

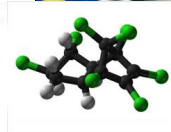
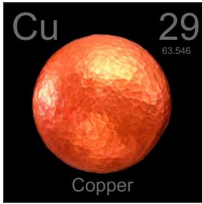
# Prise en compte de la variabilité inter-individus ou inter-réplicats dans la modélisation de l'effet des polluants sur la reproduction d'invertébrés d'eau douce

M. L. Delignette-Muller, C. Lopes and S. Charles

Equipe "Modélisation et Ecotoxicologie PrédictiveS"  
Laboratoire de Biométrie et Biologie Evolutive  
UMR CNRS 5558 - Université de Lyon - France

APPLIBUGS, 20/06/2013

- Une discipline scientifique à l'interface de l'écologie, de la chimie et de la toxicologie.
- “La branche de la toxicologie qui étudie les effets toxiques, causés par des polluants naturels ou synthétiques, sur les constituants des écosystèmes, animaux (y compris l'Homme), végétaux et microbiens, dans un contexte intégré” [Truhaut, 1977]
- “L'écologie en présence de polluants” [Chapman, 2002]
- En écotoxicologie, la réponse de l'écosystème est étudiée dans tous les compartiments de la biosphère (air, sol, eau) et à tous les niveaux d'organisation biologique [Walker *et al.*, 2006]



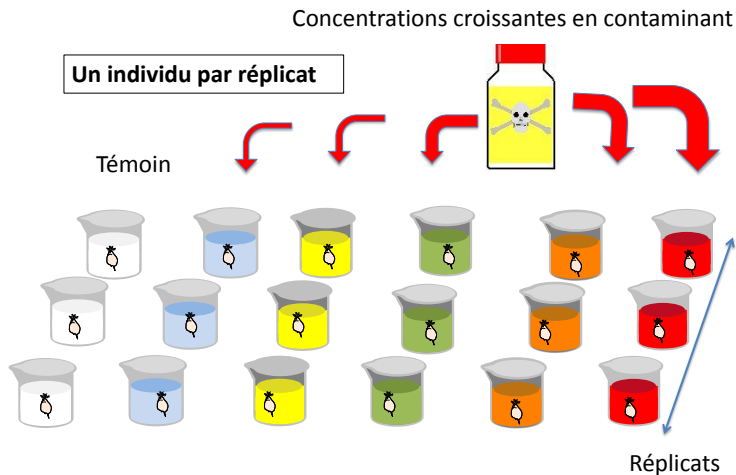
Contaminants



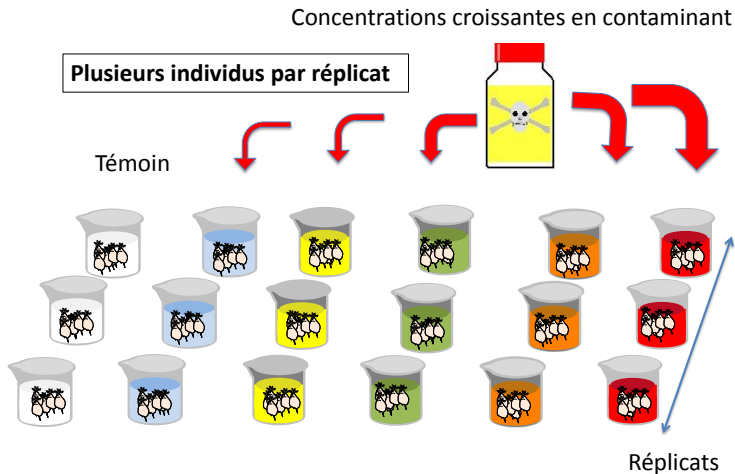
Ecosystèmes d'eau douce



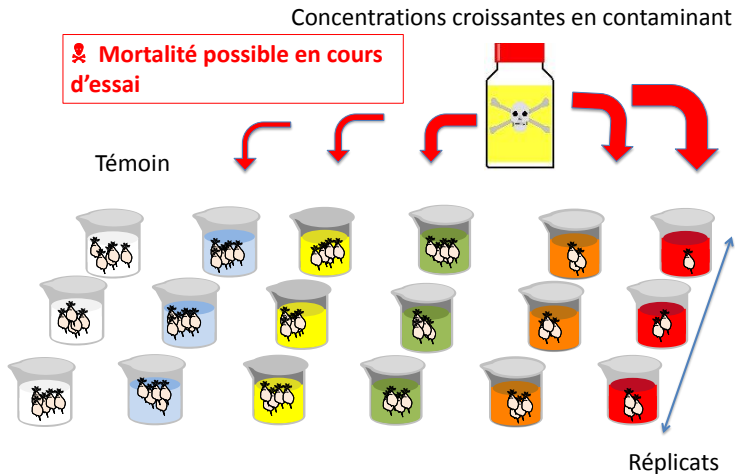
# Plan d'expérience d'un bioessai classique



# Autre plan d'expérience possible



# Evolution au cours du temps



# Mesures réalisées au cours d'un bioessai de reproduction

A échéances régulières, on compte et on retire des bechers :

- **les produits de la reproduction** (oeufs ou juvéniles), généralement sans pouvoir relier chaque produit de la reproduction à un individu donné si le béccher contient plusieurs individus,
- **les morts.**

Le plus couramment, les analyses se font uniquement sur les données au temps final.

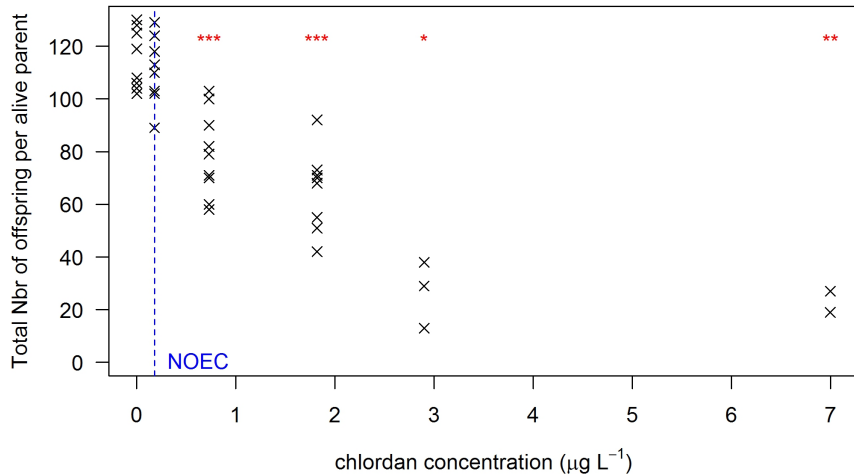
Définition de la NOEC (**No Observed Effect Concentration**),  
pour un contaminant,  
une espèce,  
un trait d'histoire de vie (reproduction, croissance, survie),  
et une durée d'exposition donnés :

**la NOEC est la plus forte concentration testée pour laquelle il n'est pas mis en évidence de différence significative avec le témoin en fin d'essai.**

Elle est estimée à partir d'un test de comparaisons multiples (test de Dunnett très couramment utilisé).



# Exemple de calcul de NOEC



## **Approche très criticable,**

que de **nombreux scientifiques appellent à bannir**, notamment du fait

- de l'utilisation abusive de la p-value pour définir un seuil de toxicité (cette utilisation va à l'encontre du principe de précaution : plus le nombre d'observations est faible, plus la valeur estimée de la NOEC est élevée, donc moins protectrice pour l'environnement),
- et de la dépendance très forte au plan d'expérience (la NOEC ne peut être qu'une concentration testée et dépend fortement de l'ensemble des concentrations testées et du nombre de réplicats).

## Ajustement d'un modèle empirique

concentration-effet

aux données observées,

pour calculer

une **concentration conduisant à x% d'effet ( $EC_x$ ) en fin d'essai**,

pour un contaminant,

une espèce,

un trait d'histoire de vie (reproduction, croissance, survie),

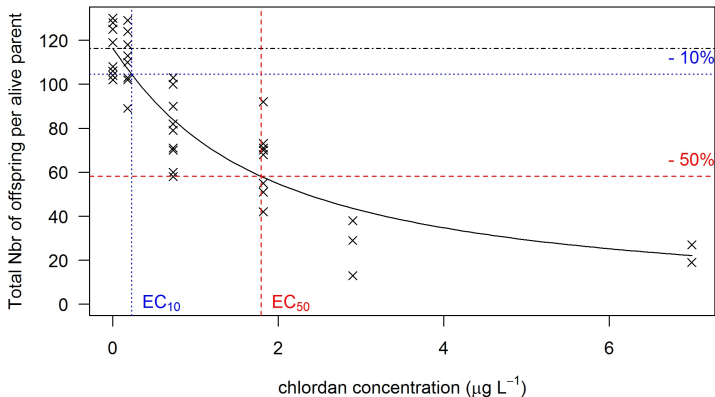
et une durée d'exposition donnés.

On parle de  $LC_x$  pour une courbe concentration-réponse (ex. survie).

# Exemple de calcul des $EC_{10}$ et $EC_{50}$

Ajustement par régression gaussienne du modèle log-logistique à 3 paramètres décrivant l'effet  $y$  en fonction de la concentration  $x$  par :

$$y = \frac{d}{1 + (\frac{x}{e})^b}$$



## **Des critiques subsistent :**

- moindres carrés utilisés souvent sans réfléchir à la nature des données,
- non prise en compte de la variabilité inter-individus ou inter-réplicats,
- non prise en compte des donnée partielles du fait de la mortalité d'individus en cours d'essai.

Proposer des améliorations aux méthodes de modélisation des données concentration-effet pour le calcul de  $EC_x$  à partir de données de reproduction, prenant en compte en particulier :

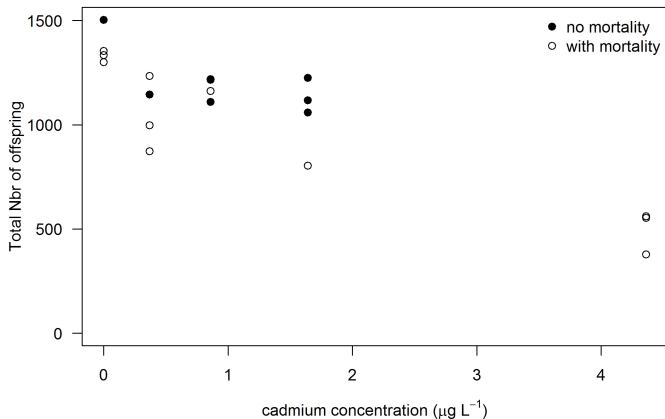
- la **nature des données** (en reproduction = données de comptage)
- la **variabilité inter-individus ou inter-replicats**
- les **données partielles** liées à la mortalité avant la fin de l'essai

Quatre jeux de données d'exposition de *Daphnia magna* sur 21 jours, avec des plans d'expérience et des contaminants différents :

- Jeu de données “cadmium” (**Cd**)  
4 concentrations testées (+ témoin),  
sur **4 réplicats de 10 daphnies**
- Jeu de données “chlordan” (**chlordan**)  
5 concentrations testées (+ témoin),  
sur **10 réplicats d'une daphnie**
- Jeu de données “cuivre” (**Cu**)  
4 concentrations testées (+ témoin),  
sur **3 réplicats de 20 daphnies**
- Jeu de données “zinc” (**Zn**)  
3 concentrations testées (+ témoin),  
sur **3 réplicats de 20 daphnies**

# Le jeu de données “cadmium” (1/4)

*Billoir et al., 2012, Ecotoxicology and Environmental Safety*

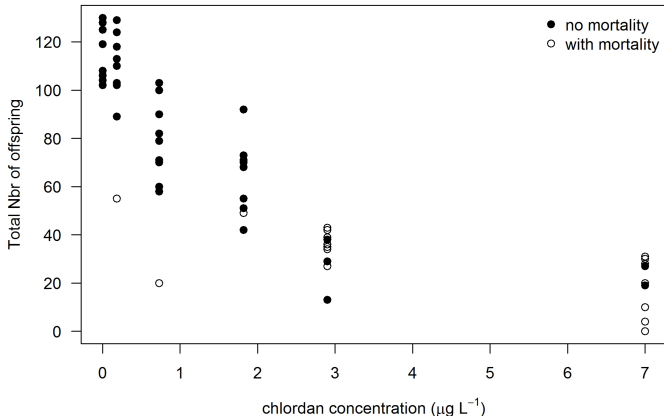


Modélisation très difficile sans prendre en compte les réplicats avec mortalité.



# Le jeu de données "chlordane" (insecticide) (2/4)

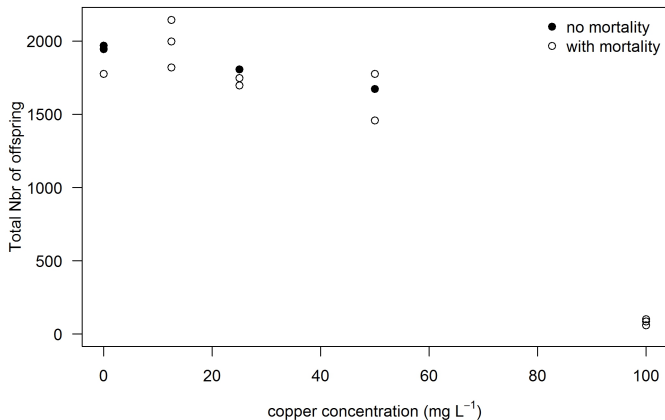
Manar et al., 2009, *Ecotoxicology*



Mortalité moins importante mais variance non constante.

# Le jeu de données “cuivre” (3/4)

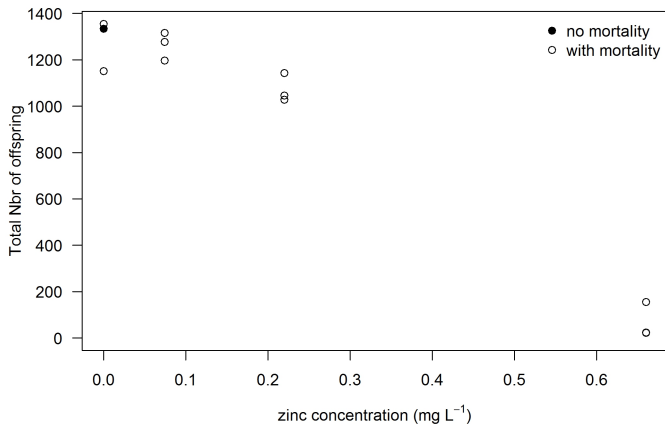
*Billoir et al., 2008, Environmental Science and Technology*



Mortalité importante avant la fin de l'essai à toutes les concentrations testées.

# Le jeu de données “zinc” (4/4)

*Billoir et al., 2008, Environmental Science and Technology*



Mortalité dans tous les réplicats avant la fin de l’essai à toutes les concentrations testées.

# Solutions classiques pour prendre en compte la mortalité

- **Recommandations de l'OCDE**

Ne compter que le nombre de produits de la reproduction issus de parents vivants en fin d'essai.

(OECD guidelines for testing of chemicals, 2012, No. 211. *Daphnia magna* reproduction test.)

- biais possible dû à l'abandon des données relatives aux organismes les plus sensibles.
- perte importante de données informatives.

- **Alternative parfois utilisée**

Diviser le nombre de produits de la reproduction par le nombre de parents vivants en fin d'essai.

- biais dû au report de la production de parents morts en cours d'essai aux parents vivants en fin d'essai.
- perte de données encore possible (réplicats sans aucun survivant en fin d'essai).

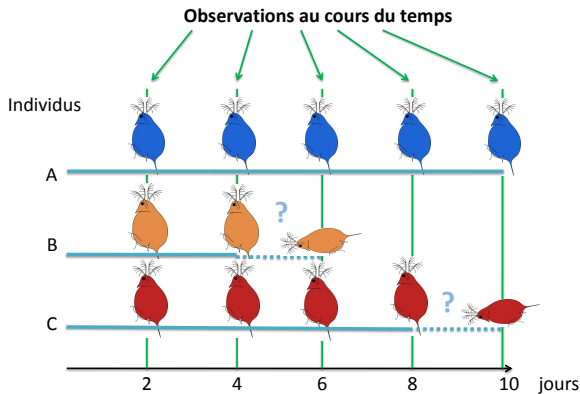
# Une solution pour ne pas perdre les données informatives

Comme cela est couramment fait en épidémiologie pour calculer des taux d'incidence, on peut calculer, pour chaque organisme, la période durant laquelle il est resté en vie durant l'essai. On définit ainsi une nouvelle covariable :

le **nombre d'individu-jours** (*NID*)

calculé pour chaque réplicat en **sommant les périodes d'observation de chaque individu avant sa mort.**

# Illustration du calcul du nombre d'individus-jours pour un réplicat



Sur cet exemple, après 10 jours d'exposition,  
$$NID = 10 + \frac{6+4}{2} + \frac{10+8}{2} = 24 \text{ individu-jours}$$

Préconisation de l'OCDE et/ou pratique courante : régression pondérée ou tranformation de variables. Solution peu satisfaisante.  
**L'utilisation d'un modèle de type Poisson paraît plus appropriée.**

## Le modèle "Poisson" (P)

$N_{ij} \sim \text{Poisson}(\lambda_{ij})$  avec  $\lambda_{ij} = f(C_i) \times NID_{ij}$

- $N_{ij}$  nombre de produits de la reproduction pour le réplicat  $j$  à la concentration  $C_i$ ,
- $f(C_i)$  la partie déterministe du modèle (ex. : modèle log-logistique à 3 paramètres), décrivant le **nombre moyen de produits de la reproduction par individu-jour**,
- $NID_{ij}$  le **nombre d'individu-jours** pour le réplicat  $j$  à la concentration  $C_i$ .

# Solution classique pour prendre en compte la variabilité inter-réplicats

Extension classique du modèle de Poisson pour prendre en compte une surdispersion si nécessaire.

## Le modèle “négative binomiale classique” (CNB)

$$N_{ij} \sim \text{Poisson}(\lambda_{ij}) \text{ avec } \lambda_{ij} \sim \text{gamma}(\alpha, \beta_{ij} = \frac{\alpha}{f(C_i) \times NID_{ij}})$$

qu'on peut écrire sous la forme d'une négative binomiale :

$$N_{ij} \sim \text{NegBin}(p_{ij} = \frac{\beta_{ij}}{\beta_{ij} + 1}, r = \alpha),$$

- de moyenne  $E(N) = \frac{\alpha}{\beta_{ij}} = f(C_i) \times NID_{ij}$
- de variance  $V(N) = \frac{\alpha}{\beta_{ij}} + \frac{\alpha}{\beta_{ij}^2} = E(N) + \frac{(E(N))^2}{\alpha}$

### Relation quadratique entre variance et moyenne.

Hypothèse faite classiquement dans le cadre du modèle linéaire généralisé (fonction `glm.nb` du package MASS).



# Alternative classique pour prendre en compte la variabilité inter-réplicats

Autre extension classique du modèle de Poisson supposant une **relation linéaire** (et non quadratique) **entre la variance et la moyenne : quasi-Poisson.**

Ex. : `glm(..., family=quasipoisson)`

Méthode de régression basée sur le modèle de Poisson, mais non associée à un modèle : maximum de vraisemblance ou inférence bayésienne impossible.

# Variante du modèle “négative binomiale”

Réécriture du modèle “négative binomiale” pour obtenir une **relation linéaire entre la variance et la moyenne**.

## Autre modèle “négative binomiale” (NB)

$$N_{ij} \sim \text{Poisson}(\lambda_{ij}) \text{ avec } \lambda_{ij} \sim \text{gamma}(\alpha_{ij} = f(C_i) \times NID_{ij} \times \beta, \beta)$$

Modèle qu'on peut encore écrire sous la forme d'une négative binomiale :  $N_{ij} \sim \text{NegBin}(p = \frac{\beta}{\beta+1}, r_{ij} = \alpha_{ij})$ ,

- de moyenne  $E(N) = \frac{\alpha_{ij}}{\beta} = f(C_i) \times NID_{ij}$
- de variance  $V(N) = \frac{\alpha_{ij}}{\beta} + \frac{\alpha_{ij}}{\beta^2} = E(N) \times (1 + \frac{1}{\beta})$

## Autre variante sous forme de gamma-Poisson

Modèle gamma-Poisson avec prise en compte différente de la covariable  $NID_{ij}$ .

### Autre modèle “gamma-Poisson” (GP)

$N_{ij} \sim \text{Poisson}(\lambda_{ij})$  avec  $\lambda_{ij} = f_{ij} \times NID_{ij}$   
et  $f_{ij} \sim \text{gamma}(\alpha_{ij} = f(C_i) \times \beta, \beta)$

Modèle d'écriture plus mécaniste avec variabilité écrite sur le nombre de produits de la reproduction par individu-jour,  $f_{ij}$  suivant une loi gamma

- de moyenne  $\frac{\alpha_{ij}}{\beta} = f(C_i)$
- de variance  $\frac{\alpha_{ij}}{\beta^2} = \frac{f(C_i)}{\beta}$  proportionnelle à la moyenne

# Récapitulatif des modèles étudiés

Quatre modèles basés sur le modèle de Poisson :

$$N_{ij} \sim \text{Poisson}(\lambda_{ij})$$

avec

- **modèle P**

$$\lambda_{ij} = f(C_i) \times NID_{ij}$$

- **modèle CNB**

$$\lambda_{ij} \sim \text{gamma}(\alpha, \beta_{ij} = \frac{\alpha}{f(C_i) \times NID_{ij}})$$

- **modèle NB**

$$\lambda_{ij} \sim \text{gamma}(\alpha_{ij} = f(C_i) \times NID_{ij} \times \beta, \beta)$$

- **modèle GP**

$$\lambda_{ij} = f_{ij} \times NID_{ij} \text{ et } f_{ij} \sim \text{gamma}(\alpha_{ij} = f(C_i) \times \beta, \beta)$$

## Choix d'un modèle *a priori* difficile

Les quatre modèles proposés diffèrent essentiellement par la description de la relation entre la variance et la moyenne de la variable observée :

variance = moyenne ?

variance proportionnelle à la moyenne ?

variance fonction quadratique de la moyenne ?

**Difficile de faire un choix uniquement à partir des données du fait de la mortalité non négligeable (impact de la covariable *NID*) et du faible nombre de réplicats.**

Quelques raisons justifiant le choix de l'inférence bayésienne :

- sa grande **flexibilité** : facilité d'écriture de ce type de **modèles hiérarchiques, non gaussiens et non linéaires**.
- le **calcul simple de l'incertitude** sur toute fonction des paramètres estimés : ici **calcul de l'incertitude sur les  $EC_x$** .
- les outils de **validation des modèles** : “posterior predictive check”.
- l'**utilisation de l'information *a priori*** dont on dispose sur la  $EC_{50}$  et le nombre maximum de produits de la reproduction par individu-jour.

## Paramètres de la partie déterministe (modèle log-logistique)

- $e$ , la  $EC_{50}$

loi lognormale définie à partir de la gamme des concentrations testées en supposant que la  $EC_{50}$  a une probabilité de 95% de se trouver entre la plus petite et la plus forte concentration testée.

- $d$ , le nombre maximum de produits de la reproduction par individu-jour

loi uniforme entre 0 et 20 pour les daphnies.

- $b$ , le paramètre de pente

loi log-uniforme vaguement informative :  $\log_{10}(b) \sim Unif(-2, 2)$ .

## Paramètre de la partie stochastique (sauf modèle **P**)

loi log-uniforme peu informative :

$\log_{10}(\alpha) \sim Unif(-4, 4)$  ou  $\log_{10}(\beta) \sim Unif(-4, 4)$ .

Simulations avec **JAGS** et le package `rjags`.

3 chaînes

50 000 itérations (*thin* = 50)

Pas de souci de convergence

MAIS

**Surprise dans le calcul du DIC :**

la déviance et la pénalité simulées ne sont pas les mêmes selon que l'on écrive les modèles "négative binomiale"

en une étape avec `dnegbin` ou

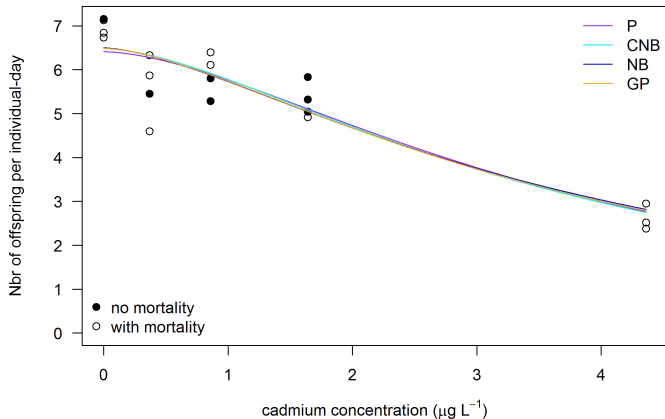
en deux étapes avec `dpois` et `dgamma` :

avec `dnegbin`, déviance plus élevée, pénalité plus faible et au bout du compte DIC plus élevée.

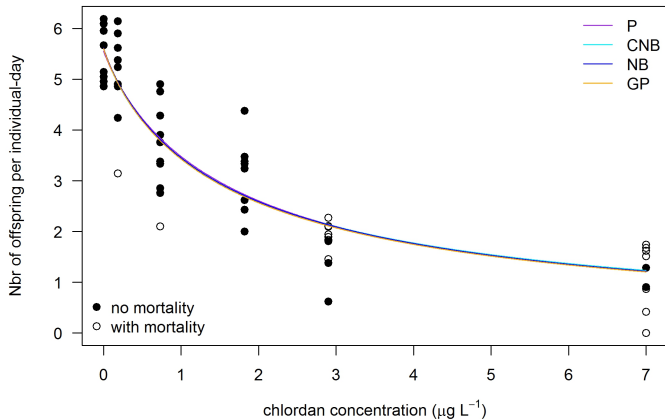
→ **écriture des trois modèles en deux étapes avec `dpois` et `dgamma`.**



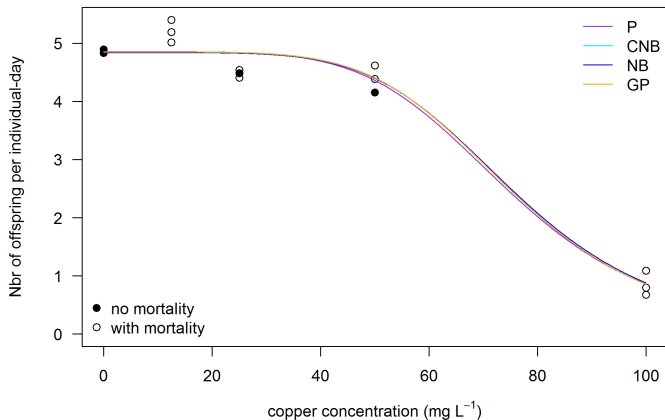
# Peu d'impact du modèle sur la courbe estimée concentration-effet - données "cadmium" - 1/4



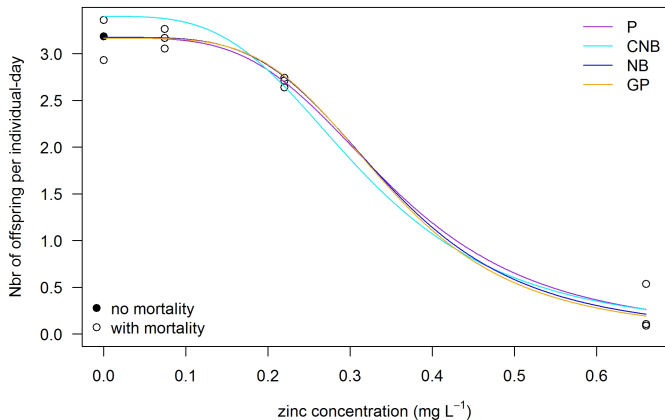
# Peu d'impact du modèle sur la courbe estimée concentration-effet - données "chlordane" - 2/4



# Peu d'impact du modèle sur la courbe estimée concentration-effet - données "cuivre" - 3/4



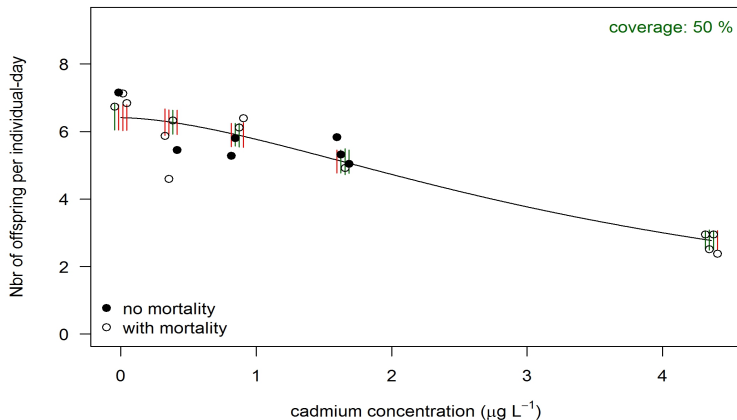
# Peu d'impact du modèle sur la courbe estimée concentration-effet - données "zinc" - 4/4



# Exploration de la capacité des modèles à décrire la variabilité inter-individus ou inter-réplicats

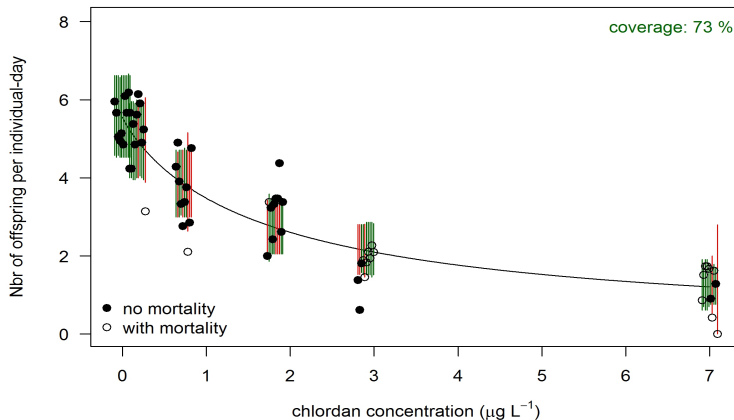
- Confrontation des intervalles de prédiction à 95% aux observations

# Intervalles de prédiction à 95% controntés aux observations - modèle P - données "cadmium" - 1/4



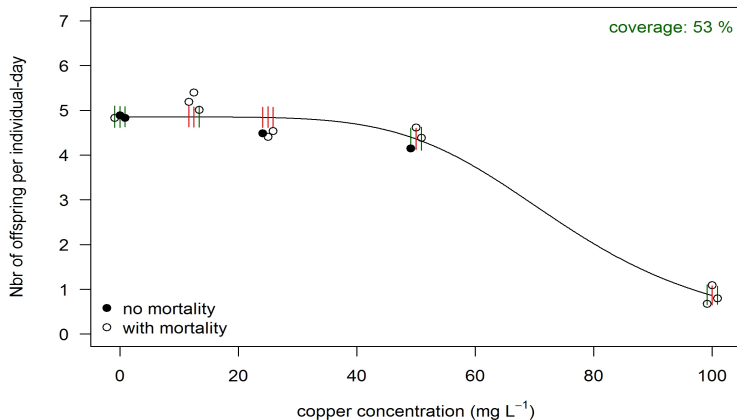
Taux de couverture des observations  $< 95\%$

# Intervalles de prédiction à 95% controntés aux observations - modèle P - données "chlordan" - 2/4



Taux de couverture des observations  $< 95\%$

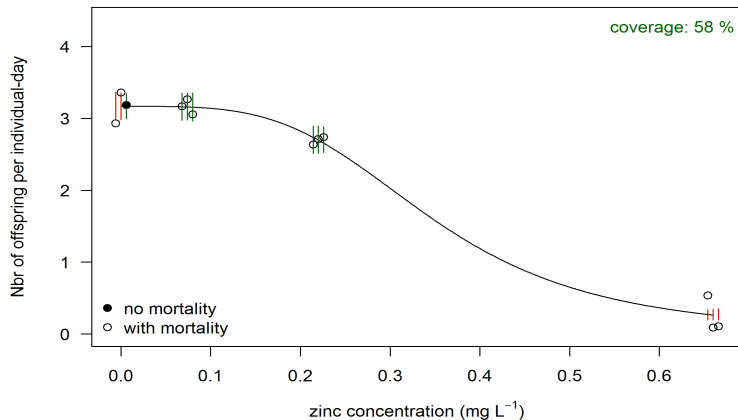
# Intervalles de prédiction à 95% confrontés aux observations - modèle P - données "cuivre" - 3/4



Taux de couverture des observations < 95%



# Intervalle de prédiction à 95% confrontés aux observations - modèle P - données "zinc" - 4/4

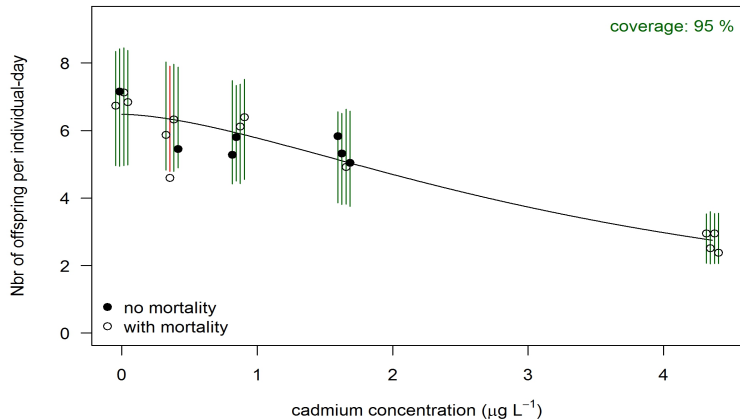


Taux de couverture des observations  $< 95\%$

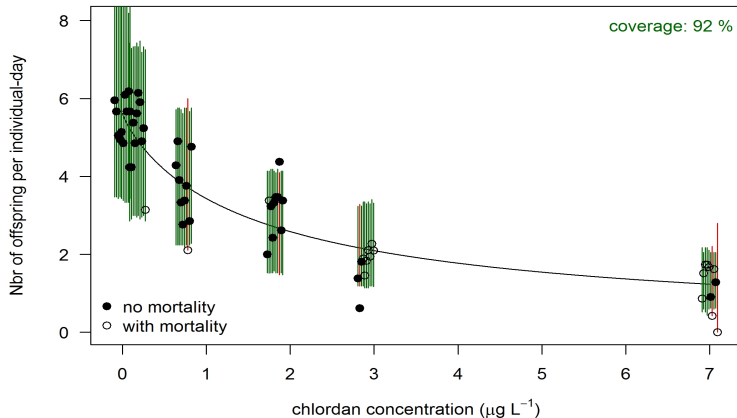
# Exploration de la capacité des modèles à décrire la variabilité inter-individus ou inter-réplicats

- Confrontation des intervalles de prédiction à 95% aux observations
  - ▶ **Modèle de Poisson sous-estimant la variabilité**

# Intervalle de prédiction à 95% confrontés aux observations - modèle CNB - données "cadmium" - 1/4

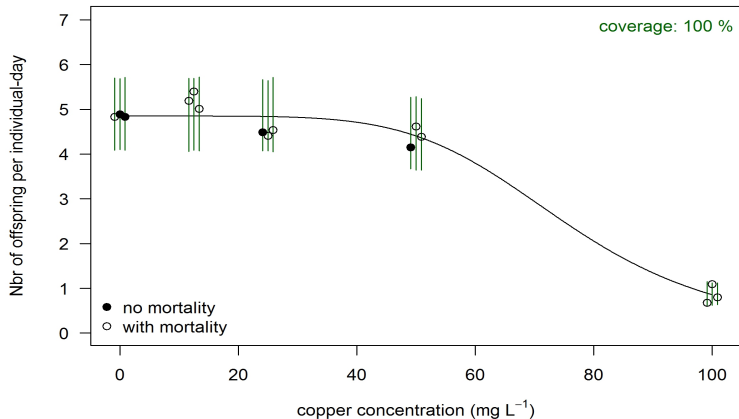


# Intervalles de prédiction à 95% confrontés aux observations - modèle CNB - données "chlordane" - 2/4

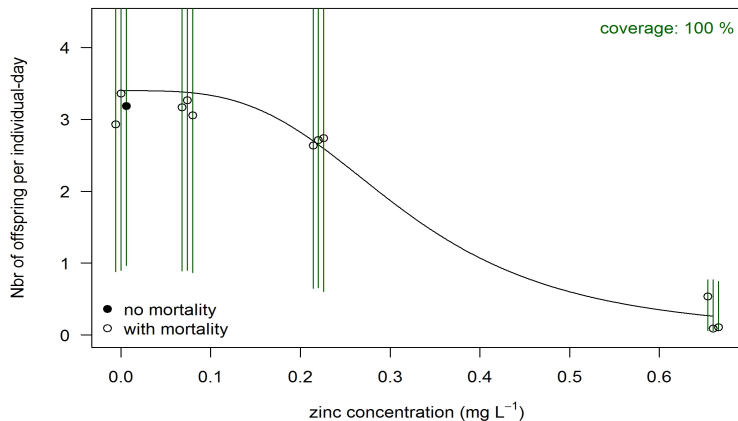


Trop grands intervalles pour  $c = 0$  et trop petits pour  $c = 7$

# Intervalles de prédiction à 95% confrontés aux observations - modèle CNB - données "cuivre" - 3/4



# Intervalles de prédiction à 95% confrontés aux observations - modèle CNB - données "zinc" - 4/4



Trop grands intervalles de prédictions pour les faibles concentrations

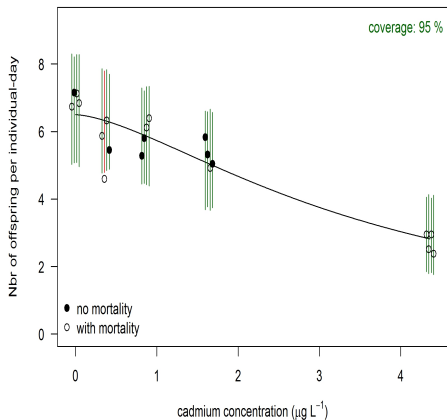
# Exploration de la capacité des modèles à décrire la variabilité inter-individus ou inter-réplicats

- Confrontation des intervalles de prédiction à 95% aux observations
  - ▶ Modèle de Poisson sous-estimant la variabilité
  - ▶ Modèle “négative binomial” classique surestimant la variabilité aux concentrations faibles (relation quadratique exagérée)

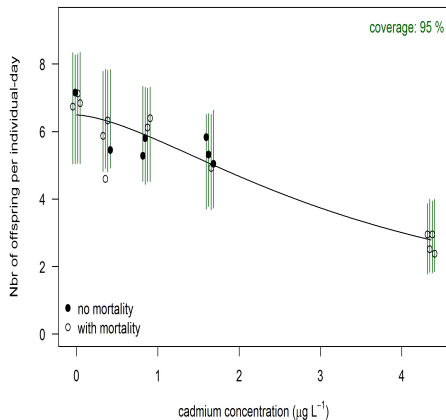
# Intervalle de prédiction à 95% confrontés aux observations - modèle NB et GP - données "cadmium"

- 1/4

## Modèle NB



## Modèle GP

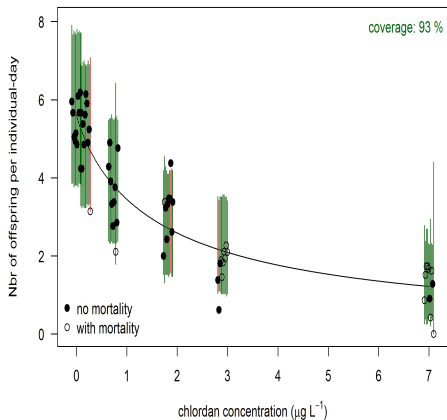




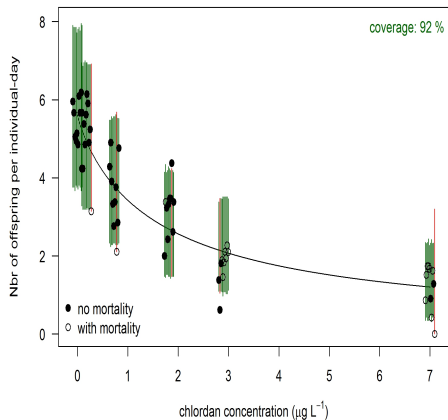
# Intervalle de prédiction à 95% confrontés aux observations - modèle NB et GP - données "chlordan"

- 2/4

## Modèle NB

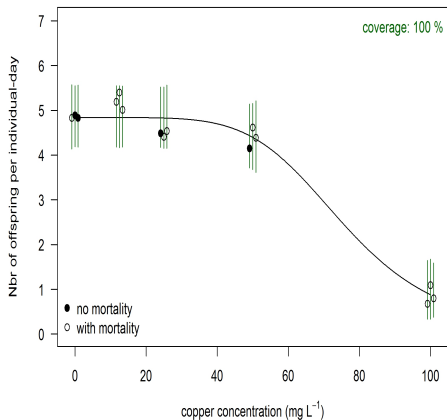


## Modèle GP

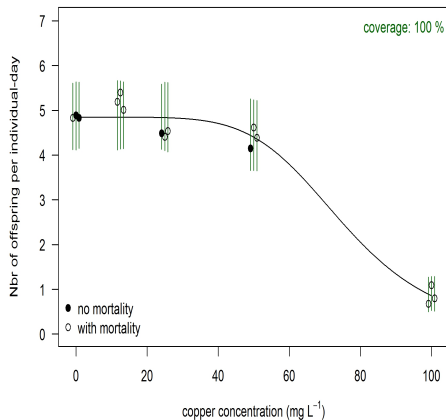


# Intervalle de prédiction à 95% confrontés aux observations - modèle NB et GP - données "cuivre" - 3/4

## Modèle NB

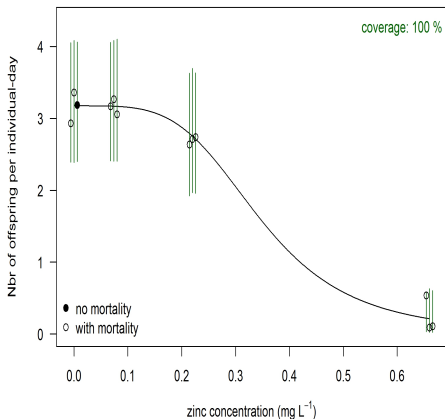


## Modèle GP

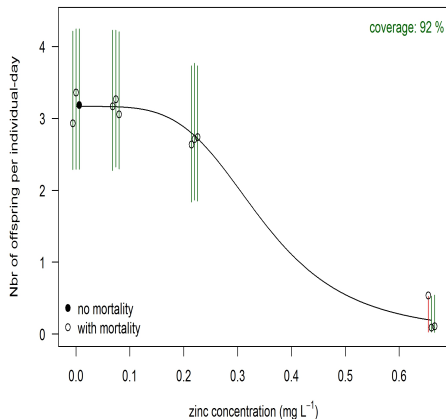


# Intervalle de prédiction à 95% confrontés aux observations - modèle NB et GP - données "zinc" - 4/4

## Modèle NB



## Modèle GP



# Exploration de la capacité des modèles à décrire la variabilité inter-individus ou inter-réplicats

- Confrontation des intervalles de prédiction à 95% aux observations
  - ▶ **Modèle de Poisson sous-estimant la variabilité**
  - ▶ **Modèle “négative binomiale” classique surestimant la variabilité aux concentrations faibles (relation quadratique exagérée)**
  - ▶ **Modèle “négative binomiale” avec variance proportionnelle à la moyenne ou sa réécriture : meilleure description de la variabilité. Modèles peu différents, difficiles à départager**

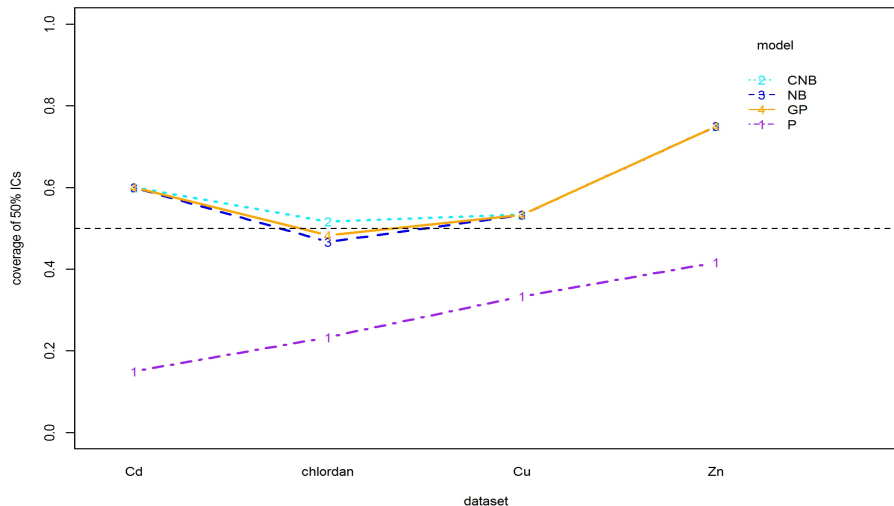
# Exploration de la capacité des modèles à décrire la variabilité inter-individus ou inter-réplicats

- Confrontation des intervalles de prédiction à 95% aux observations

## **Modèles retenus : NB et GP**

- Confrontation des intervalles de prédiction à 50% aux observations

# Confrontation des intervalles de prédiction à 50% aux observations



# Exploration de la capacité des modèles à décrire la variabilité inter-individus ou inter-réplicats

- Confrontation des intervalles de prédiction à 95% aux observations

**Modèles retenus : NB et GP**

- Confrontation des intervalles de prédiction à 50% aux observations

Modèles CNB, NB et GP difficiles à départager.

# Exploration de la capacité des modèles à décrire la variabilité inter-individus ou inter-réplicats

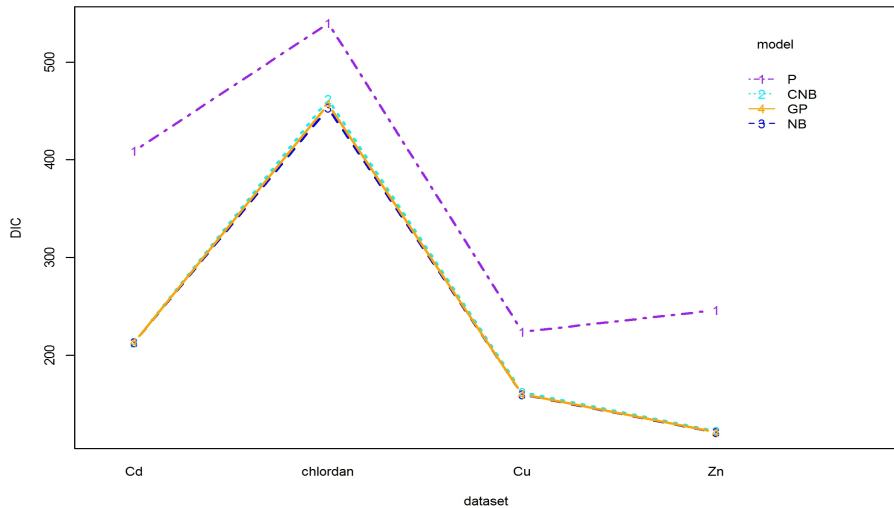
- Confrontation des intervalles de prédiction à 95% aux observations
- Confrontation des intervalles de prédiction à 50% aux observations

## **Modèles retenus : NB et GP**

- Comparaison des DIC



# Comparaison des DIC



# Exploration de la capacité des modèles à décrire la variabilité inter-individus ou inter-réplicats

- Confrontation des intervalles de prédiction à 95% aux observations
- Confrontation des intervalles de prédiction à 50% aux observations

## **Modèles retenus : NB et GP**

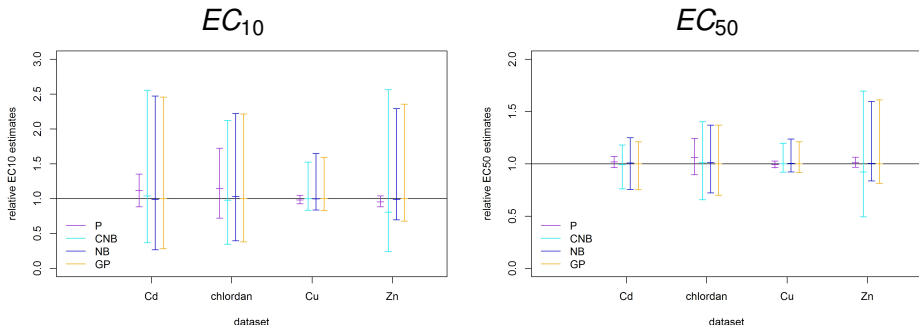
- Comparaison des DIC  
Modèle CNB, NB et GP clairement meilleurs que le modèle de Poisson, mais difficiles à départager.

# Exploration de la capacité des modèles à décrire la variabilité inter-individus ou inter-réplicats

- Confrontation des intervalles de prédiction à 95% aux observations
  - Confrontation des intervalles de prédiction à 50% aux observations
  - Comparaison des DIC
- Modèles retenus : NB et GP**
- Autre critère permettant de départager les modèles NB et GP ?  
Calcul de variance prédite pour chaque concentration ?  
Difficulté liée à la présence de la covariable *NID*.

# Impact du choix du modèle sur l'estimation des $EC_x$

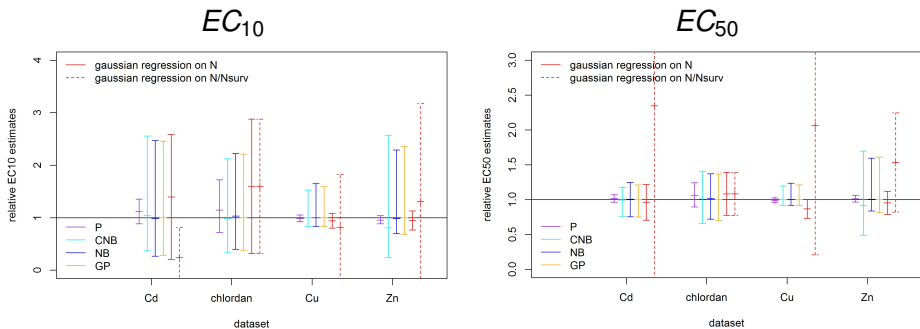
Estimations ponctuelles et par intervalles (95%) en valeurs relatives par rapport à l'estimation ponctuelle avec le modèle GP.



Sous-estimation de l'incertitude avec le modèle de Poisson, d'autant plus importante que le nombre d'individus par réplicats est grand (nombre d'individus par réplicat = 1, 10, 20, 20 resp. pour chlordan, Cd, Cu, Zn). Peu de différence entre les modèles NB et GP.

# Comparaison aux alternatives couramment utilisées

Régression gaussienne (package `drc`) sur le nombre total de produits de la reproduction en divisant ou non par le nombre de survivants du réplicat en fin d'essai.

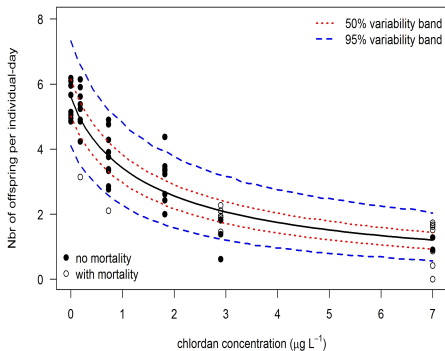


Très peu de différence entre les modèles NB et GP comparativement aux différences entre méthodes traditionnelles (sauf chlordan : peu de mortalité et données individuelles).

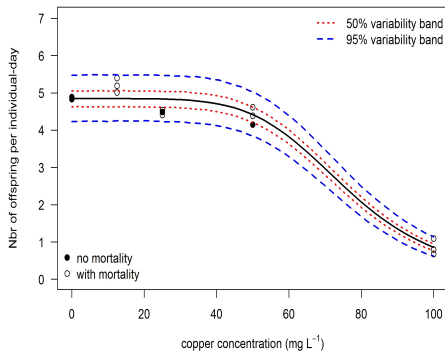
# Petit avantage à l'écriture plus mécaniste du modèle GP

Possibilité de représenter la variabilité prédite sur le nombre moyen de produits de la reproduction par individu-jour (ci-dessous sans prise en compte de l'incertitude).

Ex. : jeu de données "chlordane"



Ex. : jeu de données "cuivre"



## Méthode proposée :

Prise en compte de la covariable “nombre d’individu-jours” dans un modèle gamma-Poisson avec relation proportionnelle entre la variance et la moyenne du nombre de produits de la reproduction par individu-jour.

## Questions résiduelles :

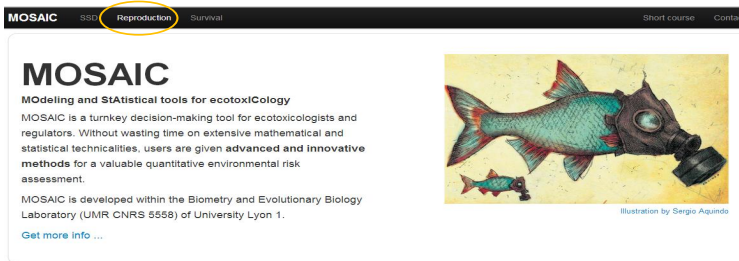
- Origine de la variabilité ?  
Y aurait-il moyen de l’expliquer à partir de variables mesurées dans chaque becher ? Parts respectives des variabilités liées aux individus et aux facteurs expérimentaux non contrôlés ?
- Robustesse de la méthode d’estimation des paramètres de la partie déterministe en cas de variabilité faible ?  
Nécessité de choisir entre modèle de Poisson et modèle gamma-poisson dans le cadre de l’utilisation courante de ce modèle ?
- Existence d’une meilleure méthode ?

# Perspectives (1/2)

Rendre accessible l'utilisation du modèle par tout écotoxicologue, notamment dans le cadre de la mise en place d'un nouveau test OCDE pour tester l'effet de substances repro-toxiques sur des limnées (mollusques gastéropodes d'eau douce).

## Développement d'un outil en ligne :

<http://pbil.univ-lyon1.fr/software/mosaic/>



**MOSAIC**

**Modeling and Statistical tools for ecotoxicology**

MOSAIC is a turnkey decision-making tool for ecotoxicologists and regulators. Without wasting time on extensive mathematical and statistical technicalities, users are given **advanced and innovative methods** for a valuable quantitative environmental risk assessment.

MOSAIC is developed within the Biometry and Evolutionary Biology Laboratory (UMR CNRS 5558) of University Lyon 1.

[Get more info ...](#)

Illustration by Sergio Aquino





Développer des modèles simples décrivant les données **de mortalité ET de reproduction au cours du temps** afin de prendre en compte l'ensemble des données disponibles au cours du temps.

On dispose de modèles de ce type pour la survie : modèle TKTD.

**Il reste à développer un modèle de reproduction mécaniste simple et à le coupler au modèle de survie.**