

ESTIMATION DES TITRES VIRAUX :

UNE PROGRAMMATION PRATIQUE ET FIABLE SUR CALCULATRICE DE POCHE, ET ACCESSIBLE PAR L'INTERNET

Jocelyne Husson van Vliet¹ et Ph. Roussel²

¹Institut de la Santé Publique, Brussels, Belgium,

jocelyne.husson@iph.fgov.be

²IMEC, SPDT Division, Heverlee, Belgium,

Philippe.Roussel@imec.be

RÉSUMÉ

Les auteurs proposent une méthode basée sur la procédure itérative de Newton-Raphson pour estimer la concentration des suspensions virales à partir des résultats des essais par effet cytopathique « tout-ou-rien » liés à la courbe dose-réponse. La procédure de calcul fournit l'estimation du maximum de vraisemblance avec ses limites de confiance à 95% et détermine la valeur de χ^2 pour tester la qualité de l'ajustement. Un programme est présenté (calculatrices HP des séries 41 et 48). Il convient pour les conditions expérimentales les plus variées et est également à présent accessible librement sur le site Internet créé.

Estimation des concentrations virales; titre viral cytopathique tout-ou-rien; Maximum de vraisemblance; loi de Poisson, essai de dénombrement par la méthode des dilutions, estimation du nombre le plus probable

ABSTRACT

A method for estimation of viral suspension concentrations from the dose-response data yielded by cytopathic effect assays is presented. The maximum likelihood equation valid for such data is solved using a robust implementation of the Newton-Raphson iterative procedure. The method also provides 95%

confidence bounds on the concentration and the χ^2 statistic for testing the goodness of fit. Programs for the HP41 and HP48 series handheld scientific calculators suitable to most experimental situations are proposed. The software is now also freely downloadable from an Internet webpage.

INTRODUCTION

Dans le contexte de la production de vaccins viraux et de leur contrôle, il est essentiel d'estimer de manière fiable le pouvoir infectieux (et, partant, immunisant) des suspensions virales. On peut obtenir une estimation du titre infectieux d'une suspension de virions soit par la méthode énumérative (dénombrement des lésions produites dans des cultures cellulaires), soit en utilisant des titrages dits tout-ou-rien (présence ou absence d'effet cytopathique), liés à la courbe de réponse dose-effet. Grâce au développement intensif des microméthodes pour la culture cellulaire, les essais tout-ou-rien l'emportent aujourd'hui largement en titrage de routine (rapidité liée à la miniaturisation et l'automatisation importantes des équipements, gain en matériel) : dilution en séries d'échantillons de la suspension, inoculation de microcultures, relevé du nombre de microcultures infectées pour chaque dilution. Ce relevé peut se faire par examen sous le microscope, ce qui, pour de grandes cadences d'essais est long, fastidieux et particulièrement éprouvant pour l'opérateur du fait de l'utilisation fréquente d'équipements optiques traditionnels encore beaucoup trop rarement adaptés aux exigences ergonomiques [*Elias, 1984, Lee et al, 1988, Sillanpaa et al, 2003*]. Il est également possible de fixer et colorer les microcultures avant la lecture. La technique de fixation classique utilise une solution de formaldéhyde, mais le classement récent de ce composé chimique comme cancérigène pour l'homme (groupe 1) [*INERIS, 2004, A.R.Co.P., 2004*] impose en vertu des législations en matière de sécurité au travail [*Réglementation du bien-être au travail, 2004*] d'appliquer au maximum des techniques de fixation al-

ternatives : la technique de fixation par micro-ondes a été décrite précédemment [*Husson van Vliet, 1991 ; 2005*].

Quel que soit le type d'essai choisi, la détermination d'une estimation fiable du titre final lié à la concentration virale nécessite une procédure de calcul adaptée.

Bien que de nombreuses méthodes aient été proposées, il est acquis de longue date que les courbes dose-réponse liée à ce type de titrage se fondent sur la loi de probabilité de Poisson, et que par conséquent seules les méthodes de calcul basées sur cette hypothèse fournissent des estimations exactes non entachées de biais [*Lauffer et al, 1945 ; Meynell, 1957 ; Mai et al, 1963 ; Stellmann et al, 1972 ; Husson van Vliet, 1986*]. Toutefois, les procédures publiées impliquent d'abord la transformation des données brutes afin de linéariser la relation dose-effet ce qui ne va pas sans l'utilisation de tables statistiques pour approcher la solution la plus exacte. Il s'ensuit que la plupart des virologues accordent dès lors la préférence à des méthodes moins fiables, mais d'utilisation élémentaire et rapide, au mépris de l'exactitude des estimations. La grande majorité d'entre eux négligent en plus de prendre en compte que l'imprécision technique des volumes utilisés dans la procédure de dilution se répercute sur le titre sous forme d'une erreur statistique qui est bien distincte de celle liée à la distribution aléatoire des particules. Une imprécision technique même faible entraîne forcément, de dilution en dilution, une erreur finale non négligeable [*Lorentz, 1961 et 1962 ; Chase et al. , 1975 ; Husson van Vliet et al, 1988 ; Husson van Vliet et al, 2005*].

Pourtant, les développements croissants dans les systèmes de programmation sur les calculatrices dites « de poche » et la possibilité à présent généralisée d'accès à l'Internet via les ordinateurs personnels ont rendu à l'heure actuelle le scientifique de laboratoire, même novice en la matière, à même de réaliser les traitements les plus élaborés et les mieux adaptés à ses résultats expérimentaux.

Nous présentons ici une solution exacte pour calculer la concentration d'une suspension virale au départ des résultats obtenus par un essai de titrage par effet cytopathique lié à la courbe de réponse quantale dose-effet. La méthode fournit l'estimation du maximum de vraisemblance de la concentration virale (MLE) ainsi qu'une estimation de ses limites de confiance à 95%, et elle détermine la valeur de χ^2 et le niveau de signification correspondant pour tester la qualité de l'ajustement. On propose également un programme initialement prévu pour la HP41C mais à présent adapté pour toutes les calculatrices de la série HP48. Nous avons rendu nos logiciels concernant la virologie accessibles librement sur le réseau Internet, après installation et lancement d'un « émulateur » HP48G (installation virtuelle de la calculatrice avec son tableau de bord : http://press.ehsal.be/pcx/EMU48_page.htm). Ceci permet d'exécuter toutes les procédures de calcul que nous avons développées sur calculatrice, mais à l'écran du PC, et 20 fois plus vite que sur la machine réelle [Husson van Vliet and Roussel, 1985, 1988 ; Roussel and Husson van Vliet, 1988, 1991, 1992, 2005].

FONDEMENT THÉORIQUE DE LA MÉTHODE DE CALCUL

Dans le modèle de la courbe de réponse quantale, conformément à la théorie de la particule unique, on admet que les probabilités de positifs (p_i) et de négatifs (q_i) à la dilution de niveau c_i sont donnés par les équations :

$$p_i = 1 - e^{-c_i \cdot m} \qquad q_i = e^{-c_i \cdot m}$$

où m est la concentration initiale inconnue (distribution type Poisson pour de petits nombres) [Dagnelie, 1973]. La probabilité P de la fréquence de positifs f_i est donc donnée par :

$$P(f_i) = C_{n_i}^{f_i} \cdot p_i^{f_i} \cdot q_i^{(n_i - f_i)}$$

où n_i est le nombre total de sujets (dans notre cas, microcupules) utilisés au niveau de dilution c_i . En utilisant $s_i = n_i - f_i$, cette dernière probabilité devient, pour N niveaux de dilution :

$$P(f_1 \& f_2 \& \dots f_N) = \prod_{i=1}^N C_{n_i}^{f_i} \cdot p_i^{f_i} \cdot q_i^{S_i}$$

(si l'on admet l'indépendance stochastique des f_i).

La probabilité conditionnelle de m est alors donnée par :

$$P(m | f_1 \& f_2 \& \dots f_N) = \frac{\prod_{i=1}^N C_{n_i}^{f_i} \cdot p_i^{f_i} \cdot q_i^{S_i}}{\int_0^{\infty} \prod_{i=1}^N C_{n_i}^{f_i} \cdot p_i^{f_i} \cdot q_i^{S_i} dm}$$

$$\propto \prod_{i=1}^N (1 - e^{-c_i \cdot m})^{f_i} \cdot (e^{-c_i \cdot m})^{S_i}$$

En nous conformant à la méthode du maximum de vraisemblance [Mather, 1965], nous maximalisons cette fonction en termes de m , ou de manière équivalente, son logarithme naturel :

$$\frac{\partial}{\partial m} \ln \left(\prod_{i=1}^N (1 - e^{-c_i \cdot m})^{f_i} \cdot (e^{-c_i \cdot m})^{S_i} \right) = 0$$

On obtient alors l'équation :

$$F(m) = \sum_{i=1}^N c_i \cdot n_i - \sum_{i=1}^N \frac{c_i \cdot f_i}{1 - e^{-c_i \cdot m}} = 0 \quad (1)$$

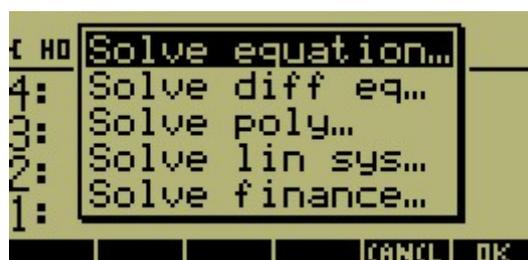
Différents auteurs ont proposé une solution approchée de l'équation (1) par le recours à des tables convenant aux méthodes de régression pondérées [Fisher et al., 1957 ; Wyshak et al., 1972]. Nous avons préféré approcher la solution exacte – c'est-à-dire la valeur la plus probable de m – en utilisant la méthode de Newton-Raphson [Stiefel, 1967]. Cette procédure itérative très répandue (connue également sous l'appellation de « méthode de la tangente ») utilise une convergence quadratique pour approcher une racine de l'équation $F(x) = 0$ en recourant à l'algorithme récursif suivant :

$$x_{j+1} = x_j - \frac{F(x_j)}{F'(x_j)}$$

Pour la solution de l'équation (1), $F'(m)$ devient :

$$F'(m) = \sum_{i=1}^N \frac{c_i^2 \cdot f_i \cdot e^{-c_i \cdot m}}{(1 - e^{-c_i \cdot m})^2}$$

Comme critère de convergence, les estimations successives de m sont comparées pour un nombre donné de digits significatifs. Les calculatrices de la série HP48 offrent un logiciel spécifique sous le menu SOLVE pour résoudre des équations comme (1) en tant que tel à l'aide d'un algorithme avancé :



Pour démarrer le processus itératif, nous ne donnons la préférence à aucune des fréquences f_i observée comme d'autres l'ont fait :

$$m_0 = -\frac{\ln(1 - f_i/n_i)}{c_i}$$

où f_i/n_i est la proportion la plus proche de 0,8.

De telles valeurs de départ sont souvent trop distantes de la racine de l'équation (1) pour assurer que la convergence reste stable lorsqu'on utilise la méthode de Newton-Raphson. Pour obtenir une première valeur approchée de m aussi proche que possible de la racine, on applique une régression linéaire pondérée par moindres carrés en utilisant les poids W_i de sorte que la valeur de départ est vraiment très proche de la solution de l'équation (1).

Il est connu que les relations dose-réponse virales sont linéaires dans le système d'unités $[\ln(c_i) \quad \ln(-\ln(s_i/n_i))]$, de sorte que dans ce cas, cette méthode a prouvé être tout à fait propre à fournir des valeurs de m fiables [Husson van Vliet, 1986]. C'est en fait une méthode accélérée pour obtenir une valeur de m la

plus exacte possible, surtout si les distributions des résultats des titrages sont suffisamment homogènes.

Si on utilise une calculatrice d'une série offrant un set de programmes statistiques (comme celles des séries HP 48 par exemple), les résultats sont particulièrement simples à introduire. En premier il faut exprimer les données d'entrée dans le bon système d'unités :

$$[x_i = \ln(c_i) \quad y_i = \ln(-\ln(s_i/n_i))] .$$

Notons que les proportions zéro et un fournissent des résultats en dehors du domaine d'application. Ce genre de données doit être écarté lorsque l'on détermine m_0 par cette méthode.

La valeur de m_0 fournie par les moindres carrés est donc déterminée au départ des moyennes pondérées des valeurs y_i et des x_i :

$$\ln(m_0) = \frac{\sum_{i=1}^N W_i \cdot y_i - \sum_{i=1}^N W_i \cdot x_i}{\sum_{i=1}^N W_i}$$

, où les poids calculés W_i pour chaque niveau de dilution sont donnés par [Lellouch et al., 1968] :

$$W_i = \frac{q_i}{p_i} \cdot \ln(q_i)^2 \cdot n_i \approx \frac{s_i}{f_i} \cdot \ln\left(\frac{s_i}{n_i}\right)^2 \cdot n_i$$

Cependant, les relations dose-réponse obtenues expérimentalement peuvent présenter exceptionnellement des anomalies telles que des répétitions ou même des inversions dans les proportions f_i/n_i (en cas d'intervalle de dilution trop faible par exemple). Dans de tels cas, même la valeur m_0 des moindres carrés pondérés peut être fort éloignée de la racine de l'équation (1). Du fait de la forme de la fonction $F(m)$, $F'(m)$ diminue très rapidement au profit des valeurs de m plus grandes que la racine de $F(m)$. C'est pourquoi, lorsque m_0 est trop grand, la procédure itérative de Newton-Raphson peut conduire à une valeur de travail négative m_{j+1} (Fig.1)

Une solution adéquate et fort simple de ce problème consiste à remplacer m_{j+1} par $m_j/2$ (soit la moitié de la valeur de travail précédente) chaque fois qu'elle est négative. Une autre façon de stabiliser la procédure est de déterminer la racine de $F(m)$ en tant que fonction de $\ln(m)$ (aucune valeur négative de m possible), bien que la convergence soit ralentie par cette technique, de sorte que nous préférons nettement la première façon de procéder (notons que dans la plupart des cas, ce problème ne se présente toutefois pas !). La méthode décrite permet de déterminer une bonne approximation de la valeur la plus probable de m , et ce malgré l'hétérogénéité des données. Néanmoins, le nombre d'itérations devrait être limité à une valeur maximum (nous avons choisi 30 pour la version HP41C), afin de prévenir des itérations irrégulières et imprévisibles dans les cas expérimentaux les plus défavorables. Le logiciel codé dans la HP48 décèle et intercepte ces cas pathologiques.

Dans l'équation (1), $F(m)$ est exprimé comme la différence de deux sommes, dont l'une n'est pas une fonction de m (c'est-à-dire la somme de gauche). La procédure de Newton-Raphson requiert l'évaluation de $F(m)$ pour différentes valeurs de m . Afin d'accélérer la vitesse d'exécution de la procédure de calcul (ce qui est un facteur limitatif important lorsque l'on implémente des processus itératifs sur de telles calculatrices), il est possible de calculer le terme constant avant de mettre en application le processus d'itération et de le mémoriser pour ensuite l'utiliser lors de chaque estimation de $F(m)$: celle-ci consiste alors en la soustraction au terme constant de la somme de droite dans l'équation (1). Toutefois, ceci accroît l'effet de perte de chiffres significatifs, surtout quand chacun des termes $c_i \cdot n_i$ dans la somme de gauche est presque contrebalancé par le terme correspondant dans la somme de droite. Nous préférons donc calculer $F(m)$ de la manière suivante :

$$F(m) = \sum_{i=1}^N c_i \cdot n_i - \frac{c_i \cdot f_i}{1 - e^{-c_i \cdot m}} = 0$$

Suivant la méthode du maximum de vraisemblance décrite plus haut, les limites de confiance de l'estimation de m pourrait être obtenues par la résolution de :

$$P(\hat{m} - \Delta m < m < \hat{m} + \Delta m \mid f_1 \& f_2 \& \dots \& f_N) = \frac{\int_{\hat{m}-\Delta m}^{\hat{m}+\Delta m} \prod_{i=1}^N (1 - e^{-c_i \cdot m})^{f_i} \cdot (e^{-c_i \cdot m})^{s_i} dm}{\int_0^{\infty} \prod_{i=1}^N (1 - e^{-c_i \cdot m})^{f_i} \cdot (e^{-c_i \cdot m})^{s_i} dm} \quad (2)$$

, qui nous donne la probabilité conditionnelle en termes de Δm .

L'utilisation de la solution exacte pour déterminer les limites de confiance de m n'est pas envisageable sur la calculatrice de poche HP41C du fait que cela requiert des temps de calcul trop longs. Dans la version HP41C, nous avons donc préféré utiliser une formule approchée et déterminer la variance de $\ln(m)$ en utilisant [Wyshak et al., 1972]:

$$\sigma_{\hat{m}}^2 = \frac{1}{\sum_{i=1}^N W_i}$$

Dans la version HP48, l'équation (2) est effectivement résolue en utilisant à nouveau le logiciel sous le menu SOLVE, en partant de la valeur $\Delta m_0 = 1,96 \cdot \sigma_{\hat{m}}$.

Le programme fournit en information finale la valeur du χ^2 pour vérifier la bonne qualité de l'ajustement, avec les degrés de liberté correspondants. Ces valeurs sont calculées à l'aide de la formule classique comparant les données observées et celles calculées :

$$\chi^2 = \sum_{i=1}^N \frac{(n_i \cdot \hat{q}_i - s_i)^2}{n_i \cdot \hat{q}_i} + \sum_{i=1}^N \frac{(n_i \cdot \hat{p}_i - f_i)^2}{n_i \cdot \hat{p}_i}$$

avec $N - 2$ degrés de liberté. La version HP48 calcule aussi le niveau de signification correspondant.

DISCUSSION

On a proposé de nombreuses méthodes permettant d'estimer le pouvoir infectieux d'une suspension de particules virales, au

départ d'un titrage par effet cytopathique. Certaines d'entre elles sont graphiques, d'autres font appel à une interpolation assez élémentaire, et d'autres encore requièrent des transformations mathématiques qui nécessitent les traitements les plus sophistiqués.

Toutes ces méthodes ont été discutées en profondeur tant en termes de bien-fondé théorique, de leurs conditions d'application, leur efficacité, leur sûreté, leur précision, etc [Halvorson et al., 1933 ; Cochran, 1950 ; Irwin, 1950 ; Armitage et al., 1950 ; Finney, 1957 ; Stellman et al., 1965], et la conclusion essentielle d'importance pratique est que les variations entre les estimations obtenues par ces différentes méthodes sont généralement faibles [Bross, 1950 ; Berkson, 1950]. Cette conclusion a évidemment encouragé de nombreux virologues à utiliser en routine les procédures de calcul les plus élémentaires, et à ignorer les autres possibilités plus élaborées. Cette tendance est particulièrement dangereuse et offre largement le flanc à la critique.

Tout d'abord, référons-nous à Jerne [1949] qui a rappelé les hypothèses essentielles à la mise en application de n'importe quelle procédure de calcul. Une fois l'assurance acquise que ces conditions sont bien remplies, l'approche scientifique est évidemment l'utilisation de méthodes compatibles avec la loi de Poisson qui régit la distribution des particules virales dans les suspensions et est donc la seule qui convienne aux titrages viraux.

Même en considérant que des procédés de calcul simples débouchent sur des estimations approximativement équivalentes, leur possibilité de mise en application est sévèrement réduite si l'on souhaite éviter tout risque d'obtention de résultats biaisés. On a montré que la condition sine qua non d'utilisation de ces procédures élémentaires est que les conditions d'application strictes nécessaires à leur fiabilité soient rigoureusement remplies. Une des méthodes les plus fréquemment utilisées est le recours à l'estimateur dit de Spearman-Kärber [Kärber, 1931 ; Johnson et al, 1961]. Afin de pouvoir l'appliquer, les dilutions

doivent cependant être également espacées sur une échelle logarithmique, avec un nombre égal de sujets par niveau de dilution, et la gamme de dilutions utilisée doit contenir les proportions de réponses extrêmes de 0 et 100%. Or, du fait de facteurs expérimentaux défavorables variés, il arrive fréquemment que l'une (voire plus) de ces conditions n'est pas satisfaite ce qui rend l'utilisation de l'estimateur très dangereuse. Plus grave encore, il n'est pas impossible que se présente une variabilité très importante dans les proportions observées ce qui conduit inévitablement également à des biais regrettables dans les estimations de titre et d'erreur [*Husson van Vliet, 1986*].

En effet, l'application de la formule de Spearman-Kärber a pour base la somme globale des sujets positifs relevés dans le domaine de dilution adéquat et ne prend nullement en compte les variations possibles dans leur distribution de par les différentes dilutions. Ceci peut être illustré par l'exemple suivant. Dans un essai qui utilise des étapes de dilution log-décimales de -3 à -6, chacune comptant 10 cupules (ou sujets) inoculées, nous obtenons une somme de 26 cupules positives qui peuvent se distribuer différemment sur les quatre niveaux de dilution tout en fournissant systématiquement la même estimation de titre $10^{5,10}$, alors que les estimations du maximum de vraisemblance peuvent quant à elles varier de $10^{4,63}$ à $10^{5,15}$ du fait des différentes possibilités de distribution de ces réponses positives le long du domaine de dilution envisagé. C'est pour cela qu'il est vivement recommandé d'utiliser les procédures de calcul les plus fiables qui restent valides quelles que soient les variations dans les résultats expérimentaux.

La méthode que nous proposons ici est parfaitement compatible avec la loi de distribution poissonnienne. Elle utilise une procédure d'approximation exacte, rapide, sans recours à aucune table. Les conditions de son application ont été choisies suffisamment larges pour englober le nombre maximum possible de conditions expérimentales : l'intervalle de dilution peut varier en amplitude, les différentes dilutions peuvent être exprimées sous forme entière ou sous forme logarithmique, et

même le nombre de sujets peut présenter des variations suivant les dilutions.

Depuis la première valeur approchée jusqu'à la solution finale, il est également possible de présenter en affichage au cours des itérations les valeurs successivement estimées de m .

Cette dernière option, qui s'ajoute aux limites de confiance de l'estimation de la concentration et à la valeur du χ^2 mesurant la qualité de l'ajustement, rend la méthode présente largement plus avantageuse que les programmes présentés précédemment [Koch, 1982 ; Mac Donell, 1983 ; Russel et al, 1983] en offrant ainsi au scientifique l'opportunité de se rendre compte par lui-même de la confiance qu'il peut accorder à ses résultats expérimentaux. Même le plus modeste des laboratoires de virologie peut de nos jours acquérir une machine programmable adéquate, ou mieux encore, installer sur son PC via l'Internet l'émulateur qui lui permet d'accéder sans problème à la calculatrice virtuelle et à toutes ses applications. Il disposera ainsi d'un outil de travail indispensable et remarquablement performant. En effet, la prolifération des ordinateurs type PC, portables ou non, équipés des logiciels statistiques les plus courants très simplement utilisables même par des novices en cette matière, et d'autre part l'accès à présent généralisé au réseau Internet nous a incité à grouper nos logiciels concernant la virologie et à les rendre accessibles librement sur le réseau Internet, après installation et lancement d'un « émulateur » HP48G (installation virtuelle de la calculatrice du modèle actuel avec son tableau de bord : http://press.ehsal.be/pcx/EMU48_page.htm). Ceci permet d'exécuter toutes les procédures de calcul que nous avons développées précédemment sur la calculatrice, mais à l'écran du PC, et 20 fois plus vite que sur la machine réelle [Husson van Vliet and Roussel, 1985, 1988 ; Roussel and Husson van Vliet, 1988, 1991, 1992]. Des renseignements complémentaires y relatifs peuvent être obtenus auprès des auteurs. Pour l'application présente, le listing complet du programme de calcul peut être obtenu auprès des auteurs, dont l'un d'eux

(Ph.J.Roussel) a développé par ailleurs un projet dans le domaine des composants électroniques et dispose également d'un programme en RMB-UX réalisé pour ordinateur dans le contexte d'analyse de test de fiabilité et de données de rodage. Les techniques utilisées pour la maximalisation des fonctions de maximum de vraisemblance sont toutefois quelque peu plus compliquées dans ce cas, mais les statistiques utilisées à la base suivent la même ligne de réflexion que celles discutées présentement.

Les présentes considérations ne sont nullement à caractère publicitaire dès lors qu'il ne s'agit pas dans le cas présent de logiciels commercialisés.

APPENDICE : EXEMPLE

Dilution (d)	Log(d)	n _i	f _i	s _i
10 ⁻⁵	-5	160	160	0
10 ⁻⁶	-6	160	158	2
10 ⁻⁷	-7	160	61	99
10 ⁻⁸	-8	160	8	152
10 ⁻⁹	-9	160	0	160

```

5.3
1 160 160 .00...
2 160 158 .00...
3 160 61 .00...
4 160 8 .00...
5 160 0 .00...
1-3: .00001
+ROW -ROW +COL -COL +STK ↑STK

```

ΣDAT input data matrix

```

[ HOME VIROLOGY MLE1 ]
1: [[ 160 160 .00001 ]
    [ 160 158 .000001...
    [ 160 61 .0000001...
STOΣ MLE
READ SKX %SKX %>ED %>SK MLE

```

Calling the MLE program

```
Log( $\lambda$ ): 6.66605785488
 $\sigma$ Log( $\lambda$ ): .043104949119
Chi^2: 1.02840248306 ...
Signif. tail: .794379...
95% confidence bounds:
6.5815 - 6.7500
READ SKX %SKX  $\lambda$ ED  $\lambda$ SK MLE
```

Screen output

FIGURE 1

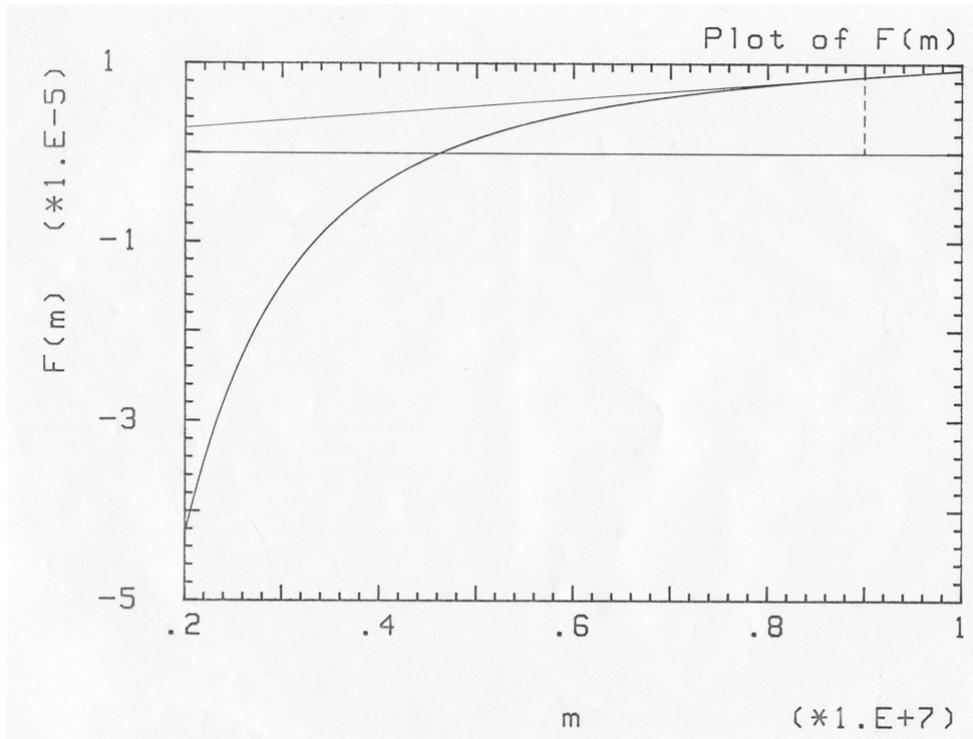


Figure 1. Graphique de $F(m)$ illustrant la divergence de la méthode de Newton-Raphson quand m_0 est trop large.

RÉFÉRENCES

A.R.Co.P news (2004) Lettre d'information de l'Association Royale des Conseillers en Prévention, Le formaldéhyde : cancérogène pour l'homme, N°114, p.6.

Armitage, P. and Allen, I. (1950) Methods of estimating the LD50 in quantal response data, J. Hyg. 48, 298-322.

Berkson, J. (1950) Some observations with respect to the error of bio-assay, Biometrics, 6, 432-434.

Bross, I. (1950) Estimates of the LD50: a critique, Biometrics, 6, 413-423.

Chase, G.R. and Hoel, D.G. (1975) Serial dilutions : error effects and optimal designs, Biometrika 62, 329-334.

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

Dagnelie, P. (1973) Théorie et Méthodes Statistiques, pp.194-200, Presse Agronomiques de Gembloux, Belgium.

Elias, R. (1984) Travail sous binoculaires. Astreintes visuelles et posturales, Cahiers de notes documentaires, n°117- 4ième trimestre, 451-456.

Finney, D.J. (1957) Statistical method in biological assay, p. 524. Griffin, London.

Fisher, R.A. and Yates, F., (1957) Statistical Tables for Biological Agricultural and Medical Research, pp. 74-75, Oliver and Boyd, London.

Halvorson, H.O. and Ziegler, N.R. (1933) Application of statistics to problems in bacteriology. I. A means of determining bacterial population by the dilution method. *Journal of Bacteriology*, XXV (2), 101-121.

Husson van Vliet, J. and Roussel, P. (1985) Estimating viral concentrations : a reliable computation method programmed on a pocket calculator, *Computers Methods and Programs in Biomedicine*, 21, 167-172.

Husson van Vliet, J. (1986) Titration of poliovaccines : improvement of end-point microassays by means of dose-response curves. *Journal of Virological Methods*, 13, 9-20.

Husson van Vliet, J. and Roussel P. (1988) Pipetting errors in viral titrations : a useful approach, *Journal of Virological Methods*, 22, 183-190.

Husson van Vliet, J. (1991) Microwave radiation : a useful fixation method in viral vaccine quantitation, *Journal of Virological Methods*, 32, 139-148.

Husson van Vliet, J. (2005) Le formaldéhyde, cancérogène pour l'homme ! Alternative avantageuse à la fixation par formaline : utilisation des micro-ondes, *Revue de l'association belge des technologues de laboratoire ABTL/BVLT*, Vol 32, 3, 179-191.

Husson van Vliet, J. and Roussel, P. (2005) Comment évaluer de manière pratique et fiable les erreurs de pipettage dans les titrages viraux ? *Revue de l'association belge des technologues de laboratoire ABTL/BVLT*, Vol 32, 4, 259-268.

INERIS (2004) Seuils de toxicité aigüe, Formaldéhyde (CH₂O), rapport final, *INERIS-DRC-03-47021-ETSC-BDo-n°03DR011*, 38 p.

Irwin, J.O. (1950) Biological assays with special reference to biological standards, J. Hyg. 48, 215-238.

Jerne, N.K. and Wood, E.C. (1949) The validity and meaning of the results of biological assays, Biometrics, 5, 273-299.

Johnson, E.A. and Brown Jr. B.W. (1961) The Spearman estimator for serial dilution assays, Biometrics, 17, 79-88.

Kärber, G. (1931) Beitrag zur kollektiven Behandlung pharmakologischer Reihenversuche, Arch. Exp. Pathol. Pharmacol. 162, 480-483.

Koch, A.L. (1982) Estimation of the most probable number with a programmable pocket calculator, Applied and Environmental Microbiology, 488-490.

Lauffer, M.A. and Price, W.C. (1945) Infection by viruses, Arch. Biochem. 8 449- 468.

Lee, K.S., Waikar, A.M., Wu, L. (1988) Physical stress evaluation of microscope work using objective and subjective methods, International Journal of industrial ergonomics, 2, N°3, 203-209.

Lellouch, J. and Lazar, P. (1968) Cours pour le certificat d'études statistiques appliquées à la médecine (option D), Faculté des Sciences, Paris.

Lorentz, R.J. (1961) Über den Einfluss des Pipettierfehler auf die Genauigkeit bei der Konzentrationsmessung von Viruslösungen, Arch. Ges. Virusforsch. 10, 551-559.

Lorentz, R.J. (1962) Über die experimentellen Fehler bei der Volumenabmessung mit Pipetten, Arch. Ges. Virusforsch. 10, 406-416.

MacDonell, M.T. (1983) Rapid estimation of most probable number with a hand-held calculator, *Canadian Journal of Microbiology*, 29, 621-623.

Mai, K. and Bonitz, K. (1963) Statistical variation found at pock and plaque counting of vaccinia virus, *Nature* 197 166-168.

Mather, K. (1965) *Analyse statistique en biologie*, pp. 252-260 Gauthier-Villars, Paris.

Meynell, G.G. (1957) Inherently low precision of infectivity titrations using a quantal response, *Biometrics* 13 149-163.

Réglementation du bien-être au travail (2004) : la loi et le code sur le bien-être au travail et extraits du règlement général pour la protection du travail, Publication du Service public fédéral Emploi, Travail et Concertation sociale, 496 p.

Roussel, P. and Husson van Vliet, J. (1988) Estimating viral concentrations from dilution counts : weighted least squares estimate of density, taking into account both Poissonian variation on the mean counts and s-normal errors on the dilutions, *Biométrie-Praximétrie*, 28, 9-14.

Roussel, P. and Husson van Vliet, (1991) Estimating viral concentrations from dilution counts, *Journal of Virological Methods*, 34, 113-140.

Roussel, P. and Husson van Vliet, (1992) Estimating viral concentrations from dilution counts: an improved HP48SX version of the 'MLE2' program, *Journal of Virological Methods*, 37, 155-162.

Russel, E. and Colwell, R.R. (1983) Computation of most probable numbers, *Applied and Environmental Microbiology*, 45(5), 1646-1650.

Sillanpaa, J., Nyberg, M., Laippala, P. (2003) A new table for work with a microscope, a solution to ergonomic problems, *Applied ergonomics*, 34, 621-628.

Stellmann, C. and Terre, J. (1965) Choix d'une méthode de calculs statistiques en vue des contrôles d'activités des produits biologiques sur animaux, *Bull. Soc. Sci. Vét. Méd. Comparée*, 67, 273-423.

Stiefel, E. (1967) *Introduction à la mathématique numérique*, Dunod, Paris, 1967.

Wyshak, G. and Detre, K. (1972), Estimating the Number of Organisms in Quantal Assays. *Applied Microbiology*, p.784-790 (in Appendix).