

# Introduction à la modélisation d'une relation dose-effet ou dose-réponse en toxicologie

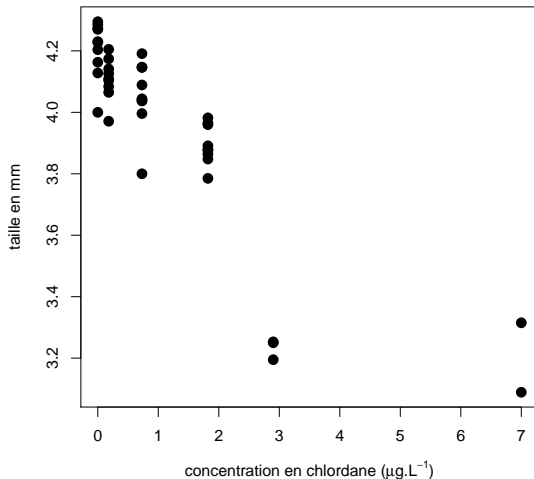
M. L. Delignette-Muller  
VetAgro Sup - LBBE

10 novembre 2014



# Exemple emprunté à l'écotoxicologie

Effet du chlordane sur la taille de daphnies après 21 jours d'exposition à concentration constante



# Objectif de l'analyse de ce type de données

- Mettre en évidence l'existence d'un effet du produit testé (ex. : ANOVA 1 si variable continue et lois normales)
- Estimer une **Valeur Toxicologique de Référence (VTR)** spécifique d'un effet, d'une voie et d'une durée d'exposition
  - ① détermination d'un effet critique (ou d'un trait d'histoire de vie en écotoxicologie)
  - ② détermination d'une dose (ou d'une concentration) critique, basée sur la NOAEL (ou NOAEC en écotoxicologie) ou sur la BMD (ou  $EC_x$  en écotoxicologie)
  - ③ application d'un facteur d'incertitude

# Calcul de la NOAEL et de la LOAEL

- **NOAEL (ou NOAEC) : “No Observed Adverse Effect Level (or Concentration)” :**  
Dose (ou Concentration) Maximale Sans Effet Nocif Observable (DMSENO).
- **LOAEL (ou LOAEC) : “Lower Observed Adverse Effect Level (or Concentration)” :**  
Dose (ou Concentration) Minimale Avec Effet Nocif Observable (DMENO).

Principe pour une variable continue lorsque les lois sont normales de même variance :

test de Dunnett de comparaison de la moyenne observée pour chaque concentration non nulle à la moyenne observée pour le groupe témoin  
(avec correction du risque  $\alpha$ )

# Test de Dunnett avec R et le package SimComp

```
> d <- read.table("ch21.txt", header = TRUE)
> str(d)

'data.frame': 42 obs. of 2 variables:
 $ conc : num 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 ...
 $ taille: num 4.27 4.13 4.2 4.29 4 ...

> require(SimComp)
> d$Concentration <- as.factor(d$conc)
> SimTestDiff(d, grp = "Concentration", resp = "taille", type = "Dunnett")
```

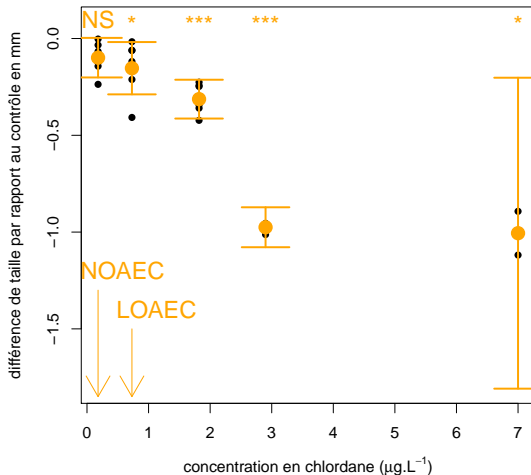
Test for differences of means of multiple endpoints

Assumption: Heterogeneous covariance matrices for the groups

Alternative hypotheses: True differences not equal to the margins

	comparison	endpoint	margin	estimate	statistic	p.value.raw	p.value.adj
1	0.18 - 0	taille	0	-0.0989	-2.712	0.0151	0.0598
2	0.73 - 0	taille	0	-0.1534	-3.203	0.0058	0.0241
3	1.82 - 0	taille	0	-0.3131	-8.761	0.0000	0.0000
4	2.9 - 0	taille	0	-0.9750	-28.374	0.0000	0.0000
5	7 - 0	taille	0	-1.0057	-8.626	0.0132	0.0325

# Illustration du calcul de la NOAEC sur l'exemple



# Défauts de la NOAEL (ou de la NOAEC)

## Sévèrement critiqué pour ces multiples défauts

- forcément égale à une dose testée dans le plan d'expérience
- basée sur une mauvaise interprétation de la p-value
- dépend fortement des effectifs  
et peu protectrice pour les faibles effectifs : en moyenne, plus les effectifs sont faibles plus la NOAEL est élevée
- ne peut pas toujours être calculée (incalculable si la première concentration conduit à une différence significative)
- pas d'intervalle de confiance associé

# la BenchMark Dose (BMD)

Alternative à la NOAEL, actuellement recommandée :  
ajustement d'un modèle aux données observées en dose-effet  
puis calcul de la dose qui, sur le modèle, correspond à un niveau  
d'effet fixé (1, 5 ou 10 % généralement utilisés)  
Pour une relation dose-effet on parle aussi en EC ou ED (Effective  
Concentration or Dose) et pour une relation dose-réponse où la survie est  
observée, en LC ou LD (Lethal Concentration or Dose)

## Avantages de la BMD

- prise en compte de toute la courbe dose-réponse
- moindre dépendance au protocole expérimental
- intervalle de confiance associé

## Inconvénients de la BMD

- nécessité de choisir un modèle
- difficultés possibles d'ajustement du modèle aux données
- nécessité de définir une niveau d'effet critique



# Les modèles

Diversité de modèles suivant la forme de la courbe dose-réponse observée et du domaine d'observation.

- parfois un modèle linéaire suffit (notamment quand le domaine d'observation est restreint)
- souvent un modèle de type logistique est adapté

Modèle très couramment utilisé : **le modèle log-logistique**

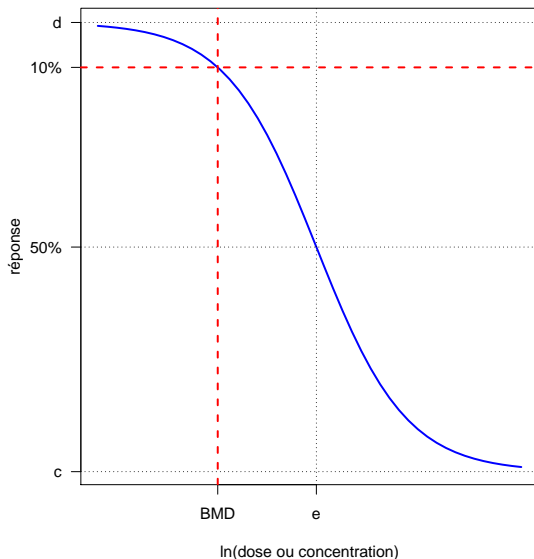
$$f(x) = c + \frac{d-c}{1+(\frac{x}{e})^b}$$

avec  $f(x)$  l'effet et  $x$  la dose ou la concentration

Modèle à 4 paramètres,  $d$  l'asymptote supérieure,  $c$  l'asymptote inférieure,  $e$  la valeur pour laquelle  $f(x) = \frac{c+d}{2}$ , et  $b$  un paramètre de forme de la courbe (plus ou moins plate)

Forme simplifiée à 2 ou 3 paramètres souvent utilisée (ex. avec  $d = 1$  et  $c = 0$  pour modéliser un taux de survie)

# Modèle log-logistique et BMD (à 10%)



# Méthode d'ajustement d'un tel modèle aux données

Utilisation classique de la méthode du **maximum de vraisemblance** pour estimer le vecteur de paramètres  $\theta$  caractérisant le modèle

(ex. : pour le modèle log-logistique  $\theta = \{b; c; d; e\}$ )

Deux cas à bien distinguer :

- **les courbes dose-effet**

**variable continue** en supposant les erreurs normales,  
en notant  $y_{ij}$  la réponse de l'individu  $j$  exposé à une concentration  $x_i$   
(ex. : taille, poids, ...)

$$y_{ij} = f(\theta, x_i) + \epsilon_{ij} \text{ avec } \epsilon_{ij} \sim N(0, \sigma)$$

- **les courbes dose-réponse**

**variable quantale** ou dichotomique,  
en notant  $z_i$  le nombre de réalisations de l'évènement (ex. : survie, ...) sur  
les  $n_i$  individus exposés à la concentration  $x_i$

$$z_i \sim \text{Binomiale}(p_i, n_i) \text{ avec } p_i = f(\theta, x_i)$$

# Difficultés liées à cette estimation

La mise en oeuvre du maximum de vraisemblance pour une variable continue ou une variable quantale est beaucoup plus délicate, d'un point de vue statistique, que la régression linéaire simple que vous connaissez

## **Difficulté majeure : pas de solution analytique**

⇒ nécessité de rechercher la solution numériquement par des méthodes itératives

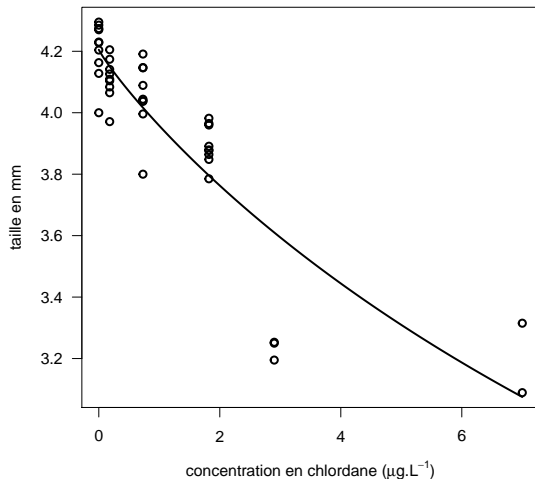
⇒ nécessité de définir des estimations initiales des paramètres

⇒ nécessité d'utiliser des outils statistiques spécifiques

Nous utiliserons le package **R** drc spécifiquement dédié à l'ajustement de courbes dose-réponse (ou dose-effet), avec initialisation automatique des valeurs initiales des paramètres pour les modèles classiques.

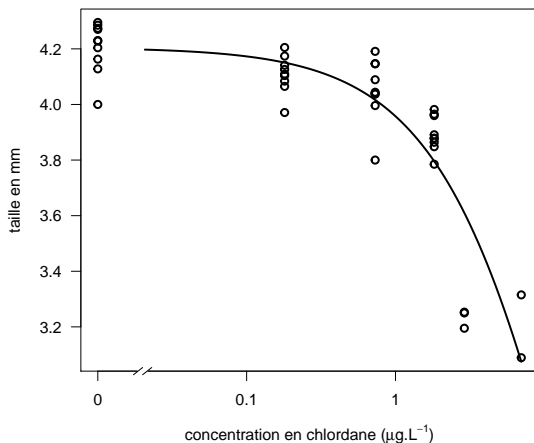
# Ajustement, sur l'exemple, d'un modèle log-logistique à 3 paramètres ( $c = 0$ )

Sans transformation logarithmique sur l'axe des abscisses



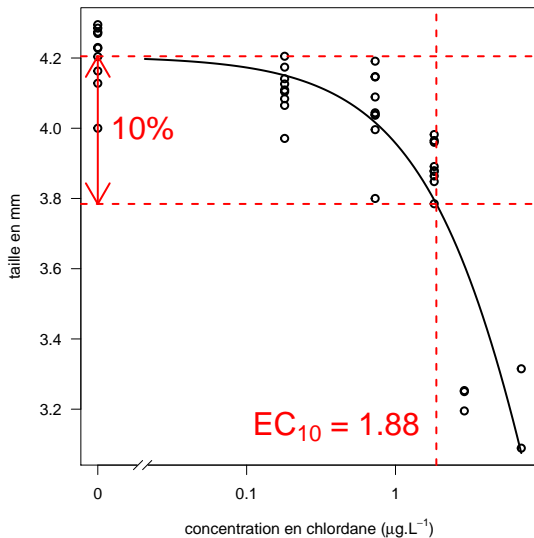
# Ajustement d'un modèle log-logistique à 3 paramètres sur l'exemple ( $c = 0$ )

Avec transformation logarithmique sur l'axe des abscisses  
(axe brisé)



# Estimation de la BMD (ou ED ou EC)

Estimation de la  $EC_{10}$  sur l'exemple

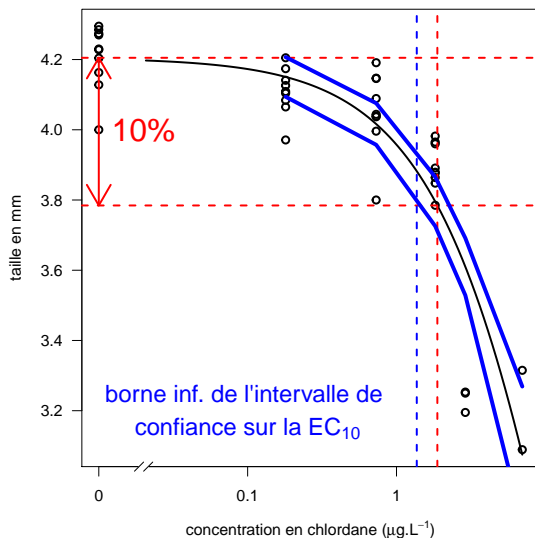


# Prise en compte de l'incertitude d'estimation

Afin de prendre en compte l'incertitude liée à l'estimation des paramètres du modèle (incertitude liée aux données), il est d'usage, pour le calcul de la VTR, de se baser plutôt sur ce que certains appellent la BMDL (d'autres l'appellent encore la BMD) : la borne inférieure de l'intervalle de confiance à 95% sur la BMD. Calcul de l'intervalle de confiance non trivial : diverses méthodes disponibles dans le package drc



# Borne inférieure de confiance sur la $EC_{10}$



Comment utiliser le package drc pour ajuster un modèle à des données de type

- dose-effet (variable continue)
- ou dose-réponse (variable quantale)

puis

estimer une BMD (ou  $ED_x$ ,  $EC_x$ ,  $LD_x$ ,  $LC_x$ ) à partir de cet ajustement ?

# Ajustement d'un modèle log-logistique à 3 paramètres ( $c = 0$ ) dans le cas d'une variable continue

```
> require(drc)
> d <- read.table("ch21.txt", header = TRUE)
> str(d)
```

```
'data.frame': 42 obs. of 2 variables:
 $ conc : num 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 ...
 $ taille: num 4.27 4.13 4.2 4.29 4 ...
```

```
> m <- drm(taille ~ conc, fct=LL.3(), type = "continuous", data = d)
> summary(m)
```

Model fitted: Log-logistic (ED50 as parameter) with lower limit at 0 (3 parms)

Parameter estimates:

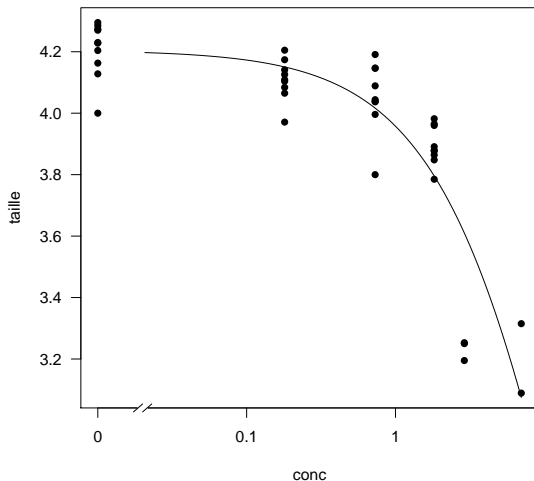
	Estimate	Std. Error	t-value	p-value
b:(Intercept)	0.9104	0.1225	7.4302	0
d:(Intercept)	4.2050	0.0385	109.2106	0
e:(Intercept)	21.0177	5.0387	4.1712	0

Residual standard error:

0.148 (39 degrees of freedom)

# Tracé du modèle sur les points observés

```
> plot(m, type = "all", log= "x" , broken = TRUE)
```



# Récupération des paramètres et calcul des intervalles de confiance autour de ces paramètres

A-t-on suffisamment de données pour estimer précisément tous les paramètres ?

```
> (coeff <- coef(m))
```

```
b:(Intercept) d:(Intercept) e:(Intercept)
          0.91          4.20          21.02
```

```
> confint(m)
```

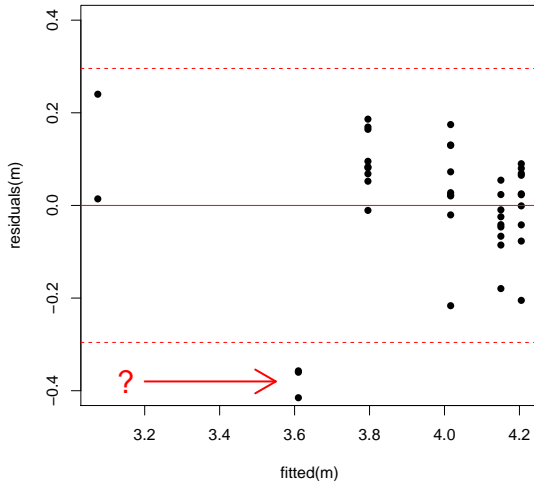
```

          2.5 % 97.5 %
b:(Intercept) 0.663  1.16
d:(Intercept) 4.127  4.28
e:(Intercept) 10.826 31.21
```

# Graphes des résidus dans le cas d'une variable continue

Le modèle d'erreur **aléatoire** gaussien est-il respecté ?

```
> plot(fitted(m), residuals(m))
```

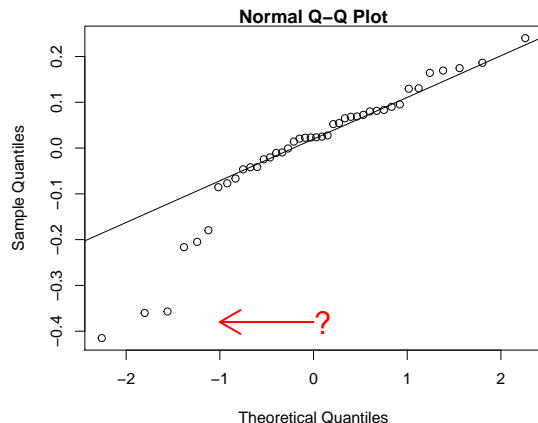


# Graphes des quantiles des résidus en fonction des quantiles de la loi normale

Le modèle d'erreur aléatoire **gaussien** est-il respecté ?

```
> qqnorm(residuals(m))
```

```
> qqline(residuals(m))
```



# Test de normalité des résidus

Le modèle d'erreur aléatoire **gaussien** est-il respecté ?

```
> shapiro.test(residuals(m))
```

Shapiro-Wilk normality test

```
data: residuals(m)  
W = 0.893, p-value = 0.0009172
```

Dans cet exemple, mise en évidence d'observations extrêmes à l'une des concentrations.

Problème expérimental ?

Modèle inadapté ? Ajustement d'un modèle à 4 paramètres ?

Fort impact sur les résultats de l'ajustement ?



# Recherche d'un modèle plus adapté - ajustement d'un modèle log-logistique à 4 paramètres

```
> mbis <- drm(taille ~ conc, fct = LL.4(), type = "continuous", data = d)
> summary(mbis)
```

Model fitted: Log-logistic (ED50 as parameter) (4 parms)

Parameter estimates:

	Estimate	Std. Error	t-value	p-value
b:(Intercept)	9.2333	5.3235	1.7344	0.09
c:(Intercept)	3.1988	0.0707	45.2631	0.00
d:(Intercept)	4.1267	0.0192	214.9040	0.00
e:(Intercept)	2.0495	0.1605	12.7712	0.00

Residual standard error:

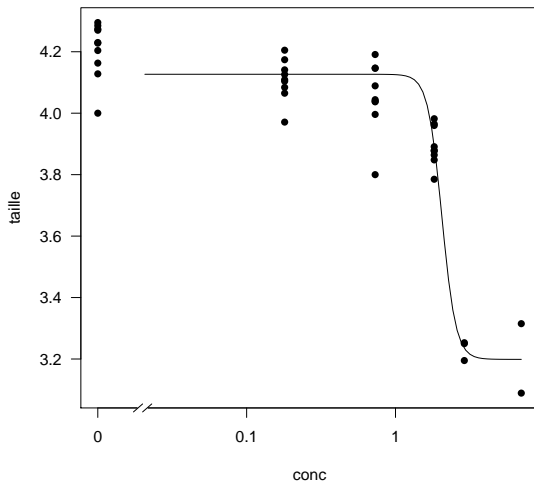
0.102 (38 degrees of freedom)

```
> confint(mbis)
```

	2.5 %	97.5 %
b:(Intercept)	-1.54	20.01
c:(Intercept)	3.06	3.34
d:(Intercept)	4.09	4.17
e:(Intercept)	1.72	2.37

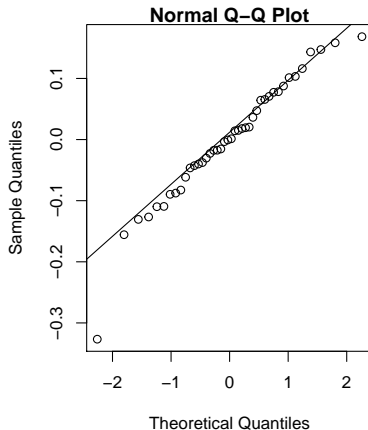
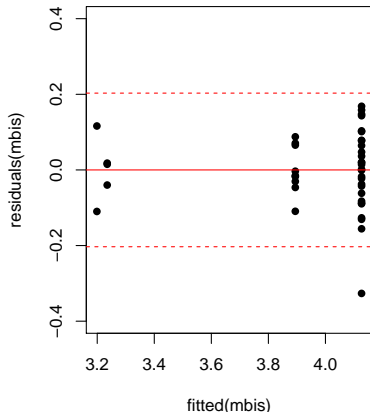
# Graphe d'ajustement du modèle log-logistique à 4 paramètres

```
> plot(mbis, type = "all", log = "x", pch = 16, broken = TRUE)
```



# Graphes des résidus du modèle log-logistique à 4 paramètres

```
> plot(fitted(mbis), residuals(mbis))  
> qqnorm(residuals(mbis))  
> qqline(residuals(mbis))
```



# Comparaison des ajustements des deux modèles à l'aide du critère d'Akaïké

Critère de déviance pénalisée par la complexité du modèle : on préfère généralement le modèle avec la plus petite valeur de ce critère.

```
> AIC(m,mbis)
```

	df	AIC
m	4	-36.5
mbis	5	-67.1

**Néanmoins on ne prend jamais de décision quant au choix du modèle sur ce seul critère.** La décision finale revient au biologiste.

Dans cet exemple, l'existence d'un seuil  $c$  non nul est-il raisonnable, a-t-il un sens biologique ? Comment sont définis les  $EC_x$  dans un modèle avec  $c \neq 0$  ?

# Cas d'une variable quantale

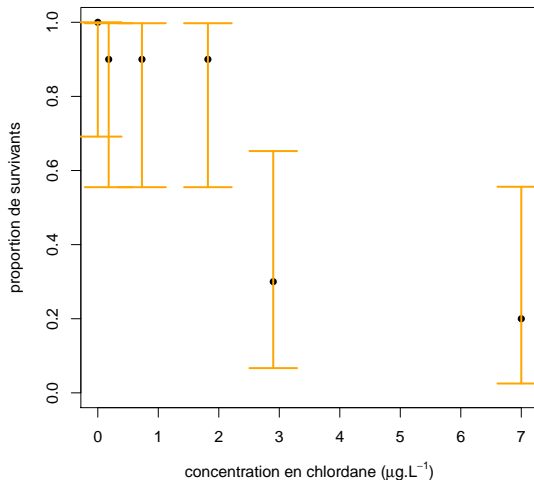
Exemple : survie observée sur le même jeu de données

```
> ds <- read.table("surviech21.txt", header = TRUE)
> ds
```

	conc	nbvivants	nbttotal
1	0.00	10	10
2	0.18	9	10
3	0.73	9	10
4	1.82	9	10
5	2.90	3	10
6	7.00	2	10

Une seule valeur de fréquence observée par concentration, mais à laquelle on peut associer un intervalle de confiance

# Tracé des fréquences observées avec intervalles de confiance à 95% calculés avec la loi binomiale



# Ajustement d'un modèle log-logistique à 2 paramètres ( $c = 0, d = 1$ ) dans le cas d'une variable quantale

## ATTENTION au codage différent du modèle !

```
> ms <- drm(nbvivants / nbttotal ~ conc, weights = nbttotal,
+   fct = LL.2(), type = "binomial", data = ds)
```

```
> summary(ms)
```

Model fitted: Log-logistic (ED50 as parameter) with lower limit at 0 and upper

Parameter estimates:

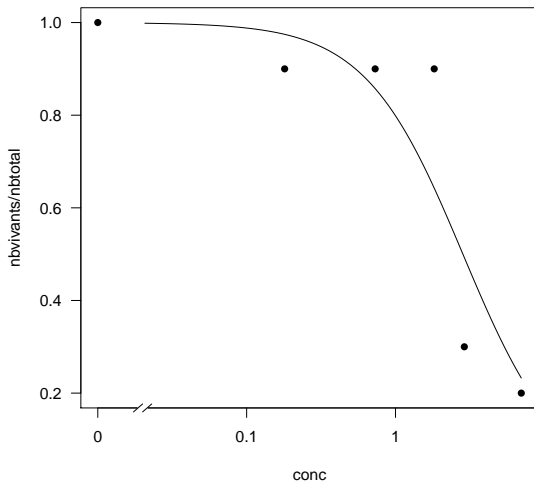
	Estimate	Std. Error	t-value	p-value
b:(Intercept)	1.322	0.419	3.153	0
e:(Intercept)	2.837	0.780	3.638	0

```
> confint(ms)
```

	2.5 %	97.5 %
b:(Intercept)	0.50	2.14
e:(Intercept)	1.31	4.37

# Tracé du modèle sur les points observés

```
> plot(ms,type = "all", log = "x", broken = TRUE)
```





# Calcul d'une ou plusieurs valeurs de BMD (ou ED...)

Calcul des valeurs de  $EC_1$ ,  $EC_5$  et  $EC_{10}$  pour les 2 exemples

- **Variable continue**

```
> ED(m, respLev = c(1,5,10))
```

Estimated effective doses

	Estimate	Std. Error
1:1	0.135	0.06
1:5	0.828	0.21
1:10	1.881	0.30

- **Variable quantale**

```
> ED(ms, respLev = c(1,5,10))
```

Estimated effective doses

	Estimate	Std. Error
1:1	0.0878	0.09
1:5	0.3059	0.21
1:10	0.5383	0.29

# Prise en compte de l'incertitude sur la BMD (ou ED...)

- Calcul des intervalles de confiance à 95% autour des  $EC_1$ ,  $EC_5$  et  $EC_{10}$  pour le **modèle dose-effet (variable continue)**  
`> ED(m, respLev = c(1,5,10), interval = "delta", level = 0.95)`

Estimated effective doses  
 (Delta method-based confidence interval(s))

	Estimate	Std. Error	Lower	Upper
1:1	0.13507	0.06475	0.00409	0.27
1:5	0.82792	0.20565	0.41195	1.24
1:10	1.88120	0.29594	1.28261	2.48

- sur cet exemple, le calcul asymptotique (méthode delta) fourni pour le **modèle dose-réponse (variable quantale)** n'est pas correct (calcul non trivial).

# Quelques difficultés inhérentes au processus de modélisation

- Choix du modèle (**partie déterministe**) et du nombre de paramètres. Il convient de trouver un modèle qui ajuste bien les données tout en restant parcimonieux (nombre de paramètres pas trop grand) et pertinent d'un point de vue biologique.
- Spécification d'un modèle d'erreur (**partie stochastique**) adapté au type de données indispensable. L'inférence est un peu plus compliquée dans le cas d'un modèle non gaussien (ex. calcul d'intervalles de confiance).
- Difficulté d'implémentation d'un modèle qui ne serait pas préalablement spécifié dans drc (écriture du modèle, initialisation manuelle des valeurs des paramètres nécessaire).  
**Modélisation non triviale si l'on ne dispose pas d'outil dédié.**

# Autres critiques

- Choix du **seuil de réponse ou d'effet critique** : 1%, 5%, 10%, 20% ?  
Ce choix est un peu arbitraire et conditionne pourtant beaucoup la valeur de BMD (ou ED)
- Choix de la **durée d'exposition** (problème existant aussi avec la NOAEL)  
La réponse ou l'effet sont conditionnés par la durée d'exposition. Les données intermédiaires acquises au cours du temps (ex. : suivi quotidien de la survie) sont rarement utilisées (information perdue?).
- Modèles ajustés souvent avec des **données insuffisantes en terme de nombre de doses testées**.

# Conclusion

Malgré ces quelques inconvénients, **la modélisation des courbes dose-réponse ou dose-effet** suivie de l'estimation de valeurs de type BMD constitue actuellement une **alternative recommandée au calcul des valeurs de NOAEL**.

Grâce aux outils du type du package drc, cette modélisation est rendue accessible au plus grand nombre,

même si elle requiert tout de même une utilisation avertie.

**Les plans expérimentaux devraient être adaptés à la modélisation** (plus de doses testées chacune avec moins de répétitions) alors que les plans adaptés à l'ANOVA continuent souvent d'être utilisés.