HAL
open science

Nouvelle utilisation de la méthode du nombre le plus probable en virologie : application à la mise en évidence et à la quantification des virus dans le milieu hydrique

Bernard Hugues

▶ **To cite this version:**

Bernard Hugues. Nouvelle utilisation de la méthode du nombre le plus probable en virologie : application à la mise en évidence et à la quantification des virus dans le milieu hydrique. Santé. Université Paul Verlaine - Metz, 1981. Français. NNT : 1981METZ003S . tel-01775629

HAL Id: tel-01775629

https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01775629v1

Submitted on 24 Apr 2018

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITÉ DE LORRAINE

AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4
Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10
http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php
http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm

UNIVERSITE DE METZ

CENTRE DES SCIENCES DE L'ENVIRONNEMENT

THESE

présentée à l'Université de Metz

pour obtenir le grade de

DOCTEUR D'ETAT ES SCIENCES

par

Bernard HUGUES

Docteur Ingénieur

BIBLIOTHEQUE UNIVERSITAIRE
SCIENCES ET TECHNIQUES - METZ -

N° Inv.	19810065
Cote	S/Mz 81/3
Loc.	Magasin
Cat	

NOUVELLE UTILISATION DE LA METHODE DU NOMBRE LE PLUS PROBABLE EN VIROLOGIE. APPLICATION A LA MISE EN EVIDENCE ET A LA QUANTIFICATION DES VIRUS DANS LE MILIEU HYDRIQUE

Soutenue publiquement le 9 mars 1981 devant la Commission d'examen

JURY

I.M. BELT

Président

Examinateurs

BIBLIOTHEQUE UNIVERSITAIRE DE METZ

022 420192 2

[illegible]ROD

R. VILAGINES

12 AVR 1989

AVANT-PROPOS

FACULTE DE MEDECINE
BIBLIOTHEQUE

Cette étude a été réalisée au Laboratoire d'Hygiène de la ville de Nice, dirigé par le Docteur M. PLISSIER avec qui j'ai partagé plus de dix ans de recherches et qui m'a prodigué conseils et encouragements tout au long de ce travail. Qu'il me permette de lui exprimer mon respectueux dévouement.

Je remercie Monsieur le Professeur PELT qui a bien voulu me faire l'honneur de présider au jugement de cette thèse. Je lui en suis très reconnaissant. Qu'il trouve ici le témoignage de ma sincère gratitude.

J'adresse mes plus vifs remerciements aux Personnalités scientifiques qui ont accepté de siéger dans mon jury :

- Monsieur le Professeur J.C. BLOCK qui a toujours apporté une bienveillante attention à mes travaux et qui, grâce à sa compétence et son amitié, m'a guidé dans la réalisation de cette étude,
- Monsieur le Professeur FOLIGUET qui, malgré ses nombreuses occupations, m'a consacré une partie de son temps pour juger cette étude et me faire bénéficier ainsi de ses connaissances en virologie,
- Monsieur O. NASI, Maître-assistant, qui a bien voulu s'intéresser à ce travail et qui m'a fait profiter de ses remarques judicieuses,
- Monsieur le Professeur SCHWARTZBROD qui a chaleureusement accepté de faire la critique de ce travail et qui, par son aide constructive, a permis une approche plus rigoureuse de mon travail,
- Monsieur le Professeur VILAGINES qui, par sa compétence et ses recherches antérieures dans le domaine de la virologie des eaux, a orienté cette étude.

Mes remerciements vont également à Monsieur PROST H., Ingénieur-Agronome, ancien Inspecteur divisionnaire de la Répression des Fraudes et du Contrôle de la Qualité, qui m'a aidé, avec beaucoup de compétence, dans les problèmes statistiques. Il a, en particulier, défini les conditions d'application de l'indice N.P.P. aux tests statistiques.

Qu'il me soit permis d'associer à ces remerciements :

- Madame ANDRE M. pour la minutie et l'efficacité dont elle a fait preuve dans son travail de virologie,
- Monsieur PLANTAT J.L., pour la compétence et la rigueur d'esprit avec lesquelles il a établi les programmes informatiques du N.P.P.,
- Tous mes collègues et amis du Laboratoire d'Hygiène qui, dans la discussion et la critique, ont su nous conseiller dans l'élaboration de ce travail,
- Madame ICART L. qui a effectué la mise en page de cette thèse,
- Mesdames CHIARDOSSO H. et GOVERNATORI G. qui en ont réalisé la dactylographie.

Ce travail de recherches a été rendu possible, en grande partie, grâce aux très obligeantes aides matérielles de la Cellule d'Intervention contre la pollution dans les Alpes - Maritimes et du Service d'Assistance technique des stations d'épuration des Alpes - Maritimes.

à ma Femme,

à toute ma famille,

à tous mes amis,

en témoignage d'affection et de reconnaissance.

SOMMAIRE

PAGES

INTRODUCTION 1

PREMIERE PARTIE - ETUDE DE LA CONCENTRATION DES VIRUS ENTERIQUES SUR POUDRE DE VERRE, DE LEUR TITRAGE ET DE LEUR MISE EN EVIDENCE 5

CHAPITRE I - PROPOSITION D'UNE TECHNIQUE DE TITRAGE 6

1 APPLICATION DE L'INDICE N.P.P AUX TESTS DE SIGNIFICATION 8

1.1 CALCUL DE L'INDICE N.P.P. 8

1.2 LOI DE PROBABILITE DE L'INDICE N.P.P 10

1.3 ETUDE DE LA DISTRIBUTION DE L'INDICE N.P.P. ET DE SA TRANSFORMATION LOGARITHMIQUE 11

1.4 ESTIMATION DE LA DENSITE 18

1.4.1 ESTIMATION PONCTUELLE 18

1.4.2 ESTIMATION PAR INTERVALLE 20

1.5 TESTS DE SIGNIFICATION 23

1.5.1 TESTS DE COMPARAISON DE DEUX DENSITES d_1 ET d_2 23

1.5.2 ANALYSE DE VARIANCE 25

2 ETUDE DES DIFFERENTES ETAPES DE LA METHODE PROPOSEE.. 28

2.1 MATERIEL ET METHODES 28

2.1.1 CULTURES CELLULAIRES 28

2.1.2 VIRUS 28

2.1.3 PROTOCOLE VIROLOGIQUE 29

2.1.3.1 INFLUENCE DE LA TRYPSINATION 29

2.1.3.2 INFLUENCE DU NOMBRE D'INOCULUMS PAR DILUTION 31

2.1.3.2.1 COMPARAISON 3 CUPULES PAR DILUTION vs 90 CUPULES PAR DILUTION 31

2.1.3.2.2 COMPARAISON 3 FLACONS PAR DILUTION vs 96 CUPULES PAR DILUTION 31

PAGES

2.1.3.3	*INFLUENCE DU VOLUME DE L'INOCULUM PAR RAPPORT A LA SURFACE DU TAPIS CELLULAIRE*	34
2.1.3.4	*INFLUENCE DU NOMBRE DE DILUTIONS MISES EN OEUVRE*	34
2.1.3.5	*COMPARAISON DE DEUX TECHNIQUES DE TITRAGE: METHODE DU N.P.P. AVEC 96 CUPULES PAR DILUTION vs METHODE DES PLAGES*	36
2.1.4	*CALCUL DE L'INDICE N.P.P. ET TRAITEMENT STATISTIQUE DES DONNEES*	39
2.2	RESULTATS ET DISCUSSION	39
2.2.1	*INFLUENCE DE LA TRYPSINATION*	39
2.2.2	*INFLUENCE DU NOMBRE D'INOCULUMS PAR DILUTION*	42
2.2.2.1	*COMPARAISON 3 CUPULES PAR DILUTION vs 90 CUPULES PAR DILUTION*	42
2.2.2.2	*COMPARAISON 3 FLACONS PAR DILUTION vs 96 CUPULES PAR DILUTION*	53
2.2.3	*INFLUENCE DU VOLUME D'INOCULUM PAR RAPPORT A UNE MEME SURFACE DE TAPIS CELLULAIRE*	56
2.2.4	*INFLUENCE DU NOMBRE DE DILUTIONS MISES EN OEUVRE*	58
2.2.5	*COMPARAISON DE 2 TECHNIQUES DE TITRAGE: PLAGES vs N.P.P. AVEC 96 INOCULUMS PAR DILUTION*	62
CHAPITRE II -	CONCENTRATION DES ENTEROVIRUS PAR ADSORPTION-ELUTION SUR POUDRE DE VERRE	67
1	MATERIEL ET METHODES	69
1.1	APPAREILLAGE ET MISE EN OEUVRE	69
1.2	CULTURES CELLULAIRES	71
1.3	VIRUS	72
1.4	EAUX DE TRAVAIL	72
1.5	LIQUIDE D'ELUTION	73
1.6	DECONTAMINATION DES CONCENTRATS	73
1.7	INOCULATION AU SYSTEME CELLULAIRE	75
2	PROTOCOLE EXPERIMENTAL	75
2.1	EXPERIMENTATION A	75
2.2	EXPERIMENTATION B	76

PAGES

2.3 EXPERIMENTATION C 77

3 RESULTATS ET DISCUSSION 77

3.1 INFLUENCE DU PH DE L'ELUANT DANS LA RECUPERATION DES PARTICULES VIRALES ET LE RENDEMENT DE LA METHODE 77

3.2 INFLUENCE DE L'EXTRAIT DE BOEUF 82

3.3 COMPARAISON DES TITRES VIRAUX OBTENUS APRES ELUTION AVEC LE TAMPON BORATE ADDITIONNE DE 3 % D'EXTRAIT DE BOEUF ET LE TAMPON GLYCINE 82

CHAPITRE III- MISE EN EVIDENCE DES VIRUS DANS LE MILIEU HYDRIQUE: INTERET DE L'IMMUNO-MICROSCOPIE ELECTRONIQUE 88

1 MATERIEL ET METHODES 89

2 RESULTATS 91

3 DISCUSSION 100

DEUXIEME PARTIE - APPLICATION DES METHODES DE CONCENTRATION ET DE TITRAGE A LA RECHERCHE DES VIRUS DANS LE MILIEU HYDRIQUE 103

CHAPITRE I - INFLUENCE DES VOLUMES D'ECHANTILLON SUR LA MISE EN EVIDENCE ET LA QUANTIFICATION DES VIRUS DANS LE MILIEU HYDRIQUE 104

1 ESSAIS SUR DES EFFLUENTS DE STATION D'EPURATION (COMPARAISON 10 L et 100 L) 105

1.1 MATERIEL ET METHODES 105

1.2 PROTOCOLE EXPERIMENTAL 107

1.2.1 EXPERIMENTATION 1 107

1.2.2 EXPERIMENTATION 2 107

1.3 RESULTATS 109

1.4 DISCUSSION 113

2 ESSAIS SUR LES EAUX DE MER (COMPARAISON 10 L et 20 L) 114

2.1 MATERIEL ET METHODES 114

PAGES

2.2 RESULTATS 116
2.3 DISCUSSION 123
3 ESSAIS SUR DES EAUX DE PISCINE (COMPARAISON 20 L et 60 L) 125
3.1 MATERIEL ET METHODES 125
3.2 RESULTATS 128
3.3 DISCUSSION 134

CHAPITRE II - REPRESENTATIVITE DE L'ECHANTILLON 138

1 MATERIEL ET METHODES 139
1.1 EAUX DE TRAVAIL 139
1.2 COLLECTE DES ECHANTILLONS 140
1.3 ANALYSES BACTERIOLOGIQUES 144
1.4 ANALYSES VIROLOGIQUES 144
1.5 ANALYSES STATISTIQUES 144
1.6 MESURE DES DEBITS 145
1.7 MESURE DES FLUX ET DES RENDEMENTS 145
2 RESULTATS 146
2.1 STATION D'EPURATION DE CAGNES-SUR-MER 146
2.2 STATION D'EPURATION DE CANNES 155
3 DISCUSSION 168

CONCLUSION 173

BIBLIOGRAPHIE 177

ANNEXE 197

□ ■ □ ■ □ ■ □

INTRODUCTION

Les eaux usées draînent les déchets des activités humaines aussi bien domestiques qu'industrielles. Chargées massivement et constamment de virus entériques (BLOCK et coll.,1979; BLOOM et coll.,1959; CHIN et coll.,1967; GRABOW,1968; GRINSTEIN et coll.,1970; KELLY et SANDERSON,1960; LAMB et coll.,1964; LELOUP et coll.,1979; MELNICK et coll.,1954) leur rejet dans les rivières ou l'eau de mer apporte à celles-ci une pollution virale très importante (EDMOND et coll., 1978; FLORA et coll.,1975; GOYAL et coll.,1978; HUGUES et coll.,1979 a; KATZENELSON, 1977; RUITER ET FUJIOKA, 1978; SCHWARTZBROD et coll.,1979 b). La relative inefficacité des traitements physico-chimiques ou biologiques des stations d'épuration sur le plan microbiologique (HUGUES et coll.,1979 b; MALHERBE et STRICKLAND-CHOLMEY,1967; RAO et coll.,1977; SCHWARTZBROD et coll.,1979 a) aggrave le problème des rejets dans le milieu récepteur. Le déversement en mer des effluents présente, pour le milieu marin et pour l'Homme, un certain danger puisque les particules virales, qui y sont présentes, survivent pendant plusieurs semaines, voire plusieurs mois (PLISSIER et THERRE, 1961; PLISSIER et HUGUES,1978). Ces risques sont d'autant plus grands que les phénomènes de dilution et de diffusion des effluents le long de la zone côtière sont plus ou moins rapides et que la stagnation des eaux est plus importante. La pollution virale de l'eau de mer sur la bande littorale peut entraîner la transmission d'un certain nombre d'affections nuisibles à la santé de l'individu. Ainsi, les baignades en zones polluées peuvent être à l'origine d'épidémies et de maladies infectieuses (BRISOU,1978; BRYAN et coll.,1974; CABELLI,1978; HAWLEY et coll.,1973), mais il convient de souligner que la signification exacte de la pollution virale de l'eau, sur le plan épidémiologique, n'est pas encore bien connue (FREYMUTH et coll.,1979; KLING,1928).

Par contre, il est certain que la consommation de produits marins crus,en contact avec l'eau de mer polluée par des eaux usées,peut provoquer des épidémies. Des observations précises ont pu être faites sur quelques cas d'hépatites infectieuses (BRISOU,1968; COURTOIS et LAFONTAINE,1962;DENIS,1974; DOUGHERTY et ALTMAN,1962; KRUGMANN et coll.,1959). Dans le cas particulier de l'épidémie de New-Delhi en 1955 (DENIS,1973), il a pu être démontré que l'eau de boisson contaminée accidentellement avec des eaux usées a été à l'origine d'une épidémie d'hépatite virale touchant 30 000 personnes.

Les besoins en eau augmentant constamment, les réserves dans lesquelles l'Homme puise deviennent insuffisantes. Il s'avère alors utile,

dans certaines circonstances, de recycler les eaux usées. L'emploi de telles eaux dans l'industrie et dans l'agriculture est accompagné d'un grand risque de pollution (FUJIOKA et LOH,1978).

La désinfection des effluents peut être justifiée lorsqu'il est impératif d'empêcher le cycle "absorption-excrétion" des virus de se refermer. Devant le coût élevé d'une épuration les solutions proposées seront fonction des risques acceptés. En règle générale, le traitement donnant une eau la moins polluée sera choisi. Pour ce faire, il faut disposer de moyens de contrôle simples et rapides. Ceci implique des recherches technologiques de détection et de mesure quantitative des virus dans les eaux naturelles, d'autant plus que les bactéries de contamination fécale, considérées traditionnellement comme de bons indicateurs de pollution, sont maintenant reconnues insuffisantes pour indiquer la présence des virus dans les eaux usées (GERBA et coll.,1979; MARZOUK et coll.,1980) Aussi, est-il nécessaire de rechercher des méthodes efficaces et sensibles pour détecter le plus petit nombre possible de virus présents dans les échantillons contrôlés. Ayant adopté la méthode de concentration des virus sur poudre de verre, dans une première partie nous nous sommes consacrés à la mise au point qualitative et quantitative de l'analyse virologique des eaux. Cette première partie se subdivise en trois chapitres.

Dans le premier chapitre, les conditions d'application techniques et statistiques de la méthode de titrage des virus que nous proposons sont exposées.

Dans le deuxième chapitre, les modifications apportées à l'appareillage sont décrites et les résultats de l'étude concernant l'influence du pH d'élution dans l'étape de l'élution sont présentés .

Dans le troisième chapitre, il est établi un bilan qualitatif des virus isolés dans le milieu hydrique à partir de deux méthodes d'identification des virus : l'une, classique, par séro-neutralisation; l'autre, nouvelle, par immuno-microscopie électronique, appliquée, dans nos conditions expérimentales, uniquement à la mise en évidence des Adénovirus.

La deuxième partie concerne l'application des méthodes de concentration et de titrage à la recherche des virus dans le milieu hydrique. Cette deuxième partie comprend deux chapitres.

Le premier chapitre est consacré à l'étude de l'influence des volumes d'échantillon sur la mise en évidence et la quantification des virus dans les eaux usées épurées, les eaux de mer et les eaux de piscine.

Dans le deuxième chapitre est exposée l'influence du mode de prélèvement sur la détermination des taux d'élimination des bactéries et des virus de deux stations d'épuration de traitements différents (biologique et physico-chimique).

Les conclusions de cette étude sont alors dégagées.

PREMIERE PARTIE

ETUDE DE LA CONCENTRATION DES VIRUS ENTERIQUES SUR POUDRE DE VERRE, DE LEUR TITRAGE ET DE LEUR MISE EN EVIDENCE

CHAPITRE I

PROPOSITION D'UNE TECHNIQUE DE TITRAGE

L'objet du titrage virologique est de fournir le moyen de mesurer le pouvoir infectieux de la suspension virale et d'en fixer le niveau par rapport à une échelle déterminée. Trois types de méthodes sont couramment utilisés : la méthode des plages, la détermination du titre $D.I._{50}$ et la méthode du nombre le plus probable. La première est considérée comme étant la plus précise car, en théorie, d'après les travaux de DULBECO et VOGT (1954), une seule particule virale est capable de former une plage. Dans la réalité, un agrégat de virus a la capacité de produire une seule plage. Le titre viral est alors entaché d'une erreur d'autant plus grande qu'il y a un plus grand nombre d'agrégats de virus et que leur taille est importante. De ce fait, il faut avoir une bonne connaissance des facteurs qui peuvent augmenter ou diminuer l'agrégation des virus. Ainsi HAMBLET et coll. (1967) démontrent que le nombre de plages est augmenté d'un coefficient 5 quand la suspension virale de virus poliomyélitique type I est diluée dans un bouillon nutritif au lieu d'une solution de Hanks. Outre ces restrictions, il faut préciser, d'une part, que certains virus ne produisent pas de plages ou présentent un faible potentiel à former les plages, d'autre part, que toutes les lyses cellulaires observées ne correspondent pas à une particule virale et que lors du repiquage des plages il y a une variation dans l'estimation du nombre qui, selon les échantillons, passe de 40% (LEON et coll.,1978) à 73% (BERTUCCI et coll.,1978).
De toutes ces considérations, il ressort que la méthode des plages n'est pas aussi précise que le voudrait la théorie car la limite de confiance que l'on peut accorder à cette méthode se situe entre 10% et 50% du titre trouvé pour un seuil de sécurité de 95% (COWELL et MORISETTI,1969; GUILLOT,1961; HILL et coll.,1971). La deuxième méthode qui établit la $D.I._{50}$ par le calcul statistique (REED et MUENCH, 1938) ne donne qu'une valeur moyenne du titre de la suspension. Cette valeur a une faible précision, de l'ordre de ± 0,3 log.
La troisième méthode, connue sous le nom de "Most Probable Number" (MAC GRADY,1918) est utilisée comme le préconisent CHANG et coll.,(1958 a) pour l'évaluation des populations virales en milieu liquide. Cette technique, comme la précédente, est facile à pratiquer car elle nécessite moins de cellules, moins de milieu et moins de travail que la méthode des plages. Cependant, quand un faible nombre de tubes est utilisé, cette méthode présente deux inconvénients majeurs : d'une part, imprécision des résultats, d'autre part, impossibilité d'exploiter statistiquement les résultats et, de ce fait, impossibilité d'effectuer des comparaisons.

Pour pallier ces inconvénients, nous proposons une micro-méthode de titrage utilisant 96 inoculums par dilution et nous démontrons que, dans certaines conditions, les tests de signification peuvent y être appliqués. Dans ce cas, la méthode du Nombre le Plus Probable (N.P.P.) avec 96 inoculums par dilution donne une numération de virus plus précise que celle donnée par la méthode des plages.

I - 1 APPLICATION DE L'INDICE N.P.P. AUX TESTS DE SIGNIFICATION.

L'ensemble des travaux relatifs à l'indice N.P.P. est exclusivement consacré aux problèmes d'estimation (CHANG et coll.,1958 a ; COCHRAN,1950; DE MAN,1975; MEYNELL,1957; PARNOW,1972; WYSHAK et DETRE,1972)

Bien que la précision du N.P.P. augmente avec le nombre d'inoculums par dilution (COCHRAN,1950; GLEDEL et ADROIT,1979) la plupart des auteurs ont publié des tables concernant l'emploi de 2, 3, 5, 8 et 10 inoculums par dilution (HALVORSON et ZIEGLER,1933; HOSKINS,1934; MAC GRADY,1918; DE MAN,1977; NORMAN et KAMPE,1960; OBLINGER et KOBURGER,1975; PROST,1970 et 1974). Rarement, ils se sont penchés sur le problème de l'utilisation de plus de 10 inoculums par dilution. A notre connaissance, tous les travaux effectués sur le N.P.P. depuis 1918 (MAC GRADY) à nos jours (DE MAN,1977) se sont toujours limités au calcul des intervalles de confiance. Aucun auteur n'a abordé le problème fondamental des conditions d'application des tests statistiques de signification. Le N.P.P., en tant que variable aléatoire dont la loi de probabilité peut être déterminée, se prête cependant à un certain nombre de tests de signification qui peuvent être utiles dans le domaine du contrôle et de la recherche en virologie.

Le but de ce travail est de :

- déterminer l'indice N.P.P. et son intervalle de confiance correspondant dans le cas de 96 inoculums par dilution;
- démontrer dans quelles conditions les tests de signification peuvent être pratiqués.

I - 1-1 Calcul de l'indice N.P.P.

Pour l'établissement de l'indice N.P.P., nous rappelons quelques notions :

★ Si K est le nombre de séries homogènes de cupules utilisées pour obtenir une réaction positive ou négative,

. si q_i est le volume d'inoculum ensemencé dans chacune des n_i cupules de la série de rang i,

. si p_i est le nombre de cupules de la série i qui fournissent une réponse positive [présence d'un effet cytopathogène (E.C.P.)] et qu'on appelle communément "cupules positives",

le "nombre caractéristique" (N.C.) est formé en juxtaposant les K rapports $\frac{p_i}{n_i}$ dans l'ordre de classement des séries de cupules correspondantes.

★ Si d est la densité microbienne rapportée à l'unité qui sert à mesurer les volumes q_i, la probabilité P d'observer le nombre caractéristique $\frac{p_1}{n_1};..\frac{p_i}{n_i};..\frac{p_k}{n_k}$ est égale à :

$$(1) \qquad \boxed{P = f(d) = \prod_{i=1}^{i=k} C_{n_i}^{p_i} \left(1 - e^{-q_i d}\right)^{p_i} e^{-(n_i - p_i) q_i d}}$$

Cette probabilité est maximale pour une valeur de d qui n'est autre que l'indice N.P.P. et qu'on détermine en annulant la dérivée par rapport à d du logarithme népérien de P (MATHER, 1965; PARNOW, 1972; WYSHAK et DETRE, 1972).
L'équation à résoudre devient alors :

$$(2) \qquad \boxed{\sum_{i=1}^{i=k} \frac{p_i q_i e^{-q_i d}}{1 - e^{-q_i d}} = \sum_{i=1}^{i=k} (n_i - p_i)\, q_i}$$

Pour résoudre cette équation, dans le cas où K = 3; $q_1 = 1$, $q_2 = 0{,}1$; $q_3 = 0{,}01$; $n_1 = n_2 = n_3 = 96$; N.C. = $\frac{96}{96}; \frac{74}{96}; \frac{12}{96}$, ces valeurs sont remplacées dans l'équation (2), soit :

$$\frac{96\, e^{-d}}{1 - e^{-d}} + \frac{7{,}4\, e^{-0{,}1\, d}}{1 - e^{-0{,}1\, d}} + \frac{0{,}12\, e^{-0{,}01\, d}}{1 - e^{-0{,}01\, d}} = 3{,}04$$

d'où d = 14,49.

Quand toutes les cupules donnent une réponse négative, la probabilité est maximale et égale à 1 pour d = 0. Quand toutes les cupules sont positives, cette probabilité est maximale et vaut 1 pour d = + ∞. Dans ces deux cas particuliers, les indices N.P.P. sont donc respectivement 0 et + ∞.

I - 1-2 Loi de probabilité de l'indice N.P.P.

A chacun des $(n_1 + 1)\ (n_2 + 1) \ldots\ldots (n_i + 1) \ldots\ldots (n_k + 1) = M$ nombres caractéristiques que peut fournir l'expérience, correspondent :

- d'une part, une certaine valeur x de l'indice N.P.P.,
- d'autre part, une probabilité P_x qui est bien définie quand d est fixée et qui se trouve ainsi associée au nombre x.

La probabilité P_x se calcule à l'aide de la formule (1) dans laquelle d, qui n'est plus une inconnue, est remplacée par la valeur fixée à priori pour la densité. Pour $x = 0$ et $x = +\infty$, les probabilités correspondantes sont P_0 et P_∞ . Ainsi, par exemple :

- pour $k = 3$; $q_1 = 1$; $q_2 = 0{,}1$; $q_3 = 0{,}01$; $n_1 = n_2 = n_3 = 40$; N.C. = 18; 3; 0, x est égal à 0,612 et pour $d = 1$, $P_x = 0{,}001159$.
- pour $k = 3$; $q_1 = 1$; $q_2 = 0{,}1$; $q_3 = 0{,}01$; $n_1 = n_2 = n_3 = 20$; N.C. = 0; 0; 0, x est égal à 0 et pour $d = 0{,}2$, $P_x = P_0 = 0{,}0117959$.
- pour $k = 3$; $q_1 = 1$; $q_2 = 0{,}1$; $q_3 = 0{,}01$; $n_1 = n_2 = n_3 = 10$; N.C. = 10; 10;10, x est égal à $+\infty$ et pour $d = 165$, $P_x = P_\infty = 0{,}1185346$.

Il en résulte que l'indice N.P.P. doit être considéré comme une variable aléatoire X suivant une loi de probabilité,certes plus ou moins discontinue,mais dont la fonction de répartition $F(x) = \text{Prob}\ (X \leqslant x)$ peut être déterminée pour n'importe quelle valeur de la densité d. Mis à part le cas où la valeur donnée à d rend notable la probabilité P_∞, la distribution de X possède une moyenne et une variance bien finies. Pour déterminer ces paramètres, les procédés habituels sont utilisés. Il est cependant exclu de calculer toutes les probabilités associées aux M-1 valeurs finies que comporte la distribution. Ainsi, pour $K = 3$ et $n_1 = n_2 = n_3 = 100$, M dépasse le million ! Il n'est donc retenu que les probabilités ayant une certaine signification, excédant par exemple 0,00001 , et encore, souvent le calcul est arrêté lorsque la probabilité totale P_T atteint 0,99. Il faut alors prendre soin de diviser par P_T les résultats obtenus pour les moments non centrés d'ordre 1 et 2 sinon les erreurs commises risquent d'être relativement importantes.

Tout ce que nous venons de dire reste valable si sur la variable X une transformation logarithmique est effectuée.

I - 1-3 Etude de la distribution de l'indice N.P.P. et de sa transformation logarithmique.

Dans le cas où $k = 3$; $q_1 = 1$; $q_2 = 0,1$; $q_3 = 0,01$; $n_1 = n_2 = n_3 = 96$, la loi de probabilité du nombre aléatoire X rapporté à q_1 a été étudiée d'une façon approfondie pour différentes valeurs de d (0,01; 0,03; 0,06; 0,08; 0,105; 0,145; 1,45; 14,49; 145; 180; 220; 240; 260). Cette étude a porté en même temps sur la loi du logarithme de X car, dès le premier abord, la fonction de répartition de X est apparue positivement dissymétrique.

L'ensemble des résultats obtenus à partir des données portées en Annexe A_1 est consigné :

- soit sous forme de tableau récapitulatif (Tableau 1 porté en Annexe A_2)
- soit sous forme de graphiques (Figures 1 à 24 portées en Annexe A_3) permettant de comparer les distributions à étudier aux distributions normales homologues, c'est-à-dire ayant les mêmes paramètres.

★ Les graphiques susvisés comportent chacun, d'une part, une courbe en trait continu tracée à l'aide des probabilités cumulées du N.P.P. ou de son logarithme, probabilités qui sont converties en valeurs de variable normale réduite (variable u) et d'autre part une droite en trait discontinu (droite de Henry) représentant la distribution normale qui a la même moyenne et le même écart-type que la distribution à examiner (DAGNELIE, 1969 et 1970). La similitude entre les deux distributions est essentiellement appréciée à l'aide des graphiques de Henry, mais à notre connaissance, il n'est pas possible de la chiffrer. Dans cette appréciation, il faut surtout considérer l'allure générale du trait continu. Par ailleurs, pour servir d'éléments de comparaison, le graphique présenté par la Figure 24 se rapportant à la distribution d'une variable de Poisson, de paramètre 18, qui peut être assimilée à une loi normale est utilisée (Annexe A_3).

★ A partir des résultats présentés dans le Tableau 1 (Annexe A_2), si Y et Z désignent respectivement le logarithme décimal et le logarithme népérien de X, différentes conclusions peuvent être tirées :

☆☆La loi de X tend vers une loi normale quand n augmente mais la similitude entre ces deux lois n'est forte qu'à partir de $n = 100$ et seulement pour des valeurs de d voisines de 15. Lorsque d s'écarte de ces valeurs, dans un sens ou dans l'autre, le coefficient de dissymétrie qui, comme nous l'avons déjà indiqué, est positif, s'accroît progressivement et rapidement pour devenir considérable, proche des zones critiques où les probabilités P_0 et P_∞ sont notables et où, d'ailleurs,

le caractère discontinu de la distribution s'accentue. La transformation logarithmique de X apporte à cet égard une nette amélioration car, lorsque d croît à partir de ses plus faibles valeurs, le coefficient de dissymétrie de la loi de Y (ou de Z) qui est d'abord négatif, change ensuite de signe tout en restant proche de zéro dans un large intervalle. Déjà avec n = 20, l'approximation normale est assez bonne, mais il faut que n dépasse 40 pour qu'elle devienne acceptable avec, du moins, des valeurs de d n'appartenant pas aux deux zones critiques susvisées.

☆☆La moyenne m_x de la loi de X progresse avec la densité d mais plus rapidement que cette dernière. L'écart relatif $E_x = \frac{m_x - d}{d}$ est nul pour une valeur d_x de d qui varie peu avec n et qui est de l'ordre de 0,15. Il en va sensiblement de même pour le nombre d' qui a pour logarithme la moyenne m_y de Y, mais sa progression est plus lente que celle de m_x et, en outre, l'écart relatif $E_y = \frac{d' - d}{d}$ s'annule pour une valeur d_y de d nettement supérieure à d_x. De toute façon, comme le montre le Tableau 2, dans la plupart des cas, $[E_y]$ est inférieur à $[E_x]$.

TABLEAU 2

Influence de d

n	d	m_x	E_x	$d' = 10^{m_y}$	E_y
96	0,145	0,1445	- 0,3 %	0,139	- 4,00 %
96	14,490	14,6000	+ 0,8 %	14,481	- 0,06 %
96	180,000	182,9000	+ 1,6 %	181,300	+ 0,60 %

D'autre part, ces valeurs absolues de E_x et E_y diminuent considérablement, comme le montre le Tableau 3, quand n augmente.

TABLEAU 3

Influence de n

d	n	m_x	E_x
15	3	21,20	+ 41,00 %
15	5	19,76	+ 32,00 %
15	10	16,48	+ 9,80 %
15	20	15,89	+ 6,00 %
14,49 (≃ 15)	96	14,60	+ 0,80 %

A la lecture de ces résultats, des valeurs plus élevées sont observées quand un petit nombre de cupules est utilisé.

Les remarques ci-dessus s'appliquent à la moyenne m_z de Z car le passage de Y à Z est un simple changement d'échelle (Z = 2,3025).

☆☆ L'écart-type σ_y de Y et l'écart-type σ_z de Z présentent la particularité de peu varier lorsque la densité d reste comprise entre deux limites d'_σ et d''_σ qui seront définies ci-dessous. Quand d décroît, à partir de la limite inférieure d'_σ, ces écarts-types augmentent rapidement. Ils le font également, mais dans une moindre mesure, quand d croît à partir de la limite supérieure d''_σ.

■ La valeur pratiquement constante que prend σ_y pour $d'_\sigma < d < d''_\sigma$ est inversement proportionnelle à $\sqrt{n}$. Lorsque n est de l'ordre de 5, une formule simple a été indiquée par WOODWARD (1957) pour calculer ladite valeur. Cette formule est la suivante :

$$\sigma_y = \frac{0,55}{\sqrt{n}} \qquad (3)$$

Si n est supérieur à 5, il semble qu'il faille légèrement modifier le coefficient 0,55 et il a été vérifié, comme le montre le Tableau 4, que 0,51 s'adapte généralement mieux aux cas où n = 10, n = 20, n = 40 et n = 96, la formule (3) ci-dessus devenant alors :

$$\sigma_y = \frac{0,51}{\sqrt{n}} \qquad (4)$$

TABLEAU 4

Comparaison des formules (3) et (4)

n	d	$\frac{0,51}{\sqrt{n}}$	$\frac{0,55}{\sqrt{n}}$	Valeur exacte de σ_y
10	2,00	0,161	0,174	0,161
10	5,00	0,161	0,174	0,161
10	20,00	0,161	0,174	0,163
20	15,00	0,114	0,123	0,117
40	1,00	0,081	0,087	0,082
40	10,00	0,081	0,087	0,081
40	150,00	0,081	0,087	0,088
96	14,49	0,052	0,056	0,040
96	145,00	0,052	0,056	0,051

■ Quant à l'écart-type σ_z il peut être déterminé en assimilant d à la valeur x observée pour le N.P.P. et en se servant de la formule (5) donnée par HALDANE (1939). Elle a été établie en se fondant sur la théorie du maximum de vraisemblance (MATHER, 1965) :

$$\sigma_z = \frac{1}{x}\left[\sum_{i=1}^{i=k} \frac{p_i q_i^2 e^{-q_i x}}{(1 - e^{-q_i x})^2}\right]^{-1/2} \qquad (5)$$

Cette formule a deux avantages :

• elle est applicable même quand la lecture d'une ou de plusieurs cupules, sur les 96 inoculées, est impossible ou que son résultat est douteux;

• elle tient compte, en faisant intervenir la valeur trouvée pour X, des légères variations de σ_z dans l'intervalle $d'_\sigma < d < d''_\sigma$.

Dans son application, comme le montre le Tableau 5, la formule (5) comparée à la formule (4) donne une meilleure approximation de σ_z.

TABLEAU 5

Comparaison des différentes valeurs de σ_z

n	d ★	N.C.	X correspondant	σ_z ★★	σ_y ★★★	Valeur exacte de σ_z
40	0,250	9; 1; 0	0,252	0,315	0,200	0,336
90	0,145	13; 1; 0	0,140	0,267	0,120	0,258

★ : valeurs inférieures à d'_σ

★★ : valeur obtenue avec la formule (5)

★★★ : valeur obtenue avec la formule (4) et multipliée par Log 10

☆☆ A partir des considérations que nous venons d'exposer, nous sommes amenés à définir deux intervalles I_1 et I_2 qui jouent un rôle primordial dans les applications statistiques de l'indice N.P.P.

• l'intervalle I_1 groupe toutes les valeurs y autres que celles qui ont une forte probabilité d'appartenir aux distributions s'écartant par trop d'une distribution normale.

Si d'_1 et d''_1 sont les valeurs de d à partir desquelles la loi de Y cesse d'être approximativement normale, les limites y'_1 et y''_1 de l'intervalle I_1 sont respectivement la borne d'intervalle d'acceptation de l'hypothèse $d \leqslant d'_1$ et la borne de l'intervalle d'acceptation de l'hypothèse $d \geqslant d''_1$. Autrement dit, les nombres y'_1 et y''_1 sont donnés par les relations ci-après dans laquelle α désigne un faible risque qui peut être égal à 1% par exemple :

$$\text{Prob } (Y > y'_1) = \alpha \quad \text{pour } d = d'_1$$
$$\text{Prob } (Y < y''_1) = \alpha \quad \text{pour } d = d''_1$$

• l'intervalle I_2 comprend toutes les valeurs y autres que celles ayant une forte probabilité d'appartenir aux distributions dont l'écart-type dépend de la densité d.

En utilisant les notations précédentes et en raisonnant comme ci-dessus, les limites y'_2 et y''_2 de l'intervalle I_2 sont déterminées à l'aide des relations :

$$\text{Prob } (Y > y'_2) = \alpha \quad \text{pour } d = d'_\sigma$$
$$\text{Prob } (Y < y''_2) = \alpha \quad \text{pour } d = d''_\sigma$$

et de la Figure 25 portée en Annexe A_4.

Etant donné que les indices N.P.P. obtenus sont voisins quand ils sont calculés à partir de nombres caractéristiques pour lesquels le nombre total de cupules positives est le même et compte tenu de ce que les limites des intervalles I_1 et I_2 n'ont rien d'absolu, car les évolutions dont il s'agit sont progressives, il est possible et commode pour le praticien d'exprimer lesdites limites en pourcentage de cupules donnant des réactions positives. Le détail des calculs qu'il a fallu faire est porté en Annexe A_2. Nous mentionnerons seulement, dans le Tableau 6 les chiffres qui nous paraissent devoir être retenus pour les différentes limites susvisées et leurs correspondances en pourcentage de cupules positives (pourcentages inscrits dans les colonnes "%+"). Remarquons que les bornes supérieures des intervalles I_1 et I_2 sont identiques.

Quand l'exécution d'un test nécessite que les variables étudiées prennent des valeurs comprises dans l'un ou l'autre des intervalles I_1 et I_2 et que les résultats des titrages faits ne correspondent pas à cette exigence, comme le montre le Tableau 7, il est obligatoire de recommencer les expériences avec d'autres taux de dilutions, car il n'y a pas de solution de rechange.

TABLEAU 6

Définition des intervalles I_1 et I_2

Nombre de cupules	Intervalle I_1						Intervalle I_2					
	limite inférieure			limite supérieure			limite inférieure			limite supérieure		
	d'_1	y'_1	% +	d''_1	y''_1	% +	d'_σ	y'_2	% +	d''_σ	y''_2	% +
80 > n > 40	0,275	-0,2296	17%	150	1,964	85%	0,8	0,1047	27%	150	1,964	85%
n > 80	0,105	-0,6530	7%	220	2,200	90%	0,4	-0,2600	16%	220	2,200	90%

% + : pourcentage de cupules "positives"

TABLEAU 7

Condition d'application du N.P.P. avec $n > 80$

n	96	96	96
N.C.	11; 0; 0	96; 68; 12	96; 96; 69
N.P.P.	0,108	12,48	126,85
P = % +	3,80	61,00	91,00
I_2	$P < I_{2_i}$	$I_{2_i} < P < I_{2_s}$	$P > I_{2_s}$
Conclusions	Expérience à recommencer	Expérience acceptée	Expérience à recommencer

I_{2_i} : limite inférieure de I_2

I_{2_s} : limite supérieure de I_2

% + : pourcentage de cupules "positives"

N.P.P. : nombre le plus probable

n : nombre total de cupules inoculées

N.C. : nombre caractéristique

I - 1-4 Estimation de la densité.

I - 1-4-1 Estimation ponctuelle.

★ Le processus par lequel est obtenu l'indice N.P.P. (variable X), processus qui n'est autre que la méthode du maximum de vraisemblance, fait de cet indice un estimateur de la densité d. Cet estimateur est convergent par rapport au n_i, mais il n'est pas sans biais car son espérance mathématique est m_x qui diffère pratiquement toujours de d.

★ Il se peut que,pour estimer d, plusieurs valeurs de X constituant un échantillon bernoullien soient disponibles. En matière de N.P.P. un échantillon est bernoullien s'il remplit les quatre conditions suivantes :

- les effectifs n_i sont égaux dans les séries homologues,
- il en est de même pour les nombres q_i,
- les mesures portent sur un même milieu statistiquement homogène,
- ces mesures sont indépendantes les unes par rapport aux autres.

Dans le cas de l'utilisation d'un échantillon de r valeurs pour X et que cet échantillon peut être considéré comme répondant aux conditions ci-dessus, sa moyenne $\bar{x}$ est aussi un estimateur de d.Cependant, pour une valeur donnée des n_i, cet estimateur n'est ni convergent par rapport à r, ni dépourvu de biais. En effet $\bar{x}$ a, comme X, pour espérance mathématique le nombre m_x et, aussi grand que soit r, le biais E_x persiste égal à lui-même.

La fonction inverse d' de la moyenne arithmétique ($\bar{y}$ par exemple) des logarithmes des r valeurs observées pour X constitue un meilleur estimateur de d puisque nous avons vu, qu'en général, nous avons $[E_y] < [E_x]$.

Il existe toutefois un procédé pratique pour avoir un estimateur encore plus précis de la densité d à partir des r nombres caractéristiques élémentaires fournis par l'expérience. Ce procédé consiste tout d'abord à former le nombre caractéristique somme en additionnant les nombres p_i et n_i des r séries homologues et ensuite à calculer l'indice N.P.P. correspondant au nombre caractéristique ainsi obtenu.

Certes, plusieurs listes différentes de N.C. individuels peuvent donner un même N.C. somme, mais l'analyse combinatoire montre que la probabilité totale d'aboutir à ce dernier est égale à la probabilité attachée au N.C. individuel qui lui est identique. L'indice N.P.P. correspondant à ces deux N.C.égaux suit donc la même loi dans les deux cas et du fait que les effec-

tifs de cupules ont considérablement augmenté par rapport à ceux des N.C. élémentaires, l'espérance mathématique dudit indice est plus voisine de la vraie valeur de la densité d que l'espérance mathématique de la moyenne empirique $\bar{x}$ et même que celle de la fonction inverse d' de la moyenne $\bar{y}$.

Ainsi, dans le cas où $k = 3$; $q_1 = 1$; $q_2 = 0,1$; $q_3 = 0,01$; $n_1 = n_2 = n_3 = 10$; $r = 9$, pour $d = 15$, les résultats obtenus sont consignés dans le Tableau 8 .

TABLEAU 8

Nombre caractéristique somme

N.C.	x	y
10/10 ; 8/10 ; 1/10	15,046	1,17742
10/10 ; 5/10 ; 2/10	8,725	0,94076
10/10 ; 8/10 ; 2/10	17,238	1,23649
10/10 ; 7/10 ; 1/10	11,808	1,07218
10/10 ; 8/10 ; 3/10	19,588	1,29199
10/10 ; 10/10 ; 0/10	23,979	1,37983
10/10 ; 8/10 ; 0/10	12,993	1,11371
10/10 ; 9/10 ; 1/10	19,792	1,29649
10/10 ; 7/10 ; 3/10	15,433	1,18845
90/90 ; 70/90 ;13/90	144,602	10,69732

La moyenne de l'échantillon des x est $\bar{x} = 144,6/9 = 16,07$. Pour $n = 10$ et $d = 15$, la loi de $\bar{x}$ a, comme celle de X, une moyenne m_x égale à 16,5, ce qui correspond à un biais relatif E_x de $+1,5/15 = +10\%$.

La moyenne de l'échantillon des y est $\bar{y} = 10,6973/9 = 1,18859$ (ce qui est le logarithme de 15,44). Pour $n = 10$ et $d = 15$, la loi de $\bar{y}$ a, comme celle de Y, une moyenne m_y qui est le logarithme de d' = 15,26 et qui correspond donc à un biais relatif E_y valant $+0,26/15 = 1,7\%$.

Le nombre caractéristique somme est 90/90; 70/90; 13/90, ce qui donne pour l'indice N.P.P. la valeur $x = 15,15$.

La loi de X n'a pas été étudiée pour n = 90 et d = 15, mais elle l'a été pour n = 96 et d = 14,49 et ces deux distributions sont certainement très proches. Or, avec la seconde d'entre-elles, le biais relatif E_x s'élève seulement à + 0,8%, ce qui est nettement inférieur aux biais relatifs E_x (10%) et E_y (1,7%) calculés précédemment.

L'utilisation du N.C. somme, qui revient en définitive à regrouper plusieurs expériences en une seule, devrait être systématiquement généralisée à tous les échantillons satisfaisant aux conditions énoncées plus haut, ou même seulement aux trois dernières de ces conditions.

Inversement, tout nombre caractéristique peut être considéré comme étant le résultat de la réunion de plusieurs autres, de sorte que, sauf exceptions, nous ne ferons plus de distinction, dans les paragraphes qui suivent, entre la façon directe ou indirecte dont les N.C. sont obtenus.

★ Le nombre caractéristique que nous donne l'expérience n'est pas toujours acceptable car la probabilité de ce N.C., pour la densité qu'il implique, est parfois faible et n'est pas comprise dans les 95% de la somme des probabilités des N.C. les plus probables. Pour rechercher si un N.C. est acceptable, la courbe "Probabilité minimale = f (densité)", comme le montre la Figure 26, est utilisée. Les probabilités minimales sont déterminées à partir d'une densité donnée en faisant la somme des probabilités par ordre décroissant jusqu'à ce qu'elle atteigne 95% (Annexe A_1). La probabilité la plus faible est alors prise.

Par exemple, à un N.C. égal à 96; 17; 0, il correspond un indice N.P.P. égal à 3,15. Or, pour cet indice, le nombre caractéristique le plus probable est 92; 26; 3. La probabilité calculée correspondant au N.C. 96; 17; 0 ayant une valeur très faible (P = 0,000007689) nettement inférieure à la valeur correspondante de la courbe, il faut rejeter ce N.C. à 95% de confiance

I - 1-4-2 Estimation par intervalle.

A chaque indice N.P.P. correspond un intervalle de confiance déterminé de la façon suivante : soit L_i la borne inférieure et L_s la borne supérieure de l'intervalle de confiance au niveau $1 - \alpha$ de l'indice N.P.P. Quatre méthodes sont utilisables pour déterminer ces limites (PROST et coll.,1981). Mais, dans ce travail, nous n'avons utilisé que la méthode décrite par PARNOW (1972)

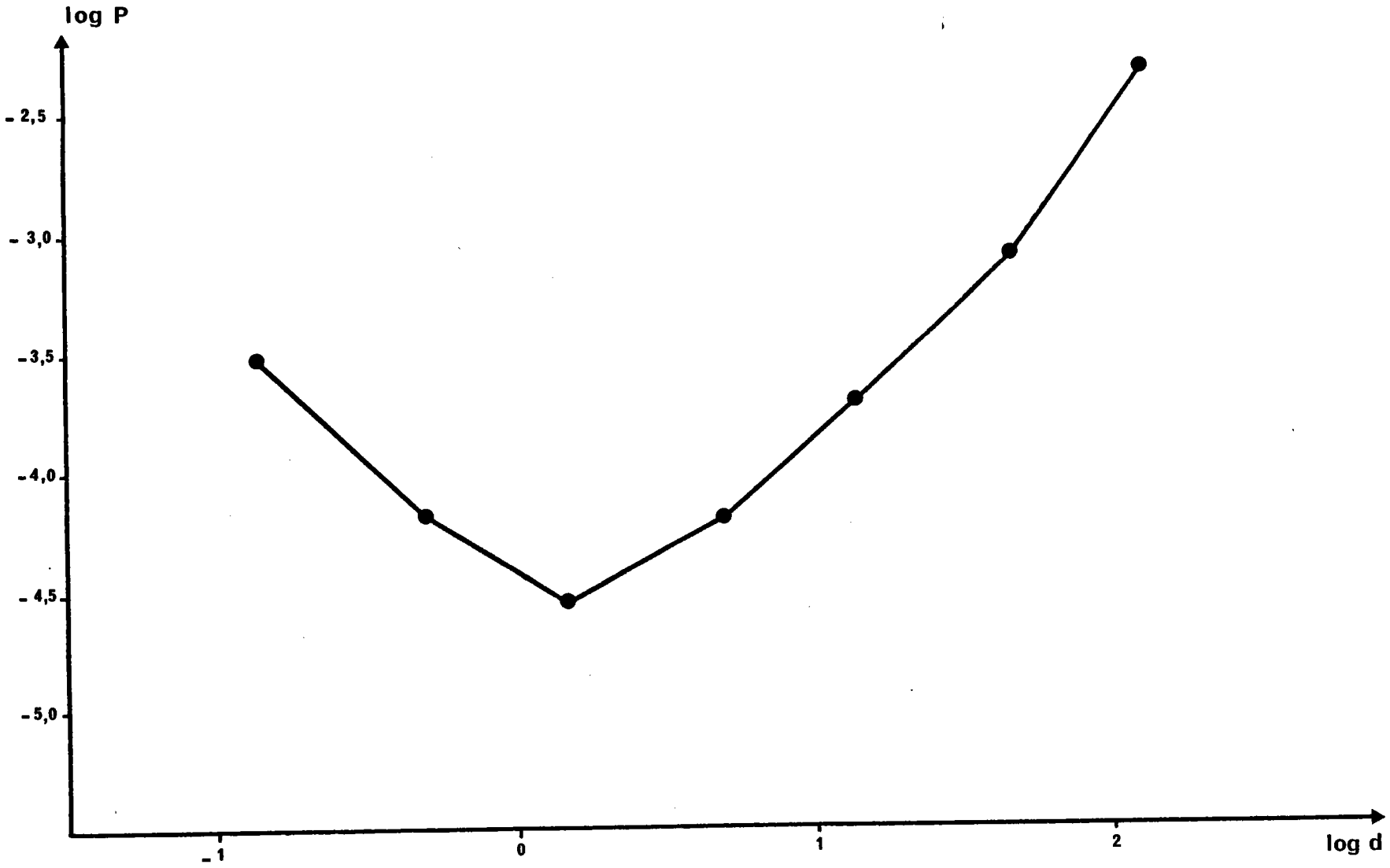


FIGURE 26

Limite inférieure de P $\begin{pmatrix} \text{N.P.P.} \\ \text{N.C.} \end{pmatrix}$ pour Σ P = 0,95

Cette méthode repose sur la normalité de la distribution de la variable Z (EISENHART et WILSON,1943) et sur le fait que l'écart-type σ_z varie relativement peu quand la densité d reste voisine de la valeur z observée pour cette variable Z.

Dans ces conditions, les logarithmes népériens L'_i et L'_s des limites L_i et L_s se déterminent à partir des intervalles d'acceptation qui leur correspondent. Ils sont obtenus à l'aide des relations :

$$\alpha = \alpha_1 + \alpha_2$$

$$L'_s - u_{1-\alpha_1} \cdot \sigma_z = z$$

$$L'_i + u_{1-\alpha_2} \cdot \sigma_z = z$$

$u_{1-\alpha_1}$ et $u_{1-\alpha_2}$ désignant respectivement les quantiles d'ordre $1-\alpha_1$ et $1-\alpha_2$ de la variable normale réduite.

Etant donné la façon dont s'obtient σ_z, il n'est pas nécessaire que les effectifs n_i soient rigoureusement égaux pour que la méthode puisse être utilisée. Ainsi, pour k = 3; $q_1 = 1$; $q_2 = 0,1$; $q_3 = 0,01$; $n_1 = 96$; $n_2 = 94$; $n_3 = 77$; $1 - \alpha = 0,95$; N.C. = 96/96; 64/94; 8/77, x est égal à 11,3 d'où : z = Log 11,3 = 2,4248 et

$$\sigma_z = \frac{1}{11,3}\left[\frac{96\ e^{-11,3}}{(1-e^{-11,3})^2} + \frac{0,64\ e^{-1,13}}{(1-e^{-1,13})^2} + \frac{0,0008\ e^{-0,113}}{(1-e^{-0,113})^2}\right]^{-1/2} = 0,123$$

Pour un intervalle symétrique en probabilité comportant donc les risques $\alpha_1 = \alpha_2 = 0,05/2 = 0,025$, $u_{1-\alpha_1}$ est égal à $u_{1-\alpha_2}$ et égal à 1,96 et :

$$L'_i = 2,4248 - 1,96 \times 0,123 = 2,18307, \text{ d'où } L_i = 8,9$$

$$L'_s = 2,4248 + 1,96 \times 0,123 = 2,66650, \text{ d'où } L_s = 14,4$$

En revanche, comme les hypothèses faites au départ sont plus ou moins vraies, les limites L_i et L_s trouvées sont elles-mêmes approximatives. Mais,ainsi que le montrent les quelques chiffres du Tableau 9, ces valeurs approchées sont assez voisines des valeurs exactes, même avec des effectifs n_i de l'ordre de 10, lorsque, du moins, le pourcentage de cupules positives n'est ni très élevé, ni très faible.

TABLEAU 9

Comparaison des limites de confiance
obtenues à partir de deux méthodes différentes

N.C.	x	% de cupules positives	Limites obtenues avec la méthode décrite	Limites obtenues avec la méthode exacte▲
1; 0; 0	0,09	3,3%	L_i= 0,01 L_s= 0,64	L_i= 0,01 L_s= 0,54
4; 3; 0	0,80	23,3%	L_i= 0,38 L_s= 1,70	L_i= 0,40 L_s= 1,70
10; 8; 0	13,00	60,0%	L_i= 6,20 L_s= 27,30	L_i= 6,00 L_s= 28,00
10; 10; 9	230,00	96,6%	L_i=102,50 L_s=516,00	L_i=110,00 L_s=600,00

▲:elles se fondent sur le théorème des probabilités composées (théorème de Bayes cité par MATHER,1965) ainsi que l'équiprobabilité à priori de toutes les valeurs de la densité qui, pour clarifier l'expression des différentielles, sera exceptionnellement désignée par θ.

. Les limites L_i et L_s sont alors données par les relations

$\alpha = \alpha_1 + \alpha_2$

$$\int_{\theta=0}^{\theta=L_i} f(\theta)\, d\theta \Big/ \int_{\theta=0}^{\theta=+\infty} f(\theta)\, d\theta = \alpha_2$$

$$\int_{\theta=0}^{\theta=L_s} f(\theta)\, d\theta \Big/ \int_{\theta=0}^{\theta=+\infty} f(\theta)\, d\theta = 1-\alpha_1$$

La fonction f (θ) n'étant autre que la probabilité P de la formule (1)

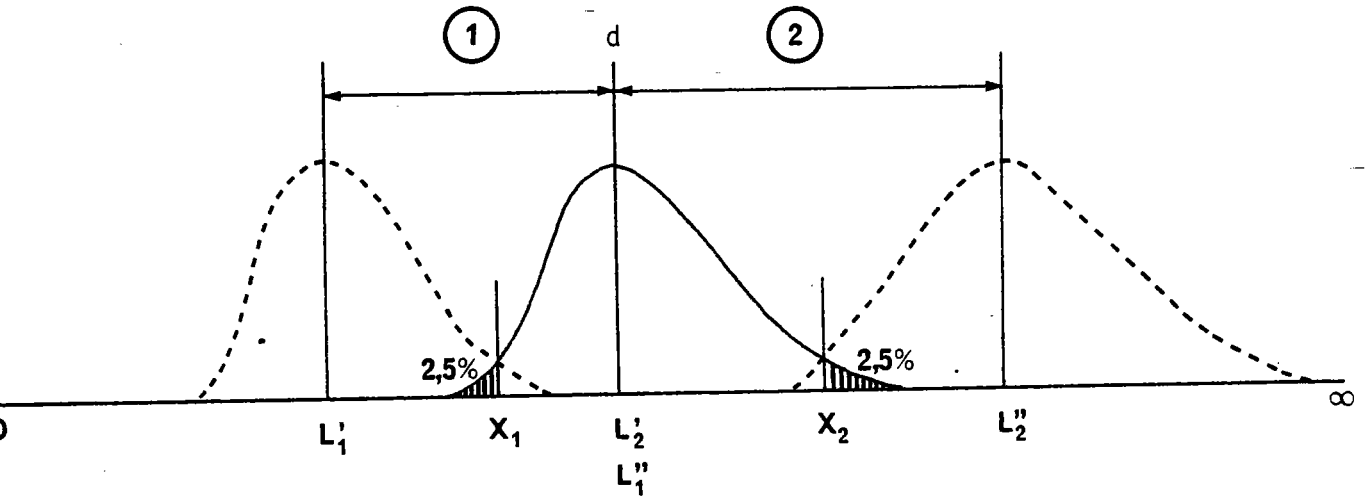
I - 1-5 Tests de signification.

I - 1-5-1 Tests de comparaison de deux densités d_1 et d_2.

L'intervalle de confiance permet d'évaluer rapidement si les deux densités d_1 et d_2 différent significativement. Il ne s'agit pas d'un test précis (LISON,1958), mais d'une indication d'obtention rapide utilisée pour s'orienter : quand les intervalles de confiance des deux densités d_1 et d_2 se chevauchent, les deux densités ne diffèrent pas significativement. Cette méthode comporte un risque de première espèce exagéremment trop petit, c'est-à-dire qu'elle

fait rejeter plus souvent qu'il ne faudrait l'hypothèse d'une différence significative. Examinons, par exemple, le cas limite où les intervalles de confiance ont une borne commune, comme le montre la Figure 27.

Si la valeur commune de d_1 et d_2 est $d = L''_1 = L'_2$, comme le fait admettre la méthode en cause, la probabilité pour X_1 d'appartenir à l'intervalle $[0,x_1]$ est de 2,5%. De même la probabilité pour X_2 d'appartenir à l'intervalle $[x_2,\infty]$ vaut 2,5%.La probabilité que ces deux événements se produisent simultanément (ce qui correspond à l'observation faite) est égale à :
$\alpha = 0,025 \times 0,025 = 0,000625$. Avec des intervalles à 99% $\alpha = 0,0001$.
Le risque α est très inférieur à ceux fixés habituellement.



X_1 borne inférieure de d

X_2 borne supérieure de d

(1) Intervalle de confiance de d_1 à 95% et symétrique en probabilité

(2) Intervalle de confiance de d_2 à 95% et symétrique en probabilité

FIGURE 27

Cas où les intervalles de confiance ont une borne commune

I - 1-5-2 Analyse de variance (SOKAL et ROHLF, 1969; DAGNELIE, 1969).

L'analyse de variance n'est valable que dans les conditions suivantes :

- la distribution des erreurs est une distribution normale,
- leur variance est constante,
- les termes d'erreur sont indépendants,
- les effets des différents traitements s'additionnent.

La notion d'indépendance des erreurs se rattache à ce qui est évoqué au paragraphe I - 1-4-1 de ce même chapitre I et l'hypothèse de l'additivité des effets des traitements est généralement admise par les statisticiens. Quant aux deux premières conditions, elles nécessitent, pour pouvoir être considérées comme remplies, que les trois règles ci-après soient appliquées :

- utiliser la technique classique avec, pour toutes les mesures, un même effectif n supérieur ou égal à 40,
- opérer sur des valeurs de X correspondant à l'intervalle I_2
- effectuer une transformation logarithmique de ces valeurs.

Le volume d'inoculum q_1 pourra varier d'une mesure à l'autre mais il conviendra, bien entendu, d'exprimer tous les résultats x avec la même unité avant d'utiliser leur logarithme y dans les calculs.

Si, dans quelques cas, il est nécessaire de multiplier certaines valeurs de X par des facteurs appropriés et différents, il en résultera pour la variable Y de simples changements d'origine n'affectant pas son écart-type σ_y.

Cas de l'analyse à deux dimensions :

Lorsqu'une même série d'échantillon subit deux traitements différents A_1 et A_2, il est intéressant de connaître l'influence des traitements sur les indices N.P.P. Soit l'exemple où
- le facteur A a deux variantes,
- le facteur B a neuf variantes,
- n = 40

Les valeurs trouvées sont consignées dans le Tableau 10.

Comme le montre le Tableau 11, l'indice N.P.P. est alors transformé en logarithmes décimaux. Les calculs suivants sont alors effectués :

TABLEAU 10

Comparaison des traitements A_1 et A_2

A / B	A_1		A_2	
	N.C.	N.P.P.		N.P.P.
B_1	34 ; 2 ; 0	1,56	40 ; 18 ; 0	5,52
B_2	40 ; 30 ; 1	11,90	40 ; 26 ; 5	10,90
B_3	40 ; 21 ; 0	6,60	39 ; 26 ; 1	6,90
B_4	40 ; 33 ; 3	15,48	40 ; 33 ; 7	17,78
B_5	40 ; 24 ; 1	8,27	40 ; 29 ; 2	11,63
B_6	40 ; 19 ; 0	5,85	40 ; 32 ; 3	14,52
B_7	40 ; 21 ; 3	7,53	40 ; 30 ; 2	12,37
B_8	40 ; 20 ; 0	6,21	40 ; 28 ; 0	10,12
B_9	40 ; 25 ; 0	8,42	40 ; 32 ; 0	12,99

TABLEAU 11

Logarithmes décimaux
des valeurs du N.P.P. rapportées à la même unité

A / B	A_1	A_2	Total
B_1	0,1931246	0,7419391	0,9350637
B_2	1,0755470	1,0374265	2,1129735
B_3	0,8195439	0,8388491	1,6583930
B_4	1,1897710	1,2499318	2,4397028
B_5	0,9175055	1,0655797	1,9830852
B_6	0,7671559	1,1619666	1,9291225
B_7	0,8767950	1,0923697	1,9691647
B_8	0,7930916	1,0051805	1,7982721
B_9	0,9253121	1,1136092	2,0389213
Total	7,5578466	9,3068522	16,8646988

- terme de centrage T.C. = $\frac{(16,8646988)^2}{18}$ = 15,801004
- somme des carrés de toutes les mesures : 16,787752
- somme des carrés générale : 16,787752 - (T.C.) = 0,9867484
- somme des carrés "entre variantes du facteur A" :

$$\frac{(7,5578466)^2}{9} + \frac{(9,3068522)^2}{9} - (T.C.) = 15,970949 - (T.C.) = 0,1699452$$

- somme des carrés "entre variantes du facteur B" :

$$\frac{(0,9350637)^2}{2} + \frac{(2,1129735)^2}{2} + \ldots\ldots + \frac{(2,0389213)^2}{2} - (T.C.) =$$

$$16,482075 - (T.C.) = 0,6810712$$

- somme des carrés résiduelle :

$$0,9867484 - (0,1699452 + 0,6810712) = 0,1357320$$

Il en résulte le tableau d'analyse de variance : Tableau 12

TABLEAU 12

Influence des deux traitements A_1 et A_2

Source de variation	Somme des carrés	Degrés de liberté	Carré moyen	$F_{obs.}$
entre variante du facteur A	0,1699452	2 - 1 = 1	0,1699452	$\frac{0,1699452}{0,0169665} = 10,016$
résiduelle	0,1357320	(9 - 1)x 1 = 8	0,0169665	
$F_{0,05}$ [1,8] = 5,32				

Comme $F_{obs.}$ [1,8] $\geqslant F_{0,05}$ [1,8], il y a une différence significative entre le traitement A_1 et le traitement A_2.

I - 2 ETUDE DES DIFFERENTES ETAPES DE LA METHODE PROPOSEE.

Dans la mise au point de la méthode de titrage des virus :

= dans un premier temps, nous avons recherché les paramètres influençant la valeur du titre viral (trypsination, nombre et volume d'inoculums par dilution,nombre de dilutions),

= dans un deuxième temps, nous avons comparé notre méthode à celle des plages et du N.P.P. utilisant trois inoculums par dilution, afin d'en déterminer la précision.

I - 2-1 Matériel et méthodes.

I - 2-1-1 Cultures cellulaires.

La recherche et la numération des virus ont été effectuées sur cultures de cellules en lignée continue K.B., soit par la méthode des plages, soit par la méthode du nombre le plus probable. Les cultures cellulaires ont donc été réalisées dans des flacons en plastique stériles de 25 cm^2 de surface, ou sur des plaques de microtitration comprenant 96 cupules (Microtest II). Dans ce dernier cas, les plaques sont préparées de la façon suivante : à partir de cellules humaines K.B., une suspension cellulaire est réalisée, à raison de 200 000 cellules par ml, dans du milieu de croissance L.Y. pH 7,2 constitué par de l'hydrolysat de Lactalbumine (Biochemical corporation) à 0,5%, de l'extrait de levure (Yeastolate-Difco) à 0,15% dans une solution saline de Earle (Earle, 1943) à laquelle sont ajoutés 10% de sérum de veau nouveau-né décomplémenté (Eurobio), 1% de solution d'antibiotiques et d'anti-fungique (Benzyl penicillinate de sodium : 25000 U/ml, sulfate de colimycine : 20000 U/ml, sulfate de streptomycine : 5 mg/ml, sulfate de néomycine : 50 mg/ml, amphotericine B : 5.10^{-3} mg/ml) et 2,5% de tampon Hépès (Bio-Mérieux). Cette suspension cellulaire est répartie dans les différentes cupules d'une ou plusieurs plaques, à raison de 0,1 ml par cupule. Elles sont incubées pendant 24 h à +37°C dans un caisson de Lwoff sans CO_2.

I - 2-1-2 Virus.

Durant toute l'étude, le même lot de virus poliomyélitique type I, souche Sabin L S C 2 ab, a été utilisé et préparé selon la méthode suivante : une boîte de Roux de 200 cm^2, contenant un tapis cellulaire continu, est inoculée avec 1,5 ml de suspension virale. Après cinq jours d'incubation à + 37°C, lorsque l'effet cytopathogène est total, 80 ml environ de suspension virale obtenus sont congelés et décongelés trois fois successivement. Après élimination des débris cellulaires par centrifugation à 1800 g pendant 10 minutes à + 4°C, le surnageant

est alors prélevé, réparti à raison de 1 ml par flacon dans 75 flacons stériles conservés au congélateur à -70°C pendant toute la durée de l'étude et titré par la méthode du N.P.P. utilisant 96 inoculums par dilution.

I - 2-1-3 Protocole virologique.

I - 2-1-3-1 Influence de la trypsination.

★ Préparation des dilutions .

A partir de l'éluat ou de la suspension de virus poliomyélitique type I, 20 ml de dilutions à 10^{-6}, 10^{-7} et 10^{-8} sont préparés avec du milieu de Hanks.

★ Inoculation et observation des cultures cellulaires.

Comme le montre la Figure 28, 20 ml de chacune des dilutions (éluat ou suspension de virus poliomyélitique type I) sont partagés en deux volumes de 10 ml :

- d'une part, un flacon de 75 cm^2 de surface contenant un tapis cellulaire de de type K.B. est inoculé avec 10 ml de dilution. Après 2 heures de contact à + 37°C, l'inoculum est éliminé et les cellules sont trypsinées. Elles sont recueillies, après centrifugation, dans 10 ml de milieu d'entretien L.Y., complétés avec 10% de sérum de veau (S.V.), 1% de solution d'antibiotiques (S.A.) et 2,5% de tampon Hépès (T.H.). La suspension cellulaire infectée ainsi obtenue est répartie dans les 96 cupules d'une plaque de microtitration à raison de 0,1 ml par cupule. Les plaques sont placées à + 37°C pendant 5 à 7 jours dans un caisson de Lwoff. Pour chaque cupule, l'apparition d'un effet cytopathogène (E.C.P.) est notée. Après congélation et décongélation de la plaque, un deuxième passage est effectué de la façon suivante : à partir de chacune des cupules, il est prélevé 0,05 ml du contenu qui est porté dans la cupule correspondante d'une autre plaque de microtitration dont le fond est déjà tapissé de cellules. L'opération est répétée pour toutes les cupules de la microplaque.
- d'autre part, 9,6 ml de suspension virale sont répartis dans une plaque de microtitration contenant un tapis cellulaire continu, à raison de 0,1 ml par cupule. Après un contact de 2 h. à + 37°C, l'inoculum est remplacé par du milieu de survie (L.Y. + 1% S.A. + 2,5% T.H.) à raison de 0,1 ml par cupule. Les plaques mises dans un caisson de Lwoff sans CO_2 sont incubées à + 37°C pendant 5 à 7 jours. Comme précédemment, un deuxième passage est effectué. Dans les deux cas, le nombre de cupules présentant un E.C.P. est noté.

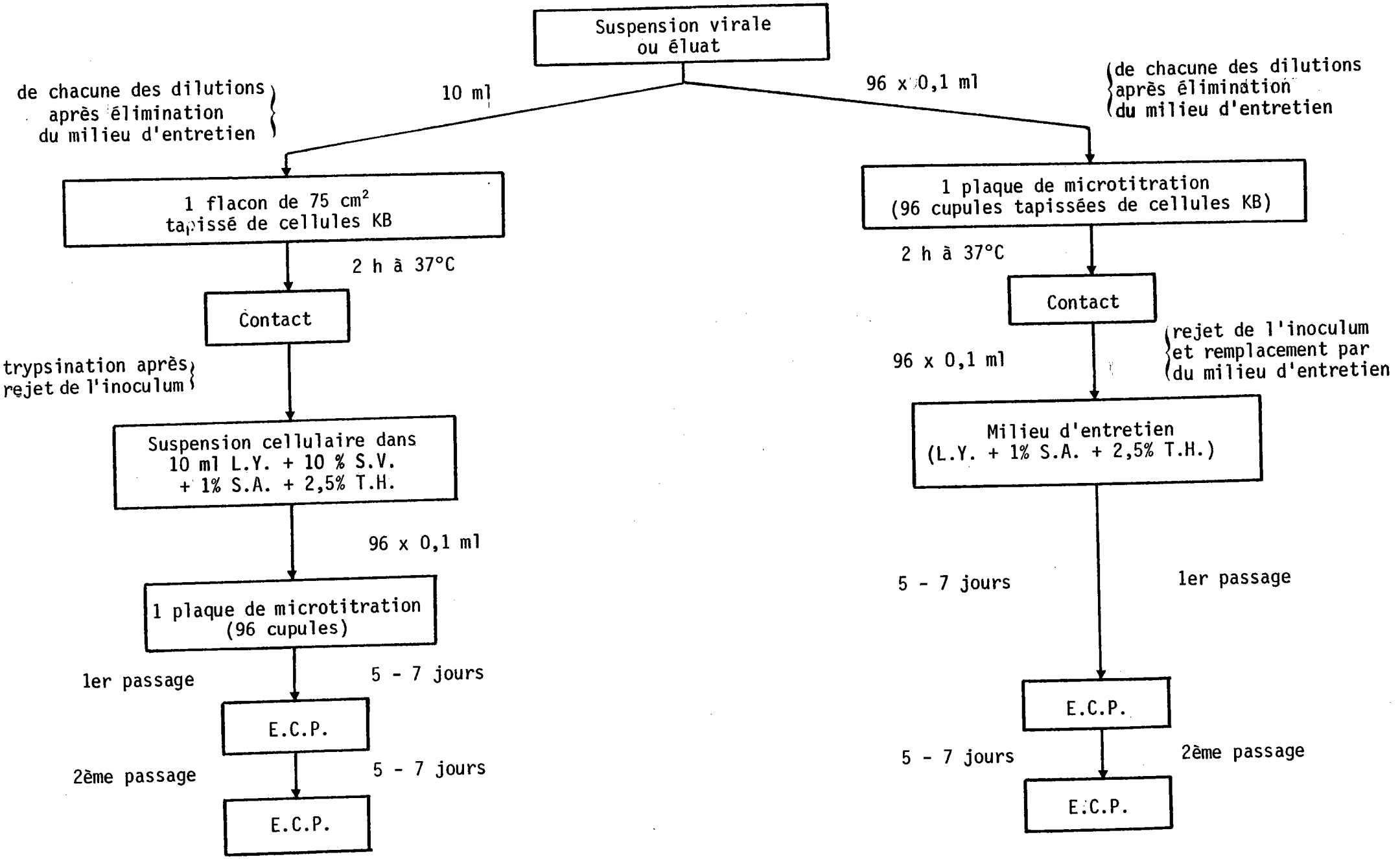


FIGURE 28

Schéma du protocole virologique concernant l'influence de la trypsination

I - 2-1-3-2 Influence du nombre d'inoculums par dilution.

I - 2-1-3-2-1 Comparaison : 3 cupules par dilution *versus* 90 cupules par dilution.

★ Préparation des solutions-mères.

A partir d'une suspension de virus poliomyélitique type I, différentes dilutions sont effectuées de façon à obtenir trois suspensions de 20 ml titrant respectivement environ 10^3,10^4 et 10^5 N.P.P.U.C./ml (solutions-mères).

★ Inoculation et observation des cultures cellulaires.

Comme le montre la Figure 29, à partir de la solution-mère, il est effectué :

- une première série de titrages en utilisant la technique du N.P.P. avec 90 inoculums par dilution que l'on distribue dans les cupules d'une plaque de microtitration à raison de 0,1 ml par cupule. D'une manière aléatoire, les 90 cupules de chaque plaque sont délimitées en 30 groupes de 3 cupules.
- une deuxième série de 30 titrages provenant de 30 dilutions différentes. La technique utilisée est celle du N.P.P. avec 3 inoculums de 0,1 ml par dilution.

Les plaques de microtitration ainsi inoculées sont incubées pendant 2 h à + 37°C. Après ce contact, les suspensions virales sont remplacées par du milieu d'entretien (L.Y. + 1% S.A. + 2,5% T.H.) à raison de 0,1 ml par cupule. Les plaques sont incubées à + 37°C dans un caisson de Lwoff sans CO_2 pendant 5 à 7 jours. Une première lecture est effectuée en comptant le nombre de cupules présentant un E.C.P. Après congélation et décongélation des plaques, un deuxième passage est réalisé à partir de toutes les cupules ayant présenté un E.C.P.

I - 2-1-3-2-2 Comparaison : 3 flacons par dilution *versus* 96 cupules par dilution.

★ Préparation des dilutions.

A partir de l'éluat ou de la suspension de virus poliomyélitique type I, 10 ml de dilution à 10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-4} et 10^{-5} sont préparés avec du milieu de Hanks

★ Inoculation et observation des cultures cellulaires.

Comme le montre la Figure 30, à partir de chacune des dilutions, il est inoculé en parallèle :

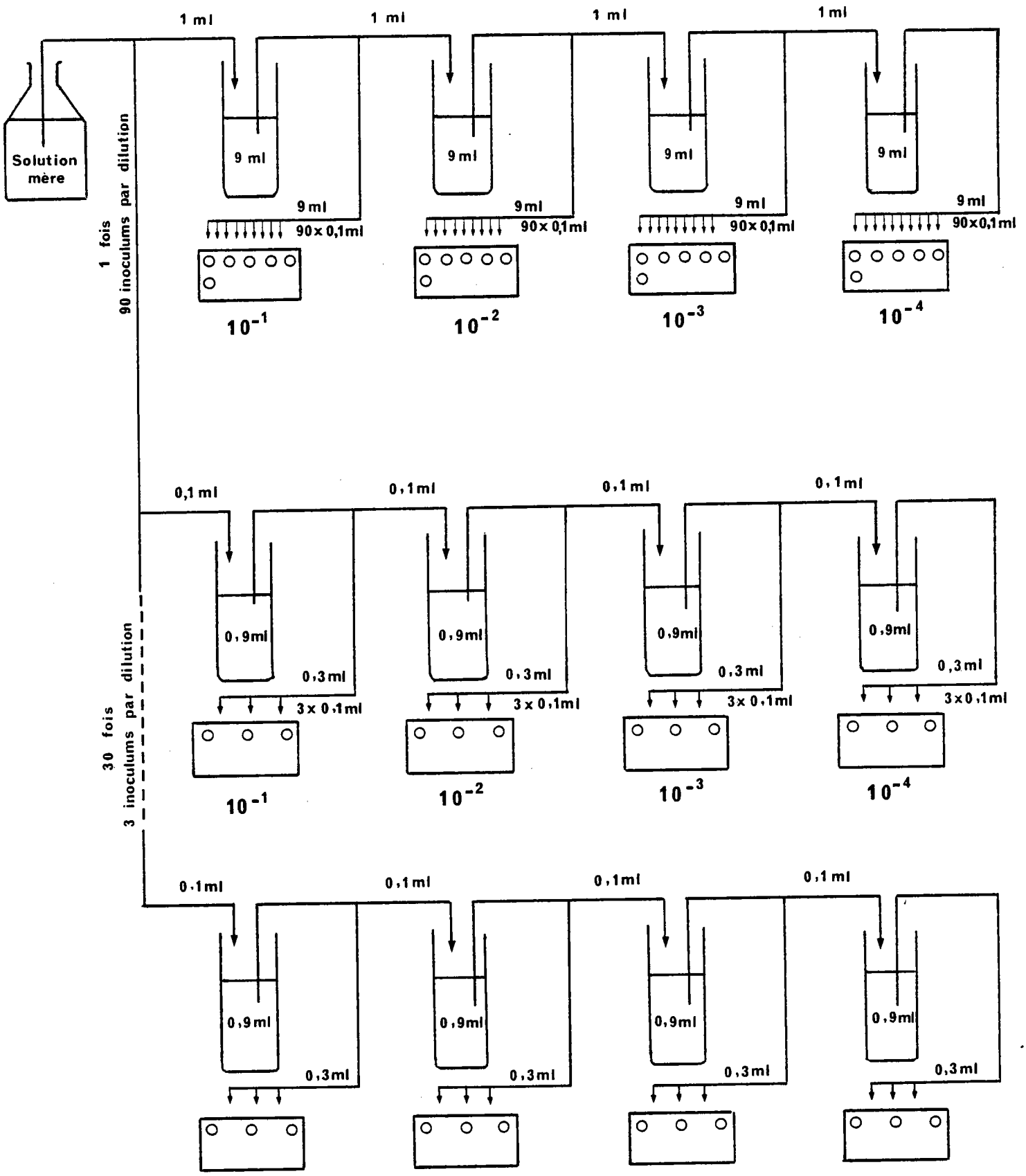


FIGURE 29

Schéma du protocole virologique
Comparaison des titres viraux à partir de 2 modes d'utilisation du N.P.P.
(3 cupules par dilution *versus* 90 cupules par dilution)

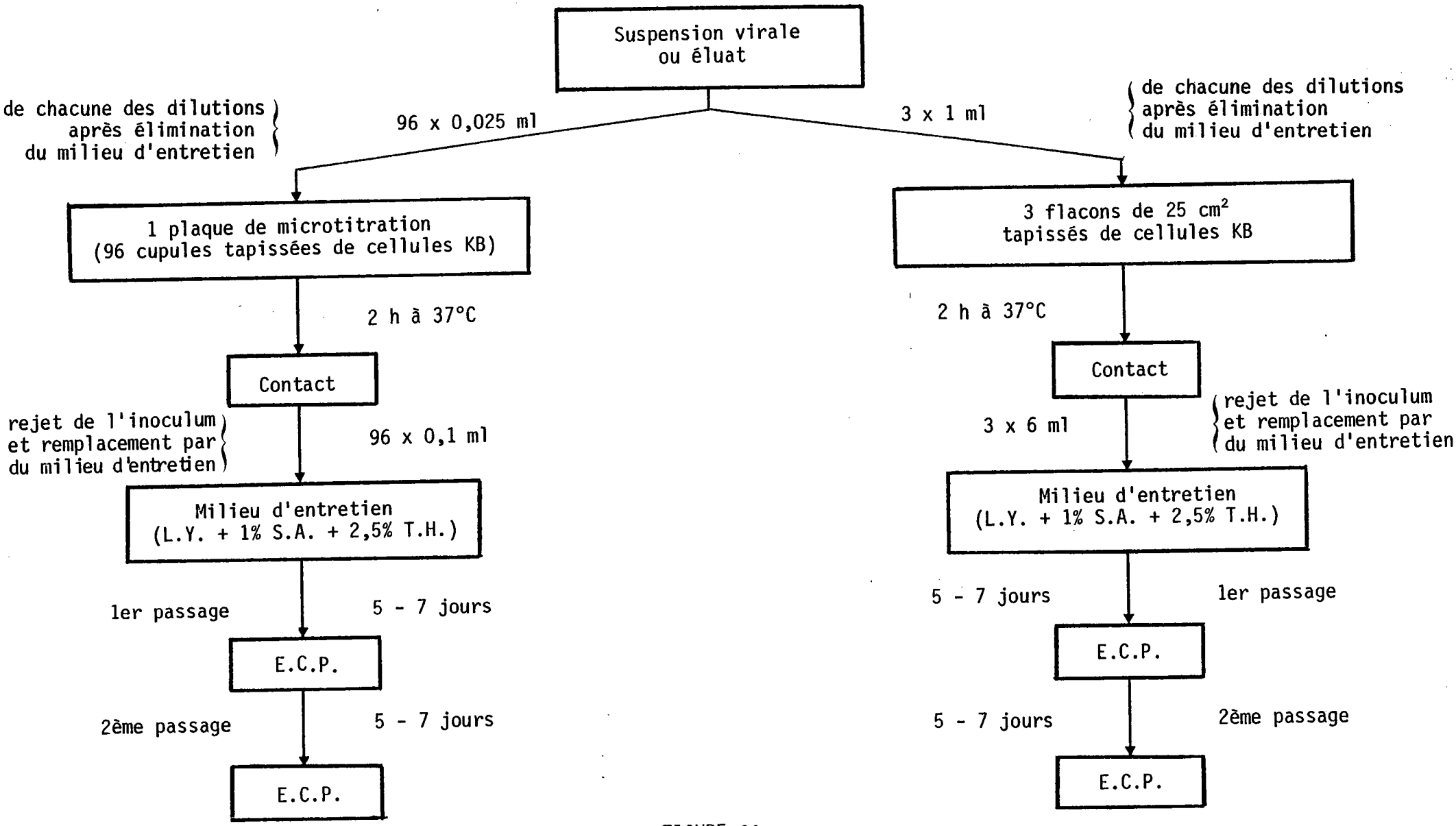


FIGURE 30

Schéma du protocole virologique
Comparaison des titres viraux à partir de 2 modes d'utilisation du N.P.P.
(3 flacons par dilution *versus* 96 cupules par dilution)

- 96 cupules d'une plaque de microtitration contenant des cellules K.B. en tapis continu, à raison de 0,025 ml par cupule, afin de conserver le même rapport volume d'inoculum - nombre de cellules que dans la méthode suivante (3 flacons par dilution),
- 3 flacons de 25 cm^2 de surface contenant des cellules K.B. en tapis continu à raison de 1 ml.

Après 2 heures de contact, les inoculums sont rejetés. Les tapis cellulaires sont recouverts avec du milieu d'entretien (L.Y. + 1% S.A. + 2,5% T.H.) à raison de 0,1 ml par cupule,pour la méthode du N.P.P. utilisant 96 inoculums par dilution et à raison de 6 ml par flacon,pour la méthode du N.P.P. utilisant 3 inoculums par dilution. Les plaques et les flacons sont incubés à + 37°C en caisson de Lwoff sans CO_2 pendant 5 à 7jours.Après congélation et décongélation des plaques et des flacons, un deuxième passage est effectué.

I - 2-1-3-3 Influence du volume de l'inoculum par rapport à la surface du tapis cellulaire.

★ Préparation des dilutions.

A partir de l'éluat ou de la suspension de virus poliomyélitique type I, des dilutions de 10 en 10,jusqu'à 10^{-4}, sont effectuées dans du milieu de Hanks.

★ Inoculation et observation des cultures cellulaires.

Comme le montre la Figure 31, à partir de chacune des dilutions, il est inoculé, en parallèle, deux plaques de 96 cupules contenant des cellules K.B. en tapis continu à raison de :

- 0,1 ml par cupule pour la premiere plaque,
- 0,025 ml par cupule pour la deuxième plaque.

Après 2 heures de contact, les inoculums sont rejetés. Les tapis cellulaires sont recouverts avec du milieu d'entretien (L.Y. + 1% S.A. + 2,5% T.H.) à raison de 0,1 ml par cupule. Les plaques placées dans un caisson de Lwoff sans CO_2 sont incubées à + 37°C pendant 5 à 7 jours. Après congélation et décongélation des plaques, un deuxième passage est effectué.

I - 2-1-3-4 Influence du nombre de dilutions mises en oeuvre.

★ Préparation des dilutions.

A partir d'éluats provenant d'échantillons d'eau de mer, 10 ml de dilution au 1/10, 1/100 et 1/1000 sont préparés avec du milieu de Hanks.

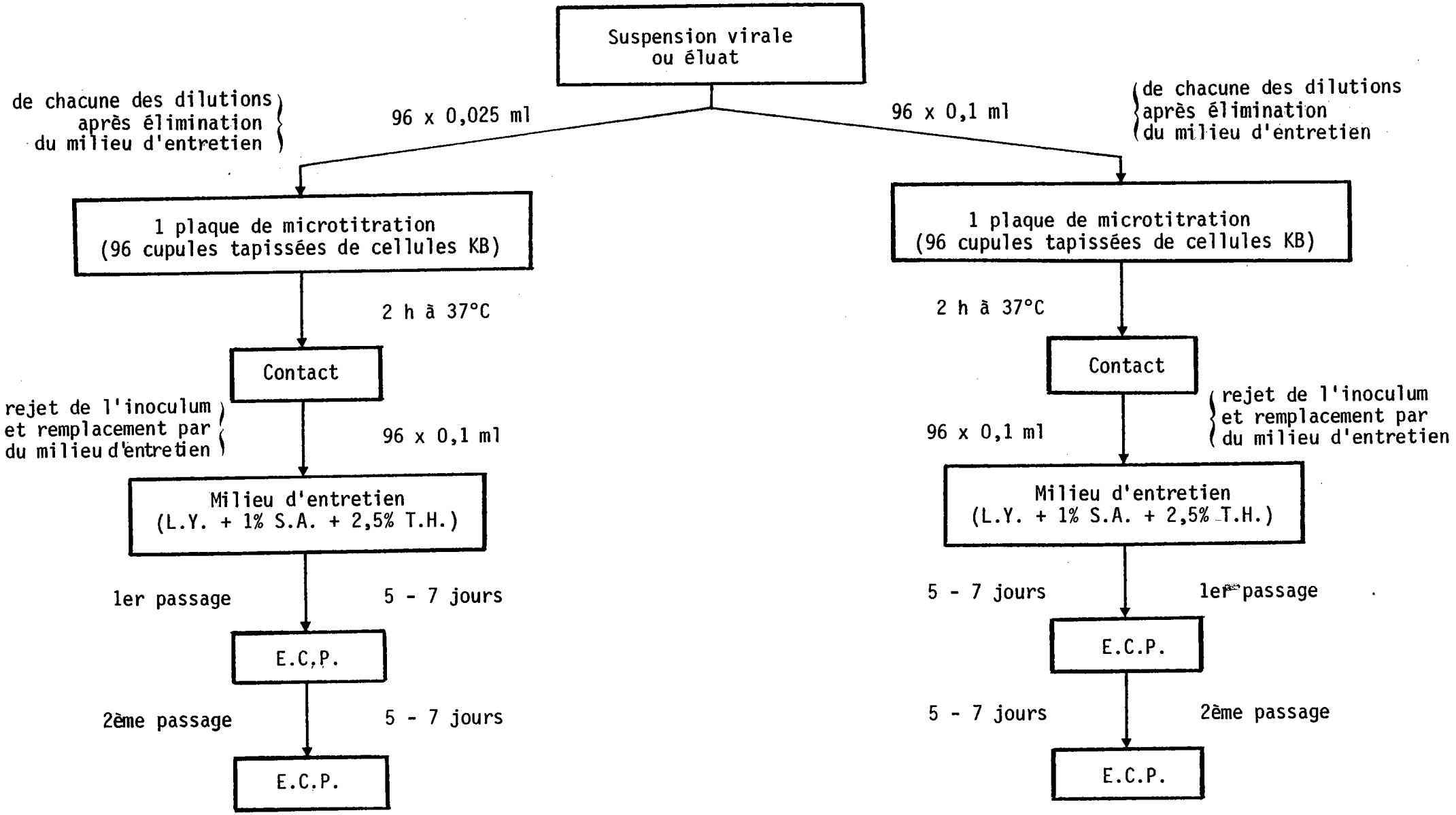


FIGURE 31

Schéma du protocole virologique concernant l'influence du volume de l'inoculum

★ Inoculation et observation des cultures cellulaires.

Comme le montre la partie gauche de la Figure 32, pour chacune des dilutions du concentrat, il est inoculé par plaque de microtitration, 96 cupules contenant déjà des cellules K.B. en tapis continu, à raison de 0,025 ml par cupule. Après un contact de 2 heures à + 37°C, l'inoculum est remplacé par du milieu de survie (L.Y. + 1% S.A. + 2,5% T.H.) à raison de 0,1 ml par cupule. Les plaques placées dans un caisson de Lwoff sans CO_2, sont incubées à + 37°C, pendant 5 à 7 jours. Après une première lecture, la plaque est congelée , puis décongelée. Un deuxième passage est alors entrepris.

I - 2-1-3-5 Comparaison de deux techniques de titrage : méthode du N.P.P. avec 96 cupules par dilution *versus* méthode des plages.

★ Préparation des dilutions.

A partir d'éluats provenant d'échantillons d'eau de mer, 10 ml de dilution au 1/10, 1/100 et 1/1000 sont préparés avec du milieu de Hanks. Chaque dilution est utilisée pour appliquer, en parallèle, deux méthodes de titrage : plages et N.P.P. avec 96 inoculums par dilution.

★ Inoculation et observation des cultures cellulaires.

Comme le montre la Figure 32, les opérations suivantes sont effectuées :

- méthode des plages (CATEIGNE et MAURIN, 1965)

0,1 ml des différentes dilutions de l'éluat sont inoculés dans des flacons de 25 cm^2 de surface contenant des cellules K.B. en tapis continu préalablement débarassées de leur milieu de croissance. Pour toutes les dilutions, un flacon est inoculé. Après étalement du liquide sur toute la surface du tapis, les flacons sont incubés à + 37°C pendant 2 heures. Durant ce temps, le milieu gélosé (Bacto-Agar• - DIFCO) est préparé. Dans la gélose fondue et ramenée à + 43°C, il est ajouté, dans l'ordre et en agitant chaque fois :

. 1,5 ml de rouge neutre•• (R.A.L. 31680)
. 10,0 ml de Earle x 10 (I.P. 72475)
. 7,5 ml de bicarbonate de sodium à 55‰ (I.P.72732)
. 0,5 ml de lait écrémé••• (Gayelord-Hauser)

6 ml de ce milieu, maintenus à + 43°C, sont versés sur toute la surface des cellules contenues dans chaque flacon. Ces derniers, bouchés, sont posés à plat, à l'abri de la lumière. Après 30 minutes, la gélose étant solidifiée, les flacons

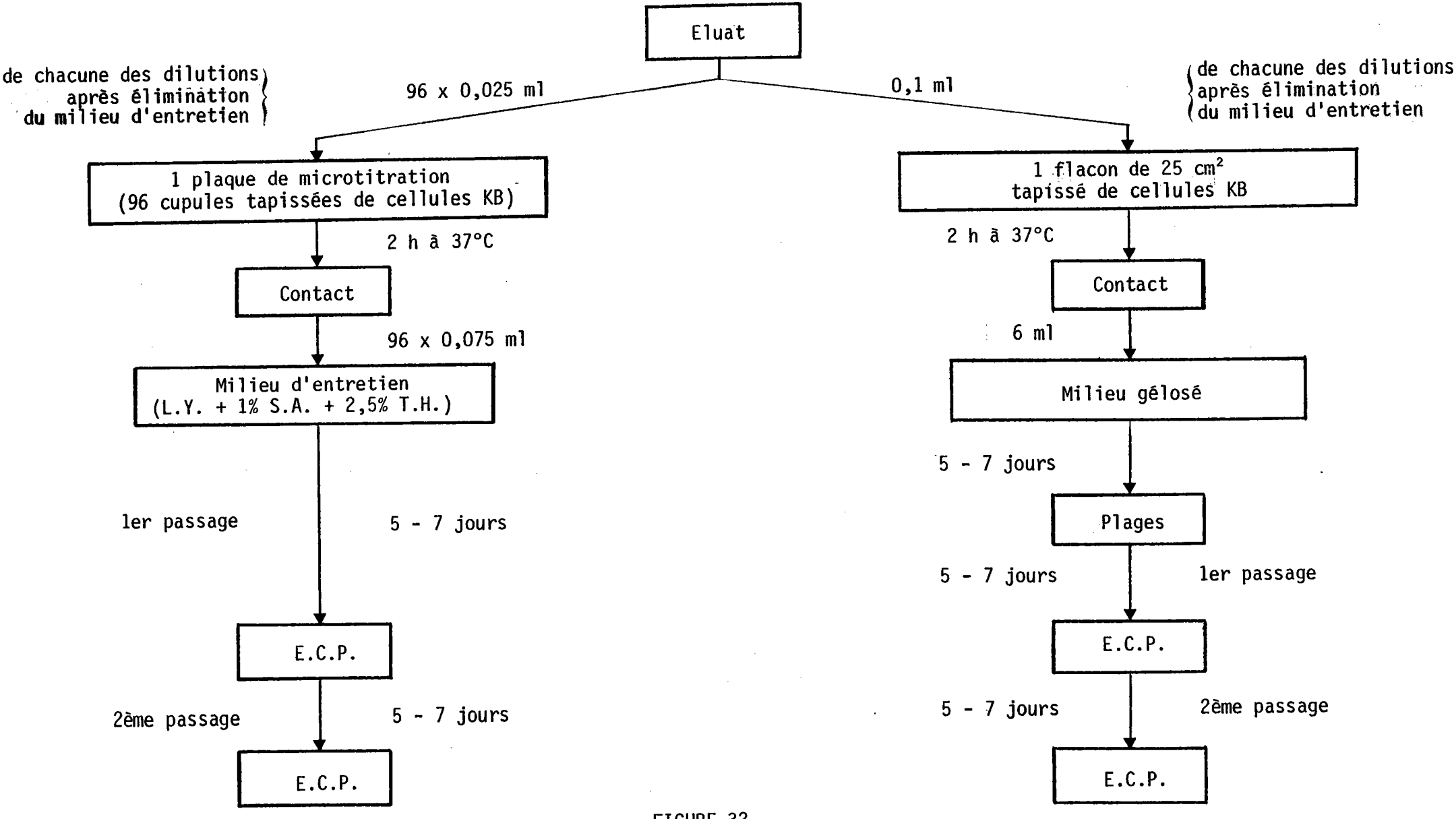


FIGURE 32

Schéma de protocole virologique concernant la comparaison de 2 techniques de titrages : plage *versus* N.P.P. avec 96 inoculums par dilution

sont retournés et placés à l'étuve à + 37°C pendant 5 à 7 jours. Différentes lectures sont effectuées au bout de 3, 5 et 7 jours. Le nombre de plages de lyses cellulaires est noté pour chacun des flacons. La concentration virale est déterminée en fonction de la dilution. A partir des flacons correspondant aux deux dernières dilutions, toutes les plages sont repiquées. Après avoir découpé la paroi du flacon qui ne contient pas le milieu gélosé, un cylindre de gélose est prélevé au centre d'une plage à l'aide d'une pipette Pasteur. Le rejet de la gélose se fait dans 0,1 ml de milieu L.Y. complété avec 1% de solution d'antibiotiques et 2,5% de tampon Hépès. Après homogénéisation, le milieu inoculé est transféré dans une cupule d'une plaque de microtitration contenant un tapis continu de cellules K.B. Après incubation à + 37°C dans un caisson de Lwoff sans CO_2, pendant 5 à 7 jours, l'aspect des cellules est noté (présence ou absence d'E.C.P.). Après congélation et décongélation de la plaque, un deuxième passage est effectué.

- méthode du N.P.P.

Pour chaque dilution de l'éluat, il est inoculé 96 cupules par plaque contenant déjà des cellules K.B. en tapis continu, à raison de 0,025 ml par cupule. Après un contact de 2 h. à + 37°C, du milieu de survie (L.Y. + 1% S.A. + 2,5% T.H.) est ajouté à raison de 0,075 ml par cupule. Les plaques placées dans un caisson de Lwoff, sans CO_2, sont incubées à + 37°C pendant 5 à 7 jours. Après une première lecture la plaque est congelée, puis décongelée. Un deuxième passage est alors entrepris.

• Bacto-Agar : dissoudre 1,35 gr de gélose dans 85 ml d'eau déminéralisée. Répartir dans des flacons de 125 ml. Stériliser 15 minutes à +100°C.

•• Rouge neutre : dissoudre 0,1 g dans 100 ml d'eau déminéralisée. Stériliser par filtration.

••• Lait écrémé : Reconstituer 11 g de lait avec 100 ml d'eau déminéralisée. Ajouter 0,002 g de rouge de phénol, verser goutte à goutte une solution normale de Na OH jusqu'au virage rose-saumon. Autoclaver à +100° C pendant 10 minutes. Centrifuger avant l'emploi.

I - 2-1-4 Calcul de l'indice N.P.P. et traitement statistique des données.

★ A partir des données théoriques de DE MAN (1975), PARNOW (1972), et WYSHAK et DETRE (1972), nous avons établi des programmes informatiques, rassemblés dans l'Annexe A_4, pour déterminer l'indice N.P.P. et son intervalle de confiance pour un seuil de sécurité de 95%. Tous les calculs ont été faits sur un ordinateur Heathkit "Zenith 89" et sur une calculatrice Texas-Instrument T.I. 59

★ Pour comparer les fréquences observées aux fréquences théoriques, la densité virale trouvée à partir de 90 inoculums par dilution est considérée comme représentant bien la densité réelle. Les probabilités associées aux différents nombres caractéristiques (N.C.) sont alors calculées. Les N.C. sont classés par ordre décroissant, après avoir rejeté ceux qui présentent une probabilité très faible.

★ Les différents tests de signification statistique utilisés dans ce travail sont traités et justifiés dans cette première partie, chapitre I, au paragraphe I - 1.

I - 2-2 Résultats et discussion.

I - 2-2-1 Influence de la trypsination.

Lors de ces essais, nous avons tenté de déterminer si l'étape de la trypsination pouvait avoir une influence sur la valeur du titre viral obtenu. Les résultats rassemblés dans le Tableau 13, montrent, dans le cas d'une suspension de virus poliomyélitique type I, qu'il n'y a pas, pour les 3 essais considérés, de différence significative dans les concentrations virales comparées. Ainsi, le nombre de virus, donné par les 2 méthodes, est sensiblement le même (essai 1 : $8,8.10^7$ *vs* $1,4.10^8$; essai 2 : $9,4.10^7$ *vs* $9,9.10^7$; essai 3 : $2,2.10^8$ *vs* $1,1.10^8$). Nous ne constatons pas, à l'inverse de BRICOUT et coll. (1974), que l'addition de 10% de sérum de veau, à la suspension de virus obtenue après trypsination, fasse diminuer le titre viral.

Nous avons alors recherché si ce résultat était aussi applicable à des eaux naturellement contaminées. A partir d'échantillons d'eau de rivière et de mer, nous constatons, comme le montre le Tableau 14, que dans quatre cas sur sept, il n'y a pas de différences statistiques significatives entre les titres viraux comparés. Quand une différence est observée, dans un cas sur trois, elle est en faveur de la méthode utilisant l'étape de trypsination. Pour

TABLEAU 13

Titres viraux (N.P.P.U.C./ml) obtenus après titrage d'une suspension de virus poliomyélitique type I avec ou sans trypsination

Nature de l'échantillon	Essai n°	Dilution	Nombre de cupules ayant présenté un E.C.P.				N.P.P.U.C./ml		Différence statistique (95%)
			avec trypsination		sans trypsination		avec trypsination	sans trypsination	
Suspension de virus poliomyélitique type I	1	10^{-6}	N.C.	96	N.C.	96	$8,8.10^{7}$ ($6,8.10^{7}$-$1,1.10^{8}$)	$1,4.10^{8}$ ($1,1.10^{8}$-$1,8.10^{8}$)	N.S.
		10^{-7}		54		72			
		10^{-8}		11		15			
	2	10^{-6}	N.C.	96	N.C.	96	$9,4.10^{7}$ ($7,3.10^{7}$-$1,2.10^{8}$)	$9,9.10^{7}$ ($7,8.10^{7}$-$1,2.10^{8}$)	N.S.
		10^{-7}		56		60			
		10^{-8}		12		10			
	3	10^{-6}	N.C.	96	N.C.	96	$2,2.10^{8}$ ($1,8.10^{8}$-$2,7.10^{8}$)	$1,1.10^{8}$ ($8.4.10^{7}$-$1,9.10^{8}$)	N.S.
		10^{-7}		77		63			
		10^{-8}		37		10			

N.C. : nombre caractéristique
N.S. : différence non significative
E.C.P. : effet cytopathogène
( ) : les nombres entre parenthèses indiquent la limite de confiance à 95%
N.P.P.U.C. : nombre le plus probable d'unités cytopathogènes

TABLEAU 14

Titres viraux (N.P.P.U.C./l) obtenus après titrage avec ou sans trypsination

(eaux de rivière et de mer - virus indigènes)

Nature de l'échantillon	Volume analysé (l)	Essai n°	N.P.P.U.C./l		Différence statistique (95%)
			avec trypsination	sans trypsination	
Concentrat d'eau de rivière (Vésubie)	60	1	5,4 (3,3- 9,6)	7,1 (4,6- 11,3)	N.S.
	60	2	108,0 (83,3-141,6)	7,9 (5,0- 12,5)	S.
	60	3	7,9 (5,0- 12,5)	2,9 (1,3- 5,8)	N.S.
	60	4	3,3 (1,6- 8,3)	22,5 (15,0- 33,3)	S.
Concentrat d'eau de mer (C_7)	20	5	21,3 (12,5- 35,0)	11,3 (7,2- 20,3)	N.S.
	20	6	20,0 (10,3- 37,2)	110,0 (85,1-137,3)	S.
	20	7	56,5 (36,6- 71,3)	16,0 (11,4- 38,1)	N.S.
$F_{obs.}$ (1,6) = 0,14 < $F_{0,05}$ (1,6) = 5,99					N.S.

S. : différence significative
N.S. : différence non significative
( ) : les nombres entre parenthèses indiquent la limite de confiance à 95%
N.P.P.U.C. : nombre le plus probable d'unités cytopathogènes

conclure objectivement sur l'influence de cette étape, dans la méthode de titrage proposée, il faut appliquer à ces résultats l'analyse de variance à deux dimensions : la valeur de F trouvée, placée au bas du Tableau 14, montre qu'il n'existe aucune différence statistique entre les deux méthodes expérimentées.

I - 2-2-2 Influence du nombre d'inoculums par dilution.

I - 2-2-2-1 Comparaison : 3 cupules par dilution *versus* 90 cupules par dilution.

★ Cas de 30 titrages virologiques à partir d'une même dilution.

Lorsque, à partir d'une même dilution, 30 titrages différents sont effectués, 30 valeurs de l'indice N.P.P. sont obtenues. Quels que soient les essais, 1, 2 ou 3, dont les résultats sont rapportés dans le Tableau 15 entre les valeurs extrêmes de l'indice N.P.P., il existe une différence d'au moins un logarithme. Par exemple, pour l'essai 2, alors que dans le meilleur des cas une concentration maximum de $1,5.10^4$ N.P.P.U.C./ml (titrage n° 1) est déterminée, dans le cas le plus défavorable, il est égal à $1,5.10^3$ N.P.P.U.C./ml (titrage n° 30). Il en est de même pour les essais 1 et 3 :
[Essai 1: $2,4.10^5$ N.P.P.U.C./ml (titrage n°1) et $2,4.10^4$ N.P.P.U.C./ml (titrage n°20); essai 3: $1,1.10^5$ N.P.P.U.C./ml (titrage n°3) et $4,0.10^3$ N.P.P.U.C./ml (titrage n° 8)]
Ce qui revient à admettre qu'il existe, dans le cas de 3 inoculums par dilution, une variation d'au moins une puissance de 10 dans l'estimation de la densité virale. Ceci est d'ailleurs en conformité avec les valeurs donnant les limites de confiance pour un indice N.P.P. bien déterminé. D'après les tables de DE MAN (1975), pour un nombre caractéristique (N.C.) de 3; 2; 1 par exemple, le N.P.P. égal à 15 varie de 5 à 51.

La meilleure estimation de la densité est alors donnée par le "nombre caractéristique somme" défini dans le paragraphe I - 1-4-1 de la première partie. Ainsi, répéter 30 titrages à 3 inoculums par dilution revient à faire un seul titrage avec 90 inoculums par dilution. Dans ce dernier cas, la valeur calculée de l'indice N.P.P. est bien encadrée par les valeurs extrêmes des différents indices N.P.P. trouvés à partir de 3 inoculums par dilution.

Entre les valeurs extrêmes des indices N.P.P. portées dans le Tableau 15, il existe toute une série de valeurs intermédiaires. Si nous considérons l'essai 2 comme étant celui où il y a le moins de cas aberrants dans les N.C. , les valeurs intermédiaires N.P.P. pour cet essai sont représentées

TABLEAU 15

Estimation de la densité virale à partir de 30 Titrages provenant de la même dilution

ESSAI N° 1				
Titrage n°	30 titrages avec 3 inoculums par dilution			
	3 x 0,1 ml			N.P.P.U.C./ml
	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	
1	3	3	3	> $2,4.10^5$ ($1,0.10^5$ - $1,4.10^6$)
2	3	3	3	d°
3	3	3	3	d°
4	3	3	3	d°
5	3	3	3	d°
6	3	3	3	d°
7	3	3	2	$1,1.10^5$ ($3,0.10^4$ - $4,8.10^5$)
8	3	3	2	d°
9	3	3	3	> $2,4.10^5$ ($1,0.10^5$ - $1,4.10^6$)
10	3	3	3	d°
11	3	3	3	d°
12	3	3	3	d°
13	3	3	2	$1,1.10^5$ ($3,0.10^4$ - $4,8.10^5$)
14	3	3	3	> $2,4.10^5$ ($1,0.10^5$ - $1,4.10^6$)
15	3	3	3	d°
16	3	3	3	d°
17	3	3	3	d°
18	3	3	3	d°
19	3	3	3	d°
20	3	3	0	$2,4.10^4$ ($1,0.10^4$ - $1,4.10^5$)
21	3	3	3	> $2,4.10^5$ ($1,0.10^5$ - $1,4.10^6$)
22	3	3	3	d°
23	3	3	2	$1,1.10^5$ ($3,0.10^4$ - $4,8.10^5$)
24	3	3	3	> $2,4.10^5$ ($1,0.10^5$ - $1,4.10^6$)
25	3	3	3	d°
26	3	3	1	$5,0.10^4$ ($2,0.10^4$ - $2,4.10^5$)
27	3	3	2	$1,1.10^5$ ($3,0.10^4$ - $4,8.10^5$)
28	3	3	3	> $2,4.10^5$ ($1,0.10^5$ - $1,4.10^6$)
29	3	3	3	d°
30	3	3	3	d°
Σ	90	90	80	$2,2.10^5$ ($1,6.10^5$ - $2,9.10^5$)

N.P.P.U.C. : nombre le plus probable d'unités cytopathogènes
( ) : les nombres entre parenthèses indiquent la limite de confiance à 95%
Σ : nombre caractéristique somme

TABLEAU 15 (suite)

ESSAI N° 2				
Titrage n°	30 titrages avec 3 inoculums par dilution			
	3 x 0,1 ml			N.P.P.U.C./ml
	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	
1	3	2	1	$1,5.10^4$ ($5,0.10^3$ - $5,1.10^4$)
2	3	2	0	$9,0.10^3$ ($3,0.10^3$ - $3,9.10^4$)
3	3	0	0	$2,3.10^3$ ($7,0.10^2$ - $1,3.10^4$)
4	3	1	1	$7,0.10^3$ ($2,0.10^3$ - $2,8.10^4$)
5	2	2	0	$2,1.10^3$ ($8,0.10^2$ - $6,3.10^3$)
6	3	2	1	$1,5.10^4$ ($5,0.10^3$ - $5,1.10^4$)
7	3	1	0	$4,0.10^3$ ($2,0.10^3$ - $2,1.10^4$)
8	3	1	0	$4,0.10^3$ ($2,0.10^3$ - $2,1.10^4$)
9	3	1	0	d°
10	3	2	0	$9,0.10^3$ ($3,0.10^3$ - $3,9.10^4$)
11	3	0	0	$2,3.10^3$ ($7,0.10^2$ - $1,3.10^4$)
12	3	1	1	$7,0.10^3$ ($2,0.10^3$ - $2,8.10^4$)
13	2	1	0	$1,5.10^3$ ($5,0.10^2$ - $5,0.10^3$)
14	3	2	0	$9,0.10^3$ ($3,0.10^3$ - $3,9.10^4$)
15	3	1	1	$7,0.10^3$ ($2,0.10^3$ - $2,8.10^4$)
16	3	2	1	$1,5.10^4$ ($5,0.10^3$ - $5,1.10^4$)
17	3	2	1	d°
18	3	1	0	$4,0.10^3$ ($2,0.10^3$ - $2,1.10^4$)
19	2	2	0	$2,1.10^3$ ($8,0.10^2$ - $6,3.10^3$)
20	3	0	0	$2,3.10^3$ ($7,0.10^2$ - $1,3.10^4$)
21	3	0	0	d°
22	3	2	0	$9,0.10^3$ ($3,0.10^3$ - $3,9.10^4$)
23	3	2	1	$1,5.10^4$ ($5,0.10^3$ - $5,1.10^4$)
24	3	2	0	$9,0.10^3$ ($3,0.10^3$ - $3,9.10^4$)
25	3	0	0	$2,3.10^3$ ($7,0.10^2$ - $1,3.10^4$)
26	3	2	1	$1,5.10^4$ ($5,0.10^3$ - $5,1.10^4$)
27	3	0	0	$2,3.10^3$ ($7,0.10^2$ - $1,3.10^4$)
28	3	1	1	$7,0.10^3$ ($2,0.10^3$ - $2,8.10^4$)
29	3	0	0	$2,3.10^3$ ($7,0.10^2$ - $1,3.10^4$)
30	2	1	0	$1,5.10^3$ ($5,0.10^2$ - $5,0.10^3$)
Σ	86	36	10	$4,3.10^3$ ($3,4.10^3$ - $5,4.10^3$)

TABLEAU 15 (Suite et fin)

ESSAI N° 3				
Titrage n°	30 titrages avec 3 inoculums par dilution			
	3 x 0,1 ml			N.P.P.U.C./ml
	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	
1	3	2	1	$1,5.10^4$ ($5,0.10^3$ - $5,1.10^4$)
2	3	3	0	$2,4.10^4$ ($1,0.10^4$ - $1,4.10^5$)
3	3	3	2	$1,1.10^5$ ($3,0.10^4$ - $4,8.10^5$)
4	3	3	1	$5,0.10^4$ ($2,0.10^4$ - $2,4.10^5$)
5	3	3	0	$2,4.10^4$ ($1,0.10^4$ - $1,4.10^5$)
6	3	3	2	$1,1.10^5$ ($3,0.10^4$ - $4,8.10^5$)
7	3	3	1	$5,0.10^4$ ($2,0.10^4$ - $2,4.10^5$)
8	3	1	0	$4,0.10^3$ ($2,0.10^3$ - $2,1.10^4$)
9	3	3	1	$5,0.10^4$ ($2,0.10^4$ - $2,4.10^5$)
10	3	3	1	d°
11	3	3	1	d°
12	3	3	1	d°
13	3	3	2	$1,1.10^5$ ($3,0.10^4$ - $4,8.10^5$)
14	3	3	0	$2,4.10^4$ ($1,0.10^4$ - $1,4.10^5$)
15	3	3	1	$5,0.10^4$ ($2,0.10^4$ - $2,4.10^5$)
16	3	3	1	d°
17	3	3	2	$1,1.10^5$ ($3,0.10^4$ - $4,8.10^5$)
18	3	3	0	$2,4.10^4$ ($1,0.10^4$ - $1,4.10^5$)
19	3	3	1	$5,0.10^4$ ($2,0.10^4$ - $2,4.10^5$)
20	3	3	1	d°
21	3	3	0	$2,4.10^4$ ($1,0.10^4$ - $1,4.10^5$)
22	3	3	0	d°
23	3	2	1	$1,5.10^4$ ($5,0.10^3$ - $5,1.10^4$)
24	3	3	2	$1,1.10^5$ ($3,0.10^4$ - $4,8.10^5$)
25	3	3	2	d°
26	3	3	0	$2,4.10^4$ ($1,0.10^4$ - $1,4.10^5$)
27	3	3	0	d°
28	3	3	1	$5,0.10^4$ ($2,0.10^4$ - $2,4.10^5$)
29	3	3	1	d°
30	3	3	1	d°
Σ	90	86	27	$3,3.10^4$ ($2,6.10^4$ - $4,2.10^4$)

dans le Tableau 16. Ces valeurs N.P.P. correspondent à des N.C. obtenus en effectuant, pour chaque titrage et chaque dilution, la somme cumulée des cupules "positives". Le graphe, déduit de ces valeurs, représenté par la Figure 33 montre qu'au dessus de 40 inoculums par dilution, le raport $E = \frac{L_s - L_i}{d}$ qui représente l'erreur relative de la densité virale diminue très faiblement, de l'ordre de 1/100, d'un titrage à un autre. Ainsi, pour les titrages n° 16 et 17, la différence $\Delta\ (E_{16} - E_{17}) = 0,67 - 0,66 = 0,01$. De cette constatation, il apparaît qu'il faut utiliser au minimum 40 inoculums par dilution lorsque la technique du N.P.P. est employée pour le titrage des virus.

★ Cas de 30 titrages virologiques à partir de 30 dilutions différentes.

L'utilisation de plusieurs dilutions en parallèle par titrage offre l'avantage de rendre indépendant chaque résultat. Dans le cas d'une erreur de dilution, seul le résultat de ce titrage est affecté. Aussi, nous est-il apparu souhaitable de déterminer si la variation d'un logarithme, constatée entre les valeurs extrêmes des indices N.P.P. correspondant aux 30 titrages obtenus à partir d'une même dilution, pouvait être augmentée ou diminuée dans le cas de 30 titrages effectués à partir de 30 dilutions différentes.

- Les 3 séries de 30 valeurs de l'indice N.P.P., obtenues chacune à partir de 30 dilutions différentes, sont consignées dans le Tableau 17. Pour chaque essai, une variation entre les valeurs extrêmes de l'indice N.P.P. d'au moins un logarithme est constatée. Par exemple, pour l'essai 1, alors que dans le meilleur des cas, une concentration maximum de $2,4.10^5$ N.P.P.U.C./ml (titrage n° 3) est déterminée, dans le cas le plus défavorable, il est trouvé $2,4.10^4$ N.P.P.U.C./ml (titrage n° 2). Il en est de même pour les essais 2 et 3 :
[Essai 2 : $2,4.10^4$ N.P.P.U.C./ml (titrage n° 21) et $2,3.10^3$ N.P.P.U.C./ml (titrage n° 8); essai 3 : $1,1.10^5$ N.P.P.U.C./ml (titrage n° 27) et $4,0.10^3$ N.P.P.U.C./ml (titrage n° 20)]. Cet écart entre les 30 titrages différents correspond bien à la précision de l'indice N.P.P., lorsque 3 inoculums par dilution sont utilisés.

- La comparaison des deux modes de titrage (30 x 3 inoculums par dilution et 1 x 90 inoculums par dilution) comme l'indiquent les Tableaux 17 et 18, montre que la valeur de l'indice N.P.P. obtenu à partir de 90 inoculums par dilution (essai 1 : $2,2.10^5$ N.P.P.U.C./ml; essai 2 : $4,3.10^3$ N.P.P.U.C./ml; essai 3 : $3,3.10^4$ N.P.P.U.C./ml) se situe entre les valeurs extrêmes des N.P.P. obtenus à partir des 30 titrages différents.

TABLEAU 16

Evaluation de la précision de l'indice N.P.P.
en fonction du nombre d'inoculums par dilution

Titrage n°	Nombre de cupules inoculées	N.C.	N.P.P.U.C./ml = d	$\frac{L_s - L_i}{d}$
1	3	3; 2; 1	14,93 (4,44-50,21)	3,07
2	6	6; 4; 1	12,02 (4,75-30,39)	2,13
3	9	9; 4; 1	6,65 (2,83-15,63)	1,92
4	12	12; 5; 2	6,86 (3,31-14,20)	1,59
5	15	14; 7; 2	4,33 (2,47- 7,59)	1,18
6	18	17; 9; 3	5,06 (3,01- 8,49)	1,08
7	21	20; 10; 3	4,97 (3,04- 8,12)	1,02
8	24	23; 11; 3	4,89 (3,07- 7,80)	0,97
9	27	26; 12; 3	4,83 (3,09- 7,55)	0,92
10	30	29; 14; 3	5,08 (3,31- 7,79)	0,88
11	33	32; 14; 3	4,74 (3,14- 7,15)	0,84
12	36	35; 15; 4	4,91 (3,30- 7,29)	0,81
13	39	37; 16; 4	4,14 (2,89- 5,94)	0,74
14	42	40; 18; 4	4,31 (3,04- 6,12)	0,71
15	45	43; 19; 5	4,44 (3,16- 6,24)	0,69
16	48	46; 21; 6	4,73 (3,40- 6,58)	0,67
17	51	49; 23; 7	5,00 (3,62- 6,90)	0,66
18	54	52; 24; 7	4,96 (3,62- 6,79)	0,64
19	57	54; 26; 7	4,54 (3,38- 6,10)	0,60
20	60	57; 26; 7	4,41 (3,30- 5,90)	0,59
21	63	60; 26; 7	4,29 (3,23- 5,71)	0,58
22	66	63; 28; 7	4,40 (3,32- 5,82)	0,57
23	69	66; 30; 8	4,59 (3,49- 6,04)	0,56
24	72	69; 32; 8	4,69 (3,58- 6,15)	0,55
25	75	72; 32; 8	4,57 (3,50- 5,96)	0,54
26	78	75; 34; 9	4,75 (3,66- 6,17)	0,53
27	81	78; 34; 9	4,63 (3,58- 5,99)	0,52
28	84	81; 35; 10	4,70 (3,65- 6,06)	0,51
29	87	84; 35; 10	4,59 (3,57- 5,89)	0,50
30	90	86; 36; 10	4,28 (3,37- 5,44)	0,48

N.C. : nombre caractéristique
N.P.P.U.C. : nombre le plus probable d'unités cytopathogènes
L_s : limite supérieure
L_i : limite inférieure
( ) : les nombres entre parenthèses indiquent la limite de confiance à 95%

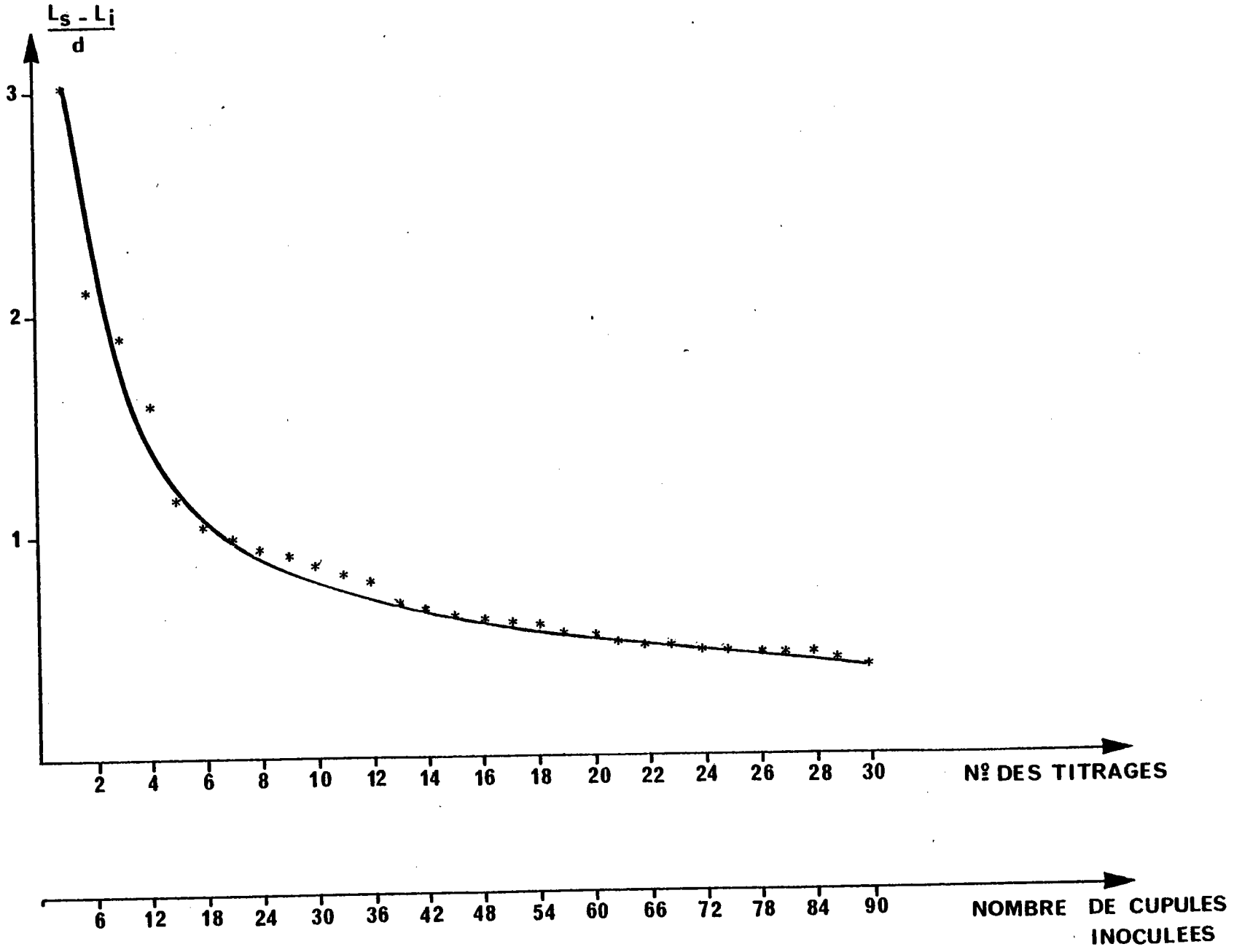


FIGURE 33

Précision de l'indice N.P.P. en fonction du nombre d'inoculums par dilution

TABLEAU 17

Valeurs du N.P.P. à partir de 30 titrages provenant de 30 dilutions différentes

ESSAI N° 1				
Titrage n°	30 titrages avec 3 inoculums par dilution			
	3 x 0,1 ml			N.P.P.U.C./ml
	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	
1	3	3	2	$1,1.10^5$ ($3,0.10^4$ - $4,8.10^5$)
2	3	3	0	$2,4.10^4$ ($1,0.10^4$ - $1,4.10^5$)
3	3	3	3	> $2,4.10^5$ ($1,0.10^5$ - $1,4.10^6$)
4	3	3	1	$5,0.10^4$ ($2,0.10^4$ - $2,4.10^5$)
5	3	3	1	d°
6	3	3	2	$1,1.10^5$ ($3,0.10^4$ - $4,8.10^5$)
7	3	3	0	$2,4.10^4$ ($1,0.10^4$ - $1,4.10^5$)
8	3	3	3	> $2,4.10^5$ ($1,0.10^5$ - $1,4.10^6$)
9	3	3	3	d°
10	3	3	1	$5,0.10^4$ ($2,0.10^4$ - $2,4.10^5$)
11	3	3	2	$1,1.10^5$ ($3,0.10^4$ - $4,8.10^5$)
12	3	3	2	d°
13	3	3	1	$5,0.10^4$ ($2,0.10^4$ - $2,4.10^5$)
14	3	3	1	d°
15	3	3	2	$1,1.10^5$ ($3,0.10^4$ - $4,8.10^5$)
16	3	3	1	$5,0.10^4$ ($2,0.10^4$ - $2,4.10^5$)
17	3	3	3	> $2,4.10^5$ ($1,0.10^5$ - $1,4.10^6$)
18	3	3	2	$1,1.10^5$ ($3,0.10^4$ - $4,8.10^5$)
19	3	3	2	d°
20	3	3	2	d°
21	3	3	1	$5,0.10^4$ ($2,0.10^4$ - $2,4.10^5$)
22	3	3	0	$2,4.10^4$ ($1,0.10^4$ - $1,4.10^5$)
23	3	3	2	$1,1.10^5$ ($3,0.10^4$ - $4,8.10^5$)
24	3	3	3	> $2,4.10^5$ ($1,0.10^5$ - $1,4.10^6$)
25	3	3	2	$1,1.10^5$ ($3,0.10^4$ - $4,8.10^5$)
26	3	3	1	$5,0.10^4$ ($2,0.10^4$ - $2,4.10^5$)
27	3	3	2	$1,1.10^5$ ($3,0.10^4$ - $4,8.10^5$)
28	3	3	2	d°
29	3	3	3	> $2,4.10^5$ ($1,0.10^5$ - $1,4.10^6$)
30	3	3	2	$1,1.10^5$ ($3,0.10^4$ - $4,8.10^5$)
Σ	90	90	52	$8,6.10^4$ ($6,5.10^4$ - $1,1.10^5$)

N.P.P.U.C. : nombre le plus probable d'unités cytopathogènes
( ) : les nombres entre parenthèses indiquent la limite de confiance à 95%
Σ : nombre caractéristique somme

TABLEAU 17 (suite)

ESSAI N° 2				
Titrage n°	30 titrages avec 3 inoculums par dilution			
	3 x 0,1 ml			N.P.P.U.C./ml
	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	
1	3	3	0	$2,4.10^4$ ($1,0.10^4$ - $1,4.10^5$)
2	3	3	0	d°
3	3	3	0	d°
4	3	3	0	d°
5	3	3	0	d°
6	3	2	0	$9,0.10^3$ ($3,0.10^3$ - $3,9.10^4$)
7	3	2	0	d°
8	3	0	0	$2,3.10^3$ ($7,0.10^2$ - $1,3.10^4$)
9	3	3	0	$2,4.10^4$ ($1,0.10^4$ - $1,4.10^5$)
10	3	3	0	d°
11	3	3	0	d°
12	3	3	0	d°
13	3	1	1	$7,0.10^3$ ($2,0.10^3$ - $2,8.10^4$)
14	3	1	0	$4,0.10^3$ ($2,0.10^3$ - $2,1.10^4$)
15	3	1	0	d°
16	3	3	0	$2,4.10^4$ ($1,0.10^4$ - $1,4.10^5$)
17	3	3	0	d°
18	3	3	0	d°
19	3	3	0	d°
20	3	2	0	$9,0.10^3$ ($3,0.10^3$ - $3,9.10^4$)
21	3	3	0	$2,4.10^4$ ($1,0.10^4$ - $1,4.10^5$)
22	3	3	0	d°
23	3	3	0	d°
24	3	3	1	$5,0.10^4$ ($2,0.10^4$ - $2,4.10^5$)
25	3	3	1	d°
26	3	3	1	d°
27	3	3	0	$2,4.10^4$ ($1,0.10^4$ - $1,4.10^5$)
28	3	3	0	d°
29	3	3	0	d°
30	3	3	0	d°
Σ	90	72	4	$1,4.10^4$ ($1,1.10^4$ - $1,8.10^4$)

TABLEAU 17(Suite et fin)

ESSAI N° 3				
Titrage n°	30 titrages avec 3 inoculums par dilution			
	3 x 0,1 ml			N.P.P.U.C./ml
	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	
1	3	3	1	$5,0.10^4$ ($2,0.10^4$ - $2,4.10^5$)
2	3	3	1	d°
3	3	3	0	$2,4.10^4$ ($1,0.10^4$ - $1,4.10^5$)
4	3	3	0	d°
5	3	3	1	$5,0.10^4$ ($2,0.10^4$ - $2,4.10^5$)
6	3	3	0	$2,4.10^4$ ($1,0.10^4$ - $1,4.10^5$)
7	3	3	1	$5,0.10^4$ ($2,0.10^4$ - $2,4.10^5$)
8	3	3	1	d°
9	3	3	1	d°
10	3	3	0	$2,4.10^4$ ($1,0.10^4$ - $1,4.10^5$)
11	3	3	0	d°
12	3	3	0	d°
13	3	3	0	d°
14	3	3	0	d°
15	3	2	0	$9,0.10^3$ ($3,0.10^3$ - $3,9.10^4$)
16	3	3	0	$2,4.10^4$ ($1,0.10^4$ - $1,4.10^5$)
17	3	3	1	$5,0.10^4$ ($2,0.10^4$ - $2,4.10^5$)
18	3	3	0	$2,4.10^4$ ($1,0.10^4$ - $1,4.10^5$)
19	3	3	1	$5,0.10^4$ ($2,0.10^4$ - $2,4.10^5$)
20	3	1	0	$4,0.10^3$ ($2,0.10^3$ - $2,1.10^4$)
21	3	3	0	$2,4.10^4$ ($1,0.10^4$ - $1,4.10^5$)
22	3	3	0	d°
23	3	3	0	d°
24	3	3	0	d°
25	3	3	1	$5,0.10^4$ ($2,0.10^4$ - $2,4.10^5$)
26	3	3	1	d°
27	3	3	2	$1,1.10^5$ ($3,0.10^4$ - $4,8.10^5$)
28	3	3	1	$5,0.10^4$ ($2,0.10^4$ - $2,4.10^5$)
29	3	3	0	$2,4.10^4$ ($1,0.10^4$ - $1,4.10^5$)
30	3	2	0	$9,0.10^3$ ($3,0.10^3$ - $3,9.10^4$)
Σ	90	86	13	$2,6.10^4$ ($2,0.10^4$ - $3,3.10^4$)

TABLEAU 18

Estimation de la densité virale à partir d'un titrage de 90 inoculums par dilution

Essai n°	Titrages avec 90 inoculums par dilution			
	90 x 0,1 ml			N.P.P.U.C./ml
	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	
1	90	90	80	$2,2.10^5$ ($1,6.10^5$-$2,9.10^5$)
2	86	36	10	$4,3.10^3$ ($3,4.10^3$-$5,4.10^3$)
3	90	86	27	$3,3.10^4$ ($2,6.10^4$-$4,2.10^4$)

N.P.P.U.C. : nombre le plus probable d'unités cytopathogènes

( ) : les nombres entre parenthèses indiquent la limite de confiance à 95%

- Pour connaître l'influence précise du facteur dilution, l'hypothèse que les 30 titrages obtenus proviennent d'une même dilution est émise. Dans ce cas, l'opération qui consiste à faire la somme par dilution du nombre de cupules, où le tapis cellulaire a présenté un effet cytopathogène, conduit à un nombre caractéristique somme qui donne un indice N.P.P. pour chaque essai : (essai 1 : $8,6.10^4$ N.P.P.U.C./ml; essai 2 : $1,4.10^4$ N.P.P.U.C./ml; essai 3 : $2,6.10^4$ N.P.P.U.C./ml). Ces valeurs, comparées à celles obtenues à partir de 90 inoculums par dilution, diffèrent statistiquement dans deux cas sur trois (essais 1 et 2). Seuls, les titres viraux de l'essai 3 ($2,6.10^4$ N.P.P.U.C./ml *versus* $3,3.10^4$ N.P.P.U.C./ml) ne diffèrent pas.

Ces observations montrent qu'il est préférable d'effectuer 30 dilutions différentes pour faire les 30 titrages considérés. L'examen des différents N.C., présentés dans le Tableau 17, indique que ceux-ci reviennent avec une certaine fréquence. Aussi, est-on en droit de se demander si les fréquences observées étaient réellement compatibles avec les fréquences théoriques. Les résultats sont rapportés dans le Tableau 19. Ils montrent que, pour les essais 1 et 3, il y a une bonne correspondance entre les deux fréquences. Par contre, pour l'essai 2, la concordance est moins nette car, par exemple, le N.C. 3; 3; 0, qui aurait dû être observé 8 fois, l'a été 20 fois. Ces considérations soulignent que, quel que soit le nombre de cupules utilisées par dilution (3 ou 90), les résultats obtenus concordent avec la théorie du N.P.P., à savoir :

- grande variabilité dans les estimations de la densité virale quand sont employés 3 inoculums par dilution. On peut alors sous-estimer ou sur-estimer la valeur de l'indice N.P.P. d'un facteur de 10;
- faible variabilité dans l'estimation de la densité virale quand sont utilisés 90 inoculums par dilution.

I - 2-2-2-2 Comparaison: 3 flacons par dilution *versus* 96 cupules par dilution.

Pour connaître la validité de notre méthode de titrage (96 cupules par dilution) nous l'avons comparée à la méthode du N.P.P. utilisant 3 flacons par dilution. Nous avons recherché si les deux modes d'utilisation de la technique du N.P.P. donnaient des concentrations identiques.

En partant d'une suspension virale de virus poliomyélitique type I, nous constatons, d'après les résultats consignés dans le Tableau 20,

TABLEAU 19

Comparaison entre les nombres caractéristiques observés et les nombres caractéristiques théoriques

Essai n°	N.C.	Probabilité théorique	Fréquence	
			théorique	observée
1	3; 3; 2	0,4230	12,69	13
	3; 3; 1	0,3079	9,23	8
	3; 3; 3	0,1938	5,81	6
	3; 3; 0	0,0747	2,24	3
2	3; 3; 0	0,2787	8,36	20
	3; 2; 0	0,2080	8,34	3
	3; 3; 1	0,1245	3,73	3
	3; 1; 0	0,0925	2,77	2
	3; 1; 1	0,0413	1,24	1
	3; 0; 0	0,0102	0,31	1
3	3; 3; 0	0,3645	10,93	15
	3; 3; 1	0,3180	9,54	11
	3; 3; 2	0,0927	2,78	1
	3; 2; 0	0,0920	2,76	2
	3; 1; 0	0,0077	0,23	1

N.C. : nombre caractéristique

TABLEAU 20

Titres viraux (N.P.P.U.C./ml) obtenus après titrage selon deux modes d'utilisation de la technique du N.P.P. :
3 flacons par dilution *versus* 96 cupules par dilution
(suspension de virus poliomyélitique type I)

Nature de l'échantillon	Essai n°	Dilutions	Nombre de flacons ou de cupules ayant présenté un E.C.P.				N.P.P.U.C./ml		Différence statistique (95%)
			96 cupules/dilution		3 flacons/dilution		96 cupules/dilution	3 flacons/dilution	
Suspension de virus poliomyélitique type I	1	10^{-2}	N.C.	87	N.C.	3	$1,2.10^{4}$ ($9,5.10^{3}$-$1,5.10^{4}$)	$2,0.10^{4}$ ($1,0.10^{4}$-$1,4.10^{5}$)	N.S.
		10^{-3}		32		3			
		10^{-4}		7		3			
		10^{-5}		0		0			
	2	10^{-2}	N.C.	95	N.C.	3	$1,7.10^{4}$ ($1,3.10^{4}$-$2,1.10^{4}$)	$5,0.10^{4}$ ($2,0.10^{4}$-$2,4.10^{5}$)	N.S.
		10^{-3}		27		3			
		10^{-4}		9		3			
		10^{-5}		0		1			
	3	10^{-2}	N.C.	84	N.C.	3	$1,0.10^{4}$ ($8,5.10^{3}$-$1,3.10^{4}$)	$2,0.10^{4}$ ($1,0.10^{4}$-$1,4.10^{5}$)	N.S.
		10^{-3}		35		3			
		10^{-4}		3		3			
		10^{-5}		0		0			

N.C. : nombre caractéristique
N.S. : différence statistique
( ) : le nombre entre parenthèses indiquent la limite de confiance à 95%
E.C.P. : effet cytopathogène
N.P.P.U.C. : nombre le plus probable d'unités cytopathogènes

qu'il n'y a pas de différence statistique significative entre les deux méthodes utilisées :
(essai 1 : $1,2.10^4$ N.P.P.U.C./ml *versus* $2,0.10^4$ N.P.P.U.C./ml;
essai 2 : $1,7.10^4$ N.P.P.U.C./ml *versus* $5,0.10^4$ N.P.P.U.C./ml;
essai 3 : $1,0.10^4$ N.P.P.U.C./ml *versus* $2,0.10^4$ N.P.P.U.C./ml)
L'examen des intervalles de confiance, dans le cas de 96 inoculums par dilution, montre que les indices N.P.P. obtenus pour les trois essais :
(essai 1 : $1,2.10^4$ N.P.P.U.C./ml; essai 2 : $1,7.10^4$ N.P.P.U.C./ml;
essai 3 : $1,0.10^4$ N.P.P.U.C./ml) sont bien groupés, ne dépassant jamais $2,1.10^4$ N.P.P.U.C./ml(essai 2) pour la limite supérieure et $8,5.10^3$N.P.P.U.C./ml (essai 3) pour la limite inférieure. Ce même examen, dans le cas de 3 inoculums par dilution, met en relief une plus grande dispersion des résultats puisque, entre la limite la plus faible et la limite la plus grande, il existe un facteur de 10 [$1,0.10^4$N.P.P.U.C./ml(essai 3) - $2,4.10^5$ N.P.P.U.C./ml (essai 2)].
La précision apportée aux valeurs des indices N.P.P. est alors faible car, dans les mêmes conditions, une concentration virale maximale de $2,4.10^5$ N.P.P.U.C./ml aurait pu être obtenue, soit environ une puissance de 10 de plus.

Quand les titres viraux,obtenus à partir des éluats des échantillons d'effluent, sont comparés, nous notons, d'après les valeurs rapportées dans le Tableau 21, que dans 6 essais sur 7, il y a une bonne concordance dans les résultats. Cependant, pour le premier essai, une différence d'un facteur de 6 est constatée entre les deux valeurs.

I - 2-2-3 Influence du volume d'inoculum par rapport à une même surface de tapis cellulaire.

Dans l'étude des différents facteurs pouvant affecter le titrage des virus, il nous est apparu judicieux de rechercher quel était le volume d'inoculum le plus favorable pour déterminer un E.C.P. à partir d'une surface donnée de tapis cellulaire, par exemple celle d'une cupule.

Pour les auteurs utilisant une micro-méthode de titrage, le volume d'inoculum par cupule varie de 0,025 ml à 0,2 ml (BEYTOUT et coll., 1975; BLOCK et coll., 1979; BRICOUT et coll.,1974; DENIS et coll., 1975 et 1977 RAGER-ZISMAN et MERIGAN,1973). Notre choix s'est fixé sur le plus faible volume (0,025 ml). Nous l'avons comparé à 0,1 ml, inoculum utilisé dans la technique d'origine.

TABLEAU 21

Titres viraux (N.P.P.U.C./l) obtenus après titrage selon deux méthodes d'utilisation de la technique du N.P.P. : 3 flacons par dilution *versus* 96 cupules par dilution (effluent - virus indigène)

Nature de l'échantillon	Volume analysé (l)	Essai n°	N.P.P.U.C./l		Différence statistique (95%)
			96 cupules par dilution	3 flacons par dilution	
Concentrat d'effluent (Cagnes-sur-Mer)	10	1	340,0 (270,0 - 430,0)	53,0 (20,0 - 150,0)	S.
	10	2	1,0 (0,5 - 2,5)	1,7 (0,5 - 7,0)	N.S.
	10	3	2,0 (1,0 - 3,7)	1,0 (0,2 - 5,2)	N.S.
	10	4	2,0 (1,0 - 3,7)	2,2 (0,5 - 9,5)	N.S.
	10	5	1,5 (0,7 - 3,2)	1,0 (0,2 - 5,2)	N.S.
	10	6	1,7 (0,5 - 7,0)	2,2 (0,5 - 9,5)	N.S.
	10	7	1,0 (0,5 - 2,5)	2,2 (0,5 - 9,5)	N.S.

S. : différence significatice
N.S. : différence non significative
( ) : les nombres entre parenthèses indiquent la limite de confiance à 95%
N.P.P.U.C. : nombre le plus probable d'unités cytopathogènes

Dans le Tableau 22, la comparaison des nombres caractéristiques montre que, quel que soit le volume d'inoculum utilisé par cupule (0,025 ml et 0,1 ml), ceux-ci sont très voisins (essai 1 : 87; 32; 7 *vs* 90; 40;8 - essai 2 : 95; 27; 9 *vs* 96; 34; 10 - essai 3 : 84; 35; 3 *vs* 90; 36; 6). Il en résulte que les titres viraux, obtenus en utilisant un inoculum de 0,1 ml par cupule, sont trois à quatre fois plus faibles (essai 1 : $0,4.10^4$ N.P.P.U.C./ml ; essai 2 : $0,5.10^4$ N.P.P.U.C./ml; essai 3 : $0,3.10^4$ N.P.P.U.C./ml) que ceux trouvés à partir d'un inoculum de 0,025 ml par cupule (essai 1: $1,4.10^4$ N.P.P.U.C./ml; essai 2 : $1,7.10^4$ N.P.P.U.C./ml; essai 3 : $1,0.10^4$ N.P.P.U.C./ml). La comparaison des titres viraux met en relief, pour les trois essais, une différence statistique significative.

Cette constatation est confirmée pour des eaux naturellement contaminées. Les résultats du Tableau 23 montrent aussi bien, pour l'affluent que pour l'effluent de la station d'épuration de Cannes, des concentrations virales différentes selon le volume d'inoculum testé (essai 3 : $1,9.10^4$ N.P.P.U.C./l *vs* $2,0.10^3$ N.P.P.U.C./l; essai 6 : $2,5.10^2$ N.P.P.U.C./l *vs* $7,1.10^1$ N.P.P.U.C./l). Pour tous les essais, soit 6 sur 6, il y a une différence statistique significative entre les concentrations virales calculées. L'analyse de variance à deux dimensions confirme le résultat donné par la simple comparaison des intervalles de confiance ($F_{obs.}[1,5] = 35,29 > F_{0,05}[1,5] = 6,61$) Dans l'essai n° 3, il y a une puissance, approchant de 10, qui différencie les deux titrages. Ceci tend à démontrer que le volume de 0,1 ml d'inoculum est trop important pour la surface cellulaire tapissant une cupule.

I - 2-2-4 Influence du nombre de dilutions mises en oeuvre.

L'observation, dans le Tableau 24, du nombre de cupules ayant présenté un E.C.P. aux différentes dilutions, montre que ce nombre pour l'échantillon non dilué (pur) est, dans la plupart des cas, très faible (essai 1:3/96; essai 5 : 2/96; essai 6 : 5/96). Il aurait alors été tentant de conclure, si les dilutions n'avaient pas été poursuivies, que le nombre de virus présents dans les échantillons d'eau de mer était très faible. L'examen des résultats montre, qu'au contraire, pour tous les essais, la dilution suivante donne un nombre de cupules "positives" très important (96/96). A partir des dilutions 10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3}, le N.C. le plus vraisemblable est déduit. Si la dilution 10^{-3} n'avait pas été effectuée, le N.C. 3; 96; 24 (essai 1) dont la probabilité est

TABLEAU 22

Titres viraux (N.P.P.U.C./ml) obtenus après ensemencement de deux volumes d'inoculum différents (suspension de virus poliomyélitique type I)

Nature de l'échantillon	Essai n°	Dilution	Nombre de cupules ayant présenté un E.C.P.				N.P.P.U.C./ml		Différence statistique (95%)
			0,025 ml/cupule		0,1 ml/cupule		0,025 ml/cupule	0,1 ml/cupule	
Suspension de virus poliomyélitique type I	1	10^{-2}	N.C.	87	N.C.	90	$1,2.10^{4}$	$0,4.10^{4}$	S.
		10^{-3}		32		40	$(9,5.10^{3}-1,5.10^{4})$	$(3,1.10^{3}-0,5.10^{4})$	
		10^{-4}		7		8			
	2	10^{-2}	N.C.	95	N.C.	96	$1,7.10^{4}$	$0,5.10^{4}$	S.
		10^{-3}		27		34	$(1,3.10^{4}-2,1.10^{4})$	$(4,1.10^{3}-0,7.10^{4})$	
		10^{-4}		9		10			
	3	10^{-2}	N.C.	84	N.C.	90	$1,0.10^{4}$	$0,3.10^{4}$	S.
		10^{-3}		35		36	$(8,5.10^{3}-1,3.10^{4})$	$(2,8.10^{3}-0,4.10^{4})$	
		10^{-4}		3		6			

N.C. : nombre caractéristique
S. : différence significative
E.C.P. : effet cytopathogène
( ) : les nombres entre parenthèses indiquent la limite de confiance à 95%
N.P.P.U.C. : nombre le plus probable d'unités cytopathogènes

TABLEAU 23

Titres viraux (N.P.P.U.C./l) obtenus après ensemencement de deux volumes d'inoculum différents (affluent et effluent - virus indigènes)

Nature de l'échantillon	Volume analysé (l)	Essai n°	N.P.P.U.C./l		Différence statistique (95%)
			0,025 ml/cupule	0,1 ml/cupule	
Concentrat d'affluent (Cannes)	10	1	$4{,}0.10^3$ ($2{,}9.10^3$-$5{,}6.10^3$)	$2{,}0.10^3$ ($1{,}6.10^3$-$2{,}6.10^3$)	S.
	10	2	$5{,}0.10^3$ ($3{,}7.10^3$-$6{,}7.10^3$)	$1{,}6.10^3$ ($1{,}2.10^3$-$2{,}0.10^3$)	S.
	10	3	$1{,}9.10^4$ ($1{,}5.10^4$-$2{,}7.10^4$)	$2{,}0.10^3$ ($1{,}6.10^3$-$2{,}6.10^3$)	S.
Concentrat d'effluent (Cannes)	10	4	$2{,}7.10^2$ ($1{,}8.10^2$-$4{,}1.10^2$)	$1{,}0.10^2$ ($0{,}7.10^2$-$1{,}5.10^2$)	S.
	10	5	$3{,}8.10^1$ ($2{,}5.10^1$-$5{,}7.10^1$)	$1{,}1.10^1$ ($0{,}7.10^1$-$1{,}5.10^1$)	S.
	10	6	$2{,}5.10^2$ ($1{,}9.10^2$-$3{,}2.10^2$)	$7{,}1.10^1$ ($5{,}6.10^1$-$9{,}3.10^1$)	S.
F_{obs} (1,5) = 35,29 > $F_{0,05}$ (1,5) = 6,61					S.

S. : différence significative
( ) : les nombres entre parenthèses indiquent la limite de confiance à 95%
N.P.P.U.C. : nombre le plus probable d'unités cytopathogènes

TABLEAU 24

Titres viraux (N.P.P.U.C./l) obtenus en fonction du nombre de dilutions mises en oeuvre (eau de mer - virus indigènes)

Nature de l'échantillon	Volume analysé (l)	Essai n°	Dilutions				N.P.P.U.C./l
			pur	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	
eau de mer (C_7)	20	1	3 *	96	24	2	$1,9.10^3$ ($1,4.10^3$-$2,4.10^3$)
	20	2	40 *	96	40	3	$2,7.10^3$ ($2,1.10^3$-$3,5.10^3$)
	20	3	6 *	96	42	5	$2,9.10^3$ ($2,3.10^3$-$3,8.10^3$)
	20	4	15 *	96	56	8	$4,4.10^3$ ($3,4.10^3$-$5,6.10^3$)
	20	5	2 *	96	6	0	$1,3.10^3$ ($1,0.10^3$-$1,6.10^3$)
	20	6	5 *	96	40	4	$2,8.10^3$ ($2,1.10^3$-$3,6.10^3$)
	20	7	20 *	96	8	2	$1,4.10^3$ ($1,1.10^3$-$1,8.10^3$)
	20	8	10 *	96	6	1	$1,3.10^3$ ($1,0.10^3$-$1,7.10^3$)

N.P.P.U.C. : nombre le plus probable d'unités cytopathogènes
( ) : les nombres entre parenthèses indiquent la limite de confiance à 95%
* : apparition d'un effet inhibiteur

très faible,aurait donné un indice N.P.P. peu conforme avec la réalité ($6,1.10^1$ N.P.P.U.C./l au lieu de $1,9.10^3$ N.P.P.U.C./l). La mise en évidence de ce phénomène suggère que les concentrats présentent un pouvoir inhibiteur (DENIS et coll.,1977; MAGNUSSON et coll.,1965; SHUVAL et coll.,1971). Il en résulte qu'il faut nécessairement poursuivre les dilutions jusqu'à 10^{-4} pour l'eau de mer. Cet effet inhibiteur n'a pas été mis en évidence dans les éluats provenant d'échantillons d'affluents et d'effluents (Cannes et Cagnes-sur-Mer).

I - 2-2-5 Comparaison de deux techniques de titrage : plages *versus* N.P.P. avec 96 inoculums par dilution.

★ La méthode des plages considérée comme méthode de référence a été comparée à la méthode du N.P.P. utilisant 96 inoculums par dilution. Les résultats des analyses virologiques sont consignés dans le Tableau 25.Dans tous les cas, les intervalles de confiance donnés par la méthode des plages sont plus larges que ceux obtenus à partir de la méthode du N.P.P. Cependant, pour chaque essai, la comparaison statistique des titres viraux pris deux à deux ne fait apparaître aucune différence significative pour P = 0,05. Les deux méthodes donnent donc des titres viraux équivalents.

★ - Dans le cas théorique où le même volume d'inoculum est ensemencé, d'une part - pour la méthode des plages - dans un seul flacon, d'autre part - pour la méthode du N.P.P. - dans chacune des 96 cupules d'une plaque de microtitration, comparons les titres U.F.P.⊕ et N.P.P. [déduits respectivement des Tables Geigy (1973) et d'expériences précédentes (résultats non publiés)] portés dans le Tableau 26. Les valeurs du rapport $\frac{L_s - L_i}{d}$ obtenues pour différentes densités virales d et pour les deux distributions considérées [POISSON (méthode des plages) et GALTON (méthode du N.P.P.)] sont représentées graphiquement par la Figure 34. Ainsi, pour une distribution de POISSON, plus le nombre de particules comptées est faible, plus le rapport $\frac{L_s - L_i}{d}$ est grand. Cette observation traduit le fait , dans le cas où d est inférieur à 65, que la méthode des plages est plus imprécise que la méthode du N.P.P. utilisant 96 inoculums par dilution.En d'autres termes, il faut compter 65 U.F.P. pour que les 2 méthodes de titrage aient le même niveau de précision.Pour une distribution de GALTON,

- dans le cas de 96 inoculums par dilution, quel que soit le nombre de particules virales (1 à 100), la même précision dans le rapport $\frac{L_s - L_i}{d}$ est constatée. Au delà de 65 particules, c'est la méthode des plages qui donne, pour ce même rapport, une valeur plus faible.

⊕ U.F.P. : unité formant plage

TABLEAU 25

Titres viraux obtenus avec deux techniques de titrage : N.P.P. avec 96 inoculums par dilution *versus* plages (eau de mer - virus indigènes)

Nature de l'échantillon	Volume analysé (l)	Essai n°	Dilutions 10^{-x} avec x =	Nombre de cupules "positives" ou de plages			Titrage		Différence statistique (95%)
				Méthode des 96 inoculums par dilution		Méthode des plages	N.P.P.U.C./l	U.F.P./l	
Eau de mer (C_7)	20	1	1 2 3	N.C.	96 24 2	+++ 13 2	$1,9.10^3$ $(1,4.10^3-2,4.10^3)$	$1,6.10^3$ $(8,6.10^2-2,8.10^3)$	N.S.
	20	2	1 2 3	N.C.	96 40 3	+++ +++ 5	$2,7.10^3$ $(2,1.10^3-3,5.10^3)$	$6,3.10^3$ $(2,0.10^3-1,5.10^4)$	N.S.
	20	3	1 2 3	N.C.	96 42 5	+++ 15 3	$2,9.10^3$ $(2,3.10^3-3,8.10^3)$	$1,9.10^3$ $(1,1.10^3-3,1.10^3)$	N.S.
	20	4	1 2 3	N.C.	96 56 8	+++ 26 3	$4,4.10^3$ $(3,4.10^3-5,6.10^3)$	$3,3.10^3$ $(2,1.10^3-4,8.10^3)$	N.S.
	20	5	1 2 3	N.C.	96 6 0	+++ +++ 2	$1,3.10^3$ $(1,0.10^3-1,6.10^3)$	$2,5.10^3$ $(3,0.10^2-9,0.10^3)$	N.S.
	20	6	1 2 3	N.C.	96 40 4	+++ 12 0	$2,8.10^3$ $(2,1.10^3-3,6.10^3)$	$1,5.10^3$ $(7,8.10^2-2,6.10^3)$	N.S.
	20	7	1 2 3	N.C.	96 8 2	+++ +++ 2	$1,4.10^3$ $(1,1.10^3-1,8.10^3)$	$2,5.10^3$ $(3,0.10^2-9,0.10^3)$	N.S.
	20	8	1 2 3	N.C.	96 6 1	+++ 10 1	$1,3.10^3$ $(1,0.10^3-1,7.10^3)$	$1,3.10^3$ $(6,0.10^2-2,3.10^3)$	N.S.

N.C.: nombre caractéristique
N.S.: différence non significative
( ) : les nombres entre parenthèses indiquent la limite de confiance à 95%
N.P.P.U.C.: nombre le plus probable d'unités cytopathogènes
+++ : plages confluentes
U.F.P.: unité formant plages

TABLEAU 26

Précision des méthodes : plages *versus* N.P.P.

- Cas où le nombre de particules virales est < 100 -

Méthodes		N.C.	N.P.P. ou nombre de plages	Intervalle de confiance (L_i - L_s)	$\frac{L_s - L_i}{d}$
Plages (Poisson)		-	4	1,09 - 10,24	2,28
		-	7	2,81 - 14,42	1,65
		-	10	4,80 - 18,39	1,35
		-	15	8,40 - 24,74	1,08
		-	20	12,22 - 30,89	0,93
		-	30	20,24 - 42,83	0,75
		-	40	28,57 - 54,47	0,65
		-	50	37,11 - 65,92	0,57
		-	70	54,57 - 88,44	0,48
		-	80	63,48 - 99,57	0,45
N.P.P. (Galton)	N = 96	60;09;01	0,98	0,77 - 1,25	0,49
		96;23;40	3,80	2,93 - 4,91	0,52
		96;63;10	10,72	8,42 - 13,64	0,49
		96;74;12	14,49	11,52 - 18,23	0,46
		96;91;28	31,27	24,70 - 39,59	0,48
		96;95;45	57,46	43,87 - 75,25	0,55
	N = 5	4;1;0	1,70	0,70 - 4,70	2,35
		4;2;0	2,20	0,90 - 5,70	2,18
		5;2;0	5,00	2,00 - 17,00	3,00
		5;3;0	8,00	3,00 - 25,00	2,75
		5;4;0	13,00	5,00 - 39,00	2,61
		5;3;2	14,00	6,00 - 36,00	2,14
		5;4;2	22,00	9,00 - 59,00	2,27
		5;5;0	24,00	10,00 - 95,00	3,54
		5;5;1	30,00	10,00 -130,00	4,00
		5;5;2	50,00	20,00 -200,00	3,60
		5;5;3	90,00	30,00 -300,00	3,00

N.P.P. : = d : nombre le plus probable
N.C. : nombre caractéristique
N. : nombre total de cupules inoculées
L_i : limite inférieure (95%)
L_s : limite supérieure (95%)

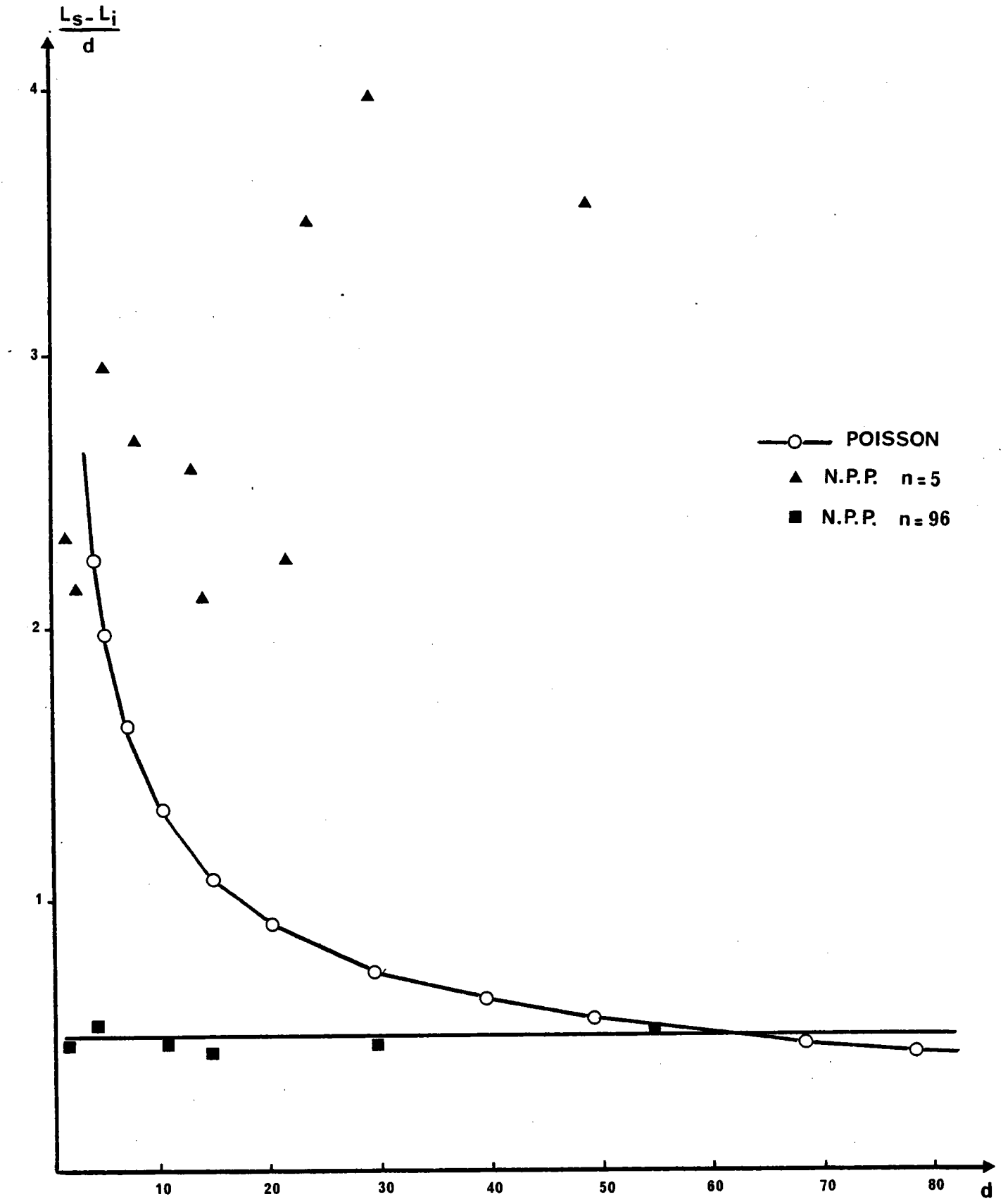


FIGURE 34

Comparaison de 2 techniques de titrage

• dans le cas de 5 inoculums par dilution (déjà plus précis que 3 inoculums par dilution), une variation très importante du rapport $\frac{Ls - Li}{d}$ est notée et ceci quel que soit le nombre de particules comptées (1 à 100). Aucune courbe ne peut être tracée car les points de coordonnées sont dispersés dans tous les sens. C'est, de toutes les observations, le cas le plus mauvais.

- Dans le cas pratique de notre expérimentation, le volume d'inoculum étant différent selon la technique de titrage utilisée (0,1 ml par flacon pour la méthode des plages et 0,025 ml par cupule pour la méthode du N.P.P.) la précision des méthodes est 4 fois plus faible. Il faut compter 15 U.F.P. ou N.P.P.U.C. pour que les deux méthodes de numération aient le même niveau de précision. Au dessous de cette valeur, c'est la technique du N.P.P. qui est meilleure; au dessus, c'est celle des plages.

★ Il faut cependant souligner que la comparaison des méthodes de numération est faussée du fait que, dans la méthode des plages :
- d'une part, toutes les lyses cellulaires ne correspondent pas toujours à une particule virale. Ainsi, dans nos conditions expérimentales, nous avons constaté lors du repiquage des plages, que selon les échantillons, 5 à 50% des plages ne correspondaient pas à un foyer infectieux (résultats non publiés). Ces pourcentages sont inférieurs à ceux donnés par BERTUCCI et coll., 1978; FANNIN et coll., 1978; LEON et coll., 1978 qui trouvent respectivement 73%, 70% et 40%.
- d'autre part, certains virus ne donnant pas de plages peuvent être mis en évidence en milieu liquide. Les virus comptés par les deux méthodes ne sont pas forcément les mêmes.

De toutes ces considérations, il ressort, néanmoins, que les deux méthodes de titrage ne donnent pas des résultats fondamentalement différents. Sous certaines conditions, la méthode du N.P.P. utilisant 96 inoculums par dilution peut donner des résultats plus précis que la méthode des plages.

CHAPITRE II

CONCENTRATION DES ENTEROVIRUS PAR ADSORPTION-ELUTION SUR POUDRE DE VERRE

L'Homme, vacciné, malade ou porteur de germes, élimine dans ses selles un grand nombre de virus entériques (plus de 1 000 000 par gramme). Des concentrations de virus infectieux - virus poliomyélitique, coxsackie virus, échovirus, adénovirus, réovirus - pouvant atteindre 100 000 particules par litre, ont été découvertes dans les eaux usées non traitées. Ces virus, capables de résister aux méthodes classiques de traitement des eaux usées (épuration, chloration) peuvent survivre pendant plusieurs semaines et de ce fait, être retrouvés loin de la source de contamination, même en faible quantité. Pour les mettre en évidence, il est nécessaire de les concentrer. La méthode utilisant l'adsorption-élution sur poudre de verre s'avérant très prometteuse, dans un premier temps, nous avons tenté d'améliorer l'utilisation de l'appareillage; dans un deuxième temps, nous avons étudié l'influence du pH dans l'étape de l'élution.

En effet, alors que SARRETTE et coll. (1977 a et b) développent la méthode et que SCHWARTZBROD et LUCENA-GUTIERREZ (1978) améliorent le matériel, LUCENA-GUTIERREZ (1979) décrit en détail toutes les étapes des essais pour la réalisation de l'appareil final. A partir de ce système, nous avons proposé quelques modifications d'ordre pratique (HUGUES et coll.,1979 b) en s'appuyant sur le même principe théorique que celui développé par SARETTE et coll. (1977 a). Ce principe est fondé sur le fait que les particules virales peuvent prendre différentes charges électriques selon le pH du milieu dans lequel elles se trouvent. Si le milieu est à un pH inférieur au point isoélectrique (pH_i) du virus, ce dernier chargé positivement se fixe électivement sur un support chargé de signe contraire. Lorsque le pH du milieu est supérieur au pH_i, la charge du virus change de signe et il y a libération du virus. Ainsi, lorsque le virus poliomyélitique qui présente, selon les auteurs, un point isoélectrique [FLOYD et SHARP,1979 (pH_i =8,2); SARETTE et coll.,1977a (pH_i = 7,8)] ou deux [MANDEL 1971,(pH_i = 4,2 et 7)], se trouve dans l'eau acidifiée à pH 3,5 en contact avec la poudre de verre dont la charge électrique est constamment négative quelles que soient les variations de pH du milieu , il y a adsorption du virus sur la poudre de verre, par attraction des charges électriques.

Partant de ces données, SARETTE et coll. (1977b) ont proposé d'utiliser la poudre de verre comme support. Ils préconisent, dans un premier temps, d'acidifier l'eau à pH 3,5 afin que les virus présents soient chargés positivement et se fixent sur la poudre de verre chargée négativement; dans un deuxième temps,d'éluer les virus en faisant passer au travers de la poudre de verre

un tampon glycine pH 11,5 afin que les virus chargés négativement se décrochent de la poudre de verre et puissent être recueillis alors dans le concentrat sous un faible volume.

II - 1 MATERIEL ET METHODES.

II - 1-1 Appareillage et mise en oeuvre.

★ Ampoule.

L'appareillage est constitué, comme le montre la Figure 35, d'une ampoule à décanter en verre Pyrex de 2 litres, dont la partie supérieure est reliée à une trompe à vide. Cette ampoule, prolongée dans sa partie inférieure par une colonne en verre Pyrex d'une hauteur de 350 mm et de diamètre de 50 mm, comprend deux tubulures dont l'une est mise en communication avec le récipient d'eau à analyser et l'autre vient s'adapter, grâce à un joint souple, type Rotulex (Sovirel 691-53 et 692-09) à un élément secondaire en verre Pyrex comprenant deux robinets et une tubulure. Entre les deux robinets, un verre fritté, de porosité 20-40 µm (Sovirel 812-23) est soudé à la colonne. Le tout est relié grâce à des raccords normalisés, type SVL (Sovirel C.N. 681-19 et 682-19). Pour simplifier la manipulation de l'appareil, des robinets à vide du type Rotaflo (Sovirel 722-62 et 722-72) ont été utilisés.

Après avoir stérilisé à l'autoclave à + 120°C, pendant 20 minutes, le système en verre Pyrex, l'ampoule et l'élément secondaire sont montés sur le bâti fixe et sont reliés (tubulures n° 4, 7 et 8) à une tubulure commune raccordée à une trompe à vide (tubulure n° 9). Tous les robinets sont alors fermés. Après introduction par la tubulure n° 10 de 100 g de poudre de verre préalablement stérilisés à l'autoclave à + 120°C, pendant 20 minutes, l'appareil est prêt à fonctionner.

★ Filtration de l'eau.

Les robinets n° 1 et 2 sont ouverts, l'eau à analyser est aspirée et monte à travers la colonne en entraînant la poudre de verre jusqu'au tiers inférieur de l'ampoule. Tout l'échantillon passe à travers le filtre dynamique formé par la poudre de verre. Au départ, pour éviter toute turbulence de l'eau dans l'ampoule, pouvant entraîner une perte de la poudre de verre, le débit de l'eau aspirée est peu important (∿ 2 litres/h). Lorsque l'ampoule est pleine d'eau, le robinet n° 2 est ouvert à fond. Une fois l'échantillon d'eau passé, les robinets n° 1 et 2 sont fermés.

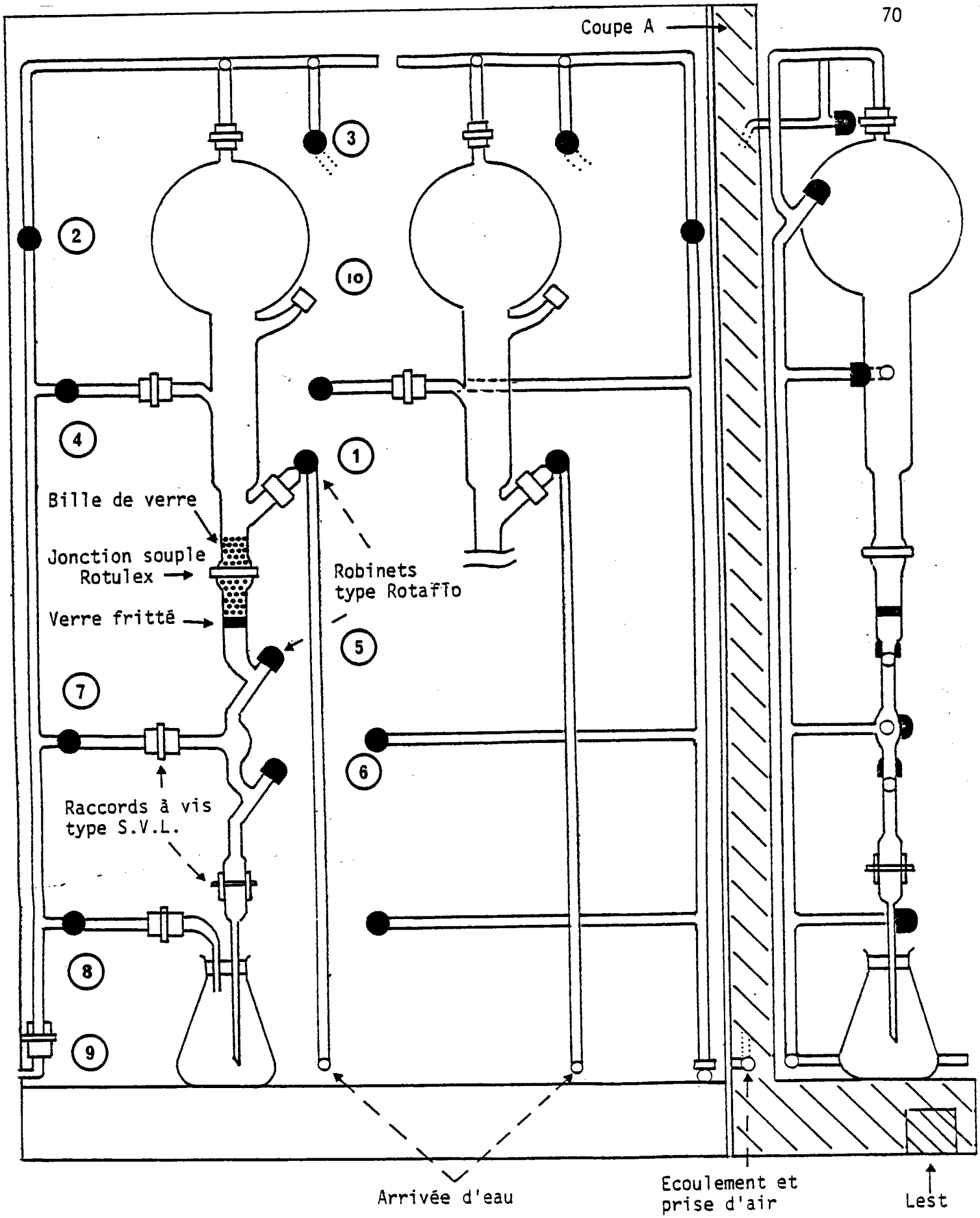


FIGURE 35

Appareillage pour concentrer les virus par la méthode d'adsorption-élution sur poudre de verre

★ Elimination de l'eau.

Après décantation de la poudre de verre sur le verre fritté dans la colonne, les robinets n° 2, 3 et 4 sont ouverts : l'eau, dans l'appareil, est aspirée par le vide. Lorsque le niveau d'eau est arrivé à la hauteur de la tubulure n° 4, les robinets n° 2, 3 et 4 sont fermés.Afin d'éliminer l'eau restant dans la colonne, les robinets n° 5 et 7 sont ouverts jusqu'à ce que le niveau d'eau atteigne 1 cm au dessus de la poudre de verre. A ce moment, les robinets n° 5 et 7 sont fermés.

★ Elution des virus.

Par la tubulure n° 10, 100 ml d'éluant sont introduits. Après fermeture de cette dernière, les robinets n° 5 et 7 sont ouverts et le cheminement de l'éluant est suivi à travers la poudre de verre qui se colore au fur et à mesure du passage de l'éluant. Lorsque le front d'élution arrive à la partie inférieure de la colonne, le robinet n° 7 est fermé, puis les robinets n° 6 et 8 sont ouverts L'éluat coule alors dans le flacon stérile et seuls, les 25 premiers ml sont recueillis.

Avec cet appareil, lorsque l'eau est peu chargée de matières en suspension,il est possible d'en filtrer environ 200 litres à l'heure. Dans le cas d'eaux usées brutes, le débit de l'appareil est plus faible car des matières solides peuvent obturer partiellement les tubulures reliées à la trompe à vide. De plus, un colmatage de la poudre de verre, par des débris solides, peut limiter le passage de l'éluant sur cette poudre de verre. Si celle-ci est réutilisable après le passage d'eaux faiblement chargées en matières organiques, elle ne l'est plus après le passage d'eaux usées brutes ou traitées. Il faut, dans ce cas, travailler chaque fois avec de la poudre de verre neuve.

II - 1-2 Cultures cellulaires.

Pour tous les essais, nous avons utilisé des cultures de cellules en lignée continue de type K.B. (EAGLE et coll.,1956; PUCK et FISHER,1956) Les cellules ont été entretenues en tapis cellulaire à la concentration de 50 000 cellules par cm^2 à + 37°C, avec un milieu de croissance L.Y. pH 7,2, contenant 10% de sérum de veau nouveau-né . Pendant la phase de survie, le même milieu L.Y. est utilisé sans sérum de veau nouveau-né. Les cellules ont été cultivées en flacons de verre borosilicatés stériles de 75 cm^2 de surface et entretenues

par repiquage après trypsination, tous les sept jours environ.

II - 1-3 Virus.

Pour les essais en laboratoire, le virus poliomyélitique type I, souche Sabin L.S.c.2.ab, a été utilisé comme virus test, tout au long de l'expérimentation. A partir de la suspension virale, pour tous les essais, des dilutions décimales ont été effectuées dans une solution saline tamponnée de Hanks (HANKS et WALLACE,1949) complétée au moment de l'expérimentation par 1% de sérum de veau pour éviter les agrégats de virus, et 1% de solution d'antibiotiques et anti-fungique (voir première partie, chapitre I, paragraphe I - 2-1-1) pour éliminer tout risque de contamination bactériologique.

Durant toute l'étude, le même lot de virus poliomyélitique a été utilisé et préparé selon la méthode décrite en première partie, chapitre I, paragraphe I -2-1-2. Pour la quantification des virus, la technique du nombre le plus probable, utilisant 96 inoculums par dilution, a été appliquée selon les modalités décrites au chapitre I de cette même partie, paragraphe I - 2-2-1

II - 1-4 Eaux de travail.

Deux types d'eaux ont été utilisés dans cette étude :

- l'eau d'alimentation ayant subi un traitement au chlore,
- l'eau usée ayant subi un traitement biologique (effluent).

Tous les échantillons d'eau ont été collectés aseptiquement dans des récipients plastiques de 20 litres stérilisés à l'ozone et contenant, pour les échantillons d'eau d'alimentation, une quantité suffisante de solution au thiosulfate de sodium stérile à 12,5 %, pour neutraliser l'oxydant (4 ml par bidon de 20 litres).

Les prélèvements d'eau d'alimentation ont été effectués au Laboratoire. Les prélèvements d'eaux usées épurées proviennent de la station d'épuration de Cagnes-sur-Mer. Les échantillons d'effluent ont été prélevés à la sortie des décanteurs secondaires, à 20 cm de profondeur, avec des seaux plastiques stériles de 10 litres avec lesquels il a été procédé au remplissage des récipients de 20 litres par l'intermédiaire d'entonnoirs plastiques stériles. Toutes ces opérations ont été réalisées avec des gants et du matériel ayant subi, avant et après chaque prélèvement, une décontamination par traitement à l'eau de Javel. Le transport des échantillons au Laboratoire a toujours été réalisé dans les 45 minutes suivant le moment du prélèvement.

Les caractéristiques principales de ces eaux, pendant la période d'expérimentation, ont été consignées dans les Tableaux 27 et 28. Toutes les eaux, avant filtration sur poudre de verre, sont homogénéisées par un agitateur centrifuge électrique (I.K.A. RW 47 D). Parallèlement à cette homogénéisation, l'échantillon est acidifié à pH 3,5 à l'aide d'acide chlorydrique technique par un système automatique de pompe péristaltique asservie à un régulateur de pH par modulation de largeur d'impulsion, type IM (Tacussel). Dans tous les cas, du chlorure d'aluminium est ajouté dans les échantillons d'eau, à une concentration finale de $5{,}0.10^{-4}$M, soit 0,12 g de poudre par litre d'échantillon.

II - 1-5 Liquide d'élution.

Cinq types d'éluants, à 2 pH différents (7 et 9 ou 9 et 11), ont été testés pour effectuer l'élution des particules virales :

- l'eau physiologique (8,5 g de Na Cl/l) ajustée aux pH 7 et 9 avec Na OH 0,1 M;
- l'eau physiologique additionnée de 3% d'extrait de boeuf en pâte (Biokar) ajustée aux pH 7 et 9 avec Na OH M;
- le tampon boraté pH 9 de composition suivante :
  - . 80 ml Na Cl 1,5 M
  - . 100 ml H_3 BO_3 0,5 M
  - . 24 ml Na OH M
  - . eau distillée q.s.p. 1000 ml

  est ajusté à pH 7 avec H Cl 0,1 M
- le tampon boraté pH 9,addionné de 3% d'extrait de boeuf ayant un pH voisin de 7, est ajusté avec Na OH M pour obtenir des éluants à pH 7 et 9;
- le tampon glycine de composition suivante :
  - . glycine 0,05 M
  - . rouge de phénol 0,01 mg/ml

  ajusté avec Na OH M aux pH 9 et 11.

Ce sont les mêmes lots de tampon boraté et glycine,préparés en début d'étude, répartis en flacons d'un litre et stockés à +4°C, qui ont servi tout au long de l'expérimentation.

II - 1-6 Décontamination de concentrats.

Les 25 premiers ml de concentrats recueillis sont additionnés de 2,5 ml d'un mélange d'antibiotiques et d'anti-fungique dont la composition a

TABLEAU 27

Caractéristiques physico-chimiques de l'eau de boisson durant la période d'expérimentation

Paramètres physico-chimiques	Eau de boisson
pH à 20°C	7,4 à 7,6
Résistivité (Ω/cm)	1670 à 1690
Titre hydrotimétrique (°F)	32,5 à 36,5
Titre alcalimétrique complet (°F)	14,3 à 14,7
Sulfates (mg/l)	150,0 à 170,0
Chlorures (mg/l)	16,3 à 17,1

TABLEAU 28

Caractéristiques physico-chimiques de l'effluent de Cagnes-sur-Mer durant la période d'expérimentation

Paramètres physico-chiques	Effluent
pH	7,8 à 8,0
M.E.S.T. (mg/l)	15 à 30
D.C.O. (mg/l)	50 à 80
$D.B.O._5$ (mg/l)	20 à 30

été donnée en première partie du chapitre I, paragraphe I - 2-1-1.
L'éluant ainsi traité est placé à + 4°C pendant une nuit.

II - 1-7 Inoculation au système cellulaire.

Le concentrat et ses dilutions sont alors répartis chacun dans un flacon de 75 cm^2 contenant un tapis cellulaire continu selon le protocole décrit au chapitre I de cette même partie, paragraphe I - 2-1-3-1.
Les méthodes statistiques, utilisées pour la comparaison des titres viraux, sont décrites en première partie, chapitre I, paragraphe I -1-5.

II - 2 PROTOCOLE EXPERIMENTAL.

II - 2-1 Expérimentation A.

★ But.

L'expérimentation a consisté à étudier l'influence du pH de l'éluant (tampon boraté additionné de 3% d'extrait de boeuf) sur le taux de récupération des virus.

★ Moyens.

- Au cours de cette expérimentation, il a été utilisé, dans un premier temps, des eaux d'alimentation (expérimentation A_1).
  - 9 essais, à raison de 2 par semaine, à des jours différents, ont été réalisés en ajoutant dans 20 l d'eau des concentrations croissantes ($\simeq 5{,}0.10^1$ à $\simeq 5.0.10^3$ N.P.P.U.C./l) de virus poliomyélitique type I.
  - Pour chaque essai, l'échantillon d'eau à analyser, après homogénéisation pendant 20 minutes à l'aide d'un agitateur centrifuge électrique, est divisé en deux fractions de 10 litres.
  - Chacune des fractions est concentrée séparément le même jour sur poudre de verre :
    - pour la première fraction, l'élution est réalisée avec du tampon boraté additionné de 3% d'extrait de boeuf à pH 7,
    - pour la deuxième fraction, l'élution est réalisée avec du tampon boraté additionné de 3% d'extrait de boeuf à pH 9,
- Au cours de cette même expérimentation, il a été utilisé, dans un deuxième temps des eaux usées traitées (expérimentation A_2)
  - 5 essais, à raison de 1 par semaine, ont été réalisés sur 20 litres d'eau.
  - Pour chaque essai, l'échantillon d'eau à analyser, après homogénéisation pendant 20 minutes à l'aide d'un agitateur centrifuge électrique, est divisé en

deux fractions de 10 litres.

- Chacune des fractions est concentrée séparément, le même jour, sur de la poudre de verre :
  - pour la première fraction, l'élution est réalisée à pH 7 avec le tampon boraté additionné de 3% d'extrait de boeuf,
  - pour la deuxième fraction, l'élution est réalisée à pH 9 avec le même tampon.

II - 2-2 Expérimentation B.

★ But.

L'expérimentation a consisté à étudier l'influence de l'extrait de boeuf dans l'étape de l'élution, aux deux pH considérés 7 et 9.

★ Moyens.

- Tout au long de cette expérimentation, l'eau d'alimentation a été utilisée. 6 essais, à raison d'un par semaine, ont été réalisés en ajoutant, dans 40 litres d'eau, une même quantité de virus poliomyélitique type I (≃15 N.P.P.U.C./l).
- Pour chaque essai, l'échantillon à analyser, après homogénéisation pendant 20 mn à l'aide d'un agitateur centrifuge électrique, est divisé en 4 fractions de 10 litres.
- Chaque fraction est concentrée séparément, le même jour, sur de la poudre de verre :

= Expérimentation B_1.

- pour la première fraction, l'élution est réalisée avec de l'eau physiologique à pH 7,
- pour la deuxième fraction, l'élution est réalisée avec de l'eau physiologique additionnée de 3% d'extrait de boeuf à pH 7,
- pour la troisième fraction, l'élution est réalisée avec de l'eau physiologique à pH 9,
- pour la quatrième fraction, l'élution est réalisée avec de l'eau physiologique additionnée de 3% d'extrait de boeuf à pH 9.

= Expérimentation B_2.

- pour la première fraction, l'élution est réalisée avec du tampon boraté à pH 7,
- pour la deuxième fraction, l'élution est réalisée avec du tampon boraté additionné de 3% d'extrait de boeuf à pH 7,
- pour la troisième fraction, l'élution est réalisée avec du tampon boraté à pH 9,
- pour la quatrième fraction, l'élution est réalisée avec du tampon boraté additionné de 3% d'extrait de boeuf à pH 9.

II - 2-3 Expérimentation C.

★ But.

L'expérimentation a consisté à comparer l'efficacité des éluants suivants : tampon boraté additionné de 3% d'extrait de boeuf pH 9 *versus* tampon glycine pH 9 et pH 11,5.

★ Moyens.

- Au cours de cette expérimentation, des eaux usées traitées ont été utilisées.
- 10 essais, à raison de 2 par semaine, à des jours différents, ont été réalisés à partir de 30 litres d'effluent.
- Pour chaque essai, l'échantillon d'eau à analyser, après homogénéisation pendant 20 minutes à l'aide d'un agitateur centrifuge électrique, est divisé en trois fractions de 10 litres.
- Chacune des fractions est concentrée séparément sur de la poudre de verre, le même jour :
  - pour la première fraction, l'élution est réalisée avec du tampon boraté additionné de 3% d'extrait de boeuf à pH 9,
  - pour la deuxième fraction, l'élution est réalisée avec du tampon glycine à pH 9,
  - pour la troisième fraction, l'élution est réalisée avec du tampon glycine à pH 11,5.

II - 3 RESULTATS ET DISCUSSION.

II - 3-1 Influence du pH de l'éluant dans la récupération des particules virales et le rendement de la méthode (Expérimentation A).

Le Tableau 29 montre que, quelle que soit la concentration de virus inoculés dans l'eau d'alimentation (50 à 5000 N.P.P.U.C./l), la variation du pH de l'éluant entre 7 et 9 n'influe pas sur les titres viraux trouvés. Ainsi, pour une concentration virale initiale de 50 N.P.P.U.C./l, il est retrouvé, après concentration sur de la poudre de verre et élution à pH 7 et pH 9, soit des concentrations de virus identiques (essai 1 : 11 N.P.P.U.C./l à pH 7 et 10 N.P.P.U.C./l à pH 9), soit des concentrations très voisines (essai 2 : 27 N.P.P.U.C./l à pH 7 et 24 N.P.P.U.C./l à pH 9). Il en est de même pour les concentrations virales

TABLEAU 29

Population virale obtenue par concentration sur poudre de verre et élution avec tampon boraté à 3% d'extrait de boeuf, à pH 7 et pH 9 (eau d'alimentation - virus poliomyélitique de laboratoire)

Expérimentation A_1

Concentration virale initiale* (N.P.P.U.C./l)	Essai n°	Concentration virale après élution (N.P.P.U.C./l)		Différence statistique
		pH 7	pH 9	
$5,2.10^1$ ($4,0.10^1$ - $6,4.10^1$)	1	$1,1.10^1$ ($0,7.10^1$ - $1,5.10^1$)	$1,0.10^1$ ($0,7.10^1$ - $1,4.10^1$)	N.S.
$5,0.10^1$ ($3,8.10^1$ - $6,1.10^1$)	2	$2,7.10^1$ ($2,1.10^1$ - $3,5.10^1$)	$2,4.10^1$ ($1,8.10^1$ - $3,0.10^1$)	N.S.
$6,1.10^1$ ($4,2.10^1$ - $9,2.10^1$)	3	$6,0.10^1$ ($4,0.10^1$ - $9,0.10^1$)	$6,0.10^1$ ($4,0.10^1$ - $9,0.10^1$)	N.S.
$5,3.10^2$ ($4,8.10^2$ - $6,5.10^2$)	4	$1,5.10^2$ ($1,1.10^2$ - $2,1.10^2$)	$1,1.10^2$ ($0,8.10^2$ - $1,4.10^2$)	N.S.
$5,2.10^2$ ($4,1.10^2$ - $6,3.10^2$)	5	$1,6.10^2$ ($1,2.10^2$ - $2,3.10^2$)	$2,8.10^2$ ($2,2.10^2$ - $3,6.10^2$)	N.S.
$8,1.10^2$ ($6,3.10^2$ - $1,2.10^3$)	6	$8,3.10^2$ ($6,5.10^2$ - $1,1.10^3$)	$8,0.10^2$ ($6,2.10^2$ - $1,0.10^3$)	N.S.
$6,1.10^3$ ($4,3.10^3$ - $9,4.10^3$)	7	$1,6.10^3$ ($1,2.10^3$ - $2,3.10^3$)	$1,7.10^3$ ($1,2.10^3$ - $2,2.10^3$)	N.S.
$6,2.10^3$ ($4,4.10^3$ - $9,3.10^3$)	8	$1,8.10^3$ ($1,4.10^3$ - $2,4.10^3$)	$1,6.10^3$ ($1,2.10^3$ - $2,1.10^3$)	N.S.
$7,8.10^3$ ($6,1.10^3$ - $1,1.10^4$)	9	$1,0.10^4$ ($9,0.10^3$ - $1,4.10^4$)	$7,6.10^3$ ($5,9.10^3$ - $9,8.10^3$)	N.S.

* : concentration obtenue à partir d'une suspension virale titrant $4,0.10^9$ N.P.P.U.C./l

( ) : les nombres entre parenthèses indiquent la limite de confiance à 95%

N.S. : différence statistique non significative

N.P.P.U.C. : nombre le plus probable d'unités cytopathogènes

initiales plus importantes (500 à 5000 N.P.P.U.C./l). Dans presque tous les cas, des titres viraux très voisins sont obtenus après concentration et élution à pH 7 et pH 9 (essai 6 : 830 N.P.P.U.C./l à pH 7 et 800 N.P.P.U.C./l à pH 9;
essai 8 : 1800 N.P.P.U.C./l à pH 7 et 1600 N.P.P.U.C./l à pH 9)
L'analyse statistique confirme ces résultats et ne met en relief aucune différence statistique pour un seuil de sécurité de 95% ($F_{obs.}$ [1,8] < 1).

Ces résultats, applicables à l'eau de distribution, le sont aussi pour l'effluent de Cagnes-sur-Mer. Pour les 5 essais, comme le montrent les valeurs du Tableau 30, la mise en évidence des particules virales indigènes après élution est aussi facile à pH 7 qu'à pH 9. Les titres viraux alors trouvés (essai 1 : 560 N.P.P.U.C./l à pH 7 et 340 N.P.P.U.C./l à pH 9;
essai 5 : 40 N.P.P.U.C./l à pH 7 et 35 N.P.P.U.C./l à pH 9), ne diffèrent pas statistiquement d'une façon significative. Ces essais suggèrent que, quelle que soit la concentration des virus dans l'eau et quel que soit le système aqueux choisi, avec ou sans ajout de virus, le facteur pH (7 ou 9), dans nos conditions expérimentales, a peu d'influence dans l'étape de l'élution.

Nous avons alors calculé, pour les éluants aux pH 7 et 9, le rendement de l'appareil vis-à-vis de différents échantillons contaminés artifitiellement avec du virus poliomyélitique. Le nombre de virus retrouvés après élution aux deux pH considérés (Tableau 29) nous a permis de déterminer les pourcentages et les taux moyens de récupération. Ces résultats sont rassemblés dans le Tableau 31. Il montre que, quel que soit le pH d'élution, le pourcentage de récupération varie de 19% à 128%. Il n'y a pas de différence fondamentale, pour une même concentration virale, dans le taux de récupération des virus, quand l'élution s'effectue à pH 7 ou pH 9 (essai 1 : 21% à pH 7 et 19% à pH 9;
essai 6 : 102% à pH 7 et 99% à pH 9; essai 8 : 29% à pH 7 et 26% à pH 9).
Nos résultats, concernant les taux moyens de récupération des particules virales ($\bar{M}$ = 50% à 60%) présentes dans l'eau d'alimentation, sont proches de ceux de SARETTE et coll. (1977 a et 1978) et de SCHWARTZBROD et LUCENA-GUTIERREZ (1978) qui trouvent respectivement 50% et 55%. Pour une eau de rivière, SARETTE et coll. (1977 b) mettent en évidence des rendements légèrement inférieurs allant de 25% à 45%.

TABLEAU 30

Population virale obtenue par concentration sur poudre de verre et élution avec un tampon boraté additionné de 3% d'extrait de boeuf à pH 7 et pH 9 (eau usée traitée - virus indigène)

Expérimentation A_2

Essai n°	Concentration virale après élution N.P.P.U.C./l		Différence statistique
	pH 7	pH 9	
1	$5,60.10^2$ ($4,30.10^2$ - $7,10.10^2$)	$3,40.10^2$ ($2,70.10^2$ - $4,30.10^2$)	N.S.
2	$0,10.10^1$ ($0,05.10^1$ - $0,25.10^1$)	$0,20.10^1$ ($0,10.10^1$ - $0,37.10^1$)	N.S.
3	$0,20.10^1$ ($0,10.10^1$ - $0,37.10^1$)	$0,15.10^1$ ($0,07.10^1$ - $0,32.10^1$)	N.S.
4	$0,17.10^1$ ($0,07.10^1$ - $0,30.10^1$)	$0,10.10^1$ ($0,05.10^1$ - $0,25.10^1$)	N.S.
5	$4,00.10^1$ ($3,15.10^1$ - $5,20.10^1$)	$3,50.10^1$ ($2,80.10^1$ - $4,50.10^1$)	N.S.

( ) : les nombres entre parenthèses indiquent les limites de confiance à 95%

N.S. : différence statistique non significative

N.P.P.U.C : nombre le plus probable d'unités cytopathogènes

TABLEAU 31

Rendement de récupération des virus poliomyélitiques par concentration sur poudre de verre

Concentration virale initiale	Essai n°	Pourcentage de récupération			
		Eluant pH 7		Eluant pH 9	
≃ 50/1	1 2 3	21 54 98	$\overline{M}$ = 58	19 48 98	$\overline{M}$ = 55
≃ 500/1	4 5 6	28 31 102	$\overline{M}$ = 54	21 54 99	$\overline{M}$ = 58
≃ 5000/1	7 8 9	26 29 128	$\overline{M}$ = 61	28 26 97	$\overline{M}$ = 50

$\overline{M}$: taux moyen de récupération des virus poliomyélitiques

II - 3-2 Influence de l'extrait de boeuf (Expérimentation B).

Le Tableau 32 montre que, dans l'étape de l'élution, lorsque l'éluant utilisé est constitué seulement par du tampon borate ou de l'eau physiologique sans extrait de boeuf, il n'y a aucune récupération des particules virales. Par contre, les virus sont retrouvés facilement quand l'élution a lieu avec le tampon borate ou l'eau physiologique, additionnés de 3% d'extrait de boeuf et ceci quel que soit le pH de l'éluant -7 ou 9- (essai 3, cas où l'éluant est de l'eau physiologique additionnée de 3% d'extrait de boeuf : 15,8 N.P.P.U.C./l à pH 7 et 13,4 N.P.P.U.C./l à pH 9; essai 6, cas où l'éluant est du tampon borate additionné de 3% d'extrait de boeuf : 80,2 N.P.P.U.C./l à pH 7 et 82,0 N.P.P.U.C./l à pH 9).

Le Tableau 33 permet de mettre en évidence le rôle "tampon" de l'extrait de boeuf, quel que soit le pH (7 ou 9) du système éluant de départ. Ceci est dû au fait que, dans les 100 ml de tampon utilisé (tampon borate additionné de 3% d'extrait de boeuf), il y a 0,09 g de phosphates. Ces phosphates sont présents, à l'origine, dans la formule de fabrication de la pâte d'extrait de boeuf à la concentration de 3%. Aussi, quand l'éluant, constitué seulement par du tampon borate ou de l'eau physiologique sans extrait de boeuf, passe à travers la poudre de verre, le pH de cet éluant chute de 7 (ou 9) à environ 3,5. Cette acidification de l'éluant rend alors impossible toute élution.

II - 3-3 Comparaison des titres viraux obtenus après élution avec le tampon borate additionné de 3% d'extrait de boeuf et le tampon glycine (Expérimentation C).

Lorsque le tampon glycine est utilisé à pH 11,5, il est à craindre, comme l'ont souligné différents auteurs (FIELDS et METCALF, 1975; JACOBS et SOBSEY, 1978; METCALF et coll., 1974) une inactivation partielle de certains virus. Aussi, nous est-il apparu intéressant de le comparer au tampon borate additionné de 3% d'extrait de boeuf, afin de déterminer leur efficacité respective dans l'étape de l'élution des virus.

Les valeurs des titres viraux obtenues après concentration sur la poudre de verre, comme le montre le Tableau 34, sont différentes selon le tampon d'élution employé. Ainsi, pour un même pH 9 (tampon borate additionné de 3% d'extrait de boeuf et tampon glycine), il est trouvé, selon les essais 7 à 20 fois plus de virus lorsque le tampon borate additionné de 3% d'extrait de boeuf

TABLEAU 32

Populations virales récupérées après concentration sur poudre de verre et élution à différents pH
Expérimentations B_1 et B_2

Concentration virale initiale ★ (N.P.P.U.C./l)	Essai n°	Concentrations virales après élution (N.P.P.U.C./l)			
		pH 7		pH 9	
		T_1	T_2	T_3	T_4
16,0 (12,0 - 22,0)	1	< 0,1	6,7 (4,5 - 10,2)	< 0,1	6,0 (4,0 - 9,2)
15,0 (11,0 - 20,5)	2	< 0,1	6,2 (4,2 - 9,5)	< 0,1	6,0 (4,0 - 9,2)
15,2 (11,5 - 20,2)	3	< 0,1	15,8 (11,2 - 21,3)	< 0,1	13,4 (9,5 - 18,4)
		T_5	T_6	T_7	T_8
16,2 (12,5 - 21,8)	4	< 0,1	8,5 (6,0 - 12,0)	< 0,1	6,7 (4,5 - 10,0)
18,7 (14,7 - 24,7)	5	< 0,1	10,7 (7,7 - 15,0)	< 0,1	8,7 (6,2 - 12,5)
102,2 (78,7 - 132,7)	6	< 0,1	80,2 (62,2 - 103,2)	< 0,1	82,0 (63,2 -106,2)

T_1 : eau physiologique pH 7
T_2 : eau physiologique + extrait de boeuf pH 7
T_3 : eau physiologique pH 9
T_4 : eau physiologique + extrait de boeuf pH 9
T_5 : tampon boraté pH 7
T_6 : tampon boraté + extrait de boeuf pH 7
T_7 : tampon boraté pH 9
T_8 : tampon boraté + extrait de boeuf pH 9

★ : concentration obtenue à partir d'une suspension virale titrant $4,0.10^9$ N.P.P.U.C./l

( ) : les nombres entre parenthèses indiquent les limites de confiance à 95%

N.P.P.U.C. : nombre le plus probable d'unités cytopathogènes

TABLEAU 33

Variation du pH de l'éluant
après passage sur la poudre de verre

Nature de l'éluant	pH	
	avant élution	après élution
eau physiologique	7,0	3,6
	9,0	3,8
eau physiologique + 3% extrait de boeuf	7,0	6,8
	9,0	8,1
tampon boraté	7,0	3,3
	9,0	3,5
tampn boraté + 3% extrait de boeuf	7,0	6,7
	9,0	8,2

TABLEAU 34

Comparaison des concentrations virales après élution avec le tampon boraté additionné de 3% d'extrait de boeuf et le tampon glycine

(effluent - virus indigènes)

Expérimentation C

Titre en virus N.P.P.U.C./l / Essai n°	Tampon utilisé :		
	boraté + 3% extrait boeuf pH 9	glycine	
		pH 9	pH 11,5
1	10,9 (7,5 -15,3)	1,6 (0,6 - 3,5)	2,7 (1,3 - 5,0)
2	2,7 (1,3 - 5,4)	0,5 (0,1 - 2,1)	0,5 (0,1 - 2,1)
3	6,8 (4,3 -13,3)	0,5 (0,1 - 2,1)	1,1 (0,4 - 2,8)
4	3,6 (2,0 - 6,4)	0,5 (0,1 - 2,1)	0,3 (0,0 - 2,1)
5	3,3 (1,7 - 6,2)	1,4 (0,6 - 3,3)	1,3 (0,5 - 3,3)
6	3,3 (1,7 - 6,2)	1,0 (0,4 - 2,8)	1,6 (0,6 - 3,5)
7	3,3 (1,7 - 6,2)	0,8 (0,3 - 2,5)	1,1 (0,4 - 2,8)
8	5,2 (3,2 - 8,2)	0,5 (0,1 - 2,1)	1,1 (0,4 - 2,8)
9	3,5 (2,0 - 6,3)	0,3 (0,0 - 2,1)	0,8 (0,3 - 2,5)
10	4,5 (2,7 - 7,4)	0,2 (0,0 - 1,9)	0,2 (0,0 - 1,9)

N.P.P.U.C. : nombre le plus probable d'unités cytopathogènes

( ) : les nombres entre parenthèses indiquent les limites de confiance à 95%

est utilisé à la place du tampon glycine (10,92 N.P.P.U.C./l *vs* 1,6 N.P.P.U.C./l pour l'essai 1; 4,5 N.P.P.U.C./l *vs* 0,2 N.P.P.U.C./ l pour l'essai 10). Le fait d'éluer avec un tampon glycine à pH 11,5 ne permet pas de rétablir la différence constatée entre les concentrations virales obtenues. Cependant, pour le tampon glycine, la variation du pH de 9 à 11,5 améliore quel que peu la récupération des particules virales (1,6 N.P.P.U.C./l, pH 9 *vs* 2,7 N.P.P.U.C./l, pH 11,5 pour l'essai 1). La comparaison statistique des 2 modes d'élution (tampon boraté + 3% d'extrait de boeuf, pH 9 *vs* tampon glycine, quel que soit le pH) comme le montre le Tableau 35, met en relief, dans la moitié des cas, une différence statistique significative en faveur de la méthode utilisant le tampon boraté additionné de 3% d'extrait de boeuf. Ces résultats, en accord avec ceux de LANDRY et coll.(1978), montrent la supériorité du tampon boraté pH 9 + 3% d'extrait de boeuf, par rapport au tampon glycine pH 11,5. Dans ces conditions, durant toute notre étude, nous avons utilisé, comme tampon d'élution, le tampon boraté à pH 9 additionné de 3% d'extrait de boeuf.

TABLEAU 35

Comparaison statistique des titres viraux avec différents tampons d'élution

Essai n°	T.B.+ 3% E.B.(pH 9) *versus* T.G. (pH 9)	T.B.+ 3% E.B.(pH 9) *versus* T.G (pH 11,5)	T.G. (pH 9) *versus* T.G. (pH 11,5)
1	S.	S.	N.S.
2	N.S.	N.S.	N.S.
3	S.	S.	N.S.
4	S.	S.	N.S.
5	N.S.	N.S.	N.S.
6	N.S.	N.S.	N.S.
7	N.S.	N.S.	N.S.
8	S.	S.	N.S.
9	S.	N.S.	N.S.
10	S.	S.	N.S.

S. : différence statistique (95%)
N.S. : différence non significative (95%)

T.B. : tampon boraté
T.G. : tampon glycine
E.B. : extrait de boeuf

CHAPITRE III

MISE EN EVIDENCE DES VIRUS DANS LE MILIEU HYDRIQUE: INTERET DE L'IMMUNO-MICROSCOPIE ELECTRONIQUE

L'immuno-microscopie électronique (I.M.E.) est une méthode qui permet l'observation directe d'un complexe antigène-anticorps par le microscope électronique à transmission (ALMEIDA et WATERSON, 1969; DOANE, 1974; KAPIKIAN et coll.,1975; KELEN et coll., 1971).

Si cette méthode est largement utilisée par de nombreux chercheurs pour le diagnostic des gastro-entérites épidémiques non bactériennes (BONSDORFF et coll., 1978; KAPIKIAN et coll., 1972 et 1974) et des hépatites virales (DIENSTAG et coll., 1975; GRAVELLE et coll., 1975; LOCARNINI et coll.,1974; WHO, 1970), quelques rares chercheurs (FOURNIER et coll., 1978; SATTAR et WESTWOOD, 1977) la pratiquent pour la mise en évidence des virus dans le milieu hydrique.

La recherche des virus dans le milieu hydrique, par inoculation sur cultures cellulaires, ayant presque toujours permis la mise en évidence des entérovirus, il nous a paru intéressant de détecter les adénovirus dans le milieu hydrique en utilisant une technique récente : l'immuno-microscopie électronique (I.M.E.)

III - 1 MATERIEL ET METHODES.

Les éluats obtenus après concentration des échantillons d'eau, par la méthode d'adsorption-élution sur de la poudre de verre, sont ensemencés sur cultures cellulaires, selon un des protocoles décrits en première partie, chapitre I, paragraphe I -2-1-3. Après avoir recueilli le milieu de culture présent dans chaque cupule où un effet cytopathogène a été observé, l'identification et le typage des virus ont été entrepris sur cette suspension virale.

★ Identification et typage des virus par séro-neutralisation.

Dans un premier temps, les entérovirus sont différenciés des adénovirus par la technique décrite par WALLIS et MELNICK en 1962. Ces derniers montrent que les entérovirus, en présence d'ions magnésium à + 50°C pendant une demi-heure, ne présentent pas d'inactivation alors que les adénovirus, dans les mêmes conditions expérimentales, sont inactivés.

Dans un deuxième temps, le typage des virus est poursuivi au moyen d'épreuves sérologiques de neutralisation spécifique (BRICOUT et coll., 1974; CATEIGNE et MAURIN, 1965). La présence de virus poliomyélitique, dans le cas où il n'y a pas d'autres entérovirus, est révélée par le sérum neutralisant

polyvalent anti-polio I, II et III (Microbiological Associated, réf. 30887, 30888 et 30889). S'il ne s'agit pas d'un virus poliomyélitique (entérovirus non poliomyélitique : E.N.P.), dans quelques cas (deuxième partie, I-2 et I-3), le typage a été poursuivi avec d'autres sérums neutralisants spécifiques.

★ Identification des adénovirus par I.M.E.

Généralement, la recherche des adénovirus par I.M.E. a été entreprise sur des échantillons où les virus ont été mis en évidence par cultures cellulaires. Elle a été faite, dans tous les cas, à partir du passage de l'éluat sur cultures cellulaires K.B. ayant présenté un E.C.P. Ces cultures cellulaires sont alors congelées puis décongelées. Après centrifugation à 3000 tours/mn, pendant 5 mn, le surnageant est recueilli. Ce dernier, après filtration sur membrane filtrante de 0,45 µm (Millipore H.A.W.P. 013000) n'ayant subi aucun pré-traitement au sérum, constitue la suspension virale sur laquelle est effectuée une recherche des adénovirus par immuno-microscopie électronique.

Dans certains cas, pour les premiers essais, la recherche des adénovirus a été effectuée à partir de l'éluat obtenu après concentration de l'échantillon d'eau, par la méthode d'adsorption-élution sur de la poudre de verre.

★ Préparation de la membrane support.

Des grilles en cuivre de 400 mesch, de 3 mm de diamètre (Agar Aids G.2400) sont utilisées pour l'observation. Elles sont recouvertes d'un film de formvar (Agar Aids R.1201) à partir d'une solution à 0,28% dans du dichloro-1.2 éthane. La membrane ainsi constituée est stabilisée par une fine couche de carbone évaporé, grâce à un évaporateur à vide (Hitachi H.U. S4).

★ Préparation du colorant.

Le colorant utilisé est une solution à 2% d'acide phosphotungstique (Prolabo 20 635) dans de l'eau distillée ajustée à pH 6-7 par Na OH 1 M.

★ Préparation de l'échantillon à observer, selon FOURNIER et coll., 1978.

A 1 ml d'éluat, ou de suspension virale provenant de ce même éluat passé sur cultures cellulaires, 0,05 ml d'anticorps humains anti-adénovirus décomplémentés et 0,025 ml d'anti-I_gG humaines décomplémentées (Behring) sont ajoutés. Après incubation à +37°C, pendant 30 minutes, une goutte de ce mélange est déposée sur la grille recouverte d'une membrane de formvar carboné. Après

15 minutes à la température du Laboratoire, la grille est lavée avec 20 gouttes de tampon phosphate pH 7,3. Entre chaque goutte, l'excès de tampon est absorbé avec du papier filtre. La préparation est colorée, pendant 30 secondes, avec de l'acide phosphotungstique.

★ Observation des grilles.

La recherche des adénovirus est effectuée avec un microscope électronique à transmission Hitachi H.U.12, sous 75 kV de tension, au grandissement de 60 000. L'observation, avec ce microscope, des particules virales sur les différentes grilles, a donné plusieurs images caractéristiques. Ainsi, la Figure 36 montre un groupe de particules virales dû à la formation du complexe virus-anticorps anti-adénovirus anti-IgG. L'examen de la Figure 37 permet de distinguer à la fois des particules virales claires dont les capsomères sont visibles et des particules sombres et altérées dont les capsomères sont difficilement reconnaissables. Cette différence dans les structures implique, d'après FOURNIER et coll.(1978), qu'il y a une différence dans le pouvoir infectieux des particules considérées : celles qui gardent toute leur intégrité physique peuvent être considérées comme infectieuses. Dans la Figure 38, la structure de l'adénovirus est remarquablement bien conservée car une des faces de l'isocaèdre formée par un triangle équilatéral est visible.

III - 2 RESULTATS.

Les résultats sont présentés en deux parties :

- la première décrit les conditions d'application de l'I.M.E. pour la recherche des adénovirus,
- la deuxième met en relief que l'I.M.E. est une méthode complémentaire pour la détection des virus dans le milieu hydrique.

★ Conditions d'application de l'I.M.E. pour la recherche des adénovirus

Les résultats des observations effectuées au microscope électronique sont rassemblés dans le Tableau 36. L'examen de ce dernier montre que la mise en évidence des adénovirus, à partir d'éluats, est très faible (2/36). Par contre, l'observation en I.M.E. des suspensions virales provenant du passage de l'éluat sur cultures cellulaires donne, comme le montre le Tableau 37, un pourcentage de positivité élevé (47%). La comparaison de ces deux pourcentages (47% *versus* 5%) met en relief une différence statistique lorsqu'on applique le test du χ^2.

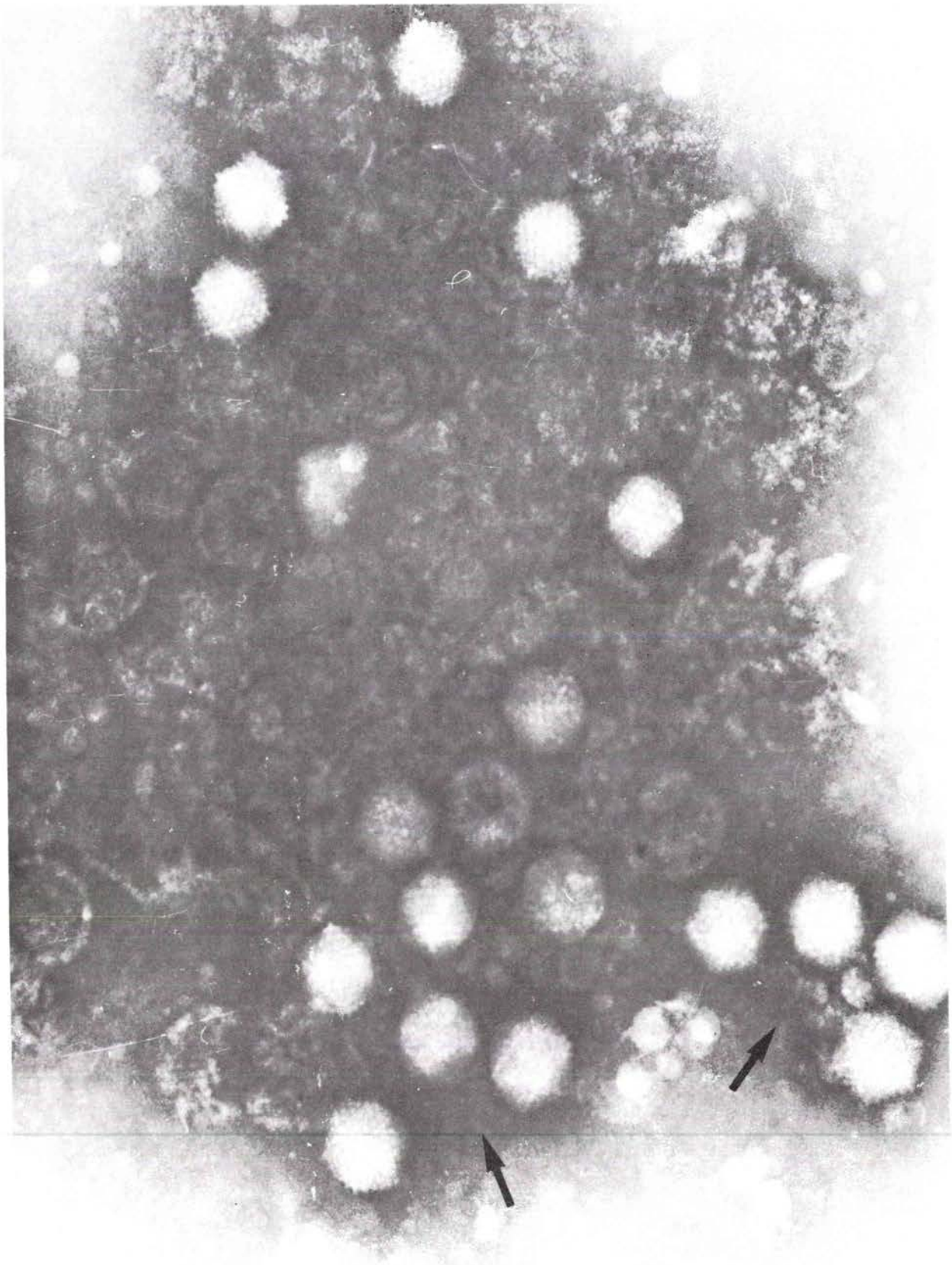


FIGURE 36

Amas de particules d'Adénovirus après réaction antigène-anticorps (flèches)
(G x 290 000)

FIGURE 37

Particules d'Adénovirus claires et sombres (flèches)
(G x 270 000)

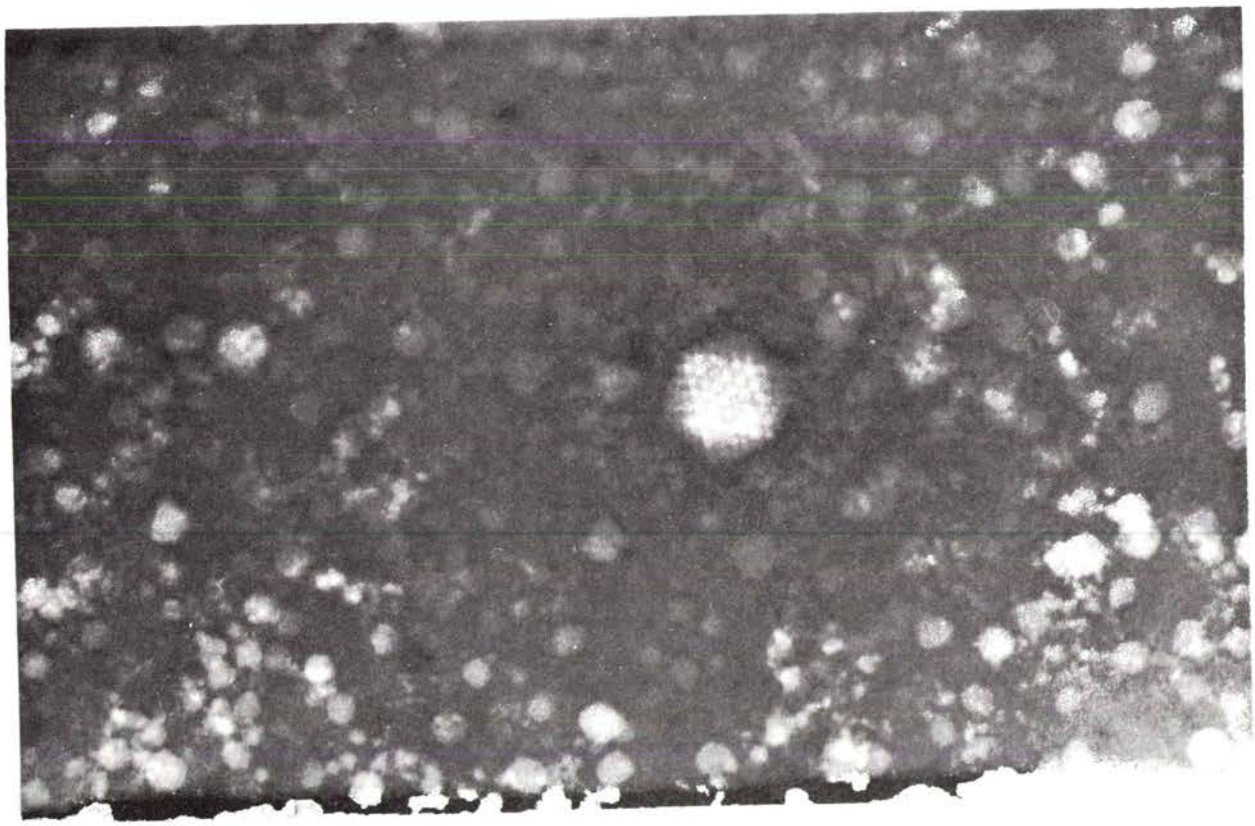


FIGURE 38

Particule d'Adénovirus dont les capsomères sont visibles
(G x 270 000)

TABLEAU 36

Détection des virus par I.M.E.

Essai n°	Nature de l'eau	Identification par I.M.E.	
		directe sur le concentrat	après passage sur cellule
1	eau de mer	absence	Adénovirus
2	"	"	"
3	"	"	absence
4	"	"	Adénovirus
5	"	"	absence
6	"	"	"
7	"	"	Adénovirus
8	"	"	absence
9	"	"	Adénovirus
10	"	"	absence
11	"	"	"
12	"	"	"
13	"	"	Adénovirus
14	"	"	absence
15	"	"	Adénovirus
16	"	"	"
17	"	"	absence
18	"	"	Adénovirus
19	"	"	absence
20	eau de rivière	"	Adénovirus
21	"	Adénovirus	Adénovirus
22	"	absence	absence
23	"	"	"
24	"	"	"
25	Effluent	"	Adénovirus
26	"	"	absence
27	"	"	Adénovirus
28	"	"	absence
29	"	"	"
30	"	"	Adénovirus
31	Affluent	Adénovirus	"
32	"	absence	absence
33	"	"	Adénovirus
34	"	"	"
35	"	"	absence
36	"	"	"

I.M.E. : immuno-microscopie électronique

TABLEAU 37

Pourcentage de positivité de la méthode d'identification par I.M.E. selon deux variantes

Variantes / Echantillons	I.M.E.	
	Concentrat	Après passage sur cellule
Nombre examiné	36	36
Nombre positif	2	17
% de positivité	5	47
$\chi^2_{obs.} = 14,03 > \chi^2_{th.} = 3,84$		

Le faible nombre d'adénovirus détectés dans l'éluat peut s'expliquer par le fait que ces particules se trouvaient dans l'échantillon observé à une concentration difficilement détectable en I.M.E., c'est-à-dire inférieure à 10^{2}/ml. Il n'en est pas de même pour l'éluat qui passe sur culture cellulaire car, dans ce cas, il y a une concentration de particules virales à chaque passage. De ce fait, l'observation au microscope électronique est plus aisée. Compte tenu de ces résultats, seules les suspensions virales, provenant du passage de l'éluat sur cultures cellulaires ont été examinées en I.M.E.

★ Complémentarité de l'I.M.E. dans l'identification des adénovirus.

Le Tableau 38 présente les résultats des identifications réalisées par les deux méthodes utilisées (I.M.E. et séro-neutralisation). Les échantillons analysés sont ceux utilisés dans la deuxième partie de notre travail L'examen des résultats, portés dans ce tableau, montre que, sur les 107 échantillons examinés, l'identification par séro-neutralisation a permis la mise en évidence de 103 entérovirus et 4 adénovirus. Chaque fois que cette méthode a permis l'identification d'un adénovirus, cette identification a été confirmée par la méthode de l'I.M.E. La complémentarité des deux méthodes pour la détection des virus dans le milieu hydrique est évidente. Sur les 107 échantillons observés,

TABLEAU 38

Identification des virus par deux techniques
(I.M.E. et séroneutralisation)

Essai n°	Nature de l'eau	Caractérisation du point			Identification après inoculation aux cultures cellulaires par :	
					I.M.E.	séroneutralisation
1	Effluent	Essai	1 - 10 l.	(a)	absence	E.N.P.
2	"	"	1 - 100 l.	"	"	"
3	"	"	2 - 10 l.	"	"	"
4	"	"	2 - 100 l.	"	"	"
5	"	"	3 - 10 l.	"	"	"
6	"	"	3 - 100 l.	"	"	"
7	"	"	4 - 10 l.	"	Adénovirus	"
8	"	"	4 - 100 l.	"	absence	"
9	"	"	5 - 10 l.	"	"	"
10	"	"	5 - 100 l.	"	"	"
11	"	"	6 - 10 l.	"	"	"
12	"	"	6 - 100 l.	"	"	"
13	"	"	7 - 10 l.	"	Adénovirus	"
14	"	"	7 - 100 l.	"	absence	"
15	"	"	8 - 10 l.	"	"	"
16	"	"	8 - 100 l.	"	"	"
17	"	"	9 - 10 l.	"	"	"
18	"	"	9 - 100 l.	"	"	"
19	"	"	10 - 10 l.	"	"	"
20	"	"	10 - 100 l.	"	"	"
21	"	"	11 - 10 l.	"	Adénovirus	"
22	"	"	11 - 100 l.	"	absence	"
23	"	"	12 - 10 l.	"	"	"
24	"	"	12 - 100 l.	"	"	"
25	"	"	13 - 10 l.	"	Adénovirus	"
26	"	"	13 - 100 l.	"	"	"

(a) : résultats portés dans le tableau 43

E.N.P. : Entérovirus non poliomyélitique

I.M.E. : immuno-microscopie électronique

TABLEAU 38 (suite)

Essai n°	Nature de l'eau	Caractérisation du point			Identification après inoculation aux cultures cellulaires par :	
					I.M.E.	séroneutralisation
27	eau de mer	T_4	20 l.	(b)	absence	E.N.P.
28	"	M_2	10 l.	"	"	"
29	"	M_2	20 l.	"	"	"
30	"	C_7	10 l.	"	"	"
31	"	C_7	20 l.	"	"	"
32	"	C_{10}	10 l.	"	"	"
33	"	C_{10}	20 l.	"	"	"
34	"	C_{16}	10 l.	"	"	"
35	"	C_{16}	20 l.	"	Adénovirus	"
36	"	Cg 5b	20 l.	"	absence	"
37	"	Cg 6b	10 l.	"	"	Coxs.A_{21}
38	"	Cg 6b	20 l.	"	"	"
39	"	V_4	10 l.	"	Adénovirus	Adéno.6
40	"	V_4	20 l.	"	"	"
41	"	J_4	10 l.	"	absence	Echo.11
42	"	J_4	20 l.	"	"	"
43	"	B_2	20 l.	"	"	"
44	eau de piscine	Essai	4	(c)	"	E.N.P.
45	"	"	27	"	"	"
46	"	"	33	"	"	Polio I
47	"	"	10	(d)	"	E.N.P.
48	"	"	35	"	Adénovirus	Adéno.6
49	"	"	36	"	"	"
50	"	"	42	"	absence	E.N.P.
51	"	"	47	"	"	Polio I

(b) : résultats portés dans le tableau 49
(c) : résultats portés dans le tableau 54
(d) : résultats portés dans le tableau 55

TABLEAU 38 (suite)

Essai n°	Nature de l'eau	Caractérisation du point	Identification après inoculation aux cultures cellulaires par :	
			I.M.E.	séroneutralisation
52	Effluent	Essai 1 continu 10 l.(e)	absence	E.N.P.
53	"	" 1 " 100 l. "	"	"
54	"	" 1 séquentiel 10 l. "	"	"
55	"	" 1 " 100 l. "	"	"
56	"	" 1 ponctuel 10 l. "	"	"
57	"	" 1 " 100 l. "	"	"
58	"	" 2 continu 10 l. "	"	"
59	"	" 2 " 100 l. "	"	"
60	"	" 2 séquentiel 10 l. "	Adénovirus	"
61	"	" 2 " 100 l. "	"	"
62	"	" 2 ponctuel 10 l. "	"	"
63	"	" 2 " 100 l. "	"	"
64	"	" 3 continu 10 l. "	"	"
65	"	" 3 " 100 l. "	"	"
66	"	" 3 séquentiel 10 l. "	"	"
67	"	" 3 " 100 l. "	"	"
68	"	" 3 ponctuel 10 l. "	absence	"
69	"	" 3 " 100 l. "	"	"
70	Affluent	" 1 séquentiel (f)	"	"
71	"	" 1 continu "	"	"
72	"	" 2 séquentiel "	"	"
73	"	" 2 continu "	"	"
74	"	" 3 séquentiel "	Adénovirus	"
75	"	" 3 continu "	"	"
76	Effluent	" 1 séquentiel "	absence	"
77	"	" 1 continu "	"	"
78	"	" 2 séquentiel "	Adénovirus	"
79	"	" 2 continu "	absence	"
80	"	" 3 séquentiel "	Adénovirus	"
81	"	" 3 continu "	"	"
82	Affluent	" 1 ponctuel (g)	absence	"
83	"	" 2 " "	Adénovirus	"
84	"	" 3 " "	absence	"
85	Effluent	" 1 " "	"	"
86	"	" 2 " "	Adénovirus	"
87	"	" 3 " "	absence	"

(e) : résultats portés dans le tableau 63
(f) : résultats portés dans le tableau 66
(g) : résultats portés dans le tableau 67

TABLEAU 38 (suite et fin)

Essai n°	Nature de l'eau	Caractérisation du point		Identification après inoculation aux cultures cellulaires par :	
				I.M.E.	séroneutralisation
88	Affluent	8 h - 10 h	(h)	Adénovirus	E.N.P.
89	"	10 h - 12 h	"	"	"
90	"	12 h - 14 h	"	"	"
91	"	14 h - 16 h	"	"	"
92	"	16 h - 18 h	"	"	"
93	"	18 h - 20 h	"	absence	"
94	"	20 h - 22 h	"	Adénovirus	"
95	"	22 h - 24 h	"	"	"
96	"	0 h - 2 h	"	"	"
97	"	2 h - 4 h	"	absence	"
98	Effluent	12 h - 14 h	"	absence	"
99	"	14 h - 16 h	"	Adénovirus	"
100	"	16 h - 18 h	"	absence	"
101	"	18 h - 20 h	"	"	"
102	"	20 h - 22 h	"	Adénovirus	"
103	"	22 h - 24 h	"	absence	"
104	"	0 h - 2 h	"	Adénovirus	"
105	"	2 h - 4 h	"	"	"
106	"	4 h - 6 h	"	"	"
107	"	6 h - 8 h	"	absence	"

(h) : résultats portés dans le tableau 70

alors que l'identification par séro-neutralisation a permis la mise en évidence de 4 adénovirus, l'identification par l'I.M.E. a permis la détection de 38 adénovirus.Cette constatation indique, comme le montre le Tableau 39, qu'il y a dans l'éluat de départ une présence simultanée d'au moins 2 virus. Le nombre d'éluats présentant à la fois des virus à A.D.N. et à A.R.N. est relativement important. Nous avons noté cette présence simultanée de virus dans la plupart des échantillons d'eaux analysés, quelles que soient leurs origines (eau de mer, eau de piscine, affluent et effluent). Les pourcentages où il y a mélange de virus varient de 57% pour les affluents à 18% pour l'eau de mer. Pour les eaux usées traitées, nous constatons que le pourcentage trouvé (35%) est plus faible que celui (57%) correspondant aux eaux usées brutes. Cette différence n'est pas, cependant, statistiquement significative ($\chi^2 = 2,32$ pour $P \simeq 0,05$).

III - 3 DISCUSSION.

L'I.M.E. est une technique complémentaire pour la mise en évidence et l'identification des adénovirus qui présentent, à l'observation, une structure bien caractéristique, comme le montrent les photographies. La méthode est relativement facile à mettre en oeuvre dans la mesure où l'on dispose d'un microscope électronique.Elle est rapide, car une fois la grille préparée, l'identification peut être faite dans l'heure. Cependant, dans nos conditions expérimentales, la méthode ne s'applique qu'aux adénovirus. Les recherches faites sur des échantillons naturels pour la mise en évidence des entérovirus par l'I.M.E. se sont révélées négatives. De plus, l'I.M.E. présente deux autres inconvénients: impossibilité de typer et de quantifier les adénovirus observés. Malgré les inconvénients cités, cette méthode présente l'énorme avantage de mettre en évidence des adénovirus dans des échantillons contenant déjà des entérovirus. Et cette possibilité n'est pas toujours réalisée lorsque seules les cultures cellulaires sont utilisées pour l'isolement et l'identification des virus. En effet, souvent, dans la recherche d'un E.C.P. sur cultures cellaires, la présence d'un entérovirus donnant un E.C.P. rapide empêche la mise en évidence de l'E.C.P. de l'adénovirus qui est plus tardif.

Nos pourcentages de détection des adénovirus dans le milieu hydrique varient selon le type d'eau considéré. Alors que ces pourcentages ne sont que de 18% (3/17) et 25% (2/8) pour l'eau de mer et l'eau de piscine, ils atteignent pour l'effluent et l'affluent respectivement 35% (22/63) et 58% (11/19). Ces

TABLEAU 39

Présence simultanée de virus* dans différents types d'eau

Type d'eau		Nombre d'échantillons analysés	Nombre d'échantillons avec :	
			Adénovirus ou Entérovirus	Adénovirus et Entérovirus
Eau de mer		17	14 (82)	3 (18)
Eau de piscine		8	6 (75)	2 (25)
Eaux usées	affluent	19	8 (43)	11 (57)
	effluent	63	41 (65)	22 (35)

( ) : les chiffres entre parenthèses indiquent les % de positivité

★ : virus mis en évidence, quelle que soit la méthode d'identification utilisée (I.M.E. ou séroneutralisation)

B. U. METZ

valeurs sont supérieures à celles citées par de nombreux auteurs. Ainsi DENIS (1973) note, d'après une étude bibliographique fondée sur la répartition de 4600 souches virales dans toutes les eaux, que les adénovirus représentent dans les eaux usées et dans les eaux de surface un pourcentage de 5%. Il ne mentionne aucun adénovirus dans l'eau de mer et l'eau de piscine. Alors que CHARRIER et coll. (1977) obtiennent des pourcentages plus élevés d'isolement d'adénovirus dans les eaux usées (26%) et dans les eaux de rivière (12%), CARLSON (1972) note que le nombre d'adénovirus dans les eaux de piscine est très élevé en été et en automne.

En conclusion, cette technique est fort intéressante puisqu'elle permet de détecter la présence des adénovirus dans le milieu hydrique là où les cultures cellulaires ne les mettent pas en évidence dans le cas où il y a présence d'un autre virus à E.C.P. rapide.

DEUXIEME PARTIE

APPLICATION DES METHODES DE CONCENTRATION ET DE TITRAGE A LA RECHERCHE DES VIRUS DANS LE MILIEU HYDRIQUE

CHAPITRE I

INFLUENCE DES VOLUMES D'ECHANTILLONS SUR LA MISE EN EVIDENCE ET LA QUANTIFICATION DES VIRUS DANS LE MILIEU HYDRIQUE

En ce qui concerne la méthode d'extraction des virus dans le milieu hydrique, il est nécessaire de définir le volume utile à cette extraction. Selon les auteurs et selon les types d'eau, ce volume peut varier de quelques litres à plusieurs dizaines de litres (LUND et HEDSTRÖM,1966; MOORE et coll., 1970; SCHWARTZBROD et coll.,1979 a). Le but du présent travail est d'étudier l'influence des volumes d'échantillons d'eaux usées, d'eau de mer et d'eau de piscine sur les quantités de virus récupérés.

I - 1 ESSAIS SUR DES EFFLUENTS DE STATION D'EPURATION (COMPARAISON 10 LITRES ET 100 LITRES).

I - 1-1 Matériel et méthodes.

★ Echantillons.

Notre étude expérimentale a été réalisée avec des eaux usées traitées provenant de la station d'épuration biologique de Cagnes-sur-Mer.
Les eaux ont été prélevées à 20 cm de profondeur dans des récipients plastiques de 20 litres. Lors du remplissage des bidons, les agents préleveurs ont opéré avec du matériel ayant subi, avant et après chaque prélèvement, une décontamination par traitement à l'ozone pour les récipients (insuflation d'ozone pendant une demi-heure grâce à un ozoneur de laboratoire Trailigaz), à l'eau de Javel pour les gants. Le transport des échantillons au Laboratoire a toujours été réalisé dans les 45 mn suivant le moment de prélèvement. Les caractéristiques physico-chimiques principales de l'effluent sont présentées dans le Tableau 40.

TABLEAU 40

Caractéristiques physico-chimiques de l'effluent de la station d'épuration de Cagnes-sur-Mer au cours de l'étude.

Paramètres	Effluent
pH	7,8 à 8,0
M.E.S.T. (mg/l)	15 à 30
D.C.O. (mg/l)	50 à 80
$D.B.O._5$ (mg/l)	20 à 30

Deux prélèvements de 190 litres, pour une première expérimentation, puis 13 prélèvements de 110 litres, pour une deuxième expérimentation, ont été effectués hebdomadairement pendant 15 semaines.

★ Conditionnement des échantillons et concentration des virus.

Tous les échantillons d'eau à analyser (190 litres ou 110 litres) recueillis dans un récipient plastique de 220 litres préalablement stérilisé à l'ozone, sont homogénéisés pendant 30 minutes à l'aide d'un agitateur centrifuge électrique.

Dans le cas particulier de la première expérimentation, l'eau est soumise, après homogénéisation, à une insufflation d'ozone pendant 2 heures pour inactiver virus et bactéries indigènes présents dans l'échantillon d'eau à analyser. Après avoir laissé reposer l'échantillon pendant 1 heure, de l'air stérile est insufflé durant une demi-heure pour éliminer éventuellement l'ozone résiduel. L'échantillon d'eau ainsi traité reçoit une quantité connue de virus poliomyélitique type I, selon le protocole expérimental décrit plus loin dans ce même chapitre I - 1-2-1.

Dans tous les cas, après acidification de l'échantillon à pH 3,5, il est ajouté $Al\ Cl_3$ en quantité telle que l'on obtienne finalement une concentration de $5{,}0\,10^{-4}$ M. La concentration des virus sur de la poudre de verre est réalisée selon le protocole défini en première partie, chapitre II, paragraphe II-1-1

★ Inoculation des cultures cellulaires et titrage.

A l'issue de la concentration, les 25 premiers ml du liquide d'élution sont décontaminés selon le protocole défini en première partie, chapitre II, paragraphe II - 1-6. L'éluat ainsi décontaminé est inoculé sur des cultures de cellules K.B. La technique de titrage utilisée a été décrite en première partie, chapitre I, paragraphe I - 2-1-3-1 : 9,6 ml de suspension cellulaire infectée sont répartis dans 96 cupules d'une plaque de microtitration à raison de 0,1 ml par cupule. La quantification a lieu après deux ou trois passages successifs sur cultures cellulaires. Trois titrages ont été effectués à partir d'un même éluat. Les méthodes statistiques utilisées pour la comparaison des titres viraux sont décrites en première partie, chapitre I, paragraphe I - 1.

I - 1-2 Protocole expérimental.

Pour les deux expérimentations 1 et 2, le protocole expérimental est représenté par la Figure 39.

I - 1-2-1 Expérimentation 1.

★ But.

Nous avons recherché une éventuelle variation de la charge virale en fonction des différents volumes d'eau passés à travers une même quantité de poudre de verre.

★ Moyens.

- Au cours de cette expérimentation, nous avons travaillé sur des effluents ozonés.
- 2 essais, à raison d'un par semaine, ont été réalisés en ajoutant 2 concentrations différentes (environ 1 et 10^5 N.P.P.U.C./l) de virus poliomyélitique type I.
- Pour chaque essai, les 190 litres d'eau à analyser, après homogénéisation pendant 20 mn à l'aide d'un agitateur centrifuge électrique, ont été divisés en 5 fractions :
  - 10 l avant ozonation (témoin "virus indigène"),
  - 10 l après ozonation (témoin "absence de virus indigène"),
  - 20 l, 50 l et 100 l, après ozonation et addition de virus.
- Chacune des fractions a été concentrée séparément sur de la poudre de verre selon le protocole défini en première partie, chapitre II, paragraphe II-1-1

I - 1-2-2 Expérimentation 2.

★ But.

Nous avons étudié l'influence du volume sur la recherche des particules virales dans l'effluent.

★ Moyens.

- Au cours de cette expérimentation, nous avons travaillé sur des effluents naturels n'ayant subi aucun traitement préalable au Laboratoire (pas d'insufflation d'ozone).
- 13 essais, à raison d'un par semaine, ont été réalisés à partir de 110 litres d'eau.

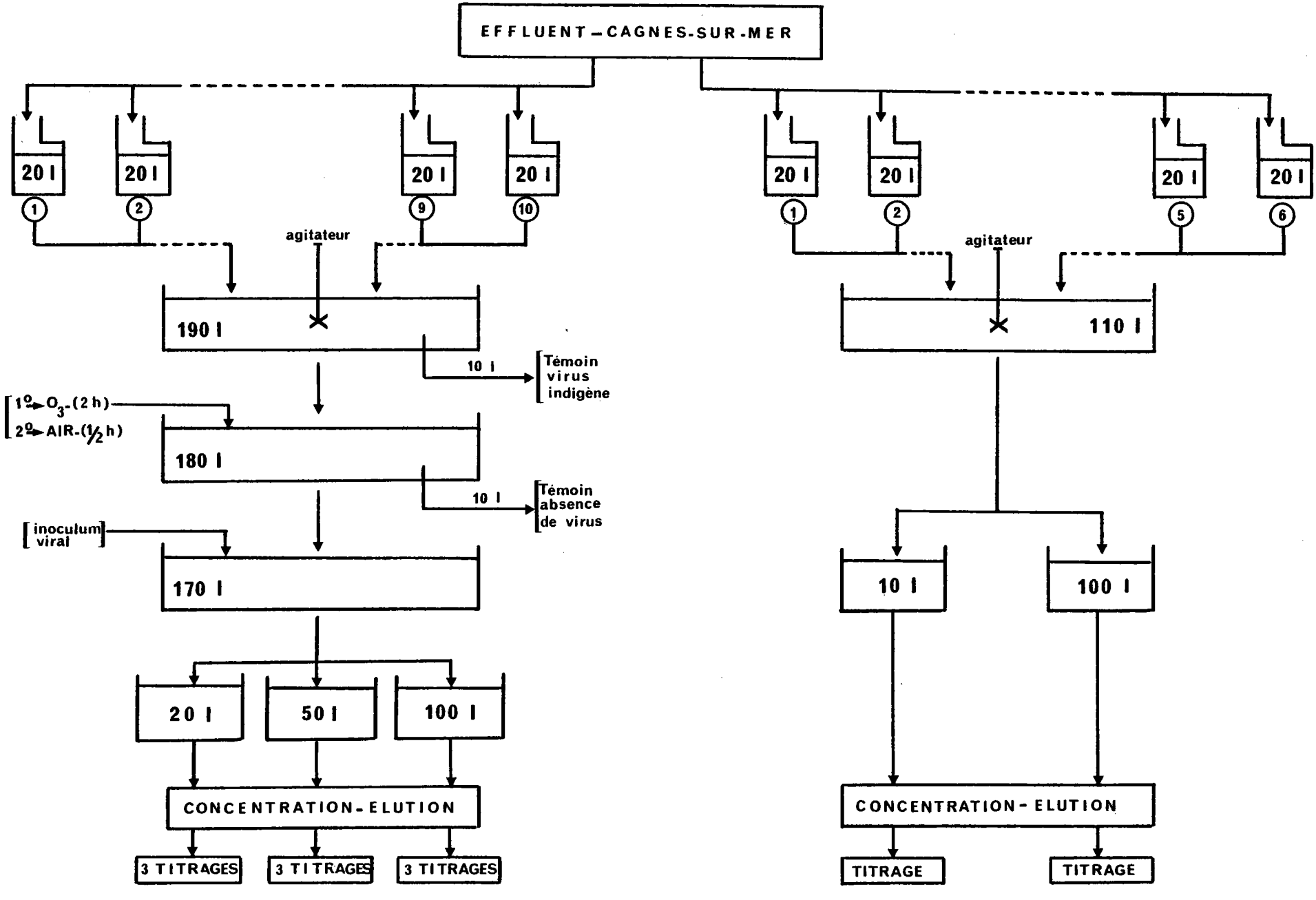


FIGURE 39

Schéma du protocole expérimental

- Pour chaque essai, les 110 litres d'eau à analyser, après homogénéisation pendant 20 mn à l'aide d'un agitateur centrifuge électrique, ont été divisés en deux fractions de 10 et 100 litres.
- Chaque fraction a été concentrée séparément sur de la poudre de verre, selon le protocole décrit en première partie, chapitre II,paragraphe II-1-1.

I - I-3 Résultats.

★ Estimation de la charge virale dans 20, 50 et 100 litres d'effluent (Expérimentation 1).

Nous avons voulu vérifier, pour deux concentrations virales, si un grand volume d'effluent passant à travers une quantité de poudre de verre, donnait les mêmes résultats qu'un faible volume d'effluent passant à travers la même quantité de poudre de verre. Les résultats sont présentés dans le Tableau 41. Lorsqu'une faible concentration de virus (1 N.P.P.U.C./l) est introduite dans un effluent ozoné, des titres viraux comparables sont retrouvés, quel que soit le volume traité (20, 50 ou 100 litres).Par contre, lorsque la concentration est beaucoup plus forte, de l'ordre de 10^5 N.P.P.U.C./l, les résultats montrent que, par litre, un plus grand nombre de virus est mis en évidence si 20 litres ($3,2.10^5$ N.P.P.U.C./l) sont analysés plutôt que 50 litres ($0,9.10^5$ N.P.P.U.C./l) et, à fortiori, 100 litres ($0,7.10^5$ N.P.P.U.C./l). Ceci est confirmé par l'analyse statistique donnée par le Tableau 42. Une différence est notée entre les titres viraux trouvés dans 20 litres et 50 litres d'une part, et 20 litres et 100 litres d'autre part, lorsque la charge virale dans l'échantillon de départ est importante.

★ Influence des volumes analysés sur la recherche des virus indigènes dans un effluent (Expérimentation 2).

Le but de cette expérimentation est de rechercher si l'estimation de la charge virale dans un effluent est fonction du volume analysé. Les concentrations virales obtenues sont présentées dans le Tableau 43. Pour un même échantillon et pour deux volumes analysés (10 litres et 100 litres), une variabilité dans les résultats est constatée en comparant les intervalles de confiance des concentrations virales. Bien que les concentrations de virus trouvés dans 10 litres soient, dans tous les cas, supérieures à celles mises en évidence dans 100 litres, il est à noter que, dans 7 cas sur 13, aucune différence significative n'est mise en évidence. Lorsqu'il existe une différence significative dans les concentrations virales (6 cas sur 13), elle est toujours en faveur des faibles volumes analysés (10 litres).

TABLEAU 41

Evaluation de la charge virale en fonction des volumes d'échantillons d'eau passés à travers une même quantité de poudre de verre
(cas d'un effluent avec ajout de virus)
Expérimentation 1

Nombre de virus (N.P.P.U.C./l)			Volume traité (l)	Nombre de virus retrouvés (N.P.P.U.C./l)			Moyenne des 3 titrages
avant ozonation	après ozonation	introduit		Titrage 1	Titrage 2	Titrage 3	
$1,4.10^1$ ($1,1.10^1$-$1,8.10^1$)	absence	$\simeq 10^5$	20	$3,2.10^5$ ($1,8.10^5$-$5,5.10^5$)	$3,2.10^5$ ($1,8.10^5$-$5,5.10^5$)	$3,2.10^5$ ($1,8.10^5$-$5,5.10^5$)	$3,2.10^5$ ($2,3.10^5$-$4,2.10^5$)
			50	$0,7.10^5$ ($0,4.10^5$-$1,1.10^5$)	$0,9.10^5$ ($0,6.10^5$-$1,5.10^5$)	$1,3.10^5$ ($0,8.10^5$-$2,2.10^5$)	$0,9.10^5$ ($0,7.10^5$-$1,2.10^5$)
			100	$0,6,10^5$ ($0,3.10^5$-$1,0.10^5$)	$0,7.10^5$ ($0,4.10^5$-$1,1.10^5$)	$0,7.10^5$ ($0,4.10^5$-$1,1.10^5$)	$0,7.10^5$ ($0,5.10^5$-$0,9.10^5$)
$2,8.10^1$ ($2,0.10^1$-$3,8.10^1$)	absence	$\simeq 1$	20	0,8 (0,4 - 3,6)	0,8 (0,2 - 3,6)	0,8 (0,2 - 3,6)	0,8 (0,4 - 2,0)
			50	0,9 (0,4 - 2,2)	1,1 (0,6 - 2,6)	1,6 (0,8 - 3,2)	1,2 (0,7 - 1,9)
			100	1,0 (0;5 - 1,8)	1,0 (0,5 - 1,8)	1,1 (0,6 - 2,6)	1,0 (0,6 - 1,4)

( ) : les chiffres entre parenthèses indiquent la limite de confiance à 95%

N.P.P.U.C. : nombre le plus probable d'unités cytopathogènes

TABLEAU 42

Comparaison statistique des titres viraux obtenus
après passage des échantillons sur une même quantité de poudre de verre
(effluent ozoné - virus de laboratoire)

Différence autre	Signification statistique (95%)	
	Essai avec : 10^5 N.P.P.U.C./l	Essai avec : 1 N.P.P.U.C./l
20 l et 50 l	S.	N.S.
50 l et 100 l	N.S.	N.S.
20 l et 100 l	S.	N.S.

N.P.P.U.C. : nombre le plus probable d'unités cytopathogènes
S. : différence significative
N.S. : différence non significative

TABLEAU 43

Comparaison des titres viraux en fonction du volume des échantillons
(virus indigènes d'un effluent)
Expérimentation 2

Essai n°	Concentration virale (N.P.P.U.C./l) dans :		Différence statistique (95%)
	10 l	100 l	
1	6,5 (4,2 - 9,2)	0,7 (0,4 - 1,0)	S.
2	3,6 (1,8 - 6,2)	1,4 (1,0 - 1,9)	N.S.
3	2,1 (0,9 - 4,3)	0,8 (0,5 - 1,2)	N.S.
4	4,3 (2,2 - 6,6)	0,4 (0,2 - 0,7)	S.
5	2,8 (1,3 - 5,1)	0,7 (0,4 - 1,0)	S.
6	3,6 (1,8 - 6,2)	1,4 (1,0 - 1,9)	N.S.
7	3,1 (1,5 - 5,5)	0,7 (0,4 - 1,0)	S.
8	0,5 (0,3 - 0,9)	0,3 (0,1 - 0,5)	N.S.
9	3,1 (1,5 - 5,5)	0,6 (0,4 - 0,9)	S.
10	2,5 (1,1 - 4,7)	0,8 (0,5 - 1,2)	N.S.
11	2,8 (1,3 - 5,1)	0,5 (0,3 - 0,9)	S.
12	0,8 (0,5 - 1,2)	0,8 (0,5 - 1,2)	N.S.
13	3,2 (1,6 - 5,7)	2,1 (0,9 - 4,3)	N.S.

N.P.P.U.C. : nombre le plus probable d'unités cytopathogènes
( ) : les nombres entre parenthèses indiquent la limite de confiance à 95%
S. : différence significative
N.S. : différence non significative

I - 1-4 Discussion.

Dans le cas où des virus sont introduits dans un effluent préalablement ozoné, nous constatons, pour les fortes concentrations en virus (10^5 N.P.P.U.C./l) une différence d'adsorption des particules virales sur la poudre de verre lorsque 20 litres, d'une part, 50 et 100 litres, d'autre part, sont traités. Dans le cas des faibles concentrations de virus (1 N.P.P.U.C./l) une telle différence n'est pas observée, quel que soit le volume traité.Ce phénomène peut s'expliquer par une adsorption sur les sites de la poudre de verre aussi bien des particules virales que des matières organiques (FARRAH et coll.,1976; LUCENA-GUTIERREZ,1979; VALENTINE et ALLISON, 1959). Ainsi, lorsque l'effluent présente une forte concentration en virus, nous pouvons supposer que les sites sont en partie saturés par les matières organiques ne permettant pas une adsorption totale des virus. Par contre, lorsque l'effluent est peu chargé en virus, même s'il y a adsorption des matières organiques sur la poudre de verre, il reste néanmoins assez de sites pour adsorber la faible quantité de virus. Il est difficile de savoir si cette hypothèse est juste, car les deux essais ont été réalisés avec deux eaux différentes.

Lorsque les faibles concentrations virales obtenues à partir de 10 litres et 100 litres d'effluent sont comparées, une différence statistique significative est observée dans la moitié des cas; ceci semble être contradictoire avec les résultats obtenus à partir des effluents ozonés où il n'a pas été constaté, dans le cas de faibles concentrations en virus, quels que soient les volumes traités, de différence statistique significative entre les titres viraux. Cette divergence dans les résultats peut s'expliquer par le fait que nous travaillons, dans la première expérimentation, avec des virus de laboratoire, alors que dans la deuxième expérimentation, nous travaillons avec des virus indigènes.

Dans le choix des volumes, il faut prendre en compte le fait que, lorsque peu de virus sont présents dans le milieu considéré, il est naturel de prélever de grands volumes d'eau. Cependant, si cette eau est chargée en matières organiques, il est à craindre que la poudre de verre se sature très vite avec les matières organiques et entraîne ainsi une mauvaise adsorption des virus. Devant cette dualité, il faut trouver un compromis. Il semble, d'après nos résultats que, pour un effluent, il est raisonnable de faire la recherche des virus sur 10 litres.

I - 2 ESSAIS SUR LES EAUX DE MER (COMPARAISON 10 LITRES ET 20 LITRES).

I - 2-1 Matériel et méthodes.

★ Situation des points de prélèvement et collecte des échantillons.

19 points de prélèvement en mer ont été définis sur le littoral du département des Alpes-Maritimes, entre Théoule et Menton. Leur situation est représentée par la Figure 40. Ces points ont été choisis parmi 167 points de contrôle suivis bactériologiquement depuis 1972, à raison de 18 analyses par an et par point. La répartition des 19 points de prélèvement de virus, le long des 120 kilomètres de côtes du département, a été définie en prenant en compte des points faiblement, moyennement et fortement contaminés bactériologiquement.

En avril 1979, chaque point a fait l'objet de 5 prélèvements différents :
- 2 pour la recherche des virus dans 10 litres et 20 litres,
- 1 pour la recherche des bactéries fécales dans 100 millilitres,
- 1 pour la recherche des *Salmonella* dans 1000 millilitres et enfin,
- 1 pour la détermination des caractéristiques physico-chimiques dans 1000 millilitres.

Tous les prélèvements d'eau de mer, effectués à 5 mètres de la laisse des eaux et à une profondeur de 0,5 mètre, ont été recueillis soit dans des récipients plastiques de 20 litres stérilisés préalablement à l'ozone, soit dans des flacons en verre stériles de 1000 millilitres, puis acheminés dans l'heure au Laboratoire, dans une enceinte isotherme à + 4°C. Les différentes analyses ont été aussitôt entreprises.

★ Analyses physico-chimiques.

Les recherches de la salinité et de l'oxygène dissous ont été effectuées sur le terrain, selon les méthodes décrites par STRICKLAND et PARSON (1972). La température a été mesurée sur le terrain à l'aide d'un thermomètre à mercure gradué de - 10°C à + 50°C (précision de l'ordre du 1/10 de degré). Le pH a été mesuré, sur le terrain, à l'aide d'une mono-électrode (Ingold Q 423) reliée à un pHmètre portatif pH 56 (Labo Moderne).

La plupart de ces mesures ont été effectuées conformément à la Directive du 5 Février 1976.

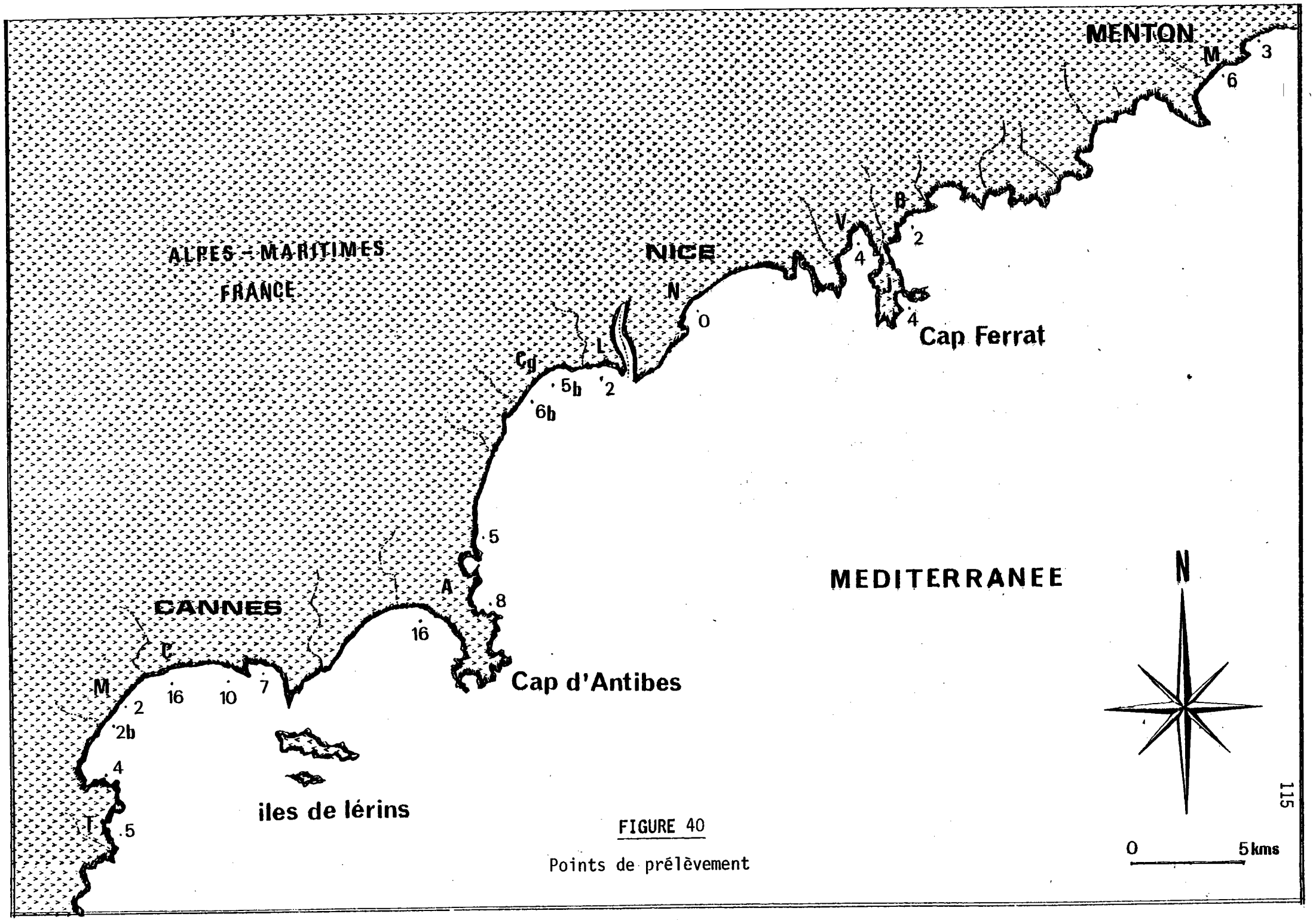


FIGURE 40

Points de prélèvement

★ Examens bactériologiques.

Les numérations des coliformes fécaux (C.F.), des streptocoques fécaux (S.F.), ainsi que la recherche des *Salmonella* (S.) ont été effectuées en utilisant la technique de filtration sur membrane stérile (RODIER,1978). La numération des coliformes fécaux a été faite sur milieu gélosé - lactosé "T.T.C. - Tergitol" (Pr. I.P. 64.451), celle des streptocoques fécaux sur milieu "m.*Enterococcus* agar" (Difco 74 601). La recherche des *Salmonella*, après enrichissement sur bouillon au tétrathionate (Difco 10 4014) à + 42°C pendant 24 h, a été entreprise sur milieu gélosé "Hektoen" (Difco 85 3017). Les résultats ont été exprimés en nombre de bactéries par 100 millilitres pour les bactéries fécales, par absence ou présence dans 1000 millilitres pour les *Salmonella*.

★ Examens virologiques.

Le titrage des virus a été fait selon le protocole décrit en première partie, chapitre I, paragraphe I - 2-1-3-1 : 9,6 ml de suspension cellulaire infectée sont répartis dans 96 cupules d'une plaque de microtitration à raison de 0,1 ml par cupule. L'identification des virus est effectuée selon le protocole décrit en première partie, chapitre III, paragraphe III-1

★ Examens statistiques des données.

Les méthodes utilisées pour la comparaison des titres viraux sont décrites en première partie, chapitre I, paragraphe I -1.

I - 2-2 Résultats.

★ Aspects qualitatifs.

Tout échantillon contenant au moins une particule virale étant considéré comme positif, nous présentons dans le Tableau 44, le pourcentage de positivité de la méthode de concentration des virus en fonction du volume d'eau de mer analysé. Sur les 19 échantillons analysés, la technique utilisant un volume de 20 litres est plus favorable à la mise en évidence des virus. La comparaison des pourcentages de positivité (37% *versus* 53%) montre qu'il n'existe pas de différence statistique lorsque le test du χ^2 est appliqué.

TABLEAU 44

Pourcentage de positivité de la méthode de concentration des virus selon le volume d'échantillon analysé

Nombre d'échantillons	Volume d'échantillon analysé	
	10 litres	20 litres
analysés	19	19
positifs	7	10
% de positivité	37 %	53 %
$\chi^2_{obs.}$	0,098 (N.S.)	

N.S. : différence non significative (95%)

L'examen du Tableau 45 rend compte du nombre d'échantillons dans lesquels les virus ont été mis en évidence simultanément ou séparément par la même méthode de concentration utilisant respectivement les volumes de 10 litres et 20 litres.

TABLEAU 45

Mise en évidence des virus
en fonction des différents volumes d'échantillons (10 et 20 l.)

Volume d'échantillons analysés			10 litres		Totaux
			Nombre d'échantillons		
			+	-	
20 litres	Nombre d'échantillons	+	7	3	10
		-	0	9	9
Totaux			7	12	19

+ : présence de virus
- : absence de virus

Ainsi, sur les 19 prélèvements, alors que 7 ont mis en évidence la présence de virus simultanément dans 10 et 20 litres, seulement 3 ont montré la présence de virus dans 20 litres. Le volume de 10 litres n'a permis, dans aucun cas, de montrer la présence de virus quand l'examen d'un volume de 20 litres s'est révélé négatif. Les différents virus isolés à partir des volumes de 10 et 20 litres, recueillis à un même point de prélèvement, sont portés dans le Tableau 46. Dans 7 cas sur 10, quel que soit le volume prélevé, le même virus est retrouvé. Outre la mise en évidence, dans la plupart des cas, d'entérovirus non poliomyélitiques, d'échovirus 11 et de coxsackie virus A_{21}, dans 2 cas un adénovirus est trouvé au point V_4. Il est à souligner que, dans aucun des cas, il n'a été mis en évidence de virus poliomyélitique.

TABLEAU 46

Identification des virus isolés dans 10 l et 20 l d'eau de mer

Points de prélèvement	Entérovirus						Adénovirus	
	E.N.P.		Echo 11		Coxsackie A_{21}		Adénovirus 6	
	10 l	20 l	10 l	20 l	10 l	20 l	10 l	20 l
T_4	-	+	-	-	-	-	-	-
T_5	-	-	-	-	-	-	-	-
M_2	+	+	-	-	-	-	-	-
M_2 b	-	-	-	-	-	-	-	-
C_7	+	+	-	-	-	-	-	-
C_{10}	+	+	-	-	-	-	-	-
C_{16}	+	+	-	-	-	-	-	-
A_5	-	-	-	-	-	-	-	-
A_8	-	-	-	-	-	-	-	-
A_{16}	-	-	-	-	-	-	-	-
Cg 5b	-	-	-	-	-	+	-	-
Cg 6b	-	-	-	-	+	+	-	-
L_2	-	-	-	-	-	-	-	-
N_0	-	-	-	-	-	-	-	-
V_4	-	-	-	-	-	-	+	+
J_4	-	-	+	+	-	-	-	-
B_2	-	-	-	+	-	-	-	-
M_3	-	-	-	-	-	-	-	-
M_6	-	-	-	-	-	-	-	-
Total	4	5	1	2	1	2	1	1

E.N.P.: entérovirus non poliomyélitique

★ Aspects quantitatifs.

A chaque point de prélèvement, des recherches bactériologiques et physico-chimiques ont été entreprises pour déterminer l'état de salubrité de l'eau de mer en ces points. Les résultats sont consignés dans le Tableau 47. L'examen des paramètres physico-chimiques montre que le point M_2 présente une faible salinité (4,39 g/l) par rapport aux autres points (environ 35 g/l). Cette faible valeur peut s'expliquer par la proximité de la rivière La Siagne qui donne en ce point un apport d'eau douce. Pour les autres points, l'oxygène dissous et le pH présentent de faibles variations (oxygène dissous : 76 ± 4%; pH 8,05 ± 0,02) quel que soit le point considéré. La concentration importante en coliformes fécaux au point M_2 résulte du fait que la rivière La Siagne débouchant en mer est fortement polluée par des rejets sauvages en amont du littoral. Ce point est interdit à la baignade car, dans presque tous les cas, la qualité bactériologique de l'eau ne correspond pas aux normes de salubrité (directive du 5 Février 1976) : les nombres impératifs, à savoir moins de 2000 *E.coli* par 100 ml et moins de 1000 streptocoques fécaux par 100 ml, sont pratiquement toujours dépassés.Pour les autres points, sauf le point A_8, la contamination en coliformes fécaux et streptocoques fécaux est relativement peu importante et bien inférieure aux nombres impératifs. La recherche des *Salmonella* s'est avérée négative dans tous les cas. Par contre, la présence de virus a été détectée en de nombreux points, même quand ceux-ci étaient faiblement contaminés en germes témoins de contamination fécale. Pour le point A_8, c'est la phénomène inverse qui se produit : aucun virus n'est mis en évidence, alors qu'il y a 1500 streptocoques fécaux par 100 ml.

La recherche de corrélation statistique entre les différents paramètres physico-chimiques et microbiologiques, comme le montre le Tableau 48, ne permet de mettre en évidence qu'un lien entre les coliformes fécaux et la salinité ($r = -0,8706$). Pour les autres corrélations, aucune relation n'est démontrée, notamment entre les coliformes fécaux et virus ($r = -0,0031$), entre les streptocoques fécaux et virus ($r = -0,1244$). Ces valeurs soulignent l'absence de tout lien dans l'eau de mer, entre les germes témoins de contamination fécale et les virus.

La comparaison des intervalles de confiance correspondant aux différents titres viraux obtenus à partir de 10 et 20 litres, comme le montre le Tableau 49, ne met en relief aucune différence statistique significative.

TABLEAU 47

Qualité de l'eau aux différents points de prélèvement

Points de prélèvement	Paramètres physico-chimiques				Paramètres biologiques			
	pH	T° eau (°C)	Salinité (g/l)	Oxygène dissous (%)	C.F. /100 ml	S.F. /100 ml	S. /l	Virus★ NPPUC/l
T_4	8,1	13,5	28,65	76	110	18	absence	0,05
T_5	8,1	18,5	32,64	78	8	6	"	absence
M_2	8,2	12,0	4,39	78	2200	320	"	0,80
M_2 b	8,1	13,0	30,22	76	400	320	"	absence
C_7	8,1	15,0	37,57	75	380	88	"	6,50
C_{10}	8,0	13,5	38,40	78	32	32	"	0,80
C_{16}	8,0	13,0	37,98	79	8	6	"	4,90
A_5	8,0	13,8	37,98	72	52	280	"	absence
A_8	8,0	14,0	37,90	66	480	1500	"	"
A_{16}	8,0	13,0	32,32	77	30	80	"	"
Cg 5b	8,1	13,0	32,23	82	46	108	"	1,20
Cg 6b	8,1	13,0	32,64	81	240	440	"	4,00
L_2	8,0	13,0	29,66	-	66	104	"	absence
N_0	8,0	12,5	39,24	80	102	32	"	"
V_4	8,0	13,0	36,74	75	24	10	"	1,50
J_4	8,0	13,0	36,32	75	8	10	"	0,40
B_2	8,0	13,0	36,32	72	110	50	"	3,20
M_3	8,1	14,0	39,15	-	2	4	"	absence
M_6	8,1	13,0	28,62	-	390	220	"	"

NPPUC : nombre le plus probable d'unités cytopathogènes
C.F.: coliformes fécaux
S.F.: streptocoques fécaux
S.: *Salmonella*
- : analyse non effectuée
★ : titre viral trouvé à partir de 20 l d'échantillon
T° : température

TABLEAU 48

Matrice de coefficient de corrélation de toutes les variables mesurées

Variables	pH	Température	Salinité	C.F.	S.F.	Virus
pH	1,00000					
Température	0,12159	1,00000				
Salinité	- 0,70000	0,24400	1,00000			
C.F.	0,64015	- 0,26670	- 0,87060**	1,00000		
S.F.	- 0,01730	- 0,02904	- 0,04726	0,29928	1,00000	
Virus	0,04920	0,01208	0,17364	- 0,00310	- 0,12440	1,00000

** : significatif à 1%

C.F : coliformes fécaux

S.F.: streptocoques fécaux

TABLEAU 49

Concentration virale trouvée successivement dans 10 et 20 l d'échantillons d'eau de mer

Points de prélèvement	N.P.P.U.C./l		Différence statistique (95 %)
	10 litres	20 litres	
T_4	absence	< 0,05	★
T_5	"	absence	-
M_2	1,50 (0,80 - 3,30)	0,80 (0,40 - 1,90)	N.S.
M_2 b	absence	absence	-
C_7	4,60 (3,10 - 6,50)	6,50 (4,80 - 9,50)	N.S.
C_{10}	0,20 (0,03 - 1,60)	0,80 (0,40 - 1,90)	N.S.
C_{16}	6,40 (4,00 - 9,80)	4,90 (3,30 - 6,90)	N.S.
A_5	absence	absence	-
A_8	"	"	-
A_{16}	"	"	-
Cg 5b	"	1,20 (0,50 - 2,30)	★
Cg 6b	2,10 (0,90 - 4,20)	4,00 (2,60 - 5,80)	N.S.
L_2	absence	absence	-
M_0	"	"	-
V_4	0,50 (0,09 - 1,90)	1,50 (0,80 - 2,70)	N.S.
J_4	< 0,10	0,40 (0,07 - 1,20)	★
B_2	absence	3,20 (2,00 - 4,90)	★
M_3	"	absence	-
M_6	"	"	-

N.P.P.U.C. : nombre le plus probable d'unités cytopathogènes
N.S. : différence non significative
( ) : les nombres entre parenthèses indiquent la limite de confiance à 95%
★ : comparaison statistique impossible à déterminer

I - 2-3 Discussion.

Lorsque, à chaque point, les concentrations virales et bactériennes trouvées sont comparées, il semble qu'il n'existe aucun lien entre l'importance de la contamination fécale et la présence de virus. Des tentatives de corrélation ont été faites (GOYAL et coll.,1978; HUGUES et coll.,1979 c; KATZENELSON,1977; Relevé Epidem. Hebd.,1980) : toutes se sont révélées négatives. La directive du 5 Février 1976 sur la qualité des eaux de baignade en mer conseille, lorsqu'un point est pollué bactériologiquement, d'effectuer en analyses complémentaires, des recherches de virus et de *Salmonella*. Compte tenu de cette directive, seuls 2 cas sur 19 auraient dû faire l'objet de ces recherches; or, il s'avère que sur les 17 autres points considérés, 9 points ont présenté une contamination virale. Cependant, la mise en évidence, en un point de prélèvement, d'échantillons contaminés par des virus, ne signifie pas nécessairement un danger pour la santé de l'individu. En effet, aucune donnée épidémiologique n'établit avec précision un lien éventuel entre la présence d'un virus et l'apparition d'une maladie. Les rares travaux effectués sur ce sujet (BRISOU,1978; BRYAN et coll.,1974; CRAUN et Mc CABE,1973; TYSSET et coll.,1966), n'aboutissent pas à la connaissance précise des doses infectantes. Cependant, CABELLI et coll.(1979), à partir d'une enquête effectuée sur 10069 personnes, observent un nombre de gastro-entérites faible, mais plus important parmi les baigneurs que parmi les non baigneurs. Sur le littoral des Alpes-Maritimes aucune épidémie, qui aurait eu un rapport avec la baignade en eau de mer, n'a été déclarée officiellement aux différents Services compétents, pendant et après le mois d'expérimentation.

Le contrôle virologique des 19 points choisis ayant été effectué depuis plusieurs années, à partir de 20 litres d'eau, il nous est apparu logique de conserver ce volume pour suivre l'évolution de la présence de virus au cours du temps. Le volume de 20 litres ne répond pas, cependant, aux voeux de la directive du 5 février 1976 qui demande de rechercher les entérovirus dans 10 litres. C'est pourquoi nous nous sommes demandé si le volume de 20 litres ne favorisait pas la mise en évidence des virus. Bien que les résultats montrent un léger avantage pour 20 litres, l'écart constaté n'est cependant pas statistiquement significatif. La comparaison des types de virus isolés à la fois dans 10 litres et 20 litres, montre que, dans tous les cas, les échantillons prélevés en un point sont bien homogènes. Il peut en être déduit que la contamination virale autour d'un point est relativement importante car les échantillons

de 10 litres et 20 litres ont été prélevés avec un intervalle de temps de 2 minutes.

Les concentrations virales qui ont été déterminées aux différents points de prélèvement, durant notre expérimentation, varient de 0 à 7 particules virales par litre d'eau de mer. Nos chiffres, comme l'indique le Tableau 50, ne diffèrent pas énormément des valeurs rapportées par d'autres auteurs.

TABLEAU 50

Concentration virale dans l'eau de mer

Auteurs		Concentration virale par litre
CROVARI et coll.	(1974)	1,0 à 17,00 $D.I._{50}$
DE FLORA et coll.	(1975)	1,0 à 28,00 $D.I._{50}$
FARRAH et coll.	(1977)	0,0 à 0,20 U.F.P.
GERBA et coll.	(1977)	0,2 à 1,60 U.F.P.
KATZENELSON et coll.	(1977)	0,0 à 0,06 U.F.P.
EDMOND et coll.	(1978)	0,0 à 0,10 U.F.P.
GOYAL et coll.	(1978)	0,0 à 0,60 U.F.P.
HUGUES et coll.	(1979 a et c)	0,0 à 27,00 N.P.P.U.C.
SCHWARTZBROD et coll.	(1979 b)	0,1 à 1,70 N.P.P.U.C.

Même si l'échantillon de 20 litres présente quelques inconvénients (volume, poids, temps de prélèvement et de passage à travers la poudre de verre), c'est ce volume qui permet d'isoler le plus fréquemment des virus. L'utilisation d'un échantillon de 20 litres d'eau de mer permet de mieux définir l'état sanitaire d'une zone de baignade.

I - 3 ESSAIS SUR DES EAUX DE PISCINE (COMPARAISON 20 LITRES ET 60 LITRES).

I - 3-1 Matériel et méthodes.

★ Points et mode de prélèvement.

Les eaux de 5 piscines ont été étudiées. La désinfection est réalisée par l'emploi, dans deux cas, d'eau de Javel, dans deux autres cas, de brome et enfin de chlore gazeux pour la cinquième installation. Les principales caractéristiques de ces établissements sont représentés dans le Tableau 51 et les Figures 41, 42 et 43.Les points de prélèvement d'eau se situent au niveau des bouches de trop-plein. L'eau est prélevée en surface:

- dans un premier temps, pour définir le volume le mieux adapté à la recherche des virus, 5 prélèvements différents ont été réalisés : 2 pour la recherche des virus (20 et 60 l), 3 pour la recherche des bactéries pathogènes [*S.aureus* (1 l) et *P.aeruginosa* (1 l)], des bactéries fécales et des germes mésophiles aérobies (250 ml).
- dans un deuxième temps, pour connaître la contamination bactérienne et virale des eaux de piscine, 4 prélèvements seulement ont été effectués : 1 pour la recherche des virus (20 l) et 3 pour la recherche des bactéries (2 x 1 litre pour *S.aureus* et *P.aeruginosa*; 250 ml pour les bactéries fécales et les germes mésophiles aérobies).

Tous les échantillons d'eau ont été collectés le plus soigneusement possible soit dans des récipients plastiques de 20 litres stérilisés à l'ozone, soit dans des flacons en verre stériles de 1 litre contenant chacun une quantité suffisante de solution de thiosulfate de sodium stérile à 12,5% pour neutraliser l'oxydant (4 ml pour les bidons, 4 gouttes pour les flacons).

★ Recherches chimiques.

Les mesures de pH et de la quantité de l'agent stérilisant ont été faites "in situ". Le chlore et le brome libres ont été dosés par la technique du D.P.D. à l'aide d'un coffret Aquamerk 11 120.

★ Recherches bactériologiques.

Les analyses concernant la numération des germes mésophiles aérobies, des coliformes et *E.coli* ont été effectuées conformément aux techniques définies par la circulaire ministérielle du 21 Janvier 1960.

TABLEAU 51

Caractéristiques des piscines testées

Type de stérilisation	Piscine n°	Système		Fréquentation moyenne par jour
		Filtration	Hydraulique	
Brome	1	sable	1 bassin	230
	2	diatomée	1 bassin	250
Chlore gazeux	3	sable	2 bassins avec circuit commun	120
Javel	4	sable	2 bassins avec circuit commun	571
	5	sable	.2 bassins avec circuit séparé .2 injections de javel	250

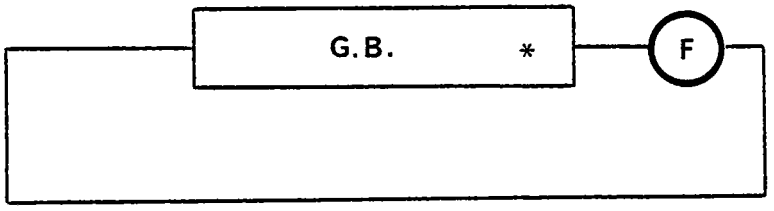
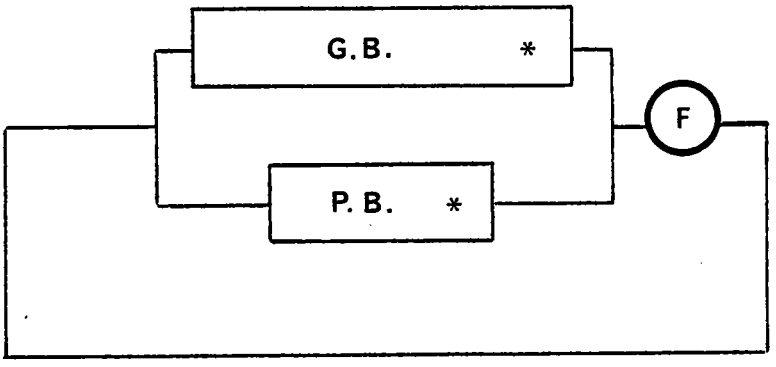


FIGURE 41

Schéma du circuit hydraulique pour les piscines n° 1 et 2



G.B. : grand bassin (adultes)
P.B. : petit bassin (enfants)
F. : filtres
* : point de prélèvement

FIGURE 42

Schéma du circuit hydraulique pour les piscines n° 3 et 4

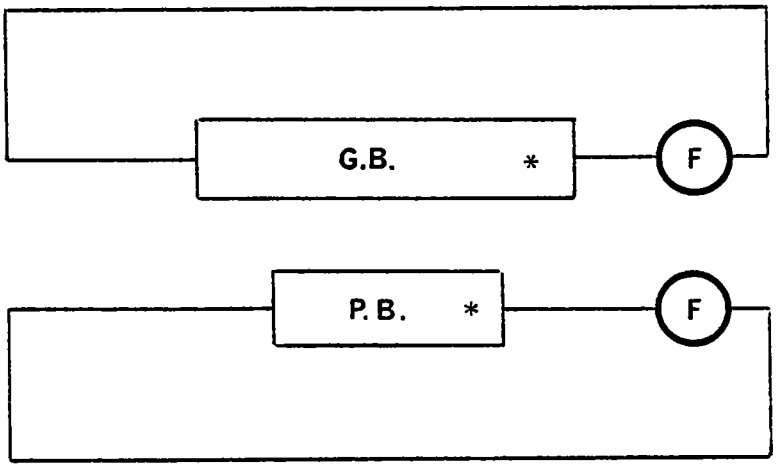


FIGURE 43

Schéma du circuit hydraulique pour la piscine n° 5

Les recherches de *S. aureus* (LECLERC et SAVAGE,1967) et *P. aeruginosa* (LEVIN et CABELLI,1972) sont effectuées chacune sur 1 litre d'eau en utilisant la technique des membranes filtrantes (RODIER,1978). La mise en évidence de *S. aureus* a été faite sur milieu "mannitol salt agar" (Difco 30 601), celle de *P. aeruginosa* sur "gélose pour isolement du bacille pyocyanique" (Pr. I.P. 64 807).

★ Recherches virologiques.

La mise en évidence des particules virales est obtenue par l'application de la technique d'adsorption-élution sur de la poudre de verre décrite en première partie, chapitre II, paragraphe II - 1-1. Aucune recherche quantitative n'a été entreprise. La mise en évidence des virus a été faite en ensemençant 10 ml d'éluat dans un flacon de 75 cm^2 de surface contenant un tapis cellulaire (cellules K.B.). Après un contact à + 37°C pendant 2 h, l'inoculum est remplacé par 20 ml de milieu de survie (L.Y. + 1% S.A.). Après incubation à + 37°C, pendant 5 à 6 jours, le tapis cellulaire est congelé puis décongelé. Après centrifugation à 1800 g, 2 ml de surnageant sont inoculés sur un nouveau tapis cellulaire, dans les mêmes conditions que précédemment (2ème passage). La présence ou l'absence d'un effet cytopathogène est déterminée au 3ème passage.

I - 3-2 Résultats.

L'examen des résultats portés dans le Tableau 52 montre que la recherche comparative des virus dans 20 litres et 60 litres ne donne, dans nos conditions expérimentales, aucune différence. Les mesures des paramètres physico-chimiques, bactériologiques et virologiques effectuées sur les eaux de piscine traitées par le chlore gazeux, l'eau de Javel et le brome, sont respectivement présentées dans les Tableaux 53, 54 et 55. Pour les eaux de piscine traitées au brome, sur les 17 échantillons examinés ne présentant aucune contamination virale :
3 se sont révélés non conformes chimiquement (essais 11, 16 et 22),
3 se sont révélés non conformes bactériologiquement (essais 3, 12 et 17),
4 se sont révélés non conformes chimiquement et bactériologiquement (essais 13, 15, 18 et 19). Seuls 7 échantillons sont conformes aux normes de salubrité (essais 1, 2, 14, 20, 21, 23 et 24).

Pour les eaux traitées au chlore gazeux, sur 10 échantillons analysés : 3 présentent une contamination virale (essais 4, 27 et 33) dont 1 seul est également contaminé bactériologiquement (essai 27), 3 échantillons ne sont pas conformes bactériologiquement (essais 25, 28 et 29), 1 seul est non conforme chimiquement (essai 31) et 1 non conforme bactériologiquement et chimiquement

TABLEAU 52

Recherche comparée des virus dans 20 et 60 l. d'eau de piscine

Essai n°	Type de traitement	Virus dans :	
		20 l.	60 l.
1	Brome	absence	absence
2		"	"
3		"	"
4	Chlore gazeux	présence	présence
5	Chlore javel	absence	absence
6		"	"
7		"	"
8		"	"
9		"	"
10		présence	présence

TABLEAU 53

Recherche des paramètres physico-chimiques, bactériologiques et virologiques dans les eaux de piscine traitées par le brome

Essai n°	Paramètres								Conclusions
	physico-chimiques		bactériologiques et virologiques						
	Brome libre mg/l	pH	Germes totaux /ml	*E.coli* /100 ml	S.fécaux /10 ml	*S.aureus* /1000 ml	*P.aeroginosa* /1000 ml	Virus /20000 ml	
1 ★	0,5	7,5	50	absence	absence	absence	absence	absence	C.
2 ★	0,9	7,5	absence	"	"	"	"	"	C.
3 ★	0,8	7,7	"	"	"	PRESENCE	"	"	N.C.B.
11	0,2	7,7	"	"	"	absence	"	"	N.C.C.
12	1,1	7,5	"	"	2	"	"	"	N.C.B.
13	0,0	7,1	6	"	"	PRESENCE	PRESENCE	"	N.C.C.B.
14	0,8	7,4	1	"	"	absence	absence	"	C.
15	0,0	7,6	1	"	1	"	"	"	N.C.C.B.
16	0,1	7,8	10	"	absence	"	"	"	N.C.C.
17	0,5	7,1	530	"	"	"	"	"	N.C.B.
18	0,1	7,1	480	"	2	PRESENCE	PRESENCE	"	N.C.C.B.
19	0,3	7,6	320	"	absence	absence	absence	"	N.C.C.B.
20	0,5	7,7	4	"	"	"	"	"	C.
21	0,6	8,1	absence	"	"	"	"	"	C.
22	2,5	7,3	"	"	"	"	"	"	N.C.C.
23	0,5	7,7	"	"	"	"	"	"	C.
24	1,4	7,6	"	"	"	"	"	"	C.

C : conforme

N.C. : non conforme (B : bactériologiquement - C : chimiquement - V : virologiquement)

★ : essai porté dans le tableau 52

TABLEAU 54

Recherche des paramètres physico-chimiques, bactériologiques et virologiques dans les eaux de piscine traitées par le chlore gazeux

Essai n°	Paramètres								Conclusions
	physico-chimiques		bactériologiques et virologiques						
	Chlore libre mg/l	pH	Germes totaux /ml	*E.coli* /100 ml	S.fécaux /10 ml	*S.aureus* /1000 ml	*P.aeruginosa* /1000 ml	Virus /20000 ml	
4 ★	0,4	7,6	absence	absence	absence	absence	absence	E.N.P.	N.C.V.
25	0,3	7,7	"	"	"	PRESENCE	"	absence	N.C.B.
26	0,1	7,2	1	"	"	PRESENCE	"	"	N.C.C.B.
27	0,6	7,8	140	"	"	absence	"	E.N.P.	N.C.B.V.
28	0,4	7,1	350	"	"	PRESENCE	"	absence	N.C.B.
29	0,3	7,4	absence	"	"	PRESENCE	"	"	N.C.B.
30	0,3	7,8	6	"	"	absence	"	"	C.
31	1,5	8,2	absence	"	"	"	"	"	N.C.C.
32	1,0	7,5	"	"	"	"	"	"	C.
33	0,5	7,3	"	"	"	"	"	POLIO I	N.C.V.

★ : essai porté dans le tableau 52

C : conforme

N.C : non conforme (B : bactériologiquement - C : chimiquement - V : virologiquement)

E.N.P : entérovirus non poliomyélitique

TABLEAU 55

Recherche des paramètres physico-chimiques, bactériologiques et virologiques dans les eaux de piscine traitées par l'eau de Javel

Essai n°	Paramètres								Conclusions
	physico-chimiques		bactériologiques et virologiques						
	Chlore libre mg/l	pH	Germes totaux /ml	*E.coli* /100 ml	S.fécaux /10 ml	*S.aureus* /1000 ml	*P.aéruginosa* /1000 ml	Virus /20000 ml	
5 ★	0,2	7,5	absence	absence	absence	PRESENCE	absence	absence	N.C.B.
6 ★	1,0	7,4	"	"	"	PRESENCE	"	"	N.C.B.
7 ★	0,6	7,2	"	"	"	PRESENCE	"	"	N.C.B.
8 ★	1,5	7,2	"	"	"	absence	"	"	N.C.C.
9 ★	1,0	7,6	"	"	"	"	"	"	C.
10 ★	0,5	7,4	"	"	"	"	"	E.N.P.	N.C.V.
34	0,3	7,6	"	"	"	"	"	absence	C.
35	0,6	7,5	"	"	"	"	"	ADENO 6	N.C.V.
36	0,2	7,4	40	2	6	PRESENCE	"	ADENO 6	N.C.B.V.
37	1,0	7,4	2	absence	absence	PRESENCE	"	absence	N.C.B.
38	1,3	7,8	absence	"	"	absence	"	"	N.C.C.
39	0,1	8,1	20	"	"	PRESENCE	"	"	N.C.C.B.
40	0,0	7,6	2	2	2	PRESENCE	"	"	N.C.C.B.
41	0,7	7,8	absence	absence	absence	absence	"	"	C.
42	0,0	7,9	2	2	2	"	"	E.N.P.	N.C.C.B.V.
43	0,6	7,5	absence	absence	absence	"	"	absence	C.
44	0,5	7,6	5000	1200	"	"	"	"	N.C.B.
45	1,5	7,4	absence	absence	"	"	"	"	N.C.C.
46	0,8	7,6	"	"	"	"	"	"	C.
47	0,4	7,6	"	"	"	"	"	POLIO I	N.C.V.

★ : essai porté dans le tableau 52

C : Conforme

N.C. : non conforme (B : bactériologiquement - C : chimiquement - V : virologiquement)

E.N.P. : entérovirus non poliomyélitique

(essai 26). Seuls 2 échantillons sur les 10 sont conformes (essais 30 et 32) aux normes de salubrité.

Pour les eaux traitées à l'eau de Javel, sur les 20 échantillons examinés, 5 ne sont pas conformes virologiquement (essais 10, 35, 36, 42 et 47), dont 1 non conforme bactériologiquement (essai 36) et 1 non conforme chimiquement et bactériologiquement (essai 42), 3 échantillons ne sont pas conformes chimiquement (essais 8, 38 et 45), 5 sont non conformes bactériologiquement (essais 5, 6, 7, 37 et 44) et 2 non conformes chimiquement et bactériologiquement (essais 39 et 40). Seuls 1/4 des échantillons (5 sur 20) sont conformes aux normes de salubrité (essais 9, 34, 41, 43 et 46). Le nombre de fois où l'eau de piscine ne répond pas aux conditions de salubrité bactériologique et virologique est très important (26/47 soit 55%) quel que soit le traitement désinfectant utilisé.
Si l'on s'en tient aux seules normes bactériologiques officielles, à savoir : nombre total de germes mésophiles inférieur à 100 par ml, absence d'*E.coli* et de streptocoques fécaux dans respectivement 100 ml et 10 ml, le pourcentage d'eau de piscine ne correspondant pas aux critères précités est plus faible (21/47 soit 45). Les eaux de piscine sont contaminées microbiologiquement, par ordre d'importance, par des *S.aureus* (30%), des virus (17%) et des *P.aeruginosa* (4%). L'examen des différentes valeurs physico-chimiques montre que 15 eaux sur 47 présentent un taux de désinfectant plus faible ou plus grand que celui préconisé par l'arrêté du 13 Juin 1969 (J.O. du 8 Juillet 1969).

A la vue des résultats des Tableaux 53, 54 et 55, nous pourrions être tentés de comparer les différents traitements désinfectants vis-à-vis de la charge virale. Les pourcentages de positivité (30% pour le chlore gazeux et 25% pour l'eau de Javel) portés dans le Tableau 56 n'ont aucune signification pratique car les différences constatées peuvent être dues au seul fait du hasard. En effet, pour étudier l'efficacité des différents traitements désinfectants, il faudrait qu'il y ait les mêmes baigneurs, que leur nombre soit identique, que les prélèvements d'eaux soient faits dans les mêmes conditions, etc... Toutes ces conditions étant difficiles à réaliser sur le terrain, la comparaison est impossible.

TABLEAU 56

Nombre et pourcentage de virus mis en évidence dans les piscines selon le traitement désinfectant.

Echantillons	Traitement			Total
	Brome	Chlore gazeux	Chlore Javel	
analysés	17	10	20	47
positifs ★	0	3	5	8
% de positivité	/	30%	25%	17%

★ : échantillons où des virus ont été mis en évidence.

L'analyse des conclusions portées dans le Tableau 57 montre que sur les 8 échantillons contaminés par des virus, 5 étaient conformes chimiquement et bactériologiquement (essais 4, 9, 33, 35 et 47). Ceci suggère que les virus, pour une même dose de désinfectant, sont plus résistants que les bactéries pathogènes ou non (HUGUES et PLISSIER, 1976).Pour les 3 échantillons restants, il y avait association de virus avec soit des germes mésophiles aérobies (essai 27), soit des germes de contamination fécale, soit *S.aureus* (essais 36 et 42).

I - 3-3 Discussion.

Dans une masse d'eau,la population virale est,par définition, en équilibre instable avec les facteurs physico-chimiques et biologiques de l'écosystème. Dans ces conditions, il est indispensable de définir un volume suffisant pour que la population virale tende vers une nouvelle structure en équilibre avec le nouveau micro-écosystème représenté par l'échantillon. Compte tenu de l'efficacité de la méthode de concentration virale utilisée, un échantillon de 20 litres nous a paru suffisant. En effet, chaque fois qu'un virus a été mis en évidence,

TABLEAU 57

Analyse des conclusions

	Brome		Chlore				Total	
			gazeux		Javel			
	Nombre	%	Nombre	%	Nombre	%	Nombre	%
C.	7	41	2	20	5	25	14	30
N.C.C.	3	18	1	10	3	15	7	15
N.C.B.	3	18	3	30	5	25	11	23
N.C.V.	0	0	2	20	3	15	5	11
N.C.C.B.	4	23	1	10	2	10	7	15
N.C.B.V	0	0	1	10	1	5	2	4
N.C.C.B.V.	0	0	0	0	1	5	1	2
	17	100	10	100	20	100	47	100

C : conforme

N.C : non conforme (B : bactériologiquement - C : chimiquement - V : virologiquement)

dans 60 litres, il l'a été aussi dans 20 litres.

Ces résultats sont en accord avec ceux que nous avons obtenus précédemment pour les eaux usées (effluents) et pour l'eau de mer. Il peut en être déduit que la contamination virale autour du point de prélèvement est relativement importante et que les échantillons prélevés en un même point sont homogènes. Pour la mise en évidence des virus, outre le volume, le lieu de prélèvement, en profondeur ou en surface, peut être un facteur important. Comme le soulignent SUSANI et HAZEGHI (1976), il existe une différence de concentration en germes dans l'eau, en surface et en profondeur. Cette constatation indique l'existence d'un défaut de circulation interne qui n'assure pas une dilution constante des agents polluants.Aussi, comme SPINASSE et coll. (1978), nous pensons que c'est à la surface de l'eau qu'un maximum de microorganismes peut être piégé. En effet, la pellicule de matières organiques qui y est formée peut protéger les virus de l'action des désinfectants.

Le pourcentage des échantillons d'eau de piscine contaminées par des virus est du même ordre que celui cité par LIEBSCHER (1970). Ce dernier trouve, dans 20% des prélèvements, la présence de coxsackie virus type B_3. Ce faible pourcentage peut s'expliquer par le fait que des baigneurs, porteurs d'un sérotype viral donné, contaminent irrégulièrement l'eau de piscine (BELIAN et BÖTHING, 1964; CARLSON, 1972). Les recherches de virus dans les eaux de piscine, bien que peu nombreuses (DENIS,1973), ont permis, à un certain nombre d'auteurs, de mettre en évidence les agents étiologiques responsables d'épidémies virales (ADAMCZYK,1970; BURGER, 1973; HAWLEY et coll.,1973; Mc LEAN, 1963). Notre étude a permis la mise en évidence, à deux reprises, du virus poliomyélitique type 1 et de l'adénovirus type 6. La présence d'adénovirus dans les eaux de piscine avait déjà été signalée par VAN DER VEEN et VAN DER PLOEG en 1958, d'ANGELO et coll. en 1979 et MARTONE et coll. en 1980.

L'application des normes bactériologiques officielles aux eaux de piscine ne rend pas compte exactemement de l'état sanitaire des piscines (HUGUES et coll., 1979 d). Outre la présence, dans les eaux de piscine, de *S.aureus* et *P.aeruginosa* (BRODSKY et NIXON, 1974; CAVAZZINI et coll., 1979; SCHINDLER et coll.,1978; SPINASSE et coll.,1978; VALENTINO et coll.,1978), il est noté que le nombre d'échantillons,où les virus sont présents, n'est pas négligeable. Cette constatation soulève le problème du choix des tests microbiologiques et de la représentativité des germes témoins de contamination fécale. Sur le plan théo-

rique, il est difficile de prétendre que les coliformes fécaux et les streptocoques fécaux puissent être représentatifs des virus d'origine entérique, compte tenu des différences de structure et de résistance propres à chacun de ces micro-organismes. Cependant, il convient de souligner que la recherche de ces deux bactéries - à l'exclusion des coliformes totaux qui n'ont aucune signification sanitaire, car ils comprennent un grand nombre de germes de l'environnement - est la mieux adaptée à l'étude rapide de la qualité bactériologique d'une eau de piscine. La rapidité des résultats n'implique pas nécessairement des conclusions justes quant à l'état sanitaire de l'eau de piscine. Nos résultats, en accord avec ceux de FAVERO et coll. (1964), montrent qu'aucune corrélation ne peut être faite entre les germes témoins de contamination fécale et les bactéries pathogènes ou virus; de même, entre les bactéries pathogènes et les virus.Dans presque tous les cas, bien que l'eau de piscine soit en conformité avec les normes chimiques, la présence, dans ces mêmes eaux, de virus et de *S.aureus* est notée. La question se pose alors : la concentration en chlore ou brome libre imposée par les textes officiels est-elle suffisante ?

CHAPITRE II

REPRESENTATIVITE DE L'ECHANTILLON

Sur les stations d'épuration biologiques et/ou physico-chimiques, il est habituel d'effectuer sur 24 h des bilans physico-chimiques. Il est plus rare de réaliser, pendant la même période, des bilans bactériologiques et surtout virologiques. En effet, la plupart des auteurs ont déterminé des concentrations virales à partir de prélèvements ponctuels soit sur l'affluent, soit sur l'effluent. Lorsqu'un rendement a été calculé, c'est presque toujours, d'une part, à partir de deux prélèvements ponctuels à l'entrée et à la sortie de la station d'épuration, et d'autre part, sans tenir compte du temps de rétention de l'eau dans les ouvrages.

Pensant que la détermination du taux de réduction des bactéries et des virus pouvait être faussée par le non respect de ces deux conditions, nous avons donc été amenés à étudier les rendements sur 24 h de deux stations d'épuration (biologique et physico-chimique) en faisant intervenir le temps de rétention et le mode de prélèvement.

II - 1 MATERIEL ET METHODES.

II - 1-1 Eaux de travail.

Nos expériences ont été réalisées avec des eaux urbaines provenant de deux stations d'épuration présentant des caractéristiques différentes :

- La station d'épuration biologique de Cagnes-sur-Mer.

Elle traite les eaux usées des villes de Cagnes-sur-Mer, St Laurent du Var, La Colle-sur-Loup et Villeneuve-Loubet. Elle comprend une décantation primaire en quatre bassins de 600 m^3 chacun, une épuration biologique par boues activées moyenne charge en quatre bassins d'oxydation d'un volume total de 2800 m^3, une décantation secondaire en quatre décanteurs de 600 m^3 chacun. Le temps de rétention, pour une tranche d'eau donnée, est de l'ordre de 4 heures. L'effluent est rejeté par un émissaire en mer, long de 220 m et posé à huit mètres de profondeur. La station a une capacité de 130 000 équivalents-habitants. Son débit est de l'ordre de 18 000 m^3 j^{-1}. Les caractéristiques physico-chimiques principales des eaux usées brutes et épurées sont présentées dans le Tableau 58.

- La station d'épuration physico-chimique de Cannes.

Elle collecte les eaux usées des agglomérations de Cannes, Mandelieu, La Roquette, Le Cannet et Mougins. Elle comprend deux clarifloculateurs de 5700 m^3

chacun, permettant, grâce à l'injection de $Fe\ Cl_3$ additionné de polyelectrolytes anioniques, une décantation rapide des boues qui sont alors reprises dans un épaississeur. Il n'y a pas d'adjonction de chaux dans le traitement de l'eau. Les doses de $Fe\ Cl_3$ sont relativement faibles (25 mg/l) par rapport aux quantités utilisées en pratique courante par ce type de station. Le temps de séjour moyen dans chaque clarifloculateur est de 4 h. L'effluent est rejeté par un émissaire en mer à 1200 m du rivage et à 85 mètres de profondeur. La station a une capacité de 225 000 équivalents-habitants. Son débit est de l'ordre de 48 000 $m^3\ j^{-1}$. Les caractéristiques physico-chimiques de l'affluent et de l'effluent sont présentées dans le Tableau 59.

II - 1-2 Collecte des échantillons.

- La station d'épuration biologique de Cagnes-sur-Mer.

★ Dans une première expérimentation, pour déterminer l'heure la mieux adaptée à la recherche des virus et des bactéries fécales dans l'effluent, nous avons prélevé sur une période de 24 h, toutes les 2 h, environ 10 litres. Ces 10 litres sont obtenus grâce à un échantillonneur d'eau type Isco 1670 collectant, toutes les 6 mn environ, 500 ml d'eau usée traitée qui serviront aux analyses bactériologiques et virologiques.

★ Dans une deuxième expérimentation, pour déterminer l'influence du mode de prélèvement et des volumes analysés sur l'estimation de la charge virale de l'effluent, 3 séries de 3 échantillons de 110 litres chacun (1 série par mois) ont été collectés de la manière suivante :

- un prélèvement ponctuel effectué à midi,
- un prélèvement continu effectué à l'aide d'une pompe peristaltique prélevant constamment l'effluent pendant une période de 24 h,
- un prélèvement séquentiel effectué à l'aide d'un échantillonneur d'eau type Isco 1670 collectant, sur 24 h, 500 ml toutes les 6 mn.

★ Dans une troisième expérimentation, pour déterminer l'influence de différents modes de prélèvement sur l'estimation du rendement bactériologique et virologique de la station d'épuration, 3 séries d'échantillons d'eaux usées (affluent et effluent) ont été recueillies selon 3 modes de prélèvement différents

- prélèvement continu : le jour J, deux pompes péristaltiques prélèvent constamment, à l'entrée et à la sortie de la station d'épuration, les eaux usées, de façon à avoir, 24 h après, au jour J + 1, deux échantillons d'environ 20 l,

TABLEAU 58

Caractéristiques physico-chimiques principales moyennes des eaux de la station d'épuration de Cagnes s/mer

Paramètres physico-chimiques	Station de Cagnes s/Mer		Taux de réduction (%)★
	Affluent	Effluent	
pH	7,3 à 7,7	7,8 à 8,0	-
M.E.S.T. (mg/l)	150 à 200	15 à 30	90
D.C.O. (mg/l)	400 à 600	50 à 80	85
$D.B.O_5$ (mg/l)	200 à 250	20 à 30	85

★ : taux de réduction calculé à partir des valeurs obtenues lors d'un bilan de 24 h (3 x 8 h)

TABLEAU 59

Caractéristiques physico-chimiques principales moyennes des eaux de la station d'épuration de Cannes

Paramètres physico-chimiques	Station de Cannes		Taux de réduction (%)★
	Affluent	Effluent	
pH	7,4 à 7,7	7,5 à 8,0	-
M.E.S.T. (mg/l)	150 à 200	40 à 80	70
D.C.O. (mg/l)	400 à 550	180 à 220	60
$D.B.O_5$ (mg/l)	160 à 250	70 à 100	60

★ : taux de réduction calculé à partir des valeurs obtenues lors d'un bilan de 24 h (3 x 8 h)

- prélèvement séquentiel : le même jour J, deux préleveurs Isco 1670 collectent, toutes les 6 mn, 100 ml d'eaux usées (affluent et effluent). Comme précédemment, au jour J+1, sont obtenus deux échantillons d'environ 20 l,
- prélèvement ponctuel : le jour J+1, à 8 h, sont prélevés 20 l d'effluent. Quatre heures plus tard, compte tenu du temps de rétention de la station d'épuration, sont collectés 20 l d'effluent.

★ Le protocole des trois expériences est porté dans le Tableau 60. 9 prélèvements de 20 litres ont été collectés à l'entrée de la station après les opérations de dégrillage et de dessablage; 30 autres de 10, 20 et 110 litres ont été prélevés dans l'effluent, au niveau de la rigole d'évacuation des eaux traitées vers l'émissaire. A partir de chaque échantillon de 10, 20 et 110 litres, il a été prélevé stérilement, dans un flacon de verre stérile, 250 ml d'eaux usées, pour effectuer les analyses bactériologiques. Tous les volumes d'eaux prélevés, quel que soit le mode de prélèvement, ont été collectés dans des récipients plastiques de 20 litres, stérilisés à l'ozone. L'opération de prélèvement a été réalisée avec des gants et du matériel ayant subi, avant et après chaque prélèvement, une décontamination par traitement à l'eau de Javel. Le transport des échantillons au Laboratoire a toujours été fait dans les 45 mn suivant le moment du prélèvement.

- La station d'épuration physico-chimique de Cannes.

Pour connaître le rendement microbiologique de la station et les variations au cours du temps des concentrations virales et bactériennes dans l'affluent et l'effluent, nous avons effectué, sur une période de 24 h, des prélèvements continus par tranche horaire de 2 h. Les échantillons d'eaux ont été collectés grâce à deux préleveurs Isco 1670 placés à l'entrée des pré-traitements et à la sortie des clarifloculateurs. Dans tous les cas, 20 litres d'eaux usées servant aux analyses virologiques et bactériologiques ont été recueillis dans des récipients plastiques préalablement stérilisés à l'ozone. Les conditions de prélèvement sont les mêmes que celles décrites précédemment. L'extraction des virus et la numération des bactéries fécales ont été effectuées dans un délai maximum de 10 h.

TABLEAU 60

Protocole des trois expérimentations

Expérimentation n°	Type d'eau	Prélèvement		Volume collecté	Volume analysé
		Mode	Temps		
1	Effluent	séquentiel	2 h	10 l	10 l
2	Effluent	séquentiel	24 h	110 l	10 et 100 l
		continu	24 h	110 l	10 et 100 l
		ponctuel	-	110 l	10 et 100 l
3	Affluent	séquentiel	24 h	20 l	20 l
		continu	24 h	20 l	20 l
		ponctuel	-	20 l	20 l
	Effluent	séquentiel	24 h	20 l	20 l
		continu	24 h	20 l	20 l
		ponctuel	-	20 l	20 l

II - 1-3 Analyses bactériologiques.

Le dénombrement des coliformes fécaux et des streptocoques fécaux a été effectué en utilisant la technique de filtration sur membrane stérile, décrite en deuxième partie, chapitre I, paragraphe I - 2-1. Les résultats ont été exprimés en nombre de bactéries par 100 ml.

II - 1-4 Analyses virologiques.

★ Préparation des échantillons.

Quels que soient l'origine et les volumes des eaux à analyser, pour tous les échantillons acidifiés à pH 3,5 il a été ajouté $5,0.10^{-4}$ M de $Al\ Cl_3$.

★ Méthode d'adsorption-élution.

Elle est décrite en première partie, chapitre II, paragraphe II - 1-1.

★ Méthode de titrage.

Le titrage des échantillons est réalisé par la détermination du nombre le plus probable d'unités cytopathogènes, avec 96 inoculums par dilution :

• Pour les concentrats obtenus à partir des échantillons d'affluent et d'effluent de la station d'épuration biologique de Cagnes-sur-Mer, le titrage décrit en première partie, chapitre I, paragraphe I - 2-1-3-1, a été pratiqué :
9,6 ml de suspension cellulaire infectée sont répartis dans 96 cupules d'une plaque de microtitration à raison de 0,1 ml par cupule.

• Pour les concentrats obtenus à partir des échantillons d'affluent et d'effluent de la station d'épuration physico-chimique de Cannes, le titrage décrit en première partie, chapitre I, paragraphe I - 2-1-3-2-2, a été réalisé :
9,6 ml d'éluat ou de dilution sont répartis dans une plaque de microtitration contenant un tapis cellulaire continu, à raison de 0,025 ml par cupule.

II - 1-5 Analyses statistiques.

La comparaison statistique des résultats obtenus à partir des différents échantillons d'effluent et d'affluent a été réalisée en utilisant la méthode d'analyse de variance à 3 facteurs [2 fixes : mode de prélèvement, lieu de prélèvement (effluent, affluent); 1 aléatoire : jour d'expérimentation], après transformation logarithmique des valeurs obtenues (SOKAL et ROHLF,1969). Cette méthode a été décrite pour 2 facteurs, en première partie, chapitre I, paragraphe I - 1. Les calculs ont été faits à l'aide d'une calculatrice T.I. 59.

II - 1-6 Mesure des débits.

A l'aide d'un seuil rectangulaire à contraction latérale, placé à la sortie de la station d'épuration de Cannes, les débits sont mesurés en déterminant la hauteur d'eau avec un débitmètre à bulle. Par quelques mesures complémentaires, il a été vérifié que le débit d'entrée était identique à celui de la sortie.

II - 1-7 Mesure des flux et des rendements.

- Pour une tranche horaire déterminée, le flux représente le produit de la concentration (C) par le débit (D) correspondant, comme l'indiquent les formules suivantes :

$$\text{Flux}_{\text{Affluent}} = \text{Concentration}_{\text{Affluent}} \times \text{Débit}_{\text{Affluent}}$$

$$\text{Flux}_{\text{Effluent}} = \text{Concentration}_{\text{Effluent}} \times \text{Débit}_{\text{Effluent}}$$

- Lorsqu'il est tenu compte des deux faits suivants :
  - que le temps de rétention de l'eau dans la station est de 4 h,
  - que le débit d'entrée (D_E) est identique au débit de sortie (D_S),

il en résulte, par exemple, pour la tranche de 8-10 h considérée, que le débit D est représenté par l'égalité :

$$D_{E\ (8\text{-}10\ h)} = D_{S\ (12\text{-}14\ h)} = D.$$

Or, par définition, le rendement d'une station d'épuration est :

$$R = \frac{\text{charge entrée - charge sortie}}{\text{charge entrée}} \times 100$$

soit, pour la tranche horaire considérée (8-10 h) :

$$R = \frac{D \times C_{8\text{-}10\ h} - D \times C_{12\text{-}14\ h}}{D \times C_{8\text{-}10\ h}} \times 100$$

$$= \frac{D\ (C_{8\text{-}10\ h} - C_{12\text{-}14\ h})}{D \times C_{8\text{-}10\ h}} \times 100$$

$$= 1 - \frac{C_{12\text{-}14\ h}}{C_{8\text{-}10\ h}} \times 100$$

II - 2 RESULTATS.

II - 2-1 Station d'épuration biologique de Cagnes-sur-Mer.

★ Variation de la charge bactérienne et virale d'un effluent sur une période de 24 heures (1ère expérimentation).

Sur une période de 24 h, toutes les 2 h, nous avons prélevé environ 10 litres d'effluent. Ceci nous a permis de déterminer l'heure la plus favorable pour un prélèvement ponctuel. Les valeurs des titres bactériens et viraux correspondant à chacun des prélèvements sont rapportées dans le Tableau 61. L'examen des résultats montre qu'il y a un facteur multiplicatif qui relie le titre le plus fort obtenu pendant l'intervalle de temps 14-16 h et le titre le plus faible obtenu pendant la période 8-10 h. Ce facteur est de l'ordre de 10 pour les coliformes fécaux, de 6 pour les streptocoques fécaux et de 4 pour les virus.Pour les coliformes fécaux, les streptocoques fécaux et les virus, une pointe de contamination est observée entre 14 et 16 h.

La recherche d'une corrélation statistique entre les différents germes présents dans l'effluent permet de mettre en évidence, comme le montre le Tableau 62, une bonne corrélation, d'une part entre les coliformes fécaux et les streptocoques fécaux ($r = 0,8637$) et d'autre part, entre les coliformes fécaux et les virus ($r = 0,7526$). Par contre, aucune corrélation n'a pu être mise en évidence entre les streptocoques fécaux et les virus.

★ Influence du mode de prélèvement sur la recherche des virus dans un effluent (2ème expérimentation).

Le but de cette expérimentation est de déterminer, à partir des valeurs des titres viraux trouvées dans 10 et 100 litres, quelle est l'influence du mode de prélèvement (continu et séquentiel sur 24 h; ponctuel). Les résultats inscrits dans le Tableau 63 montrent que, quel que soit le mode de prélèvement,pour un volume d'échantillon donné, les concentrations trouvées dans l'effluent de Cagnes-sur-Mer ne diffèrent pas statistiquement. Ainsi, comme le montre le Tableau 64, pour un même volume d'échantillon, la comparaison des intervalles de confiance des concentrations virales obtenues à partir de 2 modes de prélèvements différents ne met en relief aucune différence statistique significative. De plus, l'examen des valeurs du Tableau 63 confirme ce que nous avons déjà constaté dans le chapitre précédent : la quantité de virus obtenus à partir d'un grand

TABLEAU 61

Mesures sur 24 h des charges bactériennes et virales d'un effluent
- 1ère expérimentation -

Tranche horaire (h)	Bactéries fécales		Virus N.P.P.U.C./1000 ml
	Coliformes fécaux (10^5/100 ml)	Streptocoques fécaux (10^4/100 ml)	
12 - 14	4,3 (3,4 - 5,3)	2,7 (2,5 - 2,9)	6,1 (4,0 - 9,2)
14 - 16	6,3 (5,2 - 7,5)	3,5 (3,2 - 3,8)	8,7 (6,0 -12,5)
16 - 18	3,6 (2,8 - 4,6)	3,2 (2,8 - 3,5)	3,3 (2,0 - 5,7)
18 - 20	2,7 (2,0 - 3,5)	1,9 (1,6 - 2,2)	5,7 (3,7 - 8,7)
20 - 22	2,1 (1,5 - 2,9)	1,6 (1,4 - 1,9)	4,7 (3,0 - 7,5)
22 - 24	2,8 (2,1 - 3,7)	1,9 (1,7 - 2,2)	6,7 (4,5 -10,0)
0 - 2	2,1 (1,5 - 2,9)	1,6 (1,4 - 1,9)	3,3 (1,7 - 7,8)
2 - 4	2,6 (1,9 - 3,4)	1,6 (1,4 - 1,9)	4,7 (3,0 - 7,5)
4 - 6	1,8 (1,3 - 2,5)	1,2 (1,0 - 1,4)	3,0 (1,5 - 5,5)
6 - 8	1,0 (0,6 - 1,6)	0,9 (0,7 - 1,1)	5,2 (3,0 - 8,2)
8 - 10	0,5 (0,2 - 1,0)	0,6 (0,5 - 0,8)	2,4 (1,1 - 4,6)
10 - 12	1,6 (1,0 - 2,6)	2,5 (2,2 - 2,8)	3,4 (2,3 - 6,0)

N.P.P.U.C. : nombre le plus probable d'unités cytopathogènes

( ) : les nombres entre parenthèses indiquent la limte de confiance à 95%

TABLEAU 62

Matrice de coefficients de corrélation de toutes les variables mesurées

Variables	Coliformes fécaux	Streptocoques fécaux	Virus
Coliformes fécaux	1,000 000		
Streptocoques d°	0,863 746***	1,000 000	
Virus	0,752 683**	0,502 002	1,000 000

*** : significatif à 0,1 %

** : significatif à 1,0 %

TABLEAU 63

Titres viraux obtenus à partir d'échantillons collectés selon 3 modes de prélèvements différents

Titre N.P.P.U.C /l — Essai n°	Volume (l)	Mode de prélèvement		
		Continu sur 24 h	Séquentiel sur 24 h	Ponctuel à 12 h
1	10	0,8 (0,2 - 2,3)	4,2 (2,3 - 7,0)	0,8 (0,2 - 2,3)
2		4,0 (2,5 - 6,5)	4,5 (2,7 - 7,2)	3,2 (2,0 - 5,7)
3		4,1 (2,4 - 7,0)	7,9 (5,3 - 11,6)	6,5 (4,2 - 9,2)
1	100	0,3 (0,1 - 1,5)	1,4 (1,0 - 2,0)	0,8 (0,2 -2,3)
2		1,7 (1,2 - 2,2)	2,6 (2,0 - 3,3)	2,1 (1,6 - 2,7)
3		1,4 (1,0 - 2,0)	1,1 (0,8 - 1,6)	0,7 (0,5 - 1,1)

N.P.P.U.C. : nombre le plus probable d'unités cytopathogènes

( ) : les nombres entre parenthèses indiquent la limite de confiance à 95%

TABLEAU 64

Comparaison statistique des titres viraux pour différents modes de prélèvement
- 2ème expérimentation -

Essai n°	Volume (l)	Mode de prélèvement		
		C. et S.	S. et P.	C. et P.
1	10	N.S.	N.S.	N.S.
	100	N.S.	N.S.	N.S.
2	10	N.S.	N.S.	N.S.
	100	N.S.	N.S.	N.S.
3	10	N.S.	N.S.	N.S.
	100	N.S.	N.S.	N.S.

C : continu
S : séquentiel
P : ponctuel
N.S. : différence non significative (95%)

volume d'eau analysé (100 litres) est, dans 5 cas sur 9, inférieure à celle obtenue à partir d'un faible volume (10 litres).

L'utilisation de l'analyse de variance, comme le montre le Tableau 65, permet de confirmer, dans tous les cas, que le mode de prélèvement, dans nos conditions expérimentales, n'a pas d'influence sur les résultats.

★ Comparaison du rendement de la charge bactériologique et virale par rapport au mode de prélèvement (3ème expérimentation).

Selon que le prélèvement a été fait de façon séquentielle ou continue, nous avons déterminé l'abattement des charges bactériennes et virales, pour une durée de 24 h, sur 3 essais réalisés pendant la période estivale. Les résultats sont regroupés dans le Tableau 66. Dans l'affluent, pour les essais 1 et 3, les concentrations moyennes en coliformes fécaux et streptocoques fécaux sont respectivement d'environ 10^7/100 ml et 10^6/100 ml. Les plus faibles concentrations déterminées lors de l'essai 2 (10^5/100 ml pour les coliformes fécaux et 10^4/100 ml pour les streptocoques fécaux) sont dues à la dilution des affluents faisant suite aux violentes pluies ayant précédé le jour de l'expérimentation. Après passage de l'affluent dans la station d'épuration biologique, un abattement de la charge bactérienne, pour les essais 1 et 3, de l'ordre de 1 à 2 logarithmes, est constaté, quel que soit le mode de prélèvement séquentiel ou continu. Pour l'essai 2, le taux de réduction des streptocoques fécaux n'est que de 1/2 logarithme. Pour les virus, les concentrations observées dans l'affluent varient de 10 à 100 N.P.P.U.C./1000 ml. Le taux de réduction de la charge virale varie de 1/2 à 2 logarithmes.

Compte tenu des résultats obtenus sur une période de 24 h, nous avons recherché si les prélèvements effectués ponctuellement pouvaient être représentatifs du rendement de la station d'épuration. Les valeurs des titres bactériens et viraux obtenues à partir d'échantillons prélevés ponctuellement donnent des taux de réduction très proches de ceux trouvés à partir d'échantillons prélevés selon un mode séquentiel et continu. Ainsi, comme le montre le Tableau 67, les essais 1 et 3 donnent toujours un meilleur rendement que l'essai 2. Par exemple, pour les coliformes fécaux, un abattement de 1 à 2 logarithmes est trouvé respectivement pour les essais 3 et 1. Il n'est que de 1/2 logarithme pour l'essai 2. Cette différence est moins sensible pour les streptocoques fécaux et

TABLEAU 65

Comparaison statistique par analyse de variance
des concentrations virales obtenues quels que soient les essais à partir de différents prélèvements
- 2ème expérimentation -

Volume (l)	S. *versus* C.		C. *versus* P.		S. *versus* P.	
	F	Signification (95%)	F	Signification (95%)	F	Signification (95%)
10	3,25	N.S.	< 1	N.S.	2,45	N.S.
100	1,17	N.S.	< 1	N.S.	14,33	N.S.

S. : prélèvement séquentiel
C. : prélèvement continu
P. : prélèvement ponctuel
N.S. : différence statistique non significative

TABLEAU 66

Bilans bactériologiques et virologiques de la station d'épuration de Cagnes-sur-Mer
à partir de prélèvements séquentiels et continus pendant 24 h
- 3ème expérimentation -

Mode de prélèvement	Essai n°	Bactéries fécales/100 ml						Virus (N.P.P.U.C./1000 ml)		
		Coliformes fécaux			Streptocoques fécaux					
		Affluent	Effluent	Rdt (%)	Affluent	Effluent	Rdt (%)	Affluent	Effluent	Rdt (%)
Séquentiel	1	$8,8.10^7$ ($7,1.10^7$-$1,1.10^8$)	$2,6.10^5$ ($1,7.10^5$-$3,8.10^5$)	99	$3,0.10^6$ ($2,7.10^6$-$3,4.10^6$)	$1,9.10^4$ ($1,6.10^4$-$2,2.10^5$)	99	7,2 (4,5- 10,7)	4,2 (2,3-7,0)	42
	2	$3,3.10^5$ ($2,9.10^5$-$3,6.10^5$)	$6,7.10^4$ ($5,2.10^4$-$8,5.10^4$)	79	$1,0.10^4$ ($0,9.10^4$-$1,1.10^4$)	$4,8.10^3$ ($4,3.10^3$-$5,2.10^3$)	56	9,5 (6,7- 13,5)	4,5 (2,7-7,2)	53
	3	$3,7.10^7$ ($2,6.10^7$-$5,1.10^7$)	$1,5.10^6$ ($1,3.10^6$-$1,8.10^6$)	95	$3,0.10^6$ ($2,7.10^6$-$3,4.10^6$)	$1,2.10^5$ ($9,8.10^4$-$1,4.10^5$)	96	52,0 (32,0- 82,0)	7,9 (5,3-11,6)	85
Continu	1	$8,0.10^7$ ($6,4.10^7$-$1,0.10^8$)	$2,9.10^5$ ($1,9.10^5$-$4,1.10^5$)	99	$3,5.10^6$ ($2,5.10^6$-$4,9.10^6$)	$8,3.10^3$ ($6,6.10^3$-$1,0.10^4$)	99	6,1 (4,0- 9,4)	0,8 (0,1-2,3)	87
	2	$3,6.10^5$ ($3,2.10^5$-$4,0.10^5$)	$2,9.10^4$ ($3,7.10^4$-$6,6.10^4$)	86	$1,2.10^4$ ($1,1.10^4$-$1,3.10^4$)	$4,2.10^3$ ($3,8.10^3$-$4,6.10^3$)	67	8,7 (6,0-12,7)	4,0 (2,5-6,5)	54
	3	$2,3.10^7$ ($2,0.10^7$-$2,6.10^7$)	$1,9.10^6$ ($1,7.10^6$-$2,2.10^6$)	91	$2,2.10^6$ ($1,9.10^6$-$2,5.10^6$)	$1,3.10^5$ ($1,1.10^5$-$1,6.10^5$)	94	132,0 (92,0-188,0)	4,1 (2,4-7,0)	97

N.P.P.U.C. : nombre le plus probable d'unités cytopathogènes
( ) : les nombres entre parenthèses indiquent la limite de confiance à 95%
Rdt : rendement

TABLEAU 67

Bilans bactériologiques et virologiques de la station d'épuration de Cagnes-sur-Mer à partir de trois séries de prélèvements ponctuels collectés dans l'affluent et l'effluent

- 3ème expérimentation -

Essai n°	Bactéries fécales/100 ml						Virus (N.P.P.U.C./1000 ml)		
	Coliformes fécaux			Streptocoques fécaux					
	Affluent	Effluent	Rdt (%)	Affluent	Effluent	Rdt (%)	Affluent	Effluent	Rdt (%)
1	$8,1.10^7$ ($6,5.10^7$-$1,0.10^8$)	$1,2.10^5$ ($9,9.10^4$-$1,4.10^5$)	99	$4,4.10^6$ ($3,2.10^6$-$6,0.10^6$)	$1,8.10^4$ ($1,6.10^4$-$2,1.10^4$)	77	7,2 (4,5-10,7)	0,8 (0,2-2,3)	89
2	$1,1.10^4$ ($0,9.10^4$-$1,3.10^4$)	$3,8.10^3$ ($2,7.10^3$-$5,2.10^3$)	66	$4,1.10^3$ ($3,7.10^2$-$4,5.10^2$)	$5,3.10^2$ ($4,9.10^3$-$5,8.10^3$)	87	10,5 (7,5-14,7)	3,2 (2,0-5,7)	70
3	$4,2.10^7$ ($3,0.10^7$-$5,7.10^7$)	$2,0.10^6$ ($1,8.10^6$-$2,3.10^6$)	95	$4,5.10^6$ ($4,1.10^6$-$4,9.10^6$)	$2,6.10^5$ ($2,3.10^5$-$2,9.10^5$)	94	72,0 (46,0-112,0)	6,5 (4,2-9,2)	91

( ) : les nombres entre parenthèses indiquent la limite de confiance à 95%

Rdt : rendement

N.P.P.U.C. : nombre le plus probable d'unités cytopathogènes

les virus. La comparaison des valeurs d'abattement, selon le mode de prélèvement, montre qu'il y a une bonne concordance pour les coliformes fécaux (essai 1 : 99% quel que soit le mode de prélèvement séquentiel, continu ou ponctuel; essai 3 : 95% quel que soit le mode de prélèvement séquentiel ou ponctuel) et pour les streptocoques fécaux (essai 3 : 94% quel que soit le mode de prélèvement continu ou ponctuel). Cette concordance est moins bonne pour les virus (essai 3 : 85% pour le mode séquentiel; 97% pour le mode continu et 91% pour le mode ponctuel). Les rendements moyens, selon les trois modes de prélèvement, sont présentés dans le Tableau 68.

Pour les bactéries fécales, quel que soit le mode de prélèvement, les estimations des taux d'élimination varient très peu (de 84% à 92%). Pour les virus, le taux de réduction est plus faible : il varie de 60%, pour le mode de prélèvement séquentiel, à 83% pour le mode de prélèvement ponctuel. La comparaison statistique des valeurs des rendements, selon différents modes de prélèvement, n'a pu être entreprise car, à notre connaissance, aucune technique statistique n'existe pour l'exploitation de ce type de résultats.

Les conclusions de l'analyse statistique, pour savoir si le mode de prélèvement a une influence sur les concentrations bactériennes et virales déterminées à partir d'échantillons d'eaux usées brutes ou épurées, sont représentées dans le Tableau 69. L'analyse de variance à trois facteurs, effectuée à partir des valeurs présentées dans les Tableaux 66 et 67 montre que, quels que soient les microorganismes testés et le mode de prélèvement, il n'y a pas de différence statistique significative entre les titres trouvés.

II - 2-2 Station d'épuration physico-chimique de Cannes.

★ Variation sur une période de 24 h des concentrations et des flux viraux et bactériens dans l'affluent et l'effluent de la station d'épuration physico-chimique de Cannes.

- Variation des concentrations.

L'examen des valeurs portées dans le Tableau 70 montre que les concentrations virales dans les eaux usées, traitées ou non, varient beaucoup pendant les 24 h d'observation. Par exemple, pour l'affluent, il y a un facteur multiplicatif de 25 entre le titre le plus faible (80 N.P.P.U.C./l) et le titre le plus élevé (2000 N.P.P.U.C./l). Pour l'effluent, les variations sont plus importantes puisque le facteur multiplicatif est de 36 (10 N.P.P.U.C./l à 360 N.P.P.U.C./l)

TABLEAU 68

Taux de réduction des charges virales et bactériennes
en fonction du mode de prélèvement (3 mesures)
- 3ème expérimentation -

Mode de prélèvement		Taux de réduction (%)		
		Bactéries fécales		Virus
		Coliformes fécaux	Streptocoques fécaux	
24 h	Séquentiel	91	84	60
	Continu	92	87	79
Ponctuel		87	92	83

TABLEAU 69

Comparaison statistique des valeurs N.P.P. obtenues à partir de différents modes de prélèvement
Analyse de variance de l'expérience factorielle à 3 facteurs
- 3ème expériementation -

Mode de prélèvement	Coliformes fécaux		Streptocoques fécaux		Virus	
	F. calculé	Signification (95%)	F. calculé	Signification (95%)	F. calculé	Signification (95%)
S. *versus* C.	< 1	N.S.	< 1	N.S.	1,30	N.S.
C. *versus* P.	14,32	N.S.	< 1	N.S.	< 1	N.S.
S. *versus* P.	1,19	N.S.	1,19	N.S.	2,25	N.S.
$F_{0,05}(1,2) = 18,51$						

N.S. : différence statistique non significative
S. : séquentiel
C. : continu
P. : ponctuel

TABLEAU 70

Mesures sur 24 h de la charge virale et bactérienne de l'affluent et l'effluent de la station d'épuration de Cannes

Tranche horaire (h)	Affluent				Tranche horaire (h)	Effluent			
	Débit (m^3/2h)	Concentration				Débit (m^3/2h)	Concentration		
		Coliformes fécaux (10^7/100 ml)	Streptocoques fécaux (10^6/100 ml)	Virus (10^3/1000 ml)			Coliformes fécaux (10^7/100 ml)	Streptocoques fécaux (10^6/100 ml)	Virus (10^3/1000 ml)
8-10	4770	1,03 (0,84-1,25)	0,95 (0,77-1,16)	0,15 (0,10-0,22)	12-14	4770	1,14 (0,94-1,37)	3,40 (2,40-4,80)	0,36 (0,28-0,47)
10-12	5300	3,40 (3,05-3,87)	7,60 (5,90-9,50)	0,14 (0,09-0,20)	14-16	5300	1,70 (1,45-1,98)	2,49 (2,19-2,82)	0,02 (0,01-0,03)
12-14	4452	1,84 (1,58-2,13)	4,70 (3,40-6,30)	1,20 (0,98-1,54)	16-18	4452	1,43 (1,21-1,68)	2,08 (1,81-2,38)	0,17 (0,08-0,34)
14-16	5088	2,03 (1,76-2,33)	2,10 (1,83-2,40)	1,32 (0,99-1,75)	18-20	5088	1,31 (1,10-1,55)	1,63 (1,39-1,90)	0,05 (0,03-0,09)
16-18	3816	1,47 (1,24-1,73)	1,69 (1,44-1,97)	0,47 (0,37-0,61)	20-22	3816	1,60 (1,36-1,87)	1,54 (1,31-1,80)	0,07 (0,05-0,12)
18-20	2650	1,19 (0,99-1,42)	1,55 (1,32-1,81)	2,00 (1,50-2,80)	22-24	2650	0,98 (0,80-1,19)	1,05 (0,86-1,27)	0,15 (0,12-0,22)
20-22	2544	0,94 (0,76-1,15)	1,65 (1,41-1,92)	0,18 (0,12-0,25)	0- 2	2544	0,99 (0,80-1,21)	0,99 (0,80-1,21)	0,10 (0,07-0,16)
22-24	2332	0,79 (0,63-0,98)	2,01 (1,74-2,31)	0,19 (0,14-0,25)	2- 4	2332	0,77 (0,61-0,96)	0,86 (0,42-0,73)	0,05 (0,03-0,09)
0- 2	1272	0,68 (0,53-0,86)	1,26 (1,05-1,50)	0,08 (0,05-0,12)	4- 6	1272	0,74 (0,58-0,93)	0,94 (0,76-1,15)	0,010 (0,008-0,020)
2- 4	2328	0,68 (0,53-0,86)	1,36 (1,14-1,61)	0,19 (0,14-0,25)	6- 8	2328	0,61 (0,47-0,78)	0,76 (0,60-0,95)	0,010 (0,008-0,020)

( ) : les nombres entre parenthèses indiquent la limite de confiance à 95%

Pour les bactéries fécales dans l'affluent, ce facteur multiplicatif est plus petit : il est respectivement de l'ordre de 5 et 8 pour les coliformes fécaux ($0,68.10^7$/100 ml à $3,40.10^7$/100 ml) et les streptocoques fécaux ($0,95.10^6$/100 ml à $7,60.10^6$/100 ml). Dans l'effluent, la variation entre les concentrations est plus faible puisque le facteur multiplicatif est de 3 pour les coliformes fécaux ($0,61.10^7$/100 ml à $1,70.10^7$/100 ml) et de 4 pour les streptocoques fécaux ($0,76.10^6$/100 ml à $3,40.10^6$/100 ml). Cette différence dans les concentrations indique qu'il y a des pointes de contamination microbienne. Ainsi, pour l'affluent nous trouvons un pic de pollution commun aux coliformes fécaux et aux streptocoques fécaux qui se situe dans la tranche horaire 10-12 h. Un deuxième pic apparaît entre 14-16 h pour les coliformes fécaux et 22-24 h pour les streptocoques fécaux. Pour les virus, deux pics de contamination peuvent être mis en évidence : 12-16 h et 18-20 h. Pour l'effluent, alors que deux pics de contamination statistiquement significatifs sont observés pour les coliformes fécaux à 14-16 h et 20-22 h, il n'existe aucun pic notable pour les streptocoques fécaux. Pour les virus, 3 pics apparaissent, se situant à des tranches horaires différentes : 12-14 h, 16-18 h, 22-24 h. Dans le cas des coliformes fécaux, les tranches horaires correspondant au maximum de contamination sont sensiblement les mêmes dans l'affluent et l'effluent, mais elles diffèrent pour les virus et plus encore pour les streptocoques fécaux.

La recherche de corrélation entre les différents germes étudiés montre, comme l'indique le Tableau 71 une corrélation positive pour les coliformes fécaux et les streptocoques fécaux dans l'affluent ($r = 0,9026$) qui ne se retrouve pas dans l'effluent. Aussi bien dans l'affluent que dans l'effluent, aucune corrélation n'a pu être mise en évidence entre les germes témoins de contamination fécale et les virus. La recherche d'une corrélation entre les concentrations des microorganismes présents dans l'affluent et l'effluent a montré qu'une relation existe uniquement pour les coliformes fécaux ($r = 0,8394$).

- Variation des flux.

Connaissant le débit de l'effluent, nous avons déduit celui de l'affluent en tenant compte du temps de séjour de l'eau dans les clarifloculateurs (4 h). A partir de ces données, nous avons calculé les flux bactériens et viraux dans l'affluent et l'effluent de la station d'épuration de Cannes. Les valeurs trouvées

TABLEAU 71

Matrice des coefficients de corrélation de toutes les variables mesurées

		Coliformes fécaux		Streptocoques fécaux		Virus	
		Affluent	Effluent	Affluent	Effluent	Affluent	Effluent
Coliformes fécaux	Affluent	1,000000					
	Effluent	0,839449**	1,000000				
Streptocoques fécaux	Affluent	0,902687***	0,652860*	1,000000			
	Effluent	0,502169	0,613564	0,367343	1,000000		
Virus	Affluent	0,152094	0,174192	-0,045754	-0,082401	1,000000	
	Effluent	-0,134398	0,130778	-0,240487	0,694424	0,160328	1,000000

*** : significatif à 0,1%

** : significatif à 1,0%

* : significatif à 5,0%

sont portées dans le Tableau 72. Le facteur multiplicatif, déterminé à partir des valeurs des flux maximum et minimum, est nettement plus important que celui déterminé à partir des concentrations, car ce facteur est directement lié au débit qui varie d'une tranche horaire à l'autre. Ainsi, pour l'affluent, alors qu'il est de 20 pour les coliformes fécaux et les streptocoques fécaux, il passe à 60 pour les virus. Pour l'effluent, si le facteur multiplicatif concernant les streptocoques fécaux (16) est du même ordre de grandeur que celui trouvé pour l'affluent (20), il est deux fois plus faible pour les coliformes fécaux (10) et deux fois plus fort pour les virus (132).

En général, pour une même tranche horaire, aussi bien pour l'affluent que pour l'effluent, lorsque la concentration bactérienne ou virale est maximale, le flux calculé est important. Le fait de raisonner en flux permet de montrer l'apparition ou la disparition de pointes de contamination. En effet, pour une faible concentration bactérienne ou virale, selon que le débit est faible ou important, une absence ou une présence de pointes de contamination sera constatée. Ainsi, pour les streptocoques fécaux dans l'affluent, il existe une pointe de contamination entre 12-14 h aussi bien quand nous raisonnons en concentration qu'en flux. Par contre, dans l'effluent, lorsque nous déterminons une pointe de contamination à partir des concentrations, elle n'apparaît plus lorsque nous raisonnons en flux.

Par la simple observation des Figures 44, 45 et 46, nous remarquons qu'il n'y a pas une bonne superposition des pointes de contamination entre l'affluent et l'effluent quand nous ne tenons pas compte du temps de rétention de l'eau dans la station d'épuration. Ceci a, pour conséquence, une sous-estimation du rendement de la station et donc une mauvaise appréciation de son efficacité.

★ Evaluation du pouvoir d'arrêt de la station d'épuration de Cannes vis-à-vis de la charge bactérienne et virale.

En toute rigueur, les bilans bactériens et virologiques sur 24 h ne peuvent être déterminés qu'à partir des sommes des flux bactériens et viraux d'entrée et de sortie de la station d'épuration. Ainsi, en appliquant la formule donnée dans le paragraphe "Mesure des flux et des rendements" de ce même chapitre, le pouvoir d'arrêt de la station d'épuration est, comme le montre le Tableau 73, diffèrent selon les microorganismes testés. Il est de 82% pour les

TABLEAU 72

Mesures sur 24 h des flux viraux et bactériens de l'affluent et de l'effluent de la station d'épuration de Cannes

Tranches horaires (h)	Affluent			Tranches horaires (h)	Effluent		
	Flux				Flux		
	C.F. (10^{13} /2h)	S.F. (10^{13} /2h)	Virus (10^{6} /2h)		C.F. (10^{13} /2h)	S.F. (10^{13} /2h)	Virus (10^{6} /2h)
8 - 10	49	5	716	12 - 14	54	16	1717
10 - 12	180	40	742	14 - 16	90	13	106
12 - 14	82	21	5342	16 - 18	64	9	757
14 - 16	103	11	6716	18 - 20	67	8	254
16 - 18	56	7	1794	20 - 22	61	6	267
18 - 20	32	4	5300	22 - 24	26	3	398
20 - 22	24	4	458	0 - 2	25	3	254
22 - 24	18	5	443	2 - 4	18	2	117
0 - 2	9	2	102	4 - 6	9	1	13
2 - 4	16	3	442	6 - 8	14	2	23
Σ flux (affluent)	569	102	22055	Σ flux (effluent)	428	63	3906

Σ : somme des flux
C.F.: coliformes fécaux
S.F.: streptocoques fécaux

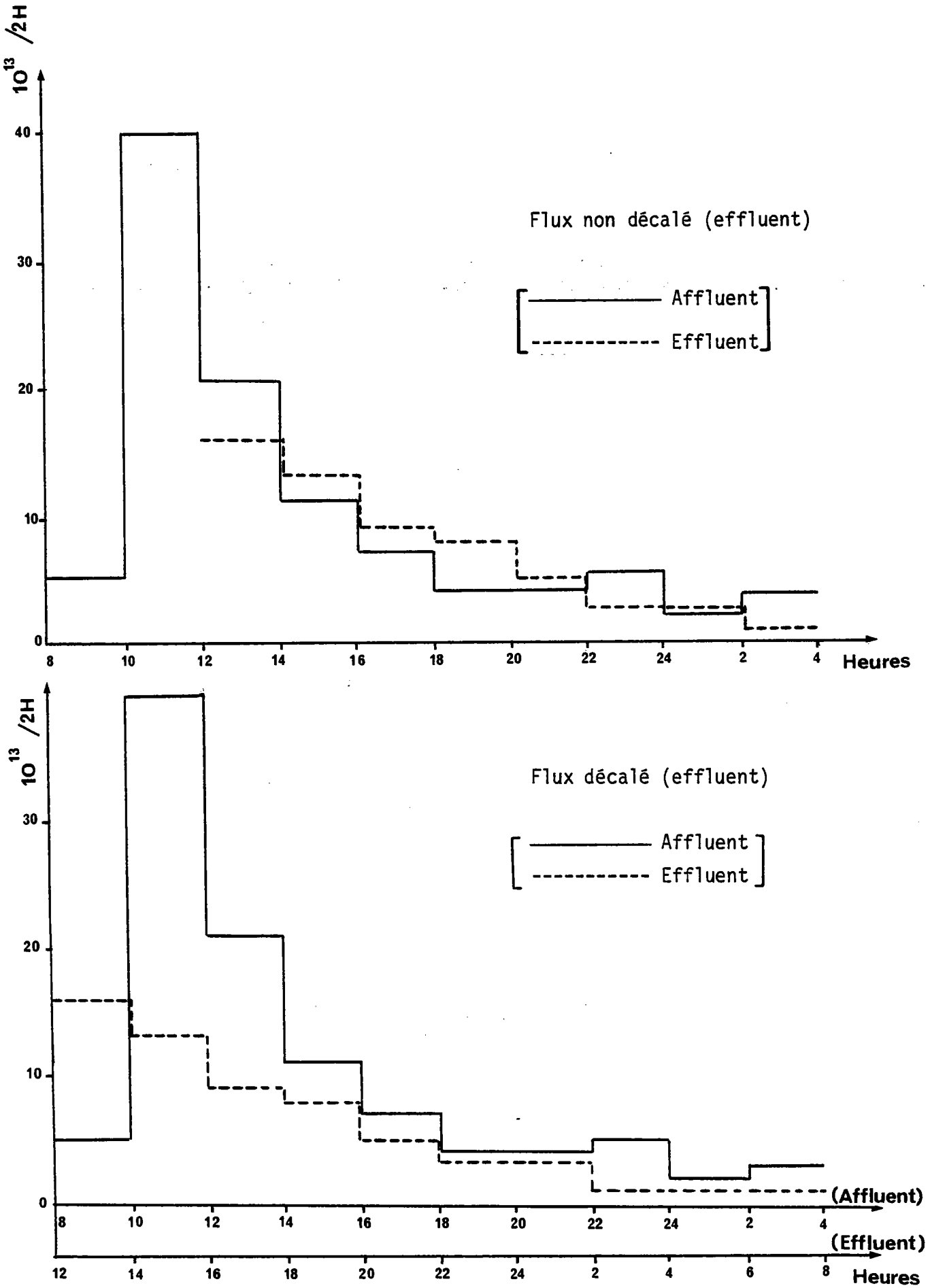


FIGURE 44

Variation du flux de streptocoques fécaux en fonction du temps
(cas où le flux de l'effluent subit ou non un décalage dans le temps)

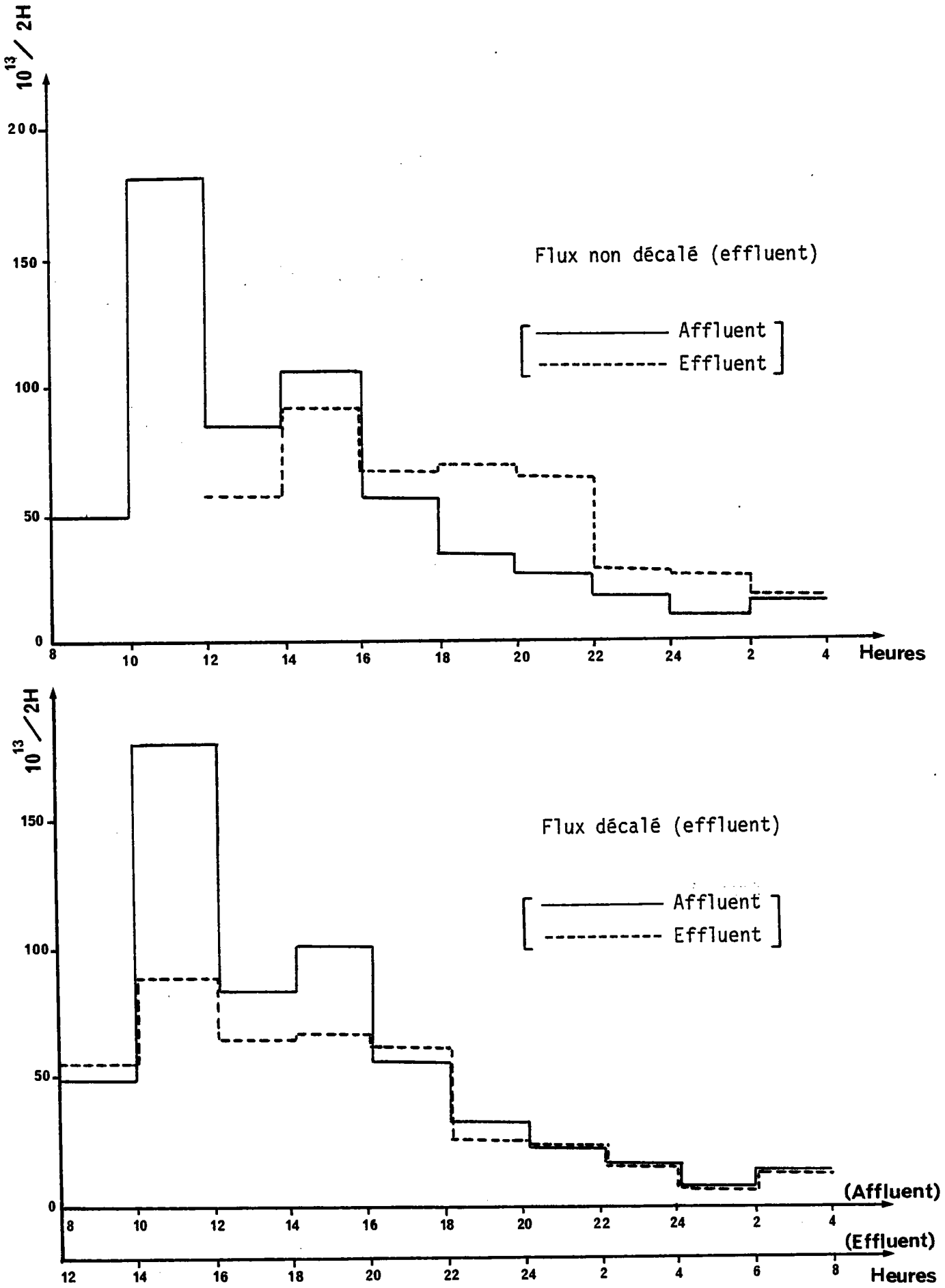


FIGURE 45

Variation des flux de coliformes fécaux en fonction du temps
(cas où le flux de l'effluent subit ou non un décalage dans le temps)

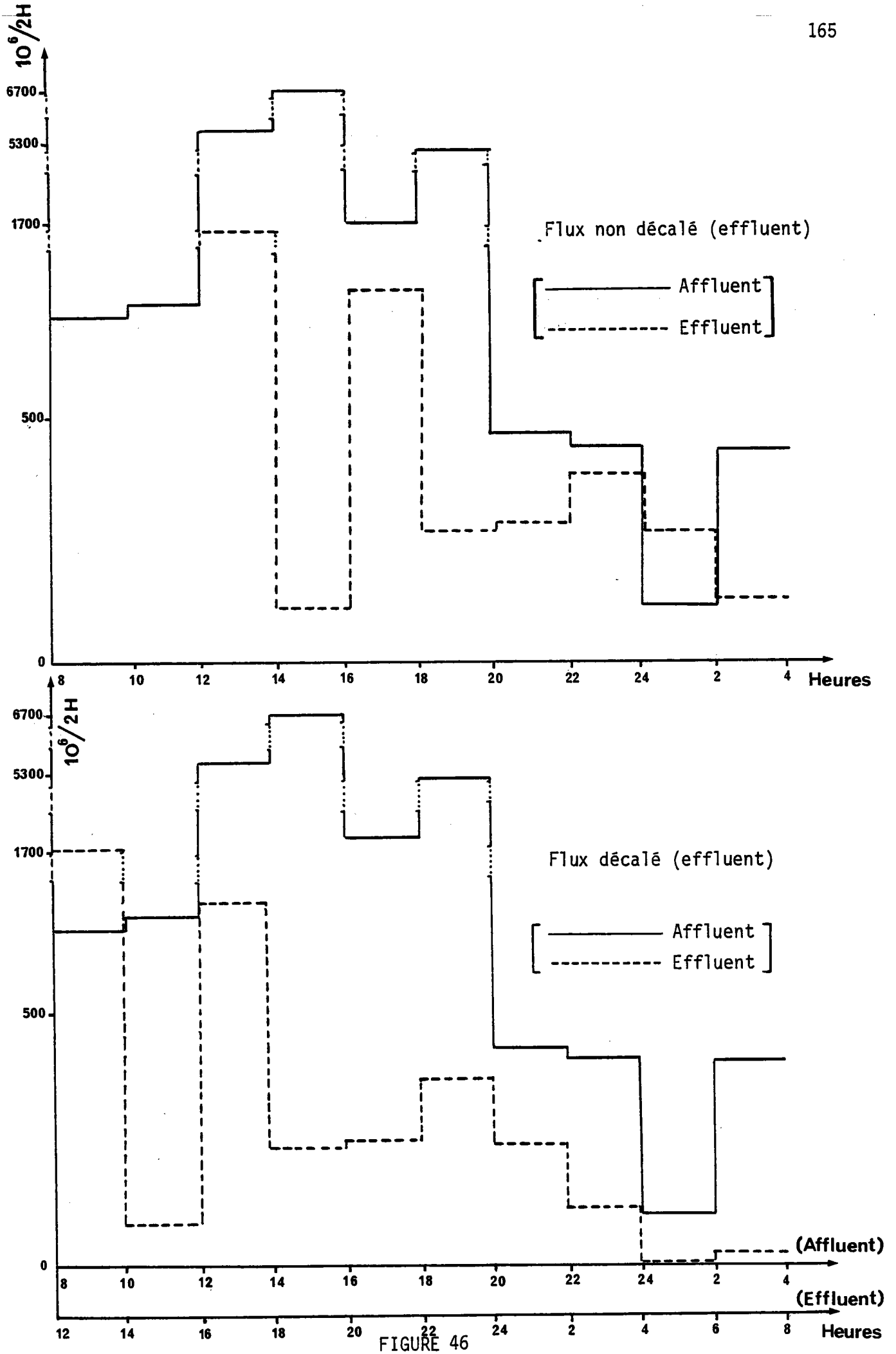


FIGURE 46

Variation du flux viral en fonction du temps
(cas où le flux de l'effluent subit ou non un décalage dans le temps)

virus, mais tombe à 38% pour les streptocoques fécaux et à 25% pour les coliformes fécaux.

TABLEAU 73

Pourcentage d'élimination de la charge virale et bactérienne
- Bilan sur 24 h -

Microorganismes recherchés	Somme des Flux		Rendements (%)
	Affluent	Effluent	
C.F. (10^{13} /20 h)	569	428	25
S.F. (10^{13} /20 h)	102	63	38
Virus (10^{6} /20 h)	22055	3906	82

C.F. : coliformes fécaux
S.F. : streptocoques fécaux

Les rendements déterminés à partir des valeurs trouvées toutes les 2 h, comme le montre le Tableau 74, présentent une grande variabilité au cours des 24 h considérées. Ils passent de moins 10% à 50% pour les coliformes fécaux, de moins 220% à 68% pour les streptocoques fécaux et de moins 140% à 96% pour les virus. Nous avons considéré que les pourcentages d'abattement des bactéries et des virus sont négatifs quand le nombre de bactéries et de virus est plus important à la sortie qu'à l'entrée de la station d'épuration.

Nous remarquons que la station présente un bon rendement vis-à-vis des charges bactériennes et virales durant la période 10-12 h (50% pour les coliformes fécaux, 68% pour les streptocoques fécaux et 86% pour les virus). Si le rendement de la station est maximum pour les streptocoques fécaux (68%) et les coliformes fécaux (50%) entre 10-12 h, il faut attendre 14-16 h pour atteindre un rendement de 96% pour les virus. Le fait que les différents rendements maximum (bactériologiques et virologiques) ne soient pas situés dans les mêmes tranches horaires ne s'explique par aucune hypothèse valable. Cette variation des rendements montre combien il est délicat de faire un prélèvement ponctuel si l'on ne connaît pas rigoureusement les fluctuations des flux bactériens et viraux entrant dans la station d'épuration.

TABLEAU 74

Pourcentage d'abattement des charges bactériennes et virales correspondant aux différentes tranches horaires

Tranches horaires (h)	Taux de réduction (%)		
	Coliformes fécaux	Streptocoques fécaux	Virus
8 - 10	- 10	- 220	- 140
10 - 12	50	68	86
12 - 14	22	57	86
14 - 16	35	27	96
16 - 18	- 9	14	85
18 - 20	19	25	93
20 - 22	- 4	25	45
22 - 24	0	60	74
0 - 2	0	50	87
2 - 4	13	33	95

II - 3 DISCUSSION.

★ Concentrations bactériennes et virales dans les eaux usées non traitées de Cagnes-sur-Mer et de Cannes.

Les concentrations virales que nous avons trouvées dans l'affluent de Cagnes-sur-Mer sont plus faibles (6,1 à 132 N.P.P.U.C./l) que celles rapportées par certains auteurs pour d'autres affluents (BURAS,1974; KATZENELSON, 1976; KELLY et SANDERSON, 1964) mais proches de celles de CLIVER (1975) et de LUCENA-GUTIERREZ (1979). Les nombres de particules virales mises en évidence dans l'affluent de Cannes (80 à 2000 N.P.P.U.C./l) sont, en moyenne, plus élevés que ceux trouvés dans l'affluent de Cagnes-sur-Mer. Cependant, ces valeurs sont proches de celles trouvées dans d'autres eaux usées brutes par GRABOW (1968) et SATTAR et WESTWOOD (1977). Nous ne pouvons faire aucune comparaison entre les titres viraux trouvés dans les affluents de ces deux stations, car les méthodes de titrage utilisées sont différentes, ce qui peut expliquer une variation entre les valeurs des titres viraux. Il peut aussi s'agir, pour ces deux eaux étudiées, d'une réelle différence de charge virale due au nombre variable de porteurs humains. Pour les affluents, les valeurs maximum des concentrations en coliformes fécaux ($8,8.10^7$/100 ml pour Cagnes-sur-Mer et $3,4.10^7$/100 ml pour Cannes) et en streptocoques fécaux ($4,5.10^6$/100 ml pour Cagnes-sur-Mer et $7,6.10^6$/100 ml pour Cannes) sont proches de celles citées par BOUTIN et TORRE (1979) qui trouvent, pour un autre affluent sur une période de cinq jours, une concentration maximum en coliformes fécaux de $3,0.10^7$/100 ml et en streptocoques fécaux d'environ $6,0.10^6$/100 ml. Parmi toutes les corrélations recherchées, il en est une qui est commune aux deux stations d'épuration considérées : c'est la relation préférentielle qui existe entre les coliformes fécaux et les streptocoques fécaux. Elle a pu être déterminée soit à partir de l'affluent de Cannes, soit à partir de l'effluent de Cagnes-sur-Mer. Si, pour l'affluent et l'effluent de Cannes aucune corrélation n'a pu être mise en évidence entre les virus et les bactéries fécales, par contre, pour l'effluent de Cagnes-sur-Mer, une corrélation positive a été déterminée entre les virus et les coliformes fécaux. Cette différence de résultats est difficilement expliquable.

★ Influence du mode de prélèvement.

La comparaison des trois modes de prélèvement, pour un même volume, ne fait ressortir aucune différence dans les résultats. RUITER et FUJIOKA (1978), pour un affluent, notent, eux aussi, qu'il n'y a pas de différence dans les concentrations virales lorsque sont comparés les échantillons selon deux modes de prélèvements différents : séquentiel ou continu. Cela suggère que le mode de prélèvement ponctuel peut, dans certaines conditions, être utilisé pour effectuer un bilan bactérien ou viral. L'heure du prélèvement ponctuel dans l'effluent ne peut être définie qu'après avoir fait un ou plusieurs bilans sur 24 h. Lorsque l'heure correspondant à la pointe de contamination est déterminée, il est possible d'effectuer le prélèvement à cette heure. Connaissant le temps de rétention de l'eau dans la station, il est alors aisé de déterminer l'heure du prélèvement de l'affluent. L'intérêt du prélèvement ponctuel est sa réalisation facile qui ne demande pas un matériel trop important. Ainsi, dans nos conditions expérimentales, si l'on choisit 8 et 12 h pour effectuer les prélèvements respectivement dans l'affluent et l'effluent de Cagnes-sur-Mer, il est possible d'avoir une bonne approximation du rendement de la station d'épuration. Ces heures de prélèvements sont différentes pour la station d'épuration de Cannes : elles se situent à 12 h pour le prélèvement de l'affluent et à 16 h pour le prélèvement de l'effluent

★ Variations horaires des concentrations virales dans les deux stations d'épuration considérées.

Pour l'effluent de Cagnes-sur-Mer, il n'existe qu'un seul pic de pollution virale entre 14 et 16 h. Aucun pic notable n'est mis en évidence durant la nuit. Pour l'effluent de Cannes, il apparaît 2 premiers pics aux tranches horaires 12-14 h et 16-18 h, encadrant celui observé pour l'effluent de Cagnes-sur-Mer, puis un troisième pic entre 22 et 24 h, plus tôt que celui observé par FLUEGGE et coll.(1978), entre 24 et 6 h, pour l'effluent de la station d'épuration biologique de Muddy Creek en 1976 et 1977.

Comme RAO et coll.(1977), pour l'affluent d'une station biologique proche de Bombay et RUITER et FUJIOKA (1978), pour l'affluent d'Honolulu, nous remarquons dans l'affluent de Cannes, au cours de la journée d'expérimentation, deux pointes de contamination virale, à des heures différentes (12-16 h et 18-20 h) de celles observées par les auteurs cités plus haut.

Le pic correspondant à la tranche horaire 12-16 h est remarquable par son ampleur: la concentration en virus, durant les 4 heures considérées, est relativement constante car les titres viraux correspondant aux échantillons prélevés à 14 et 16 h ne diffèrent pas d'une façon significative entre eux. La mise en évidence de ces pics montre combien il est illusoire de prétendre obtenir des résultats quantifiables à partir de prélèvements ponctuels quand les fluctuations de la population virale, au cours du temps, sont ignorées dans la station d'épuration considérée. Comme BOUTIN et TORRE (1979), nous pensons que l'absence de toute particule dans un échantillon sera d'autant plus vraie que le prélèvement aura été effectué à l'une des heures de pointes de contamination virale. La bonne coïncidence des pointes de contamination virale aux tranches horaires 12-14 h pour l'affluent et 16-18 h pour l'effluent, permet d'obtenir un taux d'élimination virale (86%) représentatif de la station d'épuration (82% étant le rendement moyen sur 24 h).

★ Pouvoir d'arrêt de chacune des deux stations d'épuration vis-à-vis des charges bactériennes et virales.

Dans le calcul du rendement d'une station, qu'elle soit biologique ou physico-chimique, il faut, impérativement, prendre en considération le temps de rétention de l'eau usée dans les ouvrages. S'il est fait abstraction de cette condition, le rendement est alors, dans la plupart des cas, sous-estimé. Aussi convient-il d'analyser avec précaution les résultats de certains auteurs qui n'ont pas tenu compte du temps de rétention dans le calcul du rendement, ou qui ne l'ont pas mentionné dans leurs travaux.

Pour la station d'épuration biologique de Cagnes-sur-Mer, les pourcentages moyens d'élimination des virus sur 24 h, selon le mode de prélèvement, oscillent entre 60% et 83%. Ces valeurs, comparées à celles rapportées par d'autres auteurs pour des stations basées sur le même principe, sont, comme le montre le Tableau 75, très voisines. Les taux d'élimination des bactéries sont légèrement supérieurs (84% à 92% pour les streptocoques fécaux et 87% à 92% pour les coliformes fécaux) à ceux trouvés pour les virus, mais ne diffèrent pas fondamentalement.

TABLEAU 75

Pourcentage d'élimination de la charge virale

Auteurs		Taux de réduction
FUJIOKA et coll.	(1978)	75% à 90%
HUGUES et coll.	(1979e)	54% à 90%
MALHERBE et STRICKLAND-CHOLMEY	(1967)	92%
RAO et coll.	(1977)	90% à 99%
SCHWARTZBROD et coll.	(1979a)	90% à 100%

Pour la station d'épuration physico-chimique de Cannes, l'abattement de la charge virale, déterminé sur 24 h à partir des flux, est de 82%. Cette valeur est difficilement comparable avec celle d'autres auteurs car, à notre connaissance, il n'y a pas de données concernant l'efficacité de stations fonctionnant, d'une part, avec de faibles doses de $FeCl_3$ (25 mg/l) et, d'autre part, sans chaux. Ce taux de réduction des virus est relativement important comparé à celui des streptocoques fécaux (38%) et des coliformes fécaux (25%). CHANG et coll., en 1958 b, en déterminant l'efficacité du $FeCl_3$ sur l'élimination des virus, montrèrent que, pour une concentration de 40 mg/l, les virus étaient éliminés à 98%. Ces mêmes auteurs, avec une concentration proche de celle utilisée dans la station de Cannes (20 mg/l), ont obtenu un pourcentage d'élimination des virus proche de 97%.

Nos pourcentages d'abattement bactérien sont plus faibles que ceux cités par BECHAC et coll. (1977). Mais il faut noter que ces derniers, trouvant des pourcentages d'élimination de 58% pour les coliformes fécaux et 51% pour les streptocoques fécaux, travaillaient sur l'effluent de la station d'épuration de Rennes, en pilote, avec des doses de $FeCl_3$ plus grandes (150 mg/l). L'analyse bibliographique sur ce sujet, bien que limitée, montre que les pourcentages d'élimination des bactéries fécales, cités par certains auteurs (Agence de Bassins R.M.C.,1976; Conseil Supérieur d'Hygiène Publique de France, 1980; DEMILLAC, 1976; GUERREE et coll.,1970; MERCIER, 1974; SAUNIER, 1977), varient de 10% à 99%.

Le pouvoir d'arrêt de la station d'épuration de Cannes semble être meilleur pour la charge virale (82%) que pour la charge organique (M.E.S.T.: 70%; D.C.O.: 60%; $D.B.O._5$: 60%). L'écart entre ces rendements peut s'expliquer par le fait que les doses de $FeCl_3$ sont faibles et que l'exploitant, s'attachant à satisfaire les normes imposées par le cahier des charges (M.E.S.T : 70 mg/l; D.C.O. : 200 mg/l), ne cherche pas, par souci d'économie, à optimiser le rendement de la station en augmentant les doses de réactifs.

Pour les deux stations d'épuration considérées, la comparaison des abattements moyens en virus montre que les pourcentages sont pratiquemment les mêmes et sont voisins de 80%. Par contre, le taux de réduction des bactéries fécales est très différent selon la station d'épuration. Pour la station de Cagnes-sur-Mer, le rendement d'élimination des bactéries fécales est du même ordre que ceux concernant les charges virales et organiques. Pour la station de Cannes, le pouvoir d'arrêt vis-à-vis des bactéries fécales est plus faible que celui obtenu vis-à-vis de la charge organique et plus encore vis-à-vis de la charge virale. Ces faits montrent que la station d'épuration de Cannes, conçue pour provoquer un abattement de 50 à 80% de la matière organique, ne provoque pas un abattement équivalent de la charge bactérienne.

Cette étude a montré que :

- quel que soit le système d'épuration choisi, le pourcentage d'abattement des virus est important, de l'ordre de 80%. Ce pourcentage n'est, cependant, pas satisfaisant car si l'on se place sur le plan global du rejet viral total après traitement d'épuration, il apparaît que la quantité de virus rejetés dans la mer par les eaux épurées est très importante : pour la station d'épuration biologique de Cagnes-sur-Mer, elle atteint 7.10^7 par jour; pour la station d'épuration physico-chimique de Cannes, la quantité de virus est encore plus grande, environ 9.10^9 par 24 h.;
- pour la station d'épuration physico-chimique de Cannes, il y a une différence fondamentale entre le devenir des virus et celui des bactéries fécales. Cette différence n'est pas observée dans la station d'épuration biologique de Cagnes-sur-Mer puisque les taux d'élimination des virus et des bactéries sont équivalents;
- l'heure du prélèvement ponctuel dans les deux stations d'épuration de Cannes et de Cagnes-sur-Mer ne peut être déterminée qu'après avoir fait un ou plusieurs bilans de 24 h.

CONCLUSIONS

La recherche "in situ" des virus dans le milieu hydrique nous a amenés :

- d'une part, à proposer une technique de titrage plus précise que celle des plages, sous certaines conditions,
- d'autre part, à apporter quelques modifications à la méthode d'adsorption-élution proposée par SARRETTE et coll. (1977a) et modifiée par SCHWARTZBROD et LUCENA-GUTIEREZ (1978).

★ La mise au point de la technique de titrage nous a conduits aux conclusions suivantes :

- l'étape de la trypsination n'affecte pas le titre final calculé,
- le nombre d'inoculums par dilution est fonction de la précision du titre recherché. Quand 3 inoculums par dilution sont utilisés, l'indice N.P.P. est sous- ou sur-estimé d'un facteur de 10,
- effectuer un titrage avec 90 inoculums par dilution revient à faire 30 titrages avec 3 inoculums par dilution,
- le volume d'inoculum par cupule intervient dans l'estimation du titre viral : 0,025 ml représente le volume le mieux adapté à la quantification des virus,
- le nombre de dilutions est primordial dans le calcul de la concentration car, dans certains échantillons d'eau (eau de mer par exemple), il y a apparition d'un effet inhibiteur qui est éliminé lorsque les dilutions sont poursuivies,
- la concordance des titres obtenus à partir de notre technique et de celles utilisant les plages et 3 flacons par dilution est parfaite. Pour un nombre de virus inférieur à 15/ml, notre méthode, dans nos conditions expérimentales, est plus précise que celle des plages, car l'intervalle de confiance est plus réduit ;
- pour appliquer les techniques statistiques aux indices N.P.P., il faut,
  - dans le cas où 96 inoculums par dilution sont utilisés que :
    - ... le nombre total des cupules "positives" correspondant aux 3 dilutions considérées ne soit pas inférieur à 46 et supérieur à 259,
    - ... la probabilité liée au nombre caractéristique soit acceptable,
  - dans le cas où 40 inoculums par dilution sont utilisés (cas limite), que :
    - ... le nombre total des cupules "positives" correspondant aux 3 dilutions considérées ne soit pas inférieur à 32 et supérieur à 102,
    - ... la probabilité liée au nombre caractéristique soit acceptable.

  L'analyse de variance, dans ces deux cas, peut alors être appliquée après avoir préalablement transformé l'indice N.P.P. en logarithme.

★ Les modifications que nous avons apportées à l'appareil nous ont permis :

- d'effectuer la manipulation plus simplement par l'utilisation des robinets,
- de raccourcir le temps d'élution par le remplacement du coton par du verre fritté,
- d'éviter au maximum le bris de verrerie par la conception d'un système fixe.

★ Nos essais de comparaison des tampons d'élution nous ont montré que :

- le tampon boraté avec 3% d'extrait de boeuf à pH 9 est un bon éluant, même meilleur, dans nos conditions expérimentales, que le tampon glycine à pH 11,5,
- ce même tampon peut être aussi bien utilisé à pH 7 qu'à pH 9. La présence d'une forte concentration de phosphates dans l'extrait de boeuf tamponnant fortement l'éluant, évite la neutralisation de l'éluat et permet ainsi un gain de temps appréciable.

★ En ce qui concerne la mise en évidence des virus dans le milieu hydrique , nous avons pu montrer que :

- la technique de l'immuno-microscopie électronique permet de détecter de nombreux adénovirus dans des échantillons de nature très différentes,
- dans la recherche d'un effet cytopathogène sur cultures cellulaires, la présence d'entérovirus, donnant un effet cytopathogène rapide, empêche la mise en évidence de celui, plus tardif, de l'adénovirus. De ce fait, nous n'avons isolé, sur cultures cellulaires, pratiquement que des entérovirus,
- la recherche des virus, par les deux techniques d'identification, permet de mettre en évidence la présence simultanée de virus, d'entérovirus et d'adénovirus.

★ Au cours de la recherche de l'influence des volumes d'échantillons sur l'évaluation de la charge virale dans le milieu hydrique, notre étude nous a permis de mettre en évidence que :

- pour une même quantité de poudre de verre, lorsque l'échantillon d'eau est faiblement contaminé par des virus (1 N.P.P.U.C./l), les mêmes titres viraux sont retrouvés, quel que soit le volume d'eau passé (20, 50 ou 100 litres). Il n'en est pas de même lorsque la concentration en virus dans l'échantillon analysé est plus forte (10^5 N.P.P.U.C./l) : une différence dans les valeurs des titrages au delà de 20 litres d'eau passés à travers de la poudre de verre est notée;
- les grands volumes d'échantillons ne sont pas nécessaires pour la mise en évi-

dence des virus dans les eaux de mer, de piscine et usées. Au contraire, la quantité de virus titrés à partir d'un grand volume d'eau analysé est, dans certains cas, inférieure à celle obtenue à partir d'un faible volume,

- s'il est courant de détecter des virus entériques dans les eaux usées brutes et épurées, il est plus surprenant d'en mettre en évidence dans les eaux de piscine,
- en un point de prélèvement bien déterminé, les échantillons d'eaux, prélevés pour effectuer la comparaison des volumes, sont assez homogènes puisque, dans la plupart des cas, le même virus est retrouvé.

* Enfin, pour ce qui est de la représentativité de l'échantillon, notre travail, portant sur des échantillons d'affluent et d'effluent de deux stations d'épuration, a pu montrer que :

- le mode de prélèvement a peu d'influence sur l'estimation du rendement d'une station dans la mesure où les fluctuations, au cours du temps, des charges bactériennes et virales reçues par la station sont connues,
- un prélèvement ponctuel sera d'autant plus représentatif qu'il aura été effectué à l'heure de l'une des pointes de contamination virale et bactérienne,
- pour un traitement biologique, le pourcentage d'élimination des virus et des bactéries est du même ordre (80%); pour un traitement physico-chimique le pouvoir d'arrêt est de 82 % pour les virus, de 38% pour les streptocoques fécaux et de 25% pour les coliformes fécaux.

Au terme de ce travail de laboratoire et de terrain, nous pouvons dire que le système général proposé (méthode d'adsorption-élution sur de la poudre de verre et méthode de titrage utilisant 96 inoculums par dilution) est bien adapté à la mise en évidence et à la quantification des virus indigènes présents dans le milieu hydrique.

BIBLIOGRAPHIE

ADAMCZYK B. (1970)
Epidemiologie und virologishe klärung eines meningitisausbruches in der hauptstadt Berlin, hervorgerufen durch Echo-Virus typ 30.
Otsch. Ges. Wes. 25, 2144-2148.

AGENCE DE BASSIN RHONE-MEDITERRANEE-CORSE (1976)
Epuration des eaux usées domestiques : procédés physico-chimiques de moindre encombrement. VIII-Elimination de la pollution microbienne.

ALMEIDA J.D., WATERSON R.P. (1969)
The morphology of virus antibody interaction.
Adv. Virus Res. 15, 307-338.

ANGELO (d') L.J., HIERHOLZER J.C., KEENLYSIDE R.A., ANDERSON L.J., MARTONE W.J. (1979)
Pharynconjunctival fever caused by adenovirus type 4: report of a swimming pool related outbreak with recovery of virus from pool water.
J. Inf. Dis. 110, 42-47.

BARTLETT M.S. (1947)
The use of transformation.
Biometrics 3, 39-52.

BECHAC J.P., BOUTIN P., MERCIER B. (1977)
Floculation, décantation et chloration des eaux usées domestiques. Essais au chlorure ferrique et au sulfate d'aluminium.
Techniques et Sc. Municipales 11, 459-463.

BELIAN W., BOTHING B. (1964)
Ubersicht über das adenovirusspektrum in der DDR nach dem stand des jahres 1964.
Otsch. Ges. Wes. 194, 2207-2211.

BERTUCCI J.J., ABID S.H., LUE-HING C., CLARK C.S., FENTERS J.D., FANNIN K.F. (1978)
Relationship between confirmed virus plaques and unconfirmed plaques isolated from sewage.
51 st Water Poll. Cont. Fed. Meeting, Anaheim, California.

BEYTOUT D., LAVERAN H., REYNAUD N.P. (1975)
Méthode pratique d'évaluation numérique applicable aux techniques miniaturisées de titrage en plaques.
Ann. Biol. Clin. 33, 379-384.

BLOCK J.C., COLLIN J.F., JORET J.C., ROLLAND D., FOLIGUET J.M. (1979)
Elimination des entérovirus au cours du traitement par boues activées des eaux usées urbaines.
Techniques et Sc. Municipales 3, 201-206.

BLOOM M.H., MACK W.N., KRUEGER B.J., MADIMANN W.L. (1959)
Identification of enteroviruses in sewage.
J. Inf. Dis. 105, 61-68.

BONDSDORFF (von) C.H., HOVI T., NÄKELÄ P., MORTTINEN A. (1978)
Rotavirus infections in adults in associated with acute gastro-enteritis.
J. Med. Virol. 2, 21-28.

BOUTIN P., TORRE M. (1979)
Variations de la charge bactérienne d'un effluent urbain.
J. Franç.Hydrol. 3, 189-202.

BRICOUT F., JOUBERT L., HURAUX J.M. (1974)
Diagnostic séro-immunologique des viroses humaines et animales.
Maloine S.A. édit. , Paris.

BRISOU J. (1968)
La pollution microbienne, virale et parasitaire des eaux littorales et ses conséquences pour la santé publique.
Bull. Org. Mond. Santé 38, 79-118.

BRISOU J. (1978)
Situation sanitaire et qualité des plages, zones récréatives et fruits de mer sur les rives de la Méditerranée.
Ocean Management 3, 191-203.

BRODSKY M.H., NIXON M.C. (1974)
Membrane filter method for the isolation and enumeration of Pseudomonas aeruginosa from swimming pools.
Appl. Microbiol. 27, 938-943.

BRYAN J.A., LEHMAN J.D., SETIADY I.F., HATCH M.H. (1974)
An outbreak of hepatitis A associated with recreational lake water.
Amer. J. Epidem. 99, 145-157.

BURAS N. (1974)
Recovery of viruses from waste-water and effluent by the direct inoculation method.
Water Res. 8,19-22.

BURGER R. (1973)
Zur bromdesinfektion von schwimmbädern.
Inaugural dissertation, Institut für sozial - und präventivmedizin der universität Zurich.

CABELLI P. (1978)
New standards for enteric bacteria.
Mitchell and Willy Interscience edit., New-York 2, 233-271.

CABELLI V.J., DUFOUR A.P., LEVIN M.A., Mc CABE L.J., HABERMAN P.W. (1979)
Relationship of microbial indicators to health effects at marine bathing beaches.
Amer. J. Publ. Hlth. 69, 690-696.

CARLSON S. (1972)
Evkenntnisse und fortschritte in der schwimmbädwasser hygiene.
Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt.229, 290-292.

CATEIGNE G., MAURIN J. (1965)
Isolement et étude des virus dans l'oeuf embryonné et en cultures cellulaires.
Ed. de la Tourelle, St Mandé.

CAVAZZINI G., CENCI P., GASPARINI V. (1979)
Il profilo microbiologico delle acque di alcune piscine in provincia di Ferrara e di Padova.
Ig. Mod. Ita. 72,12-36.

CHANG S.L., BERG G., BUSCH K.A.,STEVENSON R.E., CLARKE N.A., KABLER P.W. (1956 a
Application of the "most probable number " method for estimating concentrations of animal viruses by the tissue culture technique.
Virology 6, 27-42.

CHANG S.L., STEVENSON R.E., BRYANT A.R., WOOWARD R.L., KABLER P.W. (1958 b)
Removal of coxsackie and bacterial viruses in water by the floculation .
Amer. J. Publ. Hlth. 48, 51-61.

CHARRIER F., BEYTOUT D., LAVERAN H., CLUZEL R. (1977)
Surveillance des virus dans les eaux usées urbaines. Considérations techniques et épidémiologiques.
Méd. et Mal. Infectieuses 2, 55-60.

CHIN T.D.Y., MORLEY W.H., ROBINSON S., GRAMETTE C.R. (1967)
Detection of enteric viruses in sewage and water relative sensivity of the method.
In Berg G. Transmission of viruses by the water route.Interscience Publ. edit. New-York 389-392.

CLIVER D.O. (1975)
Virus association with wastewater solid.
Environ. Letters 10, 215-223.

COCHRAN W.C.(1950)
Estimation of bacterial densities by means of the "most probable number ".
Biometrics 6, 105-116.

CONSEIL SUPERIEUR D'HYGIENE PUBLIQUE DE FRANCE
Section des Eaux (1980)
Projet de rapport sur la désinfection des eaux résiduaires.

COURTOIS G., LA FONTAINE A. (1962)
Acquisitions récentes dans le domaine de l'étiologie et de l'épidémiologie des hépatites virales.
Brux. Med. 42, 647-661.

COWELL N.D. MORISETTI M.D. (1969)
Microbiological techniques - Some statistical aspects.
J. Sci. Fd. Agric. 20, 573-579.

CRAUN C.F., Mc CABE L.J. (1973)
Rewiew of the cases of water borne disease outbreaks.
J. Amer. Wat. Wks. Ass. 65, 74-83.

CROVARI P., FLORA (de) S., BADOLATI G. (1974)
The virological monitoring of water . II - Sea water.
Boll. Ist. Sieroter. 53, 525-532.

DAGNELIE P. (1969)
Théories et méthodes statistiques. I- La statistique descriptive et les fondements de l'inférence statistique.
Les Presses Agronomiques de Gembloux, A.S.B.L.

DAGNELIE P. (1970)
Théorie et méthodes statistiques. II- Les méthodes de l'inférence statistique.
Les Presses Agronomiques de Gembloux, A.S.B.L.

DEMILLAC R. (1976)
Evolution de Salmonella duisburg dans les effluents et des boues activées de station d'épuration ensemencée expérimentalement. Recherche de Salmonelles dans les stations d'épuration de la région rennaise.
Ecole de la Santé Publique,Rennes.

DENIS F. (1973)
Incidences épidémiologiques de la contamination virale des eaux.
Rev. Epidem., Med. Soc. et Santé Publ. 21, 273-302.

DENIS F. (1974)
Les virus pathogènes pour l'homme dans les eaux de mer et dans les mollusques: survie, recherche, bilan.
Med. et Mal. Infectieuses 4,325-335.

DENIS F., BRISOU J.F., DUPUIS T. (1975)
Recherches sur l'inactivation des entérovirus dans les eaux de mer.
C.R. Acad. Sc. Paris 281, 471-474.

DENIS F., DUPUIS T., DENIS N.A., BRISOU J.F. (1977)
Survie dans l'eau de mer de 20 souches de virus à A.D.N. et A.R.N.
J. Franç.Hydrol. 8, 25-36.

DIENSTAG J.L., ROUTENBERG J.A., PURCELL R.H., HOOPER R.R., HARRISON W.O. (1975)
Food-handler-associated outbreak of hepatitis type A: an immune electron microscopic study.
Ann. Intern. Med. 83, 647-650.

DOANE F.W. (1974)
Identification of viruses by immunoelectron microscopy.
Kurstak E. and Marisset R. edit., New York 237-255.

DOUGHERTY W.J., ALTMAN R. (1962)
Viral hepatitis in New-Jersey 1960-1961.
Amer. J. Med.32, 704-716.

DULBECCO R., VOGT M. (1954)
Plaque formation and isolation of pure lines with poliomyelitis viruses.
J. Exp. Med. 99, 167-178.

EAGLE H., HABEL K., ROWE W.P., HUEBNER R.J. (1956)
Viral susceptibility of a human carcinoma cell (strain KB).
Proc. Soc. Exp. Biol. and Med. 91, 361-364.

EARLE W.R. (1943)
Production of malignancy in vitro.
J. Nat. Cancer Inst. 4,165-212.

EDMOND T.D., SCHAIBERGER G.E., GERBA C.P. (1978)
Detection of enteroviruses near deep marine sewage outfalls.
Marine Pollut. Bull. 9, 246-249.

EISENHART C., WILSON P.W. (1943)
Statistical method and control in bacteriology.
Bacteriol. Rev. 7, 57-137.

FANNIN K.F., ABID S.M., BERTUCCI J.J., REED J.M., VANA S.C., LUE-HING C. (1978)
Significance of reporting infections viral as plaque forming unit concentrations from environmental samples.
Abstracts of the 78th A.S.N. meeting.

FARRAH S.R., GOYAL S.M., GERBA C.P., WALLIS C., MELNICH J.L. (1977)
Concentration of enteroviruses from estuarine water.
Appl. Environ. Microbiol. 33, 1192-1196.

FARRAH S.R., GOYAL S.M., GERBA C.P., WALLIS C., SCHAFFER P.T.P. (1976)
Characteristics of humic acids and organic compounds concentrated from tap water using the Aquela virus concentrator.
Water Res. 10, 897-901.

FAVERO M.S., DRAKE C.H., RANDALL G.B. (1964)
Use of staphylococci as indicators of swimming pool pollution.
Publ. Hlth. Rep. 79, 61-70.

FIELDS H.A., METCALF T.G. (1975)
Concentration of adenovirus from seawater.
Water Res. 9, 357-364.

FLORA (de) S., RENZI (de) G.P., BADOLATI G. (1975)
Detection of animal viruses in coastal sea water and sediments.
Appl. Microbiol. 30, 472-475.

FLOYD R., SHARP D.G. (1979)
Viral aggregation: buffer effects in the aggregation of poliovirus and reovirus at low and high pH.
Appl. Environ. Microbiol. 38, 395-401.

FLUEGGE R.A., METCALF T.G., WALLIS C. (1978)
Virus inactivation in wastewater affluents by chlorine, ozone and ultraviolet light.
Proceedings of the national symposium. Cincinnati,Ohio, Sept. 18-20 " Progress in wastewater desinfection technology ".

FOURNIER J.G., ROUSSET S., BOUTEILLE M. (1978)
Application de l'immuno-microscopie électronique à la détection de virus en milieu hydrique.
C.R. Acad. Sc. Paris 22, 1637-1639.

FREYMUTH F., DAON F., AUBOURG P., GANDON S., LANGEARD M.M., VALDAZO A., PITRE J., CHAMBON J., VERIN J.L. (1979)
Contamination de l'eau par les entérovirus non poliomyélitiques.
Ouest Med. 32, 439-442.

FUJIOKA R.S., LOH P.C. (1978)
Recycling of water for irrigator: persistence of enterovirus in sewage effluent and natural waters receiving the effluent.
Water, Air, Soil. Pollution 9, 213-226.

GEIGY (1973)
Tables scientifiques - 7 ème édition.
Ciba-Geigy édit. Bâle.

GERBA C.P., SMITH E.M., MELNICK J.L. (1977)
Development of a quantitative method for detecting enteroviruses in estuarine sediments.
Appl. Environ. Microbiol. 34, 158-163.

GERBA C.P., GOYAL S.M., LABELLE R.L., CECH I., BODGAN G.F. (1979)
Failure of indicator of bacteria to reflect the occurence of enteroviruses in marine waters.
Amer. J. Public 69, 1116-1119

GLEDEL J., ADROIT J. (1979)
Les critères microbiologiques appliqués aux denrées alimentaires. Formulation. Signification.
Cahier de nutrition et de diététique 4, 259-269.

GOYAL S.M., GERBA C.P., MELNICK J.L. (1978)
Prevalence of human enteric viruses in coastal canal communities.
J. Wat. Pollut. Control Fed. 50, 2247-2256.

GRABOW W.O.K. (1968)
The virology of waste water treatment.
Water Res. 2, 675-679.

GRAVELLE G.R., HORNBECK C.L., MAYNARD J.E. SCHABLE C.A., COOK E.M., BRADLEY D.W. (1975)
Hepatitis A: report of a common source outbreak with recovery of a possible etiologic agent. II - Laboratory studies.
J. Infect. Dis. 131, 167-171.

GRINSTEIN S., MELNICK J.L., WALLIS C. (1970)
Virus isolation from sewage and from a stream receiving effluent of sewage treatment plants.
Bull. O.M.S. 42, 291-296

GUERREE M., GOMELLA C., BALETTE B. (1970)
Pratique de l'assainissement des agglomérations urbaines et rurales.
Eyrolles édit., Paris.

GUILLOT P. (1961)
Exposé critique des principales méthodes de mesures des virus.
Path. Biol. 9, 1781-1788.

HALDANE J.B.S. (1939)
Sampling errors in the determination of bacterial or virus density by the dilution method.
J. Hygiene 39, 289-293.

HALVORSON H.O., ZIEGLER N.R. (1933)
Application of statistics to problems in bacteriology. III - A consideration of the accuracy of dilution data obtained by using several dilutions.
J. Bacteriol. 26, 559-567.

HAMBLET F.E., HILL W.F., AKIN E.W. (1967)
Effect of plaque assay diluent upon enumeration of poliovirus type I.
Appl. Microbiol. 15, 208-210.

HANKS J.H., WALLACE R.E. (1949)
Oxygen and temperature in the preservation of tissues by refrigeration.
Proc. Soc. Exp. Med. 71, 196-201.

HAWLEY H.B., MORIN D.P., GERATHY M.E., TOMKOW J., PHILIPS C.A. (1973)
Coxsackie virus B epidemic at a boy's summer camps. Isolation of virus from swimming water.
J. Amer. Med. Assn. 226, 33-36.

HILL W.F., AKIN E.W., BENTON W.H. (1971)
Detection of viruses in water: a review of methods and application.
Water Res. 5, 967-995.

HOSKINS J.K. (1934)
Most probable numbers for evaluation of coli tests by fermentation tube method.
Publ. Hlth.Rep. 49, 393-396.

HUGUES B., BOUGIS M.A., PLISSIER M., ANDRE M., LAURENT D., PAGLIARDINI A. (1979 a)
Evaluation de la contamination virale marine après rejet d'un effluent par un émissaire en mer.
Zbl. Bakt. Hyg., I Abt. Orig. B 169, 253-264.

HUGUES B., PLISSIER M. (1976)
Inactivation comparée de Poliovirus I, E.coli, S. paratyphi B, par le chlore et par l'ozone en fonction du potentiel d'oxydo-réduction, du temps de contact et de la concentration du milieu en substances réductrices.
Rapport final n°7447. Ministère de la Qualité de la Vie et de l'Environnement.

HUGUES B., PLISSIER M., ANDRE M., PAGLIARDINI A., LAURENT D. (1979 b)
Evaluation de la charge virale dans les eaux d'une station d'épuration biologique au moyen de deux méthodes de concentration de virus par adsorption-élution sur poudre de verre ou sur microfibre de verre.
Water Res. 13, 1117-1123.

HUGUES B., PLISSIER M., LEFEVRE J.R., CINI A. (1979 c)
Distribution de la charge virale et bactérienne dans l'eau de mer à proximité d'un rejet d'eaux usées traitées.
Journées de la "Société Française de Microbiologie " sur la microbiologie marine MARSEILLE.

HUGUES B., PLISSIER M., MOTHON F., BOCQUET J.P. (1979 d)
Recherche virale dans les zones récréatives.
Rev. Franç. Santé Publique 7, 53-61.

HUGUES B., PLISSIER M., PAGLIARDINI A., LAURENT D., ANDRE M. (1979 e)
Application de la méthode d'adsorption-élution sur filtre en fibre de verre pour déterminer la charge virale à l'entrée et à la sortie d'une station d'épuration biologique.
J. Franç. Hydrol. 10, 21-28.

JACOBS R.R., SOBSEY M.D. (1978)
Improved methods for concentrating adenovirus from drinking water.
Abstracts of the American Society of Microbiology.

JOURNAL OFFICIEL DE LA REPUBLIQUE FRANCAISE (1974)
Le régime de l'eau n°1327.

KAPIKIAN A.Z., WYATT R.G., THORNHILL T.S., KALICA A.R., CHANOCK R.M. (1972)
Visualisation by immune electron microscopy of 27 nm particle associated with acute infectious non bacterial gastroenteritis.
J. Virol. 10, 1075-1081.

KAPIKIAN A.Z., KIM H.W., WYATT R.G., RODRIGUEZ W.J., ROSS S., CLINE W.L., PARROT R.H., CHANOCK R.M. (1974)
Reovirus-like agent in stools: association with infantile diarrhea and development of serologic tests.
Science 185, 1049-1053.

KAPIKIAN A.Z., CLINE W.L., MEBUS C.A., WYATT R.G., KALICA A.R., JAMES H.D., VAN KIRK D., CHANOCK R.M. (1975).
New complement-fixation test for the human reovirus like agent of infantis gastroenteritis.
Lancet 1, 1056-1081.

KATZENELSON E. (1976)
Virologic and engineering problems in monitoring viruses in water.
In "Viruses in water ".
Edit.Berg. Get al. American Public Health Association Publisher.

KATZENELSON E. (1977)
Concentration and identification of viruses from sea water.
Rev. Int. Oceanogr. Med. 48, 9-16.

KELEN A.E., HATHAWAY A.E., Mc LEOD D.A. (1971)
Rapid detection of Australian SH antigen and antibody by a simple and sensitive technique of immuno electron microscopy.
Can. J. Microbiol. 17, 993-1000.

KELLY S., SANDERSON W.W. (1960)
Density of enterovirus in sewage.
J. Wat. Poll. Control Fed. 32, 1269-1273.

KELLY S., SANDERSON W.W. (1964)
Attenuated poliovirus in sewage.
J. Wat. Poll. Control. Fed. 36, 905-908.

KLING C. (1928)
Recherches sur l'épidémiologie de la poliomyélite.
Bull. Off. Internat. Hyg. Pub. 20, 1779-1803

KRUGMANN S., WARD R., GILES J.P., BODANSKY O., JACOBS A.M. (1959)
Infection hepatitis. Detection of virus during the incubation period and clinically inapparent infection.
New England J. Med. 261, 728-733.

LAMB C.A., CHIN T.D.Y., SCARCE L.E. (1964)
Isolement de virus entériques de l'eau d'égout et de rivière dans une zone métropolitaine.
Amer. J. Hyg. 80, 320-327.

LANDRY E.F., VAUGHN J.M., Mc THOMAS M.Z., VICALE T.J. (1978)
Efficiency of beef extract for the recovery of poliovirus from wastewater effluents.
Appl. Environ. Microbiol. 36, 544-548.

LECLERC H., SAVAGE C. (1967)
Etude et contrôle bactériologique des eaux de piscines.
Rev. Hyg. Med. Sociale 15, 503-505.

LELOUP D., DENOYEL G.A., GASPAR A., VIAL J. (1979)
Etude de la contamination virale des eaux de la région Rhône-Alpes entre 1975 et 1977.
Rev.Inst. Pasteur (Lyon) 12, 371-386.

LEON L.J.C., BARRET S.J., TRUSSEL R.R. (1978)
False positives in testing of secondary sewage for enteric viruses.
Abstracts of the 78 th A.S.M. meeting.

LEVIN M.A., CABELLI V.J. (1972)
Membrane filter technique for enumeration of Pseudomonas aeruginosa.
Appl. Microbiol. 24, 864-870.

LIEBSCHER S. (1970)
Enteroviren im schwimmbadwasser.
Z. Ges. Hyg. 16, 198-200.

LISON L. (1958)
Statistique appliquée à la biologie expérimentale. La planification de l'expérience et l'analyse des résultats.
Gauthier-Villars édit. Paris.

LOCARNINI S.A., FERRIS A.A., STOTT A.C., GUST I.D.(1974)
The relationship between a 27 nm virus-like particle and hepatitis A as demonstrated by immune electron microscopy.
Intervirology 4, 110-118.

LUCENA-GUTIERREZ F. (1979)
Contribution à l'étude de la concentration des virus par adsorption-élution sur poudre de verre. Application à la recherche des virus dans le milieu hydrique.
Thèse 3° cycle de Nutrition, Sciences de l'Alimentation et Biochimie appliquée.
Université Nancy I.

LUND E., HEDSTROM C.E. (1966)
The use of an aqueous polymer phase system for enterovirus isolations from sewage.
Ann. J. Epidem. 84, 287-291.

Mc GRADY M.H. (1918)
Table for rapid interpretation tube results.
Can. Publ. Hlth. 9, 201.

Mc LEAN D. (1963)
Infection hazards in swimming pools.
Pediatrics 31, 811-818.

MAGNUSSON S., HEDSTROM C.E., LYCKE Z. (1966)
The virus inactivating capacity in sea water.
Acta Path. Microbiol. Scand. 66, 551-559.

MALHERBE H.M., STRICKLAND-CHOLMEY M. (1967)
Quantitative studies on viral survival in sewage purification process. In BERG G
Transmission of viruses by the water route.
Interscience Publ. edit. New-York 379-387.

MAN (de) J.C. (1975)
The probability of most probable numbers.
European J. Appl. Microbiol. 1, 67-78.

MAN (de) J.C. (1977)
M.P.N. tables for more than one test.
European J. Appl. Microbiol. 4, 307-316.

MANDEL B. (1971)
Characterization of type 1 poliovirus by electrophoretic analysis.
Virology 44, 554-568.

MARTONE W.J., HIERHOLZER J.C., KEENLYSIDE R.A., FRAZER D.W., ANGELO (d') L.J., WINKLER W.G. (1980).
An outbreak of adenovirus type 3 disease at private recreation center swimming pool.
Am. J. Epidem. 111, 229-237.

MARZOUK Y., GOYAL S.M., GERBA C.P. (1980)
Relationship of virus and indicator bacteria in water and wastewater of Israël.
Water Res. 14, 1585-1590.

MATHER K. (1965)
Analyse statistique en biologie.
Gauthier-Villars edit. Paris.

MELNICK J.L., EMMONS J., COFFEY J.M., SCHOOF H. (1954)
Seasonal distribution of coxsackie virus in urban sewage and plies.
Amer. J. Hyg. 59, 164-184.

MERCIER B. (1974)
Etude des traitements physico-chimiques des eaux résiduaires urbaines.
Ecole Nationale de la Santé Publique- Rennes.

METCALF T.G., WALLIS C. MELNICK J.L. (1974)
Environmental factors influencing isolation of enteroviruses from polluted surface waters.
Appl. Microbiol. 27, 920-926.

MEYNELL G.G. (1957)
Inherently low precision of infectivity titrations using a quantal reponse.
Biometrics 13, 149-163.

MOORE M.L., LUDOVICI P.P., JETER W.S. (1970)
Quantitative methods for the concentration of viruses in wastewater.
J. Wat. Poll. Control Fed. 42, 21-28.

NORMANN R.L., KEMPE L.L. (1960)
Electronic computer solution for the M.P.N. equation used in the determination of bacterial populations.
J. Bioch. Microbiol. Technol. 2, 157-159.

OBLINGER J.L., KOBURGER J.A. (1975)
Understanding and teaching the most probable number technique.
J. Milk Fd. Technol. 38, 540-545.

PARNOW R.J. (1972)
Computer program estimates bacterial densities by means of most probable numbers.
Food Technol. 26, 56-62.

PLISSIER M., HUGUES B. (1978)
Survie comparée " in situ" de Poliovirus I, Adenovirus V, Salmonella paratyphi B, Escherichia coli, Candida albicans en eau de mer et en eau de rivière.
Rapport n°76-100 - Ministère de l'Environnement.

PLISSIER M., THERRE P. (1961)
Recherches sur l'inactivation du poliovirus dans l'eau de mer.
Ann. Inst. Pasteur 101, 840-844.

PROST M. (1970)
Emploi des méthodes statistiques dans le contrôle bactériologique des denrées alimentaires et des boissons.
Ecole Nle. Santé Publique; Session d'étude sur les problèmes d'hygiène et de microbiologie alimentaire - Rennes.

PROST M. (1974)
Tests statistiques pour le contrôle bactériologique en milieux d'ensemencement liquides.
Ann. Fals. Exp. Chim. 67, 157-169.

PROST M., HUGUES B., PLANTAT J.L., PLISSIER M. (1981)
Emploi statistique de l'indice N.P.P. en microbiologie.
Environ. letters - sous presse.

PUCK T.T., FISHER H.W. (1956)
Genetics of somatic mammalian cells. I- Demonstration of the existence of mutants with different growth requirements in a human cancer cell strain.
J. Exp. Med. 104, 428-434.

RAGER-ZISMAN B., MERIGAN T.C. (1973)
A useful quantitative semi micro method for viral plaque assay.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 142, 1174-1179

RAO V.C., LAKHE S.B., WAGHMARE S.V., DUBE P. (1977)
Virus removal in activated-sludge sewage treatment.
Prog. Wat. Tech. 9, 113-127.

REED C.J., MUENCH H. (1938)
A simple method for estimating fifty per cent endpoints.
Amer. J. Hyg. 27, 493.

RELEVE EPIDEM. HEBD. O.M.S. GENEVE (1980)
Présence de virus dans l'eau 11 , 83.
Epidnation edit, Genève.

RODIER J. (1978)
L'analyse de l'eau: Eaux naturelles, eaux résiduaires, eau de mer.
Dunod Techniques édit., Paris.

RUITER G.G.,FUJIOKA R.S. (1978)
Human enteric viruses in sewage and their discharge into the ocean.
Water, Air, Soil Pollution 10, 95-103.

SARRETTE B., DANGLOT C.D., VILAGINES R. (1977 a)
A new and simple method for recuperation of enterovirus from water.
Water Res.11, 355-358.

SARRETTE B., DANGLOT C.D., VILAGINES R. (1977 b)
Nouvelle méthode permettant la détermination quantitative des virus présents dans les eaux de surface.
C.R. Acad. Sc. Paris 285, 1359-1361.

SARRETTE B., DANGLOT C.D., VILAGINES R. (1978)
Nouvelle technique de concentration quantitative des enterovirus des eaux.
Techniques et Sc. Municipales 3, 185-188.

SATTAR S.A., WESTWOOD J.C.N. (1977 a)
Study of human pathogenic viruses in solid and liquid wastes and the water environment in the Ottawa area.
In Mahdy M.S. and Dutka B.J., edit., The examination of gauze pad samples of sewage from a children's hospital for the presence of infantile gastroenteritis viruses. 36-41.

SATTAR S.A., WESTWOOD J.C.N. (1977 b)
Examination of recreational waters, sewage and effluent for human pathologic viruses, 1974-1976.
Final report for the microbiology laboratories. Appl. Res. Div. Contract N.SS04, KL 347, Burlington-Ontario.

SAUNIER B. (1977)
Efficacité des traitements visant à l'élimination des produits ou agents pathogènes en vue de respecter les objectifs de qualité fixés par le milieu naturel.
Journée organisée par le Ministère de la Culture et de l'Environnement sur " l'eau, la recherche, l'environnement " Montpellier.

SCHINDLER P.R., METZ H., HELLWIG R. (1978)
Pseudomonas aeruginosa im schwimmbeekenwasser.
Zbl. Bakt. Hyg., I - Abt. Orig. B 167, 462-469.

SCHWARTZBROD L., LUCENA-GUTIERREZ F. (1978)
Concentration des entérovirus dans les eaux par adsorption sur poudre de verre: proposition d'un appareillage simplifié.
Microbia 1, 55-58.

SCHWARTZBROD L., LUCENA F., FINANCE C. (1979 a)
Etude quantitative de la population virale dans l'affluent et l'effluent d'une station d'épuration d'eaux résiduaires.
J. Franç. Hydrol. 10, 7-20.

SCHWARTZBROD L., LUCENA F., MATHIEU C., MARTINEZ J., SANCHO J., JOFFRE J. (1979 b)
Etude bactériologique et virologique de l'eau de mer de l'aire métropolitaine de Barcelone.
Journées de la "Société Française de Microbiologie" sur la microbiologie marine, Marseille.

SHUVAL H.I., THOMPSON A., FATTAL B., CYMBALISTA S., WIENER Y. (1971)
Natural virus inactivation processes in sea water.
J. Sanitary Engineering Division S A_5, 587-600.

SOKAL R.R., ROHLF F.J. (1969)
Biometry.
Freeman W.H. and C° edit., San Francisco.

SPINASSE A., LABONDE J., FESTY B. (1978)
Surveillance biologique des piscines. I - Aspect général. Données bactériologiques, virologiques et mycologiques.
J. Franç. Hydrol. 9, 63-70.

STRICKLAND J.D.H., PARSON T.R. (1972)
A pratical handbook of seawater analysis.
Fisheries Res. Board of Canada Bull. edit., Ottawa.

SUSANI (von) C., HAZEGHI P. (1976)
Infections transmises par la fréquentation des piscines.
Médecine et Hygiène 1211, 1518-1521.

TYSSET C., BRISOU J., CUDENNEC A. (1966)
Possibilités d'infections par les bains de mer pollués par les égouts.
Rev. Hyg. Med. Soc. 14, 315-348.

VALENTINE R.C., ALLISON A.C. (1959)
Virus particle adsorption. I - Theory of adsorption and experiments on the attachment of particles to non-biological surfaces.
Biochemica, Biophysica Acta. 34, 16-23.

VALENTINO L., COMES R., LANTIERI P. (1978)
Lo staficococco nelle acque di piscina.
Ig. Mod. Ita. 71, 503-516.

VAN der VEEN J., VAN der PLOEG G. (1958)
An outbreak of pharyngo-conjunctival fever caused by types 3 and 4 adenovirus.
Amer. J. Hyg. 68, 95-105.

WALLIS C., MELNICK J.L. (1962)
Cationic stabilization. A new property of enterovirus.
Virology 16, 504-506.

WHO STUDY GROUP (1970)
Viral hepatitis and tests for the Australia (hepatitis-associated) antigen and antibody.
Bull. W.H.O. 42, 957-992.

WOODWARD R.L. (1957)
How probable is the most probable number ?
J.A.W.W.A. 49, 1060-1068.

WYSHAK G., DETRE K. (1972)
Estimating the number of organisms in quantal assays.
Appl. Microbiol. 23, 784-790.

□ ● □ ● □ ● □ ● □ ● □

ANNEXES

A N N E X E A 1

◆□◆□◆□◆□◆□◆□◆□◆□◆□◆

CALCUL DES PROBABILITES D'APRES DE MAN (1975)

Pour une valeur de d, la probabilité $P_{xyz} = T_x T_y T_z$ est calculée pour chaque N.C. possible.

Les probabilités T_x, T_y, T_z correspondant aux N.C. x,y,z sont calculées par l'équation :

$$T = \frac{n\,!}{p\,!\,(n-p)\,!}\,(1 - e^{-q\,d})^{p}(e^{-q\,d})^{n-p}$$

Ainsi, pour une densité donnée, les probabilités maximales T_x, T_y et T_z permettent de trouver respectivement x_{max}, y_{max} et z_{max}. Il en résulte que le N.C. le plus probable est alors x_{max};y_{max};z_{max}. Après avoir fait varier les N.C. autour de x_{max}, y_{max} et z_{max}, les probabilités des différentes combinaisons sont calculées. Elles sont classées par ordre décroissant puis comptabilisées jusqu'à ce que la somme soit égale à 95%.

Dans l'impossibilité de calculer les 912 673 combinaisons possibles, les combinaisons les plus probables sont alors recherchées.

Exemple : si d = 14,5

★ pour la première dilution ($q_1 = 1$)

x	T_x
94	0,000000
95	0,000048
96	0,999951

Quand T_x = 0,999951 est maximum, x_{max} = 96
Il n'y a pas de variation autour de x_{max}

★ pour la deuxième dilution (q_2 = 0,1)

y	T_y
72	0,087984
73	0,094389
74	0,095731
75	0,091632
76	0,082620

Quand T_y = 0,095731 est maximum, y_{max} = 74
Il y a une variation autour de y_{max}

★ pour la troisième dilution (q_3 = 0,01)

z	T_z
10	0,086951
11	0,106075
12	0,117243
13	0,118211
14	0,109356

Quand T_z = 0,118211 est maximum, z_{max} = 13
Il y a une variation autour de z_{max}

PROBABILITE D'OBTENIR UN N.C. POUR UNE DENSITE VIRALE d = 0,01

N.C.	PROBABILITE	N.P.P.
6 0 0	0,000331	0,057
5 0 0	0,002170	0,048
4 1 0	0,001137	0,047
4 0 0	0,011723	0,038
3 1 0	0,004864	0,038
3 0 0	0,050116	0,028
2 2 0	0,000741	0,037
2 1 0	0,015430	0,028
2 0 0	0,159000	0,018
1 1 0	0,032291	0,018
1 0 0	0,332744	0,009
0 1 0	0,033441	0,009
0 0 0	0,344500	0,000

PROBABILITE D'OBTENIR UN N.C. POUR UNE DENSITE VIRALE d = 0,03

N.C.			PROBABILITE	N.P.P.
10	0	0	0,000321	0,098
9	1	0	0,000350	0,098
9	9	0	0,001212	0,088
8	1	0	0,001178	0,087
8	0	0	0,004063	0,078
7	2	0	0,000494	0,087
7	1	0	0,003458	0,077
7	0	0	0,019600	0,067
6	2	0	0,001262	0,077
6	1	0	0,008818	0,067
6	0	1	0,001860	0,067
6	0	0	0,030549	0,057
5	2	0	0,002725	0,067
5	1	0	0,019080	0,057
5	0	1	0,001860	0,057
5	0	0	0,065965	0,048
4	2	0	0,004856	0,057
4	1	1	0,000912	0,057
4	1	0	0,033931	0,047
4	0	1	0,003386	0,047
4	0	0	0,117578	0,038
3	2	0	0,006843	0,047
3	1	1	0,001288	0,047
3	1	0	0,047916	0,038
3	0	1	0,004781	0,038
3	0	0	0,165800	0,028
2	2	0	0,007165	0,037
2	1	1	0,001348	0,037
2	1	0	0,050168	0,028
2	0	1	0,004993	0,028
2	0	0	0,173395	0,018
1	1	1	0,000930	0,028
1	1	0	0,034618	0,018
1	0	0	0,119600	0,009
0	1	0	0,011803	0,009
0	0	0	0,040900	0,000

PROBABILITE D'OBTENIR UN N.C. POUR UNE DENSITE VIRALE d = 0,06

N.C.	PROBABILITE	N.P.P.
0 0 0	0,001672	-----
1 0 0	0,009927	0,009
2 0 0	0,029157	0,018
3 0 0	0,056494	0,028
4 0 0	0,081221	0,038
5 0 0	0,092413	0,048
6 0 0	0,086670	0,057
7 0 0	0,068906	0,067
8 0 0	0,047403	0,078
9 0 0	0,028661	0,088
10 0 0	0,015419	0,098
11 0 0	0,007454	0,108
12 0 0	0,003265	0,119
13 0 0	0,001305	0,130
14 0 0	0,000478	0,140
0 1 0	0,000966	0,009
1 1 0	0,005735	0,018
2 1 0	0,016845	0,028
3 1 0	0,032638	0,038
4 1 0	0,046924	0,047
5 1 0	0,053390	0,057
6 1 0	0,050072	0,067
7 1 0	0,039809	0,077
8 1 0	0,027386	0,087
9 1 0	0,016558	0,098
10 1 0	0,008908	0,108
11 1 0	0,004307	0,118
12 1 0	0,001886	0,129
13 1 0	0,000754	0,140
1 2 0	0,001639	0,028
2 2 0	0,004815	0,037
3 2 0	0,009330	0,047
4 2 0	0,013414	0,057
5 2 0	0,015262	0,067
6 2 0	0,014313	0,077
7 2 0	0,011380	0,087
8 2 0	0,007828	0,097
9 2 0	0,004733	0,107

N.C.	PROBABILITE	N.P.P.
10 2 0	0,002546	0,118
11 2 0	0,001231	0,128
12 2 0	0,000539	0,139
2 3 0	0,000908	0,047
3 3 0	0,001759	0,057
4 3 0	0,002529	0,067
5 3 0	0,002878	0,077
6 3 0	0,002699	0,087
7 3 0	0,002146	0,097
8 3 0	0,001476	0,107
9 3 0	0,000893	0,117
10 3 0	0,000480	0,128
1 0 1	0,000572	0,018
2 0 1	0,001680	0,028
3 0 1	0,003255	0,038
4 0 1	0,004686	0,047
5 0 1	0,005325	0,057
6 0 1	0,004994	0,067
7 0 1	0,003970	0,077
8 0 1	0,002731	0,087
9 0 1	0,001651	0,098
10 0 1	0,000888	0,108
2 1 1	0,000971	0,037
3 1 1	0,001881	0,047
4 1 1	0,002704	0,057
5 1 1	0,003076	0,067
6 1 1	0,002885	0,077
7 1 1	0,002294	0,087
8 1 1	0,001578	0,097
9 1 1	0,000954	0,107
10 1 1	0,000513	0,118
3 2 1	0,000538	0,057
4 2 1	0,000773	0,067
5 2 1	0,000879	0,076
6 2 1	0,000825	0,087
7 2 1	0,000656	0,097
8 2 1	0,000451	0,107

PROBABILITE D'OBTENIR UN N.C. POUR UNE DENSITE VIRALE d = 0,08

N.C.	PROBABILITE	N.P.P.
1 0 0	0,001587	0,009
2 0 0	0,006278	0,018
3 0 0	0,016384	0,028
4 0 0	0,031727	0,038
5 0 0	0,048621	0,048
6 0 0	0,061418	0,057
7 0 0	0,065768	0,067
8 0 0	0,060939	0,078
9 0 0	0,049626	0,088
10 0 0	0,035959	0,098
11 0 0	0,023415	0,108
12 0 0	0,013814	0,119
13 0 0	0,007434	0,130
14 0 0	0,003671	0,140
15 0 0	0,001671	0,151
16 0 0	0,000705	0,162
17 0 0	0,000276	0,173
1 1 0	0,001224	0,018
2 1 0	0,004841	0,028
3 1 0	0,012634	0,038
4 1 0	0,024464	0,047
5 1 0	0,037491	0,057
6 1 0	0,047358	0,067
7 1 0	0,050713	0,077
8 1 0	0,046989	0,087
9 1 0	0,038266	0,098
10 1 0	0,027727	0,108
11 1 0	0,018055	0,118
12 1 0	0,010651	0,129
13 1 0	0,005732	0,140
14 1 0	0,002830	0,151
15 1 0	0,001289	0,161
16 1 0	0,000543	0,172
17 1 0	0,000213	0,184
1 2 0	0,000467	0,028
2 2 0	0,001847	0,037
3 2 0	0,004820	0,047

N.C.	PROBABILITE	N.P.P.
4 2 0	0,009334	0,057
5 2 0	0,014304	0,067
6 2 0	0,018068	0,077
7 2 0	0,019348	0,087
8 2 9	0,017927	0,097
9 2 0	0,014599	0,107
10 2 0	0,010579	0,118
11 2 0	0,006888	0,128
12 2 0	0,004064	0,139
13 2 0	0,002187	0,150
14 2 0	0,001080	0,161
15 2 0	0,000492	0,172
16 2 0	0,000207	0,183
2 3 0	0,000465	0,047
3 3 0	0,001213	0,057
4 3 0	0,002349	0,067
5 3 0	0,003600	0,077
6 3 0	0,004547	0,087
7 3 0	0,004869	0,097
8 3 0	0,004512	0,107
9 3 0	0,003674	0,117
10 3 0	0,002662	0,128
11 3 0	0,001734	0,138
12 3 0	0,001023	0,149
13 3 0	0,000550	0,160
14 3 0	0,000272	0,171
3 4 0	0,000227	0,066
4 4 0	0,000439	0,076
5 4 0	0,000672	0,086
6 4 0	0,000849	0,096
7 4 0	0,000909	0,107
8 4 0	0,000843	0,117
9 4 0	0,000686	0,127
10 4 0	0,000497	0,138
11 4 0	0,000324	0,148
2 0 1	0,000482	0,028
3 0 1	0,001259	0,038

N.C.			PROBABILITE	N.P.P.
4	0	1	0,002438	0,047
5	0	1	0,003736	0,057
6	0	1	0,004719	0,067
7	0	1	0,005053	0,077
8	0	1	0,004682	0,087
9	0	1	0,003813	0,098
10	0	1	0,002763	0,108
11	0	1	0,001799	0,118
12	0	1	0,001061	0,129
13	0	1	0,000571	0,140
14	0	1	0,000282	0,150
2	1	1	0,000372	0,037
3	1	1	0,000971	0,047
4	1	1	0,001880	0,057
5	1	1	0,002880	0,067
6	1	1	0,003639	0,077
7	1	1	0,003896	0,087
8	1	1	0,003610	0,097
9	1	1	0,002940	0,107
10	1	1	0,002130	0,118
11	1	1	0,001387	0,128
12	1	1	0,000818	0,139
13	1	1	0,000440	0,150
14	1	1	0,000217	0,161
3	2	1	0,000370	0,057
4	2	1	0,000717	0,067
5	2	1	0,001099	0,076
6	2	1	0,001388	0,087
7	2	1	0,001487	0,097
8	2	1	0,001377	0,107
9	2	1	0,001122	0,117
10	2	1	0,000813	0,128
11	2	1	0,000529	0,138
12	2	1	0,000312	0,149

PROBABILITE D'OBTENIR UN N.C. POUR UNE DENSITE VIRALE d = 0,105

N.C.	PROBABILITE	N.P.P.
2 0 0	0,000773	0,018
3 0 0	0,002681	0,028
4 0 0	0,006901	0,038
5 0 0	0,014058	0,048
6 0 0	0,023605	0,057
7 0 0	0,033600	0,067
8 0 0	0,041383	0,078
9 0 0	0,044798	0,088
10 0 0	0,043148	0,098
11 0 0	0,037347	0,108
12 0 0	0,029288	0,119
13 0 0	0,020951	0,130
14 0 0	0,013752	0,140
15 0 0	0,008323	0,151
16 0 0	0,004665	0,162
17 0 0	0,002430	0,173
18 0 0	0,001181	0,185
19 0 0	0,000537	0,196
20 0 0	0,000229	0,207
2 1 0	0,000783	0,028
3 1 0	0,002717	0,038
4 1 0	0,006993	0,047
5 1 0	0,014245	0,057
6 1 0	0,023919	0,067
7 1 0	0,034047	0,077
8 1 0	0,041934	0,087
9 1 0	0,045394	0,098
10 1 0	0,043723	0,108
11 1 0	0,037844	0,118
12 1 0	0,029678	0,129
13 1 0	0,021230	0,140
14 1 0	0,013935	0,151
15 1 0	0,008433	0,161
16 1 0	0,004727	0,172
17 1 0	0,002463	0,184
18 1 0	0,001197	0,195
19 1 0	0,000544	0,206

N.C.	PROBABILITE	N.P.P.
20 1 0	0,000232	0,218
2 2 0	0,000393	0,037
3 2 0	0,001362	0,047
4 2 0	0,003506	0,057
5 2 0	0,007142	0,067
6 2 0	0,011993	0,077
7 2 0	0,017070	0,087
8 2 0	0,021025	0,097
9 2 0	0,022760	0,107
10 2 0	0,021922	0,118
11 2 0	0,018974	0,128
12 2 0	0,014880	0,139
13 2 0	0,010644	0,150
14 2 0	0,006986	0,161
15 2 0	0,004228	0,172
16 2 0	0,002370	0,183
17 2 0	0,001235	0,194
18 2 0	0,000600	0,205
19 2 0	0,000273	0,217
3 3 0	0,000450	0,057
4 3 0	0,001159	0,067
5 3 0	0,002361	0,077
6 3 0	0,003966	0,087
7 3 0	0,005646	0,097
8 3 0	0,006953	0,107
9 3 0	0,007527	0,117
10 3 0	0,007250	0,128
11 3 0	0,006275	0,138
12 3 0	0,004921	0,149
13 3 0	0,003520	0,160
14 3 0	0,002310	0,171
15 3 0	0,001398	0,182
16 3 0	0,000784	0,193
17 3 0	0,000408	0,204
4 4 0	0,000285	0,076
5 4 0	0,000580	0,086
6 4 0	0,000973	0,096

N.C.	PROBABILITE	N.P.P.
7 4 0	0,001386	0,107
8 4 0	0,001707	0,117
9 4 0	0,001847	0,127
10 4 0	0,001779	0,138
11 4 0	0,001540	0,148
12 4 0	0,001208	0,159
13 4 0	0,000864	0,170
14 4 0	0,000567	0,181
15 4 0	0,000343	0,192
7 5 0	0,000269	0,116
8 5 0	0,000331	0,127
9 5 0	0,000359	0,137
10 5 0	0,000346	0,148
11 5 0	0,000299	0,158
12 5 0	0,000235	0,169
3 0 1	0,000270	0,038
4 0 1	0,000696	0,047
5 0 1	0,001418	0,057
6 0 1	0,002381	0,067
7 0 1	0,003389	0,077
8 0 1	0,004174	0,087
9 0 1	0,004518	0,098
10 0 1	0,004352	0,108
11 0 1	0,003767	0,118
12 0 1	0,002954	0,129
13 0 1	0,002113	0,140
14 0 1	0,001387	0,150
15 0 1	0,000839	0,161
16 0 1	0,000470	0,172
17 0 1	0,000245	0,184
3 1 1	0,000274	0,047
4 1 1	0,000705	0,057
5 1 1	0,001437	0,067
6 1 1	0,002412	0,077
7 1 1	0,003434	0,087
8 1 1	0,004229	0,097
9 1 1	0,004578	0,107

N.C.	PROBABILITE	N.P.P.
10 1 1	0,004410	0,118
11 1 1	0,003817	0,128
12 1 1	0,002993	0,139
13 1 1	0,002141	0,150
14 1 1	0,001405	0,161
15 1 1	0,000851	0,172
16 1 1	0,000477	0,183
17 1 1	0,000248	0,194
4 2 1	0,000354	0,067
5 2 1	0,000720	0,076
6 2 1	0,001209	0,087
7 2 1	0,001722	0,097
8 2 1	0,002120	0,107
9 2 1	0,002295	0,117
10 2 1	0,002211	0,128
11 2 1	0,001914	0,138
12 2 1	0,001501	0,149
13 2 1	0,001074	0,160
14 2 1	0,000705	0,171
15 2 1	0,000426	0,182
16 2 1	0,000239	0,193
5 3 1	0,000238	0,086
6 3 1	0,000400	0,096
7 3 1	0,000569	0,106
8 3 1	0,000701	0,117
9 3 1	0,000759	0,127
10 3 1	0,000731	0,138
11 3 1	0,000633	0,148
12 3 1	0,000496	0,159
13 3 1	0,000355	0,170
14 3 1	0,000233	0,181
8 0 2	0,000208	0,097
9 0 2	0,000225	0,107
10 0 2	0,000217	0,118
8 1 2	0,000211	0,107
9 1 2	0,000228	0,117
10 1 2	0,000220	0,128

PROBABILITE D'OBTENIR UN N.C. POUR UNE DENSITE VIRALE d = 0,145

N.C.	PROBABILITE	N.P.P.
6 0 0	0,002607	0,057
7 0 0	0,005230	0,067
8 0 0	0,009079	0,078
9 0 0	0,013853	0,088
10 0 0	0,018805	0,098
11 0 0	0,022942	0,108
12 0 0	0,025357	0,119
13 0 0	0,025566	0,130
14 0 0	0,023651	0,140
15 0 0	0,020175	0,151
16 0 0	0,015937	0,162
17 0 0	0,011703	0,173
18 0 0	0,008014	0,185
19 0 0	0,005134	0,196
20 0 0	0,003084	0,207
21 0 0	0,001742	0,219
6 1 0	0,003655	0,067
7 1 0	0,007333	0,077
8 1 0	0,012731	0,087
9 1 0	0,019423	0,098
10 1 0	0,026368	0,108
11 1 0	0,032167	0,118
12 1 0	0,035554	0,129
13 1 0	0,035847	0,140
14 1 0	0,033162	0,151
15 1 0	0,028288	0,161
16 1 0	0,022346	0,172
17 1 0	0,016409	0,184
18 1 0	0,011237	0,195
19 1 0	0,007198	0,206
20 1 0	0,004325	0,218
21 1 0	0,002442	0,230
6 2 0	0,002915	0,077
7 2 0	0,005848	0,087
8 2 0	0,010151	0,097

N.C.	PROBABILITE	N.P.P.
9 2 0	0,015488	0,107
10 2 0	0,021025	0,118
11 2 0	0,025650	0,128
12 2 0	0,028350	0,139
13 2 0	0,028584	0,150
14 2 0	0,026443	0,161
15 2 0	0,022556	0,172
16 2 0	0,017818	0,183
17 2 0	0,013084	0,194
18 2 0	0,008961	0,205
19 2 0	0,005740	0,217
20 2 0	0,003448	0,228
21 2 0	0,001947	0,240
7 3 0	0,002328	0,097
8 3 0	0,004042	0,107
9 3 0	0,006167	0,117
10 3 0	0,008372	0,128
11 3 0	0,010213	0,138
12 3 0	0,011288	0,149
13 3 0	0,011381	0,160
14 3 0	0,010529	0,171
15 3 0	0,008981	0,182
16 3 0	0,007095	0,193
17 3 0	0,005210	0,204
18 3 0	0,003568	0,216
19 3 0	0,002286	0,227
9 4 0	0,002094	0,127
10 4 0	0,002843	0,138
11 4 0	0,003468	0,148
12 4 0	0,003833	0,159
13 4 0	0,003865	0,170
14 4 0	0,003575	0,181
15 4 0	0,003050	0,192
16 4 0	0,002409	0,203
17 4 0	0,001769	0,215

N.C.			PROBABILITE	N.P.P.
9	0	1	0,001930	0,098
10	0	1	0,002620	0,108
11	0	1	0,003196	0,118
12	0	1	0,003532	0,129
13	0	1	0,003561	0,140
14	0	1	0,003295	0,150
15	0	1	0,002810	0,161
16	0	1	0,002220	0,172
8	1	1	0,001773	0,097
9	1	1	0,002706	0,107
10	1	1	0,003673	0,118
11	1	1	0,004481	0,128
12	1	1	0,004953	0,139
13	1	1	0,004994	0,150
14	1	1	0,004620	0,161
15	1	1	0,003941	0,172
16	1	1	0,003113	0,183
17	1	1	0,002286	0,194
9	2	1	0,001877	0,117
10	2	1	0,002548	0,128
11	2	1	0,003109	0,138
12	2	1	0,003436	0,149
13	2	1	0,003464	0,160
14	2	1	0,003205	0,171
15	2	1	0,002734	0,182
16	2	1	0,002160	0,193

PROBABILITE D'OBTENIR UN N.C. POUR UNE DENSITE VIRALE d = 1,45

(N.C. correspondant à la 3ème dilution égale à zéro)

N.C.			PROBABILITE	N.P.P.
71	5	0	0,000098	1,188
72	5	0	0,000111	1,219
73	5	0	0,000120	1,250
74	5	0	0,000121	1,282
75	5	0	0,000116	1,315
76	5	0	0,000105	1,349
68	6	0	0,000117	1,120
69	6	0	0,000155	1,148
70	6	0	0,000195	1,177
71	6	0	0,000233	1,207
72	6	0	0,000264	1,237
73	6	0	0,000283	1,269
74	6	0	0,000287	1,302
75	6	0	0,000275	1,335
76	6	0	0,000248	1,370
77	6	0	0,000210	1,406
78	6	0	0,000167	1,443
79	6	0	0,000124	1,482
67	7	0	0,000115	1,110
68	7	0	0,000168	1,138
69	7	0	0,000234	1,166
70	7	0	0,000310	1,195
71	7	0	0,000391	1,225
72	7	0	0,000467	1,256
73	7	0	0,000529	1,288
74	7	0	0,000567	1,321
75	7	0	0,000575	1,355
76	7	0	0,000551	1,391
77	7	0	0,000497	1,427
78	7	0	0,000421	1,465
79	7	0	0,000335	1,504
80	7	0	0,000249	1,545
81	7	0	0,000173	1,588
82	7	0	0,000111	1,632
65	8	0	0,000131	1,074

N.C.			PROBABILITE	N.P.P.
66	8	0	0,000200	1,100
67	8	0	0,000292	1,128
68	8	0	0,000407	1,156
69	8	0	0,000539	1,184
70	8	0	0,000678	1,214
71	8	0	0,000810	1,244
72	8	0	0,000918	1,276
73	8	0	0,000985	1,308
74	8	0	0,000999	1,341
75	8	0	0,000956	1,376
76	8	0	0,000862	1,411
77	8	0	0,000731	1,448
78	8	0	0,000581	1,487
79	8	0	0,000432	1,527
80	8	0	0,000299	1,568
81	8	0	0,000193	1,611
82	8	0	0,000115	1,657
64	9	0	0,000124	1,065
65	9	0	0,000199	1,091
66	9	0	0,000305	1,118
67	9	0	0,000446	1,145
68	9	0	0,000621	1,173
69	9	0	0,000822	1,202
70	9	0	0,001035	1,232
71	9	0	0,001236	1,263
72	9	0	0,001401	1,295
73	9	0	0,001503	1,327
74	9	0	0,001524	1,361
75	9	0	0,001459	1,396
76	9	0	0,001315	1,432
77	9	0	0,001115	1,470
78	9	0	0,000886	1,509
79	9	0	0,000659	1,549
80	9	0	0,000457	1,591
81	9	0	0,000294	1,635

N.C.			PROBABILITE	N.P.P.
82	9	0	0,000176	1,681
83	9	0	0,000097	1,729
63	10	0	0,000100	1,056
64	10	0	0,000168	1,082
65	10	0	0,000270	1,108
66	10	0	0,000414	1,135
67	10	0	0,000606	1,163
68	10	0	0,000843	1,191
69	10	0	0,001116	1,221
70	10	0	0,001405	1,251
71	10	0	0,001678	1,282
72	10	0	0,001902	1,314
73	10	0	0,002040	1,347
74	10	0	0,002069	1,381
75	10	0	0,001981	1,417
76	10	0	0,001786	1,453
77	10	0	0,001514	1,491
78	10	0	0,001203	1,531
79	10	0	0,000894	1,572
80	10	0	0,000620	1,615
81	10	0	0,000400	1,659
82	10	0	0,000239	1,706
83	10	0	0,000131	1,755
63	11	0	0,000122	1,072
64	11	0	0,000205	1,098
65	11	0	0,000330	1,125
66	11	0	0,000506	1,152
67	11	0	0,000739	1,180
68	11	0	0,001028	1,209
69	11	0	0,001361	1,239
70	11	0	0,001714	1,269
71	11	0	0,002048	1,301
72	11	0	0,002320	1,333
73	11	0	0,002489	1,367
74	11	0	0,002524	1,402

N.C.			PROBABILITE	N.P.P.
75	11	0	0,002416	1,438
76	11	0	0,002179	1,475
77	11	0	0,001846	1,513
78	11	0	0,001468	1,553
79	11	0	0,001091	1,595
80	11	0	0,000757	1,638
81	11	0	0,000488	1,684
82	11	0	0,000291	1,731
83	11	0	0,000160	1,780
63	12	0	0,000135	1,089
64	12	0	0,000227	1,115
65	12	0	0,000365	1,142
66	12	0	0,000559	1,170
67	12	0	0,000817	1,198
68	12	0	0,001136	1,227
69	12	0	0,001505	1,257
70	12	0	0,001894	1,288
71	12	0	0,002263	1,320
72	12	0	0,002564	1,353
73	12	0	0,002751	1,387
74	12	0	0,002790	1,422
75	12	0	0,002671	1,458
76	12	0	0,002408	1,496
77	12	0	0,002041	1,535
78	12	0	0,001622	1,576
79	12	0	0,001206	1,618
80	12	0	0,000836	1,662
81	12	0	0,000539	1,708
82	12	0	0,000322	1,756
83	12	0	0,000177	1,806
63	13	0	0,000136	1,106
64	13	0	0,000229	1,132
65	13	0	0,000368	1,159
66	13	0	0,000564	1,187
67	13	0	0,000823	1,216

N.C.			PROBABILITE	N.P.P.
68	13	0	0,001146	1,245
69	13	0	0,001517	1,276
70	13	0	0,001910	1,307
71	13	0	0,002282	1,339
72	13	0	0,002585	1,373
73	13	0	0,002774	1,407
74	13	0	0,002813	1,443
75	13	0	0,002693	1,479
76	13	0	0,002428	1,518
77	13	0	0,002058	1,557
78	13	0	0,001636	1,598
79	13	0	0,001216	1,641
80	13	0	0,000843	1,686
81	13	0	0,000544	1,733
82	13	0	0,000324	1,781
83	13	0	0,000179	1,833
63	14	0	0,000126	1,122
64	14	0	0,000212	1,149
65	14	0	0,000340	1,177
66	14	0	0,000521	1,205
67	14	0	0,000762	1,234
68	14	0	0,001060	1,264
69	14	0	0,001404	1,294
70	14	0	0,001767	1,326
71	14	0	0,002111	1,359
72	14	0	0,002392	1,392
73	14	0	0,002566	1,427
74	14	0	0,002602	1,463
75	14	0	0,002491	1,500
76	14	0	0,002246	1,539
77	14	0	0,001904	1,579
78	14	0	0,001513	1,621
79	14	0	0,001125	1,665
80	14	0	0,000780	1,710
81	14	0	0,000503	1,757

N.C.			PROBABILITE	N.P.P.
82	14	0	0,000300	1,807
83	14	0	0,000165	1,859
63	15	0	0,000107	1,139
64	15	0	0,000181	1,166
65	15	0	0,000290	1,194
66	15	0	0,000445	1,223
67	15	0	0,000650	1,252
68	15	0	0,000904	1,282
69	15	0	0,001197	1,313
70	15	0	0,001507	1,345
71	15	0	0,001801	1,378
72	15	0	0,002040	1,412
73	15	0	0,002189	1,447
74	15	0	0,002220	1,484
75	15	0	0,002125	1,522
76	15	0	0,001916	1,561
77	15	0	0,001624	1,602
78	15	0	0,001291	1,644
79	15	0	0,000960	1,688
80	15	0	0,000665	1,734
81	15	0	0,000429	1,782
82	15	0	0,000256	1,833
83	15	0	0,000141	1,886
64	16	0	0,000143	1,183
65	16	0	0,000229	1,211
66	16	0	0,000351	1,240
67	16	0	0,000513	1,270
68	16	0	0,000714	1,300
69	16	0	0,000946	1,332
70	16	0	0,001190	1,364
71	16	0	0,001422	1,398
72	16	0	0,001612	1,432
73	16	0	0,001729	1,468
74	16	0	0,001754	1,505
75	16	0	0,001678	1,543

N.C			PROBABILITE	N.P.P.
76	16	0	0,001513	1,583
77	16	0	0,001283	1,624
78	16	0	0,001020	1,667
79	16	0	0,000758	1,712
80	16	0	0,000526	1,759
81	16	0	0,000339	1,808
82	16	0	0,000202	1,859
83	16	0	0,000111	1,913
64	17	0	0,000105	1,201
65	17	0	0,000168	1,229
66	17	0	0,000258	1,258
67	17	0	0,000377	1,288
68	17	0	0,000524	1,319
69	17	0	0,000694	1,351
70	17	0	0,000874	1,383
71	17	0	0,001044	1,417
72	17	0	0,001183	1,452
73	17	0	0,001270	1,488
74	17	0	0,001288	1,526
75	17	0	0,001232	1,565
76	17	0	0,001111	1,605
77	17	0	0,000942	1,647
78	17	0	0,000749	1,690
79	17	0	0,000557	1,736
80	17	0	0,000386	1,783
81	17	0	0,000249	1,833
82	17	0	0,000149	1,885
65	18	0	0,000115	1,247
66	18	0	0,000177	1,276
67	18	0	0,000258	1,306
68	18	0	0,000359	1,338
69	18	0	0,000476	1,370
70	18	0	0,000599	1,403
71	18	0	0,000715	1,437
72	18	0	0,000810	1,472

N.C.			PROBABILITE	N.P.P.
73	18	0	0,000869	1,509
74	18	0	0,000882	1,547
75	18	0	0,000844	1,586
76	18	0	0,000761	1,627
77	18	0	0,000645	1,669
78	18	0	0,000513	1,714
79	18	0	0,000381	1,760
80	18	0	0,000264	1,808
81	18	0	0,000170	1,859
82	18	0	0,000102	1,912
66	19	0	0,000113	1,294
67	19	0	0,000165	1,325
68	19	0	0,000230	1,356
69	19	0	0,000305	1,389
70	19	0	0,000383	1,422
71	19	0	0,000458	1,457
72	19	0	0,000519	1,493
73	19	0	0,000557	1,530
74	29	0	0,000565	1,568
75	19	0	0,000541	1,608
76	19	0	0,000488	1,649
77	19	0	0,000413	1,692
78	19	0	0,000328	1,737
79	19	0	0,000244	1,784
80	19	0	0,000169	1,833
81	19	0	0,000109	1,884
67	20	0	0,000099	1,343
68	20	0	0,000138	1,375
69	20	0	0,000183	1,408
70	20	0	0,000230	1,442
71	20	0	0,000275	1,477
72	20	0	0,000312	1,513
73	20	0	0,000335	1,551
74	20	0	0,000339	1,590
75	20	0	0,000325	1,630

N.C.			PROBABILITE	N.P.P.
76	20	0	0,000293	1,672
77	20	0	0,000248	1,716
78	20	0	0,000197	1,761
79	20	0	0,000147	1,809
80	20	0	0,000102	1,858
69	21	0	0,000103	1,427
70	21	0	0,000130	1,461
71	21	0	0,000155	1,497
72	21	0	0,000176	1,534
73	21	0	0,000189	1,572
74	21	0	0,000192	1,611
75	21	0	0,000183	1,652
76	21	0	0,000165	1,695
77	21	0	0,000140	1,739
78	21	0	0,000111	1,785
72	22	0	0,000094	1,554
73	22	0	0,000101	1,593
74	22	0	0,000102	1,633
75	22	0	0,000098	1,674

PROBABILITE D'OBTENIR UN N.C. POUR UNE DENSITE VIRALE d = 1,45

(N.C. correspondant à la 3ème dilution égale à un)

N.C.			PROBABILITE	N.P.P.
69	5	1	0,000092	1,147
70	5	1	0,000115	1,176
71	5	1	0,000138	1,206
72	5	1	0,000156	1,236
73	5	1	0,000168	1,268
74	5	1	0,000170	1,300
75	5	1	0,000163	1,334
76	5	1	0,000147	1,369
77	5	1	0,000124	1,405
78	5	1	0,000099	1,442
67	6	1	0,000118	1,109
68	6	1	0,000164	1,137
69	6	1	0,000217	1,165
70	6	1	0,000273	1,194
71	6	1	0,000326	1,224
72	6	1	0,000370	1,255
73	6	1	0,000397	1,287
74	6	1	0,000402	1,320
75	6	1	0,000385	1,354
76	6	1	0,000347	1,389
77	6	1	0,000294	1,426
78	6	1	0,000234	1,464
79	6	1	0,000174	1,503
80	6	1	0,000121	1,544
65	7	1	0,000105	1,073
66	7	1	0,000162	1,100
67	7	1	0,000236	1,127
68	7	1	0,000329	1,155
69	7	1	0,000435	1,183
70	7	1	0,000548	1,213
71	7	1	0,000655	1,243
72	7	1	0,000742	1,274
73	7	1	0,000796	1,307
74	7	1	0,000807	1,340
75	7	1	0,000772	1,375

N.C.			PROBABILITE	N.P.P.
76	7	1	0,000696	1,410
77	7	1	0,000590	1,447
78	7	1	0,000469	1,485
79	7	1	0,000349	1,525
80	7	1	0,000242	1,567
81	7	1	0,000156	1,610
82	7	1	0,000093	1,655
64	8	1	0,000114	1,064
65	8	1	0,000183	1,090
66	8	1	0,000281	1,117
67	8	1	0,000410	1,144
68	8	1	0,000571	1,172
69	8	1	0,000755	1,201
70	8	1	0,000951	1,231
71	8	1	0,001136	1,262
72	8	1	0,001287	1,294
73	8	1	0,001381	1,326
74	8	1	0,001401	1,360
75	8	1	0,001341	1,395
76	8	1	0,001209	1,431
77	8	1	0,001025	1,469
78	8	1	0,000814	1,507
79	8	1	0,000606	1,548
80	8	1	0,000420	1,590
81	8	1	0,000271	1,634
82	8	1	0,000162	1,679
63	9	1	0,000103	1,055
64	9	1	0,000174	1,081
65	9	1	0,000279	1,107
66	9	1	0,000428	1,134
67	9	1	0,000626	1,162
68	9	1	0,000870	1,190
69	9	1	0,001153	1,220
70	9	1	0,001451	1,250
71	9	1	0,001734	1,281

N.C.			PROBABILITE	N.P.P.
72	9	1	0,001964	1,313
73	9	1	0,002107	1,346
74	9	1	0,002137	1,380
75	9	1	0,002046	1,416
76	9	1	0,001844	1,452
77	9	1	0,001563	1,490
78	9	1	0,001243	1,530
79	9	1	0,000924	1,570
80	9	1	0,000641	1,613
81	9	1	0,000413	1,658
82	9	1	0,000246	1,704
83	9	1	0,000136	1,753
63	10	1	0,000140	1,072
64	10	1	0,000236	1,098
65	10	1	0,000379	1,124
66	10	1	0,000581	1,151
67	10	1	0,000849	1,179
68	10	1	0,001182	1,208
69	10	1	0,001565	1,238
70	10	1	0,001969	1,268
71	10	1	0,002353	1,300
72	10	1	0,002666	1,332
73	10	1	0,002861	1,366
74	10	1	0,002901	1,400
75	10	1	0,002777	1,436
76	10	1	0,002504	1,473
77	10	1	0,002122	1,512
78	10	1	0,001687	1,552
79	10	1	0,001254	1,593
80	10	1	0,000870	1,637
81	10	1	0,000561	1,682
82	10	1	0,000335	1,729
83	10	1	0,000184	1,778
84	10	1	0,000093	1,830
62	11	1	0,000097	1,063

N.C.			PROBABILITE	N.P.P.
63	11	1	0,000171	1,088
64	11	1	0,000288	1,114
65	11	1	0,000463	1,141
66	11	1	0,000709	1,169
67	11	1	0,001036	1,197
68	11	1	0,001442	1,226
69	11	1	0,001909	1,256
70	11	1	0,002403	1,287
71	11	1	0,002871	1,319
72	11	1	0,003253	1,352
73	11	1	0,003490	1,386
74	11	1	0,003539	1,421
75	11	1	0,003388	1,457
76	11	1	0,003055	1,495
77	11	1	0,002589	1,534
78	11	1	0,002058	1,574
79	11	1	0,001530	1,616
80	11	1	0,001061	1,660
81	11	1	0,000684	1,706
82	11	1	0,000408	1,754
83	11	1	0,000225	1,804
84	11	1	0,000113	1,857
62	12	1	0,000107	1,079
63	12	1	0,000189	1,105
64	12	1	0,000318	1,131
65	12	1	0,000511	1,158
66	12	1	0,000784	1,186
67	12	1	0,001145	1,215
68	12	1	0,001593	1,244
69	12	1	0,002110	1,275
70	12	1	0,002656	1,306
71	12	1	0,003173	1,338
72	12	1	0,003595	1,371
73	12	1	0,003857	1,406
74	12	1	0,003912	1,441

N.C.			PROBABILITE	N.P.P.
75	12	1	0,003744	1,478
76	12	1	0,003376	1,516
77	12	1	0,002862	1,556
78	12	1	0,002275	1,597
79	12	1	0,001691	1,640
80	12	1	0,001173	1,684
81	12	1	0,000756	1,731
82	12	1	0,000451	1,779
83	12	1	0,000248	1,831
84	12	1	0,000125	1,884
62	13	1	0,000108	1,096
63	13	1	0,000191	1,122
64	13	1	0,000321	1,148
65	13	1	0,000516	1,176
66	13	1	0,000790	1,204
67	13	1	0,001154	1,233
68	13	1	0,001607	1,263
69	13	1	0,002127	1,293
70	13	1	0,002677	1,325
71	13	1	0,003199	1,358
72	13	1	0,003625	1,391
73	13	1	0,003889	1,426
74	13	1	0,003944	1,462
75	13	1	0,003775	1,499
76	13	1	0,003404	1,538
77	13	1	0,002885	1,578
78	13	1	0,002293	1,619
79	13	1	0,001705	1,663
80	13	1	0,001182	1,708
81	13	1	0,000762	1,755
82	13	1	0,000455	1,805
83	13	1	0,000250	1,857
84	13	1	0,000126	1,912
62	14	1	0,000100	1,112
63	14	1	0,000176	1,138

N.C.			PROBABILITE	N.P.P.
64	14	1	0,000297	1,165
65	14	1	0,000477	1,193
66	14	1	0,000731	1,222
67	14	1	0,001068	1,251
68	14	1	0,001486	1,281
69	14	1	0,001968	1,312
70	14	1	0,002477	1,344
71	14	1	0,002960	1,377
72	14	1	0,003354	1,411
73	14	1	0,003598	1,446
74	14	1	0,003649	1,483
75	14	1	0,003493	1,520
76	14	1	0,003149	1,559
77	14	1	0,002669	1,600
78	14	1	0,002122	1,642
79	14	1	0,001577	1,686
80	14	1	0,001094	1,732
81	14	1	0,000705	1,780
82	14	1	0,000421	1,831
83	14	1	0,000232	1,884
84	14	1	0,000117	1,939
63	15	1	0,000151	1,155
64	15	1	0,000253	1,183
65	15	1	0,000407	1,211
66	15	1	0,000623	1,239
67	15	1	0,000911	1,269
68	15	1	0,001268	1,299
69	15	1	0,001679	1,331
70	15	1	0,002113	1,363
71	15	1	0,002525	1,396
72	15	1	0,002861	1,431
73	15	1	0,003069	1,467
74	15	1	0,003112	1,503
75	15	1	0,002979	1,542
76	15	1	0,002686	1,581

N.C.			PROBABILITE	N.P.P.
77	15	1	0,002277	1,623
78	15	1	0,001810	1,665
79	15	1	0,001345	1,710
80	15	1	0,000933	1,751
81	15	1	0,000601	1,806
82	15	1	0,000359	1,857
83	15	1	0,000198	1,911
84	15	1	0,000100	1,967
63	16	1	0,000119	1,172
64	16	1	0,000200	1,200
65	16	1	0,000321	1,228
66	16	1	0,000493	1,257
67	16	1	0,000720	1,287
68	16	1	0,001001	1,318
69	16	1	0,001326	1,350
70	16	1	0,001669	1,382
71	16	1	0,001994	1,416
72	16	1	0,002260	1,451
73	16	1	0,002424	1,487
74	16	1	0,002459	1,524
75	16	1	0,002353	1,563
76	16	1	0,002122	1,603
77	16	1	0,001798	1,645
78	16	1	0,001430	1,689
79	16	1	0,001063	1,734
80	16	1	0,000737	1,781
81	16	1	0,000475	1,831
82	16	1	0,000284	1,883
83	16	1	0,000156	1,938
64	17	1	0,000147	1,217
65	17	1	0,000236	1,246
66	17	1	0,000362	1,275
67	17	1	0,000528	1,305
68	17	1	0,000735	1,336
69	17	1	0,000974	1,369

N.C.			PROBABILITE	N.P.P.
70	17	1	0,001226	1,402
71	17	1	0,001465	1,436
72	17	1	0,001659	1,471
73	17	1	0,001780	1,508
74	17	1	0,001805	1,545
75	17	1	0,001728	1,585
76	17	1	0,001558	1,625
77	17	1	0,001321	1,668
78	17	1	0,001050	1,712
79	17	1	0,000780	1,758
80	17	1	0,000541	1,806
81	17	1	0,000349	1,857
82	17	1	0,000208	1,909
83	17	1	0,000115	1,965
64	18	1	0,000101	1,234
65	18	1	0,000162	1,263
66	18	1	0,000248	1,293
67	18	1	0,000362	1,324
68	18	1	0,000504	1,355
69	18	1	0,000667	1,388
70	18	1	0,000839	1,421
71	18	1	0,001003	1,456
72	18	1	0,001136	1,491
73	18	1	0,001219	1,528
74	18	1	0,001236	1,567
75	18	1	0,001183	1,606
76	18	1	0,001067	1,648
77	18	1	0,000904	1,691
78	18	1	0,000719	1,736
79	18	1	0,000534	1,782
80	18	1	0,000371	1,831
81	18	1	0,000239	1,882
82	18	1	0,000143	1,936
65	19	1	0,000104	1,281
66	19	1	0,000159	1,311

N.C.			PROBABILITE	N.P.P.
67	19	1	0,000232	1,342
68	19	1	0,000323	1,374
69	19	1	0,000427	1,407
70	19	1	0,000538	1,441
71	19	1	0,000642	1,476
72	19	1	0,000728	1,512
73	19	1	0,000781	1,549
74	19	1	0,000792	1,588
75	19	1	0,000758	1,628
76	19	1	0,000684	1,670
77	19	1	0,000579	1,714
78	19	1	0,000461	1,759
79	19	1	0,000342	1,807
80	19	1	0,000237	1,856
81	19	1	0,000153	1,908
82	19	1	0,000091	1,963
66	20	1	0,000095	1,329
67	20	1	0,000139	1,361
68	20	1	0,000194	1,393
69	20	1	0,000257	1,426
70	20	1	0,000323	1,460
71	20	1	0,000386	1,496
72	20	1	0,000437	1,532
73	20	1	0,000469	1,570
74	20	1	0,000476	1,610
75	20	1	0,000455	1,650
76	20	1	0,000411	1,693
77	20	1	0,000348	1,737
78	20	1	0,000277	1,783
79	20	1	0,000206	1,831
80	20	1	0,000143	1,882
81	20	1	0,000092	1,935
68	21	1	0,000109	1,412
69	21	1	0,000145	1,445
70	21	1	0,000182	1,480

N.C.			PROBABILITE	N.P.P.
71	21	1	0,000218	1,516
72	21	1	0,000247	1,553
73	21	1	0,000265	1,591
74	21	1	0,000269	1,631
75	21	1	0,000257	1,673
76	21	1	0,000232	1,716
77	21	1	0,000197	1,760
78	21	1	0,000156	1,807
78	21	1	0,000116	1,856
70	22	1	0,000097	1,500
71	22	1	0,000116	1,536
72	22	1	0,000131	1,574
73	22	1	0,000141	1,613
74	22	1	0,000143	1,653
75	22	1	0,000137	1,695
76	22	1	0,000123	1,739
77	22	1	0,000105	1,784

PROBABILITE D'OBTENIR UN N.C. POUR UNE DENSITE VIRALE d = 1,45

(N.C. correspondant à la 3ème dilution égale à deux)

N.C.			PROBABILITE	N.P.P.
71	5	2	0,000096	1,223
72	5	2	0,000108	1,254
72	5	2	0,000116	1,286
74	5	2	0,000118	1,319
75	5	2	0,000113	1,353
76	5	2	0,000102	1,388
68	6	2	0,000114	1,154
69	6	2	0,000150	1,182
70	6	2	0,000189	1,212
71	6	2	0,000226	1,242
72	6	2	0,000256	1,273
73	6	2	0,000275	1,306
74	6	2	0,000279	1,339
75	6	2	0,000267	1,373
76	6	2	0,000241	1,409
77	6	2	0,000204	1,446
78	6	2	0,000162	1,484
79	6	2	0,000121	1,524
66	7	2	0,000112	1,116
67	7	2	0,000164	1,143
68	7	2	0,000228	1,172
69	7	2	0,000302	1,200
70	7	2	0,000380	1,230
71	7	2	0,000454	1,261
72	7	2	0,000514	1,283
73	7	2	0,000552	1,325
74	7	2	0,000560	1,359
75	7	2	0,000536	1,394
76	7	2	0,000483	1,430
77	7	2	0,000409	1,467
78	7	2	0,000325	1,506
79	7	2	0,000242	1,546
80	7	2	0,000168	1,588
81	7	2	0,000108	1,632
65	8	2	0,000127	1,106

N.C.			PROBABILITE	N.P.P.
66	8	2	0,000195	1,133
67	8	2	0,000284	1,161
68	8	2	0,000396	1,189
69	8	2	0,000524	1,219
70	8	2	0,000660	1,249
71	8	2	0,000788	1,280
72	8	2	0,000893	1,312
73	8	2	0,000958	1,345
74	8	2	0,000972	1,379
75	8	2	0,000930	1,414
76	8	2	0,000839	1,459
77	8	2	0,000711	1,489
78	8	2	0,000565	1,528
79	8	2	0,000420	1,569
80	8	2	0,000420	1,569
81	8	2	0,000188	1,656
82	8	2	0,000112	1,702
64	9	2	0,000121	1,097
65	9	2	0,000194	1,123
66	9	2	0,000297	1,151
67	9	2	0,000434	1,179
68	9	2	0,000604	1,207
69	9	2	0,000800	1,237
70	9	2	0,001006	1,267
71	9	2	0,001203	1,299
72	9	2	0,001363	1,331
73	9	2	0,001462	1,365
74	9	2	0,001483	1,399
75	9	2	0,001419	1,435
76	9	2	0,001280	1,472
77	9	2	0,001085	1,510
78	9	2	0,000862	1,550
79	9	2	0,000641	1,592
80	9	2	0,000444	1,635
81	9	2	0,000286	1,680

N.C.			PROBABILITE	N.P.P.
82	9	2	0,000171	1,727
83	9	2	0,000094	1,777
63	10	2	0,000097	1,087
64	10	2	0,000164	1,114
65	10	2	0,000263	1,140
66	10	2	0,000403	1,168
67	10	2	0,000589	1,196
68	10	2	0,000820	1,225
69	10	2	0,001086	1,255
70	10	2	0,001366	1,286
71	10	2	0,001633	1,318
72	10	2	0,001850	1,351
73	10	2	0,001985	1,385
74	10	2	0,002013	1,420
75	10	2	0,001927	1,456
76	10	2	0,001737	1,493
77	10	2	0,001472	1,532
78	10	2	0,001170	1,573
79	10	2	0,000870	1,615
80	10	2	0,000603	1,659
81	10	2	0,000389	1,704
82	10	2	0,000232	1,752
83	10	2	0,000128	1,802
63	11	2	0,000119	1,104
64	11	2	0,000200	1,130
65	11	2	0,000321	1,158
66	11	2	0,000492	1,185
67	11	2	0,000719	1,214
68	11	2	0,001000	1,243
69	11	2	0,001324	1,274
70	11	2	0,001667	1,305
71	11	2	0,001992	1,337
72	11	2	0,002257	1,370
73	11	2	0,002421	1,405
74	11	2	0,002455	1,440

N.C.			PROBABILITE	N.P.P.
75	11	2	0,002350	1,477
76	11	2	0,002119	1,515
77	11	2	0,001796	1,554
78	11	2	0,001428	1,595
79	11	2	0,001061	1,638
80	11	2	0,000736	1,682
81	11	2	0,000474	1,729
82	11	2	0,000283	1,778
83	11	2	0,000156	1,829
63	12	2	0,000131	1,121
64	12	2	0,000221	1,147
65	12	2	0,000355	1,175
66	12	2	0,000544	1,203
67	12	2	0,000794	1,232
68	12	2	0,001105	1,262
69	12	2	0,001464	1,292
70	12	2	0,001842	1,324
71	12	2	0,00202	1,356
72	12	2	0,002494	1,390
73	12	2	0,002676	1,425
74	12	2	0,002714	1,461
75	12	2	0,002598	1,498
76	12	2	0,002342	1,536
77	12	2	0,001985	1,576
78	12	2	0,001578	1,618
79	12	2	0,001173	1,661
80	12	2	0,000814	1,706
81	12	2	0,000524	1,754
82	12	2	0,000313	1,803
83	12	2	0,000172	1,855
63	13	2	0,000132	1,138
64	13	2	0,000223	1,165
65	13	2	0,000358	1,192
66	13	2	0,000548	1,221
67	13	2	0,000801	1,250

N.C.			PROBABILITE	N.P.P.
68	13	2	0,001115	1,280
69	13	2	0,001476	1,311
70	13	2	0,001858	1,343
71	13	2	0,002220	1,376
72	13	2	0,002515	1,410
73	13	2	0,002698	1,445
74	13	2	0,002738	1,481
75	13	2	0,002619	1,519
76	13	2	0,002362	1,558
77	13	2	0,002002	1,599
78	13	2	0,001591	1,641
79	13	2	0,001183	1,685
80	13	2	0,000820	1,731
81	13	2	0?000529	1,779
82	13	2	0,000316	1,829
83	13	2	0,000174	1,882
63	14	2	0,000122	1,154
64	14	2	0,000206	1,182
65	14	2	0,000331	1,210
66	14	2	0,000507	1,238
67	14	2	0,000741	1,268
68	14	2	0,0001031	1,298
69	14	2	0,001365	1,330
70	14	2	0,001718	1,362
71	14	2	0,002053	1,395
72	14	2	0,002327	1,430
73	12	2	0,002496	1,465
74	14	2	0,002531	1,502
75	14	2	0,002423	1,540
76	14	2	0,002185	1,580
77	14	2	0,001852	1,621
78	14	2	0,001472	1,664
79	14	2	0,001094	1,708
80	14	2	0,000759	1,755
81	14	2	0,000489	1,809

N.C.			PROBABILITE	N.P.P.
82	14	2	0,000292	1,855
83	14	2	0,000161	1,908
63	15	2	0,000104	1,171
64	15	2	0,000176	1,199
65	12	2	0,000282	1,227
66	15	2	0,000433	1,256
67	15	2	0,000632	1,286
68	15	2	0,000880	1,317
69	15	2	0,001165	1,342
70	15	2	0,001466	1,381
71	15	2	0,001752	1,415
72	15	2	0,001985	1,450
73	15	2	0,002129	1,486
74	15	2	0,002159	1,523
75	15	2	0,002067	1,562
76	15	2	0,001864	1,602
77	15	2	0,001580	1,644
78	15	2	0,001255	1,687
79	15	2	0,000933	1,732
80	15	2	0,000647	1,180
81	15	2	0,000417	1,829
82	15	2	0,000249	1,881
83	15	2	0,000137	1,935
64	16	2	0,000139	1,216
65	16	2	0,000223	1,245
66	16	2	0,000342	1,274
67	16	2	0,000499	1,304
68	16	2	0,000695	1,335
69	16	2	0,000920	1,367
70	16	2	0,001158	1,400
71	16	2	0,001384	1,435
72	16	2	0,001568	1,470
73	16	2	0,001682	1,506
74	16	2	0,001706	1,544
75	16	2	0,001633	1,583

N.C.			PROBABILITE	N.P.P.
76	16	2	0,001472	1,624
77	16	2	0,001248	1,666
78	16	2	0,000992	1,710
79	16	2	0,000737	1,756
80	16	2	0,000511	1,804
81	16	2	0,000330	1,855
82	16	2	0,000197	1,907
83	16	2	0,000108	1,963
64	17	2	0,000102	1,233
65	17	2	0,000164	1,262
66	17	2	0,000251	1,292
67	17	2	0,000367	1,323
68	17	2	0,000510	1,354
69	17	2	0,000676	1,386
70	17	2	0,000850	1,420
71	17	2	0,001016	1,454
72	17	2	0,001151	1,490
73	17	2	0,001235	1,527
74	17	2	0,001253	1,565
75	17	2	0,001199	1,605
76	17	2	0,001081	1,646
77	17	2	0,000916	1,689
78	17	2	0,000728	1,734
79	17	2	0,000541	1,780
80	17	2	0,000375	1,829
81	17	2	0,000242	1,880
82	17	2	0,000144	1,934
65	18	2	0,000112	1,280
66	18	2	0,000172	1,310
67	18	2	0,000251	1,341
68	18	2	0,000349	1,373
69	18	2	0,000463	1,406
70	18	2	0,000582	1,439
71	18	2	0,000696	1,474
72	18	2	0,000788	1,510

N.C.			PROBABILITE	N.P.P.
73	18	2	0,000846	1,548
74	18	2	0,000858	1,587
75	18	2	0,000821	1,627
76	18	2	0,000740	1,669
77	18	2	0,000627	1,712
78	18	2	0,000499	1,758
79	18	2	0,000371	1,805
80	18	2	0,000257	1,884
81	18	2	0,000166	1,906
82	18	2	0,000099	1,961
66	19	2	0,000110	1,328
67	19	2	0,000161	1,359
68	19	2	0,000224	1,392
69	19	2	0,000296	1,425
70	19	2	0,000373	1,459
71	19	2	0,000446	1,494
72	19	2	0,000505	1,531
73	19	2	0,000542	1,569
74	19	2	0,000549	1,608
75	19	2	0,000526	1,649
76	19	2	0,000474	1,691
77	19	2	0,000402	1,735
78	19	2	0,000319	1,781
79	19	2	0,000238	1,829
80	19	2	0,000165	1,880
81	19	2	0,000106	1,932
67	20	2	0,000097	1,378
68	20	2	0,000134	1,411
69	20	2	0,000178	1,444
70	20	2	0,000224	1,479
71	20	2	0,000268	1,514
72	20	2	0,000303	1,552
73	20	2	0,000325	1,590
74	20	2	0,000330	1,630
75	20	2	0,000316	1,671

N.C.			PROBABILITE	N.P.P.
76	20	2	0,000285	1,714
77	20	2	0,000241	1,759
78	20	2	0,000192	1,805
79	20	2	0,000143	1,854
80	20	2	0,000099	1,905
69	20	2	0,000101	1,463
70	21	2	0,000127	1,499
71	21	2	0,000151	1,535
72	21	2	0,000171	1,572
73	21	2	0,000184	1,611
74	21	2	0,000186	1,651
75	21	2	0,000178	1,693
76	21	2	0,000161	1,737
77	21	3	0,000136	1,782
78	21	2	0,000108	1,830
72	22	2	0,000091	1,593
73	22	2	0,000098	1,632
74	22	2	0,000099	1,673
75	22	2	0,000095	1,716

PROBABILITE D'OBTENIR UN N.C. POUR UNE DENSITE VIRALE d = 1,45

(N.C. correspondant à la 3ème dilution égale à trois)

N.C.			PROBABILITE	N.P.P.
71	6	3	0,000104	1,260
72	6	3	0,000117	1,291
73	6	3	0,000126	1,324
74	6	3	0,000128	1,358
75	6	3	0,000122	1,393
76	6	3	0,000110	1,429
77	6	3	0,000093	1,466
68	7	3	0,000104	1,188
69	7	3	0,000138	1,218
70	7	3	0,000174	1,248
71	7	3	0,000208	1,279
72	7	3	0,000235	1,311
73	7	3	0,000253	1,344
74	7	3	0,000256	1,378
75	7	3	0,000245	1,413
76	7	3	0,000221	1,450
77	7	3	0,000187	1,487
78	7	3	0,000149	1,527
79	7	3	0,000111	1,567
67	8	3	0,000130	1,178
68	8	3	0,000181	1,206
69	8	3	0,000240	1,236
70	8	3	0,000302	1,266
71	8	3	0,000361	1,298
72	8	3	0,000409	1,330
73	8	3	0,000438	1,363
74	8	3	0,000445	1,398
75	8	3	0,000426	1,434
76	8	3	0,000384	1,471
77	8	3	0,000325	1,509
78	8	3	0,000259	1,549
79	8	3	0,000192	1,590
80	8	3	0,000133	1,633
66	9	3	0,000136	1,167
67	9	3	0,000199	1,195
68	9	3	0,000276	1,224

N.C.			PROBABILITE	N.P.P.
69	9	3	0,000366	1,254
70	9	3	0,000461	1,285
71	9	3	0,000550	1,317
72	9	3	0,000624	1,350
73	9	3	0,000669	1,383
74	9	3	0,000679	1,418
75	9	3	0,000649	1,454
76	9	3	0,000586	1,492
77	9	3	0,000496	1,531
78	9	3	0,000395	1,571
79	9	3	0,000293	1,613
80	9	3	0,000203	1,657
81	9	3	0,000131	1,703
65	10	3	0,000120	1,157
66	10	3	0,000185	1,185
67	10	3	0,000270	1,213
68	10	3	0,000375	1,242
69	10	3	0,000497	1,273
70	10	3	0,000625	1,304
71	10	3	0,000747	1,336
72	10	3	0,000847	1,369
73	10	3	0,000908	1,403
74	10	3	0,000921	1,439
75	10	3	0,000882	1,475
76	10	3	0,000795	1,513
77	10	3	0,000674	1,553
78	10	3	0,000536	1,594
79	10	3	0,000398	1,636
80	10	3	0,000276	1,681
81	10	3	0,000178	1,727
82	10	3	0,000106	1,770
64	11	3	0,000091	1,147
65	11	3	0,000147	1,174
66	11	3	0,000225	1,202
67	11	3	0,000329	1,231
68	11	3	0,000458	1,261

N.C.			PROBABILITE	N.P.P.
69	11	3	0,000606	1,291
70	11	3	0,000763	1,323
71	11	3	0,000912	1,355
72	11	3	0,001033	1,389
73	11	3	0,001108	1,423
74	11	3	0,001124	1,459
75	11	3	0,001076	1,496
76	11	3	0,000970	1,535
77	11	3	0,000822	1,575
78	11	3	0,000653	1,616
79	11	3	0,000486	1,660
80	11	3	0,000337	1,705
81	11	3	0,000217	1,752
82	11	3	0,000130	1,801
64	12	3	0,000101	1,164
65	12	3	0,000162	1,191
66	12	3	0,000249	1,220
67	12	3	0,000364	1,249
68	12	3	0,000506	1,279
69	12	3	0,000670	1,310
70	12	3	0,000843	1,342
71	12	3	0,001008	1,375
72	12	3	0,001142	1,409
73	12	3	0,001225	1,444
74	12	3	0,001242	1,480
75	12	3	0,001189	1,518
76	12	3	0,001072	1,557
77	12	3	0,000909	1,597
78	12	3	0,000722	1,639
79	12	3	0,000537	1,683
80	12	3	0,000372	1,729
81	12	3	0,000240	1,777
82	12	3	0,000143	1,827
64	13	3	0,000102	1,181
65	13	3	0,000164	1,209

N.C.			PROBABILITE	N.P.P.
66	13	3	0,000251	1,237
67	13	3	0,000367	1,267
68	13	3	0,000510	1,297
69	13	3	0,000675	1,329
70	13	3	0,000850	1,361
71	13	3	0,001016	1,394
72	13	3	0,001151	1,428
73	13	3	0,001235	1,464
74	13	3	0,001252	1,501
75	13	3	0,001199	1,539
76	13	3	0,001081	1,578
77	13	3	0,000916	1,619
78	13	3	0,000728	1,662
79	13	3	0,000541	1,707
80	13	3	0,000375	1,753
81	13	3	0,000242	1,802
82	13	3	0,000144	1,853
64	14	3	0,000094	1,198
65	14	3	0,000151	1,226
66	14	3	0,000232	1,255
67	14	3	0,000339	1,285
68	14	3	0,000472	1,316
69	14	3	0,000625	1,347
70	14	3	0,000786	1,380
71	14	3	0,000940	1,414
72	14	3	0,001065	1,448
73	14	3	0,001142	1,484
74	14	3	0,001158	1,522
75	14	3	0,001109	1,560
76	14	3	0,001000	1,600
77	14	3	0,000847	1,642
78	14	3	0,000674	1,685
79	14	3	0,000501	1,730
80	14	3	0,000347	1,778
81	14	3	0,000224	1,827

N.C.			PROBABILITE	N.P.P.
82	14	3	0,000134	1,879
65	15	3	0,000129	1,244
66	15	3	0,000198	1,273
67	15	3	0,000289	1,303
68	15	3	0,000403	1,334
69	15	3	0,000533	1,366
70	15	3	0,000671	1,399
71	15	3	0,000802	1,433
72	15	3	0,000908	1,469
73	15	3	0,000974	1,505
74	15	3	0,000988	1,543
75	15	3	0,000946	1,582
76	15	3	0,000853	1,622
77	15	3	0,000723	1,665
78	15	3	0,000575	1,709
79	15	3	0,000427	1,754
80	15	3	0,000296	1,802
81	15	3	0,000191	1,853
82	15	3	0,000114	1,905
65	16	3	0,000102	1,261
66	16	3	0,000156	1,291
67	16	3	0,000228	1,322
68	16	3	0,000318	1,353
69	16	3	0,000421	1,385
70	16	3	0,000530	1,419
71	16	3	0,000633	1,453
72	16	3	0,000717	1,489
73	16	3	0,000770	1,526
74	16	3	0,000781	1,564
75	16	3	0,000747	1,603
76	16	3	0,000674	1,645
77	16	3	0,000571	1,687
78	16	3	0,000454	1,732
79	16	3	0,000337	1,779
80	16	3	0,000234	1,827
81	16	3	0,000151	1,878

N.C.			PROBABILITE	N.P.P.
66	17	3	0,000115	1,309
67	17	3	0,000168	1,340
68	17	3	0,000233	1,372
69	17	3	0,000309	1,404
70	17	3	0,000389	1,438
71	17	3	0,000465	1,473
72	17	3	0,000527	1,509
73	17	3	0,000565	1,546
74	17	3	0,000573	1,585
75	17	3	0,000549	1,625
76	17	3	0,000495	1,667
77	17	3	0,000419	1,710
78	17	3	0,000333	1,756
79	17	3	0,000248	1,803
80	17	3	0,000172	1,852
81	17	3	0,000111	1,904
67	18	3	0,000115	1,358
68	18	3	0,000160	1,390
69	18	3	0,000212	1,424
70	18	3	0,000266	1,458
71	18	3	0,000318	1,493
72	18	3	0,000361	1,530
73	18	3	0,000387	1,567
74	18	3	0,000393	1,607
75	18	3	0,000376	1,647
76	18	3	0,000339	1,690
77	18	3	0,000287	1,734
78	18	3	0,000228	1,780
79	18	3	0,000170	1,828
80	18	3	0,000118	1,878
68	19	3	0,000102	1,409
69	19	3	0,000136	1,443
70	19	3	0,000171	1,477
71	19	3	0,000204	1,513
72	19	3	0,000231	1,550
73	19	3	0,000248	1,588

N.C.			PROBABILITE	N.P.P.
74	19	3	0,000251	1,628
75	19	3	0,000241	1,669
76	19	3	0,000217	1,712
77	19	3	0,000184	1,757
78	19	3	0,000146	1,804
79	19	3	0,000109	1,852
70	20	3	0,000103	1,497
71	20	3	0,000123	1,533
72	20	3	0,000139	1,571
73	20	3	0,000149	1,610
74	20	3	0,000151	1,650
75	20	3	0,000145	1,692
76	20	3	0,000130	1,735
77	20	3	0,000111	1,780

PROBABILITE D'OBTENIR UN N.C. POUR UNE DENSITE VIRALE d = 1,45

(N.C. correspondant à la 3ème dilution égale à quatre)

N.C.			PROBABILITE	N.P.P.
70	8	4	0,000103	1,284
71	8	4	0,000123	1,316
72	8	4	0,000139	1,348
73	8	4	0,000149	1,382
74	8	4	0,000151	1,417
75	8	4	0,000145	1,453
76	8	4	0,000130	1,491
77	8	4	0,000110	1,529
68	9	4	0,000094	1,242
69	9	4	0,000124	1,272
70	9	4	0,000156	1,303
71	9	4	0,000187	1,335
72	9	4	0,000212	1,368
73	9	4	0,000227	1,402
74	9	4	0,000230	1,437
75	9	4	0,000221	1,474
76	9	4	0,000199	1,512
77	9	4	0,000169	1,551
78	9	4	0,000134	1,592
79	9	4	0,000100	1,635
67	10	4	0,000092	1,230
68	10	4	0,000127	1,260
69	10	4	0,000169	1,290
70	10	4	0,000212	1,322
71	10	4	0,000254	1,354
72	10	4	0,000287	1,388
73	10	4	0,000308	1,422
74	10	4	0,000313	1,458
75	10	4	0,000299	1,495
76	10	4	0,000270	1,533
77	10	4	0,000229	1,573
78	10	4	0,000182	1,615
79	10	4	0,000135	1,658
80	10	4	0,000094	1,703

N.C.			PROBABILITE	N.P.P.
67	11	4	0,000112	1,248
68	11	4	0,000155	1,278
69	11	4	0,000206	1,309
70	11	4	0,000259	1,341
71	11	4	0,000310	1,373
72	11	4	0,000351	1,407
73	11	4	0,000376	1,442
74	11	4	0,000382	1,479
75	11	4	0,000365	1,516
76	11	4	0,000329	1,555
77	11	4	0,000279	1,595
78	11	4	0,000222	1,638
79	11	4	0,000165	1,681
80	11	4	0,000114	1,727
67	12	4	0,000123	1,266
68	12	4	0,000172	1,296
69	12	4	0,000227	1,327
70	12	4	0,000286	1,360
71	12	4	0,000342	1,393
72	12	4	0,000388	1,427
73	12	4	0,000416	1,463
74	12	4	0,000422	1,499
75	12	4	0,000404	1,537
76	12	4	0,000364	1,577
77	12	4	0,000309	1,618
78	12	4	0,000245	1,660
79	12	4	0,000182	1,705
80	12	4	0,000126	1,751
67	13	4	0,000124	1,284
68	13	4	0,000173	1,315
69	13	4	0,000229	1,346
70	13	4	0,000289	1,379
71	13	4	0,000345	1,412

N.C.			PROBABILITE	N.P.P.
72	13	4	0,000391	1,447
73	13	4	0,000419	1,483
74	13	4	0,000425	1,520
75	13	4	0,000407	1,559
76	13	4	0,000367	1,599
77	13	4	0,000311	1,640
78	13	4	0,000247	1,684
79	13	4	0,000184	1,729
80	13	4	0,000127	1,776
67	14	4	0,000115	1,302
68	14	4	0,000160	1,333
69	14	4	0,000212	1,365
70	14	4	0,000267	1,398
71	14	4	0,000319	1,432
72	14	4	0,000362	1,467
73	14	4	0,000388	1,504
74	14	4	0,000393	1,541
75	14	4	0,000377	1,580
76	14	4	0,000340	1,621
77	14	4	0,000288	1,663
78	14	4	0,000229	1,707
79	14	4	0,000170	1,753
80	14	4	0,000118	1,800
67	15	4	0,000098	1,320
68	15	4	0,000137	1,352
69	15	4	0,000181	1,384
70	15	4	0,000228	1,417
71	15	4	0,000272	1,452
72	15	4	0,000308	1,487
73	15	4	0,000331	1,524
74	15	4	0,000336	1,562
75	15	4	0,000321	1,602
76	15	4	0,000290	1,643
77	15	4	0,000245	1,686
78	15	4	0,000195	1,730

N.C.			PROBABILITE	N.P.P.
79	15	4	0,000145	1,777
80	15	4	0,000101	1,825
68	16	4	0,000108	1,371
69	16	4	0,000143	1,403
70	16	4	0,000180	1,437
71	16	4	0,000215	1,472
72	16	4	0,000244	1,508
73	16	4	0,000261	1,545
74	16	4	0,000265	1,584
75	16	4	0,000254	1,624
76	16	4	0,000229	1,665
77	16	4	0,000194	1,709
78	15	4	0,000154	1,754
79	16	4	0,000115	1,801
69	17	4	0,000105	1,422
70	17	4	0,000132	1,457
71	17	4	0,000158	1,492
72	17	4	0,000179	1,528
73	17	4	0,000192	1,566
74	17	4	0,000195	1,605
75	17	4	0,000186	1,646
76	17	4	0,000168	1,688
77	17	4	0,000142	1,732
78	17	4	0,000113	1,778
71	18	4	0,000108	1,512
72	18	4	0,000123	1,549
73	18	4	0,000131	1,587
74	18	4	0,000133	1,627
75	18	4	0,000128	1,668
76	18	4	0,000115	1,711
77	18	4	0,000098	1,755

PROBABILITE D'OBTENIR UN N.C. POUR UNE DENSITE VIRALE d = 1,45

(N.C. correspondant à la 3ème dilution égale à cinq)

N.C.			PROBABILITE	N.P.P.
72	11	5	0,000094	1,426
73	11	5	0,000101	1,461
74	11	5	0,000103	1,498
75	11	5	0,000098	1,536
71	12	5	0,000092	1,411
72	12	5	0,000104	1,446
73	12	5	0,000112	1,482
74	12	5	0,000113	1,519
75	12	5	0,000108	1,557
76	12	5	0,000098	1,597
71	13	5	0,000093	1,431
72	13	5	0,000105	1,466
73	13	5	0,000113	1,502
74	13	5	0,000114	1,540
75	13	5	0,000109	1,579
76	13	5	0,000099	1,619
72	14	5	0,000097	1,486
73	14	5	0,000104	1,523
74	14	5	0,000106	1,561
75	14	5	0,000101	1,601
76	14	5	0,000091	1,642

PROBABILITE D'OBTEBIR UN N.C. POUR UNE DENSITE VIRALE d = 14,5

N.C.	PROBABILITE	N.P.P.
96 83 12	0,00070	18,49
96 83 13	0,00071	18,76
96 82 09	0,00070	17,19
96 82 10	0,00095	17,44
96 82 11	0,00116	17,70
96 82 12	0,00128	17,96
96 82 13	0,00129	18,22
96 82 14	0,00119	18,49
96 82 15	0,00102	18,76
96 82 16	0,00080	19,03
96 81 08	0,00077	16,46
96 81 09	0,00118	16,71
96 81 10	0,00159	16,96
96 81 11	0,00195	17,21
96 81 12	0,00215	17,46
96 81 13	0,00216	17,71
96 81 14	0,00200	17,97
96 81 15	0,00171	18,23
96 81 16	0,00135	18,49
96 81 17	0,00099	18,75
96 81 18	0,00068	19,02
96 80 07	0,00069	15,78
96 80 08	0,00120	16,01
96 80 09	0,00183	16,25
96 80 10	0,00248	16,49
96 80 11	0,00302	16,73
96 80 12	0,00334	16,98
96 80 13	0,00336	17,23
96 80 14	0,00331	17,47
96 80 15	0,00265	17,72
96 80 16	0,00209	17,98
96 80 17	0,00153	18,23
96 80 18	0,00105	18,49
96 80 19	0,00067	18,75
96 79 07	0,00100	15,35
96 79 08	0,00173	15,58

N.C.	PROBABILITE	N.P.P.
96 79 09	0,00264	15,81
96 79 10	0,00358	16,05
96 79 11	0,00456	16,28
96 79 12	0,00482	16,52
96 79 13	0,00486	16,76
96 79 14	0,00449	17,00
96 79 15	0,00383	17,24
96 79 16	0,00302	17,49
96 79 17	0,00222	17,73
96 79 18	0,00152	17,98
96 79 19	0,00097	18,23
96 78 06	0,00067	14,72
96 78 07	0,00134	14,94
96 78 08	0,00233	15,17
96 78 09	0,00355	15,39
96 78 10	0,00482	15,62
96 78 11	0,00588	15,85
96 78 12	0,0649	16,08
96 78 13	0,00654	16,31
96 78 14	0,00605	16,55
96 78 15	0,00515	16,78
96 78 16	0,00407	17,02
96 78 17	0,00298	17,26
96 78 18	0,00204	17,50
96 78 19	0,00131	17,74
96 78 20	0,00078	17,99
96 77 06	0,00084	14,33
96 77 07	0,00169	14,55
96 77 08	0,00294	14,77
96 77 09	0,00448	14,99
96 77 10	0,00607	15,21
96 77 11	0,00740	15,43
96 77 12	0,00818	15,66
96 77 13	0,00824	15,88
96 77 14	0,00762	16,11
96 77 15	0,00649	16,34

N.C.	PROBABILITE	N.P.P.
96 77 16	0,00512	16,57
96 77 15	0,00376	16,81
96 77 16	0,00512	16,57
96 77 17	0,00376	16,81
96 77 18	0,00257	17,04
96 77 19	0,00165	17,28
96 77 20	0,00099	17,52
96 76 06	0,00100	13,96
96 76 07	0,00200	14,17
96 76 08	0,00347	14,38
96 76 09	0,00529	14,60
96 76 10	0,00718	14,82
96 76 11	0,00875	15,03
96 76 12	0,00966	15,25
96 76 13	0,00973	15,47
96 76 14	0,00900	15,70
96 76 15	0,00767	15,92
96 76 16	0,00605	16,14
96 76 17	0,00444	16,37
96 76 18	0,00304	16,60
96 76 19	0,00195	16,83
96 76 20	0,00117	17,06
96 76 21	0,00066	17,29
96 75 06	0,00111	13,60
96 75 07	0,00222	13,81
96 75 08	0,00385	14,01
96 75 09	0,00587	14,22
96 75 10	0,00797	14,44
96 75 11	0,00971	14,65
96 75 12	0,01073	14,86
96 75 13	0,01081	15,08
96 75 14	0,00999	15,29
96 75 15	0,00852	15,51
96 75 16	0,00672	15,73
96 75 17	0,00493	15,95
96 75 18	0,00338	16,17

N.C.	PROBABILITE	N.P.P.
96 75 19	0,00216	16,40
96 75 20	0,00130	16,62
96 75 21	0,00073	16,85
96 74 06	0,00116	13,25
96 74 07	0,00232	13,45
96 74 08	0,00403	13,66
96 74 09	0,00614	13,86
96 74 10	0,00833	14,07
96 74 11	0,01016	14,28
96 74 12	0,01122	14,49
96 74 13	0,01131	14,70
96 74 14	0,01046	14,91
96 74 15	0,00891	15,12
96 74 16	0,00703	15,33
96 74 17	0,00516	15,55
96 74 18	0,00353	15,77
96 74 19	0,00226	15,99
96 74 20	0,00136	16,21
96 74 21	0,00077	16,43
96 73 06	0,00114	12,92
96 73 07	0,00229	13,11
96 73 08	0,00398	13,31
96 73 09	0,00607	13,51
96 73 10	0,00823	13,72
96 73 11	0,01003	13,92
96 73 12	0,01108	14,12
96 73 13	0,01116	14,33
96 73 14	0,01032	14,54
96 73 15	0,00880	14,74
96 73 16	0,00694	14,95
96 73 17	0,00509	15,16
96 73 18	0,00348	15,37
96 73 19	0,00223	15,59
96 73 20	0,00134	15,80
96 73 21	0,00076	16,02
96 72 06	0,00107	12,59

N.C.	PROBABILITE	N.P.P.
96 72 07	0,00214	12,78
96 72 08	0,00371	12,98
96 72 09	0,00566	13,18
96 72 10	0,00768	13,37
96 72 11	0,00936	13,57
96 72 12	0,01034	13,77
96 72 13	0,01042	13,97
96 72 14	0,00963	14,18
96 72 15	0,00811	14,38
96 72 16	0,00648	14,58
96 72 17	0,00476	14,79
96 72 18	0,00325	15,00
96 72 19	0,00208	15,20
96 72 20	0,00125	15,41
96 72 21	0,00071	15,62
96 71 06	0,00094	12,28
96 71 07	0,00189	12,47
96 71 08	0,00328	12,66
96 71 09	0,00500	12,85
96 71 10	0,00679	13,04
96 71 11	0,00828	13,24
96 71 12	0,00914	13,43
96 71 13	0,00921	13,63
96 71 14	0,00851	13,83
96 71 15	0,00726	14,03
96 71 16	0,00573	14,23
96 71 17	0,00420	14,43
96 71 18	0,00288	14,63
96 71 19	0,00184	14,83
96 71 20	0,00111	15,04
96 70 06	0,00079	11,97
96 70 07	0,00159	12,16
96 70 08	0,00275	12,34
96 70 09	0,00419	12,53
96 70 10	0,00569	12,72

N.C.	PROBABILITE	N.P.P.
96 70 11	0,00693	12,91
96 70 12	0,00766	13,10
96 70 13	0,00772	13,30
96 70 14	0,00713	13,49
96 70 15	0,00608	13,69
96 70 16	0,00480	13,88
96 70 17	0,00352	14,08
96 70 18	0,00241	14,28
96 70 19	0,00154	14,48
96 70 20	0,00093	14,68
96 69 07	0,00126	11,86
96 69 08	0,00219	12,04
96 69 09	0,00334	12,23
96 69 10	0,00453	12,41
96 69 11	0,00552	12,60
96 69 12	0,00609	12,79
96 69 13	0,00614	12,98
96 69 14	0,00567	13,17
96 69 15	0,00484	13,36
96 69 16	0,00382	13,55
96 69 17	0,00280	13,74
96 69 18	0,00192	13,93
96 69 19	0,00123	14,13
96 69 20	0,00074	14,33
96 68 07	0,00095	11,57
96 68 08	0,00165	11,75
96 68 09	0,00252	11,93
96 68 10	0,00342	12,11
96 68 11	0,00417	12,29
96 68 12	0,00461	12,48
96 68 13	0,00464	12,66
96 68 14	0,00429	12,85
96 68 15	0,00366	13,04
96 68 16	0,00289	13,22
96 68 17	0,00212	13,41

N.C.	PROBABILITE	N.P.P.
96 68 18	0,00145	13,60
96 68 19	0,00093	13,79
96 67 07	0,00069	11,28
96 67 08	0,00119	11,46
96 67 09	0,00182	11,64
96 67 10	0,00246	11,82
96 67 11	0,00300	12,00
96 67 12	0,00332	12,18
96 67 13	0,00334	12,36
96 67 14	0,00309	12,54
96 67 15	0,00263	12,73
96 67 16	0,00208	12,91
96 67 17	0,00152	13,10
96 67 18	0,00104	13,28
96 67 19	0,00067	13,47
96 66 08	0,00082	11,18
96 66 09	0,00124	11,36
96 66 10	0,00169	11,53
96 66 11	0,00221	11,71
96 66 12	0,00227	11,89
96 66 13	0,00229	12,07
96 66 14	0,00212	12,24
96 66 15	0,00180	12,43
96 66 16	0,00142	12,61
96 66 17	0,00104	12,79
96 66 18	0,00071	12,97
96 65 08	0,00081	10,91
96 65 09	0,00110	11,08
96 65 10	0,00134	11,26
96 65 11	0,00148	11,43
96 65 12	0,00150	11,60
96 65 13	0,00150	11,78
96 65 14	0,00138	11,96
96 65 15	0,00118	12,13
96 65 16	0,00093	12,31

N.C.	PROBABILITE	N.P.P.
96 65 17	0,00068	12,49
96 64 10	0,00069	10,99
96 64 11	0,00084	11,16
96 64 12	0,00093	11,33
96 64 13	0,00093	11,50
96 64 14	0,00086	11,67
96 64 15	0,00073	11,85

PROBABILITE D'OBTENIR UN N.C. POUR UNE DENSITE VIRALE d = 145

N.C.	PROBABILITE	N.P.P.
96 96 65	0,012512	113,1
96 96 66	0,019118	116,3
96 96 67	0,028019	119,7
96 96 68	0,038992	123,2
96 96 69	0,051632	126,8
96 96 70	0,064985	130,6
96 96 71	0,077654	134,6
96 96 72	0,087984	138,6
96 96 73	0,094389	142,9
96 96 74	0,095731	147,3
96 96 75	0,091632	152,0
96 96 76	0,082620	156,9
96 96 77	0,070025	162,0
96 96 78	0,055660	167,4
96 96 79	0,041383	173,1
96 96 80	0,028695	179,2
96 96 81	0,018496	185,6

PROBABILITE D'OBTENIR UN N.C. POUR UNE DENSITE VIRALE d = 180

N.C.			PROBABILITE	N.P.P.
96	96	70	0,003122	130,63
96	96	71	0,005774	134,55
96	96	72	0,010125	138,63
96	96	73	0,016808	142,88
96	96	74	0,026381	147,33
96	96	75	0,039076	151,98
96	96	76	0,054522	156,86
96	96	77	0,071511	161,99
96	96	78	0,087962	167,40
96	96	79	0,101205	173,11
96	96	80	0,108598	179,17
96	96	81	0,108322	185,62
96	96	82	0,100059	192,52
96	96	83	0,085225	199,93
96	96	84	0,066602	207,94
96	96	85	0,047481	216,64
96	96	86	0,030667	226,17
96	96	87	0,017799	236,71
96	96	88	0,009192	248,49
96	96	89	0,004172	261,84
96	96	90	0,001639	277,25
96	96	91	0,000442	295,49
96	96	92	0,000140	317,80

PROBABILITE D'OBTENIR UN N.C. POUR UNE DENSITE VIRALE d = 220

N.C.	PROBABILITE	N.P.P.
96 96 75	0,001009	151,98
96 96 76	0,002237	156,86
96 96 77	0,004663	161,99
96 96 78	0,009116	167,40
96 96 79	0,016668	173,11
96 96 80	0,028424	179,17
96 96 81	0,045058	185,62
96 96 82	0,066145	192,52
96 96 83	0,089534	199,93
96 96 84	0,111199	207,94
96 96 85	0,125982	216,64
96 96 86	0,129315	226,17
96 96 87	0,119282	236,71
96 96 88	0,097899	248,49
96 96 89	0,070620	261,84
96 96 90	0,044079	277,25
96 96 91	0,023323	295,49
96 96 92	0,010172	317,80
96 96 93	0,003511	346,57

PROBABILITE D'OBTENIR UN N.C. POUR UNE DENSITE VIRALE d = 240

N.C.	PROBABILITE	N.P.P.
96 96 78	1 422	167,40
96 96 79	3 248	173,11
96 96 80	6 918	179,17
96 96 81	13 697	185,62
96 96 82	25 115	192,52
96 96 83	42 460	199,93
96 96 84	65 865	207,94
96 96 85	93 201	216,64
96 96 86	119 487	226,17
96 96 87	137 659	236,71
96 96 88	141 114	248,49
96 96 89	127 138	261,84
96 96 90	99 115	277,25
96 96 91	65 502	295,49
96 96 92	35 681	317,80
96 96 93	15 382	346,57
96 96 94	4 921	387,12
96 96 95	1 038	456,43

PROBABILITE D'OBTENIR UN N.C. POUR UNE DENSITE VIRALE d = 260

N.C.	PROBABILITE	N.P.P.
96 96 80	0,001183	179,17
96 96 81	0,002913	185,62
96 96 82	0,006640	192,52
96 96 83	0,013960	199,93
96 96 84	0,026928	207,94
96 96 85	0,047382	216,64
96 96 86	0,075536	226,17
96 96 87	0,108215	236,71
96 96 88	0,137941	248,49
96 96 89	0,154541	261,84
96 96 90	0,149812	277,25
96 96 91	0,123113	295,49
96 96 92	0,083394	317,80
96 96 93	0,044705	346,57
96 96 94	0,017782	387,12
96 96 95	0,004666	456,43

A N N E X E A 2

◆□◆□◆□◆□◆□◆□◆□◆□◆□◆

TABLEAU 1

Tableau récapitulatif

($K = 3 \quad q_1 = 1 \quad q_2 = 0,1 \quad q_3 = 0,01 \quad n_1 = n_2 = n_3 = 96$)

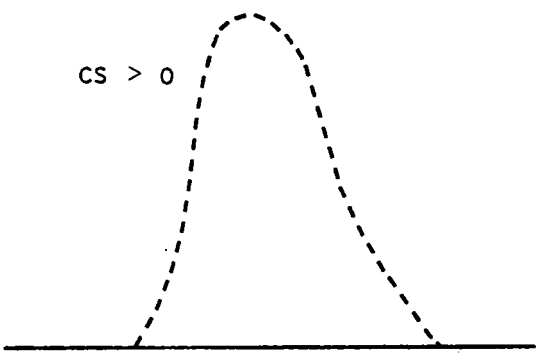
d	0,01	0,03	0,06	0,08	0,105	0,145	1,45	14,49	145	180	220	240	260
n° figure pour X	1	2	3	5	7	9		12	14	16	18	20	22
m_x	0,0098	0,02996	0,0596	0,0797	0,10486	0,1445	/	14,6030	146,2000	182,900	224,6000	245,9000	267,3000
$\lvert m_x - d \rvert / d$	0,0180	0,00130	0,0067	0,0038	0,00140	0,0034	/	0,0078	0,0083	0,016	0,0209	0,0246	0,0281
σ_x	0,0099	0,01725	0,0240	0,0280	0,03210	0,0301	/	1,5200	16,9200	24,030	31,3900	35,8100	40,9600
n° figure pour Y	/	/	4	6	8	10	11	13	15	17	19	21	23
m_y	/	/	-1,2620	- 1,1278	-1,0020	- 0,8570	0,1610	1,1608	2,1620	2,2580	2,3470	2,3880	2,4220
$\lvert m_y - \log d \rvert / \log d$	/	/	0,0330	0,0280	0,0237	0,02190	0,0022	0,0003	0,0003	0,0014	0,0021	0,0033	0,0029
σ_y	/	/	0,2080	0,1710	0,1396	0,11180	0,0386	0,0486	0,0512	0,0594	0,0604	0,0615	0,0662
$\lvert \sigma_y - \sigma \rvert / \sigma$	/	/	0,7000	2,0500	1,4880	0,99300	0,0312	0,1330	0,0850	0,0588	0,0766	0,0967	0,1800
cs_X	> 0	> 0	> 0	> 0	> 0	> 0		> 0	> 0	> 0	> 0	> 0	> 0
cs_Y			0 <	0 <	0 <	0 <		0	0	> 0	> 0	> 0	> 0
D_X	nul	très faible	faible	faible	moyen	faible		fort	fort	moyen	faible	faible	très faible
D_Y			faible	faible	moyen	moyen		très fort	très fort	fort	moyen	moyen	faible
S_s	0,047	0,078	0,128	0,151	0,184	0,228	/	/	/	/	/	/	/
S_i	/	/	/	/	/	/	/	/	/	134,5500	162,0000	173,1100	192,5200
P_o	0,3445	0,04 00	0,0016	0,0002	0,000015	/	/	/	/	/	/	/	/
P_∞	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	0,0001	0,0006

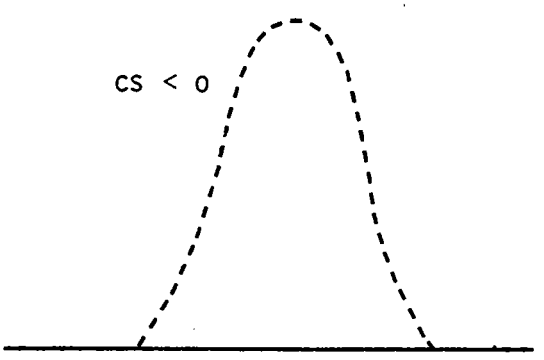
SYMBOLES UTILISES DANS LE TABLEAU RECAPITULATIF

d	: densité effective
$\log d$	: logarithme décimal de d
X	: N.P.P. rapporté au plus grand volume inoculé dans une cupule
m_X	: moyenne de X
σ_X	: écart-type de X
Y	: logarithme décimal de X
m_Y	: moyenne de Y
σ_Y	: écart-type de Y
σ	: écart-type de Y tel qu'il est obtenu par la formule $0{,}55/\sqrt{N} = 0{,}0561$
cs_X	: coéfficient de dissymétrie de la distribution de X
cs_Y	: coéfficient de dissymétrie de la distribution de Y
D_X	: degré de similitude entre la distribution de X et la distribution normale homologue
D_Y	: degré de similitude entre la distribution de Y et la distribution normale homologue
S_s	: borne supérieure de l'intervalle d'acceptation unilatérale à 99% minimum pour X
S_i	: borne inférieure de l'intervalle d'acceptation unilatérale à 99% minimum pour X
P_0	: probabilité (N.C. = 0. 0. 0)
P_∞	: probabilité (N.C. = 96.96.96)
m_X-d/d	: biais relatif à l'estimation de d par m_X
m_Y-log d/log d	: biais relatif à l'estimation de log d (donc de d) par m_Y
σ_Y-σ/σ	: erreur relative commise quand l'écart-type du logarithme décimal du N.P.P. est calculé par la formule $0{,}55/\sqrt{N}$

REMARQUE

Le coefficient de dissymétrie d'une distribution est positif ou négatif suivant que la forme de l'histogramme correspond à la première ou à la seconde des esquisses ci-dessous





A N N E X E A 3

◆□◆□◆□◆□◆□◆□◆□◆□◆□◆

Pour l'appréciation de la similitude entre une distribution donnée et la distribution normale homologue, il faut surtout considérer la courbure générale du trait continu sans trop s'attacher à celle des extrémités. Ainsi une différence de 0,002 dans la probabilité se traduit par un écart d'ordonnée qui vaut respectivement 0,02 et 0,10 selon que la valeur absolue de u est voisine de 0 ou de 2,5 .

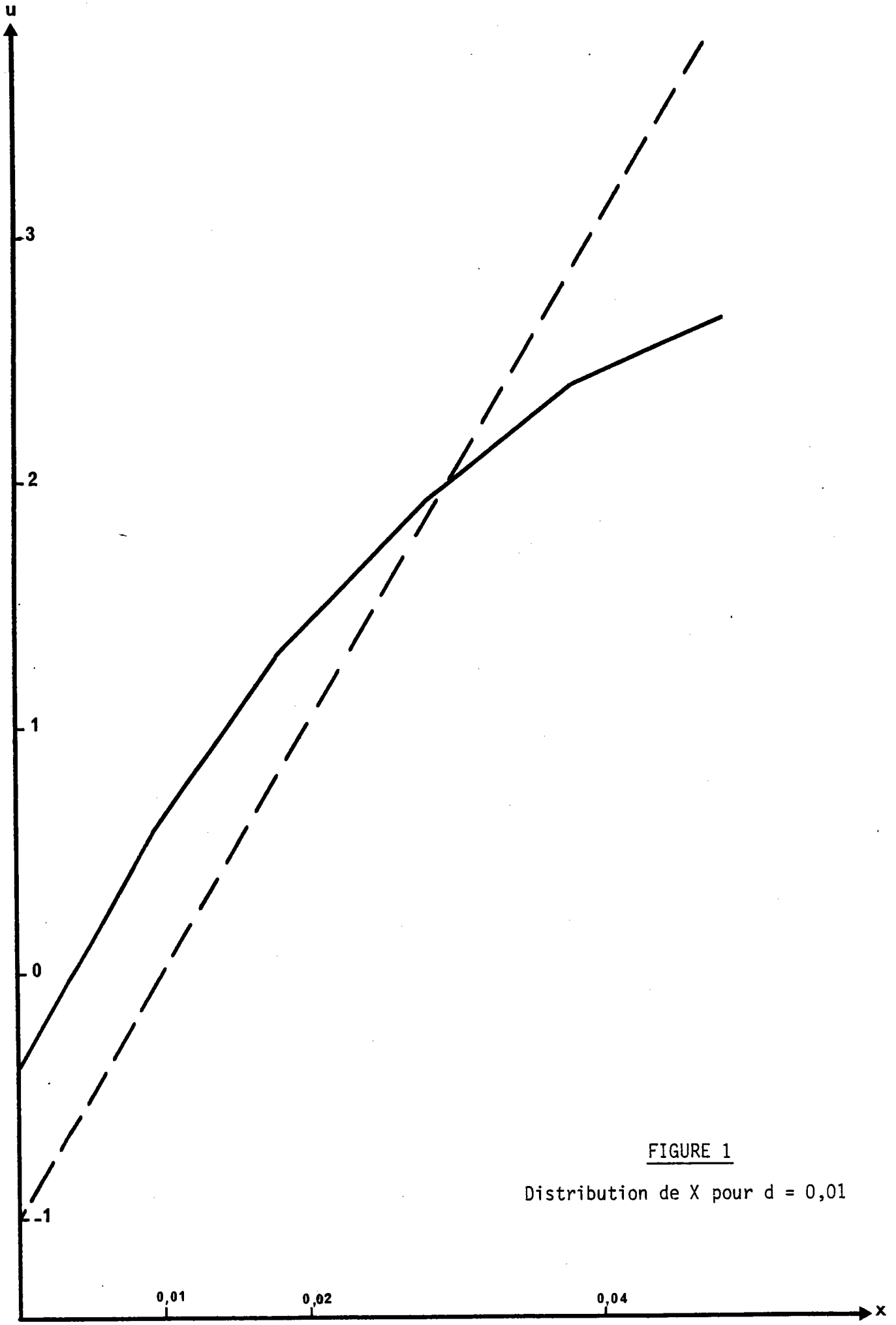


FIGURE 1

Distribution de X pour d = 0,01

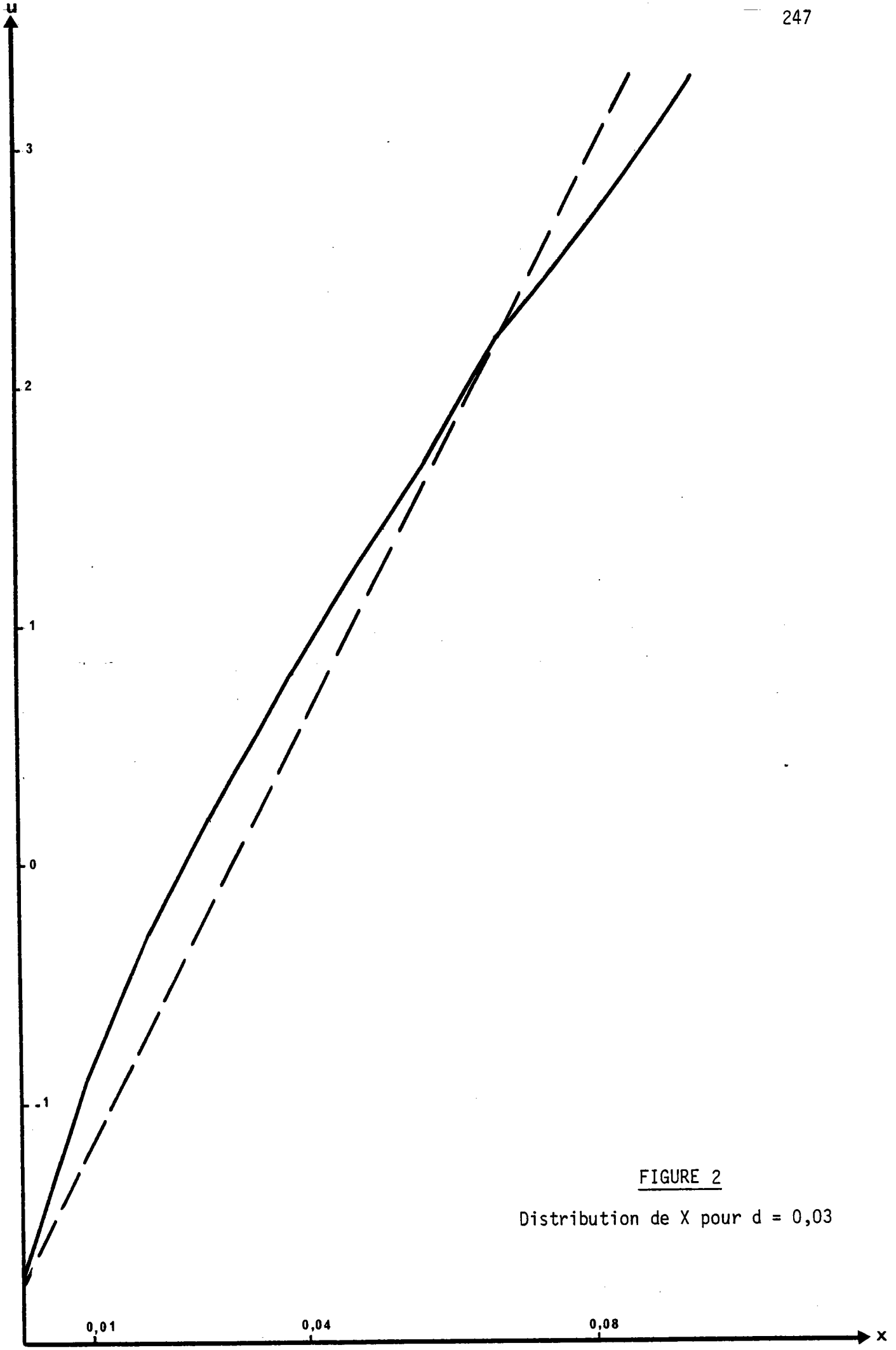


FIGURE 2

Distribution de X pour d = 0,03

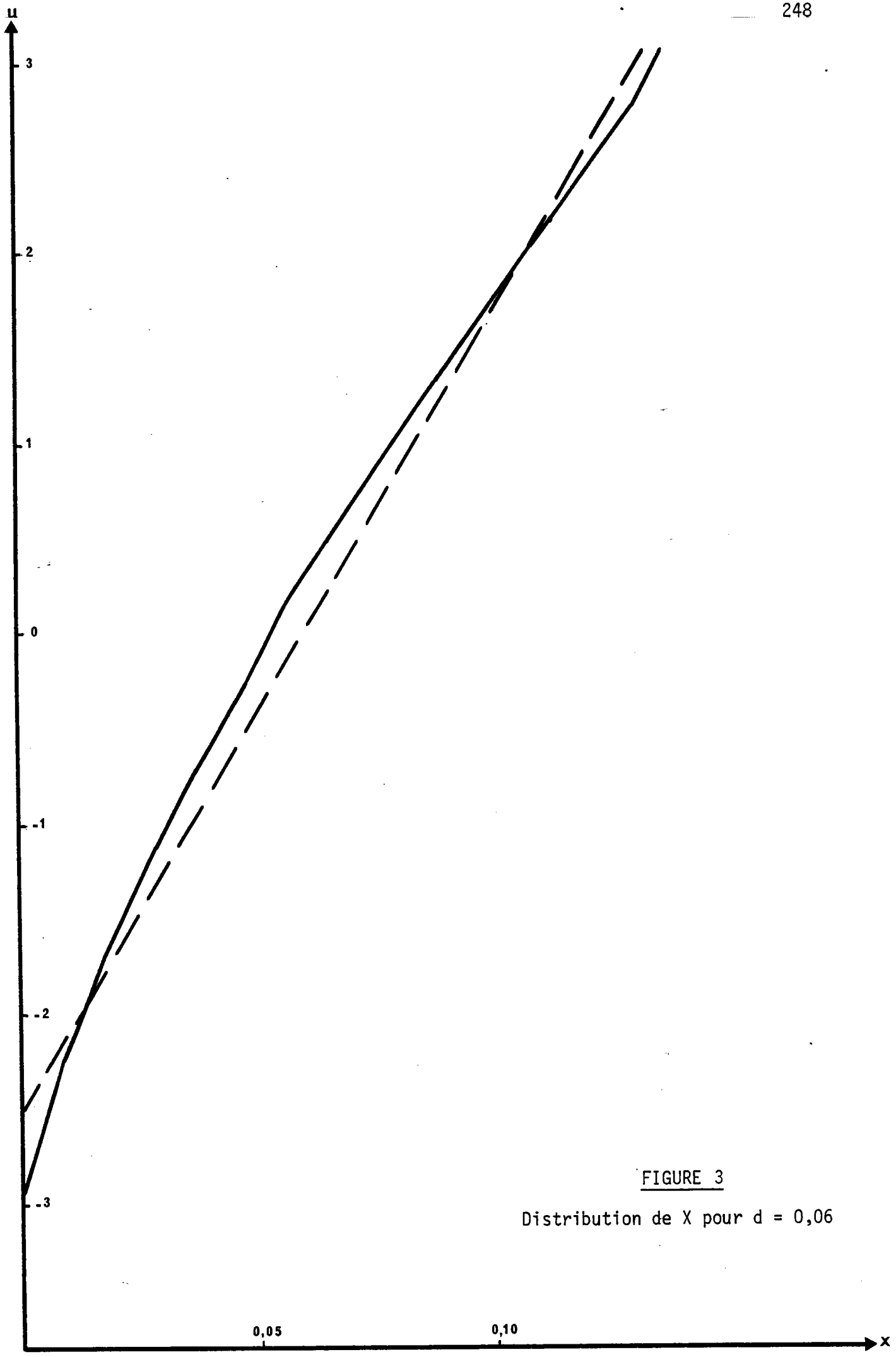


FIGURE 3

Distribution de X pour d = 0,06

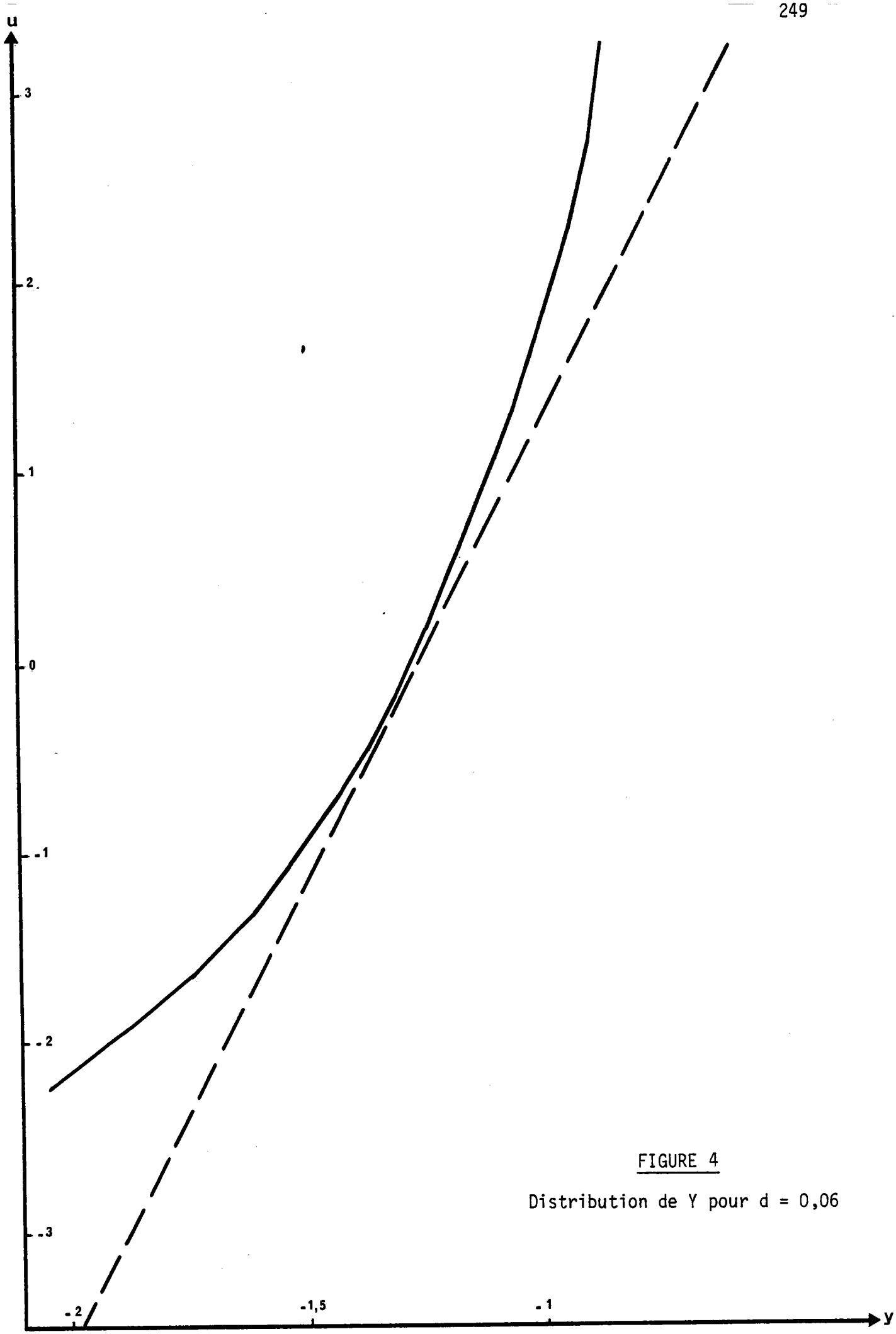


FIGURE 4

Distribution de Y pour d = 0,06

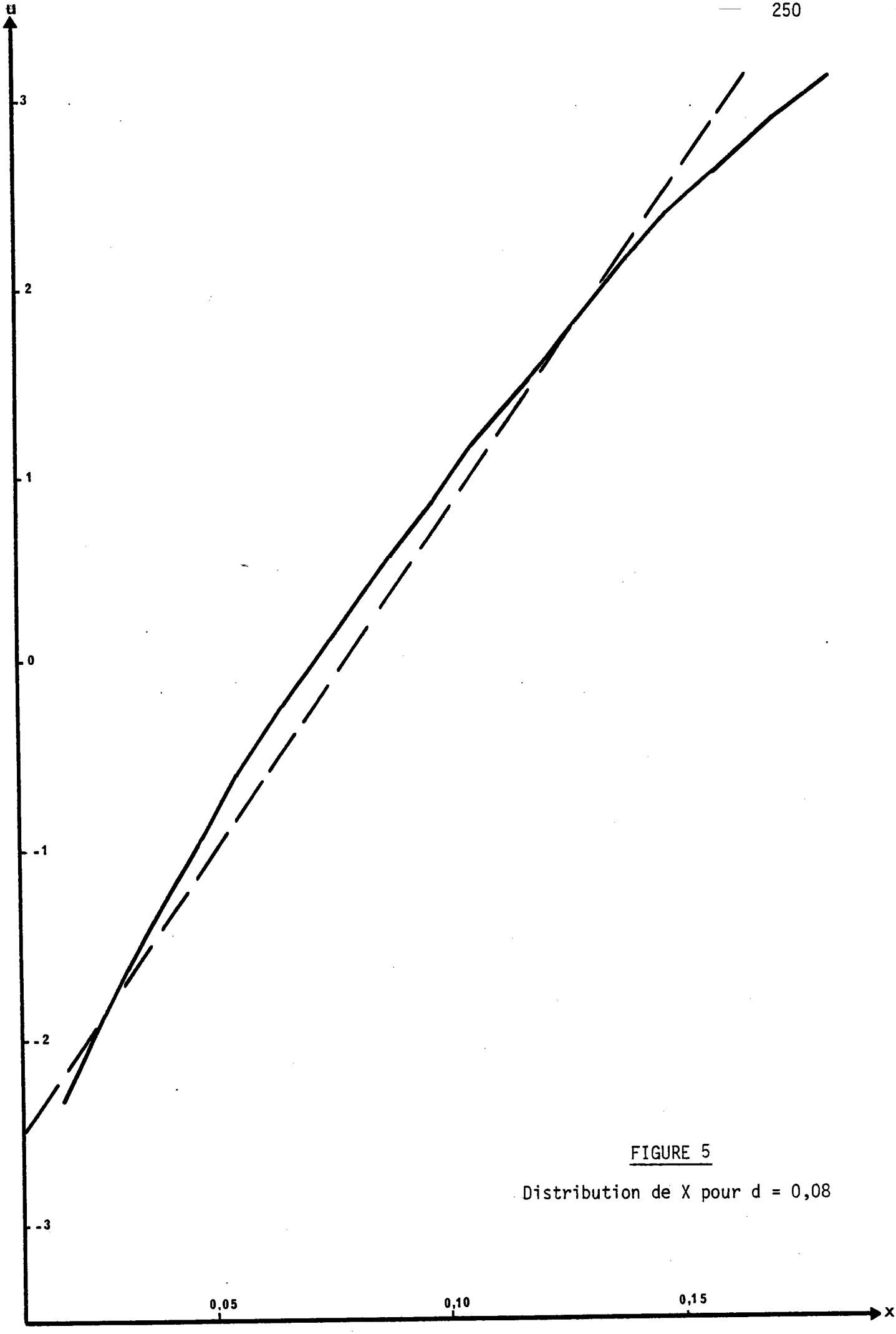


FIGURE 5

Distribution de X pour d = 0,08

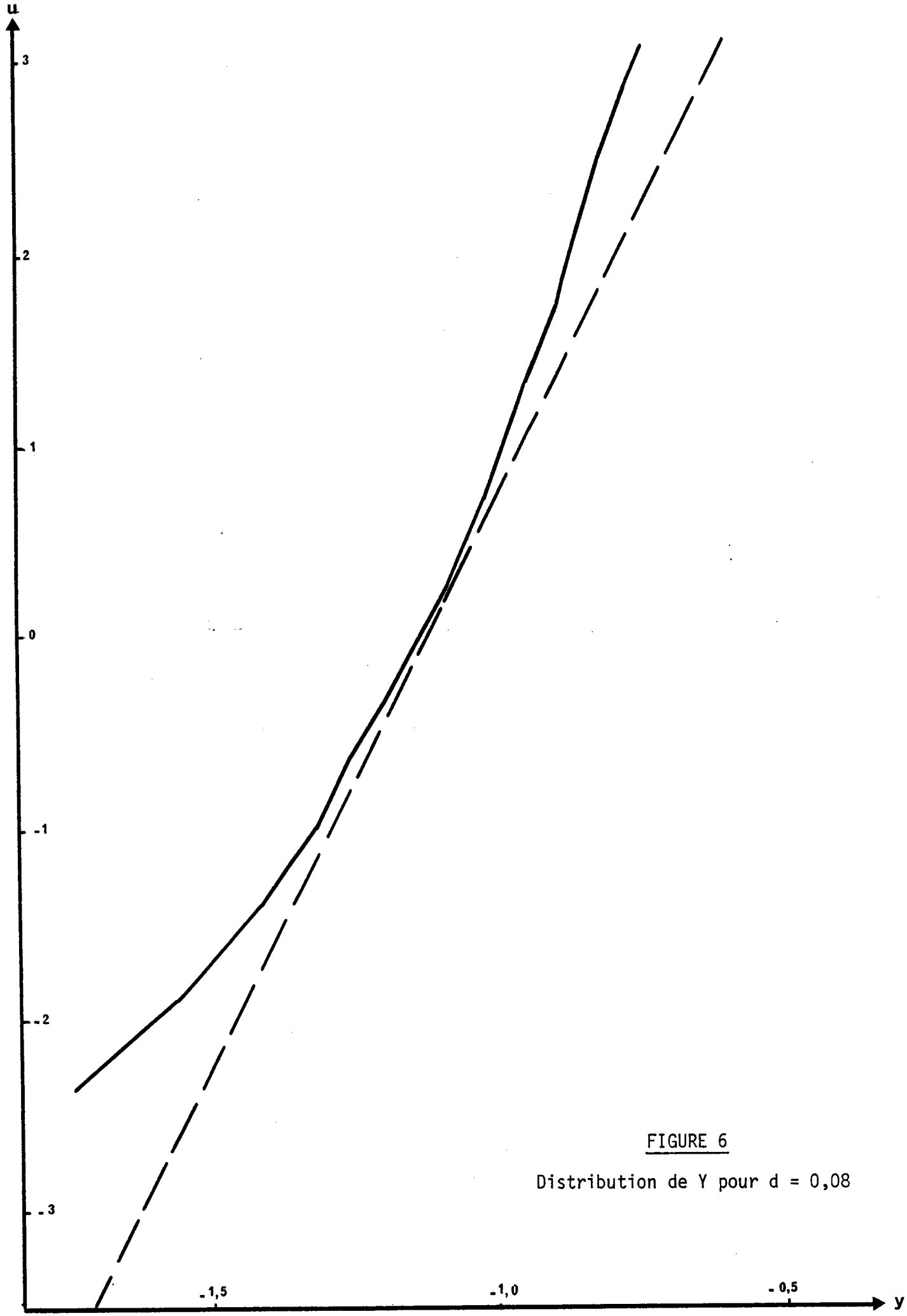


FIGURE 6

Distribution de Y pour d = 0,08

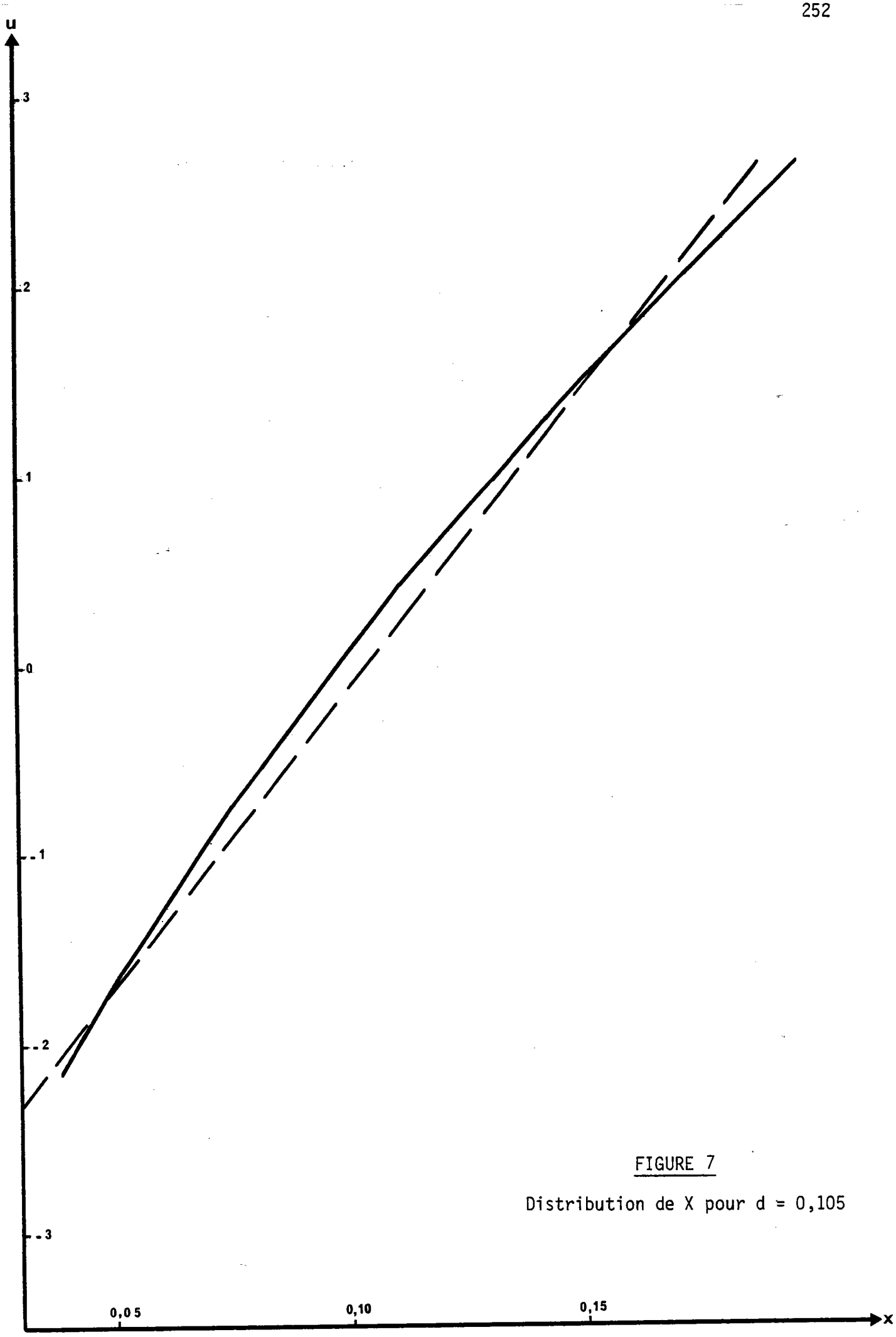


FIGURE 7

Distribution de X pour d = 0,105

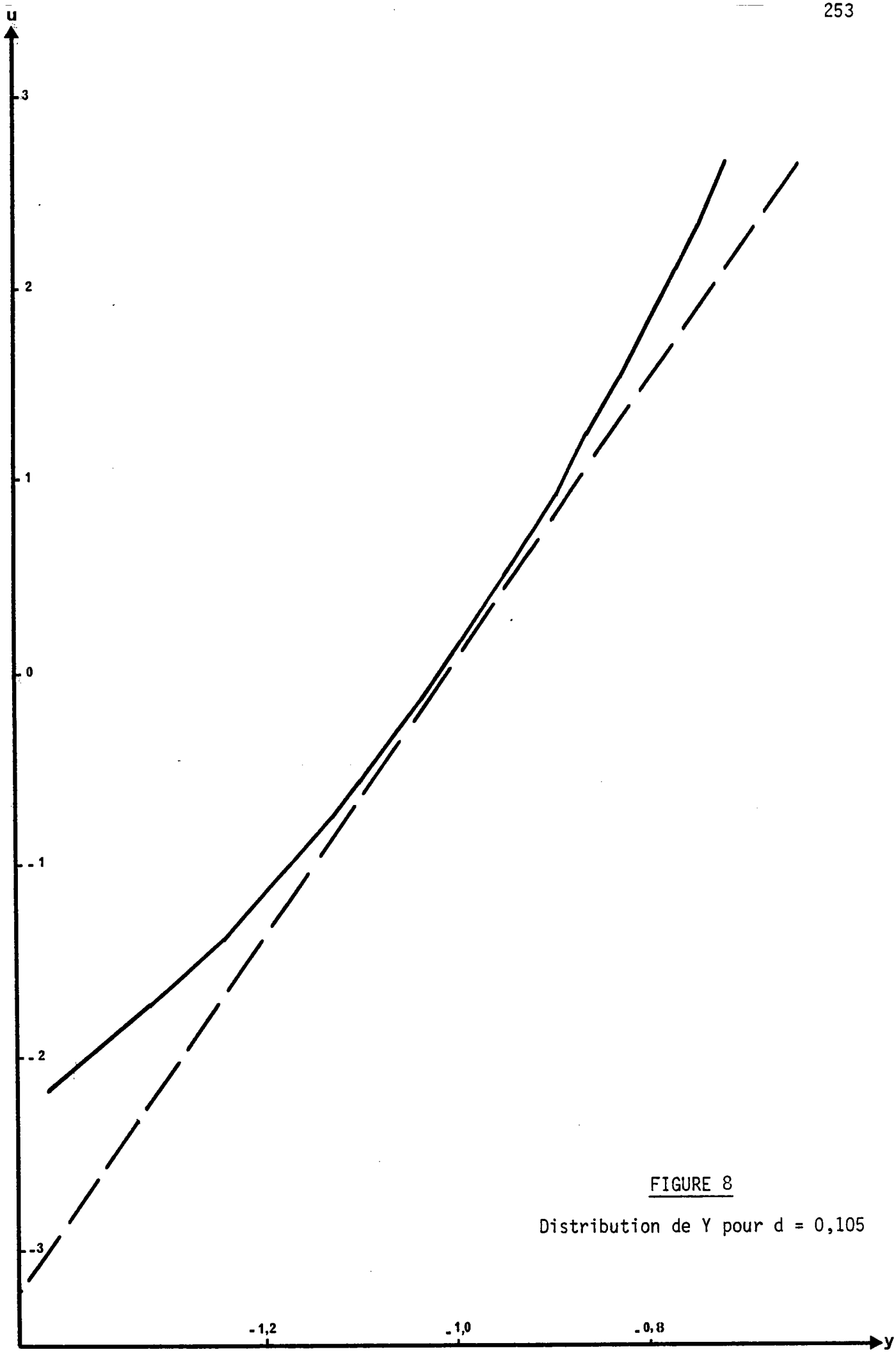


FIGURE 8

Distribution de Y pour d = 0,105

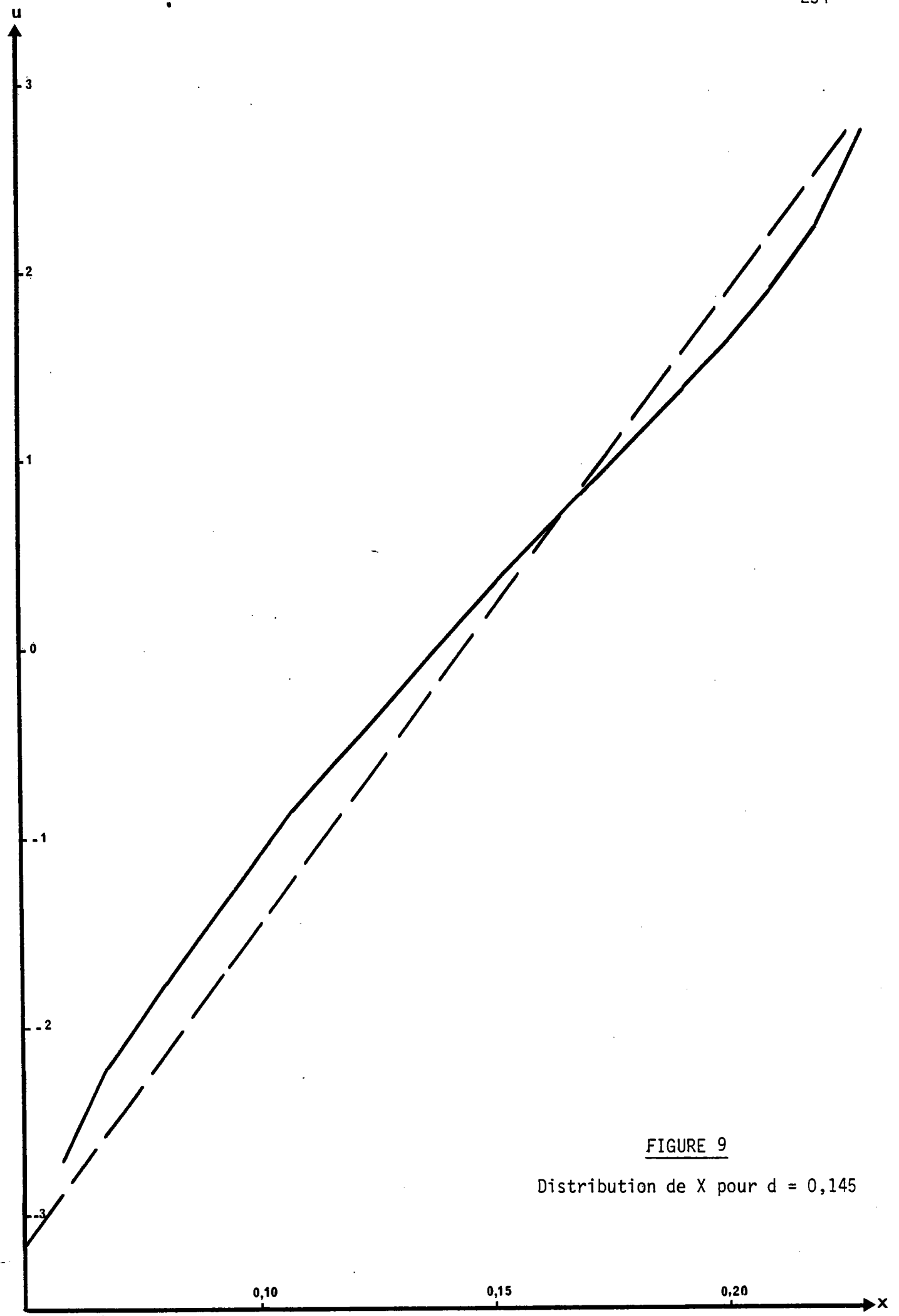


FIGURE 9

Distribution de X pour d = 0,145

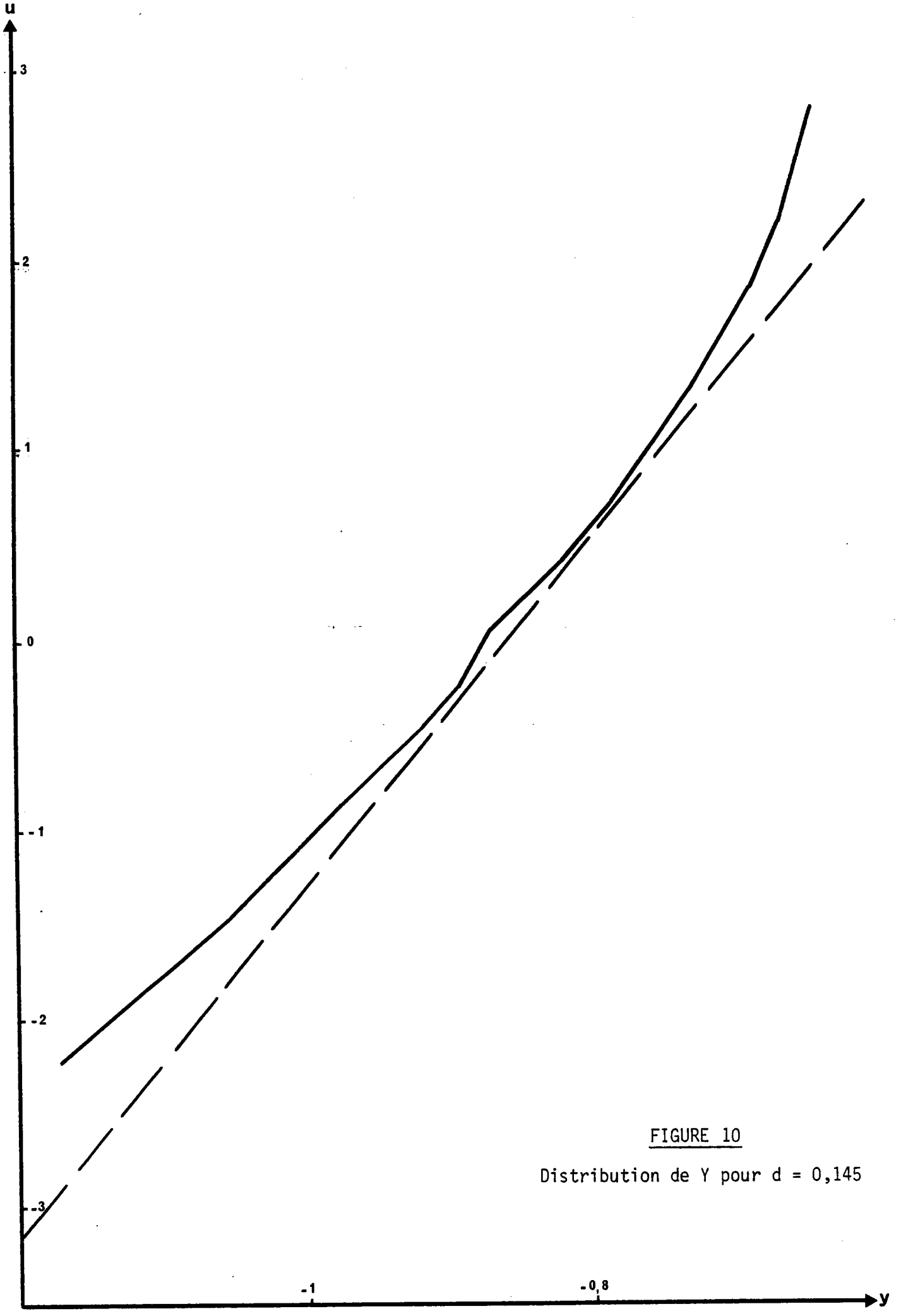


FIGURE 10

Distribution de Y pour d = 0,145

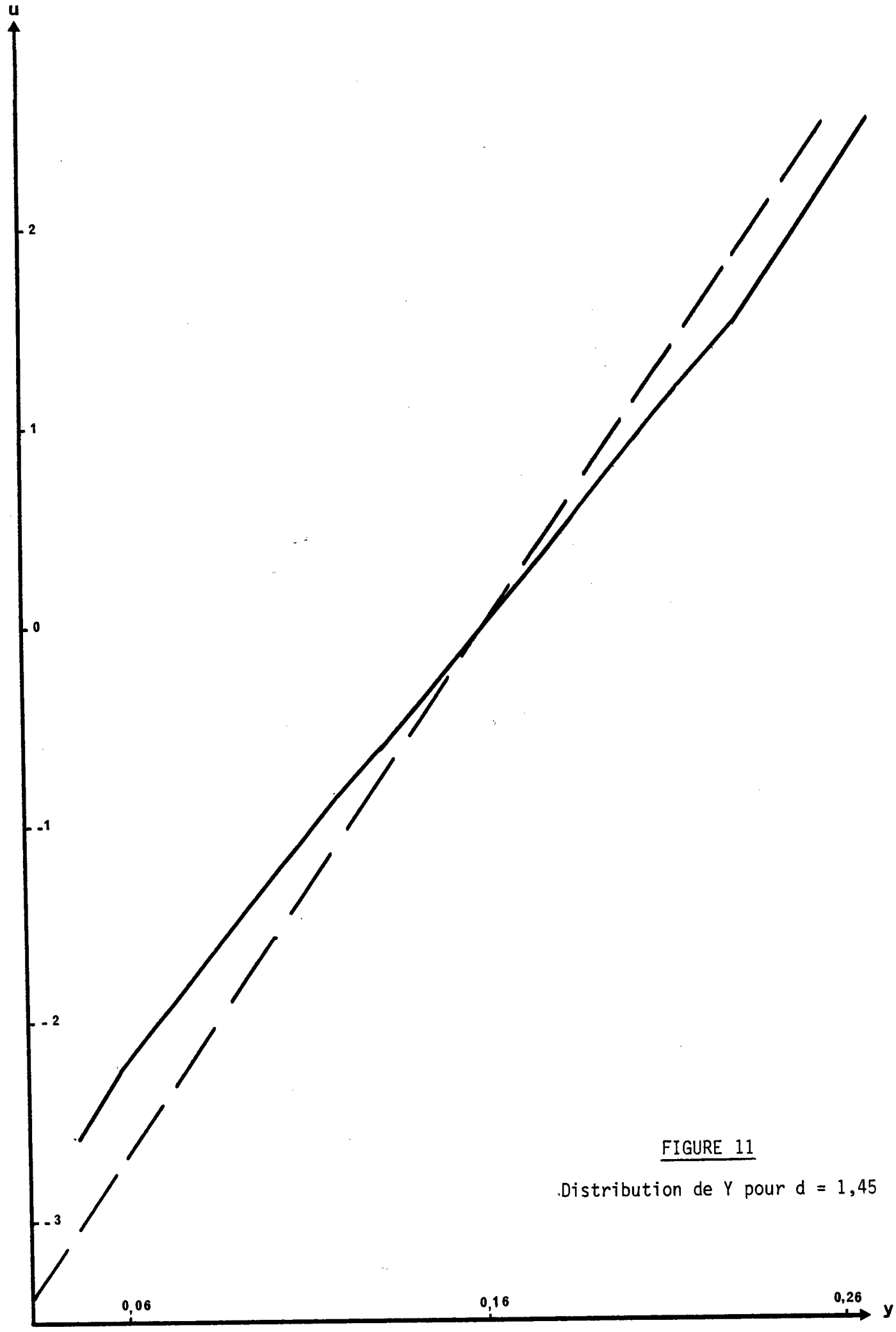


FIGURE 11

Distribution de Y pour d = 1,45

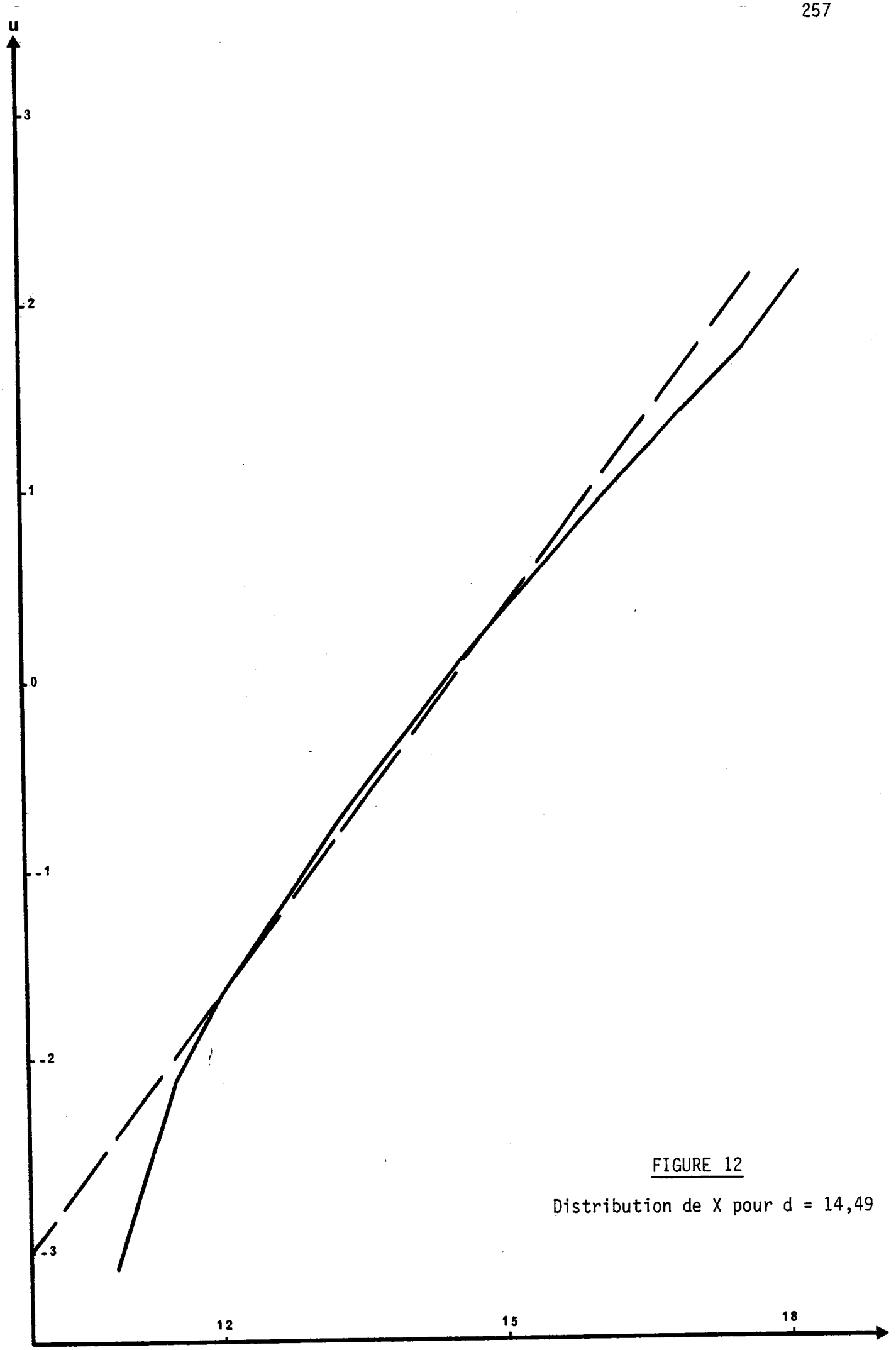


FIGURE 12

Distribution de X pour d = 14,49

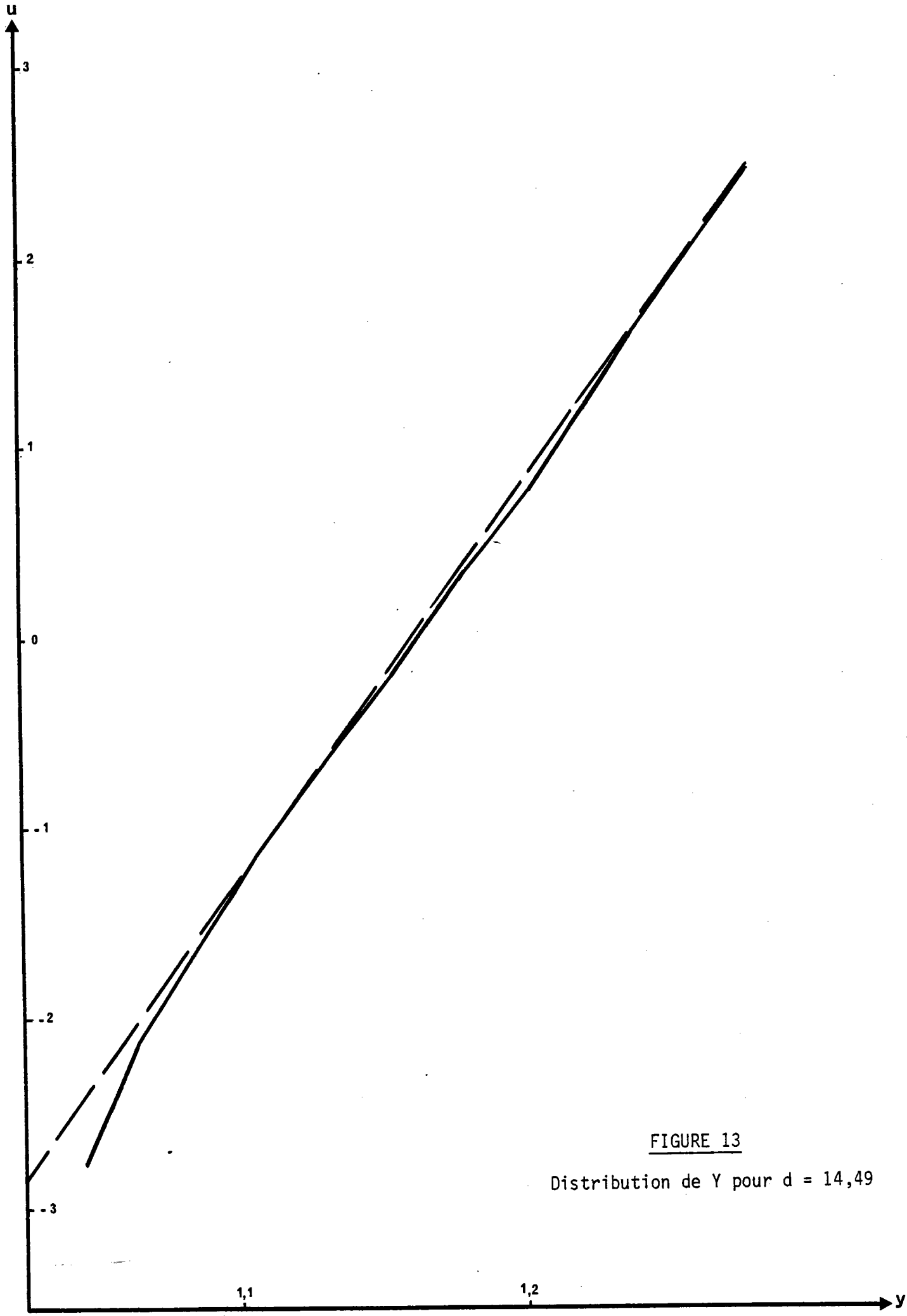


FIGURE 13

Distribution de Y pour d = 14,49

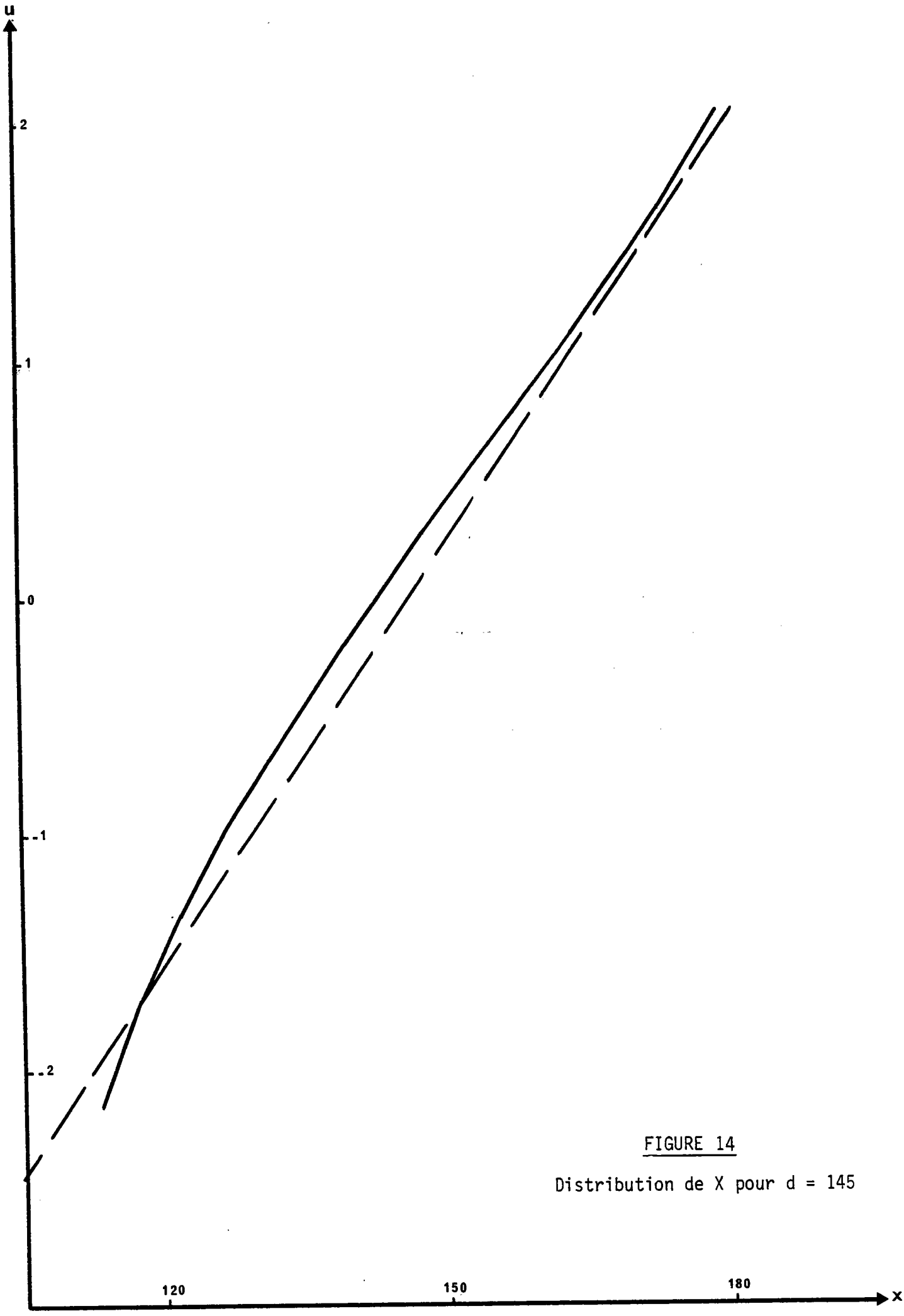


FIGURE 14

Distribution de X pour d = 145

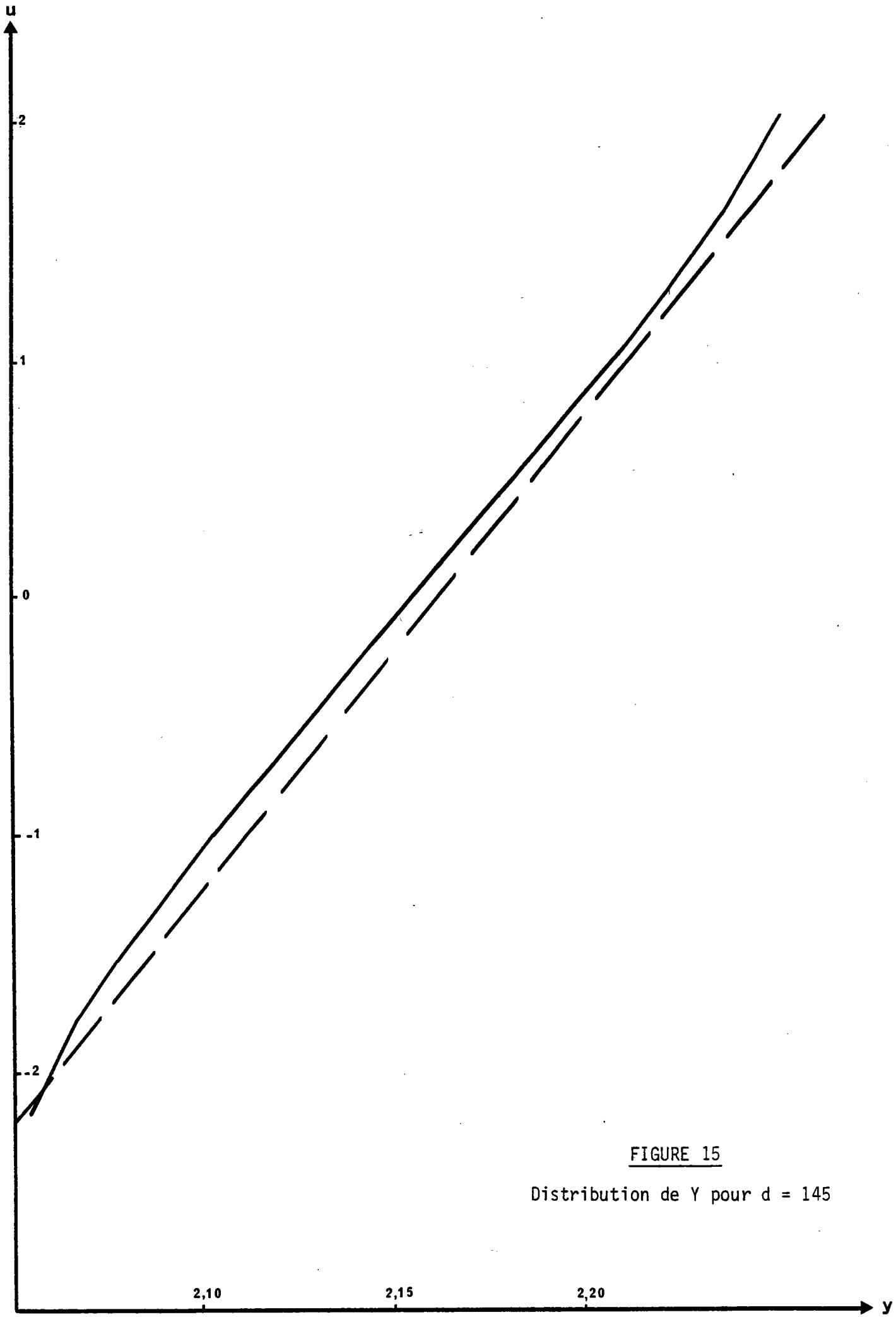


FIGURE 15

Distribution de Y pour d = 145

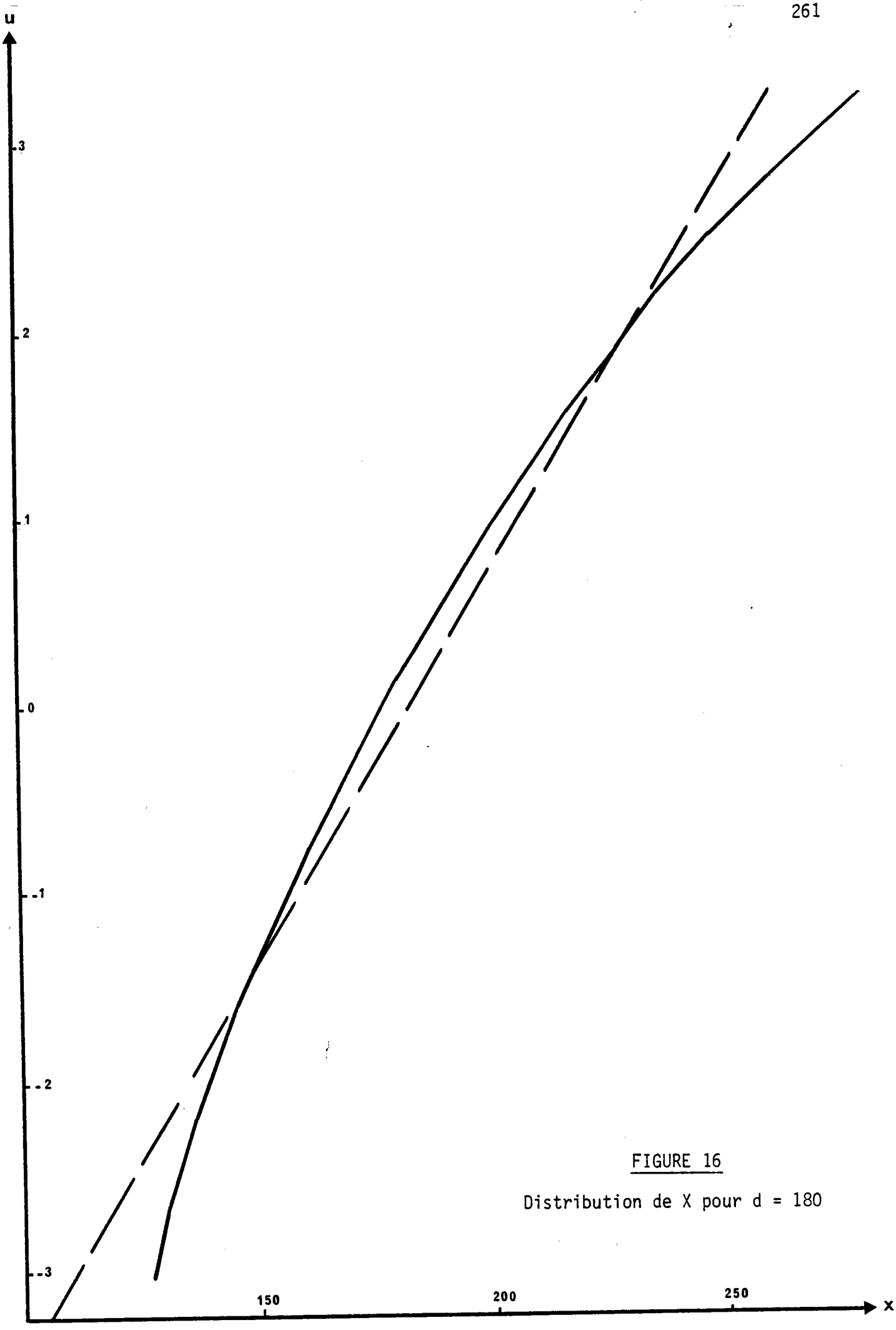


FIGURE 16

Distribution de X pour d = 180

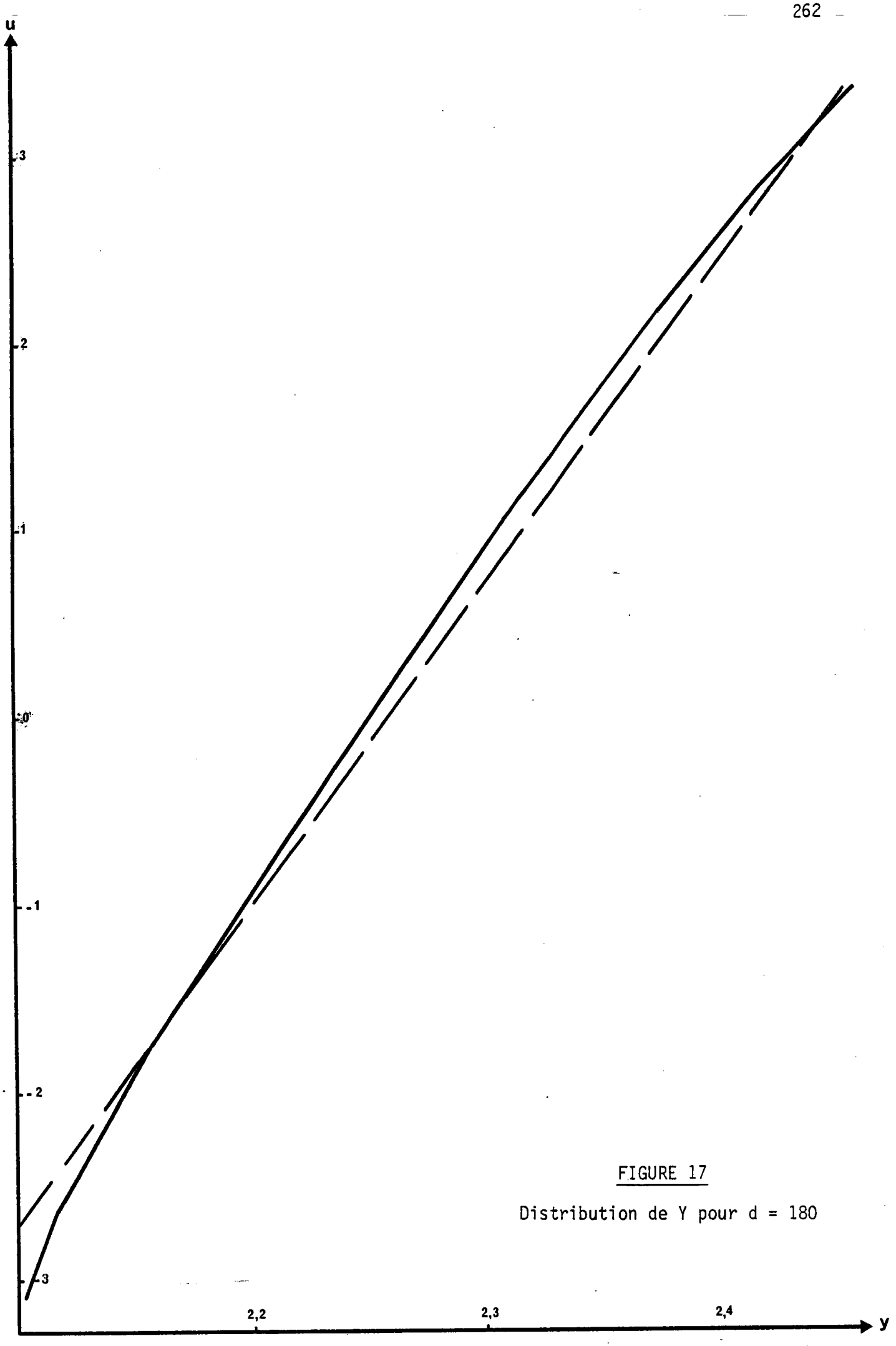


FIGURE 17

Distribution de Y pour d = 180

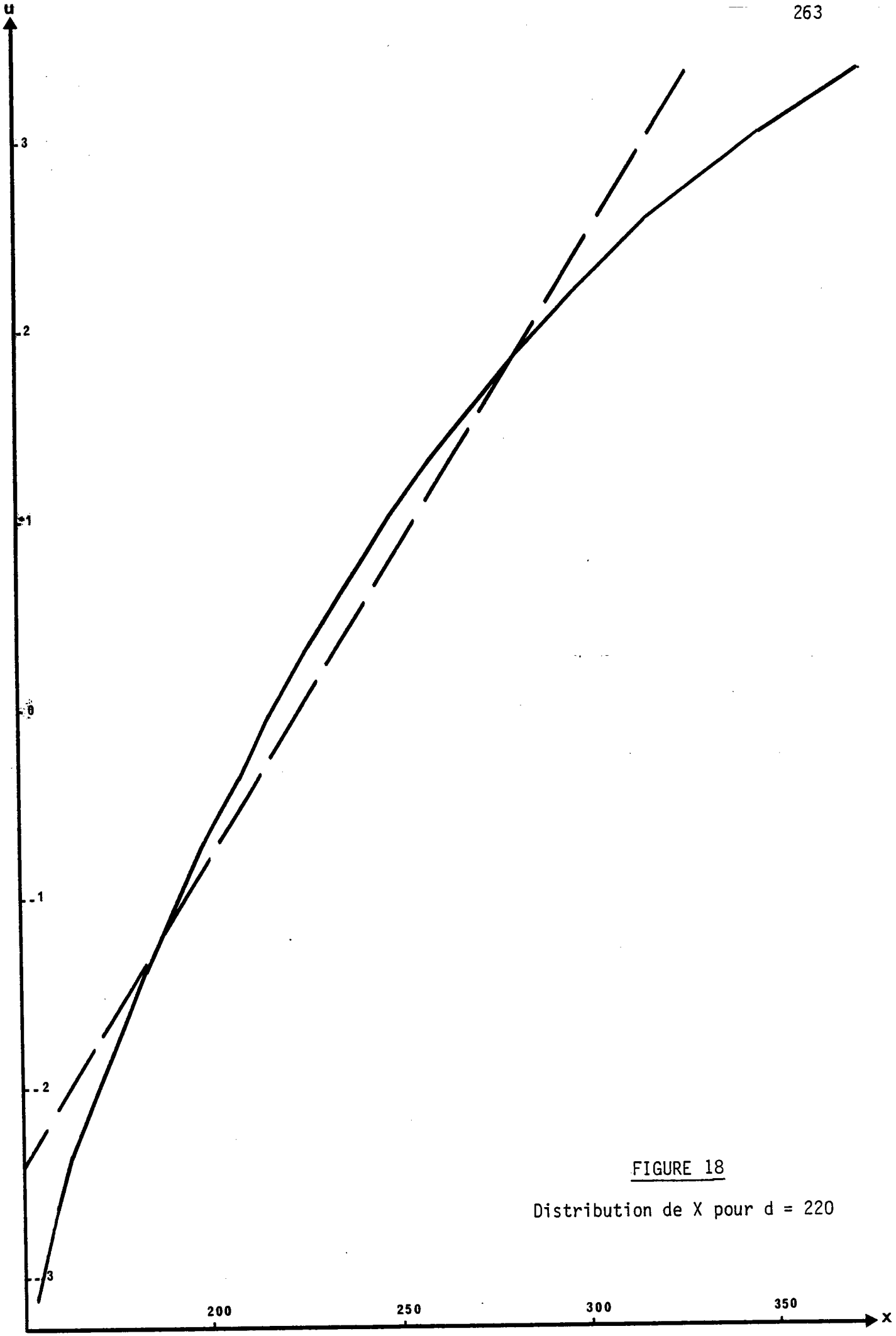


FIGURE 18

Distribution de X pour d = 220

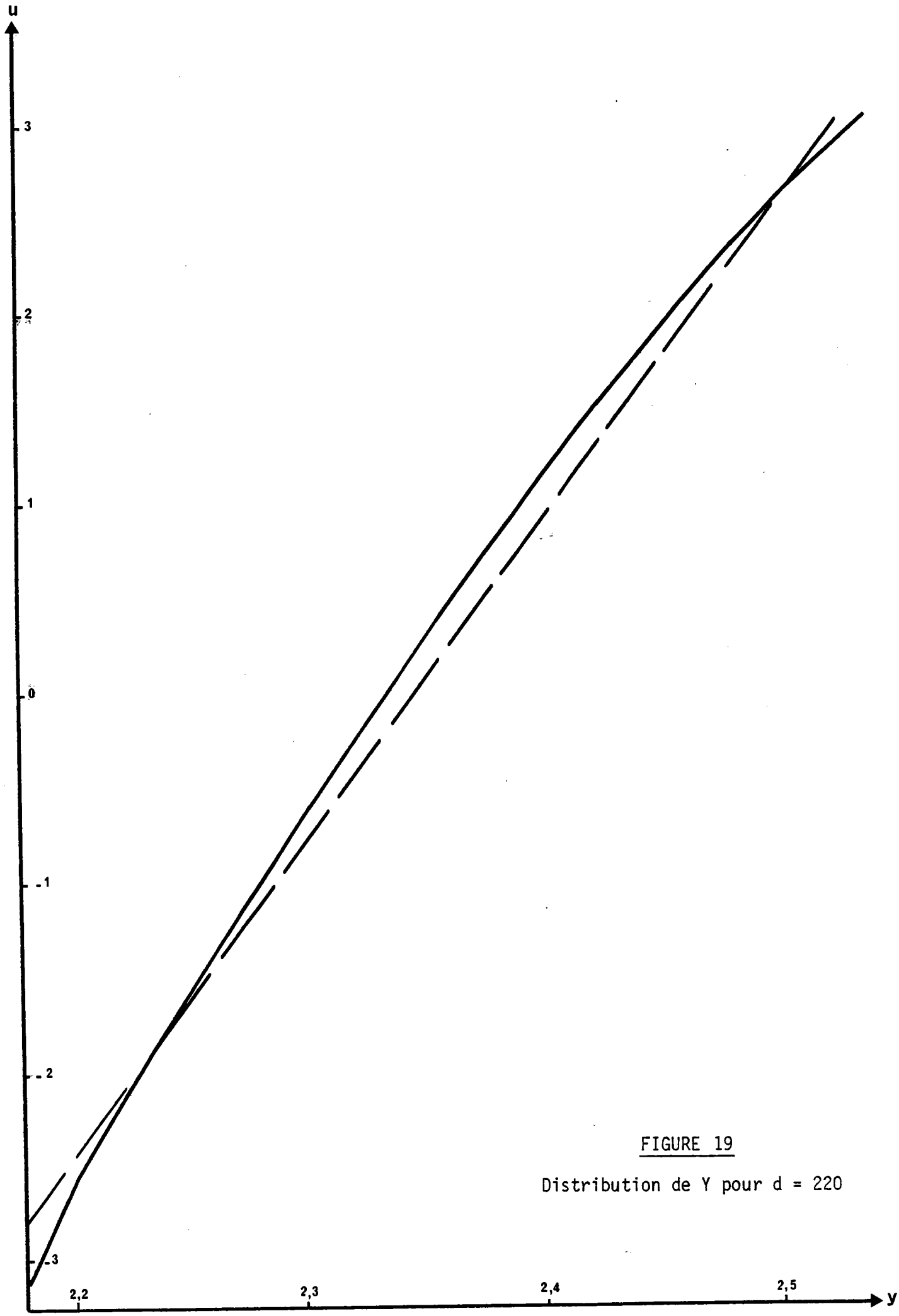


FIGURE 19

Distribution de Y pour d = 220

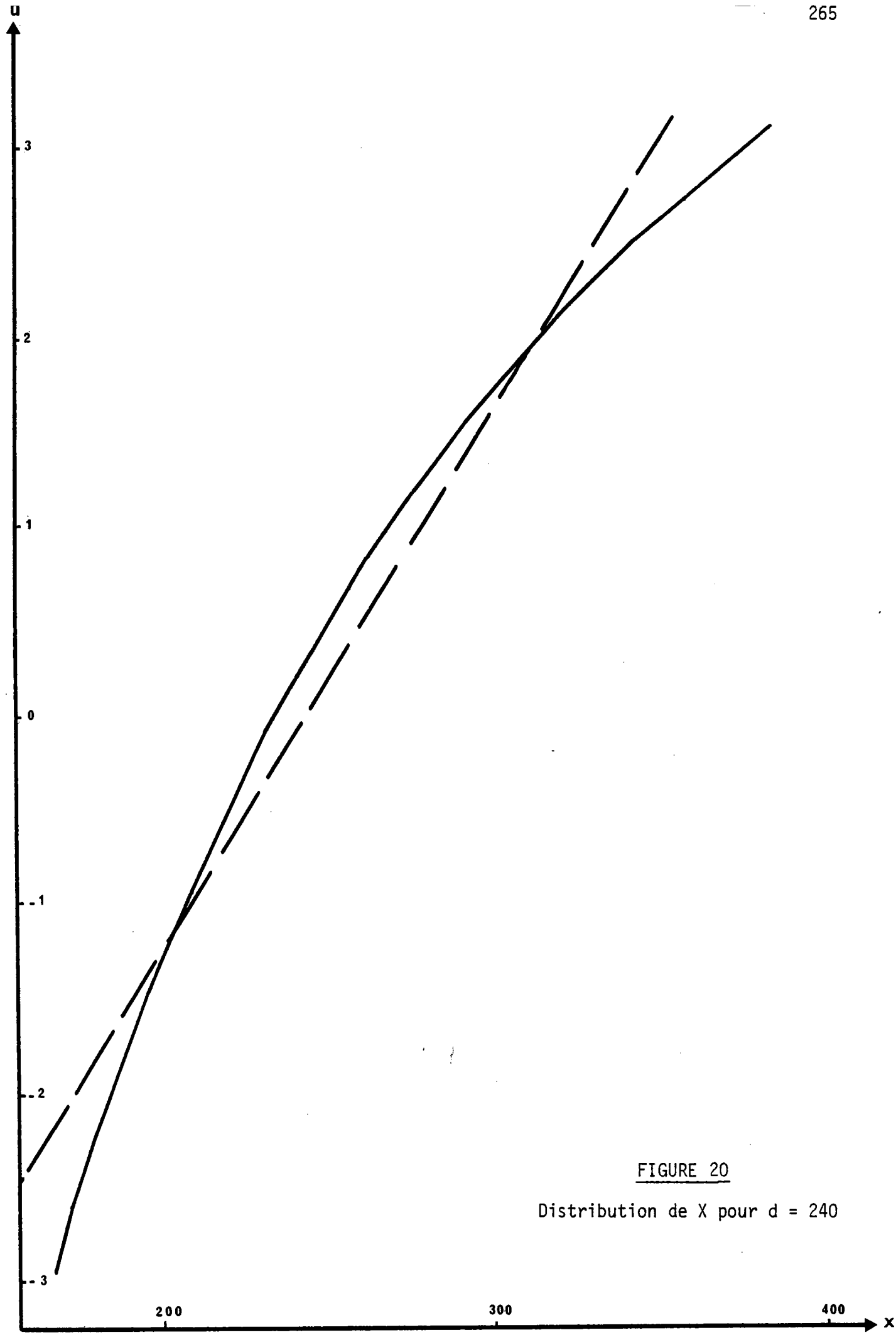


FIGURE 20

Distribution de X pour d = 240

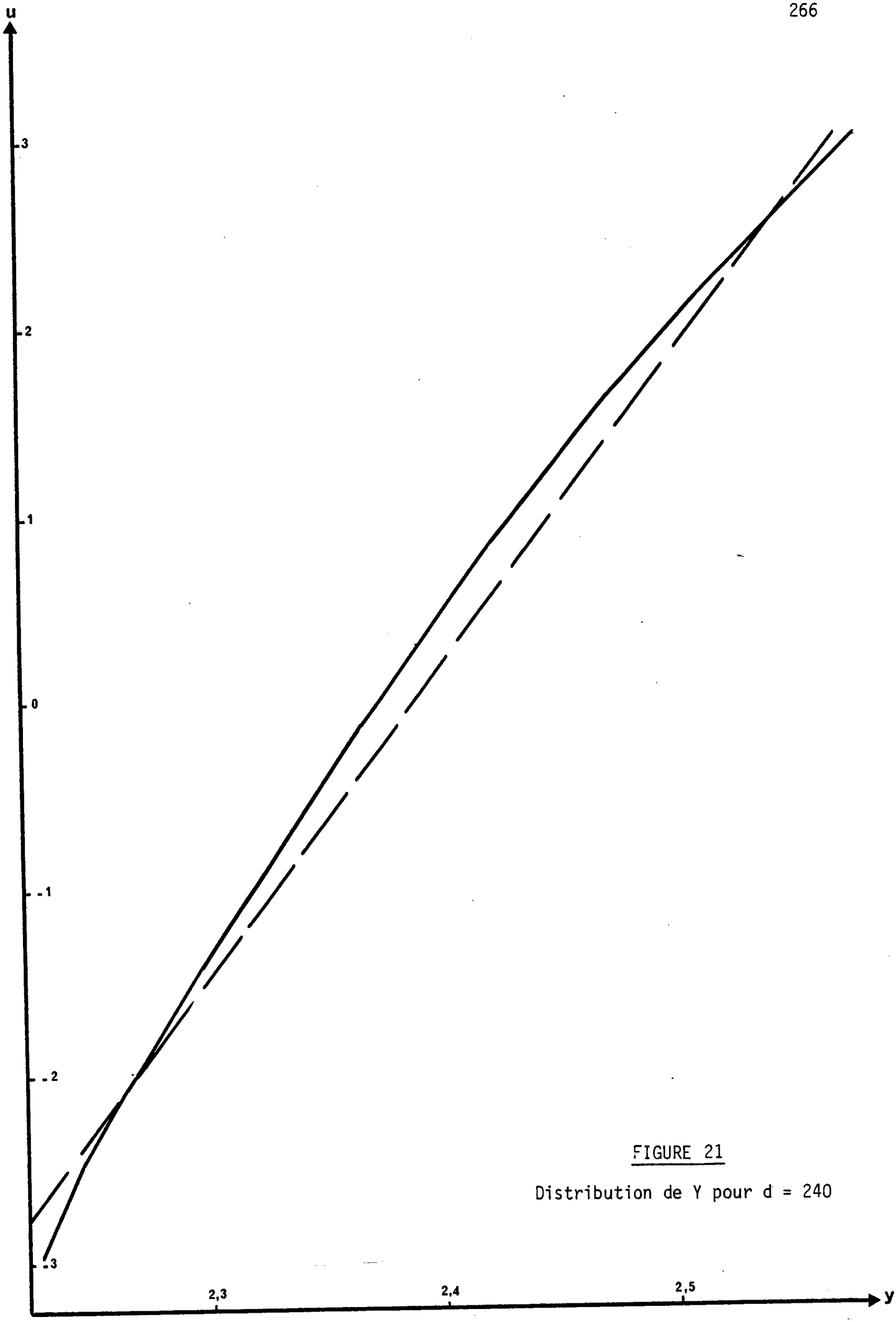


FIGURE 21

Distribution de Y pour d = 240

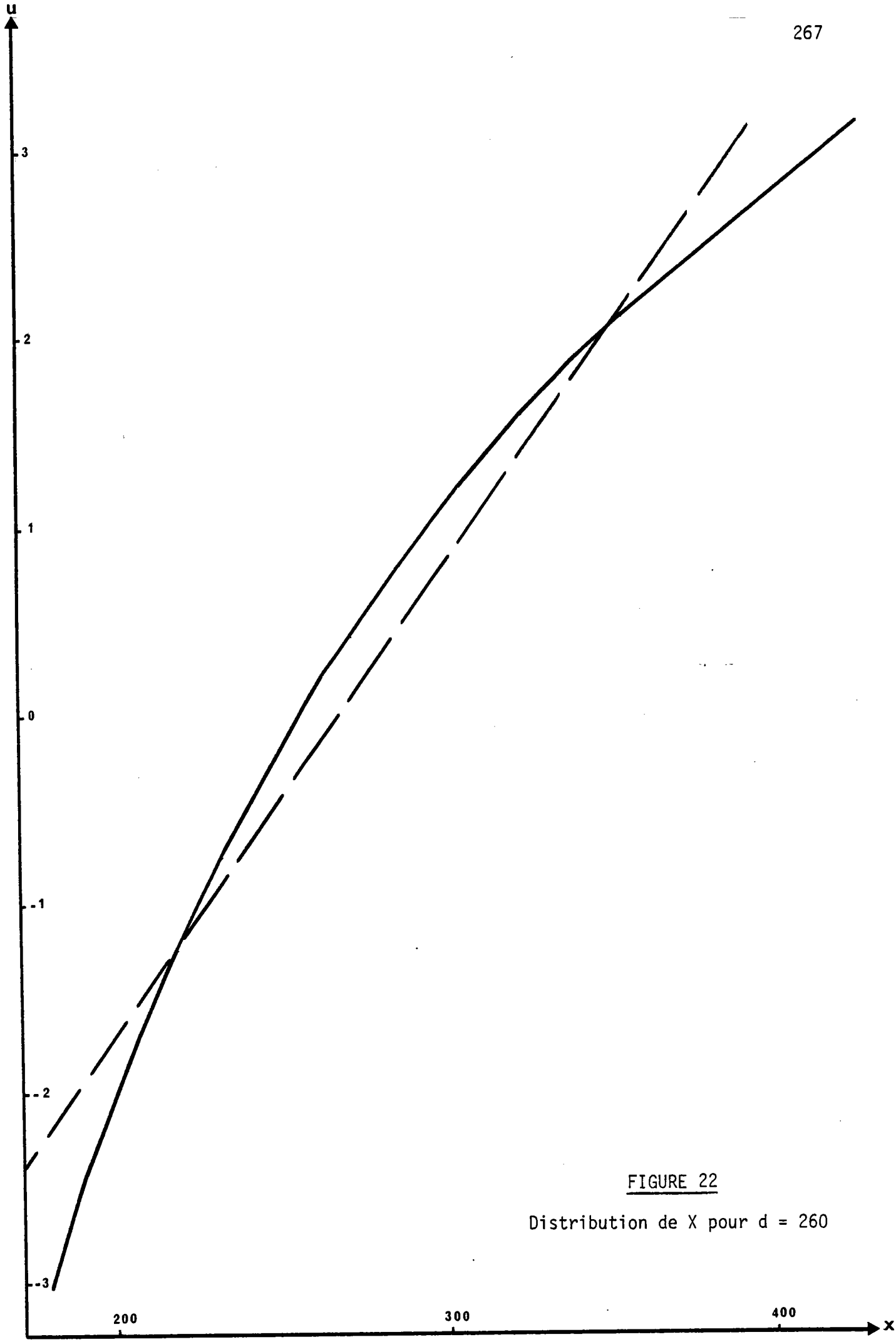


FIGURE 22

Distribution de X pour d = 260

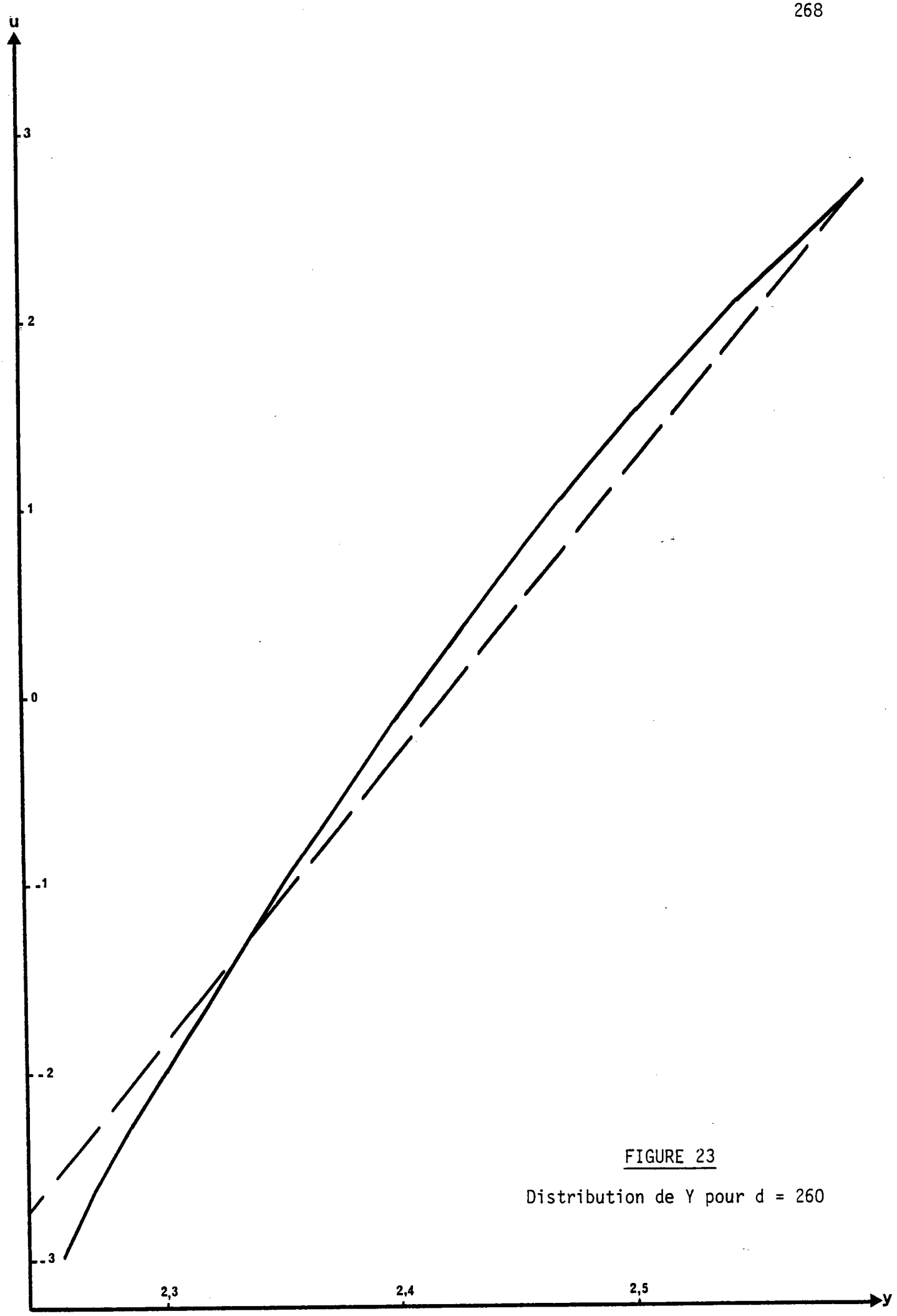


FIGURE 23

Distribution de Y pour d = 260

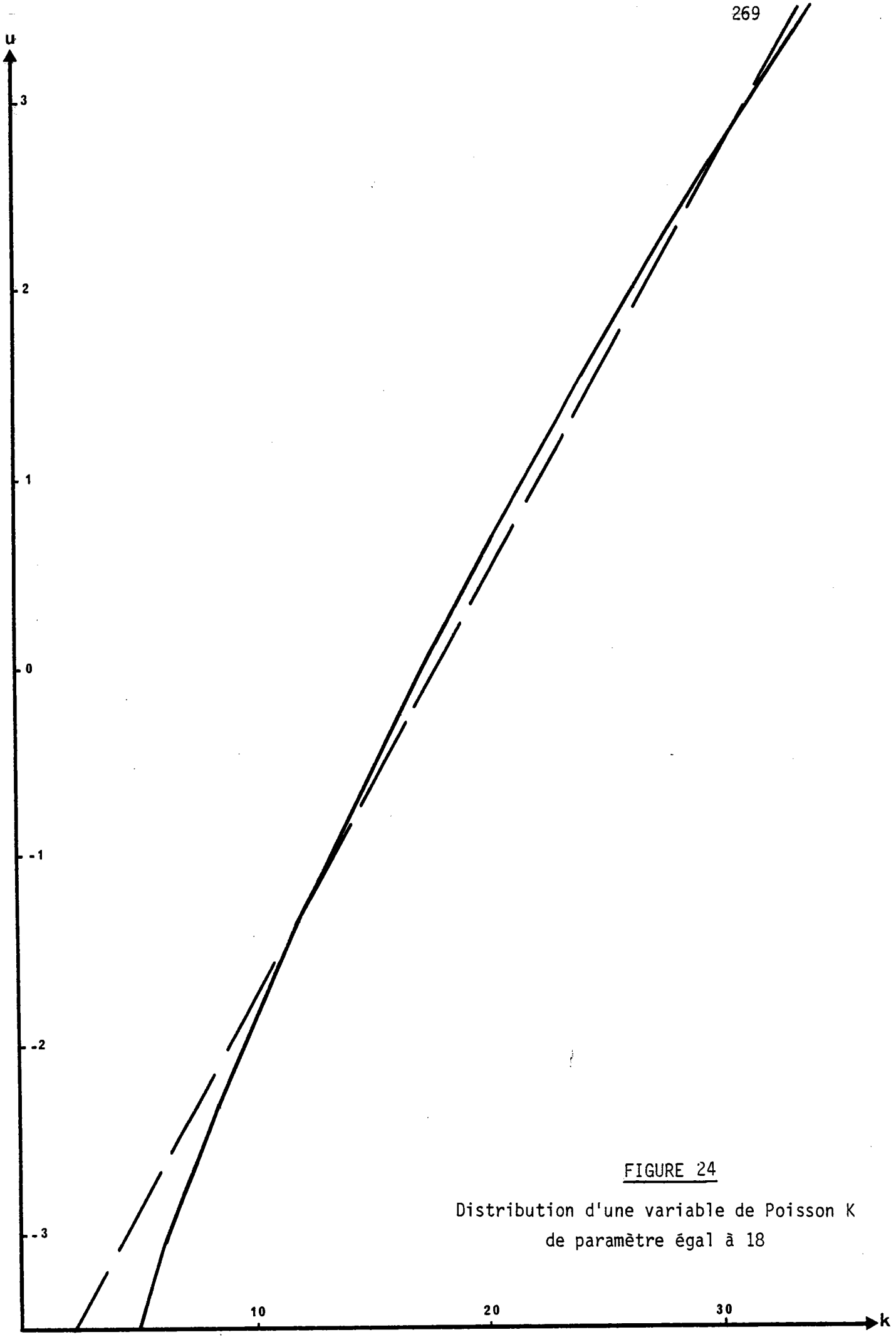


FIGURE 24

Distribution d'une variable de Poisson K
de paramètre égal à 18

A N N E X E A 4

◆□◆□◆□◆□◆□◆□◆□◆□◆

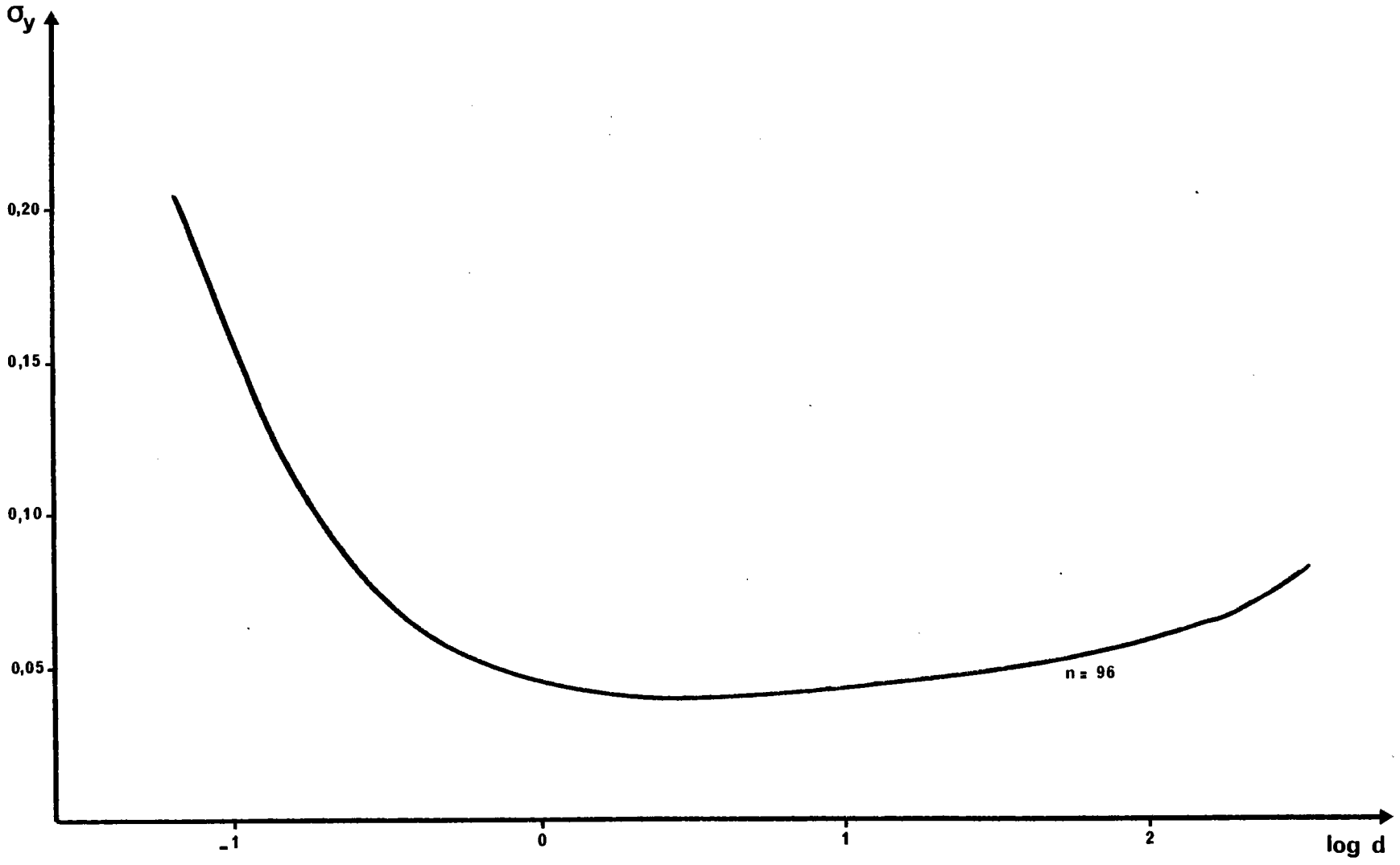


FIGURE 25

Courbe permettant la détermination des limites de l'intervalle I_2

ANNEXE A5

◆□◆□◆□◆□◆□◆□◆□◆□◆□◆

PROGRAMME INFORMATIQUE CONCERNANT LE CALCUL DE L'INDICE N.P.P.

DANS LE CAS DE TROIS DILUTIONS DECIMALES

★☆★☆★☆★☆★

Ce programme, effectué pour la calculatrice TEXAS INSTRUMENT T.I.59 permet :

- le calcul de l'indice N.P.P.
- l'intervalle de confiance de cet indice (95%)
- la probabilité de cet indice

000	47	CMS	062	69	OP	124	16	16	186	24	CE	248	GS	×
001	98	ADV	063	00	00	125	43	RCL	187	94	+/-	249	43	RCL
002	99	PRT	064	03	3	126	16	16	188	85	+	250	13	13
003	42	STO	065	00	0	127	92	RTN	189	01	1	251	95	=
004	13	13	066	03	3	128	68	NOP	190	54	)	252	44	SUM
005	91	R/S	067	03	3	129	68	NOP	191	95	=	253	26	26
006	99	PRT	068	03	3	130	43	RCL	192	65	×	254	43	RCL
007	42	STO	069	01	1	131	18	18	193	93	.	255	19	19
008	10	10	070	69	OP	132	44	SUM	194	01	1	256	94	+/-
009	91	R/S	071	04	04	133	19	19	195	65	×	257	65	×
010	98	ADV	072	43	RCL	134	43	RCL	196	43	RCL	258	93	.
011	99	PRT	073	19	19	135	19	19	197	14	14	259	01	1
012	42	STO	074	69	OP	136	71	SBR	198	95	=	260	95	=
013	14	14	075	06	06	137	01	01	199	44	SUM	261	22	INV
014	91	R/S	076	61	GTO	138	53	53	200	21	21	262	23	LNX
015	99	PRT	077	02	02	139	77	GE	201	43	RCL	263	55	÷
016	42	STO	078	32	32	140	01	01	202	19	19	264	53	(
017	11	11	079	53	(	141	30	30	203	94	+/-	265	24	CE
018	91	R/S	080	43	RCL	142	43	RCL	204	65	×	266	75	-
019	98	ADV	081	10	10	143	19	19	205	93	.	267	01	1
020	99	PRT	082	75	-	144	75	-	206	00	0	268	54	)
021	42	STO	083	43	RCL	145	43	RCL	207	01	1	269	33	X^2
022	15	15	084	13	13	146	18	18	208	95	=	270	95	=
023	91	R/S	085	54	)	147	95	=	209	22	INV	271	65	×
024	99	PRT	086	65	×	148	42	STO	210	23	LNX	272	93	.
025	42	STO	087	43	RCL	149	19	19	211	55	÷	273	00	0
026	12	12	088	17	17	150	92	RTN	212	53	(	274	01	1
027	01	1	089	95	=	151	68	NOP	213	24	CE	275	65	×
028	42	STO	090	44	SUM	152	68	NOP	214	94	+/-	276	43	RCL
029	17	17	091	16	16	153	00	0	215	85	+	277	14	14
030	71	SBR	092	53	(	154	42	STO	216	01	1	278	95	=
031	00	00	093	43	RCL	155	21	21	217	54	)	279	44	SUM
032	79	79	094	11	11	156	43	RCL	218	95	=	280	26	26
033	32	X:T	095	75	-	157	19	19	219	65	×	281	43	RCL
034	25	CLR	096	43	RCL	158	94	+/-	220	93	.	282	19	19
035	05	5	097	14	14	159	22	INV	221	00	0	283	94	+/-
036	42	STO	098	54	)	160	23	LNX	222	01	1	284	65	×
037	00	00	099	65	×	161	55	÷	223	65	×	285	93	.
038	01	1	100	43	RCL	162	53	(	224	43	RCL	286	00	0
039	00	0	101	17	17	163	24	CE	225	15	15	287	01	1
040	00	0	102	55	÷	164	94	+/-	226	95	=	288	95	=
041	00	0	103	01	1	165	85	+	227	44	SUM	289	22	INV
042	42	STO	104	00	0	166	01	1	228	21	21	290	23	LNX
043	18	18	105	95	=	167	54	)	229	43	RCL	291	55	÷
044	68	NOP	106	44	SUM	168	95	=	230	21	21	292	53	(
045	68	NOP	107	16	16	169	65	×	231	92	RTN	293	24	CE
046	43	RCL	108	53	(	170	43	RCL	232	00	0	294	75	-
047	18	18	109	43	RCL	171	13	13	233	42	STO	295	01	1
048	55	÷	110	12	12	172	95	=	234	26	26	296	54	)
049	01	1	111	75	-	173	44	SUM	235	43	RCL	297	33	X^2
050	00	0	112	43	RCL	174	21	21	236	19	19	298	95	=
051	95	=	113	15	15	175	43	RCL	237	94	+/-	299	65	×
052	42	STO	114	54	)	176	19	19	238	22	INV	300	93	.
053	18	18	115	65	×	177	94	+/-	239	23	LNX	301	00	0
054	71	SBR	116	43	RCL	178	65	×	240	55	÷	302	00	0
055	01	01	117	17	17	179	93	.	241	53	(	303	00	0
056	30	30	118	55	÷	180	01	1	242	24	CE	304	01	1
057	97	DSZ	119	01	1	181	95	=	243	75	-	305	65	×
058	00	00	120	00	0	182	22	INV	244	01	1	306	43	RCL
059	00	00	121	00	0	183	23	LNX	245	54	)	307	15	15
060	46	46	122	95	=	184	55	÷	246	33	X^2	308	95	=
061	98	ADV	123	44	SUM	185	53	(	247	95	=	309	44	SUM

310	26	26
311	43	RCL
312	26	26
313	34	√X
314	35	1/X
315	55	÷
316	43	RCL
317	19	19
318	95	=
319	42	STO
320	20	20
321	65	×
322	01	1
323	93	.
324	09	9
325	06	6
326	95	=
327	42	STO
328	22	22
329	43	RCL
330	19	19
331	23	LNX
332	75	-
333	43	RCL
334	22	22
335	95	=
336	22	INV
337	23	LNX
338	42	STO
339	23	23
340	43	RCL
341	19	19
342	23	LNX
343	85	+
344	43	RCL
345	22	22
346	95	=
347	22	INV
348	23	LNX
349	42	STO
350	24	24
351	98	ADV
352	58	FIX
353	02	02
354	69	OP
355	00	00
356	02	2
357	07	7
358	02	2
359	04	4
360	69	OP
361	04	04
362	43	RCL
363	23	23
364	69	OP
365	06	06
366	69	OP
367	00	00
368	02	2
369	07	7
370	03	3
371	06	6
372	69	OP
373	04	04
374	43	RCL
375	24	24
376	69	OP
377	06	06
378	22	INV
379	58	FIX
380	98	ADV
381	69	OP
382	00	00
383	00	0
384	07	7
385	04	4
386	06	6
387	69	OP
388	04	04
389	43	RCL
390	20	20
391	69	OP
392	06	06
393	98	ADV
394	98	ADV
395	92	RTN
396	81	RST
397	76	LBL
398	11	A
399	01	1
400	42	STO
401	08	08
402	43	RCL
403	13	13
404	42	STO
405	01	01
406	42	STO
407	02	02
408	43	RCL
409	10	10
410	42	STO
411	03	03
412	42	STO
413	04	04
414	01	1
415	42	STO
416	05	05
417	10	E'
418	49	PRD
419	08	08
420	16	A'
421	43	RCL
422	14	14
423	42	STO
424	01	01
425	42	STO
426	02	02
427	43	RCL
428	11	11
429	42	STO
430	03	03
431	42	STO
432	04	04
433	93	.
434	01	1
435	42	STO
436	05	05
437	10	E'
438	49	PRD
439	08	08
440	16	A'
441	43	RCL
442	15	15
443	42	STO
444	01	01
445	42	STO
446	02	02
447	43	RCL
448	12	12
449	42	STO
450	03	03
451	42	STO
452	04	04
453	93	.
454	00	0
455	01	1
456	42	STO
457	05	05
458	10	E'
459	49	PRD
460	08	08
461	16	A'
462	69	OP
463	00	00
464	03	3
465	03	3
466	69	OP
467	04	04
468	43	RCL
469	08	08
470	69	OP
471	06	06
472	98	ADV
473	69	OP
474	00	00
475	02	2
476	07	7
477	02	2
478	02	2
479	00	0
480	00	0
481	03	3
482	03	3
483	69	OP
484	04	04
485	43	RCL
486	08	08
487	28	LOG
488	69	OP
489	06	06
490	69	OP
491	00	00
492	02	2
493	07	7
494	02	2
495	02	2
496	00	0
497	00	0
498	01	1
499	06	6
500	69	OP
501	04	04
502	43	RCL
503	19	19
504	28	LOG
505	69	OP
506	06	06
507	92	RTN
508	81	RST
509	76	LBL
510	16	A'
511	43	RCL
512	19	19
513	94	+/-
514	65	×
515	43	RCL
516	05	05
517	95	=
518	22	INV
519	23	LNX
520	42	STO
521	09	09
522	45	Y^X
523	53	(
524	43	RCL
525	03	03
526	75	-
527	43	RCL
528	01	01
529	54	)
530	95	=
531	49	PRD
532	08	08
533	01	1
534	75	-
535	43	RCL
536	09	09
537	95	=
538	45	Y^X
539	43	RCL
540	01	01
541	95	=
542	49	PRD
543	08	08
544	92	RTN
545	76	LBL
546	10	E'
547	43	RCL
548	04	04
549	75	-
550	43	RCL
551	02	02
552	95	=
553	42	STO
554	06	06
555	32	X:T
556	43	RCL
557	02	02
558	77	GE
559	30	TAN
560	76	LBL
561	35	1/X
562	29	CP
563	43	RCL
564	02	02
565	67	EQ
566	39	COS
567	01	1
568	42	STO
569	07	07
570	43	RCL
571	04	04
572	49	PRD
573	07	07
574	01	1
575	22	INV
576	44	SUM
577	04	04
578	43	RCL
579	02	02
580	22	INV
581	49	PRD
582	07	07
583	97	DSZ
584	02	02
585	05	05
586	70	70
587	43	RCL
588	07	07
589	92	RTN
590	76	LBL
591	30	TAN
592	43	RCL
593	06	06
594	42	STO
595	02	02
596	61	GTO
597	35	1/X
598	76	LBL
599	39	COS
600	01	1
601	92	RTN

MODE D'UTILISATION

I - Introduction du programme dans la calculatrice :

1 - avant introduction des 2 cartes-programme :
taper 3; 2 nd; OP; 17 et lire le nombre 719,29

2 - taper 0 et introduire la carte-programme A dans le sens 1

3 - taper 0 et introduire la carte-programme A dans le sens 2

4 - taper 0 et introduire la carte-programme B dans le sens 3

II - Introduction des données :

1 - taper le nombre de cupules positives

2 - taper R/S

3 - taper le nombre total de cupules inoculées

4 - taper R/S

5 - taper le nombre de cupules positives

6 - taper R/S

7 - taper le nombre total de cupules inoculées

8 - taper R/S

9 - taper le nombre de cupules positives

10 - taper R/S

11 - taper le nombre total de cupules inoculées

12 - taper R/S

III - Résultats :

1 - après quelques secondes d'attente, sont obtenus les résultats :

. N.P.P.= D

. L_i et L_s

. σ_z

2 - taper A et après quelques secondes d'attente, sont obtenus les résultats :

. P

. log P

. log D

- 1er EXEMPLE -

96
96

17
96

0
96

3,15 N.P.P. = D

2,45 L_i
4,05 L_s

0,1276023368 σ_z
0,0000076892 P
-5,1141177310 LG P
0,4983105538 LG D

- 2me EXEMPLE -

86
96

24
96

1
96

2,37 N.P.P. = D

1,90 L_i
2,95 L_s

0,1119172255 σ_z
0,0018075875 P
-2,7429006630 LG P
0,3747483460 LG D

PROGRAMME INFORMATIQUE CONCERNANT LE CALCUL DE L'INDICE N.P.P.

DANS LE CAS GENERAL

(NOMBRE DE DILUTIONS POUVANT ALLER JUSQU'A 8;
FACTEUR DE DILUTION DECIMALE OU AUTRE;
NOMBRE DE CUPULES INOCULEES PAR DILUTION DIFFERENTE)

★★★★★★★★

Ce programme effectué pour la calculatrice TEXAS INSTRUMENT T.I.59 permet :

- le calcul de l'indice N.P.P.
- l'intervalle de confiance de cet indice (95%)

000	76	LBL	060	43	RCL	120	95	=	180	68	NOP	240	88	88
001	11	A	061	13	13	121	42	STO	181	00	0	241	43	RCL
002	99	PRT	062	55	÷	122	19	19	182	42	STO	242	16	16
003	42	STO	063	43	RCL	123	71	SBR	183	16	16	243	92	RTN
004	06	06	064	14	14	124	02	02	184	43	RCL	244	00	0
005	05	5	065	95	=	125	44	44	185	04	04	245	42	STO
006	09	9	066	42	STO	126	77	GE	186	42	STO	246	21	21
007	75	-	067	00	00	127	01	01	187	07	07	247	43	RCL
008	43	RCL	068	01	1	128	41	41	188	06	6	248	04	04
009	04	04	069	44	SUM	129	43	RCL	189	00	0	249	42	STO
010	95	=	070	01	01	130	01	01	190	75	-	250	07	07
011	42	STO	071	43	RCL	131	75	-	191	43	RCL	251	06	6
012	05	05	072	00	00	132	01	1	192	07	07	252	00	0
013	43	RCL	073	65	×	133	55	÷	193	95	=	253	75	-
014	06	06	074	02	2	134	02	2	194	42	STO	254	43	RCL
015	72	ST*	075	45	Y^X	135	45	Y^X	195	10	10	255	07	07
016	05	05	076	43	RCL	136	43	RCL	196	05	5	256	95	=
017	91	R/S	077	01	01	137	02	02	197	02	2	257	42	STO
018	99	PRT	078	95	=	138	95	=	198	75	-	258	10	10
019	42	STO	079	42	STO	139	42	STO	199	43	RCL	259	05	5
020	06	06	080	19	19	140	01	01	200	07	07	260	02	2
021	05	5	081	71	SBR	141	97	DSZ	201	95	=	261	75	-
022	01	1	082	02	02	142	03	03	202	42	STO	262	43	RCL
023	75	-	083	44	44	143	00	00	203	11	11	263	07	07
024	43	RCL	084	77	GE	144	98	98	204	04	4	264	95	=
025	04	04	085	00	00	145	43	RCL	205	04	4	265	42	STO
026	95	=	086	68	68	146	00	00	206	75	-	266	11	11
027	42	STO	087	43	RCL	147	65	×	207	43	RCL	267	04	4
028	05	05	088	01	01	148	02	2	208	07	07	268	04	4
029	43	RCL	089	75	-	149	45	Y^X	209	95	=	269	75	-
030	06	06	090	01	1	150	43	RCL	210	42	STO	270	43	RCL
031	72	ST*	091	95	=	151	01	01	211	12	12	271	07	07
032	05	05	092	42	STO	152	95	=	212	53	(	272	95	=
033	91	R/S	093	01	01	153	42	STO	213	73	RC*	273	42	STO
034	99	PRT	094	09	9	154	19	19	214	11	11	274	12	12
035	42	STO	095	42	STO	155	98	ADV	215	75	-	275	43	RCL
036	06	06	096	03	03	156	69	OP	216	73	RC*	276	19	19
037	04	4	097	68	NOP	157	00	00	217	10	10	277	94	+/-
038	03	3	098	01	1	158	03	3	218	54	)	278	65	×
039	75	-	099	44	SUM	159	00	0	219	65	×	279	73	RC*
040	43	RCL	100	02	02	160	03	3	220	73	RC*	280	12	12
041	04	04	101	43	RCL	161	03	3	221	12	12	281	95	=
042	95	=	102	01	01	162	03	3	222	95	=	282	22	INV
043	42	STO	103	85	+	163	01	1	223	44	SUM	283	23	LNX
044	05	05	104	01	1	164	69	OP	224	16	16	284	55	÷
045	43	RCL	105	55	÷	165	04	04	225	73	RC*	285	53	(
046	06	06	106	02	2	166	43	RCL	226	10	10	286	24	CE
047	72	ST*	107	45	Y^X	167	19	19	227	44	SUM	287	94	+/-
048	05	05	108	43	RCL	168	52	EE	228	13	13	288	85	+
049	01	1	109	02	02	169	58	FIX	229	73	RC*	289	01	1
050	44	SUM	110	95	=	170	02	02	230	11	11	290	54	)
051	04	04	111	42	STO	171	69	OP	231	65	×	291	65	×
052	98	ADV	112	01	01	172	06	06	232	73	RC*	292	73	RC*
053	92	RTN	113	43	RCL	173	22	INV	233	12	12	293	10	10
054	76	LBL	114	00	00	174	58	FIX	234	95	=	294	65	×
055	12	B	115	65	×	175	22	INV	235	44	SUM	295	73	RC*
056	71	SBR	116	02	2	176	52	EE	236	14	14	296	12	12
057	01	01	117	45	Y^X	177	61	GTO	237	97	DSZ	297	95	=
058	81	81	118	43	RCL	178	03	03	238	07	07	298	44	SUM
059	32	XIT	119	01	01	179	07	07	239	01	01	299	21	21

300	97	SZ
301	07	07
302	02	02
303	51	51
304	43	RCL
305	21	21
306	92	RTN
307	00	0
308	42	STO
309	26	26
310	43	RCL
311	04	04
312	42	STO
313	07	07
314	06	6
315	00	0
316	75	-
317	43	RCL
318	07	07
319	95	=
320	42	STO
321	10	10
322	05	5
323	02	2
324	75	-
325	43	RCL
326	07	07
327	95	=
328	42	STO
329	11	11
330	04	4
331	04	4
332	75	-
333	43	RCL
334	07	07
335	95	=
336	42	STO
337	12	12
338	43	RCL
339	19	19
340	94	+/-
341	65	×
342	73	RC*
343	12	12
344	95	=
345	22	INV
346	23	LNX
347	55	÷
348	53	(
349	24	CE
350	75	-
351	01	1
352	54	)
353	33	X^2
354	95	=
355	65	×
356	73	RC*
357	12	12
358	33	X^2
359	65	×
360	73	RC*
361	10	10
362	95	=
363	44	SUM
364	26	26
365	97	DSZ
366	07	07
367	03	03
368	14	14
369	43	RCL
370	26	26
371	34	√X
372	35	1/X
373	55	÷
374	43	RCL
375	19	19
376	95	=
377	65	×
378	01	1
379	93	.
380	09	9
381	06	6
382	95	=
383	42	STO
384	29	29
385	43	RCL
386	19	19
387	23	LNX
388	75	-
389	43	RCL
390	29	29
391	95	=
392	22	INV
393	23	LNX
394	42	STO
395	30	30
396	43	RCL
397	19	19
398	23	LNX
399	85	+
400	43	RCL
401	29	29
402	95	=
403	22	INV
404	23	LNX
405	42	STO
406	31	31
407	98	ADV
408	69	OP
409	00	00
410	02	2
411	07	7
412	02	2
413	04	4
414	69	OP
415	04	04
416	43	RCL
417	30	30
418	52	EE
419	59	FIX
420	02	02
421	69	OP
422	06	06
423	22	INV
424	58	FIX
425	22	INV
426	52	EE
427	69	OP
428	00	00
429	02	2
430	07	7
431	03	3
432	06	6
433	69	OP
434	04	04
435	43	RCL
436	31	31
437	52	EE
438	58	FIX
439	02	02
440	69	OP
441	06	06
442	22	INV
443	58	FIX
444	22	INV
445	52	EE
446	47	CMS
447	25	CLR
448	92	RTN

MODE D'UTILISATION

I - Introduction du programme dans la calculatrice :

1 - taper 1 et introduire la carte-programme dans le sens 1
2 - taper 2 et introduire la carte-programme dans le sens 2

II - Introduction des données :

★ pour la première dilution :

1 - taper le nombre de cupules positives
2 - taper A
3 - taper le nombre total de cupules positives
4 - taper R/S
5 - taper le volume inoculé
6 - taper R/S

★ pour les dilutions suivantes, les mêmes opérations sont répétées.

III - Résultats :

1 - taper B
2 - après quelques secondes d'attente, sont obtenus les résultats :
. N.P.P.
. L_i et L_s

- EXEMPLE -

95
96
1

97
95
0,5

51
89
0,25

17
96
0,125

3,55 00 N.P.P.
3,05 00 L_i
4,13 00 L_s

PROGRAMME INFORMATIQUE CONCERNANT LE CALCUL DE L'INDICE N.P.P.

DANS LE CAS DE TROIS (OU PLUS) DILUTIONS DECIMALES (OU AUTRES)

★★★★★★★★

Ce programme en langage basique, effectué pour le micro-ordinateur ZENITH 89 (Data system), permet :

★ dans le cas de 3 dilutions décimales :

- le calcul de l'indice N.P.P.
- l'intervalle de confiance de cet indice (95%)
- log P
- log D

★ dans le cas général :

- le calcul de l'indice N.P.P.
- l'intervalle de confiance de cet indice (95%)

```
10 OPEN"O",#1,"LP:"
20 PRINT"      3 DILUTIONS DECIMALES     :OPTION 1 "
30 PRINT"        CAS GENERAL             :OPTION 2 "
40 PRINT"           FIN                  :OPTION 3 ":PRINT
50 INPUT"OPTION ";OP
60 IFOP=3THEN940
70 IFOP=2THEN580
80 PRINT:PRINT
90 DIMN1(30),P1(30),N2(30),P2(30),N3(30),P3(30):J=0
100 PRINT"   T=1 SI MPN N'EST PAS LE DERNIER  "
110 PRINT"   T=0 DERNIER MPN A INTRODUIRE   CALCUL  "
120 PRINT:PRINT
130 J=J+1
140 INPUT"VALEURS DE P1,N1,P2,N2,P3,N3,T";P1(J),N1(J),P2(J),N2(J),P3(J),N3(J),T
150 IFT=1THEN130
160 PRINT:PRINT
170 PRINT"          NC                    MPN        LI          LS        LG P       LG D"
180 PRINT#1,"          NC                    MPN        LI          LS        LG P    LG D"
190 PRINT#1,""
200 M=J:FORJ=1TOM
210 P1=P1(J):N1=N1(J):P2=P2(J):N2=N2(J):P3=P3(J):N3=N3(J)
220 B=(N1-P1)+(N2-P2)*.1+(N3-P3)*.01
230 D=0:K=1000:FORI=1TO5
240 K=K/10
250 D=D+K
260 IFD>80THENM1=0ELSEM1=P1*EXP(-D)/(1-EXP(-D))
270 M2=P2*.1*EXP(-D*.1)/(1-EXP(-D*.1))
280 M3=P3*.01*EXP(-D*.01)/(1-EXP(-D*.01))
290 A=M1+M2+M3
300 IFA>BTHEN250ELSED=D-K
310 NEXTI
320 IFD>80THENM1=0ELSEM1=P1*EXP(-D)/((1-EXP(-D))↑2)
330 M2=P2*.01*EXP(-D*.1)/((1-EXP(-D*.1))↑2)
340 M3=P3*1E-04*EXP(-D*.01)/((1-EXP(-D*.01))↑2)
350 R=SQR(1/(M1+M2+M3))
360 R=R/D*1.96
370 LI=EXP(LOG(D)-R):LS=EXP(LOG(D)+R)
380 PR=0:N=N1:P=P1:GOSUB500
390 IFD>80THENPR=L1-D*(N1-P1)ELSEPR=L1-D*(N1-P1)+P1*LOG(1-EXP(-D))
400 N=N2:P=P2:GOSUB500
410 PR=PR+L1-D*.1*(N2-P2)+P2*LOG(1-EXP(-D*.1))
420 N=N3:P=P3:GOSUB500
430 PR=PR+L1-D*.01*(N3-P3)+P3*LOG(1-EXP(-D*.01))
440 A$="   ##/## ##/## ##/##    ###.##    ###.##    ###.##    ###.##    ##.###"
450 PRINTUSINGA$;P1(J),N1(J),P2(J),N2(J),P3(J),N3(J),D,LI,LS,PR/LOG(10),@
LOG(D)/LOG(10)
460 PRINT#1,USINGA$;P1(J),N1(J),P2(J),N2(J),P3(J),N3(J),D,LI,LS,@
PR/LOG(10),LOG(D)/LOG(10)
470 NEXTJ
480 ERASEN1,P1,N2,P2,N3,P3
490 PRINT#1,"":PRINT#1,"":GOTO20
500 IFP=0THEN570
510 IFP>N-PTHENP=N-P
520 IFP=0THEN570
530 L1=0:FORI=PTO1STEP-1
540 L1=L1+LOG(N)-LOG(I):N=N-1
550 NEXTI
560 RETURN
570 L1=LOG(1):RETURN
580 DIMP(20),V(20),M(20),A(20)
590 PRINT:PRINT
600 INPUT"NB DE NIVEAUX";H
610 FORI=1TOH
620 INPUT"VALEURS DE P,N,V";P(I),N(I),V(I)
630 NEXTI
640 PRINT
650 B=0:P=0:Q=0:FORI=1TOH
660 B=B+(N(I)-P(I))*V(I):P=P+P(I):Q=Q+V(I)*N(I):NEXTI
670 K=0:F=P/Q
680 K=K+1:GOSUB900
690 IFA>BTHEN680ELSEK=K-1
700 FORJ=1TO9
710 K=K+1/2↑J:GOSUB900
720 IFA>BTHEN710ELSEK=K-1/2↑J
730 NEXTJ
740 D=F*2↑K
750 M=0:FORI=1TOH
760   IF(D*V(I))>80THENM(I)=0ELSEM(I)=P(I)*V(I)↑2*EXP(-V(I)*D)@
/((1-EXP(-V(I)*D))↑2)
770 M=M+M(I):NEXTI
780 R=(SQR(1/M))/D
790 LI=EXP(LOG(D)-1.96*R):LS=EXP(LOG(D)+1.96*R)
800 A$="        ##/##        #.###↑↑↑↑        "
810 B$="    MPN=#.###↑↑↑↑   LI=#.###↑↑↑↑    LS=#.###↑↑↑↑ "
820 FORI=1TOH
830 PRINT#1,USINGA$;P(I),N(I),V(I)
840 PRINTUSINGA$;P(I),N(I),V(I):NEXTI
850 PRINT#1,USINGB$;D,LI,LS
860 PRINTUSINGB$;D,LI,LS
870 PRINT:PRINT:PRINT#1,"":PRINT#1,""
880 ERASEP,V,M,A
890 GOTO20
900 D=F*2↑K:A=0:FORI=1TOH
910 IF(D*V(I))>80THEN A(I)=0ELSE A(I)=P(I)*V(I)*EXP(-V(I)*D)/(1-EXP(-V(I)*D))
920 A=A+A(I):NEXTI
930 RETURN
940 END
```

- 1er EXEMPLE -

Cas de 3 dilutions décimales

N.C.			N.P.P.= D	L_i	L_s	LG P	LG D
96/96	74/96	12/96	14.49	11.54	18.19	- 1.95	1.161
96/96	96/96	0/96	23.97	18.64	30.82	-13.97	1.380
96/96	17/96	0/96	3.15	2.45	4.05	- 5.11	0.498
96/96	0/96	0/96	2.31	1.80	2.96	-14.95	0.364

- 2me EXEMPLE -

Cas général

95/96	0.100 E + 01
87/95	0.500 E + 00
51/89	0.250 E + 00
17/96	0.125 E + 00

N.P.P. = 0.355 E + 01 L_i = 0.305 E + 01 L_s = 0.413 E + 01