

Développement de modèles toxicocinétiques pour les cyanotoxines chez le poisson et leur application à l'exposition humaine

Équipe de recherche

HADDAD, Sami, Université de Montréal

Brodeur, Philippe, Ministère de l'environnement et de la faune

Deblois, Christian, Ministère du Développement durable, de l'Environnement et des Parcs

Juneau, Philippe, Université du Québec à Montréal

Spear, Philip, Université du Québec à Montréal

Partenaires

Belleville, Denis, Institut national de santé publique du Québec

Mochon, Alain, Société des établissements de plein air du Québec, Parc Yamaska

Étudiant

Aubry, Bénédicte, candidate au doctorat, Université du Québec à Montréal

Objectifs

L'objectif général du projet est de développer un modèle toxicocinétique à base physiologique qui permettrait de prédire l'accumulation de cyanotoxines plus particulièrement dans la chair de poisson qui est source d'alimentation pour l'humain, mais aussi dans le foie et le reste du corps du poisson. Pour atteindre ce but quelques objectifs plus spécifiques doivent être atteints 1) développement de méthode analytique pour analyse de cyanotoxines dans le tissu de poisson, 2) étude toxicocinétique des cyanotoxines par exposition de poissons (initialement la truite et ensuite la perchaude) en milieu contrôlé, 3) développement d'un modèle toxicocinétique à base physiologique (initialement la truite et ensuite la perchaude) et 4) application du modèle pour estimer l'exposition humaine via la consommation de poisson par la pêche sportive.

Méthodologie et résultats obtenues

1) développement de méthode analytique

Le développement de la méthode analytique a essentiellement été mis au point avant le premier rapport soumis. Brièvement, une méthode HPLC MS/MS (triple quadrupole) a été développée afin de quantifier la MC-YR, la MC-LR, et la MC-RR. Cette méthode utilise comme éluant un mélange acétonitrile/H₂O (+0.1%AF) avec un débit de 0.4 ml/min à 25°C, 10 µl de l'échantillon contenant les cyanotoxines passe au travers d'une colonne ZORBAX ECLIPSE PLUS C18 de 3.0 x 50 mm avec des sphères ('beads') de 1.8 microns. Un gradient d'acétonitrile est appliqué comme suit : 30% à 0 min, suivi d'un gradient linéaire de 30% à 0.5 min jusqu'à 95% à 3 min et les conditions isocratiques de 95% à 7 min. Selon cette méthode, les temps de rétention des cyanotoxines sont 1.686 min (MC-RR), 3.002 min (NOD), 3.554 min (MC-YR), et 3.629 min (MC-LR) Les paramètres liés à la détection par transition de masse spécifique sont comme suit : Source d'ionisation : Multimode, type de scan : MRM, ionisation electrospray, polarité positive, ΔEMV :300 volts, température des gas 300°C, vaporiseur à 200°C ; débit de gaz à 5L/min, nébulisateur à 60 psi et les capillaires à 3000 V. La détection des ions est effectuée selon les conditions suivantes :

Toxine	Ion Précurseur	Ion Produit	Fragmenteur (V)	E. Collision (V)
MC-YR	1045.6	135	100	65
	524.3	135	100	10
MC-RR	1038.6	135	100	65
	519.9	135	100	30
MC-LR	995.5	135	100	65
	498.2	135	100	10
NOD	825.4	135	100	60

Il est nécessaire que les échantillons à analyser soient dans un solvant similaire à celui d'élution du HPLC. Comme notre analyse au HPLC débute avec un éluant ACN acide (0.1% acide formique) à 30:70, notre échantillon doit donc contenir 70% d'eau et 0.1% d'acide formique. L'étape de filtration qui suit est tout aussi importante puisqu'elle permet d'éliminer une grande partie des graisses qui pourraient altérer la détection des cyanotoxines. Avant de lancer la détection, nous ajoutons le standard interne - la nodularine à chacun des échantillons. Lors des tests préliminaires, la nodularine variait seulement que de 8.9% d'un échantillon à une autre. Nous obtenons une relation linéaire avec des r₂ au minimum de 0.98 pour les 3 MC testés (YR, LR et R) dans un intervalle de 0 à 600 µg/L. La limite de détection est inférieure à 9.375 µg/L.

La méthode mise au point permet un taux de récupération élevé d'au moins 77% pour les microcystines YR, RR et LR pour les extractions faites à partir du foie non lyophilisé. A partir des muscles non lyophilisés, le pourcentage de récupération est d'au moins 83% pour toutes les microcystines. Nous avons démontré que l'extraction à partir de **tissus** lyophilisés nous donnait un rendement inférieur (entre 43 et 67% pour le foie et entre 26 et 39% pour le muscle).

2) étude toxicocinétique des cyanotoxines par exposition de poissons

Il est prévu que des expositions animales soient réalisées :i) exposition répétée par voie orale pour obtenir les niveaux tissulaires suite à des expositions prolongées et ii) exposition à des microcystines radiomarquées afin d'étudier la distribution des microcystines (libres et liées) dans l'organisme et de mieux caractériser la biodisponibilité des cyanotoxines en comparant administration orale et i.p. Nous avons eu plusieurs problèmes techniques qui nous ont empêchés d'exposer les poissons jusqu'à présent. La première fut l'impossibilité de produire suffisamment de cyanotoxines par culture cellulaire pour les expositions malgré le fait que nous avons essayé plusieurs conditions de culture. Nous avons donc pensé qu'il était souhaitable de faire la collecte de blooms de cyanobactéries et d'en extraire les cyanotoxines. Malheureusement les blooms toxiques se sont faits rares en 2010 et 2011. Des collectes répétitives au réservoir Choinière (Parc Yamaska) n'ont pas fourni les quantités suffisantes de cyanobactéries et leurs teneurs en toxines n'étaient que relativement faibles. Un seul des blooms qui fut d'intérêt pour nos besoins était situé en Abitibi mais l'information nous a été transmise quelques semaines après, trop tard pour l'échantillonnage. Dans le but d'accélérer la mise en route des expositions des poissons nous avons cherché une autre solution. Finalement, nous nous sommes résignés à acheter les cyanotoxines. Après une recherche, nous avons trouvé des prix abordables chez Enzo Life Sciences. Les prix étant quand même limitant, nous ferons les expositions des poissons à trois doses de MC-LR uniquement. Par la suite, nous extrapolerons le modèle aux MC-RR et MC-YR et valideront avec des expositions plus simples (1 seule dose d'exposition et des durées d'exposition moins longues minimisant les coûts liés à l'exposition).

Le deuxième point majeur qui a causé des délais importants est le blocage des fonds pendant plusieurs mois à l'UQAM suite au changement d'institution de l'investigateur principal de l'UQAM à l'Université de Montréal. La subvention a été gelée à l'UQAM et le transfert ne s'est fait que finalement en fin décembre ou début janvier. Ce délai a aussi fait en sorte que des nouvelles demandes auprès du comité d'éthique pour l'utilisation des poissons ont dû être soumises ainsi que pour le permis de radioprotection pour l'utilisation de 5 mCi de C-14 H₂CO₃. Ces permis ont été renouvelés à l'UQAM. Le « retransfert » du budget vers le co-investigateur de l'UQAM est en cours afin de démarrer les expositions. Une fois que ce transfert sera fait nous pourrions commander les animaux et les produits radiomarqués et débuter les expérimentations animales. Ces délais aussi longs étaient totalement imprévus.

3) Développement d'un modèle toxicocinétique à base physiologique

En attente de pouvoir commencer les expérimentations animales, nous avons tout de même travaillé sur le développement du modèle. Un modèle toxicocinétique de départ comprenant une description des différents processus qui pourrait affecter l'accumulation tissulaire des cyanotoxines a été encodé. La représentation conceptuelle du modèle est disponible à la figure 1 et le code est ajouté en annexe.

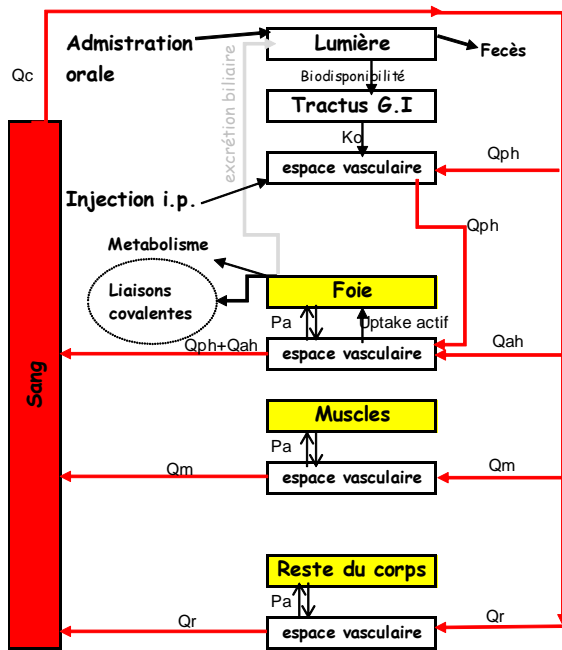


Figure 1. Représentation conceptuelle du modèle TCBP des cyanotoxines chez le poisson (truite et perchaude).

Absorption

Les truites seront exposées par la voie digestive. Il est décrit dans la littérature que les microcystines ne traversent pas les membranes de la branchie, ceci explique l'omission de cette voie d'absorption. Dans une première étape nous avons décrit l'absorption orale, en assumant qu'une partie de ce qui est ingéré est biodisponible (BD) pour l'absorption et que la vitesse à laquelle l'absorption se fait est régie par une constante d'Absorption (K_0).

$$\text{DOSE Disponible} = \text{BD} \times \text{Dose orale} \quad (\text{eq. 1})$$

$$\text{Dose absorbé} = \text{Dose disponible} \times K_0 \quad (\text{Eq. 2})$$

L'absorption IP est décrite simplement en ajoutant un bolus dans le compartiment de l'espace vasculaire du tractus gastro-intestinale (i.e., la voie porte).

$$\text{Eq.3}$$

$$\text{TAGi} = \text{QGi} (\text{Ca} - \text{CvGi}) - \text{TAGit} - \text{RTract}$$

Où TAGi est le taux de changement de la quantité de microcystines dans le compartiment sanguin du tube gastro intestinal, Ca est la concentration artérielle, CvGi est la concentration veineuse quittant le compartiment, TAGit est le taux d'absorption de la microcystine, et RTract est le taux de microcystine introduite par injection i.p. qui est décrit comme une infusion rapide.

Distribution et métabolisme

Les compartiments tissulaires sont scindés en deux sous-compartiments afin de décrire une possible limitation de la distribution par la diffusion. Il est bien connu que les grosses molécules ioniques, telles que les microcystines, ont peine à traverser les membranes biologiques. Deux équations différentielles décrivent l'accumulation dans chacun de ces deux sous-compartiments.

$$\text{Espace vasculaire : } \text{TAvt} = \text{Qt} * (\text{Ca} - \text{Cvt}) - \text{TAt} \quad \text{eq 4}$$

$$\text{Tissu : } \text{TAt} = \text{PAt} * (\text{Cvt} - (\text{Ct} / \text{Prt})) \quad \text{eq 5}$$

Où le TAvt et le TAt sont, respectivement le taux d'accumulation dans l'espace vasculaire du tissu et dans le tissu. Qt et le PAt sont le débit sanguin au tissu et le coefficient de perméabilité dans le tissu. Le Prt est le coefficient de partage tissu:sang.

Ces équations sont modifiées dans le cas du foie pour tenir compte du taux de métabolisme (T_{met}), d'un uptake cellulaire par transport actif (T_{Upt}) ainsi que d'une liaison covalente des microcystines à des protéines hépatiques (T_{met2}) (eq 6 et 7). Il est connu que les MC sont activement transportées du sang vers la cellule (Eriksson et al 1990) expliquant ainsi que cet organe soit un organe cible. A part pour le métabolisme, nous avons décrit ces processus avec des équations de premier ordre. Le métabolisme est décrit comme étant un processus saturable avec une vitesse maximale et une constante d'affinité.

Espace vasculaire hépatique :

$$T Af = (Q G_i * C v G_i) + (Q_f * C_a) - ((Q_f + Q G_i) * C v_f) - T A_{ft} - T U_{pt} \quad \text{Eq 6}$$

$$\text{Tissu hépatique : } T A_{ft} = P A_f * (C v_f - (C_f / P r_f)) + T U_{PT} - T M_{et} - T M_{et2} \quad \text{Eq 7}$$

Où T Af et T Aft sont, respectivement le taux d'accumulation dans l'espace vasculaire du foie et dans le tissu hépatique. Qf, P Af, Prf représentent le débit sanguin hépatique, le coefficient de perméabilité dans le foie et le coefficient de partage foie:sang, respectivement. Cf et Cv f sont la concentration dans le foie et dans le sang veineux quittant le foie, respectivement.

Paramétrage.

Les paramètres physiologiques du modèle existent dans la littérature et sont présentés dans le tableau 2. Les constantes suivantes devront être optimisées à partir de données expérimentales de cinétique chez le poisson : coefficient de diffusion membranaire (PA), constantes métaboliques (Vmax et Km), constante de transport actif hépatique (ClintTR), constante d'absorption orale (Ko), biodisponibilité (BD) et constante de liaison macromoléculaire (Kf).

En ce qui a trait aux coefficients de partage tissu:sang. Des études in vitro sont présentement en cours pour les mesurer expérimentalement. Nous utilisons des cellules de dialyse à l'équilibre RED Device de Thermo Scientific Pierce. Brièvement, ceci consiste à déterminer le rapport de concentration de la substance dans deux matrices séparées par une membrane poreuse. Les deux phases utilisées sont les tissus et une solution saline. Les résultats préliminaires démontrent que le temps d'incubation pour atteindre l'équilibre est d'environ 15 heures. Les valeurs mesurées de coefficients de partage tissu : saline pour le foie, le muscle et le sang sont dans le tableau 2.

Comportement du modèle (Simulations)

Des simulations ont été réalisées afin d'illustrer le comportement du modèle et de démontrer l'impact de certains processus sur la cinétique du produit.

- Impact du métabolisme sur l'accumulation : La figure 2 démontre que le modèle permet de simuler des expositions répétées et que le métabolisme aura un impact sur l'accumulation des microcystines.
- Impact de l'uptake actif hépatique sur la distribution tissulaire : La figure 3 démontre que plus l'uptake hépatique est grand, plus cela favorise l'accumulation hépatique. Mais en revanche, cela diminue les concentrations dans les autres tissus (figure 4). Cela colle bien avec la notion que les microcystines ont des concentrations hépatiques nettement supérieures aux concentrations dans la chair chez le poisson. Impact de la perméabilité membranaire sur la distribution et l'accumulation
- L'impact de la perméabilité membranaire sur les concentrations sanguines et musculaires est illustré en figure 5. On y remarque que les fluctuations journalières dans le sang diminuent avec une augmentation de perméabilité membranaire dans les tissus. En revanche, une diminution de la perméabilité restreint l'accès des microcystines dans le tissu mais aussi fait en sorte que les concentrations tissulaires diminuent plus lentement suite à un arrêt de l'exposition.

Tableau 2. Paramètres physiologiques de la truite et coefficients de partage.

Paramètres physiologiques		Valeur	
Poids corporel du poisson ¹⁾ (g)	BW		104
Débit cardiaque ¹⁾ (ml/hr/g)	KQCR		64,48
VOLUMES: Fraction du poids corporel ^{a)}			
Fraction au Foie	KVF		0,013
Fraction au GI	KVGI		0,048
Fraction au reste du corps	KVR		0,063
Fraction aux Muscles	KVMP		0,836
Fraction sang total ²⁾	KVB		0,04
	TOTAL		1,00
Espace vasculaire : Fraction du volume du tissu ^{a)}			
Fraction au Foie	KBVF		0,05
Fraction au GI	KBVGI		0,05
Fraction au reste du corps	KBVR		0,05
Fraction aux Muscles	KBVMP		0,05
DEBIT : Fraction du débit sanguin (Qc) ^{a)}			
Foie	KQFR		0,029
GI	KQGI		0,174
Reste du corps	KQR		0,145
Muscles	KQMP		0,652
	TOTAL		1,000
Coefficients de partage			
Tissu :saline ^c			
Foie :saline	YR	KPRF	10.9
	RR		20.7
	LR		19.2
Muscles :saline	YR	KPMRP	12.3
	RR		14.2
	LR		21.2
Sang	YR	PRB	9.3
	RR		14.4
	LR		14.4

^a John W. Nichols et al. 2004 Toxicol Sci 77, 206–218

^b Assumé d'être équivalent au rat et humain.

^b Mesuré par dialyse à l'équilibre

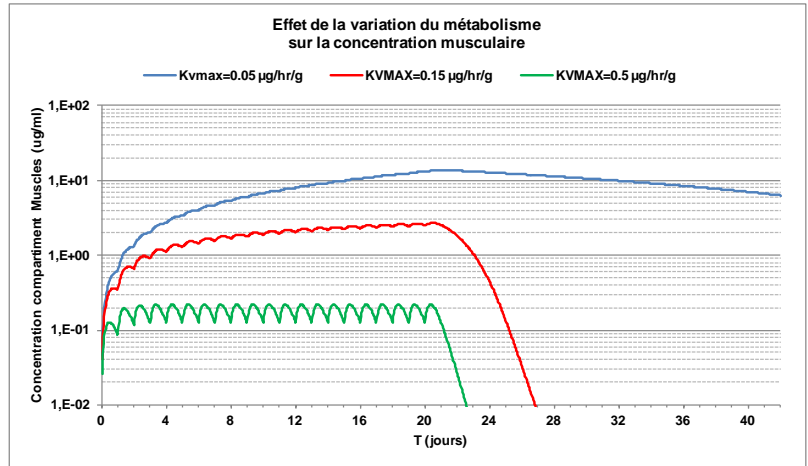


Figure 2. Impact du métabolisme sur l'accumulation dans les muscles. Une exposition orale de 21 jours à 100 µg/jour sur un poisson de 100 mg.

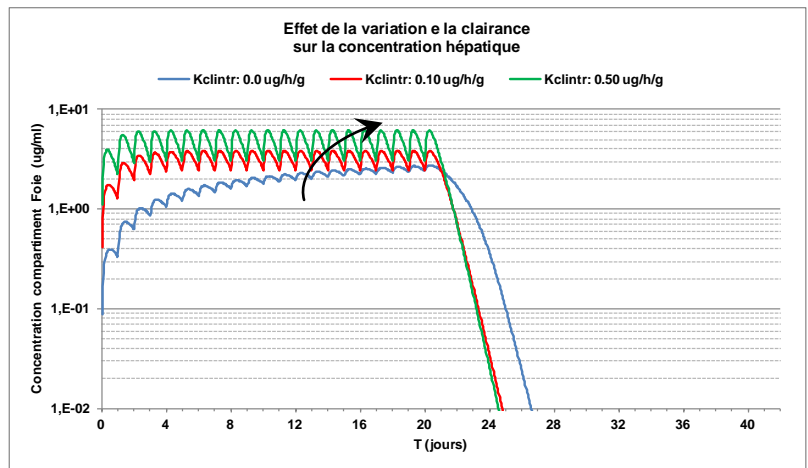


Figure 3. Impact du transport actif au niveau du uptake hépatique sur les concentrations hépatiques. Une exposition orale de 21 jours à 100 µg/jour sur un poisson de 100 mg.

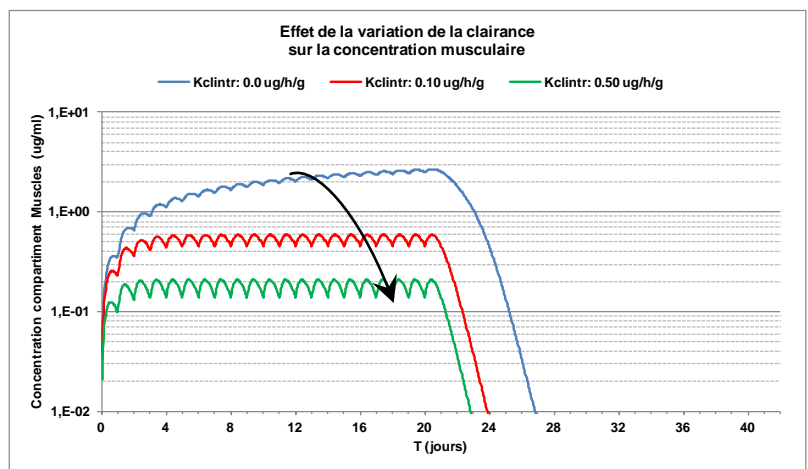


Figure 4. Impact du transport actif au niveau du uptake hépatique sur les concentrations musculaires. Une exposition orale de 21 jours à 100 µg/jour sur un poisson de 100 mg.

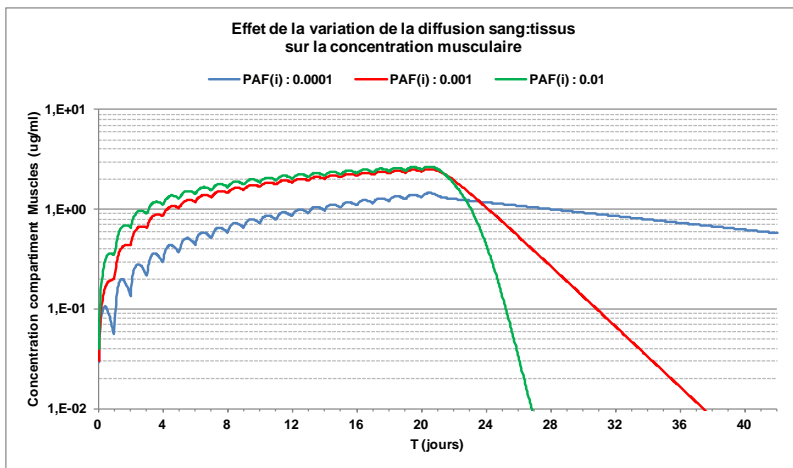


Figure 5. Impact de la perméabilité membranaire sur l'accumulation de microcystine dans le muscle. Une exposition orale de 21 jours à 100 µg/jour sur un poisson de 100 mg.

Extrapolation à la perchaude.

Une fois optimisé pour la truite, le modèle sera extrapolé pour la perchaude et une validation avec des données d'exposition en bassin sera effectuée. Les perchaudes sont maintenant disponibles en piscicultures (Abbey Road Fish Farm, Wainfleet, On ; C & M Aquatics, Bogner, On; North Shore Fish Farms, Kingsville, On).

Applicabilité de résultats et Retombées escomptées

Dans son état actuel, très préliminaire, le modèle prédit qu'un taux métabolique plus lent aura l'effet d'augmenter les teneurs en toxines au niveau des muscles axiales (figure 2). En hiver, on retrouve un ralentissement du métabolisme chez les poissons d'eaux douces et typiquement chez tous les organismes ectothermes aquatiques. À l'autre extrême, les floraisons d'algues bleu-vert se manifestent très souvent quand la température de l'eau ambiante est à son maximum pour l'année et le métabolisme des organismes aquatiques aussi. Le modèle nous suggère un taux d'accumulation musculaire moindre en été. Ce genre de résultat illustre la façon qu'un modèle toxicocinétique pourrait nous aider à améliorer les connaissances des facteurs affectant l'accumulation et les mécanismes physiologiques connexes.

De plus, le modèle aura de nombreuses applications hors du domaine de la recherche «pure». Si on accepterait les résultats préliminaires présentés ici suite aux validations appropriées, nous serions en mesure de mieux prévoir les niveaux de cyanotoxines dans la chair et le foie des poissons lors d'épisodes de «blooms» dans les lacs Québécois. Puisque la capture et la consommation de la perchaude sont importantes en hiver (c'est le poisson le plus capturé dans nos cours d'eau en hiver), le modèle indiquerait peut-être aux responsables de la santé qu'il faut une surveillance des teneurs de cyanotoxines et les risques associés à la pêche sur glace.

Le gouvernement du Québec est responsable de la production du Guide de la consommation des poissons destiné au grand public ce qui est un travail énorme impliquant des analyses chimiques de plusieurs groupes de substances potentiellement toxiques et de plusieurs espèces de poissons. Les coûts et le temps sont limitants. Le modèle dans une forme plus compréhensive pourrait nous éclairer sur les formes de toxines à analyser, ce qui aurait l'effet d'améliorer l'efficacité des analyses chimiques. En plus, le modèle aiderait à la sélection des espèces susceptibles d'avoir accumulées les plus fortes concentrations en fonction de leur taille et de la période de l'année.

Lorsque le modèle sera optimisé sur les données expérimentales nous ferons des scénarios d'exposition réalistes en tenant compte de la variabilité des expositions et de la taille des poissons

que les pêcheurs récréatifs ont l'habitude de consommer. En faisant des simulations Monte-Carlo, nous aurions une meilleure idée de l'apport en microcystines provenant de la consommation de poissons pêchés en intégrant les habitudes de consommations des poissons.

Concernant la gestion des populations de poissons, le type de modèle présenté ici pourrait éventuellement intégrer des teneurs à différents maillons de l'écosystème et des données sur les concentrations associées à la toxicité (ex. : relier la dose tissulaire aux effets sur la reproduction). Ceci permettrait la prédiction théorique des concentrations maximales permises dans un écosystème et, plus spécifiquement, dans la nourriture des poissons.

ANNEXE

PROGRAM

!Modele PBPK CYANO-9 chez poisson :[ug ml h]
!Voie d absorption : Orale + Intra Peritoniale
!Modele diffusion limite (Foie Muscle Reste corps)
!Les compartiments: Foie; Muscles; Reste corps; SANG
!Le metabolisme est limite au foie.
!DOSE ORALE (Multiple)
!Conception: Labo Haddad, version janvier 2012 Xtreme

INITIAL ! Initialisation des constantes

!Parametres physiologique

CONSTANT BW=104.0 ! Poids corporel du poisson (g) (0.104kg)
CONSTANT KQCR=64.48 ! Cst debit cardiaque (ml/h/g)
QC = KQCR*BW**0.75 ! Debit cardiaque (ml/hr) equivalent ?? 2,1 L/h

! VOLUMES TOXICOLOGICAL SCIENCES 77, 206:218 (2004)

CONSTANT KVF = 0.013 ! Fraction foie
CONSTANT KVR = 0.063 ! Fraction Reste corps
CONSTANT KVMP = 0.836 ! Fraction Muscles
CONSTANT KVGI = 0.048 ! Fractio GI
CONSTANT KVB = 0.04 !Fraction sang total Duff et al., 1987).// A verifier
VF = KVF*BW !Volume foie ml
VGI = KVGI*BW !Volume GI ml
VR = KVR*BW !Volume Reste corps tissus (ml)
VMP = KVMP*BW !Volume tissus Muscles(ml)
VB = KVB*BW !Volume total du sang (ml)

! VOLUMES des espaces vasculaires Fraction Volume: 5%

CONSTANT KBVF = 0.05 ! Fraction sanguine du foie
CONSTANT KBVGI = 0.05 ! Fraction sanguine du GI
CONSTANT KBVR = 0.05 ! Fraction tissu Reste corps
CONSTANT KBVMP = 0.05 ! Fraction sanguine tissu Muscles
BVF = KBVF*VF ! Volume sanguin du foie (ml)
BVGI = KBVGI*VGI ! Volume sanguin du GI (ml)
BVR = KBVR*VR ! Volume sanguin tissu Reste corps (ml)
BVMP = KBVMP*VMP ! Volume sanguin tissu Muscles (ml)

! DEBIT TOXICOLOGICAL SCIENCES 77, 206:218 (2004)

CONSTANT KQFR = 0.029 !Fract debit sanguin au foie ((ml))*QC)
CONSTANT KQMP = 0.652 !Fract debit sanguin Muscles ((ml/hr)*QC)
CONSTANT KQGI = 0.174 !Fract debit sanguin GI ((ml/hr)*QC)
KQR = 1.000 - KQFR - KQMP - KQGI !Fract debit sang reste corps (ml/hr)*QC)
QF = KQFR*QC !Debit sanguin foie (ml/hr)
QR = KQR*QC !Debit sanguin Reste corps tissus (ml/hr)
QMP = KQMP*QC !Debit sanguin tissu Muscles (ml/hr)
QGI = KQGI*QC !Debit sanguin tissu Muscles (ml/hr)

! CONSTANTE DE DIFFUSION (ml/hr)

CONSTANT PAFC = 0.01 !Const de diffusion foie
CONSTANT PAGI = 0.01 !Const de diffusion GI

CONSTANT PARC=0.01 !Const de diffusion Reste corps
 CONSTANT PAMPC=0.01 !Const de diffusion Muscles
 PAF=PAFC*QF !Diffusion foie (ml/hr)
 PAGI=PAGIC*QGI !Diffusion GI (ml/hr)
 PAR=PARC*QR !Diffusion reste corps (ml/hr)
 PAMP=PAMPC*QMP !Diffusion Muscles (ml/hr)

!PARAMETRE PHYSICO CHIMIQUE ((hypothetique???)A determiner en laboratoire

CONSTANT PRB = 10.00 ! Sang/Tampoon
 CONSTANT KPRF =10.0 ! Foie/Tampoon partition coeff
 CONSTANT KPRGI =10.0 ! GI/Tampoon partition coeff
 CONSTANT KPRR = 10.0 ! Reste corps /Tampoon
 CONSTANT KPRMP= 10.00 ! Muscles/Tampoon
 PRF = KPRF/PRB ! Foie/sang partition coefficient
 PRR = KPRR/PRB ! Reste corps/sang
 PRMP= KPRMP/PRB ! Muscles/sang (MP)
 PRGI= KPRGI/PRB ! GI/sang (MP)

!Anatoxin-a is a low molecular weight alkaloid (MW = 165),
 ! CONSTANT PM = 165.0 ! Poids moleculaire (ug/umol)

!-----
 ! CONSTANTES D ABSORPTION ET calcul des DOSES

CONSTANT KKOR=0.225 !Cst absorption orale(h-1 g-1)
 KOR= KKOR*BW**(-0.25) ! Constante d absorption au foie (hr-1)
 CONSTANT KKIP=0.10 !Cst absorption IP (h-1 g-1)
 KIP= KKIP*BW**(-0.25) ! Constante d absorption IP au foie (hr-1)
 CONSTANT KDOSIP = 0.0 ! Dose Intra P (ug/g)
 CONSTANT BIO1 = 1.0 ! Facteur Biodisponibilite Dose Intra P
 DOSEIP = BIO1*KDOSIP*BW ! Dose Intra P (ug)
 CONSTANT KDOSOR = 0.0 ! Dose ORALE (ug/g)
 CONSTANT BIO2 = 1.0 ! Facteur Biodisponibilite Dose ORALE
 DOSEOR = BIO2*KDOSOR*BW ! Dose ORALE (ug)
 CONSTANT KCLINTR=0.0 !Clairance intereseque pour l'uptake (ug/h/g)
 CLINTR=KCLINTR*BW**0.75

! CONSTANTES DU METABOLISME AU FOIE

CONSTANT KVMAX = 0.15 ! Max metabolism (ug/h/g)
 CONSTANT KM = 0.5 ! Mich-Menten cst (ug/ml)
 VMAX = KVMAX*BW**0.75 ! Const metab au foie (ug/hr)
 CONSTANT KKF = 0! Constante metabolism de premier ordre (hr-1 g-1)
 KF= KKF*BW**(-0.30) ! Constante metabolism de premier ordre (hr-1)

!PARAMETRES SIMULATION

CONSTANT TSTOP=24.0 !nombre de heure de simulation
 CONSTANT CINT= 0.1 !Interv. sauvegarde des result (hr)
 CONSTANT JOURS= 504.0 !nombre de jour avec DOSE ORALE (hr)=21*24
 ALGORITHM IALG=2 !Methode de calcul

! Valeur initiale Dose ORALE

TOTAL = 0.0

END ! Fin de la section INITIAL

!-----
 DYNAMIC !Debut: section dynamique de la simulation

!-----Gestion des dose orales mutiples [(ug/Dose]

DISCRETE ORon !Periode d exposition orale
 INTERVAL HRS=24.0 !Intervalle pour les gavages repetitifs
 DOSEOR = BIO2*KDOSOR*BW !Calcul Dose ORALE (ug)
 TOTAL = TOTAL + DOSEOR !Dose orale dans le compartiment (ug)
 SCHEDULE ORoff .AT. T + JOURS !Executer ORoff lorsque T=debut + JOURS AT
 END ! Fin de la section DISCRETE ORon

DISCRETE ORoff ! Fin des dose multiples ORALE
 KDOSOR=0.0 ! Dose ORALE (ug/g)
 DOSEOR = BIO2*KDOSOR*BW ! Dose ORALE (ug)
 TOTAL =TOTAL + DOSEOR ! Dose orale NUL (ug)
 END ! FIN de la section DISCRETE ORoff

!-----
 DERIVATIVE !Resolution des equations differentielles

!Compartiment Sang TOTAL dans le compartiment sang
 TCVb=Qc*(CV-CVb) !Taux acc comp sang veineux (ug/hr)
 AVb=INTEG(TCVb,0) !Qtee dans comp sang veineux (ug)
 CVb= AVb/VB ! Conc libre (ug/ml)

!Solvants dans le poumon
 CA=CVb ! Conc. sang arteriel (ug/ml)

! Solvants dans le sang veineux (ug/ml)
 CV=(((QF+QGI)*CVF)+(QR*CVR)+(QMP*CVMP))/QC
 SSCV = INTEG (CV,0.0) ! Surface sous la courbe de la conc veineuse [(ug/ml)*hr]

!-----
 !Compartiment GI Tract

!-----
 !GI TRACT_LUMIERE
 TAGIL = -RSTOM ! Taux d'acc dasn le GI (µg/hr)
 AGIL = INTEG(TAGIL,0) ! Qté restant dasn la lumiere

!GI TRACT_SANG
 TAGI=QGI*(CA-CVGI)-TAGIt-RTRACT+TAGIL+RSTOM ! Taux d acc.: sang du comp. GI (ug/hr)
 AGI=INTEG(TAGI,0) ! Quantite acc.:sang du comp. GI (ug)
 CVGI=AGI/BVGI ! Conc.:sang du comp. GI (ug/ml)

!GI Tract_TISSUS
 TAGIt = PAGI*(CVGI-(CGIt/prgi)) ! Taux d acc.: tissus GI (ug/hr)
 AGIt = INTEG (TAGIt, 0.0) !Quantite acc.: tissus GI (ug)
 CGIt = AGIt/(VGI-BVGI) ! Conc. dans le tissus GI (ug/ml)
 CGI = (AGI+AGIt)/VGI ! Concentration dans le Compartiment GI

!Absorption voie INTRA PERTONIALE
 RTRACT=-KIP*TRACT
 TRACT = INTEG(RTRACT,0) + DOSEIP ! Quantite dans le foie (ug)

!-----
 ! Compartiment foie

!-----
 !Foie_sang
 TAF=(QGI*CVGI)+(QF*CA)-((QF+QGI)*CVF)-TAFt -TUPT !Taux d acc.sang_foie (ug/hr)
 AF=INTEG(TAF,0) ! Quantite acc.:sang du compartiment foie (ug)
 CVF=AF/BVF ! Conc.:sang sortant du foie (ug/ml)

!Foie_TISSUS

TAft = PAF*(CVF-(Cft/prf))+TUPT-TMET-TMET2 ! Taux d acc.: tissu hepatique (ug/hr)

Aft = INTEG (TAft, 0.0) ! Quantite acc.: tissu hepatique (ug)

Cft = Aft/(VF-BVF) ! Conc. dans le tissu hepatique (ug/ml)

! Concentration dans le COMPARTIMENT hepatique

CF = (AF+Aft)/VF

!Metabolisme saturable

TMET = VMAX*CVF/(KM+CVF) ! Taux de metabolisme saturable (ug/hr)

MET = INTEG(TMET,0.) ! Qte 1 metab (ug)

! Metabolisme de premier ordre

TMET2= Kf*CF*VF ! Taux de metabolisme premier ordre (ug/hr)

MET2 = INTEG(TMET2,0.0) ! Qte 2 metab (ug)

! Metabolisme de premier ordre

TUPT= CLINTR*CVF ! Taux de transport premier ordre (ug/hr)

UPT = INTEG(TUPT,0.0) ! Qte 2 transport?? (ug)

!Absorption voie ORALE

RSTOM=-KOR*STOM ! Taux d absorption (ug/hr)

STOM = INTEG(RSTOM,0) + TOTAL ! Quantite dans le foie (ug)

!-----

!Compartiment Reste corps

!-----

!Reste du corps_SANG

TAR=QR*(CA-CVR)-TARt ! Taux d acc.: sang du comp. tissu Reste corps (ug/hr)

AR=INTEG(TAR,0) ! Quantite acc.:sang du comp. tissu Reste corps (ug)

CVR=AR/BVR ! Conc.:sang du comp. tissu Reste corps (ug/ml)

!Reste du corps_TISSUS

TARt = PAR*(CVR-(CRT/prr)) ! Taux d acc.: tissu Reste corps (ug/hr)

ARt = INTEG (TARt, 0.0) !Quantite acc.: tissu Reste corps (ug)

CRT = ARt/(VR-BVR) ! Conc. dans le tissu Reste corps (ug/ml)

! Concentration dans le Compartiment Reste corps

CR = (AR+ARt)/VR

!-----

!Compartiment Muscles

!-----

!Muscles_SANG

TAMP=QMP*(CA-CVMP)-TAMPt ! Taux d acc. SANG dans tissu Muscles (ug/hr)

AMP=INTEG(TAMP,0) ! Quantite acc. SANG dans tissu Muscles (ug)

CVMP=AMP/BVMP ! Conc. dans SANG tissu Muscles (ug/ml)

!Muscles_TISSUS

TAMPt = PAMP*(CVMP-(CMPt/prmp)) ! Taux d acc.: tissu Muscles (ug/hr)

AMPt = INTEG (TAMPt, 0.0) !Quantite acc.: tissu Muscles (ug)

CMPt = AMPt/(VMP-BVMP) ! Conc. dans le tissu Muscles (ug/ml)

! Concentration dans le Compartiment Muscles

CMP = (AMP+AMPt)/VMP ! ug/ml

!-----

!Estimation Dose absorbe par ORALE

ORdos= INTEG(Rstom,0) !Calcul de la DOSE absorbe (ug) Voie Orale

TRdos= INTEG(RTRACT,0) !Calcul de la DOSE absorbe (ug) Voie IP

!Estimation de la DOSE totale absorbee REELLE
DOSET = (-ORdos) +(-TRdos) ! Dose T=0 jusqu a TSTOP (ug)

!-----

!BILAN de masse sur l organisme entier

ABSOR=TOTAL+(DOSEIP*BIO1) !BILAN Qtee ORA + IP dans l organisme (ug)

TISS=AR+ARt+AMP+AMPt+AF+Aft+AGI+AGIt+AVb+STOM+TRACT !Qte dans tissu (ug)

BILAN=ABSOR-TISS-MET-MET2 !Bilan sur l organisme doit etre zero

!-----

!Conditions necessaires a l arret

TERMT(T.GE.TSTOP) ! Arret de la simulation

END ! Fin de la section DERIVATIVE

END ! Fin de la section DYNAMIC

END ! Fin du programme