



Master 02 Ecotoxicologie
Animale

Support travaux dirigés (Module PSE)



PDr Sabine Boucetta MCA

Faculté des sciences, département des sciences Biologiques,
université du 20 août 1955 Skikda, Algérie.



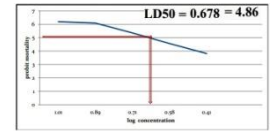
TD 01



PDr Sabine Boucetta MCA

Faculté des sciences, département des sciences Biologiques,
université du 20 août 1955 Skikda, Algérie.

HOW CAN I COMPUTE LD50 FROM LOGIT OR PROBIT?



MODULE : POLLUTION SANTE ET ENVIRONNEMENT (PSE)

Nom :	_____	Prénom :	_____	Date :	05 01 2021
-------	-------	----------	-------	--------	------------

Introduction :	Tout d'abord, ce qui est DL50?
Problématique :	Comment calculer la DL50 ?
Objectifs :	Raisonner, calculer et tracer la courbe DL50
Matériel :	Vidéo+pc

First off, what is LD50? LD50 is the median lethal dose of a toxic substance, i.e., that dose of a chemical which kills half the members of a tested population. Basically, what we have is a predictor that is the dose of a chemical and a binary response variable that indicates whether the individual dies or not. Although, this is stated in terms of lethality and deaths, the concept is a bit more general, i.e., what is the value of the continuous predictor that results in a probability of .5 of being in the 1 category. An example is, what is the test score needed for an individual to have a 50/50 chance of being admitted to a special program?

Tout d'abord, ce qui est DL50? DL50 est la dose létale médiane d'une substance toxique, à savoir que la dose d'un produit chimique qui tue la moitié des membres d'une population testée. Fondamentalement, ce que nous avons est un prédicteur qui est la dose d'une variable de réponse binaire qui indique si l'individu meurt ou non. Bien que, cela est indiqué en termes de létalité et de décès, le concept est un peu plus général, à savoir, quelle est la valeur du prédicteur continu qui se traduit par une probabilité de 0,5 d'être dans la catégorie 1. Un exemple est, ce qui est le score de test nécessaire pour un individu d'avoir une chance d'être admis à un programme spécial 50/50?

Let's say that you have a logit model that looks like this,

Disons que vous avez un modèle logit qui ressemble à ceci,

$$\text{Logit}(Y) = \text{constant} + \text{coef} * X$$

Or a probit model that looks like this,

Ou un modèle probit qui ressemble à ceci,

$$\text{Probit}(Y) = \text{constant} + \text{coef} * X$$

In either case, the computation of LD50 is the same. Here is the formula,

Dans les deux cas, le calcul de la DL 50 est la même. Voici la formule,

$$LD50 = -\text{constant}/\text{coef}$$

Example LD50 for logit model.

$$\begin{aligned} \text{Logit}(Y) &= -8.30019 + .13257 * X \\ LD50 &= 8.30019 / .13257 = 62.61 \end{aligned}$$

Example LD50 for probit model.

$$\begin{aligned} \text{Probit}(Y) &= -4.95764 + .07925 * X \\ LD50 &= 4.95764 / .07925 = 62.56 \end{aligned}$$

Please note that although the LD50 formula is the same for both logit and probit models, the LD50 values are not the same since they come from different probability distributions.

S'il vous plaît noter que, bien que la formule de la DL50 est la même pour les deux modèles logit et probit, les valeurs de DL50 sont pas les mêmes car ils proviennent de différentes distributions de probabilité.

What if instead of a LD50, I want to compute an LD60 or LD75? This requires a small change to the formulas. However, the formula for a logit model is no longer the same as for a probit model.

Et si au lieu d'une DL50, je veux calculer un LD60 ou LD75? Cela nécessite une petite modification des formules. Cependant, la formule d'un logit est plus le même que celui d'un modèle probit.

$$\begin{aligned} \text{Logit: } LD_p &= (\log(p/(1-p)) - \text{constant}) / \text{coef} \\ \text{Probit: } LD_p &= (\text{invnormal}(p) - \text{constant}) / \text{coef} \end{aligned}$$

Example LD75 for logit model.

$$\begin{aligned} \text{Logit}(Y) &= -8.30019 + .13257 * X \\ LD75 &= (\log(.75/(1-.75)) - -8.30019) / .13257 = (1.09861 - -8.30019) / .13257 = 70.9 \end{aligned}$$

Example LD75 for probit model. Probit (Y) = -4.95764 + .07925 * X

$$LD75 = (\text{invnormal}(.75) - -4.95764) / .07925 = (.67449 - -4.95764) / .07925 = 71.1$$



TD 01



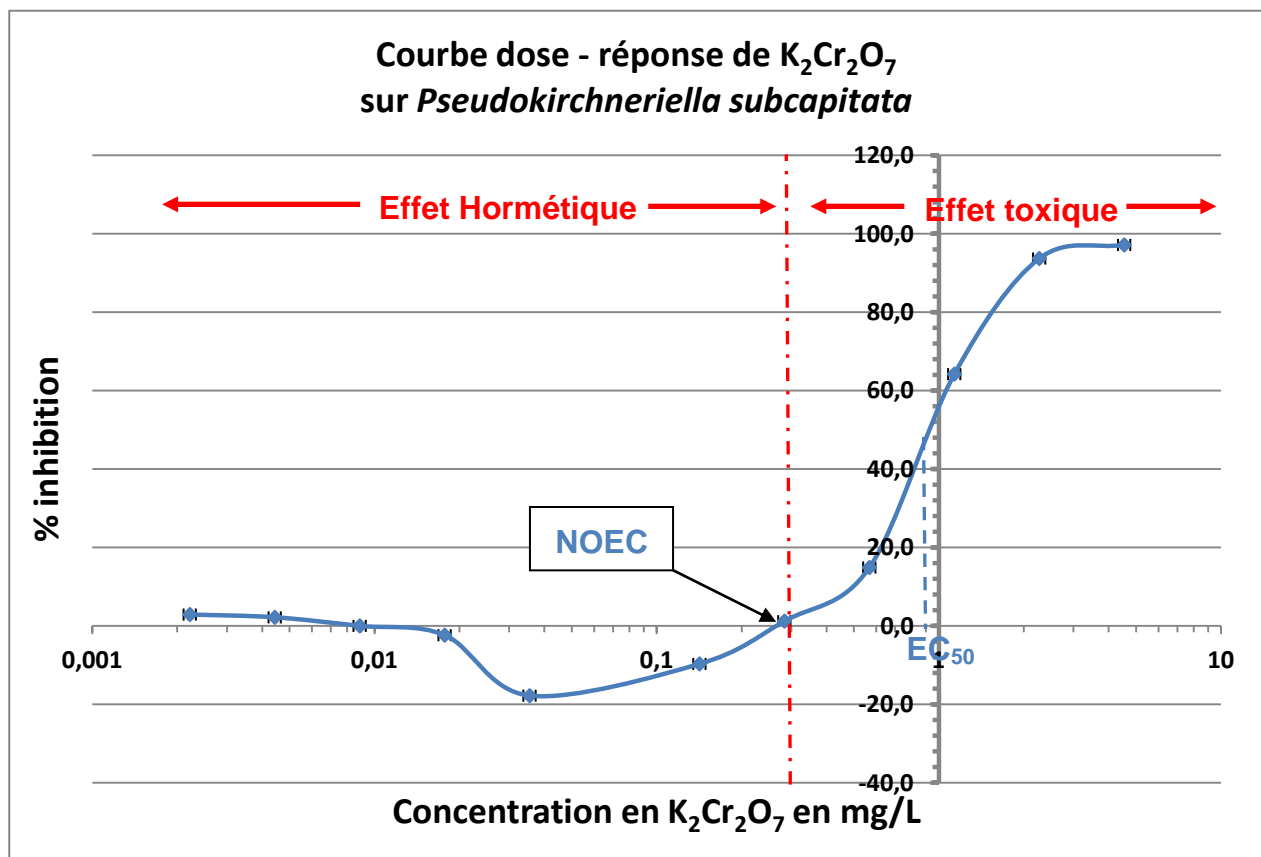
PDr Sabine Boucetta MCA

Faculté des sciences, département des sciences Biologiques,
université du 20 août 1955 Skikda, Algérie.

TOXICOLOGIE : REGTOX, une macro Excel pour dose-réponse

Pour quantifier l'effet d'un médicament ou d'un toxique, on peut déterminer différents paramètres :

- La **NOEC** (*No Observed Effect Concentration*) se définit comme la plus haute concentration dont l'effet sur les organismes n'est pas différent de celui des contrôles. Elle est généralement utilisée pour les tests chroniques. Facile à déterminer, elle nécessite cependant un nombre important de réplicats pour être fiable.
- La **CE₅₀** ou **EC₅₀** (*Effect Concentration 50%*) correspond à la concentration en toxique qui engendre un effet de 50% par rapport aux contrôles (par exemple la mortalité de la moitié de la population testée). Cette valeur, est déterminée statistiquement sur la base d'une modélisation. C'est une valeur assez stable qui change peu quelle que soit la méthode statistique employée.



Note : l'Hormèse (effet hormétique) correspond à un effet cytostimulant à de faibles concentrations en substance.

Comment déterminer la Concentration Effective 50 % (CE50) d'une substance toxique vis-à-vis d'un organisme test ?

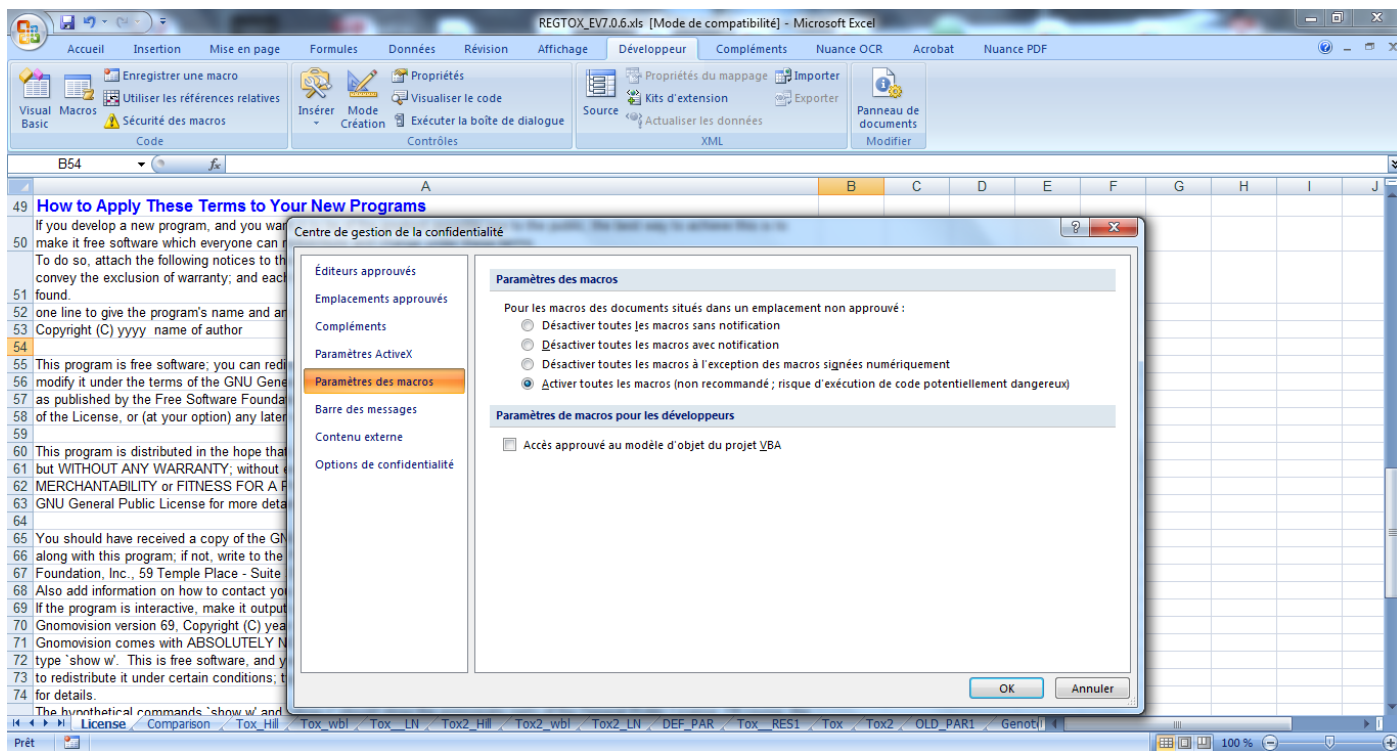
En toxicologie et écotoxicologie, différents calculs existent, mais une macro développée sous Microsoft Excel permet de modéliser des résultats expérimentaux du type dose-réponse. Cette macro fonctionne sous Office 1997 à 2010.

L'exemple suivant est tiré du sujet de BCM et Technologies d'analyses (BTS Bioanalyses et contrôles - Session 2008) : Étude de l'action cytotoxique de l'atrazine sur la prolifération en culture *in vitro* d'une lignée cellulaire de cellules adhérentes par le test au MTT (<http://www.crdp-montpellier.fr/ressources/examens/sujets/08/320/2220700/U33.pdf>).

Il faut dans un premier temps télécharger le fichier Excel (REGTOX_EV7.0.6.xls) contenant la macro à l'adresse : http://www.normalesup.org/~vindimian/fr_download.html

Il faut veiller à activer les macros dans Excel, les macros étant susceptibles d'héberger des virus.

Sous Excel 2007 : Développeur / Sécurité des macros / Activer...

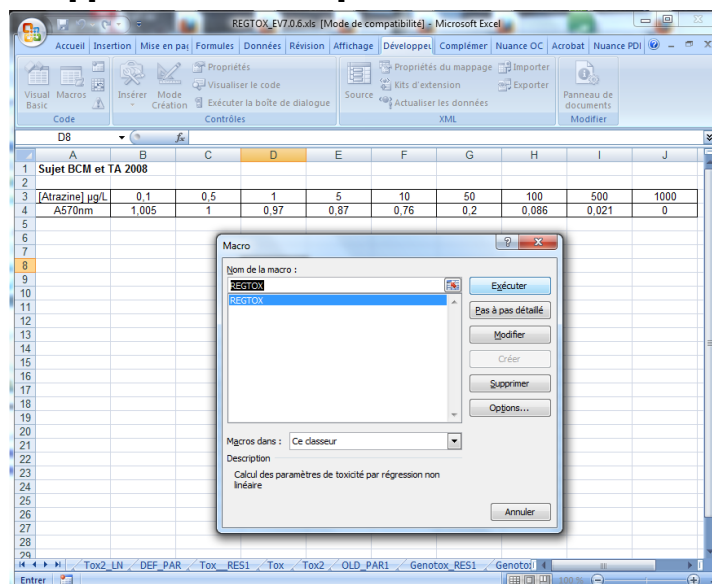


Ensuite le tableau de résultats bruts peut être saisi dans une nouvelle feuille, ou dans un nouveau classeur (veiller alors à ne pas fermer le classeur contenant la macro).

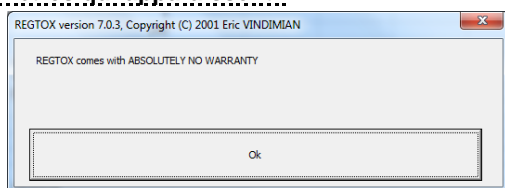
Les valeurs d'abscisses doivent être entrées en ordre croissant.

[Atrazine] µg/L	0,1	0,5	1	5	10	50	100	500	1000
A _{570nm}	1,005	1,000	0,970	0,870	0,760	0,200	0,086	0,021	0,000

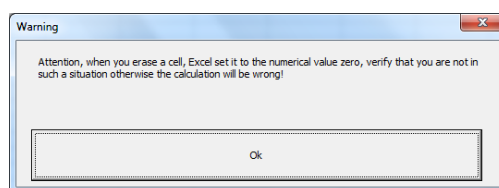
Lancer la macro : Développeur / Macros / puis exécuter REGTOX



Passer les fenêtres qui apparaissent :



puis



Choisir les données à traiter ainsi que le modèle à appliquer, puis Estimation of parameters :

REGTOX, data entry

Atrazine Title

Feuil1!\$B\$3:\$J\$3 Column or line of independent variable (X)?

Feuil1!\$B\$4:\$J\$4 Columns or lines of dependent variable (Y)?

Atraz_01 Name of results sheet?

HILL Model

Français Language

Cancel Estimation of parameters

Passer la fenêtre suivante :

Question!

Vous avez modifié le paramétrage du logiciel, voulez vous enregistrer cette modification sur la feuille de paramètres par défaut? Une copie sera créée sous le nom OLD_PARn.

NON OUI

Cliquer ensuite sur Optimiser dans la fenêtre suivante (Note : le menu Avancé permet de modifier le paramétrage)

HILL, estimation des paramètres du modèle

Témoïn

1,005 Ajustable Imposé

N de Hill

0,8 Ajustable Imposé

CE50

98,8976829368232 Ajustable Imposé

Effet maximum

0 Ajustable Imposé

Ecart 0,43263865991 Simulations 500

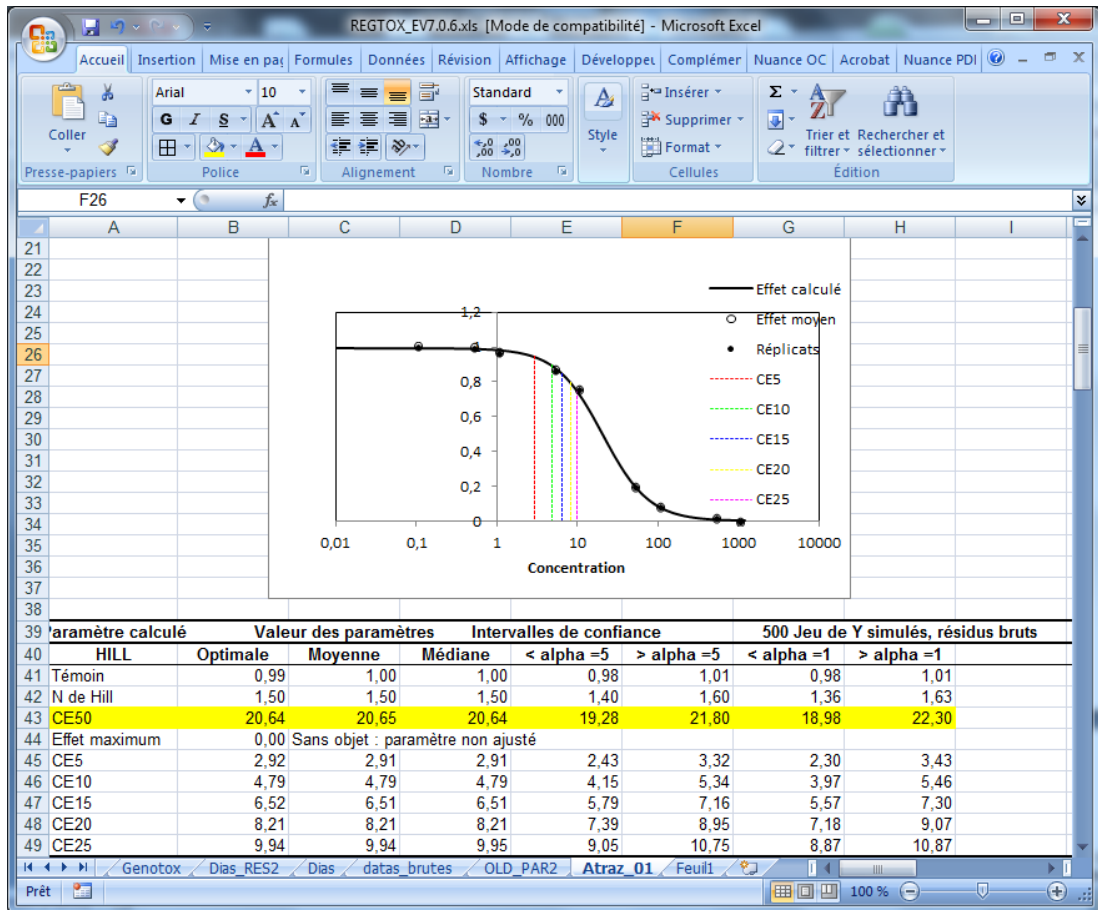
Optimiser Avancé...

Estimation auto. Tracer graphe

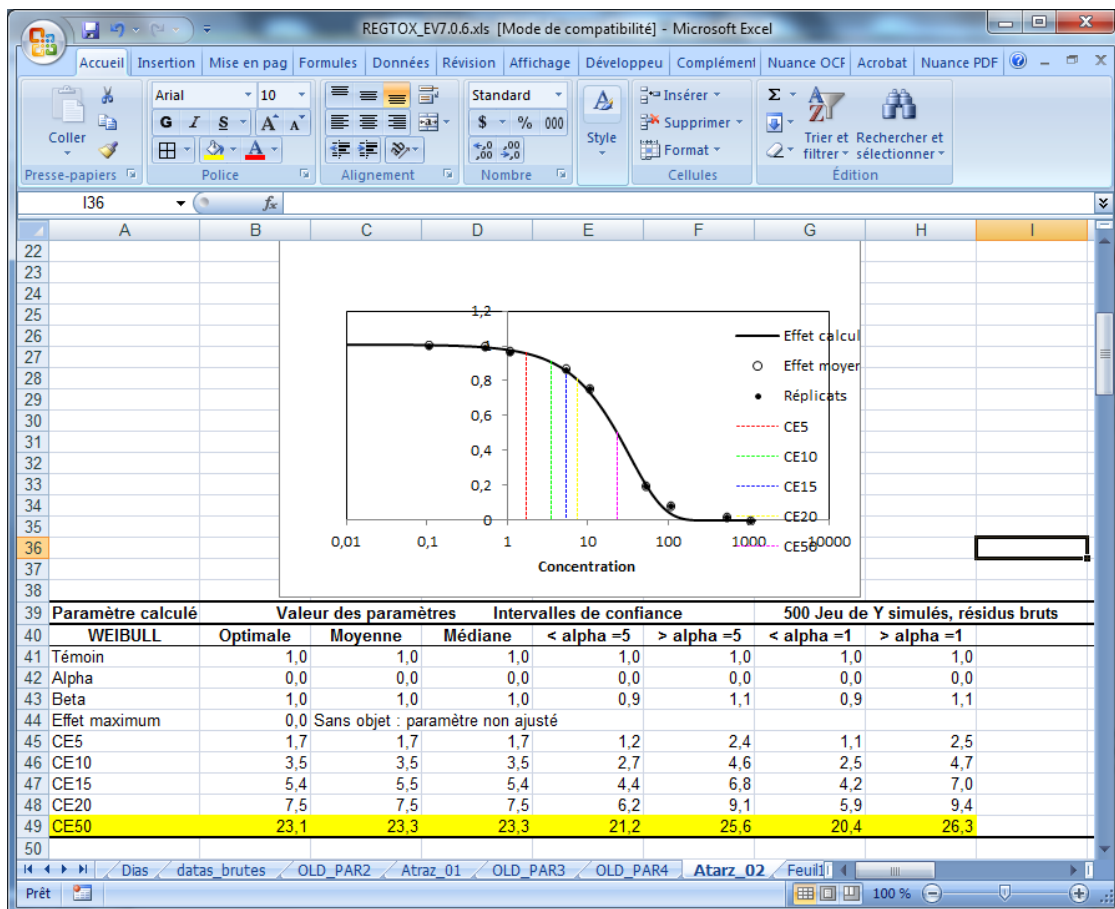
Annuler Calculer écart

Après l'exécution des simulations, le graphe apparaît ainsi que les valeurs estimées :

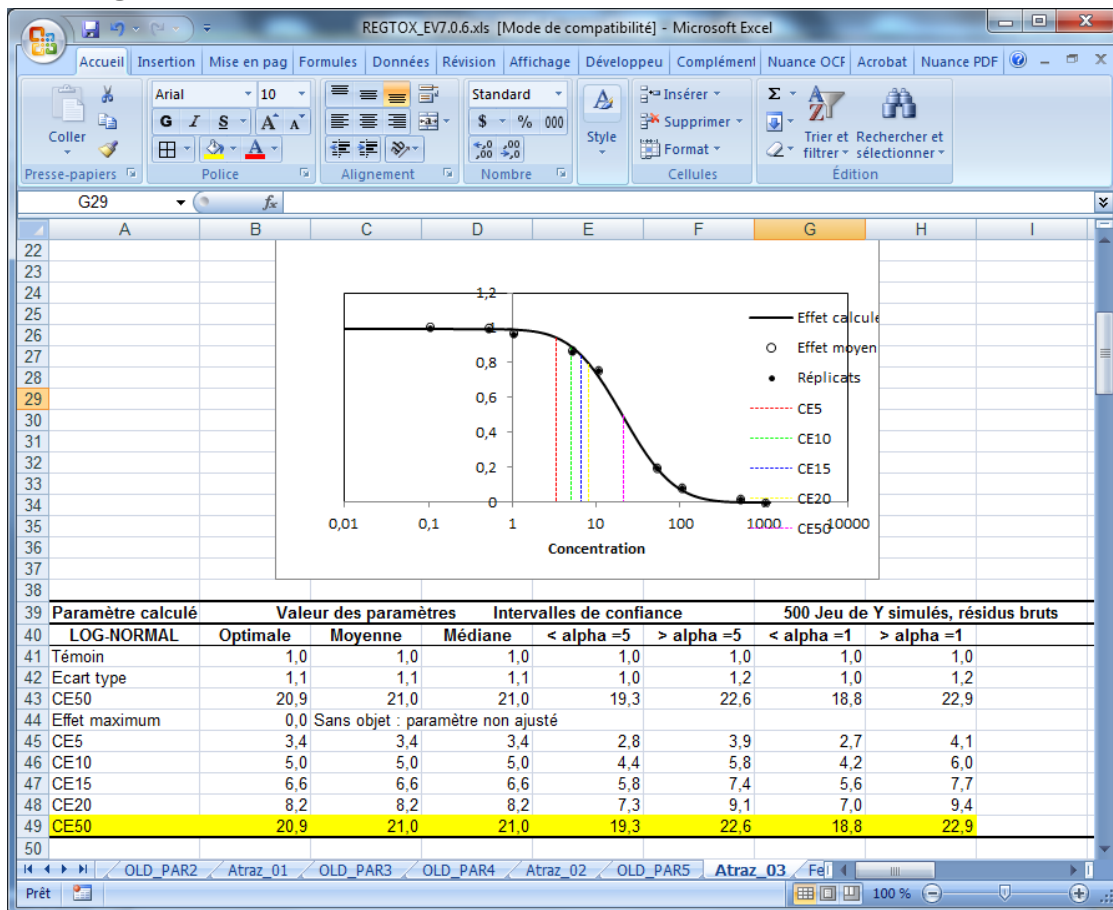
Modélisation de Hill :



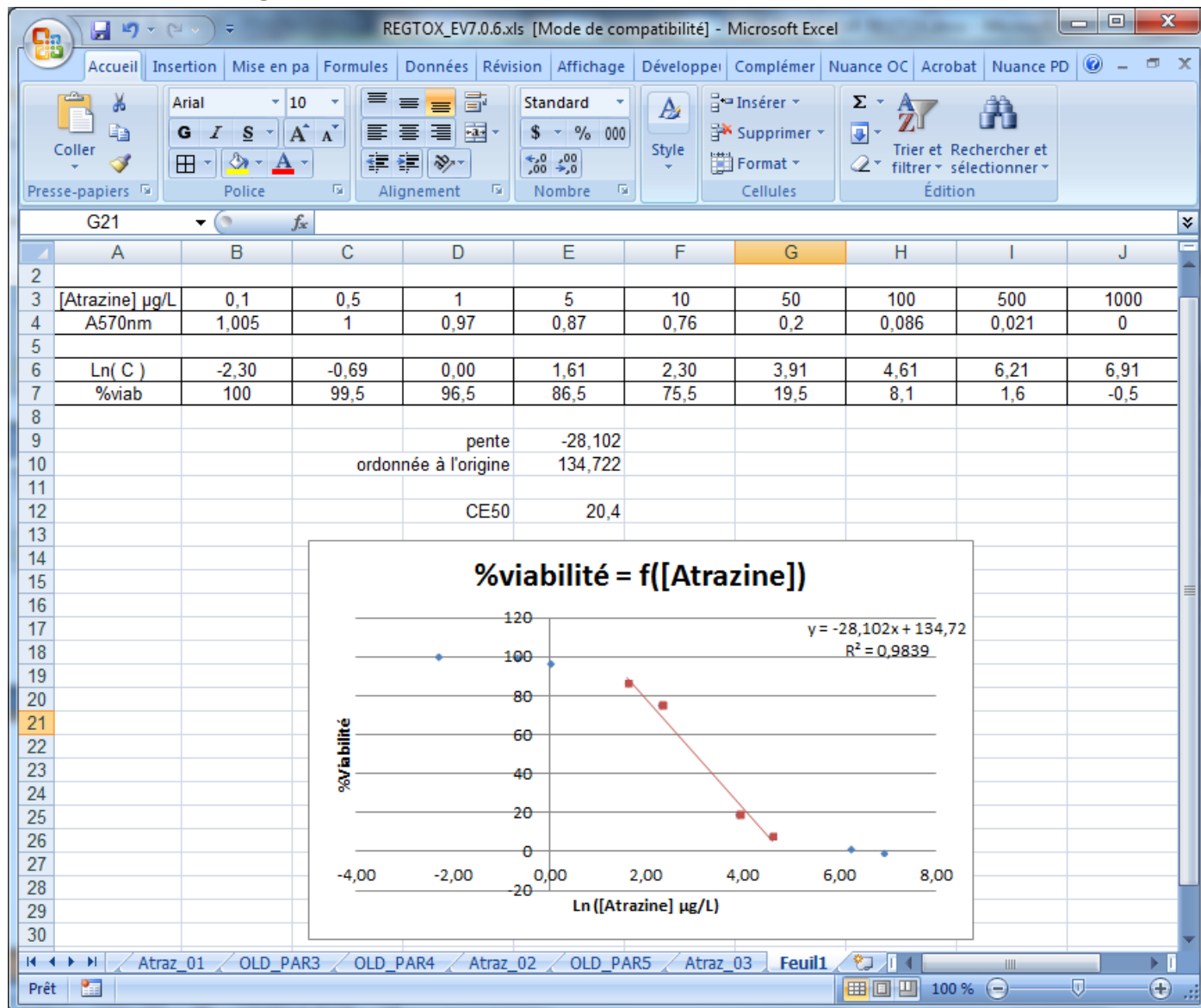
Modélisation de Weibull :



Modélisation Log-Normal :



Modélisation par régression linéaire classique :



Conclusion

En conclusion, on peut observer que les valeurs de CE50 obtenues par les différentes modélisations sont proches mais pas identiques.

Modélisation	Valeur optimale	Limite inférieure à 5%	Limite supérieure à 5%
Hill	20.6	19.3	21.8
Weibull	23.1	21.2	25.6
Log-Normal	20.9	19.3	22.6
Régression linéaire "classique"	20.4	-	-

L'avantage des modélisations proposées par la macro est que les intervalles de confiance à 5% et 1% sont fournis, ce qui permet d'introduire la notion d'incertitude sur les résultats obtenus.

Source

http://www.normalesup.org/~vindimian/fr_index.html



TD 02



PDr Sabine Boucetta MCA

Faculté des sciences, département des sciences Biologiques,
université du 20 août 1955 Skikda, Algérie.

MODULE : POLLUTION SANTE ET ENVIRONNEMENT (PSE)

Nom :		Prénom :		Date :	
-------	--	----------	--	--------	--

Introduction :	Méthode statistique d'évaluation du risque environnementale
Problématique :	Comment calculer le PEC PNEC et QR
Objectifs :	Raisonnement, calculer et classer le danger en fonction de la santé humaine
Matériel :	Pc+ calculatrice

Pour mieux comprendre comment cette évaluation est réalisée, il faut tout d'abord préciser la notion de risque environnemental. Ce dernier dépend de deux paramètres: la dangerosité de la substance (sa toxicité) et l'exposition des milieux naturels à cette substance.

En clair, une substance très toxique mais auxquels les organismes vivants sont très peu exposés (par exemple car elle est produite en petite quantité) présente un risque environnemental faible. A l'inverse, une substance modérément toxique mais que l'on retrouve dans les cours d'eau à des fortes concentrations présente un risque environnemental fort.

Les directives européennes 93/67/EC, 793/93/EC et 1488/94/EC définissent la méthode d'évaluation de ce risque environnemental. Cette méthode consiste, pour chaque substance potentiellement dangereuse pour l'environnement, à définir:

1) **PNEC (Predicted No Effect Concentration):** c'est la plus forte concentration de la substance sans risque pour l'environnement. Elle définit donc la **toxicité de la substance** vis à vis de l'environnement.

2) **PEC (Predicted Environmental Concentration):** c'est la concentration prévisible de la substance dans l'environnement. Elle définit donc **l'exposition** des milieux naturels à cette substance.

1. Comment définir une concentration sans risque pour l'environnement (PNEC) ?

Cette concentration sans risque est évaluée à partir des résultats de tests écotoxicologiques de laboratoire appliqués à cette substance. Pour déterminer la **PNEC** (concentration sans risque pour l'environnement) à partir de résultats de tests de laboratoire, on doit appliquer les règles suivantes:

1) **On utilise en priorité les résultats des tests de toxicité chronique:** en effet ces tests évaluent les effets à long terme de la substance sur les organismes vivants. On s'intéresse ici à la **NOEC**, la plus forte concentration testée à laquelle aucun effet sur l'organismes vivant n'a été observé. Par défaut de valeurs de toxicité chronique, on utilise la valeur de **CL50** (Concentration tuant 50% des individus testés).

2) **On utilise la NOEC la plus faible (ou par défaut la CL50 la plus faible):** la sensibilité de l'écosystème dépend des espèces les

plus sensibles aux polluants. Or, la **NOEC** (ou la **CL50**) la plus faible correspond à l'organisme le plus sensible.

3) **On applique un facteur de sécurité à la NOEC ou à la CL50 retenue** : ce facteur, défini dans les directives européennes précédemment cités, permet d'abaisser le risque. Il tient compte du nombre et de la qualité des données disponibles.

$$\text{Risque Environnemental} = \frac{\text{Toxicité De La Substance}}{\text{Exposition}}$$

Pour mieux comprendre nous allons détailler la méthode de détermination d'une **PNEC** pour un exemple de substance. Des tests écotoxicologiques de laboratoire ont été effectués sur cette substance sur différents organismes. Les résultats de ces tests sont présentés dans le **tableau 01** ci dessous :

Tableau.01. Résultats des tests écotoxicologiques de laboratoire sur différents organismes [2].

Organisme testé	Test de toxicité aigue (à court terme)	Test de toxicité chronique (à long terme)
	Cl ₅₀ (mg/l)	NOEC (mg/l)
Poissons	0,56	pas de résultats disponibles
Daphnies	0,22	pas de résultats disponibles

Algues	0,89	pas de résultats disponibles
Bactérie	pas de résultats disponibles	pas de résultats disponibles

Dans l'exemple ci-dessus, on dispose uniquement de données portant sur des tests de toxicité aigüe. On sélectionne donc la valeur de **CL50** la plus faible (correspondant à l'organisme le plus sensible à la substance testée) puis on lui applique un facteur de sécurité de 1000:

Ce résultat signifie donc, qu'en théorie, une concentration de 0,22 µg/l de la substance n'est pas néfaste pour l'environnement. Nous allons maintenant étudier le cas où on dispose de données relatives à la toxicité chronique de cette même substance (**Tab.02**).

Tableau.02. Résultats des tests de la toxicité chronique sur différents organismes [2].

Organisme testé	Test de toxicité aigue (à court terme)	Test de toxicité chronique (à long terme)
	Cl ₅₀ (mg/l)	NOEC (mg/l)
Poissons	0,56	0.16
Daphnies	0,22	0.08
Algues	0,89	2
Bactérie	pas de résultats disponibles	10

Dans cet exemple, on sélectionne la valeur de **NOEC** la plus faible puis on lui applique un **facteur de sécurité de 10**. Ce facteur est beaucoup plus faible que le précédent car on dispose de données de toxicité

$$\text{PNEC} = 0,08 \text{ mg/l} / 10 = 0,008 \text{ mg/l} = 8 \text{ µg/l}$$

à long terme sur 4 groupes d'organismes différents (plusieurs maillons de la chaîne alimentaire):

On se rend donc compte que des données plus complètes modifient la valeur de **PNEC**.

Même si cette valeur de **PNEC** permet de se donner une idée de la toxicité d'une substance vis à vis des écosystèmes, deux critiques peuvent être émises:

a) **La valeur du facteur de sécurité est très arbitraire** : ils sont d'ailleurs très différents selon les législations (différences notamment entre la législation européenne et la législation américaine).

$$\text{PNEC} = 0,22 \text{ mg/l} / 1000 = 0,00022 \text{ mg/l} = 0,22 \text{ } \mu\text{g/l}$$

b) **Cette PNEC est défini substance par substance** : or, dans les milieux naturels, ce sont des mélanges de molécules qui sont présentes, celles-ci pouvant interagir entre elles.

2. Comment prédire la concentration de la substance dans l'environnement (PEC) ?

Cette **PEC** permet de prévoir la concentration de la substance dans les différents compartiments de l'environnement : air, eau, sédiment, sol. Elle est définie selon plusieurs paramètres:

a) **son tonnage et son utilisation**: une substance produite à plusieurs dizaines de milliers de tonnes par an (comme le bisphénol a), pourra, selon son utilisation, se retrouver en grande quantité dans l'environnement. Si cette substance est rejetée via les eaux usées, elle

aura donc une **PEC** élevée dans l'eau.

b) **son comportement dans l'environnement**: par exemple si elle est plus ou moins biodégradable.

c) **ses propriétés physico-chimiques** : sa volatilité (dans l'air), sa solubilité (dans l'eau), son poids moléculaire.

3. Comment prédire le risque d'une substance grâce aux valeurs de PEC et de PNEC ?

La comparaison des valeurs de **PEC** et de **PNEC** permettent de tirer une conclusion quant au risque que représente une substance pour l'environnement. En effet, si la concentration prévisible de la substance (**PEC**) est supérieure à la concentration sans risque pour l'environnement, alors il y a un risque potentiel pour les écosystèmes.

Pour mieux comprendre, nous allons prendre deux exemples, en considérant que la concentration prévisible de la substance (**PEC**) est de **2 µg/l** :

a) La concentration sans effet (**PNEC**) est de **0,22 µg/l**, alors **PEC > PNEC** et on considère qu'il y a un risque pour l'environnement. Il est alors nécessaire de prendre des mesures pour réduire l'exposition des écosystèmes telles que la limitation des usages de la substance.

b) La concentration sans effet (**PNEC**) est de **8 µg/l**, alors **PEC < PNEC** et on considère que le risque est acceptable pour l'environnement, même si la vigilance est nécessaire.

4. Perspectives

L'approche des éléments de preuve signifie que vous utilisez une combinaison d'informations provenant de plusieurs sources indépendantes pour fournir la preuve permettant de répondre à l'exigence d'information.

Cette méthode est avantagée si :

1) les informations relatives à un élément de preuve unique, prises de façon isolée, ne sont pas suffisantes pour répondre à une exigence d'information. Des défaillances évidentes de l'une des études existantes peuvent être à l'origine de cette situation ;

2) les études individuelles fournissent des conclusions différentes ou contradictoires.

3) Le poids à accorder à l'élément de preuve disponible dépend de facteurs comme la qualité des données, la cohérence des résultats, la nature et la gravité des effets et la pertinence des informations.

4) L'approche des éléments de preuve exige d'utiliser un jugement scientifique et, pour cette raison, il est essentiel de fournir une documentation fiable et adéquate.

Évaluation peut-être locale, régionale ou nationale :

- PEC locale, régionale ou nationale : dimension de la contamination, des déplacements de contaminants et donc de l'exposition.

Évaluation aiguë ou chronique :

- en fonction des données toxicologiques :

Tests aigus ou chroniques (PNEC)

Risque : estimation qualitative et/ou quantitative compte tenu des incertitudes inhérentes à l'évaluation, de la probabilité de la fréquence et de la gravité des effets indésirables connus ou potentiels.

Quotient de risque (risk quotient) = RQ

$$RQ = \frac{PEC}{PNEC}$$

- **RQ < 1** : pas d'effet néfaste prévu
- **RQ = 1** : des effets néfastes pourraient survenir (affiner l'évaluation, réduire l'usage, ne pas utiliser le produit)
- **RQ > 1** : des effets néfastes probables (ne pas utiliser le produit, réduire l'usage)



TD 03



PDr Sabine Boucetta MCA

Faculté des sciences, département des sciences Biologiques,
université du 20 août 1955 Skikda, Algérie.

Étude de la toxicité de la patuline

ÉNONCÉ :

La patuline est une mycotoxine produite entre autres par *Penicillium patulinum* qui infecte essentiellement les pommes lors de leur stockage.

1. Détermination de la dose létale 50

1.1. Expérience

On étudie la toxicité de cette substance chez le rat en incorporant des doses variables de patuline dans leur alimentation.

On utilise 5 lots de 20 rats qui sont testés de la façon suivante :

Chaque rat reçoit la même quantité de patuline et l'on note les effets toxiques éventuellement apparus. On attend ensuite une période de 30 jours (on estime que toute trace de patuline a alors disparu de l'organisme des animaux) puis on double la quantité de patuline. Le test est poursuivi sur 6 mois et en cas de décès, chaque rat est remplacé de façon à ce que la population reste constante à 20 animaux par lot.

Les résultats obtenus sont consignés dans le tableau ci-dessous :

	Lot 1	Lot 2	Lot 3	Lot 4	Lot 5
1° mois : concentration en patuline égale à 5 µg/kg.					
Nombre de décès	1	0	1	0	0
2° mois: concentration en patuline égale à 10 µg/kg.					
Nombre de décès	2	1	1	1	1
3° mois: concentration en patuline égale à 20 µg/kg.					
Nombre de décès	5	3	4	2	3
4° mois: concentration en patuline égale à 40 µg/kg.					
Nombre de décès	10	11	9	10	10
5° mois: concentration en patuline égale à 80 µg/kg.					
Nombre de décès	15	18	16	15	14
6° mois: concentration en patuline égale à 160 µg/kg.					
Nombre de décès	20	20	20	20	20

1.2. Questions

1.2.1. Définir la DL 50 et en déduire la concentration en µg/kg en patuline correspondante.

1.2.2. Donner une estimation de la DL 100.

La patuline présente dans l'alimentation peut être considérée comme la quantité correspondante à la phase d'exposition.

1.2.3. Nommer la phase aboutissant à une répartition homogène de patuline dans le plasma.

1.2.4. Calculer la concentration plasmatique théorique pour un rat ayant ingéré une prise orale de 40 µg/kg, en considérant que toute la patuline se retrouve dans le plasma.

La masse plasmatique représente 3,5 % de la masse corporelle. La masse volumique du plasma est de 1,1 g/mL

1.2.5. Expliquer pourquoi la concentration plasmatique réelle sera beaucoup plus faible.

1.3. Évolution plasmatique

On étudie la diminution de la concentration plasmatique en patuline au cours du temps chez un rat survivant lors du test du 4° mois.

Les résultats sont consignés dans le tableau ci-dessous :

temps en heures	C(µg.kg ⁻¹)	temps en heures	C(µg.kg ⁻¹)
12	28,32	84	20,02
24	26,73	96	18,90
36	25,23	108	17,84
48	23,81	120	16,84
60	22,47	132	15,89
72	21,21	144	15,00

1.3.1. Déterminer la concentration en patuline ayant provoqué les effets toxiques initiaux.

1.3.2. Calculer la constante d'excrétion k_e .

2. Toxicité à doses répétées

2.1. Étude du caractère génotoxique

D'autres études ont montré que l'administration périodique et répétée de patuline entraînait des effets mutagènes mais non tératogènes.

2.1.1. Définir les termes de "mutagènes" et de "tératogènes".

Le NOAEL calculée chez le rat est évaluée à 3 µg/kg.

2.1.2. En déduire en le justifiant la valeur de la D.J.T chez l'homme.

2.2. Teneur en patuline du cidre

Différentes études ont montré que le cidre non pasteurisé et conservé en tonneaux atteignait régulièrement un taux en patuline de 45 µg/L.

2.2.1. En considérant une consommation de 1 L de cidre par jour pour un adulte de 70 kg, indiquer si un tel produit est propre à la consommation.

Le même produit conservé dans les mêmes conditions mais dans lequel on a ajouté du dioxyde de soufre à forte dose (300 mg/L) voit sa teneur en patuline chuter à des valeurs n'excédant pas 0,5 µg/L. Cependant le dioxyde de soufre présente une certaine toxicité et sa DJA est fixée à 0,7 mg de SO₂/kg⁻¹.d⁻¹.

2.2.2. Indiquer en le justifiant s'il est possible d'obtenir un tel produit satisfaisant aux normes de consommation.

CORRIGÉ :

- 1.2.1 Dose unique capable de provoquer en 14 jours la disparition de 50 % d'une population animale.
DL 50 : 40 mg/kg
- 1.2.2 $80 \mu\text{g}/\text{kg} < \text{DL} 100 \leq 160 \mu\text{g}/\text{kg}$.
- 1.2.3 phase toxicocinétique
- 1.2.4 concentration plasmatique théorique 1142,9 $\mu\text{g}/\text{kg}$.
- 1.2.5 Entre la phase d'exposition et la phase toxicocinétique, il y a les phénomènes d'absorption, de métabolisation, d'excrétion et de stockage.
- 1.3.1
 $r = -1$
pente $-0,004813833$
ordonnée à l'origine 3,401189766
concentration initiale 30 $\mu\text{g}/\text{kg}$
- 1.3.2 constante d'excrétion $k_e = 0,0048 \text{ h}^{-1}$
- 2.1.1
mutagènes : qui engendrent des modifications de l'ADN transmissible à la descendance cellulaire.
tératogènes susceptibles de provoquer des malformations de l'embryon et/ou du fœtus.
- 2.1.2 $\text{DJT} = \text{N.O.A.E.L}/100 = 0,03 \text{ mg}/\text{kg}$ ($10 \cdot 10$) sensibilité de l'espèce * différences physiologiques
- 2.2.1 Quantité 45/2,1 c'est à dire 21,4 fois la valeur admissible ; le produit est non conforme.
- 2.2.2 Un adulte en consommant 1 L de cidre absorbe 300 mg de SO_2 alors que 49 mg seulement sont tolérés pour un adulte de 70 kg. Produit non conforme.