

**SOCIETE BIOMERIEUX**

Service Recherche &  
Développement Industrie  
Chemin de l'Orme  
69280 MARCY L'ETOILE

**Validation AFNOR des méthodes alternatives d'analyse**  
*Application à la microbiologie alimentaire*

**Rapport de synthèse**

*(Etudes préliminaire et collaborative  
conduites selon la norme NF EN ISO 16140)*

**Validation de la méthode coli ID**  
**pour le dénombrement des *Escherichia coli* à 44°C**

*Méthodes quantitatives*

**Confidentiel**

**SYNTHESE COLI ID (E. coli à 44°C) - Version 2**

**4 août 2008**

*Annule et remplace la version précédente*

L'ancienne version doit être restituée  
à ADRIA Développement ou détruite en interne.

Ce rapport comprend 34 pages dont 4 annexes.

La reproduction de ce rapport n'est autorisée que sous sa forme intégrale.

**ADRIA DEVELOPPEMENT**

Creac'h Gwen - F. 29196 QUIMPER Cedex - Tél. (33) 02.98.10.18.18 - Fax (33) 02.98.10.18.08

E-mail : [adria.developpement@adria.tm.fr](mailto:adria.developpement@adria.tm.fr) - Site web : <http://www.adria.tm.fr> - Site réservé adhérents : <http://www.clubiaa.net>  
ASSOCIATION LOI DE 1901 - N° SIRET 306 964 271 00036 - N° EXISTENCE 532900006329 - N°TVA FR4530696427100036

## Sommaire

<b>1</b>	<b>INTRODUCTION</b>	<b>4</b>
	1.1 Référentiel de validation	4
	1.2 Protocole et principe de la méthode alternative	4
	1.3 Domaine d'application demandé	4
	1.4 Méthode de référence	4
	1.5 Historique de la validation	4
<b>2</b>	<b>ETUDE COMPARATIVE</b>	<b>7</b>
	2.1 Linéarité	7
	2.2 Exactitude relative	8
	2.3 Limite de détection (LOD) et limite de quantification (LOQ)	11
	2.4 Sensibilité relative	12
	2.5 Spécificité/Sélectivité	13
	2.6 Praticabilité	14
<b>3</b>	<b>ETUDE COLLABORATIVE</b>	<b>15</b>
	3.1 Organisation de l'étude	15
	3.2 Contrôle des paramètres expérimentaux	16
	3.3 Résultats des analyses	18
	3.4 Calculs et interprétation statistique	19
<b>4</b>	<b>CONCLUSION</b>	<b>23</b>
	<i>Annexe 1 - Méthode alternative</i>	<i>24</i>
	<i>Annexe 2 - Méthode de référence</i>	<i>28</i>
	<i>Annexe 3 - Linéarité : Graphiques bidimensionnels et droites de régression</i>	<i>29</i>
	<i>Annexe 4 - Exactitude : Graphiques bidimensionnels et droites de régression</i>	<i>32</i>

**Les modifications apportées au rapport sont indiquées par un double trait dans la marge à gauche.**

---

## Avant Propos

L'accréditation du COFRAC atteste de la compétence des laboratoires pour les seuls essais couverts par l'accréditation qui sont identifiés par le symbole<sup>♦</sup>.

L'ensemble des renseignements permettant de valider la garantie des analyses est tenu à la disposition de la Société BioMérieux.

Les résultats sont synthétisés au sein de tableaux et interprétés selon la norme NF EN ISO 16140.

- |                                             |                                                                                                                                              |
|---------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| ○ <b>Fabricant :</b>                        | <b>Société BIOMERIEUX</b><br>Chemin de l'Orme<br>69280 MARCY L'ETOILE                                                                        |
| ○ <b>Laboratoire expert :</b>               | <b>ADRIA Développement</b><br>ZA Creac'h Gwen<br>29196 QUIMPER Cedex                                                                         |
| ○ <b>Méthode à valider :</b>                | <b>Gélose coli ID pour le dénombrement des <i>Escherichia coli</i></b>                                                                       |
| ○ <b>Référentiel de validation :</b>        | NF EN ISO 16140 (octobre 2003) : protocole pour la validation des méthodes alternatives                                                      |
| ○ <b>Méthode de référence<sup>♦</sup> :</b> | Norme NF ISO 16649-2 (juillet 2001) : méthode horizontale pour le dénombrement des <i>Escherichia coli</i> - $\beta$ -glucuronidase positive |
| ○ <b>Etendue de la validation :</b>         | Tous produits d'alimentation humaine                                                                                                         |

---

<sup>♦</sup> NF ISO 16649-2 (juillet 2001) : essai effectué sous le couvert de l'accréditation par le laboratoire expert

# 1 INTRODUCTION

---

## 1.1 Référentiel de validation

Le référentiel de validation utilisé est la norme NF EN ISO 16140 (octobre 2003) : protocole pour la validation des méthodes alternatives.

## 1.2 Protocole et principe de la méthode alternative

Le protocole et la notice technique sont donnés en Annexe 1.

Le milieu Coli ID est un milieu chromogène permettant le dénombrement des coliformes et d'*Escherichia coli* ; ce milieu contient deux substrats chromogènes. Les coliformes autres qu'*E. coli* apparaissent sous forme de colonies bleues, grâce à la mise en évidence de la  $\beta$ -galactosidase ; les colonies d'*E. coli* apparaissent roses grâce à la mise en évidence de la  $\beta$ -glucuronidase.

## 1.3 Domaine d'application demandé

Tous produits d'alimentation humaine

## 1.4 Méthode de référence

La méthode de référence est la méthode NF ISO 16649-2 (juillet 2001) « Méthode horizontale pour le dénombrement des *Escherichia coli*  $\beta$ -glucuronidase positive ».

Le protocole est schématisé en Annexe 2.

## 1.5 Historique de la validation

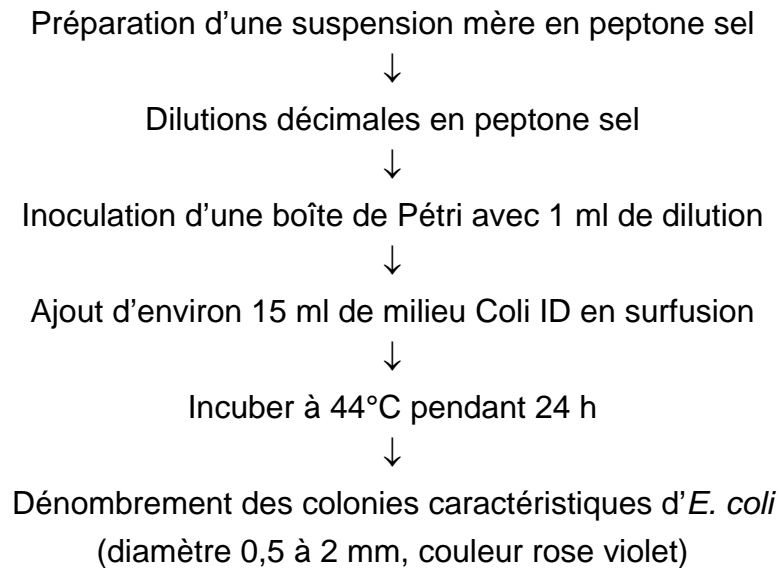
### 1.5.1 Date de la première validation

La méthode Coli ID a été validée le 19 janvier 1999 (attestation n° BIO 12/5-01/99) avec une incubation à  $44^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  pour les abats et à  $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  pour tous les autres produits. La reconduction a été obtenue le 6 février 2002 avec une incubation à  $44^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  pour l'ensemble des produits.

Une extension de validation portant sur la modification du protocole d'ensemencement (de la double couche vers la simple couche) a été obtenue en 2004 sans réalisation d'essais complémentaires.

La validation expire le 19 janvier 2007.

### 1.5.2 **Protocole validé en 2002**



### 1.5.3 **Méthodes de référence auxquelles la méthode alternative a été comparée**

- Etude de 1998 : Norme NF V08-017 - Microbiologie alimentaire. Directives générales pour le dénombrement des coliformes fécaux et d'*Escherichia coli* (incubation du VRBL à 44,5°C ± 0,5°C)
- Etude de 2002 : Norme NF ISO 16649-2 - Microbiologie alimentaire. Méthode horizontale pour le dénombrement des *Escherichia coli* - β-glucuronidase positive - Partie 2 : technique du comptage des colonies à 44°C au moyen de 5-bromo-4-chloro-3-indolyl β-D-glucuronate (incubation du VRBL à 44°C ± 1°C). **Il s'agit de la méthode de référence actuellement en vigueur.**

## 1.5.4 Principaux résultats obtenus lors de la validation initiale et des éventuelles reconductions et extensions

### 1.4.5.1 Etude menée en 1998

La **méthode Coli ID** est facile à mettre en œuvre, en comparaison à la **méthode de référence NF V08-017** qui nécessite une confirmation d'*E. coli*, rendue aléatoire par le principe même du repiquage au hasard d'un certain nombre de colonies (d'autant plus aléatoire que la charge totale en coliformes thermotolérants est élevée).

Son **délai de réponse** est nettement plus court que celui de la méthode de référence (24 h au lieu de 5 jours).

Cette méthode est **spécifique des souches d'*E. coli* β-glucuronidase positives** ; une seule souche d'*E. coli* sur 20 a donné une réaction négative (pas de coloration rose). En ce qui concerne la sélectivité de la méthode, des faux-positifs peuvent être observés en cas de présence d'*E. vulneris* ou de *Plesiomonas shigelloïdes*.

La méthode Coli ID présente une **linéarité satisfaisante**.

**Cette méthode est juste** lors de la comparaison de ses résultats à ceux de la méthode de référence NF V08-017. Pour quelques échantillons, la méthode Coli ID a donné un dénombrement supérieur à celui de la méthode de référence ; ces résultats pourraient être expliqués par la différence de sensibilité des deux méthodes, surtout en cas de forte contamination en coliformes thermotolérants.

Cette méthode présente des **caractéristiques de fidélité satisfaisantes** : la répétabilité est comprise entre **0,08 et 0,046 log UFC** ; la reproductibilité est comprise entre **0,13 et 0,57 log UFC**.

### 1.4.5.2 Etude menée en 2002

La **méthode** de dénombrement de *E. coli* dans les produits alimentaires par la **gélose Coli ID**, incubée à 44°C ± 1°C, a des **performances de**

praticabilité supérieures à celles de la méthode de référence NF ISO 16649-2.

Les temps de manipulation avec cette méthode sont moins importants que ceux de la méthode de référence.

La **méthode** est **spécifique**. Elle a une **justesse équivalente** à celle de la méthode de référence et une **fidélité comparable** avec celle de la méthode de référence.

La **méthode** est **linéaire**.

La **méthode** est **répétable et reproductible**.

## 2 ETUDE COMPARATIVE

---

### 2.1 Linéarité

#### 2.1.1 Matrices utilisées

Cinq catégories de produits ont été analysées (une matrice par catégorie), à cinq niveaux de contamination et deux répétitions ont été réalisées par échantillon. Au total, 50 analyses ont été effectuées à la fois par la méthode de référence et la méthode alternative.

Les niveaux de contamination, les matrices testées, ainsi que les souches utilisées sont listés dans le tableau suivant :

Matrice testée	Souche	Taux d'inoculation (UFC/g)
Steak haché	<i>E. coli</i> 13	50 - 100
Lait	<i>E. coli</i> 94	100 - 500
Filet de sandre	<i>E. coli</i> Ad 228	500 - 1 000
Petits pois	<i>E. coli</i> 19	1 000 - 5 000
Coule d'œuf	<i>E. coli</i> 142	5 000 - 10 000

#### 2.1.2 Résultats bruts

Les échantillons ont été testés en double par chacune des deux méthodes.

### 2.1.3 Interprétation statistique

Matrice	R	Régression utilisée	Rob.F	Valeur critique	P%	Coefficient de corrélation	Droite de régression
Steak haché	1,00	GMFR	18,392	5,41	0	0,994	log Alt = 1,060 log Ref. - 0,16
Lait	0,43	OLS2	5,103	5,41	6	0,981	log Ref. = 0,993 log Alt + 0,014
Filet de sandre	2,20	OLS1	5,958	5,41	4	0,980	log Alt = 0,894 log Ref. + 0,301
Petits pois	1,33	GMFR	10,859	5,41	1	0,992	log Alt = 1,020 log Ref. + 0,026
Coule d'œuf	0,73	GMFR	2,062	5,41	22	0,998	log Alt = 1,127 log Ref. - 0,332

#### Interprétation statistique :

$P > 5 \%$  : pas significatif                       $1 \% < P < 5 \%$  : significatif  
 $0,1 \% < P < 1 \%$  : très significatif                       $P < 0,1 \%$  : hyper significatif

Les graphiques bidimensionnels et les droites de régression sont donnés en annexe 3.

### 2.1.4 Conclusion

Les tests statistiques valident la linéarité de la méthode pour les matrices Lait et coule d'œuf, avec des valeurs de  $P > 5 \%$ .

Les coefficients de corrélation sont tous supérieurs ou égaux à 0,98, valeur très satisfaisante pouvant mettre en défaut la robustesse du test de linéarité pour les autres matrices testées (steak haché, filet de sandre et petits pois).

**La méthode Coli ID montre une linéarité satisfaisante.**

## 2.2 Exactitude relative

Les données acquises en 2002 ont été interprétées selon le référentiel ISO 16140.

### 2.2.1 Nombre et nature des échantillons

Les nombres et la diversité des échantillons analysés par catégorie sont indiqués dans le tableau suivant :

**Tableau 1 - Nombre et nature des échantillons**

Catégories	Types	Nombre d'échantillons analysés	Nombre de résultats exploités
Produits carnés	Viande crue, charcuterie, plats cuisinés	32	23
Produits laitiers	Laits crus, fromages, crèmes, poudres de lait	31	26
Produits de la mer	Poisson cru, coquillages	27	24
Végétaux et divers	Surgelés, déshydratés, plats cuisinés	30	23
Ovoproduits	Coules d'œuf, mayonnaises, plats cuisinés	27	25

### 2.2.2 Contamination artificielle des échantillons

Aucune contamination artificielle n'a été réalisée.

### 2.2.3 Résultats bruts

Les échantillons ont été analysés en double par chacune des deux méthodes.

**Tableau 2**

Catégorie d'aliments	Domaine de contamination (log UFC/g)
Produits carnés	0,70 à 4,36
Produits laitiers	0,00 à 4,52
Produits de la mer	0,70 à 3,69
Végétaux et divers	1,00 à 3,60
Ovoproduits	0,70 à 4,30

Les graphiques bidimensionnels pour chaque catégorie et pour l'ensemble des échantillons sont donnés en annexe 4.

## 2.2.4 Interprétation

**Tableau 3**

Catégorie	n	R	Régression utilisée	a	t(a)	b	t(b)	T critique	P%	
									Ordonnée à 0	Pente à 1
Produits carnés	23	1,67	GMFR	- 0,063	0,638	1,005	0,100	2,080	53	92
Produits laitiers	26	2,33	OLS1	0,244	1,932	0,933	1,505	2,064	7	15
Produits de la mer	24	1,14	GMFR	0,293	2,326	0,875	2,505	2,074	3	2
Végétaux	23	2,00	GMFR	- 0,211	2,183	1,033	0,957	2,080	4	35
Ovoproduits	25	1,00	GMFR	0,412	2,663	0,879	2,413	2,067	1	2
Tous produits	121	2,33	GMFR	0,192	1,836	0,952	1,289	1,980	8	21

Les limites de répétabilité obtenues pour la méthode alternative et la méthode de référence, ainsi que le biais D obtenu entre les deux méthodes sont donnés dans le tableau 4.

**Tableau 4**

Catégorie	Biais D	Répétabilité méthode alternative	Répétabilité méthode de référence
Produits carnés	- 0,050	0,294	0,176
Produits laitiers	0,055	0,205	0,088
Produits de la mer	- 0,017	0,235	0,205
Végétaux	- 0,110	0,234	0,117
Ovoproduits	0,045	0,205	0,205
Toutes catégories confondues	0,055	0,205	0,088

Un échantillon de la catégorie Végétaux (D133 : Trompettes déshydratées) montre un écart de dénombrement important entre les deux méthodes. Ainsi, les résultats sont respectivement de 3,28 et 3,38 Log UFC/g par la méthode de référence, et inférieurs à 1 par la méthode Coli ID. La présence d'une souche d'*E. coli*, issue de la gélose TBX, (identifiée sur API 20 E) mais non caractéristique sur Coli ID explique l'écart de dénombrement sur cet échantillon.

Les droites de régression (sous la forme de graphiques et d'équations) pour chacune des matrices et pour l'ensemble des matrices sont données en annexe 4.

### 2.2.5 Conclusion

Les limites de répétabilité de la méthode alternative sont toutes supérieures ou égales à celles de la méthode de référence.

Le biais entre les deux méthodes est faible, compris entre - 0,110 et 0,055 log UFC/g.

Les droites de régression sont les suivantes :

- produits carnés log (Coli ID) = 1,00 log (méthode référence) - 0,06
- produits laitiers log (Coli ID) = 0,93 log (méthode référence) + 0,24
- produits de la mer log (Coli ID) = 0,87 log (méthode référence) + 0,29
- produits végétaux log (Coli ID) = 1,02 log (méthode référence) - 0,17
- ovoproduits log (Coli ID) = 0,88 log (méthode référence) + 0,41

Toutes catégories confondues, la droite de régression est la suivante :  
**log (Coli ID) = 0,97 log (méthode référence) + 0,06.**

**La méthode Coli ID montre une exactitude satisfaisante.**

## 2.3 Limite de détection (LOD) et limite de quantification (LOQ)

### 2.3.1 Protocole

La limite de détection de la méthode a été réalisée en cultures pures.

Trois niveaux d'inoculation ont été testés, à raison de 6 réplicats par niveau, soit 18 analyses par la méthode alternative.

Une souche de *E. coli* a été utilisée pour 6 déterminations indépendantes de diluant stérile.

### 2.3.2 Résultats

Les données sont intrinsèques à la méthode. Les résultats sont donnés dans les tableaux suivants :

Niveau	Nombre d'échantillons positifs	Ecart-type	Biais
0	0 / 6	/	/
0,5	4 / 6	0,753	1
1	5 / 6	1,752	2

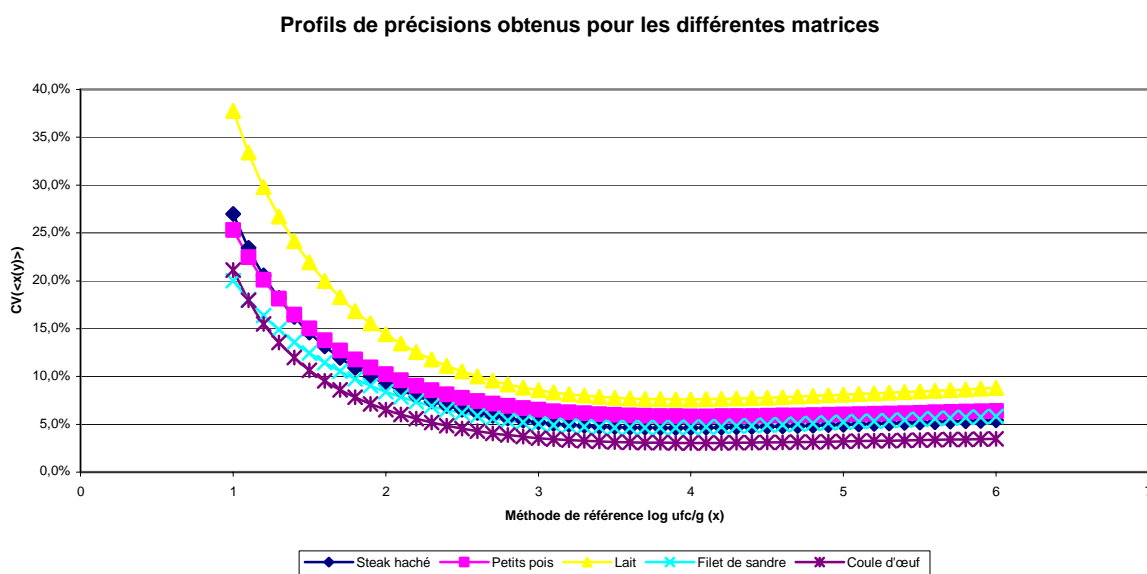
	Formules	Valeurs obtenues
LC	$1,65 S_0 + X_0$	2,2
LOD	$3.3 S_0 + X_0$	3,5
LOQ	$10 S_0 + X_0$	8,5

## 2.4 Sensibilité relative

Les données sont intrinsèques à la méthode. Elles sont obtenues à partir des résultats obtenus dans l'étude de linéarité (pas de nouveau protocole spécifique mis en oeuvre)

Les profils de précision obtenus pour les différentes matrices sont présentés Figure 1.

**Figure 1 - Profils de précision obtenus pour les différentes matrices**



## 2.5 Spécificité/Sélectivité

### 2.5.1 Protocoles d'essai

Au cours de l'étude menée en 1998, 20 souches positives et 23 souches négatives avaient été testées ; les données ont été reprises et complétées avec 10 souches positives. Trois souches négatives ont également été testées.

### 2.5.2 Résultats

#### ✓ Inclusivité

Sur les 30 souches de *E. coli* testées, 3 donnent des colonies bleues non caractéristiques sur Coli ID. L'une d'entre elles est une souche de *E. coli* O157:H7  $\beta$ -glucuronidase négative.

Les 2 autres souches, *E. coli* 12 et *E. coli* 20, ont été identifiées sur galerie ID 32E. La souche *E. coli* 20 a donné une réaction négative au test  $\beta$ -glucuronidase, contrairement à la souche *E. coli* 12.

Les souches à l'activité  $\beta$ -glucuronidase négative, apparaissent non caractéristiques sur milieu TBX, et sont donc non dénombrées par la méthode de référence ISO 16649-2.

#### ✓ Exclusivité

Sur les 23 souches testées, aucune croissance ou une croissance faible est observée sur gélose Coli ID

Il est à noter que, lors de l'étude d'exactitude menée lors de la validation AFNOR en 1998, des colonies identifiées aux espèces *Escherichia vulneris* et *Plesiomonas shigelloides* ont présenté une coloration rose. Cependant, la souche *E. vulneris* 151, testée dans l'étude d'exclusivité, ne montre pas de colonies caractéristiques sur gélose Coli ID. De même trois souches supplémentaires ont été testées : elles ne montrent pas de colonies caractéristiques, ni sur Coli ID , ni sur le milieu TBX de la méthode de référence.

## 2.6 Praticabilité

La praticabilité du milieu Coli ID a été évaluée selon 13 critères :

- *Temps réel de manipulation, flexibilité de la technique par rapport au nombre d'échantillons à analyser, leur charge en bactéries* : le gain de temps par la méthode Coli ID est obtenu par le fait qu'une seule boîte est dénombrée par dilution, ainsi que dans la facilité de lecture des tests.

	Temps en minutes			
	Méthode NF ISO 16649-2		Méthode Coli ID	
	15 échantillons	25 échantillons	15 échantillons	25 échantillons
Prélèvement	26	40	26	40
Broyage	22,5	37,5	22,5	37,5
Analyse	31	69	25	31
Lecture	25	20	12,5	10
Total	104,5	166,5	86	118,5
Temps / échantillon	7	5	5,7	4,7

- *Délai d'obtention des résultats* : le délai d'obtention des résultats par la méthode Coli ID est identique à celui de la méthode de référence.

	Méthode NF ISO 16649-2	Méthode Coli ID
Prélèvement, broyage	J0	J0
Analyse	J0	J0
Lecture	J1	J1

- *Type de qualification de l'opérateur* : le type de qualification requis pour cette méthode est identique à celui requis pour la méthode de référence.
- *Traçabilité des résultats* : aucune traçabilité particulière n'est proposée. Le laboratoire utilise ses propres procédures.

## **3 ETUDE COLLABORATIVE**

---

### **3.1 Organisation de l'étude**

#### **3.1.1 Laboratoires collaborateurs**

14 laboratoires ont participé à l'étude.

#### **3.1.2 Instructions aux laboratoires collaborateurs**

Les instructions détaillées ont été transmises aux laboratoires par le laboratoire expert.

#### **3.1.3 Echantillons**

Du lait pasteurisé demi-écrémé a été inoculé par la souche *Escherichia coli* 94.

#### **3.1.4 Inoculation**

Les taux d'inoculation visés ont été les suivants :

- 0 UFC/ml,
- 10 – 100 UFC/ml,
- 100 – 1 000 UFC/ml,
- 1 000 - 10 000 UFC/ml.

Les échantillons ont été répartis à raison de 25 ml par flacon. Deux échantillons par taux et par laboratoire ont été préparés, soit huit échantillons par laboratoire.

#### **3.1.5 Etiquetage, expédition**

Les échantillons codés (code connu uniquement du laboratoire expert) ont été placés dans des caisses isothermes contenant des blocs réfrigérants et ont été expédiés aux différents laboratoires à l'aide d'un transport express.

Un flacon témoin température contenant un enregistreur de température a été joint au colis, afin de suivre la température au cours du transport et de la mesurer à réception.

Les échantillons ont été livrés en 24 h à 48 h aux laboratoires collaborateurs. La température des échantillons devait être inférieure ou égale à 8°C pendant le transport et comprise entre 0°C et 8°C à l'arrivée.

### 3.1.6 Analyses

Les laboratoires collaborateurs et le laboratoire expert ont analysé les échantillons par la méthode alternative et par la méthode de référence.

Une étude de stabilité de la souche inoculée dans la matrice a été réalisée afin de vérifier qu'il n'y a pas d'évolution au cours du transport.

## 3.2 Contrôle des paramètres expérimentaux

### 3.2.1 Stabilité de la souche au cours du transport

Afin de vérifier la stabilité de la souche *Escherichia coli* 94, un dénombrement de la flore de six flacons inoculés a été effectué le jour de l'inoculation, ainsi qu'après 24 h (avec simulation de transport) et 48 h de conservation à 4°C ; les résultats sont reportés dans le tableau 5.

**Tableau 5 - Dénombrement d'*Escherichia coli* 94 par la méthode NF EN ISO 16649-2 (en UFC/ml)**

	Taux 1		Taux 2		Taux 3	
	Répétition 1	Répétition 2	Répétition 1	Répétition 2	Répétition 1	Répétition 2
J0	55	47	450	450	3 500	2 700
J1	36	53	420	350	3 900	4 500
J2	38	47	340	550	5 000	4 400

Aucune évolution de la souche n'est observée au bout de 48 h de conservation à 4°C.

### 3.2.2 Résultats obtenus pour les deux méthodes

Les résultats de dénombrement d'*Escherichia coli* par le laboratoire expert, par la méthode de référence et par la méthode alternative, sont présentés dans le tableau 6.

**Tableau 6 - Résultats du laboratoire expert (en log UFC/g)**

Taux visé (log UFC/g)	Méthode de référence		Méthode alternative	
	Duplicat 1	Duplicat 2	Duplicat 1	Duplicat 2
< 1	< 1	< 1	< 1	< 1
1 à 2	1,64	1,68	1,76	1,68
2 à 3	2,54	2,59	2,70	2,69
3 à 4	3,63	3,59	3,83	3,79

Les taux de contamination visés ont été atteints.

### 3.2.3 Température des échantillons à réception

Les températures mesurées à réception sont données dans le tableau 7.

**Tableau 7 - Température des échantillons à réception**

Laboratoires	Température mesurée à réception (°C)	Date et heure de réception des échantillons		Température mesurée par le thermobouton
A	7,5	J2	14h00	0,5
B	2,0	J1	11h15	0,0
C	4,0	J1	11h30	<i>Thermobouton non récupéré</i>
D	3,0	J1	08h30	0,0
E	2,5	J2	09h10	0,0
F	0,3	J1	11h20	- 2,5 <sup>1</sup>
G	4,6	J1	10h00	0,00
H	0,2	J1	08h15	0,00
I	0,4	J1	09h30	0,00
J	1,0	J1	11h30	- 1,00 <sup>1</sup>
K	0,6	J1	09h20	0,00
L	0,3	J1	13h15	0,00
M	0,0	J1	11h00	0,00
N	0,3	J1	08h45	0,00

<sup>1</sup> Certaines températures inférieures à 0°C ont été relevées pour ces thermoboutons. Aucune congélation de la matrice n'a été notée par les laboratoires collaborateurs : les résultats ont été conservés dans les interprétations.

### **3.2.4 Température des échantillons pendant le transport**

Tous les colis ont été livrés à J1 à l'exception de deux laboratoires (A et E) qui ont été livrés à J2. Aucun problème de température n'a été rencontré lors du transport. Toutes les températures à réception étaient inférieures à 8,4°C.

## **3.3 Résultats des analyses**

Certains laboratoires n'ont pas inoculé les dilutions 0, -1, -2 et -3 mais uniquement les dilutions -1, -2 et -3, ce qui explique les résultats obtenus pour le niveau 0 (< 1 et < 10 UFC/ml).

Le dénombrement de la flore aérobie mésophile varie de 2 200 à 480 000 UFC/ml. Le laboratoire B n'a pas pu réaliser ce dénombrement, le flacon s'étant cassé au cours du transport.

### 3.4 Calculs et interprétation statistique

#### 3.4.1 Synthèse des résultats obtenus par les deux méthodes

Une synthèse des résultats est présentée tableau 8.

**Tableau 8 - Synthèse des résultats obtenus par la méthode alternative et la méthode de référence (en UFC)**

Laboratoires	Niveau 0				Niveau 1				Niveau 2				Niveau 3			
	Méthode de référence		Méthode alternative		Méthode de référence		Méthode alternative		Méthode de référence		Méthode alternative		Méthode de référence		Méthode alternative	
A	<10	<10	<10	<10	35	40	40	80	390	510	550	520	3200	3800	4400	4300
B	<1	<1	<1	<1	43	42	53	58	620	550	670	630	5500	4900	6600	5300
C	<10	<10	<10	<10	65	55	50	40	380	400	350	460	5300	4400	4900	4800
D	<10	<10	<10	<10	30	50	60	80	440	360	500	570	3000	3600	4100	4500
E	<1	<1	<1	<1	44	45	50	40	480	380	540	560	4800	4400	5900	5600
F	<1	<1	<1	<1	25	41	52	49	490	600	620	610	5200	7000	5400	5800
G	<10	<10	<10	<10	35	45	30	30	360	330	190	410	3500	3500	3300	5400
H	<1	<1	<1	<1	25	43	39	38	360	400	480	400	4000	5000	4500	3500
I	<1	<1	<1	<1	40	39	50	47	420	510	570	520	4000	4900	5600	6400
J	<1	<1	<1	<1	39	34	44	43	440	400	490	290	6100	5000	3700	5000
K	<10	<10	<10	<10	35	45	60	20	590	420	480	460	4600	5000	5900	4800
L	<10	<10	<10	<10	35	50	30	50	430	480	590	470	4800	6500	4800	3900
M	<1	<1	<1	<1	39	43	55	43	430	480	500	480	4800	6500	5700	5100
N	<1	<1	<1	<1	24	20	47	42	450	360	420	410	3600	3700	5800	6600

#### 3.4.2 Calcul du biais

Pour chaque niveau, la différence des moyennes des réplicats ( $d_i$ ) obtenues par la méthode alternative et la méthode de référence est calculée :  $d_i = (M_{i,alt} - M_{i,ref})$ .

La médiane ( $MED\{d_i\}$ ) des  $d_i$  permet de déterminer le biais D ( $MED\{d_i\} = \text{biais D}$ ).

Le biais D et l'écart-type robuste  $S\{d_i\} = K1S_n$  donnent une statistique de t ( $t(d) = MED\{d_i\} \sqrt{n}/S\{d_i\}$ ). Cette valeur de t obtenue est comparée à une

valeur critique trouvée dans la table de Student (pour  $n = 14$   $t$  critique = 2,179).

Les valeurs de  $t(d)$  obtenues par niveau sont reportées dans le tableau 9.

**Tableau 9 - Valeurs de  $t(d)$  obtenues par niveau**

Niveau	Nombre de résultats exploitables (nombre de laboratoires)	Biais D	t critique ddl (n-1)	Conclusion
1	n = 14	0,076	2,160	Biais non significatif
2	n = 14	0,051	2,160	Biais non significatif
3	n = 14	0,051	2,160	Biais non significatif

*Niveau critique :  $t(d) < t$  critique*

Le biais entre les deux méthodes est non significatif quel que soit le niveau testé : il est compris entre + 0,051 et + 0,076 log UFC/g.

Le biais entre les deux méthodes déterminé au cours de l'étude préliminaire est égal à - 0,020 log UFC/g, toutes catégories confondues.

### 3.4.3 Calcul de la répétabilité

Les valeurs obtenues pour la limite de répétabilité, ainsi que les valeurs obtenues pour le test F sont données dans le tableau 10.

**Tableau 10 - Valeurs obtenues pour la limite de répétabilité et valeurs pour le Test F**

Niveau	Nombre de résultats exploitables (nombre de laboratoires)	Limite de répétabilité		F calculé (ou $1/F^*$ )	F critique (0,05 ; n ; n)	P %
		Méthode de référence	Méthode alternative			
1	n = 14	0,223	0,214	1,084*	2,78	44
2	n = 14	0,200	0,098	4,191*	2,48	1
3	n = 14	0,235	0,167	1,966*	2,48	11

*Interprétation statistique :*  $P > 5\%$  : non significatif       $1\% < P < 5\%$  : significatif  
 $0,1\% < P < 1\%$  : très significatif       $P < 0,1\%$  : hyper significatif

La limite de répétabilité de la méthode alternative déterminée au cours de l'étude préliminaire est égal à 0,240 log UFC/g pour toutes catégories confondues, celle de la méthode de référence à 0,147log UFC/g.

Les limites de répétabilité de la méthode alternative, obtenues au cours de l'étude collaborative, montrent des valeurs comparables à celles obtenues par la méthode de référence, à l'exception de la limite de répétabilité observée pour le niveau 2. La limite de répétabilité de la méthode alternative est alors meilleure que celle de la méthode de référence.

### 3.4.4 Reproductibilité

Les valeurs obtenues pour la limite de reproductibilité, ainsi que les valeurs obtenues pour le test F sont données dans le tableau 11.

**Tableau 11 - Valeurs obtenues pour la limite de reproductibilité et valeurs pour le Test F**

Niveau	Nombre de résultats exploitables (nombre de laboratoires)	Limite de reproductibilité		F calculé (ou 1/F *)	F critique (0,05 ; n - 1 ; n - 1)	P %
		Méthode de référence	Méthode alternative			
1	n = 14	0,216	0,305	1,990	2,58	11
2	n = 14	0,240	0,266	1,234*	2,58	65
3	n = 14	0,338	0,319	1,122*	2,58	42

*Interprétation statistique :* P > 5% : non significatif  
 0,1 % < P < 1 % : très significatif  
 1 % < P < 5 % : significatif  
 P < 0,1 % : hyper significatif

Les limites de reproductibilité de la méthode alternative montrent des valeurs comparables à celles de la méthode de référence.

### 3.4.5 Rapports limite de reproductibilité / limite de répétabilité

Les rapports limite de reproductibilité / limite de répétabilité sont donnés dans le tableau 12.

**Tableau 12 - Rapports limite de reproductibilité /  
limite de répétabilité**

Niveau	Nombre de résultats exploitables (nombre de laboratoires)	Limite de reproductibilité / limite de répétabilité	
		Méthode de référence	Méthode alternative
1	n = 14	0,971	1,426
2	n = 14	1,198	2,725
3	n = 14	1,440	1,905

Niveau critique : reproductibilité / répétabilité : < 2

Les rapports limite de reproductibilité / limite de répétabilité sont tous inférieurs à 2, excepté pour la méthode alternative au niveau 2. Ceci est dû à la valeur de limite de répétabilité faible, obtenue pour la méthode alternative (0,098).

### 3.4.6 Dispersion entre les laboratoires

Niveau	Nombre de résultats exploitables (nombre de laboratoires)	Méthode de référence F (ou 1/F*)	Méthode alternative F (ou 1/F*)	F critique (0,05 ; n - 1 ; n)
1	n = 14	1,129*	3,066	2,55
2	n = 14	1,869	13,848	2,55
3	n = 14	3,145	6,261	2,55

Niveau critique : F ou 1/F < F (critique)

**La dispersion des résultats entre laboratoires est plus élevée pour la méthode alternative que pour la méthode de référence.**

## 4 CONCLUSION

---

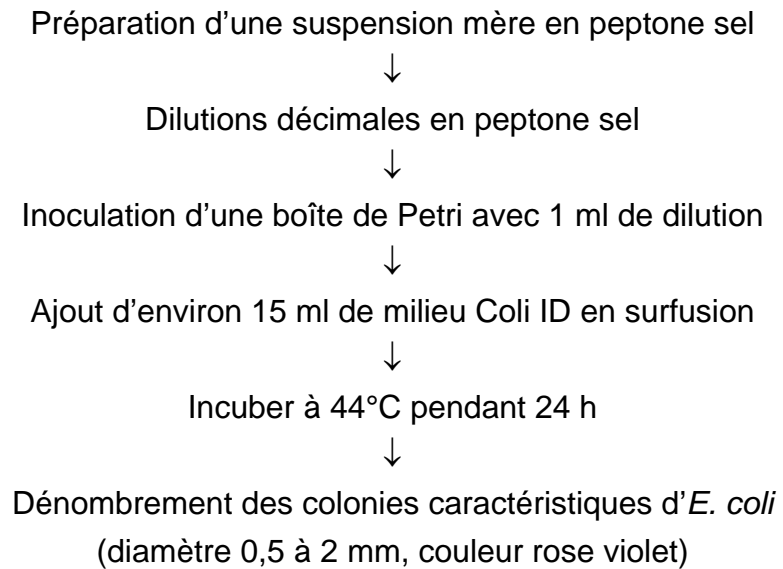
Les **conclusions de l'étude préliminaire** sont les suivantes :

- ✓ La linéarité et l'exactitude de la méthode COLI ID pour le dénombrement des *E. coli* à 44°C sont satisfaisantes.
- ✓ Les limites de répétabilité de la méthode alternative sont proches de celles de la méthode de référence.
- ✓ Le biais entre les deux méthodes est faible, compris entre - 0,110 et + 0,055 log UFC/ g.
- ✓ La méthode COLI ID est spécifique et sélective.

Les **conclusions de l'étude interlaboratoire** sont les suivantes :

- ✓ Le biais entre les deux méthodes est faible, comprise entre 0,051 et 0,076 log UFC/g.
- ✓ Les limites de répétabilité et de reproductibilité de la méthode alternative sont comparables ou inférieures à celles de la méthode de référence.
- ✓ La dispersion entre laboratoires est plus élevée pour la méthode alternative.

## Annexe 1 - Méthode alternative



**REF 42 017**

08142 H - fr - 2007/02

**Gélose Coli ID (COLI ID-F)***Pour contrôle microbiologique exclusivement*Milieu chromogène sélectif pour la détection et le dénombrement d' *E. coli*  $\beta$ D-glucuronidase positive et des autres coliformes à partir d'échantillons alimentaires.**INTRODUCTION ET OBJET DU TEST**

La gélose Coli ID est un milieu chromogène sélectif pour la détection et le dénombrement d' *E. coli*  $\beta$ D-glucuronidase positive et des autres coliformes à partir d'échantillons alimentaires.

Le milieu Coli ID est validé AFNOR :

- pour une incubation à 44°C par rapport à la méthode normalisée NF ISO 16649-2 (3) pour le dénombrement d' *E. coli*  $\beta$ D-glucuronidase positive.
- pour une incubation à 37°C d'une part par rapport à la méthode normalisée NF ISO 4832 pour le dénombrement des coliformes par comptage des colonies (2) et d'autre part par rapport à la méthode normalisée NF ISO 16649-2 (3) pour le dénombrement d' *E. coli*  $\beta$ D-glucuronidase positive.

La validation a été conduite selon la norme ISO 16140.

**PRINCIPE**

Le milieu Coli ID contient deux substrats chromogènes : l'un pour la mise en évidence de la  $\beta$ D-glucuronidase colorant les colonies d' *E. coli* en rose et l'autre pour la mise en évidence de la  $\beta$ -galactosidase colorant les colonies des autres coliformes en bleu. La combinaison de ces deux substrats optimise la détection d' *E. coli* et des autres coliformes. La plupart des bactéries Gram positif est inhibée.

	<i>E. coli</i> $\beta$ D-glucuronidase positive	Autres coliformes	Autres Gram négatifs
Couleur	Rose/violet	Bleu/gris	Incolore
Taille (mm)	0,5 à 2,0	0,5 à 2,0	0,1 à 1,0

**PRESENTATION**

	Milieu prêt à l'emploi
<b>REF 42 017</b>	Coffret de 6 flacons de 200 ml + 1 notice

**COMPOSITION**

Formule théorique .

Ce milieu peut être ajusté et/ou complété en fonction des critères de performances imposés:

Peptone de gélatine (bovin ou porcin) .....	7 g
Extrait de levure .....	3 g
Chlorure de sodium .....	5g
Sels biliaires (bovin ou ovin) .....	1,5 g
Mélange des activateurs .....	0,3 g
Mélange chromogène .....	0,3 g
Agar .....	15 g
Eau purifiée .....	1 l

pH 7,2

**REACTIFS ET MATERIEL NECESSAIRES MAIS NON FOURNIS****Réactifs :**

- Bouillon Tryptone sel (Réf. 42 076 ou 42 021).

**Matériel :**

- Boîtes de Petri stériles.
- Etuve bactériologique.
- Bains-marie.

**PRECAUTIONS D'UTILISATION**

- Pour contrôle microbiologique exclusivement.
- Pour usage professionnel uniquement
- Ce coffret contient des composants d'origine animale. La maîtrise de l'origine et/ou de l'état sanitaire des animaux ne pouvant garantir de façon absolue que ces produits ne contiennent aucun agent pathogène transmissible, il est recommandé de les manipuler avec les précautions d'usage relatives aux produits potentiellement infectieux (ne pas ingérer; ne pas inhaler).
- Les prélèvements, cultures bactériennes et produits ensemencés doivent être considérés comme potentiellement infectieux et doivent être manipulés de façon appropriée. Les techniques aseptiques et les précautions usuelles de manipulation pour le groupe bactérien étudié doivent être respectées tout au long de la manipulation; se référer à "CLSI/NCCLS M29-A, *Protection of Laboratory Workers from occupationally Acquired Infections; Approved Guideline – Révision en vigueur*". Pour informations complémentaires sur les précautions de manipulation, se référer à "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories – CDC/NIH - Dernière édition ", ou à la réglementation en vigueur dans le pays d'utilisation.
- Les milieux de culture ne doivent pas être utilisés comme matériau ou composant de fabrication.
- Ne pas utiliser les réactifs après la date de péremption.
- Ne pas utiliser des flacons présentant une suspicion de contamination.
- Avant utilisation, s'assurer de l'intégrité des ergots d'invulnérabilité de la capsule des flacons.
- Un flacon de gélose ne peut subir que deux régénérations.
- Le milieu doit être utilisé selon le mode opératoire indiqué dans cette notice. Toute déviation de méthodologie peut modifier les résultats.

**CONDITIONS DE STOCKAGE**

- Les flacons se conservent entre 2°C et 8°C dans leur coffret jusqu'à la date de péremption.
- Conserver à l'abri de la lumière.

**ECHANTILLONS**

Suivre les recommandations des normes en vigueur pour la réalisation des prélèvements et la préparation des échantillons.

**MODE OPERATOIRE****Préparation de la gélose:**

1. Desserrer au préalable la capsule du flacon de gélose.
2. Mettre le flacon à régénérer dans un bain marie sécurisé à environ 50°C, monter la température jusqu'à 95°C et laisser fondre la gélose (environ 45 minutes).
3. Homogénéiser après fermeture de la capsule (utiliser des gants de protection contre les risques thermiques).
4. Laisser les flacons à température ambiante au moins 15 secondes avant de les transférer dans un bain d'eau thermostaté à 47 ± 2°C. Maintenir les flacons à cette température jusqu'au moment de l'utilisation, sans excéder 6 heures.

**Préparation de la suspension mère :**

A effectuer conformément à la norme décrite pour l'analyse du produit concerné.

**Protocoles :**

1. Dénombrement d' *E.coli*  $\beta$ D-glucuronidase positive à 44°C : Protocole validé AFNOR (BIO 12/5 - 01/99) (Reconduction obtenue en décembre 2006 – validité janvier 2011)

Le milieu Coli ID est validé AFNOR par rapport à la norme NF ISO 16649-2 (3) pour le dénombrement des *E. coli*  $\beta$ D-glucuronidase positive dans tous les produits d'alimentation humaine, selon le protocole suivant :

1. Dans une boîte de Petri stérile, placer 1 ml de la suspension mère (réalisée par exemple en bouillon tryptone sel) ou des dilutions décimales, à raison d'une boîte par dilution.
2. Ajouter environ 15 ml de milieu Coli ID maintenu en surfusion (47°C environ) et homogénéiser soigneusement avant de laisser refroidir sur une surface plane jusqu'à solidification de la gélose.
3. Incuber les boîtes (couvercle en bas) à 44°C  $\pm$  1°C pendant 24  $\pm$  2 heures.

**Note :** Si on suspecte une forte contamination de la matrice par des micro-organismes susceptibles d'envahir la gélose en surface à 44°C, il peut être nécessaire, pour faciliter la lecture, de couler une double couche de milieu Coli ID (environ 5 ml) maintenu en surfusion.

**Lecture et interprétation :**

*E. coli*  $\beta$ D-glucuronidase positive donne en 24 heures des colonies de 0,5 à 2 mm de diamètre de coloration rose à violet.

Retenir les boîtes contenant moins de 150 colonies caractéristiques (il faut qu'une boîte renferme au moins 15 colonies) et se reporter à la formule générale de calcul. Dans le cas où la plus faible dilution testée contient un nombre inférieur à 15 colonies caractéristiques, utiliser l'estimation pour les petits nombres.

2. Dénombrement simultané d' *E.coli*  $\beta$ D-glucuronidase positive et des autres coliformes à 37°C par ensemencement en profondeur : Protocole validé AFNOR.

- pour *E.coli* : BIO 12/19 – 12/06 (Validité décembre 2010)
  - et
  - pour les coliformes : BIO 12/20 – 12/06 (Validité décembre 2010).
1. Dans les boîtes de Petri stériles, placer 1 ml du produit et/ou les différentes dilutions (réalisées par exemple en Tryptone sel). N'utiliser qu'une boîte par dilution.
  2. Couler environ 15 ml du milieu Coli ID maintenu en surfusion.
  3. Agiter pour bien mélanger et laisser refroidir sur une surface fraîche et horizontale. Laisser le milieu se solidifier.
  4. Pour faciliter la lecture en évitant un envahissement en surface de certains micro-organismes, possible après une incubation à 37°C, il est recommandé de couler une deuxième couche de milieu Coli ID (environ 5 ml) maintenu en surfusion. Laisser refroidir jusqu'à solidification.
  5. Incuber les boîtes (couvercle en bas) à 37°C  $\pm$  1°C pendant 24  $\pm$  2 heures.

**Lecture et interprétation :**

*E. coli*  $\beta$ D-glucuronidase positive donne des colonies de 0,5 à 2 mm de diamètre de coloration rose à violette. Les autres coliformes donnent des colonies de 0,5 à 2 mm de diamètre de coloration bleue à bleu-gris.

**Le nombre de coliformes totaux correspond à la somme des colonies roses à violettes et des colonies bleues à gris-bleu.**

**Mode de calcul :**

Retenir les boîtes contenant moins de 150 colonies caractéristiques (il faut qu'une boîte renferme au moins 15 colonies caractéristiques) et se reporter à la formule générale de calcul. Dans le cas où la plus faible dilution testée contient un nombre inférieur à 15 colonies caractéristiques, utiliser l'estimation pour les petits nombres.

3. Dénombrement d' *E.coli*  $\beta$ D-glucuronidase positive par ensemencement en surface : protocole non validé AFNOR.

Après avoir coulé la gélose en boîte de Petri (90 mm ou 55 mm), l'ensemencement peut être effectué soit en déposant la membrane utilisée pour la filtration, soit en étalant 0,1 ml du liquide à tester ou de ses dilutions à la surface du milieu.

Incuber les boîtes (couvercle en bas) à 37°C  $\pm$  1°C pendant 24  $\pm$  2 heures.

**Lecture et interprétation:**

*E. coli*  $\beta$ D-glucuronidase positive donne des colonies de 0,5 à 2 mm de diamètre de coloration rose à violette.

**CONTROLE DE QUALITE**

La gélose Coli ID est conçue et développée afin de répondre aux exigences de qualité les plus strictes. Les résultats des souches testées lors du contrôle de qualité lot par lot figurent sur le certificat de contrôle qualité disponible sur demande.

**LIMITES DU TEST**

- Coli ID a été évalué sur les principales matrices alimentaires et sur un grand nombre de souches bactériennes. Compte tenu de la diversité des produits alimentaires, des procédés de fabrication et de la flore microbienne, il peut être nécessaire de vérifier que Coli ID est bien adapté à la spécificité de vos produits.
- Une inhibition de la  $\beta$ -galactosidase des coliformes, se traduisant par une absence de coloration bleue des colonies, est exceptionnellement observée. Cette inhibition a été constatée pour certains fromages principalement avec la suspension mère.
- Le sérotype *E. coli* O157 H7, ne possédant pas de  $\beta$ D-glucuronidase, apparaît sous forme de colonies bleues à gris-bleu.
- Certaines souches, autres que *E. coli* possèdent une  $\beta$ D-glucuronidase et sont susceptibles de donner des colonies roses. Par exemple : certaines souches de *Pleisiomonas shigelloides*, d'*Enterobacter* et d'*Escherichia vulneris* ....
- Le développement est fonction des exigences propres à chaque micro-organisme. Il est donc possible que certaines souches ayant des exigences spécifiques (substrat, température, ...) ne se développent pas.

Le paramètre Gélose Coli ID est validé selon la norme EN ISO 16140 (4) en tant que méthode alternative d'analyse pour tous produits alimentaires et échantillons d'environnement. Cette validation délivrée par AFAQ AFNOR Certification, a été obtenue par rapport aux méthodes de référence décrites dans les normes NF ISO 16649-2(3) et NF ISO 4832(2).

L'attestation BIO-12/5 - 01/99 est valide jusqu'au 19 janvier 2011.

L'attestation BIO-12/19 - 12/06 est valide jusqu'au 15 décembre 2010.

L'attestation BIO-12/20 - 12/06 est valide jusqu'au 15 décembre 2010.

Ces attestations peuvent être obtenues auprès de notre service Assistance Technique.



BIO 12/5 - 01/99  
BIO 12/19 - 12/06  
BIO 12/20 - 12/06

METHODES ALTERNATIVES D'ANALYSE POUR L'AGROALIMENTAIRE  
Certifié par AFAQ AFNOR Certification  
www.afnor.org

#### TABLE DES SYMBOLES

Symbole	Signification
	Référence du catalogue
	Fabricant
	Limites de température
	Utiliser jusque
	Code du lot
	Consulter les instructions d'utilisation
	Conserver à l'abri de la lumière

#### ELIMINATION DES DECHETS

Eliminer les réactifs utilisés et non utilisés ainsi que les matériels à usage unique contaminés en suivant les procédures relatives aux produits infectieux ou potentiellement infectieux.

Il incombe à chaque laboratoire de gérer les déchets et les effluents qu'il produit selon leur nature et leur dangerosité, et d'en assurer (ou faire assurer) le traitement et l'élimination selon les réglementations applicables.

#### REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. MIONI R, GRIMALDI M, BORDIN P. et al. - Comparison between selective media for Escherichia coli and coliforms simultaneous determination in food of animal origin - Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie - Italie - *Rev. Industrie Alimentari*- Sept. 97 p. 1014 à 1020
2. Norme NF ISO 4832 - Microbiologie des aliments - Méthode horizontale pour le dénombrement des coliformes - Méthode par comptage des colonies - Juillet 2006.
3. Norme NF ISO 16649-2 - Méthode horizontale pour le dénombrement des *Escherichia coli*  $\beta$ D-glucuronidase positive. Partie 2 : Technique de comptage des colonies à 44°C au moyen de 5-bromo-4 chloro - 3 indolyl  $\beta$  D glucuronate. Juillet 2001. ISSN 0335-3931.
4. Norme NF EN ISO 16140 - Microbiologie des aliments - Protocole pour la validation des méthodes alternatives. Octobre 2003.



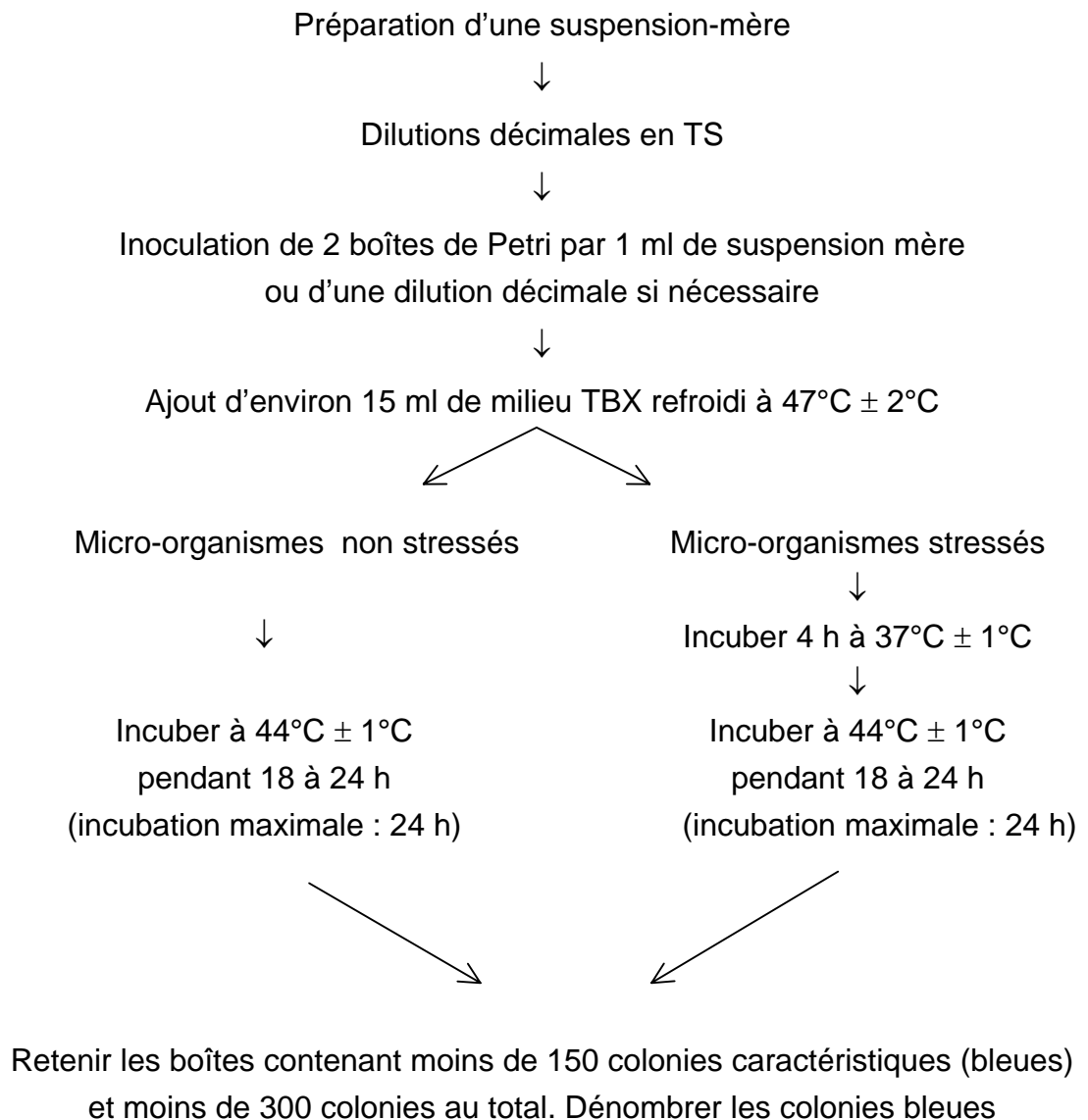
bioMérieux® SA  
au capital de 12 029 370 €  
673 620 399 RCS LYON

69280 Marcy-l'Étoile / France  
Tél. 33 (0)4 78 87 20 00  
Fax 33 (0)4 78 87 20 90  
<http://www.biomerieux.com>

Imprimé en France

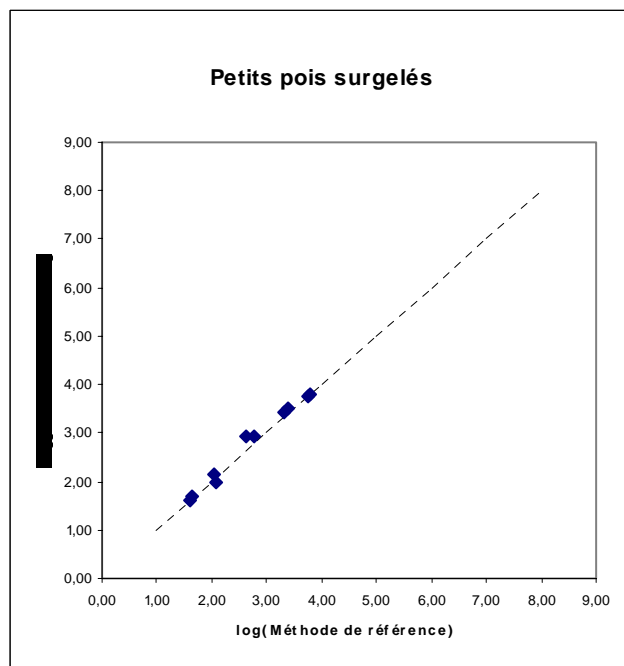
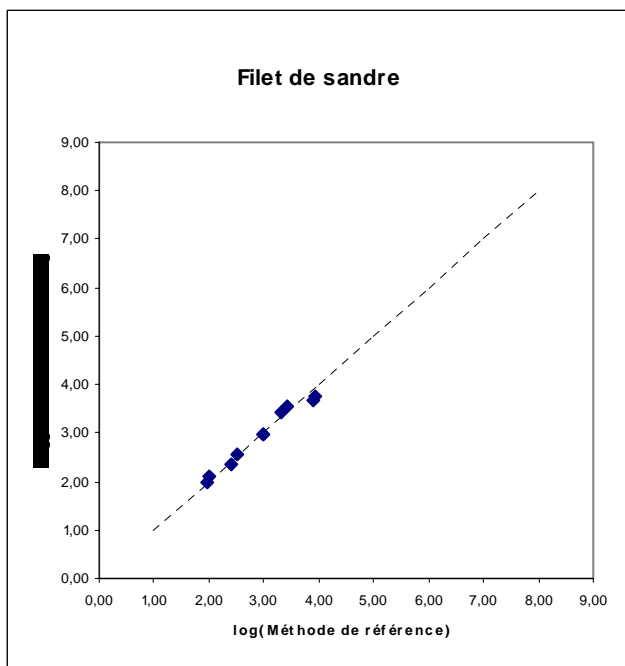
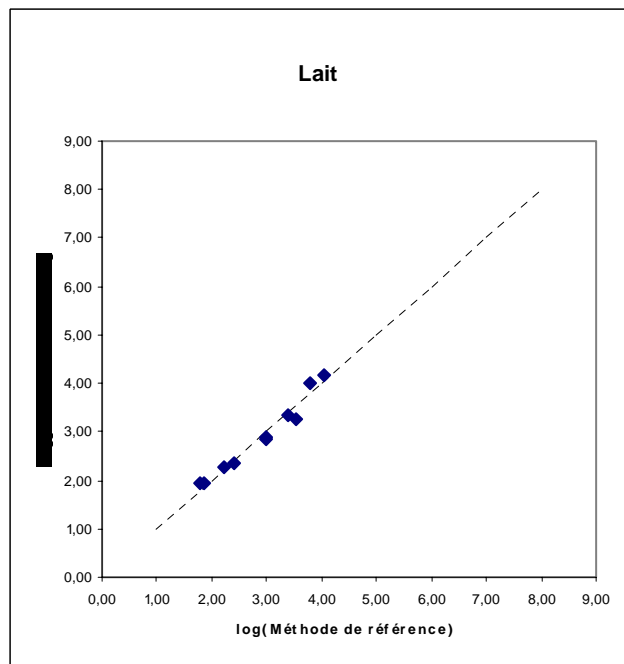
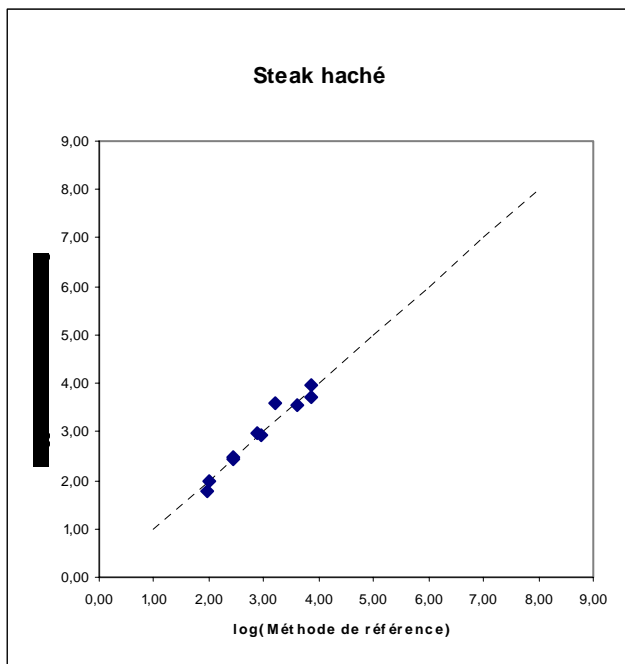
bioMérieux et le logo bleu sont des marques utilisées, déposées et/ou enregistrées appartenant à bioMérieux SA ou à l'une de ses filiales.

## Annexe 2 - Méthode de référence

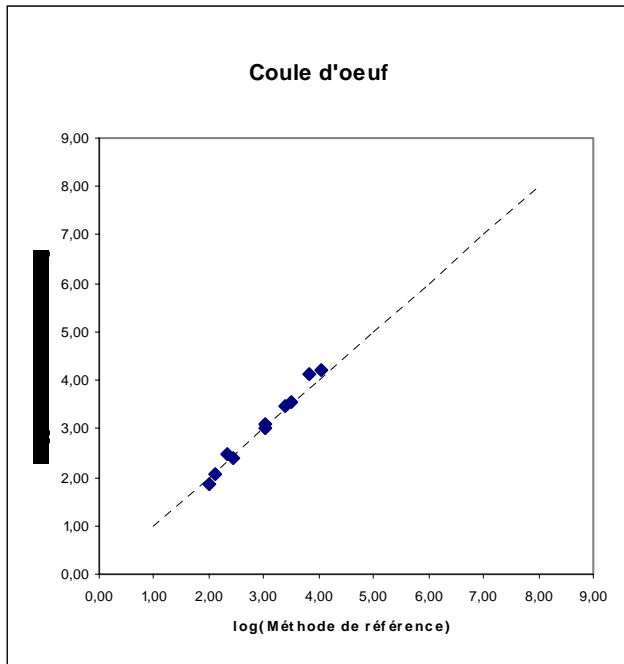


### Annexe 3 - Linéarité : Graphiques bidimensionnels et droites de régression

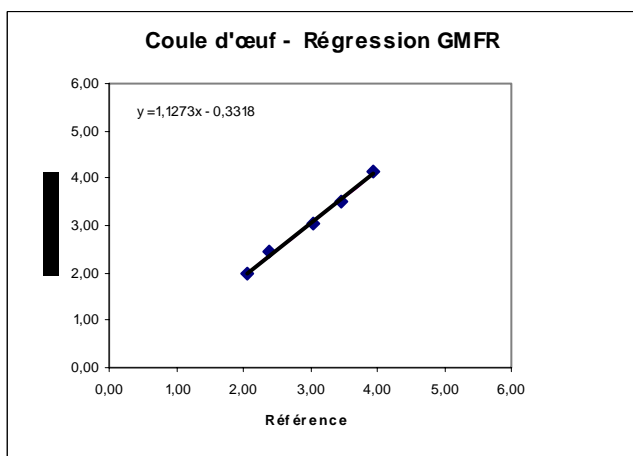
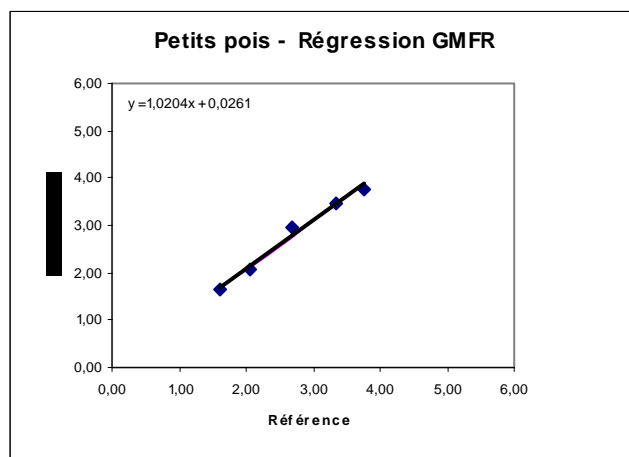
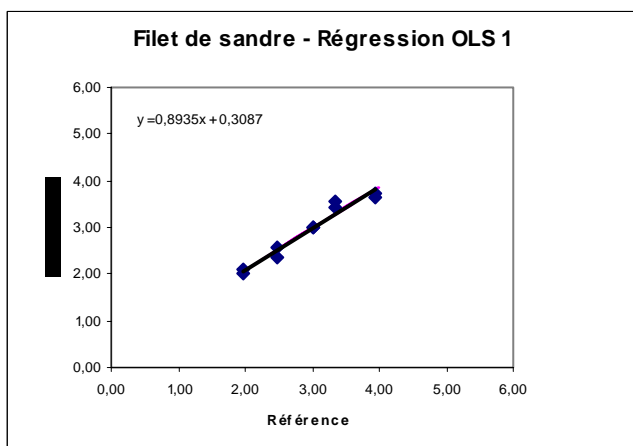
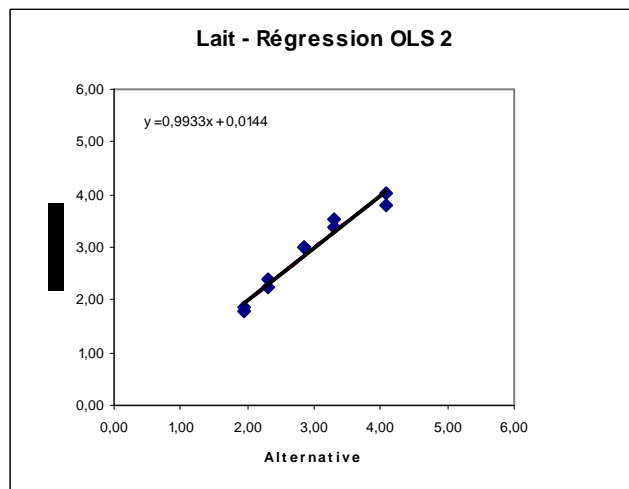
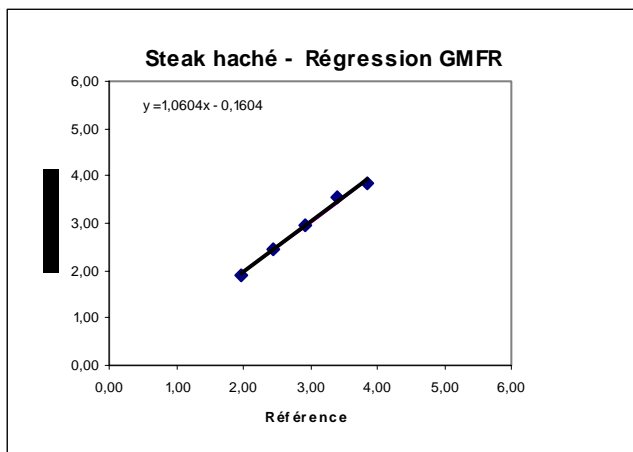
#### Linéarité : Graphiques bidimensionnels



### Linéarité : Graphiques bidimensionnels

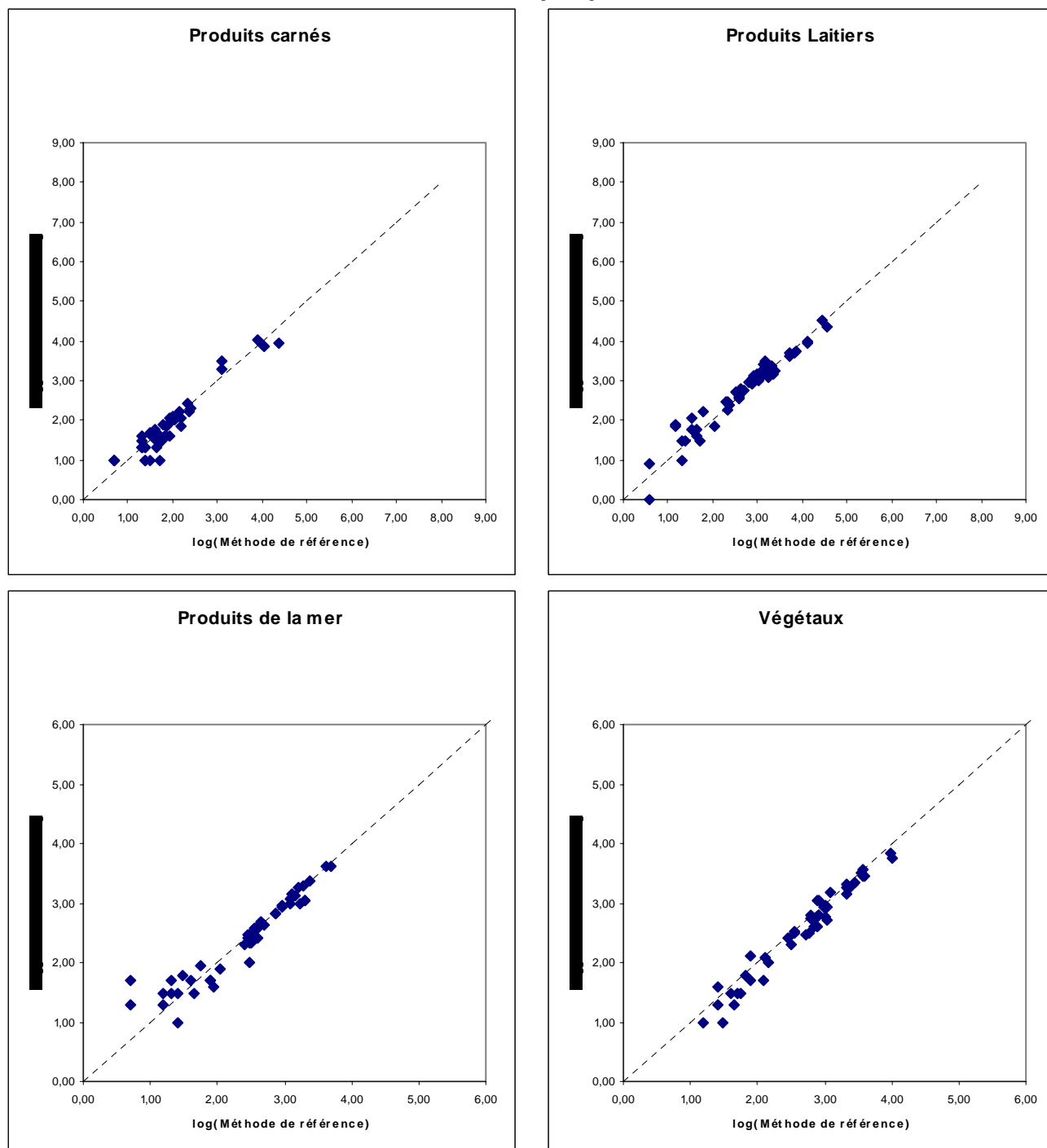


### Linéarité : Droites de régression

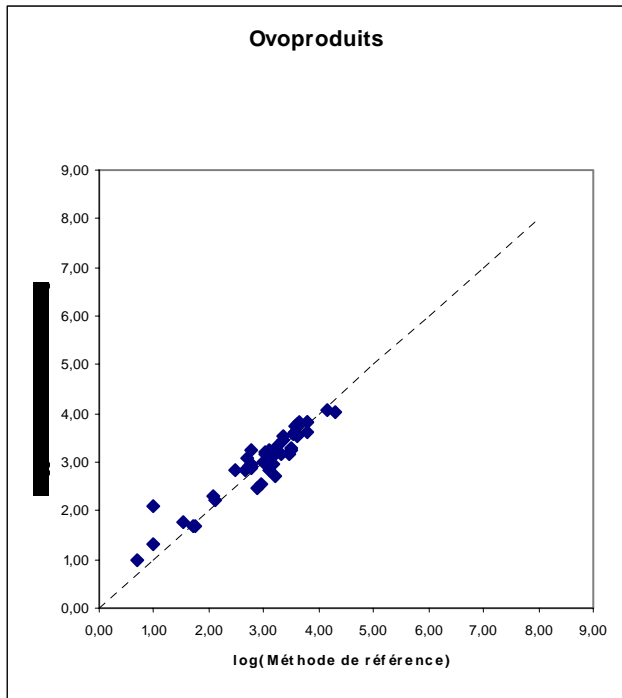


## Annexe 4 - Exactitude : Graphiques bidimensionnels et droites de régression

### Exactitude relative : Graphique bidimensionnel



### Exactitude relative : Graphique bidimensionnel



**Droites de régression (sous la forme de graphiques et d'équations) pour chacune des matrices et pour l'ensemble des matrices**

