

Signification de l'équation de Druckrey-Küpfmüller pour l'évaluation des risques
La toxicité des insecticides néonicotinoïdes contre les arthropodes est renforcée par la
durée d'exposition

Henk A. Tennekes

(Traduction Christian Pacteau)

Experimental Toxicology Services (ETS) Nederland bv
Frankensteeg 4,
7201KN Zutphen, The Netherlands

Addressee for Manuscript Correspondence:

Dr. H.A. Tennekes

Telephone: + 31 575 545 500

Telefax: + 31 575 516 717

e-mail: info@toxicology.nl

Published as NEWS&VIEWS in the journal TOXICOLOGY

Titre court : Signification de l'équation de Druckrey-Küpfmüller pour l'évaluation des risques

Résumé

L'essence de l'équation de Druckrey-Küpfmüller $d t^n = \text{constante}$ (où d = dose journalière et t = durée d'exposition pour observer un effet, avec $n > 1$), pour les carcinogènes chimiques, se définit ainsi : **la dose totale requise pour produire un même effet décroît avec la décroissance des niveaux d'exposition, même si la durée d'exposition pour produire un même effet s'accroît avec des niveaux d'exposition décroissants.** Druckrey-Küpfmüller déduisent que si les deux conditions, les récepteurs se lient au carcinogène chimique et les effets sont irréversibles, la durée d'exposition renforce l'effet. L'équation de Druckrey-Küpfmüller explique pourquoi la toxicité peut se produire après une durée d'exposition prolongée à de très bas niveaux d'exposition. Récemment, des caractéristiques de doses-réponses similaires ont été établies pour la toxicité des néonicotinoïdes imidaclopride et thiaclopride pour les arthropodes. Cette observation est hautement pertinente pour l'évaluation des risques environnementaux. Les approches traditionnelles qui considèrent les effets toxiques à des durées d'expositions fixes sont incapables de fournir une extrapolation à partir des valeurs mesurées pour des effets qui peuvent se produire à d'autres durées d'exposition. L'approche par les relations durées-effets, qui fournit des informations sur les doses et les durées d'exposition nécessaires pour produire des effets toxiques sur les organismes testés sont requises pour prédire des effets toxiques pour n'importe quelle combinaison de concentration et de durée dans l'environnement.

Mots clefs : insecticides, carcinogènes, arthropodes, toxicité.

UN BREF HISTORIQUE DE L'EQUATION DE DRUCKREY-KÜPFMÜLLER

La première étude repère, des relations doses-réponses aux produits chimiques carcinogènes, fut rapporté par Druckrey-Küpfmüller avec le 4-diméthylaminoazobenzène (4-DAB) aussi connu comme le « Beurre jaune » dans l'expérimentation sur les rats BDIII (Druckrey 1943). Avec un éventail de doses journalières de 3 à 30mg par rat, il fut mis en évidence que le temps (t) pour qu'apparaisse un cancer du foie était inversement proportionnelle à la dose journalière (d). Il fut ainsi constaté que le produit de la dose journalière par le temps médian d'induction d'une tumeur, lequel correspond à la somme des doses journalières, i. e. la dose totale (D), était pratiquement constant (Tableau 1)

$$d \ t = D \sim 1\ 000 \text{ mg} = \text{constante} \quad (1)$$

Tableau 1: Induction du cancer du foie dans l'expérimentation sur les rats BDIII par le 4-DAB (Druckrey, 1943)

Dose journalière, d (mg/rat)	Temps médian d'induction d'une tumeur, t (jours)	Dose totale carcinogénique, D (mg/rat)
30	34	1 020
20	52	1 040
10	95	950
5	190	950
3	350	1 050

Supposant que la dose journalière (d) et la concentration en 4-DAB (c), au site de l'action carcinogénétique sont proportionnelles, l'équation (1) s'écrirait ainsi :

$$c \ t = \text{constante} \quad (2)$$

L'équation (2) qui exprime que le produit de la concentration d'exposition par la durée d'exposition produit un effet toxique constant, est connue sous le nom de Règle de Haber (Haber, 1924), après que le chimiste Allemand Fritz Haber, au début des années 1900, ait caractérisé la toxicité aiguë des gaz de combat utilisés dans la guerre chimique (pour une revue, voir Witsch, 1999). Druckrey-Küpfmüller (1948) fournirent une explication théorique pour la Règle de Haber, comme suit : notant la concentration initiale des récepteurs spécifiques auquel le 4-DAB réagit, avec R, la concentration des récepteurs auxquels les 4-DAB ont réagi avec C_R , et la concentration moyenne du 4-DAB au site d'action, avec C, les réactions cinétiques dans le cas d'une réaction bimoléculaire sont :

$$dC_R / dt = K (R - C_R) C - C_R / T_R \quad (3)$$

où K est la constante de réaction pour l'association et T_R le temps constant pour la dissociation. Druckrey-Küpfmüller infèrent ensuite que leur expérience a montré que l'action carcinogénétique du 4-DAB était *irréversible*, noté $T_R \rightarrow \infty$

$$dC_R / dt = K (R - C_R) C \quad (4)$$

Maintenant, supposant que le temps d'effet $C_R \ll R$, ce qui apparaît raisonnable, quand R reste pratiquement constant, donc

$$dC_R / dt = K R C \quad (5)$$

Dès que le niveau de la dose était constant pendant l'étude, C restait probablement constant aussi. L'intégration conduit à :

$$C_R = K R C t \quad (6)$$

Cette équation est la Règle de Haber. Cette équation (6) fournit une explication théorique pour la règle de Haber, mais elle suppose une proportionnalité entre la concentration des récepteurs occupés et l'*effet*. Ceci peut ne pas être toujours le cas. La réversibilité d'un effet peut avoir la même signification pour des doses-réponses caractéristiques que la réversibilité de la liaison du récepteur à la substance chimique. Notant le temps constant pour la réversibilité de l'effet T_R , trois types de doses-réponses caractéristiques furent identifiés par Druckrey-Küpfmüller (1949) quand les constantes de temps T_R et T_f approchent respectivement zéro et l'infini (Tableau 2)

Tableau 2: Doses-réponses caractéristiques d'après Druckrey and Küpfmüller (1949)

Réversibilité du récepteur lié	Récepteur lié en relation avec la concentration du composé	Réversibilité de l'effet	Effet en relation avec le récepteur lié	Effet en relation avec la concentration du composé	Doses-réponses caractéristiques
$T_R \rightarrow 0$	$C_R \sim C$	$T_r \rightarrow 0$	$E \sim C_R$	$E \sim C$	Dose-dépendante
		$T_r \rightarrow \infty$	$E \sim \int C_R dt$	$E \sim \int C dt$	Ct = constante
$T_R \rightarrow \infty$	$C_R \sim \int C dt$	$T_r \rightarrow 0$	$E \sim C_R$	$E \sim \int C dt$	Ct = constante
		$T_r \rightarrow \infty$	$E \sim \int C_R dt$	$E \sim \int \int C dt$	Renforcé par la durée

Un effet peut être dose-dépendant quand des temps constants pour le récepteur lié (T_R) et l'effet (T_r) sont assez petits. La Règle de Haber (ct = constante) peut être obtenue quand, chaque récepteur lié ou l'effet, est irréversible. Si, cependant, les deux, le récepteur lié et l'effet, sont irréversibles, l'effet serait proportionnel à la double intégrale de la concentration du composé au fil du temps. L'implication serait que le temps d'exposition *renforcerait l'effet*. La première indication que le temps d'exposition peut renforcer l'action du produit chimique carcinogène fut une dose totale carcinogénique significativement très petite (700 mg au lieu de 1000mg) pour une dose journalière de 4-DAB de 1mg et pour un temps médian d'induction d'une tumeur hépatique de 700 jours, mais Druckrey et son équipe rapportèrent aussi d'autres preuves, en 1963, au moyen d'études de référence d'induction de carcinomes du conduit auditif et du foie par le 4-diméthylaminostilbene (4-DAST) (Druckrey and Dischler 1963) et le diéthylnitrosamine (DNA) (Druckrey *et al.* 1963), respectivement, dans l'expérimentation avec des rats BDII. (Tableaux 3 &4)

Tableau 3. Induction d'un carcinome du conduit auditif dans l'expérimentation avec des rats BDII par le 4-DAST (Druckrey and Dischler, 1963)

Dose journalière, d (mg/kg)	Temps médian d'induction d'une tumeur, t (jours)	Dose totale carcinogénique, D (mg/kg)
3.4	250	850
2.0	340	680
1.0	407	407
0.5	550	275
0.28	607	170
0.2	700	140
0.1	900	90

Tableau 4: Induction du carcinome du foie dans l'expérimentation avec des rats BDII par le DENA (Druckrey et al, 1963)

Dose/journalière, d (mg/kg)	Temps médian d'induction d'une tumeur, t (jours)	Dose totale, D (mg/kg)
9.6	101	963
4.8	137	660
2.4	192	460
1.2	238	285
0.6	355	213
0.3	457	137
0.15	609	91
0.075	840	64

En contraste avec l'étude sur la carcinogénicité du 4-DAB, où la dose totale carcinogénique restait pratiquement constante aux dosages de 3 à 0,3 mg/jour, la dose totale carcinogénique *décroissait* avec la décroissance du niveau des doses du 4-DAST ou DENA, alors que le temps médian d'induction de la tumeur s'accroissait avec la décroissance des niveaux des doses journalières. Dans un système de coordonnées logarithmiques, la relation entre le temps (t) médian d'induction de la tumeur et la dose journalière (d) était linéaire :

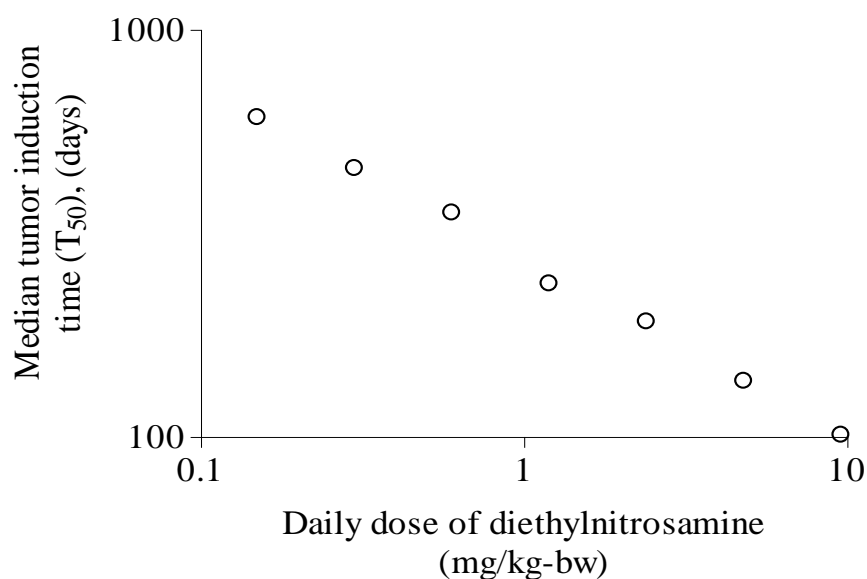
$$\ln d = \ln k - n \ln t \quad (7)$$

ou

$$d t^n = \text{constante} \quad (8)$$

où n est l'exposant du temps t , 3,0 et 2,3 pour le 4-DAST et le DENA, respectivement (Figure 1).

Figure 1 (log axes)



LA SIGNIFICATION DE L'EQUATION DE DRUCKREY-KÜPFMÜLLER POUR L'EVALUATION DES RISQUES ENVIRONNEMENTAUX

La dépendance dose - durée traduite par l'équation de Druckrey-Küpfmüller (8) fut confirmée dans l'étude ED₀₁, la plus vaste expérimentation toxicologique jamais conduite, examinant la carcinogénicité du 2-acétylaminofluorene sur environ 25 000 souris (Littlefield *et al.*, 1980) et dans l'étude BIBRA avec 4 000 rats pour étudier la carcinogénicité des nitrosamines (Peto *et al.*, 1991). Il fut aussi découvert que l'équation de Druckrey-Küpfmüller (8) s'appliquait aux cancers de la peau non mélanomes induits par les radiations solaires ultraviolettes (UVR). Les UVR sont généralement subdivisées en radiations Ultraviolettes A (UVA) dont les bandes de fréquences sont (UVA2: 315-340 nm, et UVA1: 340-400 nm) et les radiations ultraviolettes B (UVB) dont la bande de fréquences est (280-315 nm). Il a été démontré que la relation entre la dose journalière (d) et le temps d'induction de la tumeur (non mélanome) de la peau (t), chez les souris chauves, pour les deux UVA1 (de Laats *et al.*, 1997) et UVB (Sternborg *et al.*, 1988), était :

$$d^r t = \text{constante} \quad (9)$$

ou

$$d t^{1/r} = \text{constante} \quad (10)$$

où $r = 0.62$ pour les UVB et 0.35 pour les UVA1 et $1/r = 1.6$ pour les UVB et 2.9 pour les UVA1.

Récemment il fut montré que l'équation de Druckrey-Küpfmüller (8) était également d'une grande signification pour l'évaluation des risques environnementaux. Sanchez-Bayo (2009) a démontré pour les insecticides néonicotinoïdes, l'imidaclopride et le thiaclopride, que les relations entre la concentration moyenne du toxique (C) et le temps pour une mortalité de 50% (T) d'arthropodes exposés, suit une courbe hyperbolique décrite par l'équation

$$T = a * C^{-b} \quad (11)$$

En conséquence, en utilisant les logarithmes des variables C et T une relation linéaire fut obtenue.

$$\ln T = a' - b \ln C \quad (12)$$

Où « a » est l'intersection avec l'axe des ordonnées et « b » la pente. L'équation (12) peut être transformée en

$$C^b T = \text{constante} \quad (13)$$

ou

$$C T^{1/b} = \text{constante} \quad (14)$$

Equation qui est celle de Druckrey-Küpfmüller (8). Similaire aux doses-réponses caractéristiques des produits chimiques carcinogènes, le temps d'exposition renforce la toxicité de l'imidaclopride et du thiaclopride pour différentes espèces d'arthropodes (Sanchez-Bayo, 2009). Le produit CT, lequel reflète la dose totale requise pour un effet léthal, décroissait avec la décroissance de la concentration du toxique (C) (Tableau 5) alors que les durées, pour un taux de mortalité de 50% T, s'accroissaient avec la décroissance de la concentration du toxique (C).

Tableau 5: Mortalité des Arthropodes induite par les insecticides néonicotinoïdes (Sanchez-Bayo, 2009)*

Espèces	Substance chimique	Concentration (C) en $\mu\text{g.L}^{-1}$	Temps pour 50% de mortalité (T) en jours	Produit C x T en $\mu\text{g.L}^{-1}.\text{jours}$
<i>Cypridopsis</i> <i>Vidua</i>	Imidaclopride	4	5.2	20.8
		16	3.0	48
		64	3.3	211.2
		250	2.3	575
		1 000	2.0	2 000
		4 000	0.9	3 600
<i>Daphnia magna</i>	Imidaclopride	250	384.7	96 175
		750	69.7	52 275
		2 220	18.6	41 292
		6 700	15.0	100 500
		20 000	18.4	368 000
		60 000	3.0	180 000
<i>Gammarus</i> <i>Pulex</i>	Thiaclopride	99	63.6	6 296.4
		364	16.7	6 078.8
		988	6.5	6 422
		3 100	3.2	9 920
		9 520	0.9	8 568
		113.3	3.2	362.6
<i>Sympetrum</i> <i>Striolatum</i>	Thiacloprid	7.2	20.6	148.3
		8.0	17.2	137.6
		12.7	13.0	165.1
		113.3	3.2	362.6

* Les effets du thiaclopride sur *Simulium latigonium* reporté by Sanchez-Bayo (2009) n'ont pas été prises en considération en raison de la pauvreté des données de l'équation de régression (12)

Il fut montré que la valeur de l'exposant du temps (1/b) dans l'équation (14) était de 4,65 et 1,31 pour la toxicité de l'imidaclopride pour les *Cypridopsis vidua* et *Daphnia magna*, respectivement, et 1.10 et 1.53 pour la toxicité du thiaclopride pour les *Gammarus pulex* et *Sympetrum striolatum*, respectivement (Sanchez-Bayo, 2009). Suchail et al. (2001) l'ont aussi noté pour des concentrations de 0.1, 1, et 10µg d'imidaclopride par litre, la dose totale cumulée ingérée par les abeilles au cours d'une intoxication chronique fut de 60 à 6000 fois plus basse que les doses nécessaires pour produire le même effet dans les tests d'intoxication aiguë. Stoughton et al (2008) ont déterminé la valeur de la concentration létale d'imidaclopride (CL50) pour des moucheron (*Chironomus tentans*), elle était de 5.75 µg/L, mais quand les animaux étaient exposés en continu pendant 28 jours, la valeur de la CL50 était beaucoup plus basse, avec une concentration de seulement 0.91 µg/L. Le produit CT pour le *Chironomus tentans* était très similaire sous les conditions d'exposition aiguë et chronique.

DISCUSSION

Druckrey-Küpfmüller (1949) ont expliqué les doses-réponses caractéristiques des produits chimiques carcinogènes en soulignant que si les deux conditions, récepteurs liés (à des produits chimiques) et les effets constatés, sont irréversibles, la durée d'exposition renforcerait l'effet. L'équation de Druckrey-Küpfmüller (8), établie dans les années 1960 à partir d'expérimentations sur les rats avec le 4-DAST ou le DENA, a été par la suite confirmée à grande échelle par des études de carcinogénicité sur les souris et les rats et se révéla aussi applicable aux cancers de la peau, non-mélanomes, induits chez les souris chauves par les radiations ultraviolettes. La caractéristique essentielle de l'équation de Druckrey-Küpfmüller (8) est que la dose totale requise pour produire le même effet *décroît* avec des niveaux d'expositions décroissants même si la durée d'exposition pour produire le même effet s'allonge avec des niveaux d'expositions décroissants. Récemment, des doses-réponses caractéristiques similaires ont été établies pour la toxicité des insecticides néonicotinoïdes, l'imidaclopride et le thiaclopride, pour les arthropodes confirmant ainsi le théorème de Druckrey-Küpfmüller (Tableau 2). L'imidaclopride fut le premier insecticide efficace dont le mode d'action dérive d'un blocage presque complet, *virtuellement irréversible*, des récepteurs post-synaptiques nicotiniques de l'acétylcholine (nAChRs) du système nerveux central des insectes (Abbink, 1991; Buckingham et al., 1997; Zhang et al., 2000). L'imidaclopride a une affinité beaucoup plus élevée pour les récepteurs nAChRs des insectes que pour les récepteurs nAChRs des vertébrés (Liu and Cassida, 1993), il est donc moins toxique pour les mammifères et les oiseaux. Les récepteurs post-synaptiques nicotiniques de l'acétylcholine (nAChRs) médiatisent la transmission synaptique cholinergique rapide et joue un rôle dans de nombreux processus cognitifs. La capacité d'apprentissage des abeilles butineuses peut être endommagé par des doses sub-létales d'imidaclopride (Guez et al., 2001; Decourtye et al., 2004; Colin et al., 2004), endommagement qui peut au cours du temps être nuisible à la colonie d'abeilles, et finalement, être la cause de l'effondrement de la colonie. L'équation de Druckrey-Küpfmüller (8) explique pourquoi de tels effets peuvent se produire à de bas niveaux d'exposition et être ainsi hautement pertinente pour l'évaluation des risques environnementaux. Les approches traditionnelles qui considèrent les effets toxiques à des durées d'exposition fixes sont impuissantes pour fournir des extrapolations à partir des valeurs mesurées pour des effets qui peuvent se produire pour d'autres temps d'exposition. Les approches temps-effets, qui fournissent l'information sur les doses et le temps d'exposition nécessaires pour produire des effets toxiques sur les organismes testés, sont requises pour prédire les effets toxiques pour n'importe quelle combinaison de concentration et de temps d'exposition dans l'environnement.

REFERENCES

- Abbink, J., 1991. The biochemistry of imidacloprid. Pflanzenschutz-Nachrichten Bayer (Germany, F.R.). Serial ID – ISSN: 0340-1723
- Buckingham, S. D., Lapied, B., Le Corronic, H. et al., 1997. Imidacloprid actions on insect neuronal acetylcholine receptors. *The Journal of Experimental Biology* 200: 2685-2692
- Colin, M.E., Bonmatin, J.M., Moineau, I. et al., 2004. A method to quantify and analyze the foraging activity of honey bees: relevance to sub-lethal effects induced by systemic insecticides. *Arch Environ Contam Toxicol* 47 (3): 387-395
- Decourtye, A., Devillers, J., Cluzeau, S. et al., 2004. Effects of imidacloprid and deltamethrin on associative learning in honeybees under semi-field and laboratory conditions. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 57, 410-419
- de Laat, A., van der Leun, J. C., and de Gruijl, F. R., 1997. Carcinogenesis induced by UVA (365-nm) radiation: the dose-time dependence of tumour formation in hairless mice. *Carcinogenesis* 18, 1013-20
- Druckrey, H., and Küpfmüller, K., 1948. Quantitative Analyse der Krebsentstehung. *Z Naturforschung* 3b, 254-266.
- Druckrey, H., and Kupfmüller, K., 1949. Dosis und Wirkung. Beiträge zur theoretischen Pharmakologie. Editio Cantor GmbH, Freiburg im Breisgau, Germany
- Druckrey, H., and Dischler, W., 1963. Dosis-Wirkungsbeziehungen bei der Krebserzeugung durch 4-dimethylaminostilben bei Ratten. *Z Krebsforsch* 65, 272
- Druckrey, H., Schildbach, A., Schmaehl, D., Preussmann, R., and Ivankovic, S., 1963. Quantitative Analysis of the Carcinogenic Effect of Diethylnitrosamine. *Arzneimittelforschung* 13, 841-51
- Guez, D., Suchail, S., Gauthier, M. et al., 2001. Contrasting effects of imidacloprid on habituation in 7- and 8-day-old honeybees (*Apis mellifera*). *Neurobiol. Learn. Mem.* 76, 183-191
- Haber, F., 1924. Zur Geschichte des Gaskrieges. In *Fünf Vorträge aus den Jahren 1920-1923*, pp. 76-92. Julius Springer, Berlin.
- Littlefield, N. A., Farmer, J. H., Gaylor, D. W., and Sheldon, W. G., 1980. Effects of dose and time in a long-term, low-dose carcinogenic study. *J Environ Pathol Toxicol* 3, 17-34
- Liu, M.Y. and Casida, J. E., 1993. High affinity binding of [3H]-imidacloprid in the insect acetylcholine receptor. *Pestic Biochem Physiol* 46, 40-46
- Peto, R., Gray, R., Brantom, P., and Grasso, P., 1991. Effects on 4080 rats of chronic ingestion of N-nitrosodiethylamine or N-nitrosodimethylamine: a detailed dose-response study. *Cancer Res* 51, 6415-51
- Sanchez-Bayo, F., 2009. From simple toxicological models to prediction of toxic effects in time. *Ecotoxicology* 18, 343-354
- Sterenborg, H. J., van Weelden, H., and van der Leun, J. C., 1988. The dose-response relationship for tumourigenesis by UV radiation in the region 311-312 nm. *J Photochem Photobiol B* 2, 179-94
- Stoughton, S.J., Liber, K., Culp, J. and Cessna, A., 2008. Acute and chronic toxicity of imidacloprid to the aquatic invertebrates *Chironomus tentans* and *Hyalella azteca* under constant- and pulse-exposure conditions. *Arch Environ Contam Toxicol* 54:662-673
- Suchail, S., Guez, D., and Belzunces, 2001. Discrepancy between acute and chronic toxicity induced by imidacloprid and its metabolites in *Apis mellifera*. *Environmental Toxicology and Chemistry* 20, 2482-2486
- Witschi, H., 1999. Some notes on the history of Haber's law. *Toxicological Sciences* 50, 164-168
- Zhang, A., Kayser, H., Maienfisch, P., and Casida, J. E., 2000. Insect nicotinic acetylcholine receptor: conserved neonicotinoid specificity of [³H] imidacloprid binding site. *J. Neurochem.* 75, 1294-1303