Ensemble pour s'améliorer

NOTE TECHNIQUE N°8

- Microbiologie des eaux -

Recherche et dénombrement des coliformes et d' *E. coli*

Incertitude associée à la couleur des colonies observées sur milieu CCA

Ce document est diffusé à titre informatif et est basé sur des travaux menés à A.G.L.A.E. pour accompagner les membres de son réseau dans l'optimisation de leurs pratiques analytiques.

07/10/2016

Rédacteurs : Philippe Guarini et Cédric Vanhems

Association AGLAE
Parc des Pyramides
427 rue des Bourreliers
59320 Hallennes lez Haubourdin
☎ 03 20 16 91 40
contact@association-aglae.fr
www.association-aglae.fr

RESUME

La méthode normalisée internationale de recherche et de dénombrement dans l'eau des germes coliformes et plus spécifiquement de l'espèce *Escherichia coli* a été modifiée fin 2014.

Elle consiste dorénavant en l'utilisation d'un milieu de type nouveau pour le domaine de l'analyse de l'environnement : un milieu chromogène, le Chromagar, dont la lecture repose sur la couleur des colonies. Si la colonie est pigmentée de bleu, il s'agit d'*Escherichia coli*. Si elle est rose, il s'agit d'un autre coliforme.

Quel est l'ordre de grandeur des variations de couleur d'une souche à l'autre ? Et quelle est l'incertitude associée à la perception de cette couleur par le microbiologiste ?

Pour tenter de répondre à ces questions, et par là même évaluer la praticabilité et l'efficacité de la nouvelle méthode, AGLAE a mené une expérimentation en 2015.

Les résultats de cette étude réalisée sur un petit nombre de souches sont mitigés.

Point positif : malgré des écarts significatifs de couleur d'une souche à l'autre et malgré des divergences entre microbiologistes dans la perception de ces couleurs, il apparaît que la pigmentation du centre des colonies est un critère fiable.

Mais il apparaît aussi que sur les petites colonies la pigmentation n'est pas suffisamment développée.

Enfin, et c'est là un peu plus inquiétant, parmi les souches testées plusieurs présentent des réponses singulières ; en particulier pour la distinction des *Escherichia coli* avec les autres coliformes.

Au niveau français, cette méthode pas encore en application pourrait devoir l'être prochainement ; selon ce que décideront les pouvoirs publics chargés du contrôle sanitaire.

Le poster présenté à Poitiers lors des Journées Information Eaux des 11, 12 et 13 octobre 2016 constitue un résumé plus détaillé des résultats de la présente étude. Il est disponible sur demande à l'adresse suivante :
contact@association-aglae.fr

ABSTRACT

The international standard method to detect and enumerate in water coliform bacteria and more specifically *Escherichia coli* was modified at the end of 2014.

It consists from now on in using a type of agar medium new for the analysis of the environment: a chromogenic medium, Chromagar, for which the reading of colonies is based on the colonies colour. If the colony appears blue, it is *Escherichia coli*. If it is pink, it is another coliform bacteria.

What is the order of magnitude of the colour variations from one strain to another? And what is the uncertainty associated with the perception of this colour by the microbiologist?

In order to address these questions, and also evaluate the practicability and efficiency of this new method, AGLAE conducted experiments in 2015.

The results of this study based on a small number of strains are mixed.

Positive point: despite of significant colour differences from one strain to another and despite of divergences between microbiologists in the perception of these colours, it seems that the pigmentation of the colonies centre is a reliable criterion.

But it also appears that on small colonies the pigmentation is not sufficiently developed.

Then, and this is a bit more disturbing, among the tested strains, several presented singular responses; in particular for the distinction of *Escherichia coli* among other coliform bacteria.

At the French level, this method is not enforced yet but it could soon be; depending on what the public authorities in charge of the sanitary control will decide.

The poster presented in Poitiers for the « Journées Information Eaux »* of the 11, 12 and 13 October 2016 is a more detailed summary of the present study.
It is available upon request at the following address:
contact@association-aglae.fr

**water information day*

SOMMAIRE

1	**Introduction**	page 5/38
2	**Plan d'expériences réalisé**	page 7/38
3	**Exploitation des données**	page 11/38
	3.1 Structure des données disponibles	page 11/38
	3.2 Exploitation statistique réalisée	page 13/38
4	**Résultats et discussion**	page 14/38
5	**Conclusion**	page 19/38
	Annexe	page 21/38

1 INTRODUCTION

De longue date, les coliformes étaient définis dans la normalisation comme des **bactéries Gram négatif**, en forme de **bâtonnet**, ne formant pas de spores, présentant une réaction négative à l'oxydase, pouvant croître en présence de sels biliaires et normalement capables de **fermenter le lactose** avec production d'acide et d'aldéhyde en 48 heures lorsqu'on les fait incuber à une température de 36 ± 2 °C. Les critères de recherche et d'identification de la méthode spécifiée (méthode TTC – norme NF EN ISO 9308-1 de septembre 2000) étaient la **fermentation du lactose** (critère présomptif) et **l'oxydase négative** (confirmation).

Dans la continuité, *Escherichia coli (E. coli)* était défini comme une **bactérie coliforme** produisant de **l'indole** à partir du tryptophane dans les 21 ± 3 heures à **44 ± 0,5 °C**.

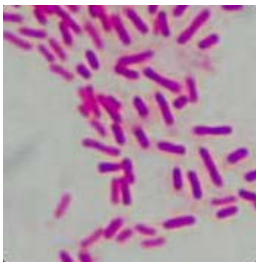


Image 1 : coloration de Gram sur un *E. coli*

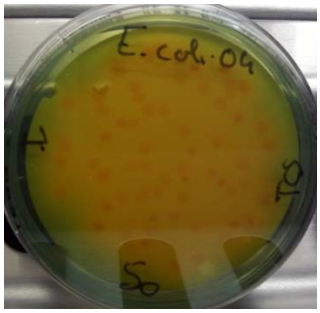


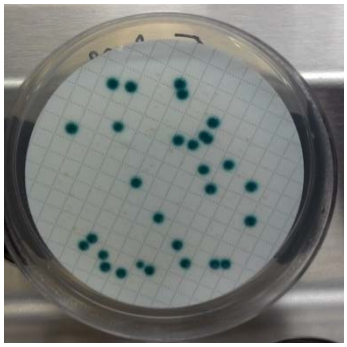
Image 2 : colonies caractéristiques d'*E. coli* sur milieu TTC

A noter le halo jaune envahissant toute la boîte, consécutif à une acidification généralisée du milieu par fermentation du lactose.

En 2010, les instances internationales de normalisation (groupe « Qualité de l'eau - Méthodes microbiologiques » ISO/TC147/SC4) ont démarré des travaux qui ont abouti sur un **changement radical des critères** de recherche et d'identification. Dorénavant :

- pour les **coliformes** le critère présomptif est la **présence de l'enzyme β-galactosidase** (β-gal) – la confirmation par le test oxydase reste d'actualité
- pour ***E. coli*** le critère distinctif est la **présence spécifique de l'enzyme β-glucuronidase** (β-glu), en plus de la **β-gal** qui est caractéristique des coliformes

La **norme ISO 9308-1 a été révisée**. La nouvelle version a été publiée en **septembre 2014**, avec ces nouveaux critères mis en œuvre dans le cadre d'une nouvelle méthode (**méthode CCA**) sur milieu sélectif chromogène : le **Chromagar**.



recto

verso

Image 3: colonies typiques d'*E. coli* sur milieu CCA, colonies de couleur bleu nuit caractérisant l'activité simultanée des deux enzymes β-gal et β-glu

Ce changement a évidemment un impact sur les résultats de mesures. En effet, pour quelque méthode que ce soit il y a toujours des faux positifs et surtout des faux négatifs. Tout changement de méthode implique un déplacement du panel des souches mal identifiées et génère une certaine rupture dans la continuité du contrôle sanitaire. Des échantillons qui répondaient négativement avec l'ancienne méthode peuvent répondre positivement avec la nouvelle, et inversement.

La norme **ISO 9308-1 (sept 2014)** a finalement **été adoptée par l'organisme européen de normalisation (le CEN)**. Selon les accords de Vienne, elle est donc devenue d'usage obligatoire dans tous les pays de la Communauté Européenne.
Néanmoins, en date de rédaction du présent document, l'organisme français de normalisation (l'AFNOR) n'a toujours pas enregistré l'ISO 9308-1 (sept 2014) comme norme nationale. La France est d'ailleurs le seul pays de la Communauté à tarder à appliquer les accords de Vienne. La raison de cet écart est réglementaire : déjà échaudée en 2006 par la révision de la méthode de recherche et de dénombrement des staphylocoques coagulase + (voir note ci-après), la Direction Générale de la Santé (DGS) est très réservée sur le changement de norme ISO 9308-1 et a commandité une étude (en cours) à l'Agence Nationale de Sécurité Sanitaire de l'Alimentation, de l'Environnement et du Travail (l'ANSES).

Note : En 2006, l'AFNOR (commission T90D « Microbiologie des eaux ») a révisé la norme NF T 90-421 (oct 89) « Essais des eaux – Examens bactériologiques des eaux de piscines » et a créé la norme XP T90-412 (juin 2006) traitant spécifiquement de la recherche et du dénombrement des staphylocoques pathogènes. A cette occasion, a été introduite la possibilité d'utiliser un autre milieu de culture que le traditionnel Chapman-mannitol : le Baird-Parker, avec ou sans plasma de lapin et fibrinogène. Dès les quelques mois ayant suivi la publication de cette nouvelle norme, des disparités majeures sont apparues : les différents milieux autorisés par la nouvelle norme se sont avérés pas complètement équivalents !

Dans quelle mesure l'aspect des colonies peut-il impacter le résultat de mesure, sur ce nouveau type de milieu pour l'environnement qu'est un milieu chromogène ? En particulier, la distinction des couleurs entre coliformes non *E. coli* et *E. coli* est-elle suffisamment franche pour qu'il n'y ait pas d'ambiguïté ? Et la perception des couleurs par les techniciens chargés de la lecture des boîtes interfère-t-elle sur le résultat de mesure ?
C'est ce que nous avons voulu examiner (sans prétendre être exhaustif) lors de cette étude, en mettant en œuvre un plan d'expériences adapté.

Avant de commencer, précisons que ce travail a été réalisé par **Cédric Vanhems** dans le cadre de son stage de fin d'étude qu'il a réalisé à AGLAE, dans l'objectif d'obtenir la licence professionnelle MEB de l'IUT A de l'Université de Lille 1, cursus soutenu et auquel contribue largement AGLAE.

Cédric fait désormais partie du personnel d'AGLAE.

2 PLAN D'EXPERIENCES REALISE

L'expérimentation réalisée consistait à produire des boîtes représentatives de situations analytiques normales, ceci à partir de plusieurs souches bactériennes, et à les faire lire par plusieurs techniciens plus ou moins familiers des milieux chromogènes.

La première étape a été de préparer les matériaux à analyser comme des matériaux d'essais interlaboratoires. Chaque matériau a été dopé par une unique souche, pour atteindre un niveau de charge bactérienne entre 10 et 40 germes dans 100 mL. Il est important de respecter cet objectif de charge bactérienne conduisant à un nombre raisonnable de colonies sur les boîtes lors de l'analyse. En effet, une confluence des colonies risquerait d'en modifier l'aspect et la couleur. Les tableaux 1.1 et 1.2 ci-dessous répertorient les 25 souches testées.

Référence Souche (interne à AGLAE)	Espèce	Origine	Réponse attendue pour le paramètre	
			E. coli	coliformes totaux
E.col-01	*Escherichia coli*	WDCM 00012 (ATCC 8739)	+	+
E.col-02	*Escherichia coli*	environnement	+	+
E.col-03	*Escherichia coli*	environnement	+	+
E.col-04	*Escherichia coli*	environnement	+	+
E.col-05	*Escherichia coli*	WDCM 00179 (CIP 106878)	+	+
E.col-07	*Escherichia coli*	environnement	+	+
E.col-08	*Escherichia coli*	environnement	+	+
E.col-10	*Escherichia coli*	médicale	+	+
E.col-12	*Escherichia coli*	environnement	+	+
E.col-13	*Escherichia coli*	environnement	+	+
E.col-16	*Escherichia coli*	environnement	+	+
E.col-24	*Escherichia coli*	environnement	+	+
E.col-26	*Escherichia coli*	environnement	+	+
E.col-30	*Escherichia coli*	environnement	+	+

Tableau 1.1 : Liste exhaustive des souches d'*Escherichia coli* testées

Référence Souche (interne à AGLAE)	Espèce	Origine	Réponse attendue pour le paramètre	
			E. coli	coliformes totaux
En.clo-02	*Enterobacter cloacae*	RIVM WR3	-	+
R.ter-02	*Raoultella terrigena*	environnement	-	+
Y.ent-10	*Yersinia enterocolitica*	médicale	-	+
A.spp-02	*Aeromonas spp*	environnement	-	-
Pan.spp-01	*Pantoea spp*	environnement	-	+
L.ade-01	*Leclercia adecarboxylata*	environnement	-	+
S.fon-01	*Serratia fonticola*	ATCC 29845	-	+
K.pneu-02	*Klebsiella pneumoniae*	environnement	-	+
E.sak-01	*Cronobacter sakazakii*	environnement	-	+
S.spp-01	*Salmonella spp*	environnement	-	+
C.fre-02	*Citrobacter freundii*	environnement	-	+

Tableau 1.2 : Liste exhaustive des souches autres qu'*E. coli* testées

La seconde étape a été d'analyser extemporanément les matériaux, comme prévu par la méthode CCA.

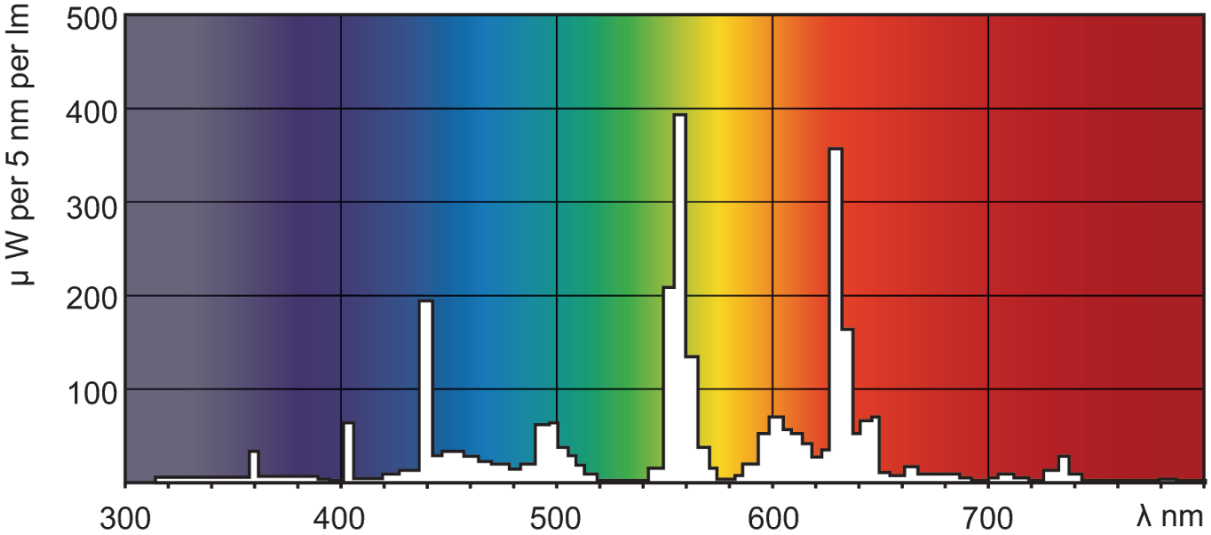
A l'issue de l'incubation, les boîtes ont été données à lire à quatre techniciens qui seront identifiés par leur prénom : Cédric, Nicolas, Mylène et Rose-Marie.

Des consignes précises de lecture ont été données.

En premier lieu, la nature de l'éclairage a été fixée.
En effet, indubitablement le spectre lumineux de la lampe sous laquelle on lit a des répercussions sur la perception que l'on a des couleurs. Un objet bleu sous une lumière bleue apparaît bleu. Un objet bleu sous une lumière rouge apparaît noir. Un objet jaune (mélange de rouge et de vert) apparaît rouge sous une lumière rouge, et noir sous une lumière bleue. Deux couleurs peuvent apparaître différentes sous un éclairage, et apparaître identiques sous un autre. C'est le phénomène de métamérisme.

Toutes les boîtes ont été lues sous la lampe du poste de sécurité microbiologique (PSM) du laboratoire. Il s'agit d'un tube fluorescent MASTER TL5 HO 39W/840 UNP (Philips) dont les principales caractéristiques techniques sont les suivantes :

- **sa puissance spectrale est présentée dans le graphique 1 ci-dessous.**



en abscisse : longueur d'onde exprimée en nm
en ordonnée : puissance exprimée en µW, ceci pour une tranche de longueurs d'onde de 5 nm, et pour 1 lumen de puissance perçue.

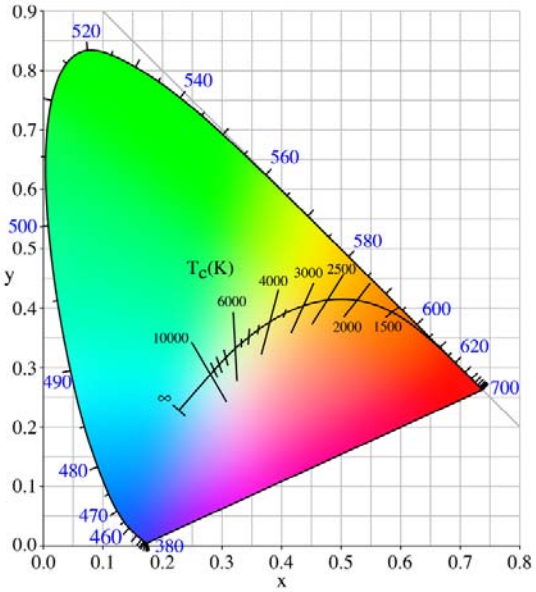
Graphique 1 : puissance spectrale du tube fluorescent MASTER TL5 HO 39W/840 UNP Philips

Pour mémoire, le lumen (abréviation lm) est une unité de puissance comme le W, mais de puissance perçue. Dans le Système International des poids et mesures (SI), lm = cd.sr (cd est le candela, unité de mesure de l'intensité lumineuse, sr est le stéradian, unité de mesure de l'angle solide). A une longueur d'onde de 555 nm (dans le jaune – vert), 1 W = 683 lm. Cette longueur d'onde correspondant au maximum de sensibilité de l'œil humain en vision dite « photopique », c'est-à-dire en vision diurne. Lorsque la longueur d'onde varie, la sensibilité de l'œil humain décroit et la correspondance entre W et lm change. Par exemple, dans l'orange et dans le turquoise l'œil humain ne perçoit plus que 60% environ de la puissance qu'il aurait perçue dans le jaune – vert. La correspondance devient 1W = 410 lm. De la même façon, lorsque la longueur d'onde est en dehors du visible (380 à 780 nm), 1W = 0 lm. En moyenne pour une lumière blanche : 1 W = 240 lm.

- **sa température de couleur est 4000 °K**

La température de couleur est une caractérisation de la couleur des lumières qui servent en éclairage, par comparaison à celles d'un matériau idéal émettant de la lumière uniquement par l'effet de la chaleur. La couleur de la source lumineuse est comparée à celle d'un corps noir théorique chauffé entre 2000 et 10000°K, qui aurait dans le domaine de la lumière visible un spectre d'émission similaire à la couleur considérée.

Le graphique 2 ci-dessous présente la correspondance de la couleur avec la température, telle que normalisée par la Commission internationale de l'éclairage (CIE).



en abscisse : coordonnée chromatique x (grandeur sans unité)
en ordonnée : coordonnée chromatique y (grandeur sans unité)
en bleu : les longueurs d'ondes monochromatiques

Graphique 2 : diagramme chromatique x,y de la CIE (1931), incluant le lieu planckien avec indication des températures Tc en °K

Le terme de lieu planckien fait référence à Max Planck, qui introduisit la théorie des quanta pour expliquer le rayonnement du corps noir.
Paradoxalement, les couleurs dites « chaudes » ont des températures de couleur basses, par exemple la flamme d'une bougie à 1850°K dont la dominante de couleur est dans le jaune – orange. A l'inverse, les couleurs dites « froides » présentent des températures élevées, par exemple la lumière d'un flash photographique dont la dominante de couleur est le bleu.
A 4000°K, la lumière présente un léger déficit de bleu par rapport à la lumière solaire qui est à 6500°K.

- **son indice de rendu de couleurs est 82 [80, 85]**

  L'indice de rendu des couleurs (IRC) est la capacité d'une source de lumière à restituer les différences entre couleurs dans le spectre du visible. C'est un indicateur qui, à une température de couleur donnée, prend conventionnellement des valeurs entre 0 et 100 : 100 correspond au spectre du corps noir chauffé à la température considérée ; 0 correspond à la couleur monochromatique. Plus l'IRC est élevé, meilleure est la continuité du spectre. Pour éviter le problème de métamérisme, il est conseillé de travailler à des IRC supérieurs ou égaux à 90.

Avec cet éclairage, sans être dans des conditions idéales les techniciens (qui seront qualifiés de « lecteurs » dans la suite du document) étaient dans un environnement adapté et maîtrisé.

En second lieu, un référentiel de couleurs a été fourni aux lecteurs.
Un nuancier de référence a été acquis et mis à disposition du lecteur au moment de la manipulation, avec pour consigne d'identifier la couleur la plus proche de celle qu'il perçoit.
La référence internationale en matière de nuances de couleurs porte le nom de Pantone. Commercialisée par la société américaine Pantone Inc., elle prend la forme d'une gamme complète de 1755 couleurs normalisées, obtenues par combinaison de 9 encres de base. Ce nuancier est essentiellement utilisé en imprimerie, dans l'industrie textile, l'industrie plastique, ..., partout là où les mesures de nuances de couleurs sont essentielles et doivent être comparables à une large échelle.

Comme tout étalon de référence, le Pantone a une durée de vie limitée. Néanmoins, on ne ré-étalonne pas un Pantone. Au bout de deux ans il faut simplement le remplacer, l'encre ayant pu être altérée par l'exposition à l'air ou aux UV.

En troisième lieu, plusieurs zones de lectures ont été spécifiées.
Il s'agissait pour les lecteurs de déterminer la couleur (par comparaison au Pantone) du centre de la colonie, du pourtour de la colonie, et au revers de la boîte. La lecture du pourtour de la colonie est particulièrement intéressante, car elle renseigne sur ce que peut être l'aspect d'une colonie de petite taille.
Les quatre lecteurs ont tous lu la même boîte pour chacune des souches. Il leur avait été indiqué qu'une seule souche était présente sur la boîte, à charge pour eux de choisir (pour effectuer le relevé) la colonie la plus caractéristique de l'ensemble de la boîte. Sinon, aucune information ne leur avait été donnée sur la nature de la souche. Et tous les lecteurs ont lu de manière complètement indépendante, dans un intervalle de temps aussi court que possible (en pratique sur une demi-journée).

Les matériaux d'essais préparés pour cette expérimentation n'ont pas été détruits après mise en analyse extemporanément. Ils ont été placés en chambre froide à 5 ± 3 °C jusqu'au lendemain matin (soit environ 18 heures), pour être à nouveau analysés et lus par les quatre mêmes lecteurs, ceci dans les mêmes conditions.

3 EXPLOITATION DES DONNEES

3.1 Structure des données disponibles

Chaque lecteur a donc remis pour chaque souche et sur chacun des deux jours :

- un code Pantone correspondant à la couleur perçue pour le centre d'une colonie typique de la boîte
- un code Pantone correspondant à la couleur perçue pour le pourtour de cette même colonie
- un code Pantone correspondant à la couleur perçue au revers de la boîte

Le code Pantone est une référence. Il ne matérialise pas la nature intrinsèque de la couleur et n'est donc pas exploitable en tant que tel.

En conséquence, une phase préparatoire au traitement de données a dû être réalisée : restructurer l'information collectée pour la rendre exploitable ; concrètement, il s'agissait de convertir les codes Pantone.

Il existe plusieurs systèmes de représentation numérique de la couleur. Les trois essentielles sont la représentation hexadécimale (HEX), la représentation rouge-vert-bleu (RVB), et la représentation teinte-saturation-lumière (TSL).

La représentation RVB est rapidement apparue comme la plus pertinente pour la présente étude, puisque le mélange rouge/vert/bleu est la base physiologique de la reconnaissance des couleurs par l'œil humain en vision diurne. La rétine est en effet composée de quatre types de terminaisons nerveuses :

- les bâtonnets, impliqués dans la vision nocturne en noir et blanc
- les cônes présentant un maximum d'absorbance à 420 nm (dans le bleu)
- les cônes présentant un maximum d'absorbance à 534 nm (dans le vert)
- et les cônes présentant un maximum d'absorbance à 564 nm (dans le rouge)

La représentation RVB est la juxtaposition de trois entiers naturels compris entre 0 et 255 (inclus), chacun quantifiant l'intensité de la couleur élémentaire (rouge, vert ou bleu) dans le mélange. Le code RVB de la couleur bordeaux ● est par exemple 109/7/26, ce que l'on peut interpréter de la façon suivante : 109 parts de rouge + 7 parts de vert + 26 parts de bleu. Le code RVB de la couleur blanc est 255/255/255 ; celui du noir est 0/0/0.

Il est aisé de convertir les Pantone en RVB (ou en HEX, ou en TSL, …). Il existe des formules pour cela, souvent reprises dans des tables facilement accessibles.

A noter qu'en cours de traitement des données, la représentation RVB s'est avérée difficile à interpréter, et il a été décidé de basculer sur la représentation TSL.

La représentation TSL ne fonctionne pas en mélange de couleurs fondamentales comme la représentation RVB, mais distingue trois axes indépendants : la teinte T, la saturation S et la lumière L. Ces trois composantes sont chacune quantifiées par un entier naturel compris entre 0 et 255 (inclus) :

- la teinte T balaye toutes les nuances du rouge (T=0) au rouge (T=255, équivalant à T=0), en passant par le vert (T=85) et le bleu (T=170)
- la saturation définit la pureté de la couleur : S=255 correspond à la couleur pure ; S=0 correspond à la couleur « sale » (à S=0 tout est gris)
- la lumière définit la luminosité : à L=255, la couleur est aveuglante et apparaît blanche ; à L=0 il n'y a aucune luminosité et la couleur apparaît noire

Les grandeurs mesurées lors de notre expérimentation sont donc au nombre de neuf : R, V et B (ou en TSL : T, S et L) ; ceci pour le centre de la colonie, pour son pourtour, et au revers de la boîte. Elles sont notées :

- pour la représentation RVB : R-centre, V-centre, B-centre, R-pourtour, V-pourtour, B-pourtour, R-dos (pour le revers de la boîte), V-dos et B-dos
- pour la représentation TSL : T-centre, S-centre, L-centre, T-pourtour, S-pourtour, L-pourtour, T-dos, S-dos et L-dos

La matrice des données à exploiter prend donc la forme du tableau 2 page suivante.

	Souche	Lecteur	Jour	T-centre	S-centre	L-centre	T-pourtour	S-pourtour	L-pourtour	T-dos	S-dos	L-dos
1	E.col-01	Cédric	1	140	90	93	242	96	185	196	255	70
2	E.col-01	Nicolas	1	142	94	103	232	99	213	154	255	74
3	E.col-01	Mylène	1	188	26	142	204	35	160	189	255	76
4	E.col-01	Rose	1	165	95	150	222	93	142	198	65	125
5	E.col-02	Cédric	1	143	40	149	248	232	222	234	138	159
6	E.col-02	Nicolas	1	142	94	103	232	99	213	154	255	74
⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮
84	C.fre-02	Rose	2	145	173	103	185	118	130	192	255	60
85	E.col-01	Cédric	2	139	171	55	139	171	55	168	105	85
86	E.col-01	Nicolas	2	140	90	93	232	109	224	164	182	63
87	E.col-01	Mylène	2	168	49	129	194	43	161	189	255	76
88	E.col-01	Rose	2	141	87	119	196	107	121	198	201	57
89	E.col-02	Cédric	2	140	90	93	233	94	219	238	114	105
⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮

→ 9 grandeurs mesurées sur 200 observations (25 souches x 4 lecteurs x 2 jours)

Tableau 2 : structure de la matrice des données exploitées

3.2 Exploitation statistique réalisée

La matrice des données observées a été exploitée grâce à une méthode d'analyse multivariée portant le nom d'**analyse en composante principale** (ACP).

L'ACP est une technique statistique dont l'objectif est de repérer l'existence d'une variable cachée derrière l'ensemble des grandeurs que l'on étudie. En d'autres termes, il s'agit de détecter des **synergies** ou des **antagonismes** entre grandeurs ; dans notre cas, détecter des synergies ou des antagonismes entre R-centre, V-centre, etc… à partir des 200 observations collectées.

S'il apparaît que plusieurs grandeurs évoluent ensemble (dans le même sens pour la synergie, en sens contraire pour l'antagonisme), c'est que derrière les grandeurs étudiées se cache en réalité une seule et même variable qui gouverne (au moins partiellement) les variations des grandeurs concernées. Cette variable en arrière plan est appelée **composante**.

L'ACP ne se contente pas de détecter l'existence de ces composantes. Elle propose une quantification de leur dispersion. Chaque observation est en effet quantitativement positionnée par rapport aux composantes mises en évidence, permettant la conception d'un véritable modèle.

En revanche, l'ACP n'identifie pas les composantes. C'est à l'utilisateur d'investiguer et de confronter chaque composante aux informations dont il dispose par ailleurs (dans notre cas, les informations sur les souches, sur les lecteurs, …).

L'ACP est généralement utilisée pour traiter des tableaux de grande dimension : nombreuses grandeurs mesurées et nombreuses observations, sachant qu'il doit toujours y avoir au moins trois fois plus d'observations que de grandeurs mesurées. D'ailleurs, avec les neuf grandeurs mesurées de cette étude, on peut davantage voir l'utilisation de l'ACP comme un moyen de dé-corréler les grandeurs mesurées, que comme un moyen d'identifier des composantes cachées.

Les détails du calcul de l'ACP ne seront pas exposés ici. Il s'agit de calculs que les statisticiens eux-mêmes délèguent à des outils informatiques dument programmés et validés (les calculs peuvent être trouvés dans de

nombreux ouvrages traitant de statistiques et de probabilité, dont: Probabilités, Analyse des données et Statistique, G. Saporta, éditions Technip).
Pour le traitement des données de cette étude nous avons travaillé avec le logiciel Statgraphics XVI. Les résultats du calcul y sont formulés de manière simple et conviviale, permettant de se focaliser sur l'interprétation.

4 RESULTATS ET DISCUSSION

En amont de la réalisation de l'ACP, un examen technique des données observées a été réalisé. Des particularités sont immédiatement apparues :

- plusieurs boîtes ne présentaient pas le niveau de charge attendu :

- la boîte de *Leclercia adecarboxylata* (L.ade-01) présentait seulement quelques colonies roses de petite taille, alors qu'il s'agit d'un coliforme qui aurait dû pousser davantage
- la boîte de *Yersinia enterocolitica* (Y.ent-10) ne présentait aucune colonie ; là aussi il s'agit d'un coliforme qui aurait dû pousser, et qui du reste avait poussé un peu mieux lors d'expérimentations préliminaires
- la boîte d'*Escherichia coli* référencée E.col-05 ne présentait aucune colonie ; cette souche avait poussé également lors d'expérimentations antérieures
- la boîte de *Serratia fonticola* (F.fon-01) ne présentait aucune colonie ; au moins quelques-unes auraient dû être observées pour ce coliforme

> ☞ ces quatre souches de coliformes pourraient présenter une sensibilité particulière vis-à-vis de la méthode CCA (qu'elles ne présentent pas vis-à-vis de la méthode TTC) : selon les circonstances, le rendement de la méthode pour ces souches pourrait fluctuer de manière notable ; **ceci mériterait néanmoins d'être confirmé**, ce qui n'a pas pu être fait en date de rédaction du présent document

- une boîte ne présentait pas de colonie, comme on pouvait l'attendre :

- la boîte d'*Aeromonas spp* (A.spp-02) ne présentait aucune colonie ; ce résultat est cohérent puisqu'il ne s'agit pas d'un coliforme, et que sur TTC déjà cette souche interférente est fortement inhibée

> ☞ **ce résultat mériterait d'être complété** par l'examen de la pigmentation d'interférents poussant sur CCA (car il en existe)

- trois cas particuliers observés lors d'expérimentations préliminaires se sont confirmés

- la boîte relative à la souche de *Salmonella* (S.spp-01) a présenté le nombre attendu de colonies, mais celles-ci n'étaient pas pigmentées ; ce résultat s'explique par l'absence connue de la β-gal et de la β-glu chez *Salmonella* ; considéré comme coliforme avec l'ancienne définition (reposant sur la fermentation du lactose) ce genre bactérien ne l'est plus avec la nouvelle méthode

- le *Citrobacter freundii* testé (C.fre-02) s'est révélé être un faux positif pour le paramètre *E. coli* ; l'existence de faux positifs pour le paramètre *E. coli* sur le critère β-glu, comme observé ici sur C.fre-02, est documentée dans la littérature ; l'article suivant fait par exemple état de l'observation de plusieurs souches de *Citrobacter freudii* β-glu + ; 10 ont été trouvées lors d'une étude portant sur 990 souches différentes appartenant à des genres et des espèces différents, et d'origine clinique (3/4 des souches) ou environnementale (1/4 des souches).

  Evaluation of a commercial beta-glucuronidase test for the rapid and economical identification of *Escherichia coli*. Pérez JL, Berrocal CI, Berrocal L. J Appl Bacteriol. 1986 Dec; 61(6):541-5.

  Les autres souches mentionnées dans cet article comme faux positifs pour le paramètre *E. coli* appartiennent aux espèces *Shigella sonnei*, *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter aerogenes* et *Salmonella enteritidis* (sans précision sur le caractère β-gal).

  ☞ les données ont été conservées pour le traitement en ACP

- l'*Escherichia coli* isolé de l'environnement E.col-04 a présenté un polymorphisme rendant la lecture des boîtes ambigüe ; si certaines colonies présentaient un centre bleu suffisamment marqué, pour d'autres la coloration rose du pourtour dominait jusqu'à conduire à les interpréter comme coliforme non *E. coli*.

  ☞ les données des deux types de colonies ont été intégrées à la matrice à exploiter en ACP

- à mentionner également :

- *l'Escherichia coli* E.col-02 a présenté une pigmentation intermédiaire évoluant avec l'âge de l'échantillon (gris/rosé à bleu le premier jour, donc faux négatif potentiel, et plus franchement bleu le second jour).

Au final, la matrice des données à traiter ne comportaient plus que 160 observations sur les 200 de départ. Il y avait bien trois fois plus d'observations que de grandeurs mesurées.

Le cheminement de l'exploitation réalisée en ACP est présenté en annexe.

Initialement lancée sur les données en représentation RVB, l'ACP a rapidement été réorientée sur les données en représentation TSL. En effet, l'interprétation des axes en représentation RVB a posé des difficultés ; difficultés contournées en représentation TSL.

A noter que pour la teinte T, il a fallu user d'un subterfuge pour assurer la continuité de l'échelle de la grandeur. En effet, la couleur rouge pure présente la valeur de T=0 ou T=255. Les couleurs situées dans cette même zone de nuance se trouvaient donc alternativement rejetées dans la gamme haute (T voisin de 255) ou dans la gamme basse (T voisin de 0). Pour lever ce problème, il a été décidé de transformer les valeurs de T pour toutes les couleurs situées dans les nuances de rouge : toutes les valeurs de T strictement inférieures à 50 ont été remplacées par T + 255.

L'ACP a montré que 45% de la dispersion des données expérimentales est expliquée par la pigmentation des colonies (44,2% pour reprendre l'information du tableau des valeurs propres de l'ACP). Elle a montré aussi que cette pigmentation est suffisamment tranchée au centre des colonies pour caractériser les souches. Le graphique 3 ci-après donne une visualisation de cette pigmentation, telle que déduite de l'ACP qui permet d'exclure l'effet des facteurs interférents (effet lecteur en particulier).

	Pigmentation du centre des colonies	
Souche	Jour 1	Jour 2
E.col-01		
E.col-02		
E.col-03		
E.col-04		
E.col-04-bis		
E.col-06		
E.col-08		
E.col-10		
E.col-12		
E.col-13		
E.col-16		
E.col-24		
E.col-26		
E.col-30		
En.clo-02		
R.ter-02		
Pan.spp-01		
K.pneu-02		
E.sak-01		
C.fre-02		

Attention : une imprimante, un écran, ou un vidéo projecteur non calibré est susceptible de restituer des couleurs différentes de celles définies par leur représentation TSL

Graphique 3 : visualisation de la pigmentation des souches sur milieu CCA, telle qu'estimée lors de l'exploitation en ACP (interférences liées aux facteurs de mesures écartées) – cas de la lecture du centre de la colonie

La pigmentation du pourtour des colonies est en revanche insuffisamment développée pour permettre une caractérisation fiable des souches, comme l'illustre le graphique 4 ci-dessous.

	Pigmentation du pourtour des colonies	
Souche	Jour 1	Jour 2
E.col-01		
E.col-02		
E.col-03		
E.col-04		
E.col-04-bis		
E.col-06		
E.col-08		
E.col-10		
E.col-12		
E.col-13		
E.col-16		
E.col-24		
E.col-26		
E.col-30		
En.clo-02		
R.ter-02		
Pan.spp-01		
K.pneu-02		
E.sak-01		
C.fre-02		

Graphique 4 : visualisation de la pigmentation des souches sur milieu CCA, telle qu'estimée lors de l'exploitation en ACP (interférences liées aux facteurs de mesures écartées) – cas de la lecture du pourtour de la colonie

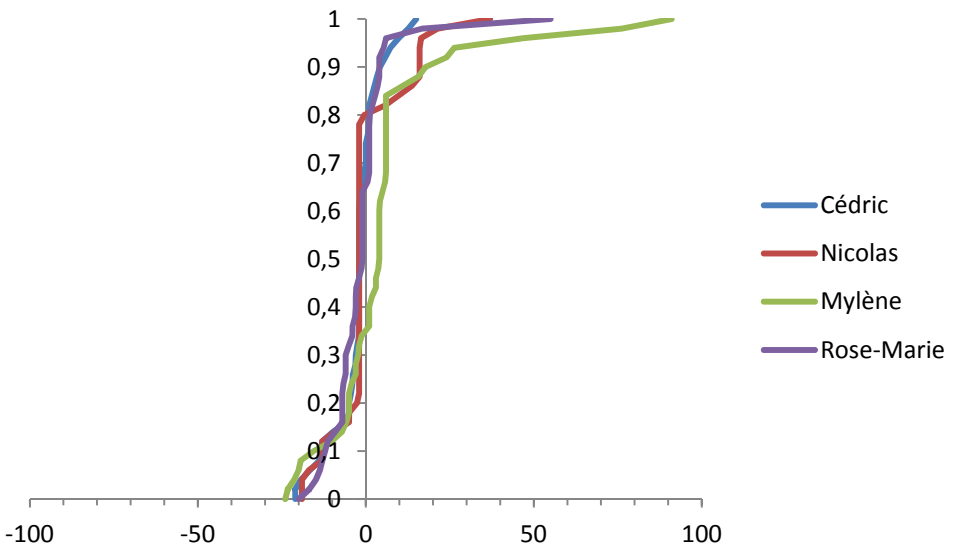
La couleur du pourtour des colonies de certains *Escherichia coli* apparaît franchement non caractéristique (rose).

Comme le pourtour d'une grosse colonie est assurément l'aspect général d'une petite colonie, il faut en conclure que la méthode présente un risque élevé de faux négatifs pour le paramètre *E. coli* sur les colonies de petite taille.

Quant à la pigmentation des colonies au revers de la boîte, elle est intermédiaire et ne présente de toute évidence pas de plus-value pour le diagnostique (voir détails en annexe).

L'ACP, et surtout la reprise des composantes issues de l'ACP avec des techniques de régression simple, a ensuite permis de calculer l'incertitude induite par l'effet du facteur lecteur.

Et les résultats se sont montrés satisfaisants, comme l'illustre le graphique 5 ci-après.



en abscisse : écarts des valeurs observées à la valeur de pigmentation du centre de la colonie
en ordonnée : densité de probabilité cumulée

Graphique 5 : répartition des écarts des valeurs observées à la valeur de pigmentation du centre de la colonie, ceci pour chacun des lecteurs impliqués dans l'expérimentation

Le tableau 3 ci-dessous complète ce graphique 5 en proposant une estimation quantitative de l'incertitude de lecture.

	Cédric	Nicolas	Mylène	Rose-Marie
estimation du biais (en points de teinte dans la représentation TSL)	-2	-2	+4	-1
estimation de l'incertitude-type (en points de teinte dans la représentation TSL)	3,8	7,5	5,9	4,9

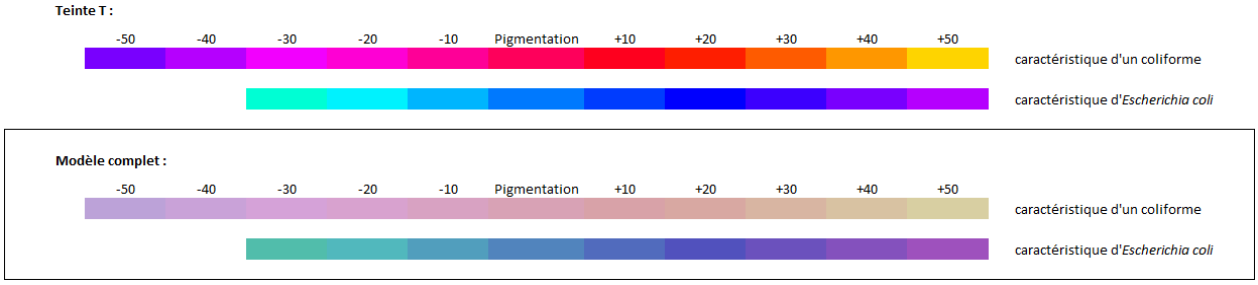
Tableau 3 : estimation de l'incertitude induite par l'effet lecteur sur la mesure de la teinte du centre de la colonie, ceci pour chacun des lecteurs impliqués dans l'expérimentation

En termes d'incertitude étendue (k=2), on peut conclure que la teinte T de la pigmentation du centre de la colonie est estimée à ± 13,0 points.

Les distributions présentées dans le graphique 5 peuvent être approchées par des sigmoïdes, caractéristiques de distributions normales. Mais la loi vraie n'est probablement pas normale. Il faut donc être prudent avec toute extrapolation, en particulier avec la notion d'incertitude étendue comme moyen de déterminer les limites de confiance du résultat de mesure. A cet égard, il est proposé d'appliquer un élargissement de sécurité, et de retenir que **la teinte de la pigmentation du centre de la colonie est estimée à ± 20 points**.

De la même façon, l'incertitude a été estimée sur la lecture du pourtour de la colonie et sur la lecture du revers de la boîte : **la teinte de la pigmentation du pourtour de la colonie est estimée à ± 50 points**, et **la teinte de la pigmentation au revers de la boîte est estimée à ± 30 points**.

La répercussion de ces incertitudes sur le diagnostique est perceptible sur le graphique 6 ci-dessous.



échelle du haut : en points de teinte T, avec saturation S=255 et lumière L=127

échelle du bas (encadrée) : en points de teinte T, pour le modèle complet de pigmentation (avec valeurs de saturation et de lumière réelles)

Graphique 6 : visualisation de l'impact de l'incertitude associée à l'effet lecteur sur la mesure de la pigmentation du centre de la colonie (à ± 20 points de teinte T), du pourtour de la colonie (à ± 50) ou au revers de la boîte (à ± 30)

On peut constater, en particulier sur le modèle complet qui représente la réalité de la couleur perçue, que l'incertitude liée à l'effet lecteur n'induit pas d'erreur de diagnostique si celui-ci est établi sur le centre de la colonie (± 20 points d'erreur de teinte T lors de la lecture). En revanche, sur le pourtour de la colonie (qui, encore une fois, représente potentiellement la situation d'une colonie de petite taille), à la variabilité des niveaux de pigmentation décrits dans le graphique 4 s'ajoute une erreur de mesure avec une imprécision importante (± 50 points de teinte T) qui rend le diagnostique impossible.

Enfin, de manière plus anecdotique l'ACP a permis de caractériser la vision des différents lecteurs impliqués dans l'étude. Comme présenté en annexe, il apparaît que Nicolas a une vision qui tend vers le bleu et qu'il a du mal à distinguer les nuances. Présente-t-il un léger déficit de vision dans le rouge ?
A l'opposé, Rose-Marie présente une vision qui tend vers le rouge.
Quant à Mylène, sa vision se caractérise clairement par des saturations S inférieures d'environ 30 points à celles des autres lecteurs. Mylène tend à voir les couleurs dans le gris.

5 CONCLUSION

Cette étude a été l'occasion de mettre en place une approche méthodique de quantification de l'incertitude associée à la perception des couleurs. Appliquer les méthodes de la métrologie à de telles mesures qualitatives n'allait pas de soi. Preuve est faite que c'est possible.

Et les travaux réalisés ont été riches en enseignements.

En effet, le modèle d'incertitude élaboré a permis de cerner avec efficacité les limites de l'utilisation du milieu chromogène considéré.

Concrètement, ce modèle a pu mettre en évidence que sur CCA :

- la pigmentation du centre des colonies de taille suffisante est un critère fiable de distinction des germes répondant à la méthode (hors faux positifs et faux négatifs)

- la pigmentation des petites colonies n'est en revanche pas suffisamment développée pour pouvoir trancher le caractère *E. coli*

- la perception des couleurs varie d'un individu à l'autre, avec un risque potentiel d'erreur d'interprétation pour certaines souches dont la pigmentation n'est pas franche ; risque d'erreur inévitablement amplifié par le manque d'expérience avec ce nouveau type de milieu pour les laboratoires d'analyses de l'environnement

Moyennant une adaptation des techniciens (formation / entrainement / habilitation) et moyennant le cas échéant un prolongement de l'incubation pour laisser aux petites colonies le temps de finaliser leur développement, la possible contrainte pour les laboratoires français de devoir passer au CCA ne devrait pas poser de difficulté majeure.

Mais cette étude a également révélé plusieurs singularités pouvant apparaître comme inquiétantes. Sur seulement le tout petit nombre de souches testées (25), plusieurs posent problème pour le paramètre *E. coli* (important pour le contrôle sanitaire des eaux, il va sans dire).
Ont en particulier été repérés : un faux positif, un faux négatif potentiel, et un polymorphe dont l'un des faciès est faussement négatif.
Ces cas ont-ils bien été pris en considération lors de la validation de la méthode par l'instance normative internationale ISO/TC147/SC4 ? On peut penser que oui à la lecture de l'annexe C de la norme !
Pour le paramètre *E. coli*, il y est en effet fait état d'un taux de 6% de faux positifs et de 3% de faux négatifs ; pour les coliformes : 5% de faux positifs et 11% de faux négatifs. Les observations faites au cours de la présente étude semblent donc aller dans le même sens que les performances établies lors de la caractérisation de la méthode normalisée.

Une certitude : cette étude a été réalisée en 2015, dans une période de rodage pour la profession vis-à-vis de cette nouvelle méthode ; rodage, en France, pour les fournisseurs de consommables comme pour les laboratoires d'analyses.

Des écarts notables d'aspect des colonies d'un fournisseur de milieux de culture à l'autre avaient par exemple été repérés (parmi les trois testés : Oxoid, Biokar Diagnostics et bioMérieux). Pour une mise en place de cette technique, il n'y a pas de doute que les laboratoires français auront à effectuer une étude approfondie pour la sélection des fournisseurs leur apportant la meilleure satisfaction technique (que ce soit pour les milieux ou les membranes).

Pour terminer, rappelons qu'en date de rédaction du présent document l'ANSES ne s'est toujours pas prononcée sur l'utilisation du CCA pour le contrôle sanitaire des eaux.
Il apparaît toutefois difficilement envisageable que la France rejette purement et simplement le CCA pour conserver le TTC. Ce n'est donc peut-être actuellement qu'une question de répit avant cette transition.
Et comme la pratique du CCA nécessite tout de même l'acquisition d'une expérience nouvelle, surement est-il raisonnable d'anticiper pour ne pas être pris au dépourvu. Surtout si, à l'image de la révision récente du LAB GTA 23, le délai de mise en application est particulièrement court.

ANNEXE

Cheminement de l'exploitation en ACP réalisée pour l'évaluation de l'incertitude associée à la lecture des colonies sur milieu CCA

La présente annexe décrit comment ont été interprétés les résultats de l'ACP, produits par le logiciel Statgraphics XVI.

Une première ACP avait été réalisée sur les données en représentation RVB. Les résultats obtenus se sont avérés intéressants par certains aspects, mais leur interprétation n'était pas immédiate. C'est pourquoi l'ACP a été recommencée sur les données en représentation TSL. Cette seconde approche ayant donné satisfaction, elle a été retenue et est relatée ci-dessous.

1/ En premier lieu, le **tableau des valeurs propres et du niveau de signification des composantes** a été analysé

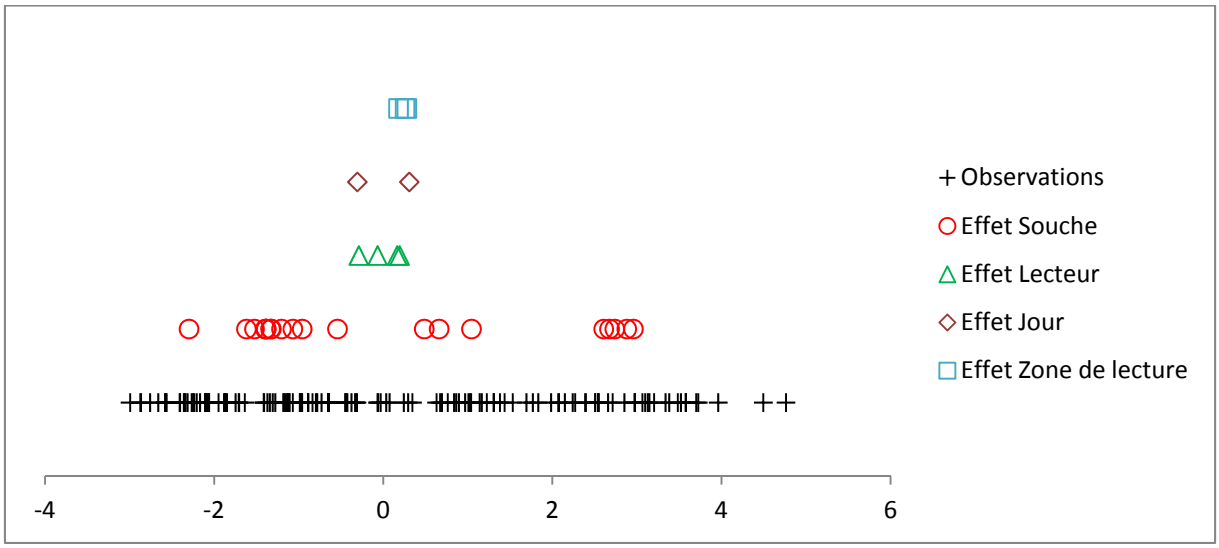
Numéro composante	Valeur propre	Pourcentage de variance	Pourcentage cumulé
1	3,97994	44,222	44,222
2	1,77447	19,716	63,938
3	1,10715	12,302	76,24
4	0,76894	8,544	84,783
5	0,457499	5,083	89,867
6	0,326306	3,626	93,492
7	0,313144	3,479	96,972
8	0,195863	2,176	99,148
9	0,0766816	0,852	100

Analyse, selon les règles d'interprétation de l'ACP
Les trois premières composantes calculées présentent des valeurs propres supérieures ou égales à 1. Seules ces trois composantes sont retenues comme significatives, expliquant 76,24% de la dispersion totale des données expérimentales (en termes de variance).

Tableau A.1 : valeurs propres de l'ACP

2/ En second lieu, les informations disponibles sur les conditions d'observation ont été positionnées au regard de la **composante 1** afin de tenter d'**en identifier la nature**

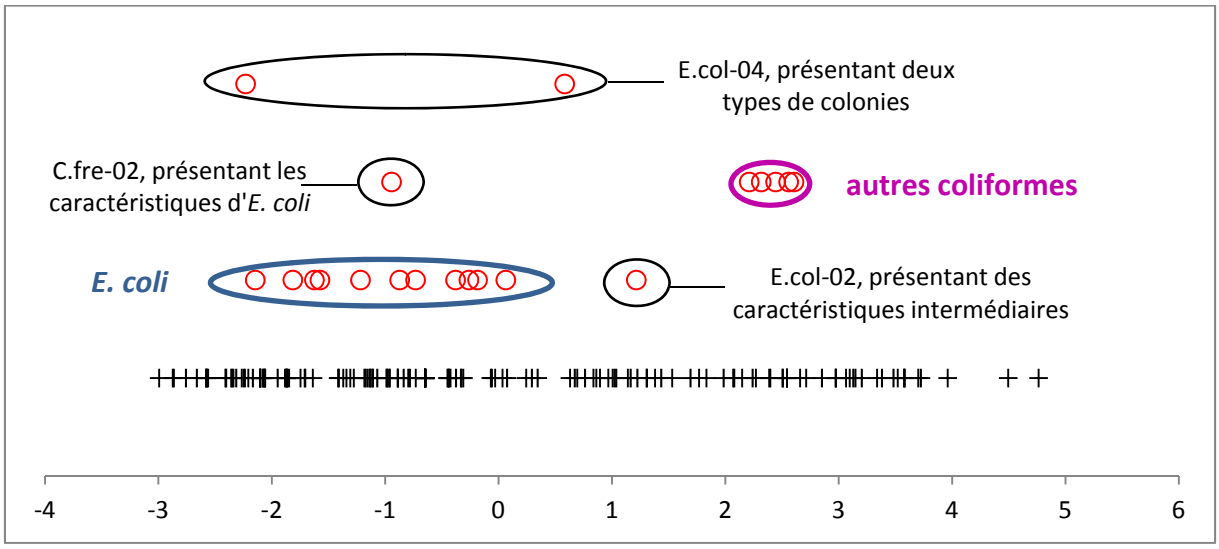
Pour cela, les contributions des différentes informations à cet axe de composante 1 ont été calculées et représentées graphiquement.



NB : l'axe de ce graphique est l'axe des valeurs de la composante 1, grandeur sans dimension assimilable à une variable aléatoire normale centrée réduite.

Graphique A.1 : contribution des différents effets à l'axe de composante 1

Très clairement, les valeurs observées dans l'axe de la composante 1 sont portées par l'effet souche.
De manière plus détaillée, si l'on se focalise sur les modalités de l'effet souche :



Graphique A.2 : contribution des différentes modalités de l'effet souche à l'axe de composante 1

Le tableau des poids des variables contient les valeurs suivantes :

Grandeurs mesurées	Poids dans la composante 1
T-centre	0,427874
T-dos	0,421967
T-pourtour	0,418885
L-centre	0,413748
L-pourtour	0,366294
L-dos	0,327081
S-pourtour	0,0495338
S-centre	-0,0690926
S-dos	-0,209368

Analyse, selon les règles d'interprétation de l'ACP
Les teintes T, et dans une moindre mesure les lumières L, sont en synergie avec l'axe de la composante 1. La composante 1 est donc également l'axe de la dominante de pigmentation de la souche : la dominante rouge est sur les valeurs positives de la composante 1 ; la dominante bleu est sur les valeurs négatives.

Tableau A.2 : poids des variables dans la composante 1

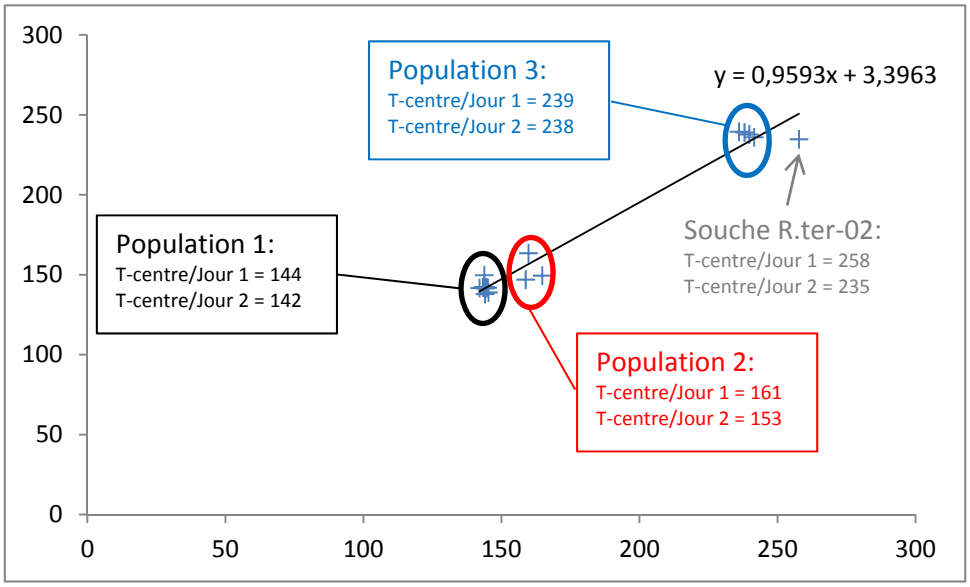
Conclusion partielle
La composante 1 est la dominante de pigmentation des colonies, définissant la nature de la souche à quelques particularités près : le polymorphisme de la souche E.col-04, la fausse positivité de C.fre-02, et la caractérisation intermédiaire de E.col-02.

3/ En troisième lieu, un modèle de variation de la teinte dans le temps a été élaboré

Pour cela, des régressions linéaires simples ont été réalisées entre teintes T observées le premier jour, et teintes T observées sur les mêmes boîtes le deuxième jour.

Trois relations linéaires ont été identifiées : une première sur la variable T-centre, une seconde sur le ratio de variables T-pourtour / T-centre, et la troisième sur le ratio de variables T-dos / T-centre.

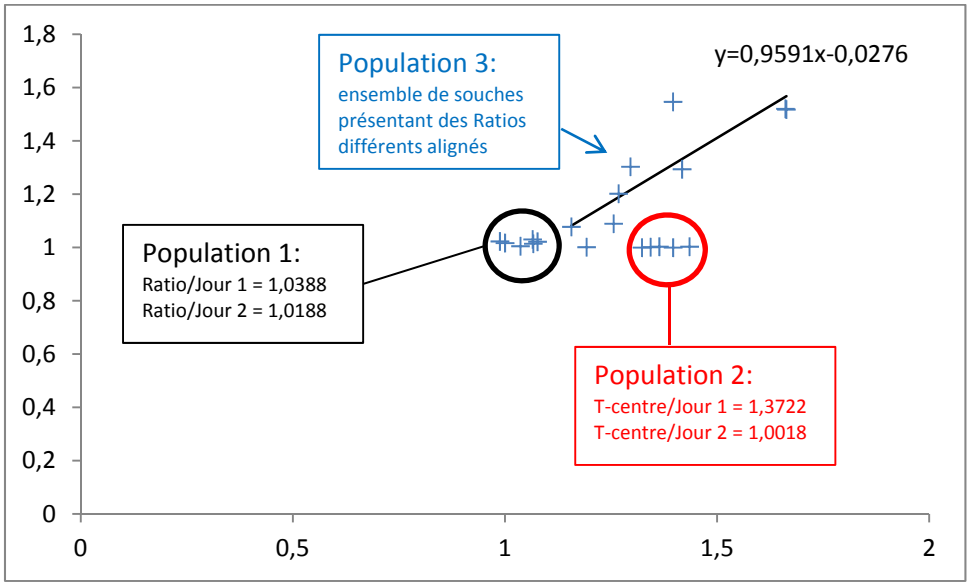
Ces trois relations forment un modèle complet de variation de la teinte entre le jour 1 et le jour 2.



Souche	Population
E.coli-01	2
E.coli-02	2
E.coli-03	2
E.coli-04	1
E.coli-04-bis	1
E.coli-06	1
E.coli-08	1
E.coli-10	1
E.coli-12	1
E.coli-13	1
E.coli-16	1
E.coli-24	1
E.coli-26	1
E.coli-30	1
En.clo-02	3
R.ter-02	-
Pan.spp-01	3
K.pneu-02	3
E.sak-01	3
C.fre-02	1

NB : en abscisse : T-centre pour le jour 1 en ordonnée : T-centre pour le jour 2

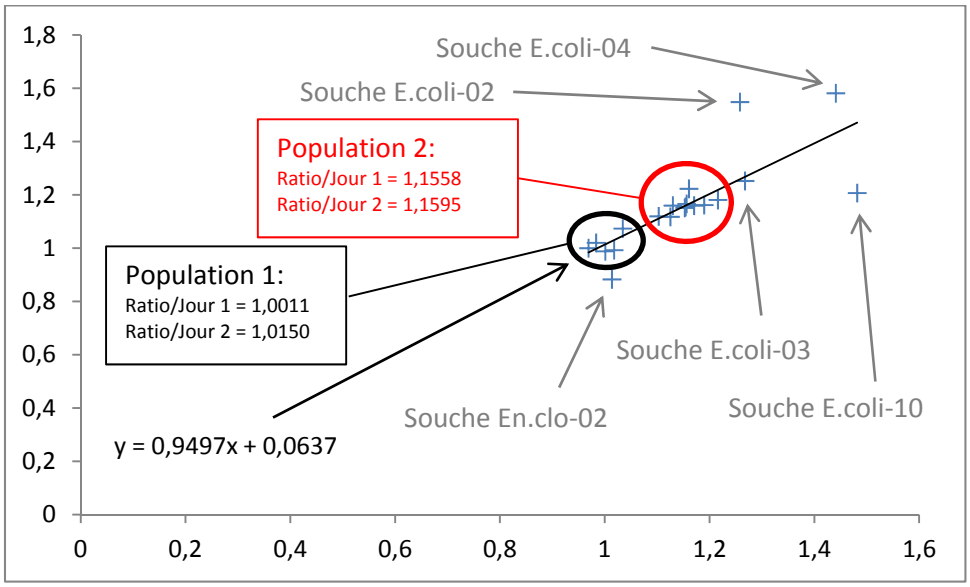
Graphique A.3 : modèle de variation de la teinte entre le jour 1 et le jour 2 pour la variable T-centre



NB : en abscisse : ratio T-pourtour / T-centre pour le jour 1 en ordonnée : ratio T-pourtour / T-centre pour le jour 2

		Ratio T-pourtour sur T-centre Jour 1 pour
Souche	Population	population 3
E.coli-01	3	1,417322835
E.coli-02	3	1,396054628
E.coli-03	3	1,295774648
E.coli-04	3	1,663194444
E.coli-04-bis	1	-
E.coli-06	2	-
E.coli-08	2	-
E.coli-10	3	1,660869565
E.coli-12	3	1,156494523
E.coli-13	3	1,267826087
E.coli-16	3	1,19237435
E.coli-24	2	-
E.coli-26	3	1,256097561
E.coli-30	2	-
En.clo-02	1	-
R.ter-02	1	-
Pan.spp-01	1	-
K.pneu-02	1	-
E.sak-01	1	-
C.fre-02	2	-

Graphique A.4 : modèle de variation de la teinte entre le jour 1 et le jour 2 pour le ratio de variables T-pourtour / T-centre



NB : en abscisse : ratio T-dos / T-centre pour le jour 1 en ordonnée : ratio T-dos / T-centre pour le jour 2

Souche	Population	Ratio T-dos sur T-centre Jour 1 pour autres	Ratio T-dos sur T-centre Jour 2 pour autres
E.coli-01	2		
E.coli-02	-	1,257966616	1,54849498
E.coli-03	-	1,267605634	1,25220459
E.coli-04	-	1,440972222	1,58152174
E.coli-04-bis	1		
E.coli-06	2		
E.coli-08	2		
E.coli-10	-	1,48173913	1,20701169
E.coli-12	2		
E.coli-13	2		
E.coli-16	2		
E.coli-24	2		
E.coli-26	2		
E.coli-30	2		
En.clo-02	-	1,013771186	0,88308977
R.ter-02	1		
Pan.spp-01	1		
K.pneu-02	1		
E.sak-01	1		
C.fre-02	2		

Graphique A.5 : modèle de variation de la teinte entre le jour 1 et le jour 2 pour le ratio de variables T-dos / T-centre

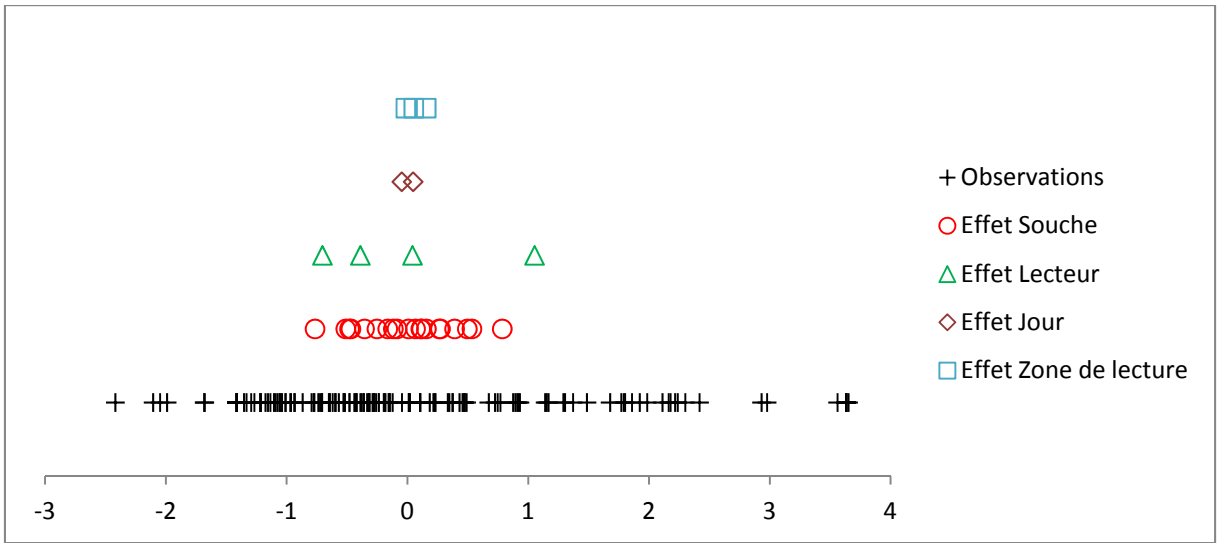
Numériquement et en teinte T de pigmentation, le modèle donne le résultat suivant :

	Valeur moyenne de T-centre	Valeur moyenne de T-centre	Teinte de pigmentation		Valeur moyenne de T-pourtour	Valeur moyenne de T-pourtour	Teinte de pigmentation		Valeur moyenne de T-dos	Valeur moyenne de T-dos	Teinte de pigmentation	
Souche	Jour 1	Jour 2	Jour 1	Jour 2	Jour 1	Jour 2	Jour 1	Jour 2	Jour 1	Jour 2	Jour 1	Jour 2
E.coli-01	161	153			228	204			186	177		
E.coli-02	161	153			225	201			203	237		
E.coli-03	161	153			209	186			204	192		
E.coli-04	144	142			240	223			208	225		
E.coli-04-bis	144	142			150	145			144	144		
E.coli-06	144	142			198	142			166	165		
E.coli-08	144	142			198	142			166	165		
E.coli-10	144	142			239	222			213	171		
E.coli-12	144	142			167	154			166	165		
E.coli-13	144	142			183	169			166	165		
E.coli-16	144	142			172	158			166	165		
E.coli-24	144	142			198	142			166	165		
E.coli-26	144	142			181	167			166	165		
E.coli-30	144	142			198	142			166	165		
En.clo-02	239	238			248	242			242	210		
R.ter-02	258	235			268	239			258	239		
Pan.spp-01	239	238			248	242			239	242		
K.pneu-02	239	238			248	242			239	242		
E.sak-01	239	238			248	242			239	242		
C.fre-02	144	142			198	142			166	165		

NB : les teintes T sont représentées avec arbitrairement une saturation de 255 et une lumière de 127

Graphique A.6 : modèle de variation de la teinte entre le jour 1 et le jour 2, exprimé numériquement et visualisé sous forme de couleur

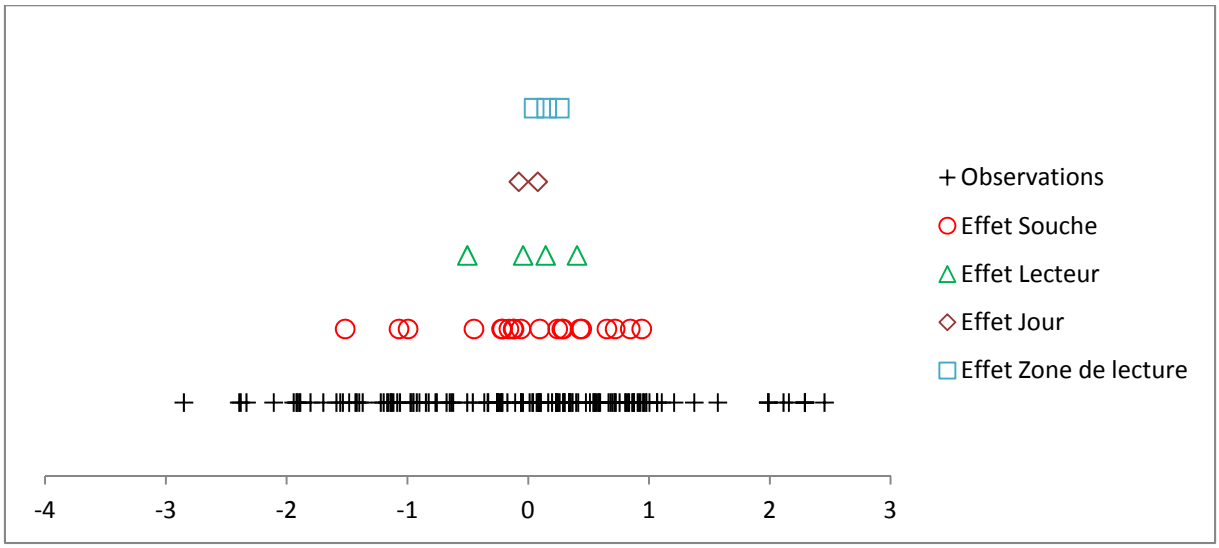
4/ En quatrième lieu, les informations disponibles sur les conditions d'observation ont été positionnées au regard des **composantes 2 et 3** afin de tenter d'**en identifier la nature**



NB : l'axe de ce graphique est l'axe des valeurs de la composante 2, grandeur sans dimension assimilable à une variable aléatoire normale centrée réduite.

Graphique A.7 : contribution des différents effets à l'axe de composante 2

Il ne ressort rien de probant de ce graphique. Un effet lecteur transparaît, mais il n'explique pas à lui seul la répartition des valeurs de la composante.

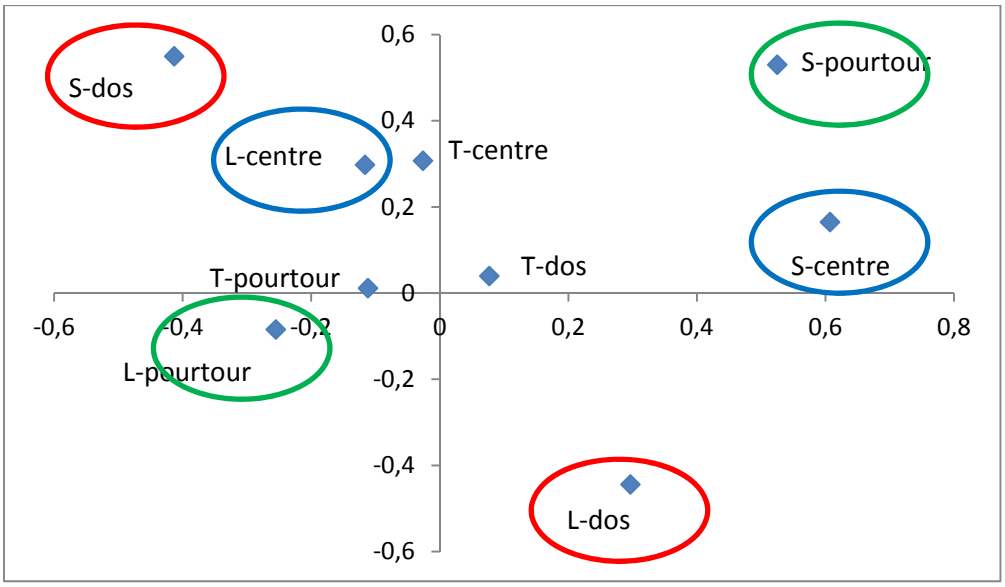


NB : l'axe de ce graphique est l'axe des valeurs de la composante 3, grandeur sans dimension assimilable à une variable aléatoire normale centrée réduite.

Graphique A.8 : contribution des différents effets à l'axe de composante 3

Un effet souche transparaît, mais comme pour le graphique précédent il n'explique pas à lui seul la répartition des valeurs de la composante.

Pour tenter d'y voir un peu plus clair, le biplot composante 2 versus composante 3 a été examiné. C'est sur ce graphique que l'on est susceptible de voir des effets interactifs de la composante 2 avec la composante 3.



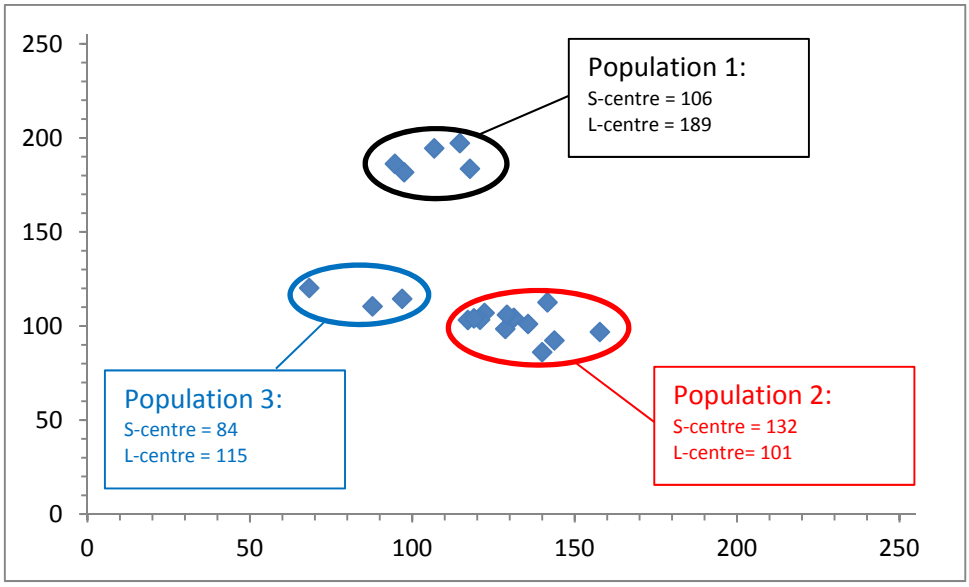
NB : l'axe horizontal de ce graphique est l'axe des valeurs de la composante 2 ; l'axe vertical est l'axe des valeurs de la composante 3 ; échelles sans dimension assimilables à des variables aléatoires normales centrées réduites.

Analyse, selon les règles d'interprétation de l'ACP
Il apparaît clairement un antagonisme entre la saturation et la lumière. Cet antagonisme ne se situe pas sur le même plan selon que l'on lit le centre de la colonie, son pourtour, ou au revers de la boîte.

Graphique A.9 : biplot des contributions des variables aux axes des composantes 2 et 3

5/ En cinquième lieu, un modèle de variation du couple saturation/lumière a été élaboré

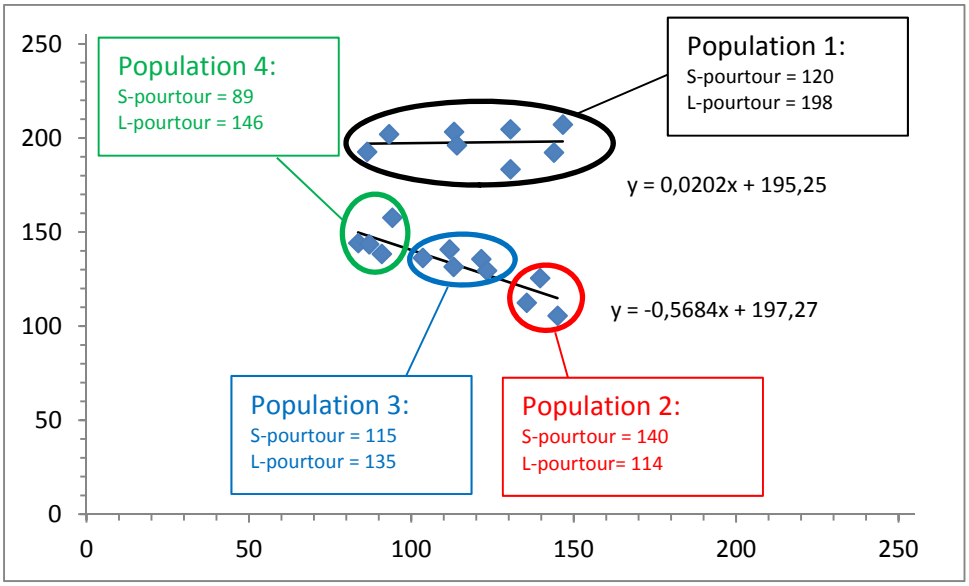
Comme pour la composante 1, des régressions linéaires simples ont été réalisées.



Souche	Population
E.coli-01	3
E.coli-02	3
E.coli-03	2
E.coli-04	2
E.coli-04-bis	2
E.coli-06	2
E.coli-08	2
E.coli-10	2
E.coli-12	2
E.coli-13	2
E.coli-16	2
E.coli-24	2
E.coli-26	2
E.coli-30	3
En.clo-02	1
R.ter-02	1
Pan.spp-01	1
K.pneu-02	1
E.sak-01	1
C.fre-02	2

NB : en abscisse : S-centre en ordonnée : L-centre

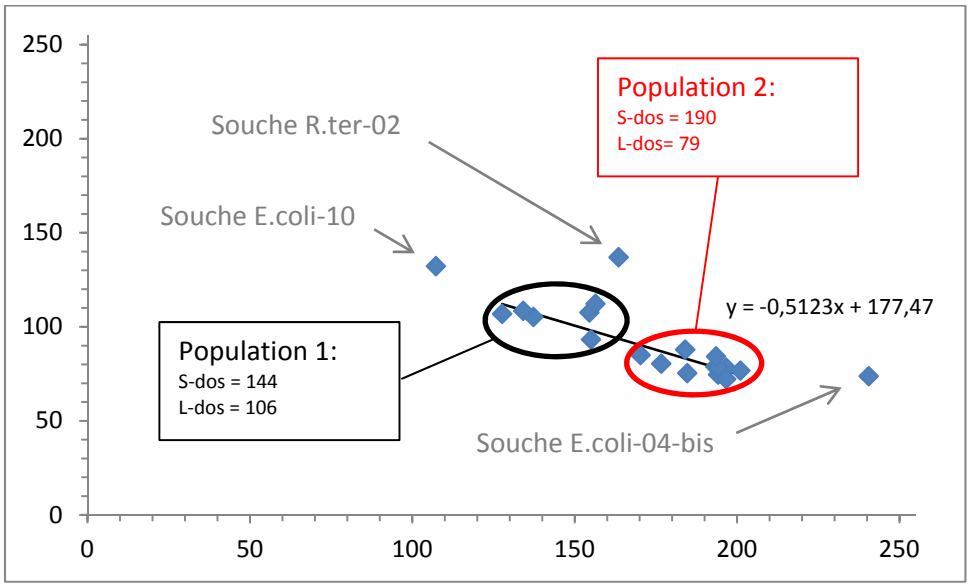
Graphique A.10 : modèle de variation de la lumière selon la saturation pour les données relatives au centre de la colonie



Souche	Population
E.coli-01	4
E.coli-02	1
E.coli-03	4
E.coli-04	1
E.coli-04-bis	2
E.coli-06	3
E.coli-08	2
E.coli-10	1
E.coli-12	3
E.coli-13	4
E.coli-16	3
E.coli-24	3
E.coli-26	2
E.coli-30	4
En.clo-02	1
R.ter-02	1
Pan.spp-01	1
K.pneu-02	1
E.sak-01	1
C.fre-02	3

NB : en abscisse : S-pourtour en ordonnée : L-pourtour

Graphique A.11 : modèle de variation de la lumière selon la saturation pour les données relatives au pourtour de la colonie



NB : en abscisse : S-dos en ordonnée : L-dos

Souche	Population	S-dos autres	L-dos autres
E.coli-01	2		
E.coli-02	1		
E.coli-03	2		
E.coli-04	1		
E.coli-04-bis	-	240,5	73,75
E.coli-06	2		
E.coli-08	2		
E.coli-10	-	107,25	132,25
E.coli-12	2		
E.coli-13	2		
E.coli-16	2		
E.coli-24	2		
E.coli-26	2		
E.coli-30	2		
En.clo-02	1		
R.ter-02	-	163,5	137
Pan.spp-01	1		
K.pneu-02	1		
E.sak-01	1		
C.fre-02	2		

Graphique A.12 : modèle de variation de la lumière selon la saturation pour les données relatives au dos de la colonie

Numériquement et en couleur (teinte T + saturation S + lumière L), le modèle complet de pigmentation des souches donne le résultat présenté pages suivantes (graphiques A.13a, A.13b et A.13c).

	Valeur moyenne de T-centre	Valeur moyenne de T-centre	Valeur moyenne de	Valeur moyenne de	Pigmentation colonies (T, S et L)	
Souche	Jour 1	Jour 2	S-centre	L-centre	Jour 1	Jour 2
E.coli-01	161	153	84	115		
E.coli-02	161	153	84	115		
E.coli-03	161	153	132	101		
E.coli-04	144	142	132	101		
E.coli-04-bis	144	142	132	101		
E.coli-06	144	142	132	101		
E.coli-08	144	142	132	101		
E.coli-10	144	142	132	101		
E.coli-12	144	142	132	101		
E.coli-13	144	142	132	101		
E.coli-16	144	142	132	101		
E.coli-24	144	142	132	101		
E.coli-26	144	142	132	101		
E.coli-30	144	142	84	115		
En.clo-02	239	238	106	189		
R.ter-02	258	235	106	189		
Pan.spp-01	239	238	106	189		
K.pneu-02	239	238	106	189		
E.sak-01	239	238	106	189		
C.fre-02	144	142	132	101		

Graphique A.13a : modèle complet de variation de la pigmentation, exprimé numériquement et visualisé sous forme de couleur – partie 1/3 relative au centre de la colonie

	Valeur moyenne de T-pourtour	Valeur moyenne de T-pourtour	Valeur moyenne de	Valeur moyenne de	Pigmentation colonies (T, S et L)	
Souche	Jour 1	Jour 2	S-pourtour	L-pourtour	Jour 1	Jour 2
E.coli-01	228	204	89	146		
E.coli-02	225	201	120	198		
E.coli-03	209	186	89	146		
E.coli-04	240	223	120	198		
E.coli-04-bis	150	145	140	114		
E.coli-06	198	142	115	135		
E.coli-08	198	142	140	114		
E.coli-10	239	222	120	198		
E.coli-12	167	154	115	135		
E.coli-13	183	169	89	146		
E.coli-16	172	158	115	135		
E.coli-24	198	142	115	135		
E.coli-26	181	167	140	114		
E.coli-30	198	142	89	146		
En.clo-02	248	242	120	198		
R.ter-02	268	239	120	198		
Pan.spp-01	248	242	120	198		
K.pneu-02	248	242	120	198		
E.sak-01	248	242	120	198		
C.fre-02	198	142	115	135		

Graphique A.13b : modèle complet de variation de la pigmentation, exprimé numériquement et visualisé sous forme de couleur – partie 2/3 relative au pourtour de la colonie

	Valeur moyenne de T-dos	Valeur moyenne de T-dos	Valeur moyenne de S-dos	Valeur moyenne de L-dos	Pigmentation colonies (T, S et L)	
Souche	Jour 1	Jour 2			Jour 1	Jour 2
E.coli-01	186	177	190	79		
E.coli-02	203	237	144	106		
E.coli-03	204	192	190	79		
E.coli-04	208	225	144	106		
E.coli-04-bis	144	144	240	74		
E.coli-06	166	165	190	79		
E.coli-08	166	165	190	79		
E.coli-10	213	171	107	132		
E.coli-12	166	165	190	79		
E.coli-13	166	165	190	79		
E.coli-16	166	165	190	79		
E.coli-24	166	165	190	79		
E.coli-26	166	165	190	79		
E.coli-30	166	165	190	79		
En.clo-02	242	210	144	106		
R.ter-02	258	239	163	137		
Pan.spp-01	239	242	144	106		
K.pneu-02	239	242	144	106		
E.sak-01	239	242	144	106		
C.fre-02	166	165	190	79		

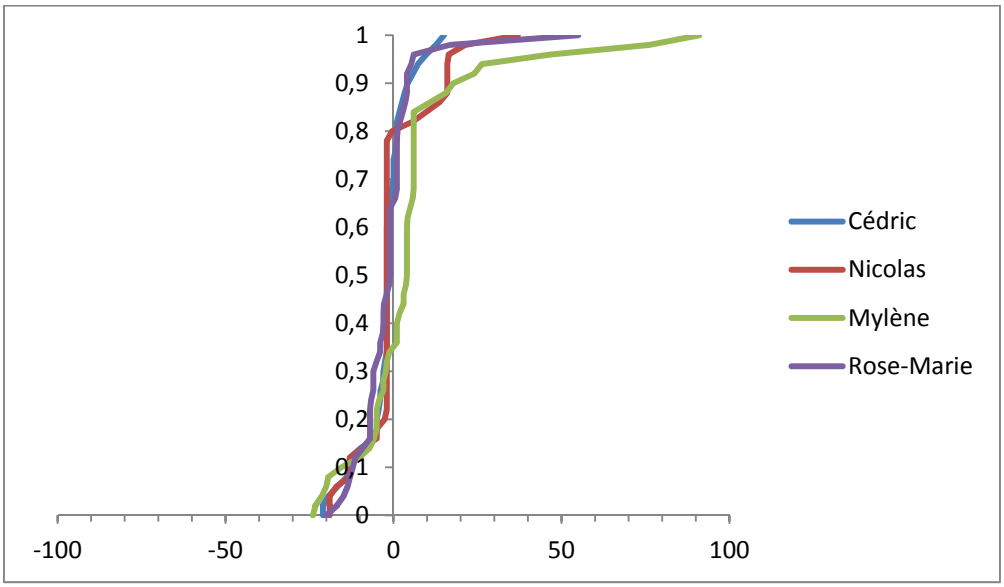
Graphique A.13c : modèle complet de variation de la pigmentation, exprimé numériquement et visualisé sous forme de couleur – partie 3/3 relative au dos de la colonie

A noter que le modèle ainsi obtenu présente un léger défaut pour la pigmentation au revers de la boîte pour la souche R.ter-02. Ce défaut a pour origine un écart entre le jour 1 et le jour 2 sur le couple saturation/lumière. Le modèle a néanmoins été conservé ainsi, ce léger défaut ne prêtant pas à conséquence et l'intégration de l'effet (non significatif d'après l'ACP) pour toutes les souches complexifiant inutilement le modèle.

6/ En sixième lieu, l'erreur de mesure induite par la lecture a été évaluée

Les écarts des valeurs observées par les différents lecteurs au modèle complet de pigmentation des colonies ci-dessus peuvent être calculés, conduisant à une estimation de l'erreur liée à la lecture.

Pour la **teinte au centre de la colonie**, on obtient la répartition présentée dans le graphique A.14 page suivante.



NB : en abscisse : écart à la valeur de pigmentation prévue par le modèle, en points de teinte dans la représentation TSL
en ordonnée : densité de probabilité cumulée

Graphique A.14 : répartition des écarts observés au modèle de pigmentation, ceci pour la teinte au centre de la colonie et pour les différents lecteurs impliqués dans l'expérimentation

Le tableau ci-dessous complète ce graphique en précisant pour chaque lecteur l'erreur systématique de lecture (biais en points de teinte dans la représentation TSL) et l'erreur aléatoire (incertitude-type en points de teinte dans la représentation TSL).

Estimateur robuste	Cédric	Nicolas	Mylène	Rose-Marie
du biais *	-2	-2	+4	-1
de l'incertitude type *	3,8	7,5	5,9	4,9

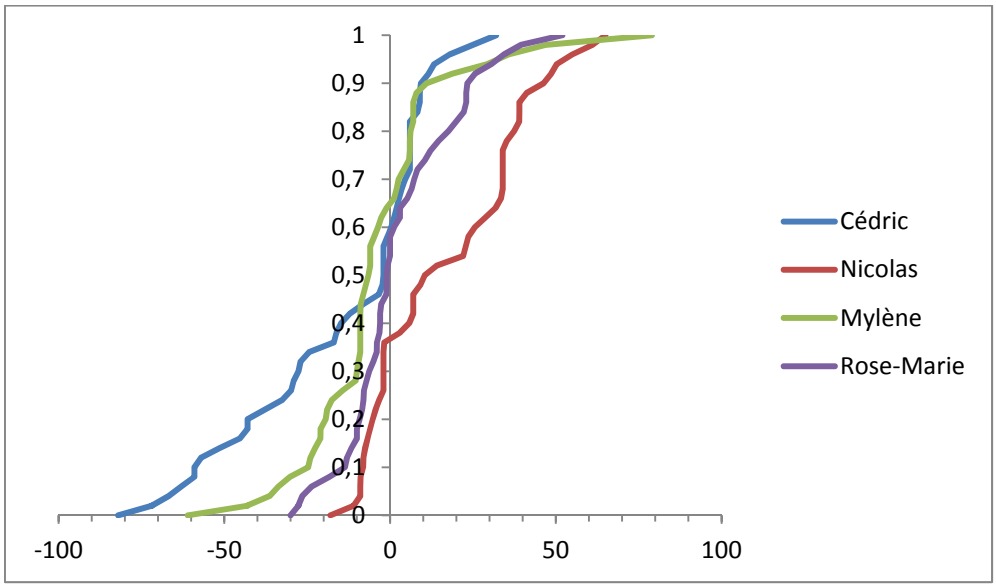
* : en points de teinte dans la représentation TSL

Tableau A.3 : estimation de l'incertitude de lecture, pour la teinte au centre de la colonie et pour les différents lecteurs impliqués dans l'expérimentation

Attention: les répartitions ci-dessus peuvent être approchées par des variables aléatoires normales, mais leur loi vraie n'est peut-être pas normale. L'extrapolation des valeurs de biais et d'incertitude type obtenues doit donc être considérée avec précautions.

L'erreur de lecture apparaît raisonnable si l'on considère le centre de la colonie, puisque globalement sa pigmentation est évaluée à + ou - 20 points près (incertitude étendue k=2 totale, en points de teinte dans la représentation TSL).

Pour la **teinte sur le pourtour**, on obtient la répartition présentée dans le graphique A.15 page suivante.



NB : en abscisse : écart à la valeur de pigmentation prévue par le modèle, en points de teinte dans la représentation TSL
en ordonnée : densité de probabilité cumulée

Graphique A.15 : répartition des écarts observés au modèle de pigmentation, ceci pour la teinte sur le pourtour de la colonie et pour les différents lecteurs impliqués dans l'expérimentation

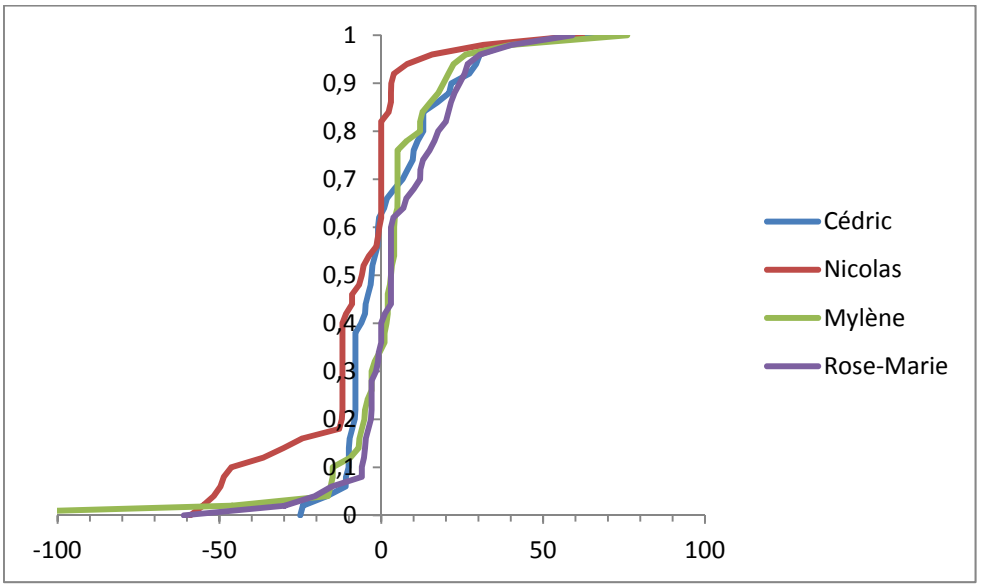
Estimateur robuste	Cédric	Nicolas	Mylène	Rose-Marie
du biais *	-2	+10,5	-6,5	-1
de l'incertitude type *	26,9	22,9	14,0	16,2

* : en points de teinte dans la représentation TSL

Tableau A.4 : estimation de l'incertitude de lecture, pour la teinte sur le pourtour de la colonie et pour les différents lecteurs impliqués dans l'expérimentation

L'erreur de lecture apparaît problématique si l'on considère le pourtour de la colonie, puisque globalement sa pigmentation est évaluée à + ou - 50 points près (incertitude étendue k=2 totale, en points de teinte dans la représentation TSL).

Pour la **teinte au revers de la boîte**, on obtient la répartition présentée dans le graphique A.16 page suivante.



NB : en abscisse : écart à la valeur de pigmentation prévue par le modèle, en points de teinte dans la représentation TSL
en ordonnée : densité de probabilité cumulée

Graphique A.16 : répartition des écarts observés au modèle de pigmentation, ceci pour la teinte au revers de la boîte de Petri et pour les différents lecteurs impliqués dans l'expérimentation

Estimateur robuste	Cédric	Nicolas	Mylène	Rose-Marie
du biais *	-3	-6	+3	+3
de l'incertitude type *	11,4	13,8	9,8	12,8

* : en points de teinte dans la représentation TSL

Tableau A.5 : estimation de l'incertitude de lecture, pour la teinte au revers de la boîte et pour les différents lecteurs impliqués dans l'expérimentation

La lecture au dos de la boîte induit une erreur de + ou - 30 points (incertitude étendue k=2 totale, en points de teinte dans la représentation TSL).

7/ Enfin, quelques observations ont pu être réalisées

D'une manière générale, la saturation et la lumière n'influent pas significativement sur la perception de la couleur (composante 1 et composantes 2/3 sont des axes bien distincts). C'est pourquoi les estimations d'incertitude les concernant ne sont pas reprises ici.

L'examen du tableau des biais sur la saturation et la lumière permet néanmoins de détecter une singularité.

Estimateur robuste	Cédric	Nicolas	Mylène	Rose-Marie
du biais pour la saturation *	+5,2	+1,2	**-31,0**	+2,5
du biais pour la lumière **	-6,8	+6,8	+6,7	-8,3

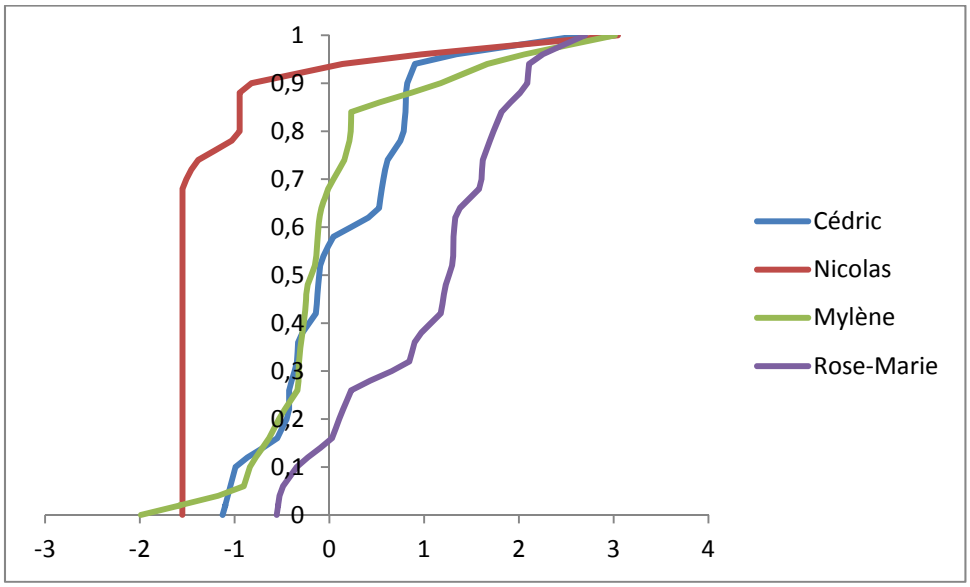
* : en points de saturation dans la représentation TSL
** : en points de lumière dans la représentation TSL

Tableau A.6 : estimation des biais de lecture sur la saturation et la lumière, pour les différents lecteurs impliqués dans l'expérimentation

Il apparaît que Mylène tend à voir les couleurs avec 30 points de saturation en moins que les autres lecteurs (perception dans le gris).

Par ailleurs, une observation intéressante ressort de l'ACP réalisée en représentation RVB.

Le graphique ci-dessous présente la répartition des contributions de l'effet lecteur à l'axe 3 (axe de cette ACP sur les données en représentation RVB qui a été identifié comme l'effet lecteur).



NB : en abscisse : valeurs de la composante 3 définie en ACP sur les données en représentation RVB (grandeur sans dimension assimilable à une variable aléatoire normale centrée réduit)
en ordonnée : densité de probabilité cumulée

Graphique A.17 : répartition des contributions des modalités de l'effet lecteur à l'axe 3 de l'ACP sur les données en représentation RVB, axe 3 qui a été identifié comme correspondant à l'effet lecteur

Cet axe est en synergie avec les variables R (rouge) et B (bleu), la vision vers le rouge étant dans les valeurs positives de la composante et la vision vers le bleu étant dans les valeurs négatives.

Il apparaît que Nicolas présente une vision davantage orientée vers le bleu et qu'il distingue peu les nuances (il voit tout dans la même nuance de bleu). Il apparaît aussi que la vision de Rose-Marie tend vers le rouge.

Avertissement :
Les couleurs du présent document ont été numériquement calées sur leur représentation TSL.
En impression papier, ou simplement à l'écran, leur aspect peut se révéler significativement différent de ce qu'il devrait être.
Les écrans et les imprimantes nécessitant un rendu fidèle des couleurs doivent être régulièrement calibrés.