Drug Metab Dispos Biol Fate Chem. 2014 Jan;42(1):89–93.

309. St-Pierre MV, Serrano MA, Macias RIR, Dubs U, Hoechli M, Lauper U, et al. Expression of members of the multidrug resistance protein family in human term placenta. Am J Physiol - Regul Integr Comp Physiol. 2000 Oct 1;279(4):R1495–503.

310. Peng KC, Cluzeaud F, Bens M, Duong Van Huyen JP, Wioland MA, Lacave R, et al. Tissue and cell distribution of the multidrug resistance-associated protein (MRP) in mouse intestine and kidney. J Histochem Cytochem Off J Histochem Soc. 1999 Jun;47(6):757–68.

311. König J, Rost D, Cui Y, Keppler D. Characterization of the human multidrug resistance protein isoform MRP3 localized to the basolateral hepatocyte membrane. Hepatol Baltim Md. 1999 Apr;29(4):1156–63.

312. Nies AT, Keppler D. The apical conjugate efflux pump ABCC2 (MRP2). Pflugers Arch. 2007 Feb;453(5):643–59.

313. Rius M, Hummel-Eisenbeiss J, Hofmann AF, Keppler D. Substrate specificity of human ABCC4 (MRP4)-mediated cotransport of bile acids and reduced glutathione. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2006 Apr;290(4):G640-649.

314. Kool M, Linden M van der, Haas M de, Baas F, Borst P. Expression of Human MRP6, a Homologue of the Multidrug Resistance Protein Gene MRP1, in Tissues and Cancer Cells. Cancer Res. 1999 Jan 1;59(1):175–82.

315. Zelcer N, Saeki T, Bot I, Kuil A, Borst P. Transport of bile acids in multidrug-resistance-protein 3-overexpressing cells co-transfected with the ileal Na+-dependent bile-acid transporter. Biochem J. 2003 Jan 1;369(Pt 1):23–30.

316. Rost D, König J, Weiss G, Klar E, Stremmel W, Keppler D. Expression and localization of the multidrug resistance proteins MRP2 and MRP3 in human gallbladder epithelia. Gastroenterology. 2001 Nov;121(5):1203–8.

317. König J, Hartel M, Nies AT, Martignoni ME, Guo J, Büchler MW, et al. Expression and localization of human multidrug resistance protein (ABCC) family members in pancreatic carcinoma. Int J Cancer. 2005 Jun 20;115(3):359–67.

318. Lee Y-MA, Cui Y, König J, Risch A, Jäger B, Drings P, et al. Identification and functional characterization of the natural variant MRP3-Arg1297His of human multidrug resistance protein 3 (MRP3/ABCC3). Pharmacogenetics. 2004 Apr;14(4):213–23.

319. Schaub TP, Kartenbeck J, König J, Spring H, Dörsam J, Staehler G, et al. Expression of the MRP2 gene-encoded conjugate export pump in human kidney proximal tubules and in renal cell carcinoma. J Am Soc Nephrol JASN. 1999 Jun;10(6):1159–69.

320. Van Aubel RAMH, Smeets PHE, Peters JGP, Bindels RJM, Russel FGM. The MRP4/ABCC4 gene encodes a novel apical organic anion transporter in human kidney proximal tubules: putative efflux pump for urinary cAMP and cGMP. J Am Soc Nephrol JASN. 2002 Mar;13(3):595–603.

321. Flens MJ, Zaman GJ, van der Valk P, Izquierdo MA, Schroeijers AB, Scheffer GL, et al. Tissue distribution of the multidrug resistance protein. Am J Pathol. 1996 Apr;148(4):1237–47.

322. Choudhuri S, Klaassen CD. Structure, Function, Expression, Genomic Organization, and Single Nucleotide Polymorphisms of Human ABCB1 (MDR1), ABCC (MRP), and ABCG2 (BCRP) Efflux Transporters. Int J Toxicol. 2006 Jul 1;25(4):231–59.

323. Rius M, Thon WF, Keppler D, Nies AT. Prostanoid transport by multidrug resistance protein 4 (MRP4/ABCC4) localized in tissues of the human urogenital tract. J Urol. 2005 Dec 1;174(6):2409–14.

324. Scheffer GL, Kool M, de Haas M, de Vree JML, Pijnenborg ACLM, Bosman DK, et al. Tissue distribution and induction of human multidrug resistant protein 3. Lab Investig J Tech Methods Pathol. 2002 Feb;82(2):193–201.

325. Van Aubel RAMH. Human organic anion transporter MRP4 (ABCC4) is an efflux pump for the purine end metabolite urate with multiple allosteric substrate binding sites. AJP Ren Physiol. 2004 Sep 7;288(2):F327–33.

326. Smeets PHE, van Aubel RAMH, Wouterse AC, van den Heuvel JJMW, Russel FGM. Contribution of multidrug resistance protein 2 (MRP2/ABCC2) to the renal excretion of p-aminohippurate (PAH) and identification of MRP4 (ABCC4) as a novel PAH transporter. J Am Soc Nephrol JASN. 2004 Nov;15(11):2828–35.

327. Bortfeld M, Rius M, König J, Herold-Mende C, Nies AT, Keppler D. Human multidrug resistance protein 8 (MRP8/ABCC11), an apical efflux pump for steroid sulfates, is an axonal protein of the CNS and peripheral nervous system. Neuroscience. 2006;137(4):1247–57.

328. Nies AT, Jedlitschky G, König J, Herold-Mende C, Steiner HH, Schmitt H-P, et al. Expression and immunolocalization of the multidrug resistance proteins, MRP1-MRP6 (ABCC1-ABCC6), in human brain. Neuroscience. 2004;129(2):349–60.

329. Jedlitschky G, Tirschmann K, Lubenow LE, Nieuwenhuis HK, Akkerman JWN, Greinacher A, et al. The nucleotide transporter MRP4 (ABCC4) is highly expressed in human platelets and present in dense granules, indicating a role in mediator storage. Blood. 2004 Dec 1;104(12):3603–10.

330. Dazert P, Meissner K, Vogelgesang S, Heydrich B, Eckel L, Böhm M, et al. Expression and localization of the multidrug resistance protein 5 (MRP5/ABCC5), a cellular export pump for cyclic nucleotides, in human heart. Am J Pathol. 2003 Oct;163(4):1567–77.

331. Nagashige M, Ushigome F, Koyabu N, Hirata K, Kawabuchi M, Hirakawa T, et al. Basal membrane localization of MRP1 in human placental trophoblast. Placenta. 2003 Nov;24(10):951–8.

332. Meyer Zu Schwabedissen HEU, Grube M, Heydrich B, Linnemann K, Fusch C, Kroemer HK, et al. Expression, localization, and function of MRP5 (ABCC5), a transporter for cyclic nucleotides, in human placenta and cultured human trophoblasts: effects of gestational age and cellular differentiation. Am J Pathol. 2005 Jan;166(1):39–48.

333. Meyer Zu Schwabedissen HEU, Grube M, Heydrich B, Linnemann K, Fusch C, Kroemer HK, et al. Expression, localization, and function of MRP5 (ABCC5), a transporter for cyclic nucleotides, in human placenta and cultured human trophoblasts: effects of gestational age and cellular differentiation. Am J Pathol. 2005 Jan;166(1):39–48.

334. Pomozi V, Le Saux O, Brampton C, Apana A, Iliás A, Szeri F, et al. ABCC6 is a Basolateral Plasma Membrane Protein. Circ Res. 2013 May 24;112(11):e148–51.

335. Kock K, Brouwer KL. A Perspective on Efflux Transport Proteins in the Liver. Clin Pharmacol Ther. 2012 Nov;92(5):599–612.

336. Nakagawa M, Schneider E, Dixon KH, Horton J, Kelley K, Morrow C, et al. Reduced intracellular drug accumulation in the absence of P-glycoprotein (mdr1) overexpression in mitoxantrone-resistant human MCF-7 breast cancer cells. Cancer Res. 1992 Nov 15;52(22):6175–81.

337. Yu L, Li-Hawkins J, Hammer RE, Berge KE, Horton JD, Cohen JC, et al. Overexpression of ABCG5 and ABCG8 promotes biliary cholesterol secretion and reduces fractional absorption of dietary cholesterol. J Clin Invest. 2002 Sep;110(5):671–80.

338. McDevitt CA, Collins R, Kerr ID, Callaghan R. Purification and structural analyses of ABCG2. Adv Drug Deliv Rev. 2009 Jan 31;61(1):57–65.

339. Doyle LA, Yang W, Abruzzo LV, Krogmann T, Gao Y, Rishi AK, et al. A multidrug resistance transporter from human MCF-7 breast cancer cells. Proc Natl Acad Sci U S A. 1998 Dec 22;95(26):15665–70.

340. Henriksen U, Fog JU, Litman T, Gether U. Identification of Intra- and Intermolecular Disulfide Bridges in the Multidrug Resistance Transporter ABCG2. J Biol Chem. 2005 Apr 11;280(44):36926–34.

341. Henriksen U, Gether U, Litman T. Effect of Walker A mutation (K86M) on oligomerization and surface targeting of the multidrug resistance transporter ABCG2. J Cell Sci. 2005 Apr 1;118(7):1417–26.

342. Clark R, Kerr ID, Callaghan R. Multiple drugbinding sites on the R482G isoform of the ABCG2 transporter. Br J Pharmacol. 2006 Nov;149(5):506–15.

343. Janvilisri T, Venter H, Shahi S, Reuter G, Balakrishnan L, van Veen HW. Sterol transport by the human breast cancer resistance protein (ABCG2) expressed in Lactococcus lactis. J Biol Chem. 2003 Jun 6;278(23):20645–51.

344. Imai Y, Asada S, Tsukahara S, Ishikawa E, Tsuruo T, Sugimoto Y. Breast cancer resistance protein exports sulfated estrogens but not free estrogens. Mol Pharmacol. 2003 Sep;64(3):610–8.

345. Suzuki M, Suzuki H, Sugimoto Y, Sugiyama Y. ABCG2 transports sulfated conjugates of steroids and xenobiotics. J Biol Chem. 2003 Jun 20;278(25):22644–9.

346. Jonker JW, Buitelaar M, Wagenaar E, Van Der Valk MA, Scheffer GL, Scheper RJ, et al. The breast cancer resistance protein protects against a major chlorophyll-derived dietary phototoxin and protoporphyria. Proc Natl Acad Sci U S A. 2002 Nov 26;99(24):15649–54.

347. Rabindran SK, He H, Singh M, Brown E, Collins KI, Annable T, et al. Reversal of a novel multidrug resistance mechanism in human colon carcinoma cells by fumitremorgin C. Cancer Res. 1998 Dec 15;58(24):5850–8.

348. Fetsch PA, Abati A, Litman T, Morisaki K, Honjo Y, Mittal K, et al. Localization of the ABCG2 mitoxantrone resistance-associated protein in normal tissues. Cancer Lett. 2006 Apr 8;235(1):84–92.

349. Herwaarden AE van, Jonker JW, Wagenaar E, Brinkhuis RF, Schellens JHM, Beijnen JH, et al. The Breast Cancer Resistance Protein (Bcrp1/Abcg2) Restricts Exposure to the Dietary Carcinogen 2-Amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine. Cancer Res. 2003 Oct 1;63(19):6447–52.

350. Zhang W, Petrovic J-M, Andrade MF, Zhang H, Ball M, Stanimirovic DB. The expression and functional characterization of ABCG2 in brain endothelial cells and vessels. FASEB J. 2003 Jan 11;17(14):2085–7.

351. Enokizono J, Kusuhara H, Ose A, Schinkel AH, Sugiyama Y. Quantitative investigation of the role of breast cancer resistance protein (Bcrp/Abcg2) in limiting brain and testis penetration of xenobiotic compounds. Drug Metab Dispos Biol Fate Chem. 2008 Jun;36(6):995–1002.

352. Doyle LA, Ross DD. Multidrug resistance mediated by the breast cancer resistance protein BCRP (ABCG2). Oncogene. 2003 Oct 20;22(47):7340–58.

353. Gedeon C, Behravan J, Koren G, Piquette-Miller M. Transport of glyburide by placental ABC transporters: implications in fetal drug exposure. Placenta. 2006 Dec;27(11–12):1096–102.

354. Jonker JW, Merino G, Musters S, van Herwaarden AE, Bolscher E, Wagenaar E, et al. The breast cancer resistance protein BCRP (ABCG2) concentrates drugs and carcinogenic xenotoxins into milk. Nat Med. 2005 Feb;11(2):127–9.

355. Bart J, Hollema H, Groen HJM, de Vries EGE, Hendrikse NH, Sleijfer DT, et al. The distribution of drug-efflux pumps, P-gp, BCRP, MRP1 and MRP2, in the normal blood-testis barrier and in primary testicular tumours. Eur J Cancer Oxf Engl 1990. 2004 Sep;40(14):2064–70.

356. Qian X, Cheng Y-H, Mruk DD, Cheng CY. Breast cancer resistance protein (Bcrp) and the testis—an unexpected turn of events. Asian J Androl. 2013 Jul;15(4):455–60.

357. Huls M, Brown CDA, Windass AS, Sayer R, van den Heuvel JJMW, Heemskerk S, et al. The breast cancer resistance protein transporter ABCG2 is expressed in the human kidney proximal tubule apical membrane. Kidney Int. 2008 Jan;73(2):220–5.

358. Hediger MA, Clémençon B, Burrier RE, Bruford EA. The ABCs of membrane transporters in health and disease (SLC series): introduction. Mol Aspects Med. 2013 Jun;34(2–3):95–107.

359. Wolff NA, Thies K, Kuhnke N, Reid G, Friedrich B, Lang F, et al. Protein kinase C activation downregulates human organic anion transporter 1-mediated transport through carrier internalization. J Am Soc Nephrol JASN. 2003 Aug;14(8):1959–68.

360. Barros SA, Srimaroeng C, Perry JL, Walden R, Dembla-Rajpal N, Sweet DH, et al. Activation of protein kinase Czeta increases OAT1 (SLC22A6)- and OAT3 (SLC22A8)-mediated transport. J Biol Chem. 2009 Jan 30;284(5):2672–9.

361. Mehrens T, Lelleck S, Cetinkaya I, Knollmann M, Hohage H, Gorboulev V, et al. The affinity of the organic cation transporter rOCT1 is increased by protein kinase C-dependent phosphorylation. J Am Soc Nephrol JASN. 2000 Jul;11(7):1216–24.

362. Zhang X, Wright SH. MATE1 has an external COOH terminus, consistent with a 13-helix topology. Am J Physiol Renal Physiol. 2009 Aug;297(2):F263-271.

363. Zhang X, He X, Baker J, Tama F, Chang G, Wright SH. Twelve transmembrane helices form the functional core of mammalian MATE1 (multidrug and toxin extruder 1) protein. J Biol Chem. 2012 Aug 10;287(33):27971–82.

364. Quistgaard EM, Löw C, Guettou F, Nordlund P. Understanding transport by the major facilitator superfamily (MFS): structures pave the way. Nat Rev Mol Cell Biol. 2016 Jan 13;17(2):123–32.

365. He X, Szewczyk P, Karyakin A, Evin M, Hong W-X, Zhang Q, et al. Structure of a cation-bound multidrug and toxic compound extrusion transporter. Nature. 2010 Oct 21;467(7318):991–4.

366. Matsumoto T, Kanamoto T, Otsuka M, Omote H, Moriyama Y. Role of glutamate residues in substrate recognition by human MATE1 polyspecific H+/organic cation exporter. Am J Physiol Cell Physiol. 2008 Apr;294(4):C1074-1078.

367. Asaka J, Terada T, Tsuda M, Katsura T, Inui K. Identification of essential histidine and cysteine residues of the H+/organic cation antiporter multidrug and toxin extrusion (MATE). Mol Pharmacol. 2007 Jun;71(6):1487–93.

368. Hori R, Maegawa H, Kato M, Katsura T, Inui K. Inhibitory effect of diethyl pyrocarbonate on the H+/organic cation antiport system in rat renal brush-border membranes. J Biol Chem. 1989 Jul 25;264(21):12232–7.

369. Radestock S, Forrest LR. The Alternating-Access Mechanism of MFS Transporters Arises from Inverted-Topology Repeats. J Mol Biol. 2011 Apr 15;407(5):698–715.

370. Forrest LR, Rudnick G. The rocking bundle: a mechanism for ion-coupled solute flux by symmetrical transporters. Physiol Bethesda Md. 2009 Dec;24:377–86.

371. Verdon G, Oh S, Serio RN, Boudker O. Coupled ion binding and structural transitions along the transport cycle of glutamate transporters. eLife. 2014 May 19;3:e02283.

372. Meier-Abt F, Mokrab Y, Mizuguchi K. Organic anion transporting polypeptides of the OATP/SLCO superfamily: identification of new members in nonmammalian species, comparative modeling and a potential transport mode. J Membr Biol. 2005 Dec;208(3):213–27.

373. Pedersen BP, Kumar H, Waight AB, Risenmay AJ, Roe-Zurz Z, Chau BH, et al. Crystal structure of a eukaryotic phosphate transporter. Nature. 2013 Mar 31;496(7446):533–6.

374. Tanaka Y, Hipolito CJ, Maturana AD, Ito K, Kuroda T, Higuchi T, et al. Structural basis for the drug extrusion mechanism by a MATE multidrug transporter. Nature. 2013 Mar 27;496(7444):247–51.

375. Colas C, Ung PM-U, Schlessinger A. SLC Transporters: Structure, Function, and Drug Discovery. MedChemComm. 2016 Jun 1;7(6):1069–81.

376. van de Steeg E, Stránecký V, Hartmannová H, Nosková L, Hřebíček M, Wagenaar E, et al. Complete OATP1B1 and OATP1B3 deficiency causes human Rotor syndrome by interrupting conjugated bilirubin reuptake into the liver. J Clin Invest. 2012 Feb;122(2):519–28.

377. Gründemann D, Gorboulev V, Gambaryan S, Veyhl M, Koepsell H. Drug excretion mediated by a new prototype of polyspecific transporter. Nature. 1994 Dec 8;372(6506):549–52.

378. Volk C. OCTs, OATs, and OCTNs: structure and function of the polyspecific organic ion transporters of the SLC22 family. Wiley Interdiscip Rev Membr Transp Signal. 2014 Jan 1;3(1):1–13.

379. Kimura H, Takeda M, Narikawa S, Enomoto A, Ichida K, Endou H. Human organic anion transporters and human organic cation transporters mediate renal transport of prostaglandins. J Pharmacol Exp Ther. 2002 Apr;301(1):293–8.

380. Eisenhofer G. The role of neuronal and extraneuronal plasma membrane transporters in the inactivation of peripheral catecholamines. Pharmacol Ther. 2001 Jul;91(1):35–62.

381. Fujita T, Urban TJ, Leabman MK, Fujita K, Giacomini KM. Transport of drugs in the kidney by the human organic cation transporter, OCT2 and its genetic variants. J Pharm Sci. 2006 Jan;95(1):25–36.

382. Wu X, Kekuda R, Huang W, Fei YJ, Leibach FH, Chen J, et al. Identity of the organic cation transporter OCT3 as the extraneuronal monoamine transporter (uptake2) and evidence for the expression of the transporter in the brain. J Biol Chem. 1998 Dec 4;273(49):32776–86.

383. Ayala-Lopez N, Jackson WF, Burnett R, Wilson JN, Thompson JM, Watts SW. Organic cation transporter 3 contributes to norepinephrine uptake into perivascular adipose tissue. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2015 Dec 1;309(11):H1904-1914.

384. Gorboulev V, Ulzheimer JC, Akhoundova A, Ulzheimer-Teuber I, Karbach U, Quester S, et al. Cloning and characterization of two human polyspecific organic cation transporters. DNA Cell Biol. 1997 Jul;16(7):871–81.

385. Zhang L, Dresser MJ, Gray AT, Yost SC, Terashita S, Giacomini KM. Cloning and functional expression of a human liver organic cation transporter. Mol Pharmacol. 1997 Jun;51(6):913–21.

386. Sweet DH, Miller DS, Pritchard JB. Basolateral localization of organic cation transporter 2 in intact renal proximal tubules. Am J Physiol Renal Physiol. 2000 Nov;279(5):F826-834.

387. Gorboulev V, Ulzheimer JC, Akhoundova A, Ulzheimer-Teuber I, Karbach U, Quester S, et al. Cloning and characterization of two human polyspecific organic cation transporters. DNA Cell Biol. 1997 Jul;16(7):871–81.

388. Kekuda R, Prasad PD, Wu X, Wang H, Fei YJ, Leibach FH, et al. Cloning and functional characterization of a potential-sensitive, polyspecific organic cation transporter (OCT3) most abundantly expressed in placenta. J Biol Chem. 1998 Jun 26;273(26):15971–9.

389. Pritchard JB. Intracellular alpha-ketoglutarate controls the efficacy of renal organic anion transport. J Pharmacol Exp Ther. 1995 Sep;274(3):1278–84.

390. Sekine T, Miyazaki H, Endou H. Molecular physiology of renal organic anion transporters. Am J Physiol Renal Physiol. 2006 Feb;290(2):F251-261.

391. Sweet DH, Chan LMS, Walden R, Yang X-P, Miller DS, Pritchard JB. Organic anion transporter 3 (Slc22a8) is a dicarboxylate exchanger indirectly coupled to the Na+gradient. Am J Physiol - Ren Physiol. 2003 Apr 1;284(4):F763–9.

392. Ekaratanawong S, Anzai N, Jutabha P, Miyazaki H, Noshiro R, Takeda M, et al. Human organic anion transporter 4 is a renal apical organic anion/dicarboxylate exchanger in the proximal tubules. J Pharmacol Sci. 2004 Mar;94(3):297–304.

393. Bahn A, Hagos Y, Reuter S, Balen D, Brzica H, Krick W, et al. Identification of a new urate and high affinity nicotinate transporter, hOAT10 (SLC22A13). J Biol Chem. 2008 Jun 13;283(24):16332–41.

394. Sekine T, Cha SH, Tsuda M, Apiwattanakul N, Nakajima N, Kanai Y, et al. Identification of multispecific organic anion transporter 2 expressed predominantly in the liver. FEBS Lett. 1998 Jun 12;429(2):179–82.

395. Cheng Y, Vapurcuyan A, Shahidullah M, Aleksunes LM, Pelis RM. Expression of organic anion transporter 2 in the human kidney and its potential role in the tubular secretion of guanine-containing antiviral drugs. Drug Metab Dispos Biol Fate Chem. 2012 Mar;40(3):617–24.

396. Babu E, Takeda M, Narikawa S, Kobayashi Y, Enomoto A, Tojo A, et al. Role of human organic anion transporter 4 in the transport of ochratoxin A. Biochim Biophys Acta. 2002 Jun 12;1590(1–3):64–75.

397. Enomoto A, Kimura H, Chairoungdua A, Shigeta Y, Jutabha P, Cha SH, et al. Molecular identification of a renal urate anion exchanger that regulates blood urate levels. Nature. 2002 May 23;417(6887):447–52.

398. Kimura H, Takeda M, Narikawa S, Enomoto A, Ichida K, Endou H. Human organic anion transporters and human organic cation transporters mediate renal transport of prostaglandins. J Pharmacol Exp Ther. 2002 Apr;301(1):293–8.

399. Cha SH, Sekine T, Kusuhara H, Yu E, Kim JY, Kim DK, et al. Molecular cloning and characterization of multispecific organic anion transporter 4 expressed in the placenta. J Biol Chem. 2000 Feb 11;275(6):4507–12.

400. Roth M, Obaidat A, Hagenbuch B. OATPs, OATs and OCTs: the organic anion and cation transporters of the SLCO and SLC22A gene superfamilies. Br J Pharmacol. 2012 Mar;165(5):1260–87.

401. Motohashi H, Sakurai Y, Saito H, Masuda S, Urakami Y, Goto M, et al. Gene expression levels and immunolocalization of organic ion transporters in the human kidney. J Am Soc Nephrol JASN. 2002 Apr;13(4):866–74.

402. Jacquemin E, Hagenbuch B, Stieger B, Wolkoff AW, Meier PJ. Expression cloning of a rat liver Na(+)-independent organic anion transporter. Proc Natl Acad Sci U S A. 1994 Jan 4;91(1):133–7.

403. Hagenbuch B, Meier PJ. Organic anion transporting polypeptides of the OATP/ SLC21 family: phylogenetic classification as OATP/ SLCO superfamily, new nomenclature and molecular/functional properties. Pflugers Arch. 2004 Feb;447(5):653–65.

404. Stieger B, Hagenbuch B. Organic Anion Transporting Polypeptides. Curr Top Membr. 2014;73:205–32.

405. Zhang Y, Boxberger KH, Hagenbuch B. Organic anion transporting polypeptide 1B3 can form homo- and hetero-oligomers. PloS One. 2017;12(6):e0180257.

406. Mikkaichi T, Suzuki T, Onogawa T, Tanemoto M, Mizutamari H, Okada M, et al. Isolation and characterization of a digoxin transporter and its rat homologue expressed in the kidney. Proc Natl Acad Sci U S A. 2004 Mar 9;101(10):3569–74.

407. Otsuka M, Matsumoto T, Morimoto R, Arioka S, Omote H, Moriyama Y. A human transporter protein that mediates the final excretion step for toxic organic cations. Proc Natl Acad Sci U S A. 2005 Dec 13;102(50):17923–8.

408. Masuda S, Terada T, Yonezawa A, Tanihara Y, Kishimoto K, Katsura T, et al. Identification and functional characterization of a new human kidney-specific H+/organic cation antiporter, kidney-specific multidrug and toxin extrusion 2. J Am Soc Nephrol JASN. 2006 Aug;17(8):2127–35.

409. Komatsu T, Hiasa M, Miyaji T, Kanamoto T, Matsumoto T, Otsuka M, et al. Characterization of the human MATE2 proton-coupled polyspecific organic cation exporter. Int J Biochem Cell Biol. 2011 Jun;43(6):913–8.

410. Wright SH, Wunz TM. Transport of tetraethylammonium by rabbit renal brush-border and basolateral membrane vesicles. Am J Physiol. 1987 Nov;253(5 Pt 2):F1040-1050.

411. Winter TN, Elmquist WF, Fairbanks CA. OCT2 and MATE1 provide bidirectional agmatine transport. Mol Pharm. 2011 Feb 7;8(1):133–42.

412. Chen Y, Zhang S, Sorani M, Giacomini KM. Transport of paraquat by human organic cation transporters and multidrug and toxic compound extrusion family. J Pharmacol Exp Ther. 2007 Aug;322(2):695–700.

413. Ohta K-Y, Inoue K, Hayashi Y, Yuasa H. Molecular identification and functional characterization of rat multidrug and toxin extrusion type transporter 1 as an organic cation/H+ antiporter in the kidney. Drug Metab Dispos Biol Fate Chem. 2006 Nov;34(11):1868–74.

414. Dangprapai Y, Wright SH. Interaction of H+ with the extracellular and intracellular aspects of hMATE1. Am J Physiol Renal Physiol. 2011 Sep;301(3):F520-528.

415. Wright SH, Wunz TM. Influence of substrate structure on turnover of the organic cation/H+ exchanger of the renal luminal membrane. Pflugers Arch. 1998 Aug;436(3):469–77.

416. Tanihara Y, Masuda S, Sato T, Katsura T, Ogawa O, Inui K-I. Substrate specificity of MATE1 and MATE2-K, human multidrug and toxin extrusions/H(+)-organic cation antiporters. Biochem Pharmacol. 2007 Jul 15;74(2):359–71.

417. Damme K, Nies AT, Schaeffeler E, Schwab M. Mammalian MATE (SLC47A) transport proteins: impact on efflux of endogenous substrates and xenobiotics. Drug Metab Rev. 2011 Nov;43(4):499–523.

418. Khanvilkar K, Donovan MD, Flanagan DR. Drug transfer through mucus. Adv Drug Deliv Rev. 2001 Jun 11;48(2–3):173–93.

419. Thomson ABR, Dietschy JM. The Role of the Unstirred Water Layer in Intestinal Permeation. In: Pharmacology of Intestinal Permeation II. 1984. p. 165–269.

420. Back DJ, Rogers SM. Review: first-pass metabolism by the gastrointestinal mucosa. Aliment Pharmacol Ther. 1987 Oct;1(5):339–57.

421. Kaminsky LS. The small intestine as a xenobiotic metabolizing organ. Drug Metab Dispos. 2003 Dec 1;31(12):1520–5.

422. 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.

423. Estudante M, Morais JG, Soveral G, Benet LZ. Intestinal drug transporters: an overview. Adv Drug Deliv Rev. 2013 Oct;65(10):1340–56.

424. Pavek P, Merino G, Wagenaar E, Bolscher E, Novotna M, Jonker JW, et al. Human breast cancer resistance protein: interactions with steroid drugs, hormones, the dietary carcinogen 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo(4,5-b)pyridine, and transport of cimetidine. J Pharmacol Exp Ther. 2005 Jan;312(1):144–52.

425. Moule SK, McGivan JD. Regulation of the plasma membrane potential in hepatocytes--mechanism and physiological significance. Biochim Biophys Acta. 1990 Oct 8;1031(3):383–97.

426. Molinari A, Calcabrini A, Meschini S, Stringaro A, Del Bufalo D, Cianfriglia M, et al. Detection of P-glycoprotein in the Golgi apparatus of drug-untreated human melanoma cells. Int J Cancer. 1998 Mar 16;75(6):885-93.

427. Hayes JH, Soroka CJ, Rios-Velez L, Boyer JL. Hepatic sequestration and modulation of the canalicular transport of the organic cation, daunorubicin, in the rat. Hepatology. 1999 Feb 1;29(2):483–93.

428. Strazzabosco M, Sakisaka S, Hayakawa T, Boyer JL. Effect of UDCA on intracellular and biliary pH in isolated rat hepatocyte couplets and perfused livers. Am J Physiol. 1991 Jan;260(1 Pt 1):G58-69.

429. Ivanyuk A, Livio F, Biollaz J, Buclin T. Renal Drug Transporters and Drug Interactions. Clin Pharmacokinet. 2017 Aug;56(8):825–92.

430. Ullrich KJ. Renal transporters for organic anions and organic cations. Structural requirements for substrates. J Membr Biol. 1997 Jul 15;158(2):95–107.

431. Burckhardt G. Drug transport by Organic Anion Transporters (OATs). Pharmacol Ther. 2012 Oct;136(1):106–30.

432. Cardinal J, Lapointe JY, Laprade R. Luminal and peritubular ionic substitutions and intracellular potential of the rabbit proximal convoluted tubule. Am J Physiol. 1984 Aug;247(2 Pt 2):F352-364.

433. Budiman T, Bamberg E, Koepsell H, Nagel G. Mechanism of electrogenic cation transport by the cloned organic cation transporter 2 from rat. J Biol Chem. 2000 Sep 22;275(38):29413–20.

434. Sato T, Masuda S, Yonezawa A, Tanihara Y, Katsura T, Inui K-I. Transcellular transport of organic cations in double-transfected MDCK cells expressing human organic cation transporters hOCT1/hMATE1 and hOCT2/hMATE1. Biochem Pharmacol. 2008 Oct 1;76(7):894–903.

435. Schäli C, Schild L, Overney J, Roch-Ramel F. Secretion of tetraethylammonium by proximal tubules of rabbit kidneys. Am J Physiol. 1983 Aug;245(2):F238-246.

436. Wright SH, Dantzler WH. Molecular and cellular physiology of renal organic cation and anion transport. Physiol Rev. 2004 Jul;84(3):987–1049.

437. Yoshitomi K, Frömter E. Cell pH of rat renal proximal tubule in vivo and the conductive nature of peritubular HCO3- (OH-) exit. Pflugers Arch. 1984 Nov;402(3):300–5.

438. Nezu J, Tamai I, Oku A, Ohashi R, Yabuuchi H, Hashimoto N, et al. Primary systemic carnitine deficiency is caused by mutations in a gene encoding sodium ion-dependent carnitine transporter. Nat Genet. 1999 Jan;21(1):91–4.

439. Terada T, Inui K. Peptide transporters: structure, function, regulation and application for drug delivery. Curr Drug Metab. 2004 Feb;5(1):85–94.

440. Nishiwaki T, Daigo Y, Tamari M, Fujii Y, Nakamura Y. Molecular cloning, mapping, and characterization of two novel human genes, ORCTL3 and ORCTL4, bearing homology to organic-cation transporters. Cytogenet Cell Genet. 1998;83(3–4):251–5.

441. de Boer AG, van der Sandt ICJ, Gaillard PJ. The role of drug transporters at the blood-brain barrier. Annu Rev Pharmacol Toxicol. 2003;43:629–56.

442. Gao B, Hagenbuch B, Kullak-Ublick GA, Benke D, Aguzzi A, Meier PJ. Organic anion-transporting polypeptides mediate transport of opioid peptides across blood-brain barrier. J Pharmacol Exp Ther. 2000 Jul;294(1):73–9.

443. Ohtsuki S, Asaba H, Takanaga H, Deguchi T, Hosoya K, Otagiri M, et al. Role of blood-brain barrier organic anion transporter 3 (OAT3) in the efflux of indoxyl sulfate, a uremic toxin: its involvement in neurotransmitter metabolite clearance from the brain. J Neurochem. 2002 Oct;83(1):57–66.

444. Couroussé T, Gautron S. Role of organic cation transporters (OCTs) in the brain. Pharmacol Ther. 2015 Feb;146:94–103.

445. Sweet DH, Miller DS, Pritchard JB. Ventricular choline transport: a role for organic cation transporter 2 expressed in choroid plexus. J Biol Chem. 2001 Nov 9;276(45):41611–9.

446. Tai LM, Loughlin AJ, Male DK, Romero IA. P-glycoprotein and breast cancer resistance protein restrict apical-to-basolateral permeability of human brain endothelium to amyloid-beta. J Cereb Blood Flow Metab Off J Int Soc Cereb Blood Flow Metab. 2009 Jun;29(6):1079–83.

447. Su W, Pasternak GW. The role of multidrug resistance-associated protein in the blood-brain barrier and opioid analgesia. Synap N Y N. 2013 Sep;67(9):609–19.

448. Hoffmeyer S, Burk O, von Richter O, Arnold HP, Brockmöller J, Johne A, et al. Functional polymorphisms of the human multidrug-resistance gene: multiple sequence variations and correlation of one allele with P-glycoprotein expression and activity in vivo. Proc Natl Acad Sci U S A. 2000 Mar 28;97(7):3473–8.

449. Meerum Terwogt JM, Malingré MM, Beijnen JH, ten Bokkel Huinink WW, Rosing H, Koopman FJ, et al. Coadministration of oral cyclosporin A enables oral therapy with paclitaxel. Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res. 1999 Nov;5(11):3379–84.

450. Jansen J, Friesema ECH, Milici C, Visser TJ. Thyroid hormone transporters in health and disease. Thyroid Off J Am Thyroid Assoc. 2005 Aug;15(8):757–68.

451. Blokzijl H, van Steenpaal A, Vander Borght S, Bok LIH, Libbrecht L, Tamminga M, et al. Up-regulation and cytoprotective role of epithelial multidrug resistance-associated protein 1 in inflammatory bowel disease. J Biol Chem. 2008 Dec 19;283(51):35630–7.

452. Beedholm-Ebsen R, van de Wetering K, Hardlei T, Nexø E, Borst P, Moestrup SK. Identification of multidrug resistance protein 1 (MRP1/ABCC1) as a molecular gate for cellular export of cobalamin. Blood. 2010 Feb 25;115(8):1632–9.

453. Hatcher JM, Delea KC, Richardson JR, Pennell KD, Miller GW. Disruption of dopamine transport by DDT and its metabolites. Neurotoxicology. 2008 Jul;29(4):682–90.

454. Narayan S, Sinsheimer JS, Paul KC, Liew Z, Cockburn M, Bronstein JM, et al. Genetic variability in ABCB1, occupational pesticide exposure, and Parkinson's disease. Environ Res. 2015 Nov;143(Pt A):98–106.

455. Shabbir A, DiStasio S, Zhao J, Cardozo CP, Wolff MS, Caplan AJ. Differential effects of the organochlorine pesticide DDT and its metabolite p,p'-DDE on p-glycoprotein activity and expression. Toxicol Appl Pharmacol. 2005 Mar 1;203(2):91–8.

456. Bircsak KM, Richardson JR, Aleksunes LM. Inhibition of human MDR1 and BCRP transporter ATPase activity by organochlorine and pyrethroid insecticides. J Biochem Mol Toxicol. 2013 Feb;27(2):157–64.

457. Nicklisch SCT, Rees SD, McGrath AP, Gökirmak T, Bonito LT, Vermeer LM, et al. Global marine pollutants inhibit P-glycoprotein: Environmental levels, inhibitory effects, and cocrystal structure. Sci Adv. 2016 Apr;2(4):e1600001.

458. Lacher SE, Skagen K, Veit J, Dalton R, Woodahl EL. P-Glycoprotein Transport of Neurotoxic Pesticides. J Pharmacol Exp Ther. 2015 Oct;355(1):99–107.

459. Lu X, Long Y, Lin L, Sun R, Zhong S, Cui Z. Characterization of zebrafish Abcc4 as an efflux transporter of organochlorine pesticides. PloS One. 2014;9(12):e111664.

460. Bain LJ, LeBlanc GA. Interaction of structurally diverse pesticides with the human MDR1 gene product P-glycoprotein. Toxicol Appl Pharmacol. 1996 Nov;141(1):288–98.

461. Tribull TE, Bruner RH, Bain LJ. The multidrug resistance-associated protein 1 transports methoxychlor and protects the seminiferous epithelium from injury. Toxicol Lett. 2003 Apr 30;142(1–2):61–70.

462. Jandacek R, Tso P. Enterohepatic circulation of organochlorine compounds: a site for nutritional intervention? J Nutr Biochem. 2007 Mar;18(3):163–7.

463. 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 Mar;28(3):119–28.

464. Belfiore CJ, Yang RSH, Chubb LS, Lohitnavy M, Lohitnavy OS, Andersen ME. Hepatic sequestration of chlordecone and hexafluoroacetone evaluated by pharmacokinetic modeling. Toxicology. 2007 May 5;234(1–2):59–72.

465. Cohn WJ, Boylan JJ, Blanke RV, Fariss MW, Howell JR, Guzelian PS. Treatment of chlordecone (Kepone) toxicity with cholestyramine. Results of a controlled clinical trial. N Engl J Med. 1978 Feb 2;298(5):243–8.

466. Pivčević B, Zaja R. Pesticides and their binary combinations as P-glycoprotein inhibitors in NIH 3T3/MDR1 cells. Environ Toxicol Pharmacol. 2006 Nov;22(3):268–76.

467. Li G, Kim C, Kim J, Yoon H, Zhou H, Kim J. Common Pesticide, Dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT), Increases Amyloid-β Levels by Impairing the Function of ABCA1 and IDE: Implication for Alzheimer's Disease. J Alzheimers Dis JAD. 2015;46(1):109–22.

468. Lee J, Scheri RC, Curtis LR. Chlordecone altered hepatic disposition of [14C]cholesterol and plasma cholesterol distribution but not SR-BI or ABCG8 proteins in livers of C57BL/6 mice. Toxicol Appl Pharmacol. 2008 Jun 15;229(3):265–72.

469. Teo S, Vore M. Mirex exposure inhibits the uptake of estradiol-17 beta(beta-D-glucuronide), taurocholate, and L-alanine into isolated rat hepatocytes. Toxicol Appl Pharmacol. 1990 Jul;104(3):411–20.

470. Sreeramulu K, Liu R, Sharom FJ. Interaction of insecticides with mammalian P-glycoprotein and their effect on its transport function. Biochim Biophys Acta. 2007 Jul;1768(7):1750–7.

471. Kiyosawa N, Kwekel JC, Burgoon LD, Williams KJ, Tashiro C, Chittim B, et al. o,p'-DDT elicits PXR/CAR-, not ER-, mediated responses in the immature ovariectomized rat liver. Toxicol Sci Off J Soc Toxicol. 2008 Feb;101(2):350–63.

472. Barnhill ML, Rosemond MVM, Curtis LR. Dieldrin stimulates biliary excretion of 14C-benzo[a]pyrene polar metabolites but does not change the biliary metabolite profile in rainbow trout (Oncorhyncus mykiss). Toxicol Sci Off J Soc Toxicol. 2003 Oct;75(2):249–59.

473. Gilroy DJ, Carpenter HM, Curtis LR. Chlordecone pretreatment alters [14C]chlordecone and [14C]cholesterol transport kinetics in the perfused rat liver. Fundam Appl Toxicol Off J Soc Toxicol. 1994 Feb;22(2):286–92.

474. 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.

475. Cavret S, Videmann B, Mazallon M, Lecoeur S. Diazinon cytotoxicity and transfer in Caco-2 cells: Effect of long-term exposure to the pesticide. Environ Toxicol Pharmacol. 2005 Sep;20(2):375–80.

476. Popovic M, Zaja R, Fent K, Smital T. Interaction of environmental contaminants with zebrafish organic anion transporting polypeptide, Oatp1d1 (Slco1d1). Toxicol Appl Pharmacol. 2014 Oct 1;280(1):149–58.

477. Sultatos LG, Murphy SD. Kinetic analyses of the microsomal biotransformation of the phosphorothioate insecticides chlorpyrifos and parathion. Fundam Appl Toxicol Off J Soc Toxicol. 1983 Feb;3(1):16–21.

478. Lanning CL, Fine RL, Sachs CW, Rao US, Corcoran JJ, Abou-Donia MB. Chlorpyrifos oxon interacts with the mammalian multidrug resistance protein, P-glycoprotein. J Toxicol Environ Health. 1996 Mar;47(4):395–407.

479. Yalkowsky SH, He Y, Jain P. Handbook of aqueous solubility data. 2010.

480. Halwachs S, Schäfer I, Kneuer C, Seibel P, Honscha W. Assessment of ABCG2-mediated transport of pesticides across the rabbit placenta barrier using a novel MDCKII in vitro model. Toxicol Appl Pharmacol. 2016 Aug 15;305:66–74.

481. Nornberg BF, Batista CR, Almeida DV, Trindade GS, Marins LF. ABCB1 and ABCC4 efflux transporters are involved in methyl parathion detoxification in ZFL cells. Toxicol Vitro Int J Publ Assoc BIBRA. 2015 Feb;29(1):204–10.

482. Habibollahi P, Ghahremani MH, Azizi E, Ostad SN. Multi drug resistance-1 (MDR1) expression in response to chronic diazinon exposure: an in vitro study on Caco-2 cells. Bull Environ Contam Toxicol. 2011 Jan;86(1):105–9.

483. Baldwin WS, Roling JA. A Concentration Addition Model for the Activation of the Constitutive Androstane Receptor by Xenobiotic Mixtures. Toxicol Sci. 2009 Jan;107(1):93–105.

484. Agarwala S, Chen W, Cook TJ. Effect of chlorpyrifos on efflux transporter gene expression and function in Caco-2 cells. Toxicol Vitro Int J Publ Assoc BIBRA. 2004 Aug;18(4):403–9.

485. Ridano ME, Racca AC, Flores-Martin JB, Fretes R, Bandeira CL, Reyna L, et al. Impact of chlorpyrifos on human villous trophoblasts and chorionic villi. Toxicol Appl Pharmacol. 2017 Aug 15;329:26–39.

486. Ridano ME, Racca AC, Flores-Martín J, Camolotto SA, de Potas GM, Genti-Raimondi S, et al. Chlorpyrifos modifies the expression of genes involved in human placental function. Reprod Toxicol Elmsford N. 2012 Jun;33(3):331–8.

487. Kang X-L, Zhang M, Wang K, Qiao X-F, Chen M-H. Molecular cloning, expression pattern of multidrug resistance associated protein 1 (MRP1, ABCC1) gene, and the synergistic effects of

verapamil on toxicity of two insecticides in the bird cherry-oat aphid. Arch Insect Biochem Physiol. 2016 May;92(1):65–84.

488. 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 Off J Soc Toxicol. 2013 Dec;136(2):284–93.

489. Li H-Y, Wu S-Y, Shi N. Transcription factor Nrf2 activation by deltamethrin in PC12 cells: Involvement of ROS. Toxicol Lett. 2007 Jun 15;171(1–2):87–98.

490. Goulart TLS, Boyle RT, Souza MM. Cytotoxicity of the association of pesticides Roundup Transorb® and Furadan 350 SC® on the zebrafish cell line, ZF-L. Toxicol Vitro Int J Publ Assoc BIBRA. 2015 Oct;29(7):1377–84.

491. Brunet J-L, Maresca M, Fantini J, Belzunces LP. Human intestinal absorption of imidacloprid with Caco-2 cells as enterocyte model. Toxicol Appl Pharmacol. 2004 Jan 1;194(1):1–9.

492. Oosterhuis B, Vukman K, Vági E, Glavinas H, Jablonkai I, Krajcsi P. Specific interactions of chloroacetanilide herbicides with human ABC transporter proteins. Toxicology. 2008 Jun 3;248(1):45–51.

493. Leslie EM, Deeley RG, Cole SP. Toxicological relevance of the multidrug resistance protein 1, MRP1 (ABCC1) and related transporters. Toxicology. 2001 Oct 5;167(1):3–23.

494. Kolmodin-Hedman B, Höglund S, Swensson A, Akerblom M. Studies on phenoxy acid herbicides. II. Oral and dermal uptake and elimination in urine of MCPA in humans. Arch Toxicol. 1983 Dec;54(4):267–73.

495. Carmichael NG, Nolan RJ, Perkins JM, Davies R, Warrington SJ. Oral and dermal pharmacokinetics of triclopyr in human volunteers. Hum Toxicol. 1989 Nov;8(6):431–7.

496. Kimura O, Tsukagoshi K, Hayasaka M, Endo T. Uptake of triclopyr (3,5,6-trichloro-2-pyridinyloxyacetic acid) and dicamba (3,6-dichloro-2-methoxybenzoic acid) from the apical membranes of the human intestinal Caco-2 cells. Arch Toxicol. 2012 Jan;86(1):55–61.

497. Kimura O, Tsukagoshi K, Endo T. Uptake of 4-chloro-2-methylphenoxyacetic acid (MCPA) from the apical membrane of Caco-2 cells by the monocarboxylic acid transporter. Toxicol Appl Pharmacol. 2008 Mar 15;227(3):325–30.

498. Kimura O, Tsukagoshi K, Endo T. Uptake of phenoxyacetic acid derivatives into Caco-2 cells by the monocarboxylic acid transporters. Toxicol Lett. 2009 Sep 10;189(2):102–9.

499. Nagata Y, Kusuhara H, Imaoka T, Endou H, Sugiyama Y. Involvement of rat organic anion transporter 3 in the uptake of an organic herbicide, 2,4-dichlorophenoxyacetate, by the isolated rat choroid plexus. J Pharm Sci. 2004 Nov;93(11):2724–32.

500. Chan BS, Lazzaro VA, Seale JP, Duggin GG. Transport of paraquat in a renal epithelial cell line LLC-PK1. J Pharmacol Exp Ther. 1996 Nov;279(2):625–32.

501. Chan BS, Lazzaro VA, Seale JP, Duggin GG. The renal excretory mechanisms and the role of organic cations in modulating the renal handling of paraquat. Pharmacol Ther. 1998 Sep;79(3):193–203.

502. Li Q, Peng X, Yang H, Wang H, Shu Y. Deficiency of multidrug and toxin extrusion 1 enhances renal accumulation of paraquat and deteriorates kidney injury in mice. Mol Pharm. 2011 Dec 5;8(6):2476–83.

503. Lacher SE, Gremaud JN, Skagen K, Steed E, Dalton R, Sugden KD, et al. Absence of P-glycoprotein transport in the pharmacokinetics and toxicity of the herbicide paraquat. J Pharmacol Exp Ther. 2014 Feb;348(2):336–45.

504. Zerin T, Kim Y-S, Hong S-Y, Song H-Y. Protective effect of methylprednisolone on paraquat-induced A549 cell cytotoxicity via induction of efflux transporter, P-glycoprotein expression. Toxicol Lett. 2012 Jan 25;208(2):101–7.

505. Wen X, Gibson CJ, Yang I, Buckley B, Goedken MJ, Richardson JR, et al. MDR1 transporter protects against paraquat-induced toxicity in human and mouse proximal tubule cells. Toxicol Sci Off J Soc Toxicol. 2014 Oct;141(2):475–83.

506. Vilas-Boas V, Silva R, Guedes-de-Pinho P, Carvalho F, Bastos ML, Remião F. RBE4 cells are highly resistant to paraquat-induced cytotoxicity: studies on uptake and efflux mechanisms. J Appl Toxicol JAT. 2014 Sep;34(9):1023–30.

507. Dinis-Oliveira RJ, Duarte JA, Remião F, Sánchez-Navarro A, Bastos ML, Carvalho F. Single high dose dexamethasone treatment decreases the pathological score and increases the survival rate of paraquat-intoxicated rats. Toxicology. 2006 Oct;227(1–2):73–85.

508. Silva R, Carmo H, Dinis-Oliveira R, Cordeiro-da-Silva A, Lima SC, Carvalho F, et al. In vitro study of P-glycoprotein induction as an antidotal pathway to prevent cytotoxicity in Caco-2 cells. Arch Toxicol. 2011 Apr;85(4):315–26.

509. Shimizu K, Ohtaki K, Matsubara K, Aoyama K, Uezono T, Saito O, et al. Carrier-mediated processes in blood--brain barrier penetration and neural uptake of paraquat. Brain Res. 2001 Jul 6;906(1–2):135–42.

510. Silva R, Carmo H, Vilas-Boas V, Barbosa DJ, Monteiro M, de Pinho PG, et al. Several transport systems contribute to the intestinal uptake of Paraquat, modulating its cytotoxic effects. Toxicol Lett. 2015 Jan 5;232(1):271–83.

511. Langston JW, Ballard P, Tetrud JW, Irwin I. Chronic Parkinsonism in humans due to a product of meperidine-analog synthesis. Science. 1983 Feb 25;219(4587):979–80.

512. Langston JW, Irwin I, Langston EB, Forno LS. 1-Methyl-4-phenylpyridinium ion (MPP+): identification of a metabolite of MPTP, a toxin selective to the substantia nigra. Neurosci Lett. 1984 Jul 13;48(1):87–92.

513. Ahmadimoghaddam D, Hofman J, Zemankova L, Nachtigal P, Dolezelova E, Cerveny L, et al. Synchronized Activity of Organic Cation Transporter 3 (Oct3/Slc22a3) and Multidrug and Toxin Extrusion 1 (Mate1/Slc47a1) Transporter in Transplacental Passage of MPP+ in Rat. Toxicol Sci. 2012 Aug;128(2):471–81.

514. Ingoglia F, Visigalli R, Rotoli BM, Barilli A, Riccardi B, Puccini P, et al. Functional characterization of the organic cation transporters (OCTs) in human airway pulmonary epithelial cells. Biochim Biophys Acta BBA - Biomembr. 2015 Jul;1848(7):1563–72.

515. Hacker K, Maas R, Kornhuber J, Fromm MF, Zolk O. Substrate-Dependent Inhibition of the Human Organic Cation Transporter OCT2: A Comparison of Metformin with Experimental Substrates. Deli MA, editor. PLOS ONE. 2015 Sep 1;10(9):e0136451.

516. Guillot TS, Miller GW. Protective actions of the vesicular monoamine transporter 2 (VMAT2) in monoaminergic neurons. Mol Neurobiol. 2009 Apr;39(2):149–70.

517. Griffin J, Fletcher N, Clemence R, Blanchflower S, Brayden DJ. Selamectin is a potent substrate and inhibitor of human and canine P-glycoprotein. J Vet Pharmacol Ther. 2005 Jun;28(3):257–65.

518. Schinkel AH, Smit JJ, van Tellingen O, Beijnen JH, Wagenaar E, van Deemter L, et al. Disruption of the mouse mdr1a P-glycoprotein gene leads to a deficiency in the blood-brain barrier and to increased sensitivity to drugs. Cell. 1994 May 20;77(4):491–502.

519. Mealey KL, Bentjen SA, Gay JM, Cantor GH. Ivermectin sensitivity in collies is associated with a deletion mutation of the mdr1 gene. Pharmacogenetics. 2001 Nov;11(8):727–33.

520. Mealey KL, Northrup NC, Bentjen SA. Increased toxicity of P-glycoprotein-substrate chemotherapeutic agents in a dog with the MDR1 deletion mutation associated with ivermectin sensitivity. J Am Vet Med Assoc. 2003 Nov 15;223(10):1453–5, 1434.

521. Geyer J, Gavrilova O, Petzinger E. Brain penetration of ivermectin and selamectin in mdr1a,b P-glycoprotein- and bcrp- deficient knockout mice. J Vet Pharmacol Ther. 2009 Feb;32(1):87–96.

522. Macdonald N, Gledhill A. Potential impact of ABCB1 (p-glycoprotein) polymorphisms on avermectin toxicity in humans. Arch Toxicol. 2007 Aug;81(8):553–63.

523. Dunn ST, Hedges L, Sampson KE, Lai Y, Mahabir S, Balogh L, et al. Pharmacokinetic interaction of the antiparasitic agents ivermectin and spinosad in dogs. Drug Metab Dispos Biol Fate Chem. 2011 May;39(5):789–95.

524. Lu W-J, Tamai I, Nezu J, Lai M-L, Huang J-D. Organic anion transporting polypeptide-C mediates arsenic uptake in HEK-293 cells. J Biomed Sci. 2006 Jul;13(4):525–33.

525. Liu J, Liu Y, Powell DA, Waalkes MP, Klaassen CD. Multidrug-resistance mdr1a/1b double knockout mice are more sensitive than wild type mice to acute arsenic toxicity, with higher arsenic accumulation in tissues. Toxicology. 2002 Jan 15;170(1–2):55–62.

526. Vernhet L, Allain N, Bardiau C, Anger JP, Fardel O. Differential sensitivities of MRP1-overexpressing lung tumor cells to cytotoxic metals. Toxicology. 2000 Jan 3;142(2):127–34.

527. Salerno M, Petroutsa M, Garnier-Suillerot A. The MRP1-mediated effluxes of arsenic and antimony do not require arsenic-glutathione and antimony-glutathione complex formation. J Bioenerg Biomembr. 2002 Apr;34(2):135–45.

528. Carew MW, Leslie EM. Selenium-dependent and -independent transport of arsenic by the human multidrug resistance protein 2 (MRP2/ABCC2): implications for the mutual detoxification of arsenic and selenium. Carcinogenesis. 2010 Aug;31(8):1450–5.

529. Leslie EM, Haimeur A, Waalkes MP. Arsenic transport by the human multidrug resistance protein 1 (MRP1/ABCC1). Evidence that a tri-glutathione conjugate is required. J Biol Chem. 2004 Jul 30;279(31):32700–8.

530. Lorico A, Bertola A, Baum C, Fodstad O, Rappa G. Role of the Multidrug Resistance Protein 1 in protection from heavy metal oxyanions: investigations in vitro and in MRP1-deficient mice. Biochem Biophys Res Commun. 2002 Mar 1;291(3):617–22.

531. Belzer M, Morales M, Jagadish B, Mash EA, Wright SH. Substrate-Dependent Ligand Inhibition of the Human Organic Cation Transporter OCT2. J Pharmacol Exp Ther. 2013 Aug;346(2):300–10.

532. Jani M, Makai I, Kis E, Szabó P, Nagy T, Krajcsi P, et al. Ivermectin interacts with human ABCG2. J Pharm Sci. 2011 Jan;100(1):94–7.

533. Didier A, Loor F. The abamectin derivative ivermectin is a potent P-glycoprotein inhibitor. Anticancer Drugs. 1996 Sep;7(7):745–51.

534. Mazur CS, Marchitti SA, Zastre J. P-glycoprotein inhibition by the agricultural pesticide propiconazole and its hydroxylated metabolites: Implications for pesticide-drug interactions. Toxicol Lett. 2015 Jan 5;232(1):37–45.

535. Yagdiran Y, Oskarsson A, Knight CH, Tallkvist J. ABC- and SLC-Transporters in Murine and Bovine Mammary Epithelium--Effects of Prochloraz. PloS One. 2016;11(3):e0151904.

536. Halwachs S, Wassermann L, Lindner S, Zizzadoro C, Honscha W. Fungicide prochloraz and environmental pollutant dioxin induce the ABCG2 transporter in bovine mammary epithelial cells by the arylhydrocarbon receptor signaling pathway. Toxicol Sci Off J Soc Toxicol. 2013 Feb;131(2):491–501.

537. Sergent T, Dupont I, Jassogne C, Ribonnet L, van der Heiden E, Scippo M-L, et al. CYP1A1 induction and CYP3A4 inhibition by the fungicide imazalil in the human intestinal Caco-2 cells-comparison with other conazole pesticides. Toxicol Lett. 2009 Feb 10;184(3):159–68.

538. Roques BB, Leghait J, Lacroix MZ, Lasserre F, Pineau T, Viguié C, et al. The nuclear receptors pregnane X receptor and constitutive androstane receptor contribute to the impact of fipronil on hepatic gene expression linked to thyroid hormone metabolism. Biochem Pharmacol. 2013 Oct 1;86(7):997–1039.

539. Vernhet L, Séité MP, Allain N, Guillouzo A, Fardel O. Arsenic induces expression of the multidrug resistance-associated protein 2 (MRP2) gene in primary rat and human hepatocytes. J Pharmacol Exp Ther. 2001 Jul;298(1):234–9.

540. Pi J, Qu W, Reece JM, Kumagai Y, Waalkes MP. Transcription factor Nrf2 activation by inorganic arsenic in cultured keratinocytes: involvement of hydrogen peroxide. Exp Cell Res. 2003 Nov 1;290(2):234–45.

541. Chin KV, Tanaka S, Darlington G, Pastan I, Gottesman MM. Heat shock and arsenite increase expression of the multidrug resistance (MDR1) gene in human renal carcinoma cells. J Biol Chem. 1990 Jan 5;265(1):221–6.

542. Wielandt AM, Vollrath V, Manzano M, Miranda S, Accatino L, Chianale J. Induction of the multispecific organic anion transporter (cMoat/mrp2) gene and biliary glutathione secretion by the herbicide 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid in the mouse liver. Biochem J. 1999 Jul 1;341 (Pt 1):105–11.

543. Chen Z-S, Mutoh M, Sumizawa T, Furukawa T, Haraguchi M, Tani A, et al. Reversal of Heavy Metal Resistance in Multidrug-Resistant Human KB Carcinoma Cells. Biochem Biophys Res Commun. 1997 Jul;236(3):586–90.

544. 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.

545. Wesołowska O, Mosiądz D, Motohashi N, Kawase M, Michalak K. Phenothiazine maleates stimulate MRP1 transport activity in human erythrocytes. Biochim Biophys Acta BBA - Biomembr. 2005 Dec 30;1720(1–2):52–8.

546. Pizzagalli F, Varga Z, Huber RD, Folkers G, Meier PJ, St-Pierre MV. Identification of Steroid Sulfate Transport Processes in the Human Mammary Gland. J Clin Endocrinol Metab. 2003 Aug 1;88(8):3902–12.

547. Kondratov RV, Komarov PG, Becker Y, Ewenson A, Gudkov AV. Small molecules that dramatically alter multidrug resistance phenotype by modulating the substrate specificity of P-glycoprotein. Proc Natl Acad Sci U S A. 2001 Nov 20;98(24):14078–83.

548. Zelcer N, Huisman MT, Reid G, Wielinga P, Breedveld P, Kuil A, et al. Evidence for two interacting ligand binding sites in human multidrug resistance protein 2 (ATP binding cassette C2). J Biol Chem. 2003 Jun 27;278(26):23538–44.

549. Evers R, de Haas M, Sparidans R, Beijnen J, Wielinga PR, Lankelma J, et al. Vinblastine and sulfinpyrazone export by the multidrug resistance protein MRP2 is associated with glutathione export. Br J Cancer. 2000 Aug;83(3):375–83.

550. Iancu CV, Zamoon J, Woo SB, Aleshin A, Choe J. Crystal structure of a glucose/H+ symporter and its mechanism of action. Proc Natl Acad Sci U S A. 2013 Oct 29;110(44):17862–7.

551. Rost B, Liu J, Nair R, Wrzeszczynski KO, Ofran Y. Automatic prediction of protein function. Cell Mol Life Sci CMLS. 2003 Dec;60(12):2637–50.

552. Chedik L, Mias-Lucquin D, Bruyere A, Fardel O. In Silico Prediction for Intestinal Absorption and Brain Penetration of Chemical Pesticides in Humans. Int J Environ Res Public Health. 2017 Jun 30;14(7):708.

553. Schuetz EG, Schuetz JD, Thompson MT, Fisher RA, Madariage JR, Strom SC. Phenotypic variability in induction of P-glycoprotein mRNA by aromatic hydrocarbons in primary human hepatocytes. Mol Carcinog. 1995 Feb;12(2):61–5.

554. Jigorel E, Le Vee M, Boursier-Neyret C, Parmentier Y, Fardel O. Differential regulation of sinusoidal and canalicular hepatic drug transporter expression by xenobiotics activating drug-sensing receptors in primary human hepatocytes. Drug Metab Dispos Biol Fate Chem. 2006 Oct;34(10):1756–63.

555. Maher JM, Cheng X, Slitt AL, Dieter MZ, Klaassen CD. Induction of the multidrug resistance-associated protein family of transporters by chemical activators of receptor-mediated pathways in mouse liver. Drug Metab Dispos Biol Fate Chem. 2005 Jul;33(7):956–62.

556. Letschert K, Faulstich H, Keller D, Keppler D. Molecular characterization and inhibition of amanitin uptake into human hepatocytes. Toxicol Sci Off J Soc Toxicol. 2006 May;91(1):140–9.

557. Ueo H, Motohashi H, Katsura T, Inui K. Human organic anion transporter hOAT3 is a potent transporter of cephalosporin antibiotics, in comparison with hOAT1. Biochem Pharmacol. 2005 Oct 1;70(7):1104–13.

558. Tachampa K, Takeda M, Khamdang S, Noshiro-Kofuji R, Tsuda M, Jariyawat S, et al. Interactions of organic anion transporters and organic cation transporters with mycotoxins. J Pharmacol Sci. 2008 Mar;106(3):435–43.

559. van Herwaarden AE, Wagenaar E, Karnekamp B, Merino G, Jonker JW, Schinkel AH. Breast cancer resistance protein (Bcrp1/Abcg2) reduces systemic exposure of the dietary carcinogens aflatoxin B1, IQ and Trp-P-1 but also mediates their secretion into breast milk. Carcinogenesis. 2006 Jan;27(1):123–30.

560. Loe DW, Stewart RK, Massey TE, Deeley RG, Cole SP. ATP-dependent transport of aflatoxin B1 and its glutathione conjugates by the product of the multidrug resistance protein (MRP) gene. Mol Pharmacol. 1997 Jun;51(6):1034–41.

561. Bruyere A, Hubert C, Le Vee M, Chedik L, Sayyed K, Stieger B, et al. Inhibition of SLC drug transporter activities by environmental bisphenols. Toxicol Vitro Int J Publ Assoc BIBRA. 2017 Apr;40:34–44.

562. Sayyed K, Le Vee M, Abdel-Razzak Z, Fardel O. Inhibition of organic anion transporter (OAT) activity by cigarette smoke condensate. Toxicol Vitro Int J Publ Assoc BIBRA. 2017 Oct;44:27–35.

563. César-Razquin A, Snijder B, Frappier-Brinton T, Isserlin R, Gyimesi G, Bai X, et al. A Call for Systematic Research on Solute Carriers. Cell. 2015 Jul 30;162(3):478–87.

CHAPITRE VI : AUTRES CONTRIBUTIONS SCIENTIFIQUES

International Journal of
Environmental Research and Public Health

MDPI

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 LogP value calculated according to the Wildman–Crippen method (WLogP), 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 WLogP versus tPSA [21]. The compounds included in these ellipses are predicted to display high intestinal absorption, i.e., the fraction absorbed (Fa) is $\geq$0.30, with Fa equal to the amount of absorbed chemical/amount of ingested chemical, or brain permeation, i.e., the brain-blood concentration ratio is $\geq$1 (the LogBB, defined as the logarithm of the ratio of the drug concentration in the brain versus that in the blood, is therefore $\geq$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 LogS (Silicos-IT), the lipophilicity parameter LogP 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 (Talete, 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 Fa 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 Fa values were given as a range of values

for one ingested dose, the median value was retained. When different Fa 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 Fa was $\geq$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:

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

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).

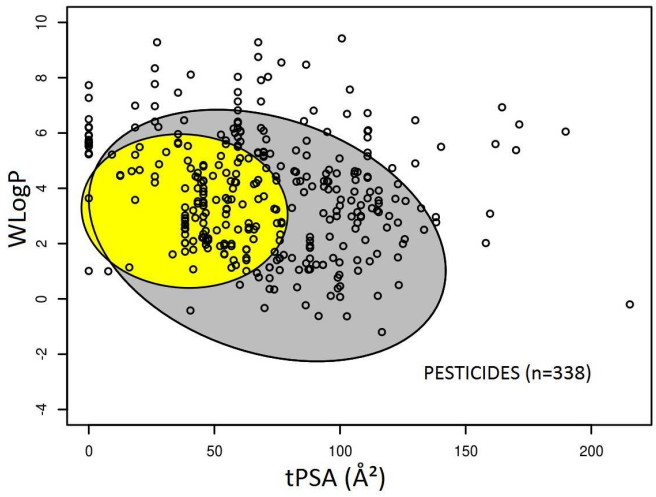


Figure 1. Graphical distribution of pesticides using the BOILED-Egg predictive model for intestine and brain permeation. Each pesticide corresponds to a small black circle. The grey region is the physicochemical space of pesticides (n = 275) predicted to exhibit high intestinal absorption, and the yellow 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.

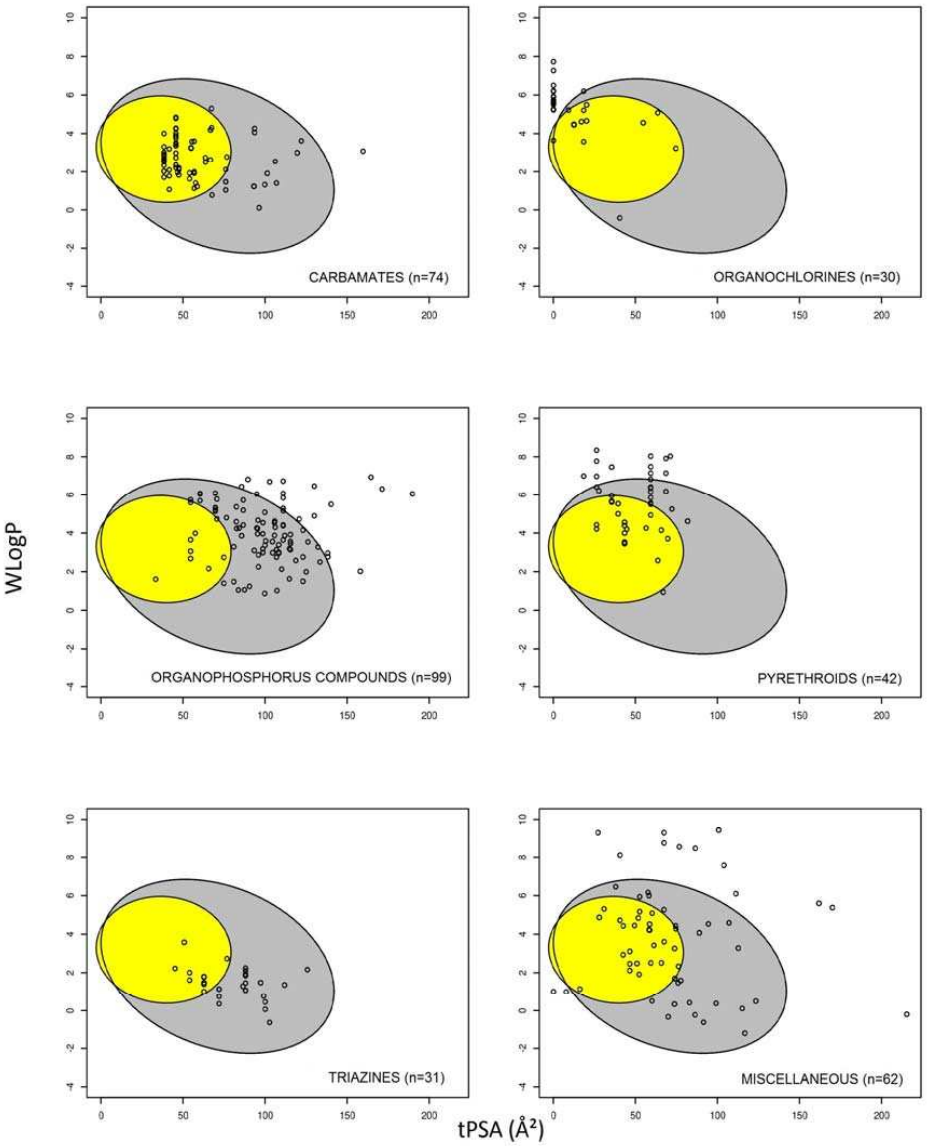


Figure 2. Graphical distribution of pesticides according to chemical classes using the BOILED-Egg predictive model for intestine and brain permeation. Each member of a chemical pesticide class corresponds to a small black circle. The grey region is the physicochemical space of pesticides predicted to 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.

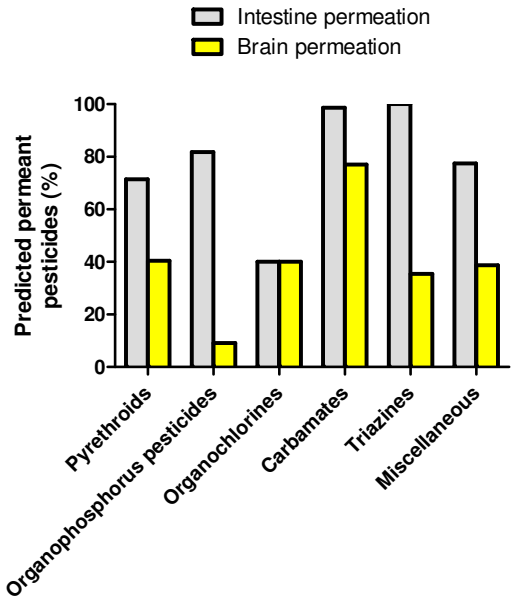


Figure 3. Percentage of predicted intestine- and brain-permeant molecules for the main chemical classes of pesticides.

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 ± SD)		
	Low Intestinal Absorption (n = 63 Pesticides)	High Intestinal Absorption (n = 275 Pesticides)	Significance [2]
Molecular weight (g/mol)	420.4 ± 145.4	284.0 ± 79.3	S ($p < 0.0001$)
Mean atomic van der Waals volume	0.7 ± 0.1	0.6 ± 0.1	S ($p < 0.0001$)
Mean atomic polarizability	0.8 ± 0.5	0.7 ± 0.1	S ($p < 0.0001$)
Number of heavy atoms	24.2 ± 11.4	18.0 ± 5.3	S ($p < 0.0001$)
Number of aromatic heavy carbons	6.6 ± 6.3	5.5 ± 4.4	NS ($p = 0.1050$)
Fraction Csp3	0.5 ± 0.3	0.5 ±0.3	NS ($p = 0.7335$)
Number of rotatable bonds	6.2 ± 4.2	5.4 ± 2.2	S ($p = 0.0252$)
Number of H-bond acceptors	4.5 ± 4.3	3.5 ± 1.6	S ($p = 0.0031$)
Number of H-bond donors	0.4 ± 0.9	0.6 ± 0.8	NS ($p = 0.0550$)
LogS (Silicos-IT)	−6.0 ± 2.5	−3.8 ± 1.9	S ($p < 0.0001$)
XLogP3	5.2 ± 2.1	3.1 ± 1.8	S ($p < 0.0001$)
Molar refractivity	97.4 ± 37.6	73.2 ± 19.9	S ($p < 0.0001$)
tPSA (Å^2)	68.1 ± 61.3	70.3 ± 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 ± SD)		
	No-Brain Permeation (n = 208 Pesticides)	Brain Permeation (n = 130 Pesticides)	Significance [2]
Molecular weight (g/mol)	332.2 ± 120.2	273.1 ± 74.6	S ($p < 0.0001$)
Mean atomic van der Waals volume	0.7 ± 0.1	0.6 ± 0.1	S ($p = 0.0225$)
Mean atomic polarizability	0.7 ± 0.3	0.7 ± 0.1	NS ($p = 0.0510$)
Number of heavy atoms	20.0 ± 8.3	17.8 ± 4.8	S ($p = 0.0061$)
Number of aromatic heavy carbons	5.9 ± 5.2	5.4 ± 4.2	NS ($p = 0.3634$)
Fraction Csp3	0.5 ± 0.3	0.5 ± 0.3	NS ($p = 0.4746$)
Number of rotatable bonds	6.0 ± 2.9	4.8 ± 2.2	S ($p < 0.0001$)
Number of H-bond acceptors	4.3 ± 2.7	2.8 ± 1.3	S ($p < 0.0001$)
Number of H-bond donors	0.6 ± 0.9	0.6 ± 0.7	NS ($p = 0.6422$)
LogS (Silicos-IT)	−4.2 ± 2.5	−4.1 ± 1.6	NS ($p = 0.6153$)
XLogP3	3.6 ± 2.4	3.4 ± 1.4	NS ($p = 0.4395$)
Molar refractivity	81.1 ± 29.1	72.2 ± 18.4	S ($p = 0.0021$)
tPSA (Å^2)	83.3 ± 39.2	48.5 ± 15.2	S ($p < 0.0001$)
Number of N and O atoms	4.4 ± 2.5	3.4 ± 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., Fa $\geq$ 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 $\geq$ 0.32 [44])	High
Bendiocarb	Carbamate	High (Fa $\geq$ 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	Organosphosphorus compund	High (Fa > 0.66 [54])	High
Dichlorvos	Organophosphorus compound	High (Fa > 0.36 [55])	High
Dimethoate	Organosphosphorus 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 $\leq$ 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 $\geq$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 $Å^2$ [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 $Å^2$ for brain permeation, whereas the tPSA threshold is higher, i.e., 120 $Å^2$, 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 organosphosphorus 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 administrated 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 organosphosphorus 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.; Haeberlein, 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. Papalexiou, 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. Toxikol.* **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 paranitrophenol 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. The.r* **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.; Autrup, 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. Konig, J.; Muller, 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]



© 2017 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

Toxicology in Vitro 40 (2017) 34–44

Contents lists available at ScienceDirect

Toxicology in Vitro

journal homepage: www.elsevier.com/locate/toxinvit

Inhibition of SLC drug transporter activities by environmental bisphenols

Arnaud Bruyere [a], Céline Hubert [a], Marc Le Vee [a], Lisa Chedik [a], Katia Sayyed [a,b], Bruno Stieger [c], Claire Denizot [d], Yannick Parmentier [d], Olivier Fardel [a,e,*]

[a] Institut de Recherches en Santé, Environnement et Travail (IRSET), UMR INSERM U1085, Faculté de Pharmacie, 2 Avenue du Pr Léon Bernard, 35043 Rennes, France
[b] EDST-AZM-center-LBA3B, Faculty of Sciences, Rafic Hariri Campus, Lebanese University, Lebanon
[c] Department of Clinical Pharmacology and Toxicology, University Hospital Zurich, University of Zurich, Rämistrasse 100, 8091 Zurich, Switzerland
[d] Centre de Pharmacocinétique, Technologie Servier, 25–27 rue Eugène Vignat, 45000 Orléans, France
[e] Pôle Biologie, Centre Hospitalier Universitaire, 2 rue Henri Le Guilloux, 35033 Rennes, France

ARTICLE INFO

Article history:
Received 10 August 2016
Received in revised form 14 November 2016
Accepted 13 December 2016
Available online 15 December 2016

Keywords:
Drug transporters
Bisphenol A
Bisphenol F
Bisphenol S
Tetrabromobisphenol A
Inhibition

ABSTRACT

The plastic component bisphenol A (BPA) is suspected to exert deleterious effects towards human health and targets various cellular and molecular pathways, including activity of ATP-binding cassette drug transporters. The present study was designed to determine whether BPA and some derivatives, like its substitutes bisphenol F (BPF) and bisphenol S (BPS) and the flame retardant tetrabromobisphenol A (TBBPA), may additionally interact with solute carrier (SLC) drug transporters. Activities of the various following SLC transporters were inhibited in a major way (by >60%) by 100 μM bisphenols: OCT1 and MATE1 (by BPA and TBBPA), OATP1B1 (by BPA, BPF and TBBPA), OATP1B3 and NTCP (by TBBPA) and OAT3 (by BPA, BPF, BPS and TBBPA); by contrast, activities of other transporters were not impacted (MATE2-K) or were stimulated (notably OCT1 by BPS and OCT2 by BPF). Transporter inhibitions due to bisphenols were concentrations-dependent, with half maximal inhibitory concentrations (IC_{50}) ranging from 0.5 μM to 73.5 μM. BPA was finally shown to be not transported by OAT3, although inhibiting this transporter in a competitive manner. Taken together, these data indicate that bisphenols interact with SLC transporters, at concentration levels however rather higher than those occurring in humans in response to environmental exposure.

© 2016 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Bisphenol A (BPA) is a synthetic chemical, largely used as a monomere in the production of polycarbonate plastics and epoxy resins, and by this way among the highest-volume chemicals produced worldwide. BPA is found in many consumer products, including food containers, paper products like thermal paper, water pipes and medical equipment (Halden, 2010). Humans are consequently widely exposed to this chemical, *via* dietary and non-dietary sources (Kang et al., 2006). Importantly, such an exposure is now thought to cause various deleterious effects for health (Rochester, 2013; Srivastava et al., 2015). BPA, through acting as a xeno-estrogen (Ben-Jonathan and Steinmetz, 1998), may thus exert reproductive and developmental toxicity (Golub et al., 2010; Peretz et al., 2014); it may also contribute to metabolic and cardiovascular diseases (Lang et al., 2008), may impair immunity (Jochmanova et al., 2015) and is suspected to have carcinogenic properties (Thompson et al., 2015). Such toxic effects have led to governmental restrictive regulations on the production and usage of BPA in North America and the European Union (Birnbaum et al., 2013). This also stimulates the development and production of alternative substances to replace BPA in a myriad of applications. Among such BPA substitutes, bisphenol analogues like bisphenol F (BPF) and bisphenol S (BPS) are major ones, even if they exhibited estrogenic and/or anti-androgenic activities similar to those of BPA (Chen et al., 2016). Endocrine-disrupting effects have additionally been reported for tetrabromobisphenol A (TBBPA), another bisphenol derivative, widely used as a brominated flame retardant in printed circuit boards and to which humans are also highly exposed (Birnbaum and Staskal, 2004).

Besides classical nuclear estrogen receptor alpha and beta, various molecular targets of BPA have been described, notably at the plasma membrane level. BPA thus interacts with ion channels and ATP-binding cassette (ABC) membrane transporters (Deutschmann et al., 2013; Soriano et al., 2016), suggesting that transport across plasma membrane may represent one of the cellular processes with which bisphenols interfere. In this context, it is noteworthy that main ABC drug efflux pumps have been shown to be targeted by bisphenols. Breast cancer resistance protein (BCRP/*ABCG2*) activity is thus inhibited by BPA and TBBPA (Dankers et al., 2013). TBBPA additionally inhibits P-glycoprotein

* Corresponding author at: Institut de Recherches en Santé, Environnement et Travail (IRSET), UMR INSERM U1085, Faculté de Pharmacie, 2 Avenue du Pr Léon Bernard, 35043 Rennes, France.
E-mail address: olivier.fardel@univ-rennes1.fr (O. Fardel).

http://dx.doi.org/10.1016/j.tiv.2016.12.009
0887-2333/© 2016 Elsevier Ltd. All rights reserved.

(*ABCB1*), multidrug resistance-associated protein (MRP) 1 (*ABCC1*) and MRP4 (*ABCC4*) (Dankers et al., 2013). By contrast, BPA stimulates P-glycoprotein activity (Jin and Audus, 2005), without however affecting P-glycoprotein expression (Peyre et al., 2014), whereas levels of other drug detoxifying proteins like hepatic cytochromes P-450 may be impaired by BPA, but not by TBBPA (Germer et al., 2006; Vrzal et al., 2015). Importantly, BPA, but not TBBPA, is transported by BCRP (Dankers et al., 2013); BPA is also a potential substrate for MRP2 (*ABCC2*) and MRP3 (*ABCC3*) (Mazur et al., 2012). These drug efflux pumps may therefore participate in the elimination of BPA and conjugated BPA metabolites, notably at the liver level (Moscovitz et al., 2016).

In addition to interacting with membrane ABC drug transporters, bisphenols may interact with activity of solute carrier (SLC) drug transporters. The fact that BPA has been recently shown to inhibit activity of organic anion transporting polypeptide (OATP/*SLCO*) 1d1 (*Slco1d1*) in zebrafish fully supports this hypothesis (Popovic et al., 2014). Such potential interactions of bisphenols with SLC transporters remain however very poorly characterized, although SLC drug transporters represents key-actors of xenobiotic elimination pathway, notably in the liver and kidney (Giacomini et al., 2010; Lecureur et al., 2000). Most of SLC drug transporters primarily mediate drug uptake and, by this way and in concert with ABC transporters, they control intracellular levels of drugs, notably in hepatocytes (Planchamp et al., 2007). Their inhibition may be the source of numerous drug-drug interactions (DDI) (Koepsell, 2015; Shitara et al., 2005). The present study was therefore designed to analyze the possible interactions of various environmentally relevant bisphenols, *i.e.*, BPA, BPF, BPS and TBBPA, with activities of main human SLC drug transporters notably expressed in the liver, *i.e.*, organic cation transporter (OCT) 1 (*SLC22A1*), OATP1B1 (*SLCO1B1*), OATP1B3 (*SLCO1B3*), sodium/taurocholate co-transporting polypeptide (NTCP/*SLC10A1*) and multidrug and toxin extrusion protein (MATE) 1 (*SLC47A1*), or in the kidney, *i.e.*, OCT2 (*SLC22A2*), organic anion transporter (OAT) 1 (*SLC22A6*), OAT3 (*SLC22A7*) and MATE2-K (*SLC47A2*). Our data indicate that most of these SLC transporters constitute targets for bisphenols, especially for BPA and TBBPA.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals and reagents

BPA, BPF, BPS and TBBPA were provided by Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France), as well as verapamil, probenecid, fluorescein, bromosulfophthalein (BSP) and amitriptyline. Chemical structures of bisphenols are shown in Fig. 1. Some of their basic molecular properties, including molecular weight, LogP predicted using the XLogP3 method (Cheng et al., 2007), counts of hydrogen bond donors, hydrogen bond acceptors and rotatable bonds, and topological polar surface area, were given by PubChem database (https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/) and are indicated in Supplementary Table 1. [1-^{14}C]-tetra-ethylammonium bromide (TEA) (sp. act. 3.5 mCi/mmol), [6, 7-^{3}H(N)] estrone-3-sulfate (E3S) (sp. act. 57.3 Ci/mmol), [^{3}H(G)]-taurocholic acid (TC) (sp. act. 5.0 Ci/mmol), *p*-[glycyl-1-^{14}C]-aminohippuric acid (PAH) (sp. act. 50.4 Ci/mmol) and [bis 2,6-^{3}H]-BPA (sp. act. 51.0 Ci/mmol) were from Perkin-Elmer (Boston, MA, USA). All other chemicals and reagents were commercial products of the highest purity available.

2.2. Cell culture

HEK293 cells overexpressing OCT1 (HEK-OCT1 cells), OCT2 (HEK-OCT2 cells), MATE1 (HEK-MATE1 cells), MATE2-K (HEK-MATE2-K cells) or NTCP (HEK-NTCP cells) and control HEK293 cells (HEK-MOCK cells), whose generation and functional characterization have already been described (Jouan et al., 2014; Le Vee et al., 2015; Mayati et al., 2015; Sayyed et al., 2016), were routinely cultured in DMEM medium supplemented with 10% fetal calf serum (v/v), 20 IU/mL penicillin, 20 μg/mL streptomycin, 1% (vol/vol) MEM non-essential amino acids

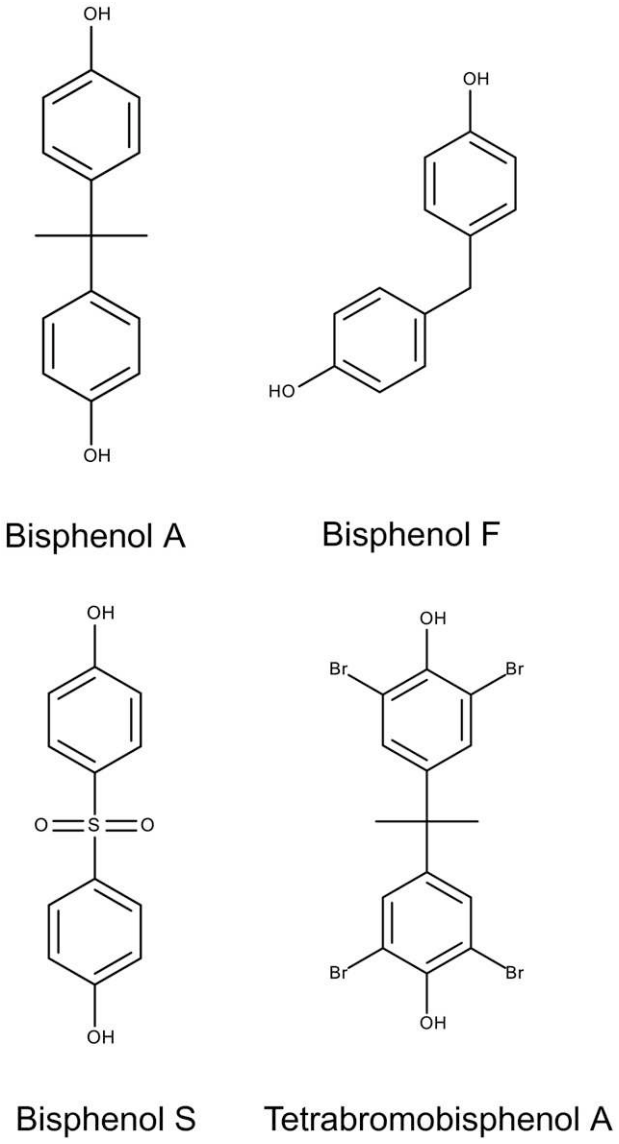


Fig. 1. Chemical structures of bisphenols.

solution (Life Technologies) and 1 μg/mL insulin. HEK293 cells overexpressing OAT1 (NM_004790) (HEK-OAT1 cells) or OAT3 (NM_004254) (HEK-OAT3 cells) were prepared by transduction of HEK293 cells by a lentiviral pLV-EF1-hOAT1-hPGK-GFP or pLV-EF1-hOAT3-hPGK-GFP vector, as previously reported (Jouan et al., 2014). Construction of the lentiviral vectors, production of lentivirus supernatants, transduction of HEK293 cells, cloning and initial characterization of HEK-OAT1 and HEK-OAT3 cells were performed by Vectalys (Labège, France). HEK-OAT1 and HEK-OAT3 cells were routinely cultured in DMEM medium as described above.

OATP1B1- and OATP1B3-transfected CHO cells as well as parental wild-type CHO cells were cultured in DMEM-low glucose containing 20 IU/mL penicillin, 20 μg/mL streptomycin, 10% (vol/vol) fetal calf serum and 50 μg/mL proline, as already reported (de Graaf et al., 2011). G418 (500 μg/mL) was specifically added in culture media for OATP1B1- and OATP1B3-transfected CHO cells, whose functional transport features have been previously characterized (Gui et al., 2008; Treiber et al., 2007).

Human differentiated hepatoma HepaRG cells, which exhibit functional expression of OATPs (Le Vee et al., 2006), were routinely cultured in Williams' E medium (Life Technologies) supplemented with 10% (vol/vol) fetal calf serum, 20 IU/mL penicillin, 20 μg/mL streptomycin,

5 μg/mL insulin, 2 mM glutamine, and 5×10^{-5} M hydrocortisone hemisuccinate. Additional culture for two weeks in the same medium supplemented with 2% (vol/vol) dimethylsulfoxide was performed in order to get a full hepatocytic differentiation of the cells (Gripon et al., 2002).

2.3. RNA isolation and analysis

Total RNAs were extracted using the TRI reagent (Sigma-Aldrich). RNA was then subjected to reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR), using the RT kit from Applied Biosystems (Foster City, CA), the fluorescent dye SYBR Green methodology and a CFX384 real-time PCR system (Bio-Rad, Hercules, CA), as previously described (Sparfel et al., 2010). Gene-specific primers for OAT1 were: sense, CCATGGTGT TCGGCTACCTT, and anti-sense, GGGCATCCACTCCACATTCA. Primers for OAT3 and 18S rRNA were exactly as previously reported (Moreau et al., 2011). The specificity of each gene amplification was verified at the end of qPCR reactions through analysis of dissociation curves of the PCR products. Amplification curves were next analyzed with CFX Manager software (Bio-Rad), using the comparative cycle threshold method. Relative quantification of the steady-state target mRNA levels was calculated after normalization of the total amount of cDNA tested to the 18S rRNA endogenous reference using the $2(^{-\Delta Ct})$ method. Data were finally expressed in arbitrary unit relatively comparatively to the 18S rRNA reference (Le Vee et al., 2013).

2.4. SLC transporter activity assays

The effects of bisphenols on SLC transporter activities were analyzed through determining intracellular accumulation of reference substrates of SLC transporters using a well-defined transport medium, as previously reported (Jigorel et al., 2005; Le Vee et al., 2015). The transport assay medium consisted of 5.3 mM KCl, 1.1 mM KH_2PO_4, 0.8 mM $MgSO_4$, 1.8 mM $CaCl_2$, 11 mM D-glucose, 10 mM HEPES, and 136 mM NaCl; pH was adjusted to 7.4 value, except for the pH-sensitive MATE1 and MATE2-K transport assays for which pH was set at 8.4. Cells were first washed with transport assay buffer, then incubated at 37 °C for 5 min with transport assay buffer containing 40 μM [^{14}C]-TEA (used as a reference substrate for OCT1, OCT2, MATE1 and MATE2-K), 3.5 nM [^{3}H]-E3S (used as a reference substrate for OATP1B1 and OAT3), 10 μM fluorescein (used as a reference substrate for OATP1B3) (De Bruyn et al., 2011), 43.4 nM [^{3}H]-TC (used as a reference substrate for NTCP) or 0.1 μM [^{14}C]-PAH (used as a reference substrate for OAT1), in the absence or presence of bisphenols or reference SLC transporter inhibitors. These reference inhibitors were 50 μM verapamil (for OCT1, MATE1 and MATE2-K), 100 μM BSP (for OATP1B1), 10 mM probenecid (for OATP1B3), 2 mM probenecid (for OAT1 and OAT3) and 100 μM amitriptyline (for OCT2). Reference inhibition of NTCP activity was done through removal of NaCl from transport assay medium and replacing it by 136 mM *N*-methyl glucamine (Jigorel et al., 2005). The 5 min incubation time with substrates was chosen because it is presumed to usually correspond to the initial linear phase of substrate uptakes mediated by SLC transporters (Jouan et al., 2014) and has been consequently retained in various previous studies analyzing SLC transporter inhibitors (Ahlin et al., 2008; Mayati et al., 2015; Sayyed et al., 2016). Cells were next washed twice with ice-cold phosphate-buffered saline (PBS), and finally lysed in distilled water. Intracellular accumulation of radiolabeled substrates was next measured by scintillation counting with a Beckman LS6500 counter (Beckman Coulter Inc., Fullerton, CA, USA). Intracellular accumulation of fluorescein was determined by spectrofluorimetry using a SpectraMax Gemini SX spectrofluorometer (Molecular Devices, Sunnyvale, CA); excitation and emission wavelengths were 485 and 535 nm, respectively. Values of substrate accumulation were then normalized to total protein content, determined by the Bradford method (Bradford, 1976). Data were finally expressed as percentage of substrate accumulation in control cells not exposed to reference inhibitor or bisphenols; in this context, percentage of reduction of substrate accumulation was defined as 100% (accumulation in control cells) minus percentage of substrate accumulation in the presence of bisphenol or reference inhibitor, whereas percentage of stimulation of substrate accumulation corresponded to percentage of substrate accumulation in the presence of bisphenol minus 100% (accumulation in control cells). Data were also alternatively expressed as percentage of transporter activity found in control cells, arbitrarily set at 100%, according to the following equations:

For OATPs, OATs, OCTs and MATEs:

$$\%\text{SLC transporteractivity} = \frac{(\text{Accumulation}_{\text{Bisphenol}} - \text{Accumulation}_{\text{Referenceinhibitor}}) \times 100}{\text{Accumulation}_{\text{Control}} - \text{Accumulation}_{\text{Referenceinhibitor}}} \quad \text{(A)}$$

with $\text{Accumulation}_{\text{Bisphenol}}$ = substrate accumulation in the presence of bisphenol, $\text{Accumulation}_{\text{Control}}$ = substrate accumulation in control cells and $\text{Accumulation}_{\text{Reference inhibitor}}$ = substrate accumulation in the presence of a reference transporter inhibitor.

For NTCP:

$$\%\text{NTCPactivity} = \frac{\left(\text{Accumulation}_{\text{Bisphenol}} - \text{Accumulation}_{\text{Control}/-\text{Na}^+}\right) \times 100}{\text{Accumulation}_{\text{Control}/+\text{Na}^+} - \text{Accumulation}_{\text{Control}/-\text{Na}^+}} \quad \text{(B)}$$

with $\text{Accumulation}_{\text{Bisphenol}}$ = TC accumulation in the presence of bisphenol and sodium, $\text{Accumulation}_{\text{Control}/+\text{Na}^+}$ = TC accumulation in control cells in the presence of sodium and $\text{Accumulation}_{\text{Control}/-\text{Na}^+}$ = TC accumulation in control cells in the absence of sodium.

2.5. BPA accumulation assays

HEK-OAT3 cells and control HEK-MOCK cells were incubated at 37 °C for various lengths of time (from 1 to 10 min) with transport assay buffer containing 19.6 nM [^{14}C]-BPA. Cells were next washed twice with ice-cold PBS, and finally lysed in distilled water. Intracellular accumulation of BPA was then measured by scintillation counting and normalized to protein content as reported above.

2.6. Determination of kinetic parameters

For bisphenols inhibiting SLC drug transporter activity by at least 60% when initially used at 100 μM, transport assays described above were performed in the presence of various concentrations of bisphenols. Half maximal inhibitory concentrations (IC_{50}) were next determined using Prism 5.0 software (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA) through nonlinear regression based on the following four-parameter logistic equation:

$$A = \frac{100}{1 + 10^{((\log[I] - \log IC_{50}) \times \text{Hillslope})}} \quad \text{(C)}$$

where A is the percentage of SLC transporter activity for a given concentration of bisphenol determined as described in Eq. (A) for OATPs, OATs, OCTs and MATEs and in Eq. (B) for NTCP, [I] is the bisphenol concentration in the medium, and Hill slope is a coefficient describing the steepness of the curve.

Kinetic parameters of E3S uptake into HEK-OAT3 cells (K_m and V_{max}) in the absence or presence of 50 μM BPA were estimated using Prism 5.0

software through nonlinear regression based on the Michaelis-Menten equation:

$$v = \frac{V_{max} \times [S]}{K_m + [S]} \quad (D)$$

where v is the initial uptake rate of substrate, [S] is the substrate concentration in the medium, K_m is the Michaelis–Menten affinity constant and V_{max} is the maximum uptake rate.

2.7. Statistical analysis

Experimental data were usually expressed as means ± SEM of at least three independent assays. They were statistically analyzed using analysis of variance (ANOVA) followed by the Dunnett's post-hoc test, the Student's *t*-test or the F-test, with the Prism 5.0 software. The criterion of significance was $p < 0.05$.

3. Results

3.1. Inhibition of organic cation transporter activity by bisphenols

Effects of BPA, BPF, BPS and TBBPA, each used at 100 μM, on TEA transport mediated by the organic cation transporters OCT1, OCT2, MATE1 or MATE2-K were determined using OCT or MATE-transfected HEK293 cells, which exhibited high TEA accumulation when compared to HEK-MOCK cells (Fig. 2). BPA and TBBPA, like the reference inhibitor verapamil, markedly inhibited uptake of TEA in HEK-OCT1 cells, by >80% when compared to uptake in control conditions (Fig. 2). BPF also significantly decreased TEA uptake in HEK-OCT1 cells, but in a more moderately manner (inhibition by 41.6%), whereas, by contrast, BPS stimulated TEA accumulation by 61.9% (Fig. 2). BPS, and also BPF, additionally stimulated TEA accumulation in HEK-OCT2 cells, whereas TBBPA reduced it and BPA was without effect (Fig. 2); the percentage of reduction of TEA uptake by TBBPA in HEK-OCT2 cells (39.4%) was however lower than that caused by the reference OCT2 inhibitor amitriptyline (87.8%). TEA uptake in HEK-MATE1 cells was inhibited by all bisphenols (Fig. 2); the percentages of these inhibitions by bisphenols ranged from 28.1% (for BPF) to 66.8% (for TBBPA) and were therefore lower than that caused by verapamil (98.0%) (Fig. 2). None of bisphenols significantly impaired TEA accumulation in HEK-MATE2-K cells, in contrast to the reference inhibitor verapamil that markedly reduced it by 87.3% (Fig. 2). Bisphenols also failed to alter intracellular accumulation of TEA in HEK-MOCK cells in a major way, whatever the pH used (pH = 7.4 for OCT1/2 activity and pH = 8.4 for MATE1/MATE2-K) (Supplementary Fig. 1).

For inhibitions of TEA accumulation by 100 μM bisphenol reaching at least 60%, IC_{50} values towards SLC transporter activities were next determined. As shown in Fig. 3A, BPA IC_{50} towards OCT1 and MATE1 activities were 39.0 and 73.5 μM, respectively. With respect to TBBPA, IC_{50} values were 37.5 μM (for OCT1 activity) and 23.1 μM (for MATE1 activity) (Fig. 3B).

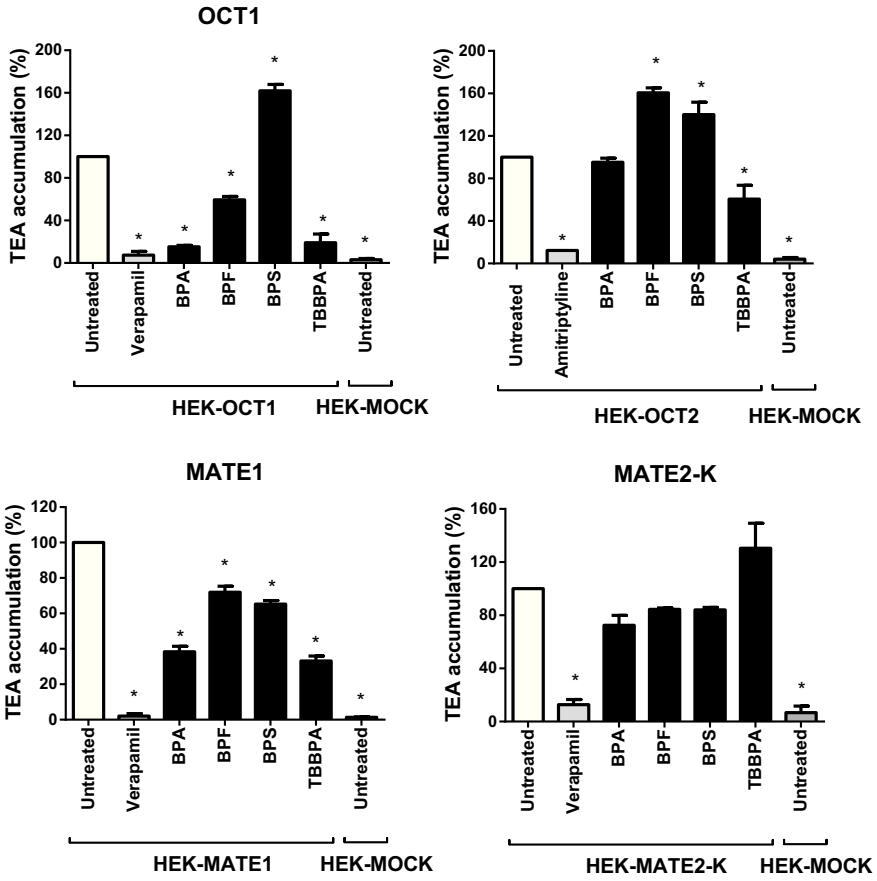


Fig. 2. Effects of bisphenols on OCT1, OCT2, MATE1 and MATE2-K activities. OCT- and MATE-overexpressing HEK293 cells as well as HEK-MOCK cells were incubated at 37 °C for 5 min with the radiolabeled reference substrate TEA in the absence (untreated) or presence of reference inhibitors (50 μM verapamil for OCT1, MATE1 and MATE2-K and 100 μM amitriptyline for OCT2) or of bisphenols, each used at 100 μM. After washing, intracellular uptake of TEA was determined by scintillation counting and normalized to total cellular protein content. Data are expressed as percentages of TEA accumulation found in control OCT- or MATE-transfected cells not exposed to reference inhibitors or bisphenols; they are the means ± SEM of at least three independent experiments. *, $p < 0.05$ when compared to control untreated OCT- or MATE-transfected HEK293 cells.

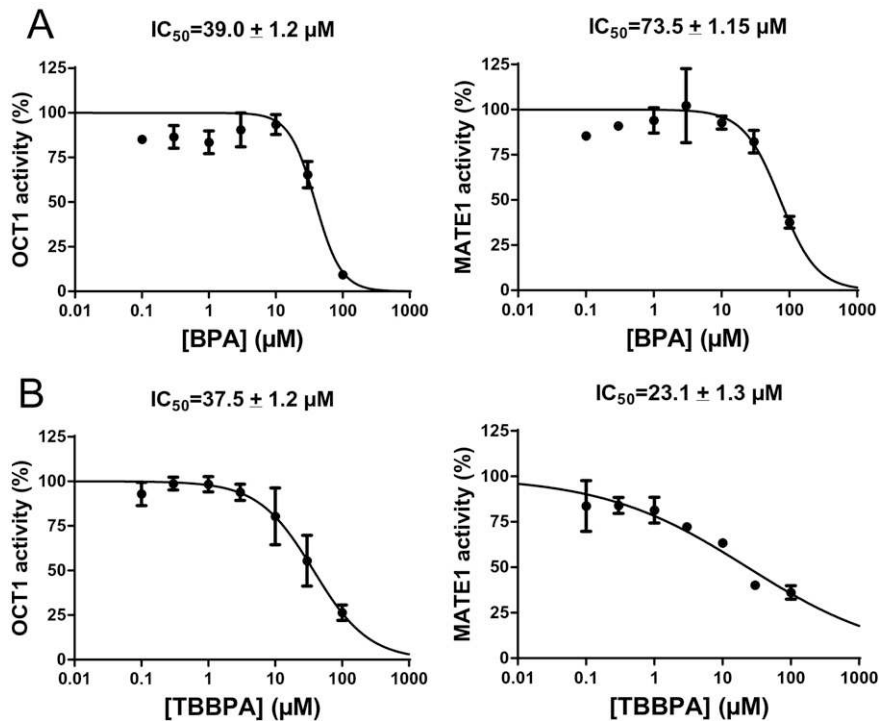


Fig. 3. Concentration-dependent effects of (A) BPA and (B) TBBPA towards OCT1 and MATE1 activities. OCT1 and MATE1 activities were determined in the absence or presence of various concentrations of (A) BPA or (B) TBBPA, as described in Materials and methods. Incubation time with TEA, used as a reference substrate, was 5 min. Data are expressed as percentages of transporter activity found in control untreated cells, arbitrarily set at 100%; they are the means ± SEM of three independent assays. IC_{50} values are indicated at the top of graphs.

3.2. Inhibition of organic anion transporter activity by bisphenols

Effects of BPA, BPF, BPS and TBBPA, each used at 100 μM, on OATP-mediated uptake of reference substrates were first studied using OATP-transfected CHO cells, displaying high accumulation of the OATP reference substrates comparatively to parental CHO cells (Fig. 4A). As shown in Fig. 4A, BPA, BPF and TBPPA significantly decreased E3S accumulation in CHO-OATP1B1 cells in a rather notable manner; the percentages of accumulation decrease were thus comprised between 68.9% (for BPA) and 85.9% (for TBBPA). By contrast, BPS failed to significantly alter E3S accumulation in CHO-OATP1B1 cells (Fig. 4A). BPS, in contrast to the reference inhibitor probenecid, did not also affect fluorescein uptake in CHO-OATP1B3 cells, whereas BPF significantly enhanced it by 38.2% and BPA and TBBPA reduced it by 49.7% and 73.8%, respectively (Fig. 4A). None of bisphenols inhibited E3S or fluorescein accumulation in parental wild-type CHO cells in a major way (Supplementary Fig. 2). Bisphenols were next shown to reduce E3S accumulation in hepatoma HepaRG cells (Fig. 4B), which constitutively display OATP activity (Le Vee et al., 2013). In this context, TBBPA was the most active, with an inhibitory effect towards E3S uptake similar to that of the reference OATP inhibitor BSP, whereas BPS was the less inhibitory (Fig. 4B).

Effects of BPA, BPF, BPS and TBBPA, each used at 100 μM, on OAT- and NTCP-mediated uptake of reference substrates were next analyzed using OAT- and NTCP-transfected HEK293 cells. These transporter-transfected cells showed high uptake of reference substrates when compared to HEK-MOCK cells (Fig. 5); in addition, HEK-OAT1 and HEK-OAT3 cells displayed marked mRNA overexpression of OAT1 and OAT3, respectively, when compared to HEK-MOCK cells (Supplementary Fig. 3). As indicated in Fig. 5A, BPS moderately reduced PAH accumulation by 44.1% in HEK-OAT1 cells, whereas BPA and BPF stimulated it by 49.3% and 36.3%, respectively, and TBBPA was without significant effect. All bisphenols markedly decreased E3S uptake in HEK-OAT3 cells, with percentages of inhibition ranging from 79.5% (for BPF) to 94.1% (for TBBPA) and therefore close to the percentage of inhibition (97.2%) caused by the reference inhibitor BSP (Fig. 5A). By contrast, bisphenols did not obviously alter uptake of both E3S and PAH in HEK-MOCK cells (Supplementary Fig. 1). TBBPA was finally shown to markedly inhibit sodium-dependent accumulation of TC in HEK-NTCP cells by 91.5%, whereas BPA and BPF more modestly decreased it by 44.3% and 39.2%, respectively, and BPS was without effect (Fig. 5B). None of the bisphenols obviously altered TC accumulation in HEK-MOCK cells (Supplementary Fig. 1).

For inhibitions of reference anionic substrate accumulation by 100 μM bisphenol reaching at least 60%, IC_{50} values towards SLC transporter activities were next determined. As shown in Fig. 6A, BPA IC_{50} values towards OATP1B1 and OAT3 activities were 18.7 μM and 9.2 μM, respectively. Those of BPF were 13.4 μM (for OATP1B1) and 26.8 μM (for OAT3) (Fig. 6B), whereas that of BPS towards OAT3 activity was 23.3 μM (Fig. 6C). IC_{50} values of TBBPA towards OATP1B1 and OAT3 activities were rather low (0.6 μM and 0.5 μM, for OATP1B1 and OAT3, respectively), whereas those towards NTCP and OATP1B3 activities were 4.5 μM and 12.1 μM, respectively (Fig. 6D).

3.3. Characterization of OAT3-BPA interaction

Because OAT3 was the SLC transporter most potently inhibited by BPA (IC_{50} = 9.2 μM; Fig. 6A), we next decided to characterize the nature of its interaction with this SLC transporter, primarily expressed by proximal renal cells (Burckhardt and Wolff, 2000). For this, we first analyzed the kinetic parameter (K_m and V_{max}) of E3S uptake by HEK-OAT3 cells in the absence or presence of 50 μM BPA through non-linear regression of E3S uptake rate in function of E3S concentration using the Michaelis-Menten equation. As indicated in Fig. 7, BPA was found to significantly enhance K_m without altering V_{max}, thus suggesting that it inhibited OAT3 activity by a competitive mechanism, possibly through interacting with the transport binding site of OAT3. To determine whether BPA may be a substrate for this SLC transporter, we next analyzed BPA uptake in

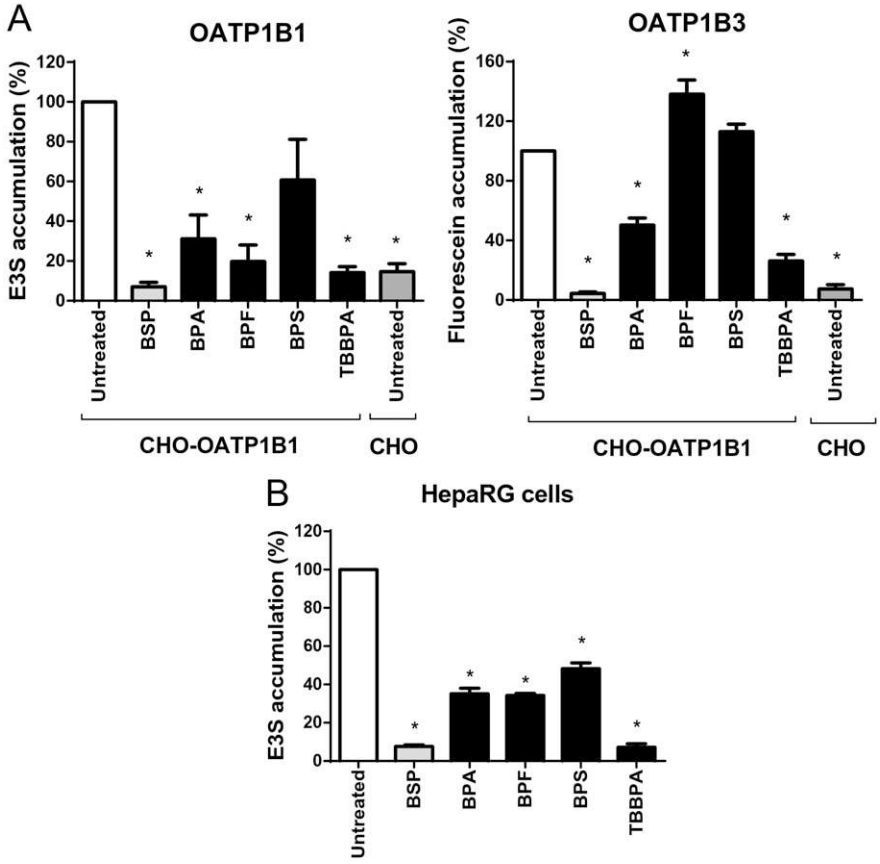


Fig. 4. Effects of bisphenols on OATP activities in (A) OATP-expressing CHO cells and (B) HepaRG cells. (A) OATP-overexpressing CHO cells and parental wild-type CHO cells were incubated at 37 °C for 5 min with reference substrates (radiolabeled E3S for OATP1B1 and fluorescein for OATP1B3) in the absence (untreated) or presence of reference OATP inhibitors (100 μM BSP for OATP1B1 and 10 mM probenecid for OATP1B3) or of bisphenols, each used at 100 μM. After washing, intracellular uptake of substrates was determined by scintillation counting (E3S) or spectrofluorimetry (fluorescein) and normalized to total cellular protein content. Data are expressed as percentages of substrate accumulation in untreated control OATP-transfected cells, arbitrarily set at 100%; they are the means ± SEM of at least three independent experiments. *, $p < 0.05$ when compared to control untreated OATP-transfected cells. (B) HepaRG cells were incubated with E3S in the absence or presence of 100 μM BSP or of bisphenols, as described above. After washing, intracellular uptake of E3S was determined by scintillation counting and normalized to total cellular protein content. Data are expressed as percentages of E3S accumulation in untreated control HepaRG cells, arbitrarily set at 100%; they are the means ± SEM of three independent experiments. *, $p < 0.05$ when compared to control untreated HepaRG cells.

HEK-OAT3 and HEK-MOCK cells; for this purpose, we used a 19.6 nM BPA concentration, which is in the range of BPA concentrations measured in humans (Thayer et al., 2015; Vandenberg et al., 2010). Results indicated that the two types of cells similarly accumulated BPA, whatever the incubation times with BPA (from 1 min to 10 min) (Fig. 8), thus discarding the hypothesis that BPA may be transported by OAT3. This conclusion is also supported by the fact that the OAT inhibitor probenecid used at 2 mM failed to alter BPA accumulation in HEK-OAT3 cells (data not shown). By contrast, HEK-OAT3 cells exhibited marked probenecid-inhibitable uptake of E3S when compared to HEK-MOCK cells (Supplementary Fig. 4), thus confirming that OAT3 was fully functional in HEK-OAT3 cells.

3.4. Prediction of potential drug-drug interactions due to inhibition of SLC transporters by BPA

We finally considered whether *in vitro* inhibition of SLC transporter activities by BPA may be relevant in terms of DDI. For this, we applied the criteria retained by the US Food and Drug Administration (FDA) for plasma inhibitor concentration, according to which a potential DDI with respect to a drug inhibiting a transporter can be predicted from *in vitro* data when the maximum total plasma (bound plus unbound) concentration (C_{max}) of the investigated drug at steady state ([I]) divided by its *in vitro* inhibitory potency (IC_{50}) is greater than or equal to 0.1 ($[I]/IC_{50} \geq 0.1$) (Giacomini et al., 2010; Hillgren et al., 2013; Maeda and Sugiyama, 2013). For [I_{BPA}], we retained the value of 6.5 nM, that corresponds to the unconjugated BPA C_{max} recently reported in serum following oral administration of BPA to human volunteers (Thayer et al., 2015) and the value of 44 nM, that is the upper limit of the range of unconjugated BPA concentrations (2.2 nM to 44 nM) measured in blood samples from human populations (Vandenberg et al., 2010). None of these two BPA concentration values was predicted to cause potential DDI involving OCTs, MATEs, OATPs or OATs transporters, according to the FDA criteria (Table 1).

4. Discussion

The environmental contaminant BPA has previously been shown to interact with ABC drug efflux pumps like P-glycoprotein, MRP2 and BCRP (Dankers et al., 2013; Jin and Audus, 2005; Mazur et al., 2012). The data reported in the present study indicate that BPA and other bisphenol derivatives such as BPF, BPS and TBBPA can also alter activities of various human SLC drug transporters (see Table 2 for a summary of these effects of bisphenols towards SLC transporters), thus highlighting the fact that membrane drug transporters represent targets for environmental bisphenols.

BPA was thus demonstrated to inhibit activities of various SLC transporters, especially those of OCT1, MATE1, OATP1B1 and OAT3 in transporter-overexpressing transfected cells; it concomitantly reduced constitutive OATP activity in hepatic HepaRG cells, indicating that its inhibitory effects towards SLC transporters were not restricted to transfected cells. By contrast, BPA failed to impair activities of other

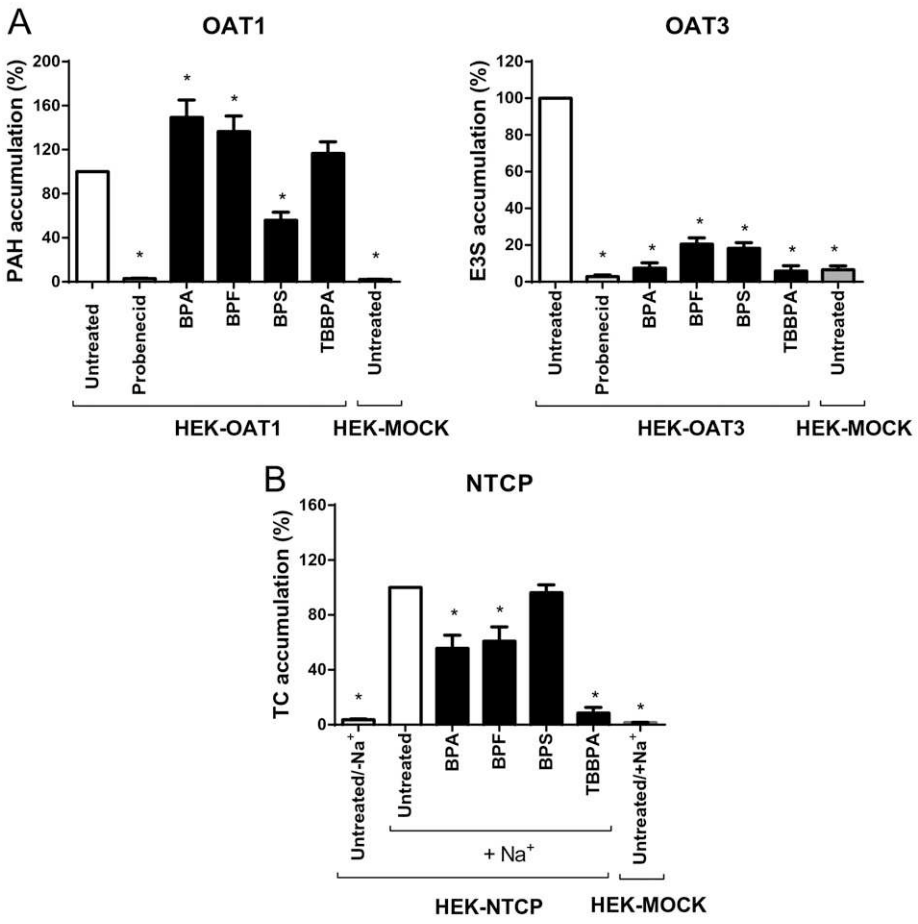


Fig. 5. Effects of bisphenols on (A) OAT and (B) NTCP activities. (A) OAT-overexpressing HEK293 cells as well as HEK-MOCK cells were incubated at 37 °C for 5 min with radiolabeled reference substrates (PAH for OAT1 and E3S for OAT3) in the absence (untreated) or presence of the OAT inhibitor probenecid (2 mM) or of bisphenols, each used at 100 μM. After washing, intracellular uptake of substrates was determined by scintillation counting and normalized to total cellular protein content. Data are expressed as percentages of reference substrate accumulation in OAT-transfected HEK293 cells not exposed to reference inhibitors or bisphenols; they are the means ± SEM of three independent experiments. *, $p < 0.05$ when compared to control untreated OAT-transfected cells. (B) HEK-NTCP cells as well as HEK-MOCK cells were incubated at 37 °C for 5 min with TC in sodium-containing medium in the absence (untreated) or presence of bisphenols, each used at 100 μM; reference inhibition of NTCP activity was done in parallel through removal of sodium from transport assay medium. After washing, intracellular uptake of TC was determined by scintillation counting and normalized to total cellular protein content. Data are the means ± SEM of three independent experiments. *, $p < 0.05$ when compared to control untreated HEK-NTCP cells in the presence of sodium.

SLC transporters such as OCT2, MATE2-K, OATP1B3, whereas it stimulated that of OAT1, thus most likely discarding the hypothesis of a general and non-discriminating inhibitory effect of BPA towards membrane transporter activities. Inhibitory effects of BPA and other bisphenols towards some SLC drug transporters can rather be considered as specific, probably reflecting direct and transporter-dependent interactions of BPA and other bisphenols with substrate and/or regulatory binding sites on drug transporters, as classically described for drug transporter inhibitors (Montanari and Ecker, 2015). In this context, BPA appears to inhibit OAT3 in a competitive manner, thus suggesting that the bisphenol interacts with the substrate drug binding site of this transporter. However, BPA accumulation was similar in HEK-OAT3 and HEK-MOCK cells. This indicates that BPA is not transported by OAT3, although interacting with its drug binding site, and thereby discards the hypothesis that renal OAT3 may contribute to toxicokinetics parameters of BPA. Non-competitive mechanism may additionally account for inhibition of some transporters by BPA; the fact that BPA acts as an uncompetitive inhibitor of Oatp1d1 in Zebrafish supports this hypothesis (Popovic et al., 2014). Moreover, it is noteworthy that BPA increased activity of OAT1. Such a cis-stimulation of SLC transporter activity has been already described for various chemicals (De Bruyn et al., 2013) and is also reported in the present study for other bisphenols such as BPF, that stimulated activity of OCT2 and OATP1B3, and BPS, that enhanced that of OCT1 and OCT2. In the same way, BPA has been previously shown to stimulate activity of the ABC efflux pump P-glycoprotein in placental cells (Jin and Audus, 2005). The molecular mechanisms that underlying such *cis*-stimulatory effects remain however yet very poorly characterized; they can reflect specific positive interactions with putative regulatory/allosteric binding sites on transporters, resulting in increased transport activity (Jin and Audus, 2005). Moreover, with respect to SLC transporters, *e.g.*, OATPs, many of them have more than one drug binding site, which may mutually modulate each other (Hagenbuch and Stieger, 2013; Stieger and Hagenbuch, 2014); similarly, multiple binding sites have been reported for ABC drug transporters such as MRP1 (Trompier et al., 2003). Additional studies are therefore needed to more extensively characterize the exact nature of drug binding sites on drug transporters and the molecular mechanisms by which BPA may differently interact with them.

Besides BPA, BPA substitutes like BPF and BPS and the brominated bisphenol TBBPA, used as a flame retardant, also inhibited activities of SLC transporters. Among these bisphenols, TBBPA was the most potent inhibitor, acting towards the greatest number of transporters (activities of only OAT1 and MATE2-K were not impacted) and displaying low IC_{50} values, <1 μM for OATP1B1 and OAT3. By contrast, OAT3 was the only transporter markedly inhibited by BPS, which thus appears as the less inhibitory bisphenol analyzed in the present study, while the inhibitory profile of BPF was relatively close to that of BPA. Physico-chemical features differentially displayed by bisphenols may basically contribute to

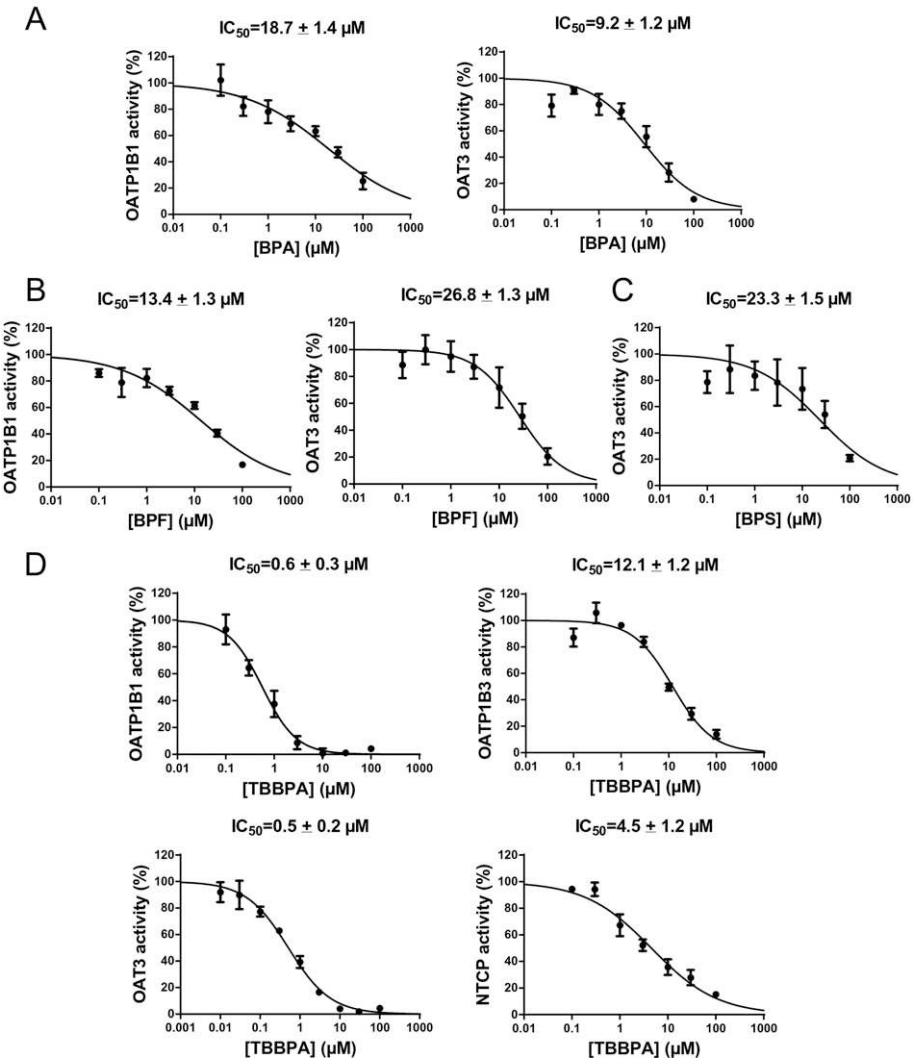


Fig. 6. Concentration-dependent effects of (A) BPA and (B) (BPF) towards OATP1B1 and OAT3 activities, (C) BPS towards OAT3 activity and (D) TBBPA towards OATP1B1, OATP1B3, OAT3 and NTCP activities. Transporter activities were determined in the absence or presence of various concentrations of (A) BPA, (B) BPF, (C) BPS and (D) TBBPA, as described in Materials and methods. Incubation time with reference substrates was 5 min. Data are expressed as percentages of transporter activity found in control untreated cells, arbitrarily set at 100%; they are the means ± SEM of three independent assays. IC_{50} values are indicated at the top of graphs.

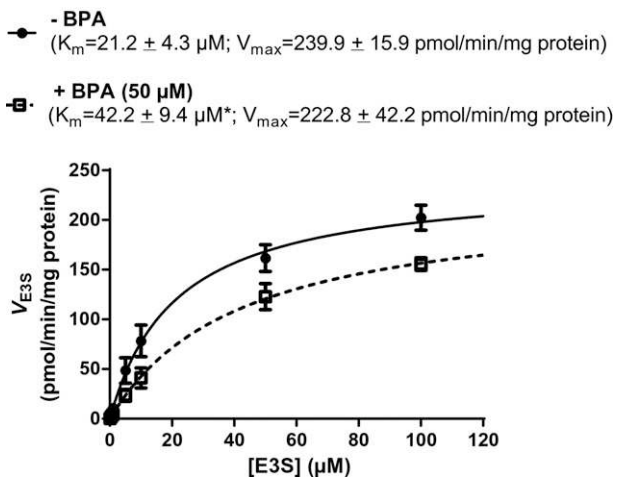


Fig. 7. Effects of BPA on kinetic parameters of E3S accumulation in HEK-OAT3 cells. HEK-OAT3 cells were incubated with increasing concentrations of E3S in the absence or presence of 50 µM BPA for 5 min. E3S uptake velocity (V_{E3S}) was next fitted to [E3S] according to the Michaelis-Menten equation, in order to determine K_m and V_{max} values (indicated at the top of the graph). Data are the means ± SEM of three independent experiments. *, $p < 0.05$ when compared to control cells not exposed to BPA.

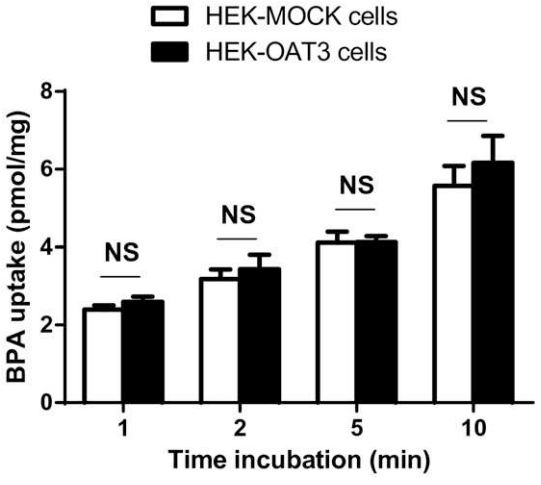


Fig. 8. Intracellular uptake of BPA in HEK-MOCK and HEK-OAT3 cells. HEK-MOCK and HEK-OAT3 cells were incubated with radiolabeled BPA at 37 °C for various length of times (from 1 min to 10 min). After washing, intracellular uptake of BPA was determined by scintillation counting and normalized to total cellular protein content. Data are the means ± SEM of three independent experiments. NS, not statistically significant.

Table 1
Prediction of potential drug-drug interactions (DDI) for BPA-mediated inhibitions of SLC drug transporters according to FDA criteria for plasma inhibitor concentration.[a]

SLC transporter	Effect of BPA on transporter activity	Ratio $[I_{BPA}]/BPA\ IC_{50}$		Prediction of potential DDI according to FDA criteria
		$[I_{BPA}] = 6.5$ nM[b]	$[I_{BPA}] = 44$ nM[c]	
OCT1	Inhibition ($IC_{50} = 39.0$ μM)	0.00017	0.00111	No DDI
OCT2	No effect	ND[d]	ND	No DDI
MATE1	Inhibition ($IC_{50} = 73.5$ μM)	0.00009	0.00060	No DDI
MATE2-K	No effect	ND	ND	No DDI
OATP1B1	Inhibition ($IC_{50} = 18.7$ μM)	0.00035	0.00216	No DDI
OATP1B3	Inhibition[e]	ND	ND	No DDI
OAT1	Stimulation	ND	ND	No DDI
OAT3	Inhibition ($IC_{50} = 9.2$ μM)	0.00071	0.00478	No DDI

[a] FDA criteria related to plasma inhibitor concentration: a potential clinical DDI may be predicted when $[I]/IC_{50} \geq 0.1$ (with [I] = maximum total plasma (bound plus unbound) inhibitor concentration).
[b] BPA serum C_{max} according to Thayer et al. (2015).
[c] Upper limit of the range of BPA concentrations reported in the blood of human populations according to Vandenberg et al. (2010).
[d] ND, not determined.
[e] Inhibition of accumulation of the OATP1B3 substrate fluorescein in response to 100 μM BPA by 49.7%, which precludes to determine IC_{50} value.

their various inhibitory effects towards SLC transporters. In this context, among basic molecular descriptors of bisphenols (Supplementary Table 1), hydrophobicity/LogP may be an important parameter to consider. Indeed, hydrophobicity has been reported to be one of key molecular descriptors for inhibition of various SLC transporters such as OAT3 (Duan et al., 2012), OCT1 (Ahlin et al., 2008) and OATP1B1 (De Bruyn et al., 2013), that are markedly inhibited by TBBPA, which, according to the calculated LogP value, is the most hydrophobic bisphenol (Supplementary Table 1). By contrast, hydrophobicity is not a molecular descriptor associated with blockage of OAT1 (Duan et al., 2012), which is not impacted by TBBPA. Further studies are however likely required to analyze quantitative structure-activity relationships for bisphenols-mediated inhibition of SLC transporters in a more detailed and accurate manner, knowing that a single molecular descriptor is not thought to be sufficient to appropriately describe binding to SLC transporters (Astorga et al., 2012).

The putative relevance of the SLC transporter inhibitions described in the present paper to human exposure to environmental bisphenols is probably a key-point that has to be considered. Inhibition of SLC transporters by BPA is very unlikely to cause DDI according to FDA criteria. This likely reflects the rather low plasma concentrations of BPA in humans, which are in the 2.2–44 nM range (Vandenberg et al., 2010), owing to extensive intestinal and hepatic first-pass metabolism producing BPA-glucuronide (Thayer et al., 2015). In the same way, BPA-mediated SLC transporter inhibition may be presumed to have no consequence in terms of *in vivo* membrane transport of hormones like estrogens and thyroid hormones, which are notably handled by OATPs (Obaidat et al., 2012). A contribution of putative impairment of hormone transport in target cells or detoxifying organs like liver to known endocrine disruptive effects of BPA can therefore likely be discarded. Similarly, BPA inhibited activity of the ABC transporter BCRP only when used at a high concentration (100 μM) (Dankers et al., 2013), not relevant to human exposure, thus ruling out any DDI or toxic consequence. With respect to TBBPA plasma concentrations in humans, they are either below the limit of quantification or very low, *i.e.*, <40 pM, reflecting rapid metabolism of TBBPA (Kibakaya et al., 2009; Schauer et al., 2006). Minimal concentrations of TBBPA (in the 0.5 μM range) required to inhibit SLC transporters like OATP1B1 and OAT3 can therefore probably not be reached *in vivo*, making very unlikely any DDI or perturbation of membrane transport of physiological substrates like hormones or bile acid due to TBBPA. In the same way, TBBPA IC_{50} values for the inhibitions of the ABC transporters P-glycoprotein and MRP4 are 22.9 μM and 24.0 μM, respectively (Dankers et al., 2013), and are therefore much higher than human plasma concentrations of TBBPA, thus discarding any relevant blockage of these ABC efflux pumps in TBBPA-exposed humans. Similarly, although plasma concentrations of BPF and BPS have not been yet characterized in humans, they may be hypothesized to be not sufficient to reach levels consistent with SLC transporter inhibition. It should however be kept in mind that humans are likely to be exposed not only to a single bisphenol, but to other contaminants and xenobiotics, that may also interact with drug transporters (Fardel et al., 2012), as recently demonstrated for notably organochlorine pesticides (Bucher et al., 2014), polychlorinated biphenyls (Nicklisch et al., 2016), diesel exhaust particle components (Le Vee et al., 2015) and perfluorinated surfactants (Nakagawa et al., 2009). Plasma levels of bisphenols in association with those of other pollutants may therefore be sufficient to contribute to synergic or additive inhibitory effects towards drug transporters, as already described for pesticide combinations (Pivcevic and Zaja, 2006). In addition, concentrations of bisphenols may be much higher in the gastro-intestinal tract (before first-pass metabolism) than in plasma, and SLC transporters notably expressed at the intestinal level, especially OCT1 (Giacomini et al., 2010), may therefore be hypothesized to be inhibitable by ingested bisphenols.

In summary, BPA and other environmental bisphenol derivatives, including TBBPA, were shown to down-modulate *in vitro* activity of various human SLC drug transporters. Such inhibitions of drug transporters occur however for relatively elevated concentrations of bisphenols (in the μM range), much higher than plasma concentrations commonly observed in human populations (in the nM range for BPA and in the pM range for TBBPA). Such data make unlikely the fact that *in vivo* exposure to a single environmental bisphenol may lead to inhibition of SLC transporters in humans and, by this way to DDI or adverse effects, excepted for the gastrointestinal tract where sufficient concentrations of bisphenols may be reached.

Table 2
Summary of bisphenol effects towards SLC transporter activities.

SLC transporter	Bisphenol			
	BPA	BPF	BPS	TBBPA
OCT1	Inhibition	Inhibition	Stimulation	Inhibition
OCT2	No effect	Stimulation	Stimulation	Inhibition
MATE1	Inhibition	Inhibition	Inhibition	Inhibition
MATE2-K	No effect	No effect	No effect	No effect
OATP1B1	Inhibition	Inhibition	No effect	Inhibition
OATP1B3	Inhibition	Stimulation	No effect	Inhibition
OAT1	Stimulation	Stimulation	Inhibition	No effect
OAT3	Inhibition	Inhibition	Inhibition	Inhibition
NTCP	Inhibition	Inhibition	No effect	Inhibition

Transparency document

The Transparency document associated with this article can be found, in online version.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at http://dx.doi.org/10.1016/j.tiv.2016.12.009.

References

Ahlin, G., Karlsson, J., Pedersen, J.M., Gustavsson, L., Larsson, R., Matsson, P., Norinder, U., Bergstrom, C.A., Artursson, P., 2008. Structural requirements for drug inhibition of the liver specific human organic cation transport protein 1. J. Med. Chem. 51, 5932–5942.

Astorga, B., Ekins, S., Morales, M., Wright, S.H., 2012. Molecular determinants of ligand selectivity for the human multidrug and toxin extruder proteins MATE1 and MATE2-K. J. Pharmacol. Exp. Ther. 341, 743–755.

Ben-Jonathan, N., Steinmetz, R., 1998. Xenoestrogens: the emerging story of bisphenol A. Trends Endocrinol. Metab. 9, 124–128.

Birnbaum, L.S., Staskal, D.F., 2004. Brominated flame retardants: cause for concern? Environ. Health Perspect. 112, 9–17.

Birnbaum, L.S., Aungst, J., Schug, T.T., Goodman, J.L., 2013. Working together: research- and science-based regulation of BPA. Environ. Health Perspect. 121, A206–A207.

Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72, 248–254.

Bucher, S., Le Vee, M., Jouan, E., Fardel, O., 2014. Regulation of hepatic drug transporter activity and expression by organochlorine pesticides. J. Biochem. Mol. Toxicol. 28, 119–128.

Burckhardt, G., Wolff, N.A., 2000. Structure of renal organic anion and cation transporters. Am. J. Physiol. Ren. Physiol. 278, F853–F866.

Chen, D., Kannan, K., Tan, H., Zheng, Z., Feng, Y.L., Wu, Y., Widelka, M., 2016. Bisphenol analogues other than BPA: environmental occurrence, human exposure, and toxicity-a review. Environ. Sci. Technol. 50, 5438–5453.

Cheng, T., Zhao, Y., Li, X., Lin, F., Xu, Y., Zhang, X., Li, Y., Wang, R., Lai, L., 2007. Computation of octanol-water partition coefficients by guiding an additive model with knowledge. J. Chem. Inf. Model. 47, 2140–2148.

Dankers, A.C., Roelofs, M.J., Piersma, A.H., Sweep, F.C., Russel, F.G., van den Berg, M., van Duursen, M.B., Masereeuw, R., 2013. Endocrine disruptors differentially target ATP-binding cassette transporters in the blood-testis barrier and affect Leydig cell testosterone secretion in vitro. Toxicol. Sci. 136, 382–391.

De Bruyn, T., Fattah, S., Stieger, B., Augustijns, P., Annaert, P., 2011. Sodium fluorescein is a probe substrate for hepatic drug transport mediated by OATP1B1 and OATP1B3. J. Pharm. Sci. 100, 5018–5030.

De Bruyn, T., van Westen, G.J., Ijzerman, A.P., Stieger, B., de Witte, P., Augustijns, P.F., Annaert, P.P., 2013. Structure-based identification of OATP1B1/3 inhibitors. Mol. Pharmacol. 83, 1257–1267.

Deutschmann, A., Hans, M., Meyer, R., Haberlein, H., Swandulla, D., 2013. Bisphenol A inhibits voltage-activated Ca(2+) channels in vitro: mechanisms and structural requirements. Mol. Pharmacol. 83, 501–511.

Duan, P., Li, S., Ai, N., Hu, L., Welsh, W.J., You, G., 2012. Potent inhibitors of human organic anion transporters 1 and 3 from clinical drug libraries: discovery and molecular characterization. Mol. Pharm. 9, 3340–3346.

Fardel, O., Kolasa, E., Le Vee, M., 2012. Environmental chemicals as substrates, inhibitors or inducers of drug transporters: implication for toxicokinetics, toxicity and pharmacokinetics. Expert Opin. Drug Metab. Toxicol. 8, 29–46.

Germer, S., Piersma, A.H., van der Ven, L., Kamyschnikow, A., Fery, Y., Schmitz, H.J., Schrenk, D., 2006. Subacute effects of the brominated flame retardants hexabromocyclododecane and tetrabromobisphenol A on hepatic cytochrome P450 levels in rats. Toxicology 218, 229–236.

Giacomini, K.M., Huang, S.M., Tweedie, D.J., Benet, L.Z., Brouwer, K.L., Chu, X., Dahlin, A., Evers, R., Fischer, V., Hillgren, K.M., Hoffmaster, K.A., Ishikawa, T., Keppler, D., Kim, R.B., Lee, C.A., Niemi, M., Polli, J.W., Sugiyama, Y., Swaan, P.W., Ware, J.A., Wright, S.H., Yee, S.W., Zamek-Gliszczynski, M.J., Zhang, L., 2010. Membrane transporters in drug development. Nat. Rev. Drug Discov. 9, 215–236.

Golub, M.S., Wu, K.L., Kaufman, F.L., Li, L.H., Moran-Messen, F., Zeise, L., Alexeeff, G.V., Donald, J.M., 2010. Bisphenol A: developmental toxicity from early prenatal exposure. Birth Defects Res. B Dev. Reprod. Toxicol. 89, 441–466.

de Graaf, W., Hausler, S., Heger, M., van Ginhoven, T.M., van Cappellen, G., Bennink, R.J., Kullak-Ublick, G.A., Hesselmann, R., van Gulik, T.M., Stieger, B., 2011. Transporters involved in the hepatic uptake of (99m)Tc-mebrofenin and indocyanine green. J. Hepatol. 54, 738–745.

Gripon, P., Rumin, S., Urban, S., Le Seyec, J., Glaise, D., Cannie, I., Guyomard, C., Lucas, J., Trepo, C., Guguen-Guillouzo, C., 2002. Infection of a human hepatoma cell line by hepatitis B virus. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 99, 15655–15660.

Gui, C., Miao, Y., Thompson, L., Wahlgren, B., Mock, M., Stieger, B., Hagenbuch, B., 2008. Effect of pregnane X receptor ligands on transport mediated by human OATP1B1 and OATP1B3. Eur. J. Pharmacol. 584, 57–65.

Hagenbuch, B., Stieger, B., 2013. The SLCO (former SLC21) superfamily of transporters. Mol. Asp. Med. 34, 396–412.

Halden, R.U., 2010. Plastics and health risks. Annu. Rev. Public Health 31, 179–194.

Hillgren, K.M., Keppler, D., Zur, A.A., Giacomini, K.M., Stieger, B., Cass, C.E., Zhang, L., 2013. Emerging transporters of clinical importance: an update from the International Transporter Consortium. Clin. Pharmacol. Ther. 94, 52–63.

Jigorel, E., Le Vee, M., Boursier-Neyret, C., Bertrand, M., Fardel, O., 2005. Functional expression of sinusoidal drug transporters in primary human and rat hepatocytes. Drug Metab. Dispos. 33, 1418–1422.

Jin, H., Audus, K.L., 2005. Effect of bisphenol A on drug efflux in BeWo, a human trophoblast-like cell line. Placenta 26 (Suppl. A), S96–S103.

Jochmanova, I., Lazurova, Z., Rudnay, M., Bacova, I., Marekova, M., Lazurova, I., 2015. Environmental estrogen bisphenol A and autoimmunity. Lupus 24, 392–399.

Jouan, E., Le Vee, M., Denizot, C., Da Violante, G., Fardel, O., 2014. The mitochondrial fluorescent dye rhodamine 123 is a high-affinity substrate for organic cation transporters (OCTs) 1 and 2. Fundam. Clin. Pharmacol. 28, 65–77.

Kang, J.H., Kondo, F., Katayama, Y., 2006. Human exposure to bisphenol A. Toxicology 226, 79–89.

Kibakaya, E.C., Stephen, K., Whalen, M.M., 2009. Tetrabromobisphenol A has immunosuppressive effects on human natural killer cells. J. Immunotoxicol. 6, 285–292.

Koepsell, H., 2015. Role of organic cation transporters in drug-drug interaction. Expert Opin. Drug Metab. Toxicol. 11, 1619–1633.

Lang, I.A., Galloway, T.S., Scarlett, A., Henley, W.E., Depledge, M., Wallace, R.B., Melzer, D., 2008. Association of urinary bisphenol A concentration with medical disorders and laboratory abnormalities in adults. JAMA 300, 1303–1310.

Le Vee, M., Jigorel, E., Glaise, D., Gripon, P., Guguen-Guillouzo, C., Fardel, O., 2006. Functional expression of sinusoidal and canalicular hepatic drug transporters in the differentiated human hepatoma HepaRG cell line. Eur. J. Pharm. Sci. 28, 109–117.

Le Vee, M., Noel, G., Jouan, E., Stieger, B., Fardel, O., 2013. Polarized expression of drug transporters in differentiated human hepatoma HepaRG cells. Toxicol. in Vitro 27, 1979–1986.

Le Vee, M., Jouan, E., Stieger, B., Lecureur, V., Fardel, O., 2015. Regulation of human hepatic drug transporter activity and expression by diesel exhaust particle extract. PLoS One 10, e0121232.

Lecureur, V., Courtois, A., Payen, L., Verhnet, L., Guillouzo, A., Fardel, O., 2000. Expression and regulation of hepatic drug and bile acid transporters. Toxicology 153, 203–219.

Maeda, K., Sugiyama, Y., 2013. Transporter biology in drug approval: regulatory aspects. Mol. Asp. Med. 34, 711–718.

Mayati, A., Bruyere, A., Moreau, A., Jouan, E., Denizot, C., Parmentier, Y., Fardel, O., 2015. Protein kinase C-independent inhibition of organic cation transporter 1 activity by the bisindolylmaleimide Ro 31-8220. PLoS One 10, e0144667.

Mazur, C.S., Marchitti, S.A., Dimova, M., Kenneke, J.F., Lumen, A., Fisher, J., 2012. Human and rat ABC transporter efflux of bisphenol A and bisphenol a glucuronide: interspecies comparison and implications for pharmacokinetic assessment. Toxicol. Sci. 128, 317–325.

Montanari, F., Ecker, G.F., 2015. Prediction of drug-ABC-transporter interaction—recent advances and future challenges. Adv. Drug Deliv. Rev. 86, 17–26.

Moreau, A., Le Vee, M., Jouan, E., Parmentier, Y., Fardel, O., 2011. Drug transporter expression in human macrophages. Fundam. Clin. Pharmacol. 25, 743–752.

Moscovitz, J.E., Nahar, M.S., Shalat, S.L., Slitt, A.L., Dolinoy, D.C., Aleksunes, L.M., 2016. Correlation between conjugated bisphenol A concentrations and efflux transporter expression in human fetal livers. Drug Metab. Dispos. 44, 1061–1065.

Nakagawa, H., Terada, T., Harada, K.H., Hitomi, T., Inoue, K., Inui, K., Koizumi, A., 2009. Human organic anion transporter hOAT4 is a transporter of perfluorooctanoic acid. Basic Clin. Pharmacol. Toxicol. 105, 136–138.

Nicklisch, S.C., Rees, S.D., McGrath, A.P., Gokirmak, T., Bonito, L.T., Vermeer, L.M., Cregger, C., Loewen, G., Sandin, S., Chang, G., Hamdoun, A., 2016. Global marine pollutants inhibit P-glycoprotein: environmental levels, inhibitory effects, and cocrystal structure. Sci. Adv. 2, e1600001.

Obaidat, A., Roth, M., Hagenbuch, B., 2012. The expression and function of organic anion transporting polypeptides in normal tissues and in cancer. Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 52, 135–151.

Peretz, J., Vrooman, L., Ricke, W.A., Hunt, P.A., Ehrlich, S., Hauser, R., Padmanabhan, V., Taylor, H.S., Swan, S.H., VandeVoort, C.A., Flaws, J.A., 2014. Bisphenol A and reproductive health: update of experimental and human evidence, 2007–2013. Environ. Health Perspect. 122, 775–786.

Peyre, L., Rouimi, P., de Sousa, G., Helies-Toussaint, C., Carre, B., Barcellini, S., Chagnon, M.C., Rahmani, R., 2014. Comparative study of bisphenol A and its analogue bisphenol S on human hepatic cells: a focus on their potential involvement in nonalcoholic fatty liver disease. Food Chem. Toxicol. 70, 9–18.

Pivcevic, B., Zaja, R., 2006. Pesticides and their binary combinations as P-glycoprotein inhibitors in NIH 3T3/MDR1 cells. Environ. Toxicol. Pharmacol. 22, 268–276.

Planchamp, C., Hadengue, A., Stieger, B., Bourquin, J., Vonlaufen, A., Frossard, J.L., Quadri, R., Becker, C.D., Pastor, C.M., 2007. Function of both sinusoidal and canalicular transporters controls the concentration of organic anions within hepatocytes. Mol. Pharmacol. 71, 1089–1097.

Popovic, M., Zaja, R., Fent, K., Smital, T., 2014. Interaction of environmental contaminants with zebrafish organic anion transporting polypeptide, Oatp1d1 (Slco1d1). Toxicol. Appl. Pharmacol. 280, 149–158.

Rochester, J.R., 2013. Bisphenol A and human health: a review of the literature. Reprod. Toxicol. 42, 132–155.

Sayyed, K., Vee, M.L., Abdel-Razzak, Z., Jouan, E., Stieger, B., Denizot, C., Parmentier, Y., Fardel, O., 2016. Alteration of human hepatic drug transporter activity and expression by cigarette smoke condensate. Toxicology 363–364, 58–71.

Schauer, U.M., Volkel, W., Dekant, W., 2006. Toxicokinetics of tetrabromobisphenol a in humans and rats after oral administration. Toxicol. Sci. 91, 49–58.

Shitara, Y., Sato, H., Sugiyama, Y., 2005. Evaluation of drug-drug interaction in the hepatobiliary and renal transport of drugs. Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 45, 689–723.

Soriano, S., Ripoll, C., Alonso-Magdalena, P., Fuentes, E., Quesada, I., Nadal, A., Martinez-Pinna, J., 2016. Effects of bisphenol A on ion channels: experimental evidence and molecular mechanisms. Steroids 111, 12–20.

Sparfel, L., Pinel-Marie, M.L., Boize, M., Koscielny, S., Desmots, S., Pery, A., Fardel, O., 2010. Transcriptional signature of human macrophages exposed to the environmental contaminant benzo(a)pyrene. Toxicol. Sci. 114, 247–259.

Srivastava, S., Gupta, P., Chandolia, A., Alam, I., 2015. Bisphenol A: a threat to human health? J. Environ. Health 77, 20–26.

Stieger, B., Hagenbuch, B., 2014. Organic anion-transporting polypeptides. Curr. Top. Membr. 73, 205–232.

Thayer, K.A., Doerge, D.R., Hunt, D., Schurman, S.H., Twaddle, N.C., Churchwell, M.I., Garantziotis, S., Kissling, G.E., Easterling, M.R., Bucher, J.R., Birnbaum, L.S., 2015. Pharmacokinetics of bisphenol A in humans following a single oral administration. Environ. Int. 83, 107–115.

Thompson, P.A., Khatami, M., Baglole, C.J., Sun, J., Harris, S.A., Moon, E.Y., Al-Mulla, F., Al-Temaimi, R., Brown, D.G., Colacci, A., Mondello, C., Raju, J., Ryan, E.P., Woodrick, J., Scovassi, A.I., Singh, N., Vaccari, M., Roy, R., Forte, S., Memeo, L., Salem, H.K., Amedei, A., Hamid, R.A., Lowe, L., Guarnieri, T., Bisson, W.H., 2015. Environmental immune disruptors, inflammation and cancer risk. Carcinogenesis 36 (Suppl. 1), S232–S253.

Treiber, A., Schneiter, R., Hausler, S., Stieger, B., 2007. Bosentan is a substrate of human OATP1B1 and OATP1B3: inhibition of hepatic uptake as the common mechanism of its interactions with cyclosporin A, rifampicin, and sildenafil. Drug Metab. Dispos. 35, 1400–1407.

Trompier, D., Baubichon-Cortay, H., Chang, X.B., Maitrejean, M., Barron, D., Riordon, J.R., Di Pietro, A., 2003. Multiple flavonoid-binding sites within multidrug resistance protein MRP1. Cell. Mol. Life Sci. 60, 2164–2177.

Vandenberg, L.N., Chahoud, I., Heindel, J.J., Padmanabhan, V., Paumgartten, F.J., Schoenfelder, G., 2010. Urinary, circulating, and tissue biomonitoring studies indicate widespread exposure to bisphenol A. Environ. Health Perspect. 118, 1055–1070.

Vrzal, R., Zenata, O., Doricakova, A., Dvorak, Z., 2015. Environmental pollutants parathion, paraquat and bisphenol A show distinct effects towards nuclear receptors-mediated induction of xenobiotics-metabolizing cytochromes P450 in human hepatocytes. Toxicol. Lett. 238, 43–53.