

UTILISATION D'UNE RÉGRESSION NON LINÉAIRE POUR COMPARER L'EFFICACITÉ D'HUILES ESSENTIELLES EN TANT QUE BIOFONGICIDES

Karin Sahmer ¹, Caroline Deweer ², Jérôme Muchembled ² & Patrice Halama ²

¹ *Groupe ISA, Equipe Sols et Environnement, Laboratoire Génie Civil et géoEnvironnement (LGCgE) Lille Nord de France (EA 4515), 48 Boulevard Vauban, 59046 Lille Cedex, France, karin.sahmer@isa-lille.fr*

² *Groupe ISA, Equipe Biotechnologie et Gestion des agents pathogènes en Agriculture (BioGAP), 48 bd Vauban, 59046 Lille Cedex, France, caroline.deweer@isa-lille.fr*

Résumé. Dans le développement de nouveaux biofongicides, les huiles essentielles sont des produits prometteurs. Nous allons comparer l'efficacité d'huiles essentielles sur un même champignon. Dans ce but, un modèle est ajusté par une régression non linéaire. Un des paramètres à estimer correspond au logarithme de la concentration d'inhibition à 50%, la CI_{50} . Cette CI_{50} peut servir comme mesure de l'efficacité des biofongicides. Une huile essentielle avec une CI_{50} plus faible est plus efficace qu'une huile essentielle avec une CI_{50} plus élevée. Un test F permet de comparer un modèle avec une même CI_{50} pour tous les biofongicides avec un modèle estimant des CI_{50} différentes selon les biofongicides et de conclure sur des différences éventuelles. Nous utiliserons cette méthodologie pour comparer deux huiles essentielles qui s'avèrent avoir des CI_{50} et donc, des efficacités, significativement différentes.

Mots-clés. Régression non linéaire, CI_{50} , huiles essentielles, biofongicides

Abstract. Essential oils are possible new biofungicides. We will compare the effect of some essential oils on the same fungus. To do this, a nonlinear regression model will be adjusted. One of the parameters of this model corresponds to the logarithm of the half maximal inhibitory concentration IC_{50} . This concentration can be used to compare the efficacy of different biofungicides. The essential oil with the lowest IC_{50} is the most efficacious essential oil. We will use a F -test in order to compare a model with the same IC_{50} for all biofungicides with a model allowing for different IC_{50} -values for different biofungicides. This will enable us to conclude about differences in efficacy of the essential oils. We will apply this methodology on data obtained for two essential oils which have significantly different IC_{50} -values and, hence, one of them is more efficacious than the other.

Keywords. Nonlinear regression, IC_{50} , essential oils, biofungicides

1 Introduction

Il y a de nombreuses maladies fongiques en agriculture. La gestion des fongicides est difficile, dû à l'apparition de souches résistantes contre les fongicides chimiques utilisés habituellement. Dans la recherche d'alternatives, les huiles essentielles jouent un rôle important en tant que biofongicides. Pour comparer l'efficacité de plusieurs huiles essentielles, la concentration d'inhibition à 50%, la CI_{50} est habituellement utilisée. Elle est estimée dans le cadre d'une régression non linéaire qui peut servir à comparer les CI_{50} de différents biofongicides. Par la suite, les essais réalisés seront décrits, avant d'aborder le modèle de régression non linéaire qui est utilisé. Ensuite, les résultats obtenus seront présentés.

2 Les essais réalisés

Pour mesurer l'efficacité d'huiles essentielles en tant que biofongicides contre un champignon donné, une souche du champignon est d'abord multipliée de manière à produire des spores. Les tests sont réalisés dans des microplaques avec une gamme de huit concentrations pour chaque huile essentielle. La suspension de spores est préparée dans un milieu de culture. Pour chaque concentration, huit puits sont inoculés avec la suspension et quatre puits ne le sont pas (témoin biofongicide). Après une incubation pendant six jours à 20°C dans l'obscurité avec agitation, la croissance est évaluée avec un lecteur de microplaque à 630 nm. La densité optique sera plus élevée si la souche s'est bien développée ; elle sera moins élevée si le biofongicide (l'huile essentielle) a eu un effet important. Pour chaque densité optique obtenue dans un puits avec spores, on soustrait la moyenne des valeurs obtenues dans les puits sans spore, avec la même concentration du biofongicide.

Pour chaque huile essentielle, une microplaque différente est préparée. Par la suite, nous allons considérer les résultats obtenus avec deux huiles essentielles, codées HE4 et HE7. Pour chaque huile, nous disposons des valeurs de densité optique pour huit concentrations différentes (y compris la concentration de 0), chaque fois avec 5 à 8 répétitions.

3 Modèle de régression non linéaire utilisé

La relation entre une concentration x et la densité optique peut être exprimée par le modèle log-logistique à quatre paramètres :

$$f(x) = bottom + \frac{top - bottom}{1 + 10^{(\log_{10}(x) - \log IC50) \cdot slope}} \quad (1)$$

ou, d'une manière équivalente :

$$f(x) = bottom + \frac{top - bottom}{1 + (x \times 10^{-\log IC50})^{slope}} \quad (2)$$

L'avantage de la deuxième écriture du modèle consiste dans l'utilisation des concentrations de 0. *bottom*, *top*, *slope* et *logIC50* sont des paramètres à estimer. Le paramètre *bottom* est la valeur vers laquelle la courbe converge pour des valeurs élevées de x (de la concentration). Il correspond à la densité optique en cas d'inhibition complète. Le fait d'avoir soustrait la moyenne obtenue dans des puits sans spores devrait résulter dans un paramètre *bottom* de 0. Cependant, ce n'est pas toujours le cas. Ce paramètre sera donc estimé. Le paramètre *top* est la valeur haute vers laquelle la courbe converge à gauche. Il correspond à la densité optique en l'absence d'inhibition, donc en l'absence de biofongicide. Il ne devrait pas dépendre de l'huile essentielle utilisée. Vu que chaque biofongicide est utilisé dans des microplaques différentes, même si c'est avec la même préparation de spores, ce paramètre peut dépendre de la microplaque et, donc, du biofongicide. Il sera donc estimé séparément pour les deux huiles essentielles, et il sera testé s'il peut être partagé entre les huiles essentielles. Le paramètre *slope* correspond à la pente de la courbe. Nous n'avons pas d'informations sur la possibilité de le partager entre les biofongicides. Il sera donc également d'abord estimé séparément pour les huiles essentielles, suivi par un test sur l'égalité de *pente* pour les différentes huiles essentielles. Le paramètre *logIC50* correspond au logarithme de base 10 de la CI_{50} , la concentration d'inhibition à 50%. C'est ce paramètre qui nous intéresse le plus pour la comparaison des huiles essentielles. Un biofongicide avec un CI_{50} moins élevé qu'un autre biofongicide est un biofongicide plus efficace. L'objectif principal de la régression non linéaire utilisée ici est la comparaison des CI_{50} des différents biofongicides.

L'estimation du modèle se fera grâce à la fonction *nls* du logiciel R (R Core team, 2013). Un modèle commun sera ajusté aux deux huiles essentielles, avec certains paramètres partagés entre les deux biofongicides et certains paramètres différents selon le biofongicide. Pour décider quels paramètres peuvent être partagés, des tests F successifs seront réalisés. Pour ce test, un modèle A plus général et un modèle B , sous-modèle du modèle A , sont ajustés. La seule différence entre A et B est un paramètre qui est partagé entre les biofongicides pour B et estimé séparément par biofongicide dans le modèle A . L'hypothèse nulle est que le sous-modèle B est vrai et qu'on peut donc partager le paramètre. L'hypothèse alternative est que le modèle plus général A doit être utilisé, qu'il n'est donc pas possible de partager le paramètre. La statistique de test est basée sur la somme des carrés des écarts résiduels (RSS), voir Ritz et Streibig (2008) :

$$F = \frac{(RSS_B - RSS_A) / (df_B - df_A)}{RSS_A / df_A} \quad (3)$$

où RSS_A et RSS_B sont les sommes des carrés résiduelles des modèles A et B respectivement et df_A et df_B correspondent aux degrés de liberté des deux modèles. Par la suite, les modèles ajustés successivement ainsi que les résultats des tests F seront présentés.

4 Résultats obtenus

Tout d'abord, un modèle est ajusté séparément aux deux huiles essentielles, sans aucun paramètre partagé :

$$f(x) = bottom[product] + \frac{top[product] - bottom[product]}{1 + (x \times 10^{-logIC50[product]})^{slope[product]}} \quad (4)$$

Le terme $[product]$ indique que le paramètre en question est estimé séparément pour les biofongicides. Pour ce premier modèle, chaque paramètre est donc estimé séparément pour les deux huiles essentielles. Ensuite, un modèle avec le paramètre $slope$ partagé entre huiles essentielles est ajusté. La p -value du test F de comparaison de ces modèles est de 0.5498. H_0 n'est donc pas rejetée, et le modèle avec partage du $slope$ entre les deux huiles essentielles est retenu. Les modèles ajustés ensuite ainsi que les résultats des tests sont résumés dans le tableau 1.

Table 1: Modèles comparés et résultats des tests

Modèle	Paramètres partagés	Paramètres par biofongicide	H_0	H_1	p-value
Modèle 1	aucun	$bottom,$ $top,$ $slope,$ $logIC50$			
Modèle 2	$slope$	$bottom,$ $top,$ $logIC50$	Modèle 2 même $slope$	Modèle 1 $slope$ différent selon le biofongicide	0.5498
Modèle 3	$slope,$ top	$bottom,$ $logIC50$	Modèle 3 même top	Modèle 2 top différent selon le biofongicide	0.0466
Modèle 4	$slope,$ $bottom$	$top,$ $logIC50$	Modèle 4 même $bottom$	Modèle 2 $bottom$ différent selon le biofongicide	0.9198
Modèle 5	$slope,$ $bottom$ $logIC50$	top	Modèle 5 même $logIC50$	Modèle 4 $logIC50$ différent selon le biofongicide	0.0010

C'est le modèle 4 qui sera finalement retenu, avec deux paramètres partagés entre les huiles essentielles (les paramètres $slope$ et $bottom$) et deux paramètres à ajuster séparément par huile essentielle, les paramètres top et $logIC50$. Plus particulièrement,

on peut constater que la comparaison des modèles 4 et 5 indique que les $logIC50$ sont bien différents entre les deux huiles essentielles. Cela veut dire qu'une des deux huiles essentielles est plus efficace que l'autre. L'équation du modèle retenu est la suivante :

$$f(x) = bottom + \frac{top[product] - bottom}{1 + (x \times 10^{-logIC50[product]})^{slope}} \quad (5)$$

Les estimations des paramètres sont affichées dans le tableau 2. Les intervalles de confiance sont les intervalles de confiance de Wald, décrit par Ritz et Streibig (2008). L'intervalle avec un niveau de confiance $1 - \alpha$ pour le paramètre β_j est défini comme suit :

$$\hat{\beta}_j \pm t_{1-\alpha/2;n-p} se(\hat{\beta}_j) \quad (6)$$

où $\hat{\beta}_j$ est l'estimateur de β_j , $t_{1-\alpha/2;n-p}$ est le quantile d'ordre $1 - \alpha$ de la loi de Student avec $n - p$ (nombre d'observations - nombre de paramètres estimés) degrés de liberté, et $se(\hat{\beta}_j)$ est une estimation de l'écart-type de $\hat{\beta}_j$. Ces intervalles de confiances sont calculés grâce à la fonction *confint2* du package *nlrwr* du logiciel R (Ritz et Streibig, 2008).

Table 2: Paramètres estimés dans le modèle final

Paramètre	Estimateur	Intervalle de confiance à 95%
<i>bottom</i>	0.0104	[0.0067;0.0141]
<i>slope</i>	2.7206	[1.8443;3.5969]
<i>top</i> pour HE4	0.1221	[0.1097;0.1345]
<i>top</i> pour HE7	0.1033	[0.0902;0.1164]
<i>logIC50</i> pour HE4	2.0080	[1.9379;2.0782]
<i>logIC50</i> pour HE7	1.7953	[1.7021;1.8885]
CI_{50} de HE4	102 mg/l	[87 mg/l ; 120 mg/l]
CI_{50} de HE7	62 mg/l	[50 mg/l ; 77 mg/l]

L'estimateur pour la CI_{50} est obtenu en prenant 10 à la puissance du $logIC50$. C'est HE7 qui est plus efficace que HE4, avec une CI_{50} de 62 mg/l pour HE7 et une CI_{50} de 102 mg/l pour HE4. Les courbes estimées pour les deux huiles essentielles sont affichées dans la figure 1. Les lignes verticales indiquent l'estimation de la CI_{50} et son intervalle de confiance.

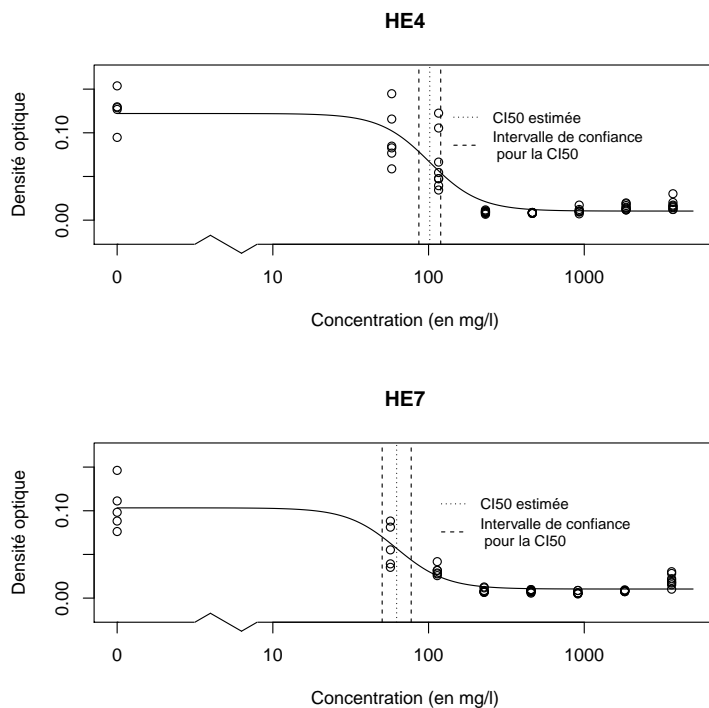


Figure 1: Courbes et intervalles de confiance à 95% pour la CI_{50} obtenus pour les deux huiles essentielles

5 Conclusion et perspectives

Une régression non linéaire peut être utilisée pour comparer des concentrations d'inhibition à 50% (CI_{50}) de différents biofongicides. Dans la présente étude, deux huiles essentielles HE4 et HE7 ont été comparées. Il s'est avéré que HE7 a une CI_{50} plus petite que HE4. HE7 est donc plus efficace contre le champignon que HE4. D'autres essais sont en cours et fourniront des données supplémentaires qu'il faudra prendre en compte dans l'analyse. Un modèle mixte avec l'expérience comme facteur aléatoire sera alors à prendre en considération.

Bibliographie

- [1] R Core Team (2013), *R: A language and environment for statistical computing*, R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <http://www.R-project.org/>.
- [2] Ritz, C. et Streibig, J. C. (2008), *Nonlinear Regression with R*, Springer, New York