LES MÉTHODES AUXANOGRAPHIQUES ET LEUR APPLICATION AU DOSAGE DES ANTIBIOTIQUES

Par J. DUFRÉNOY

Ainsi que le montre la bibliographie des travaux publiés en 1947, le groupe de recherches du Collège de Pharmacie du Medical Center de l'Université de Californie, à San Francisco, a pu, grâce aux subventions des Cutter Laboratories de Berkeley, Californie, proposer de notables modifications de la détermination auxanographique de la concentration d'une solution en pénicilline ou en autres antibiotiques, et proposer une interprétation cytochimique des phénomènes mis en œuvre.

Ayant brièvement retracé l'histoire des méthodes auxanographiques, et renvoyant à la Bibliographie chronologique, qui terminera cette revue, pour la liste des publications se référant à l'auxanographie, nous étudierons les applications de cette méthode à la détermination du dosage, c'est-à-dire de la concentration de la pénicilline dans une solution par la méthode dite « *cup-plate assay* ». Nous définirons, dans une première partie, les conditions techniques qui permettent d'obtenir régulièrement la même réaction auxanographique au même dosage ; nous discuterons statistiquement l'influence de la profondeur des plaques de gélose sur la variabilité des diamètres des zones résultant de la diffusion de la pénicilline à partir de cylindres contenant la même concentration, exprimée en unités par cm^3 , ou *dosage*. Dans une seconde partie, nous étudierons la relation entre *dosage* et *réaction* mesurée (diamètre des zones).

I. Les méthodes auxanographiques. — La méthode d'hydrodiffusion dans des gels de gélatine ou d'agar (gélose) inaugurée par Beijerinck (1889), et utilisée par Crabill et Reed (1915), reprise par J. Lodder (1934) pour l'étude biochimique des levures, a été mise au point par Langeron et ses élèves (1938).

Cette méthode d'« auxanographie » permet d'étudier l'effet d'un

gradient de concentration d'une substance sur la croissance d'une population d'organismes sensibles, ensemencés dans la masse du gel, siège de la diffusion, ou à la surface de ce gel.

Cette méthode a joué un rôle fondamental au cours de ces sept dernières années dans l'étude du pouvoir antibiotique de la pénicilline, de la streptomycine et de divers autres produits du métabolisme de moisissures, de bactéries ou de plantes vertes... Nous nous proposons de montrer, dans cette revue critique, que les « réactions » obtenues sur gels ensemencés d'organismes sensibles, par diffusion de substances antibiotiques, s'expliquent du fait que ces substances, qui inhibent le métabolisme lorsque la concentration dépasse un certain seuil, exagèrent au contraire le métabolisme et agissent comme « facteurs de croissance » aux concentrations subliminaires (1).

II. Méthodes auxanographiques et définition de l'unité de pénicilline. — « Les premiers échantillons commerciaux de pénicilline contenaient surtout des impuretés dont la composition dépendait du milieu de fermentation et du mode d'extraction ; la pénicilline ne pouvait donc être déterminée chimiquement, et force était de recourir aux méthodes microbiologiques... Tout progrès dépendait de la mise au point d'une technique rapide et suffisamment précise, telle que celle qu'Heatley proposa en 1941, et qui, sous le nom de « cup plate », « cup cylinder » ou « cylinder plate assay », demeure la méthode la plus employée » (*Penicillin, Its properties, uses and preparations*, Published by direction of the Council of the Pharmaceutical Society of Great Britain, London, 1946, p. 40). Les détails de cette adaptation de la méthode auxanographique ont été publiés dans le *Quarterly Bull. Health Org. L. o. N.* (1945-6, 12, 250) ainsi que dans la monographie précitée (p. 42-48) ; la méthode officielle de la « U.S. Food and Drug Administration » a été publiée dans le *Federal Register*, 1945, 11478 (sept. 8).

Abraham et Chain ayant publié (1941) « que la solution standard de pénicilline donne, par la méthode de « cup plate », une moyenne d'« assay » de 24 mm., beaucoup de personnes interprétèrent ce résultat comme étant une définition de l'« Oxford Unit », interprétation que Garrod et Heatley déclarèrent erronée (1944) ; « en 1941 on n'avait pas encore compris que le diamètre de la zone d'inhibition dépend d'un certain nombre de variables... et qu'il est indispensable de se référer chaque fois à une solution étalon » (*loc. cit.*, p. 36).

(1) A ce sujet, voir, entre autres, Ph. J. LUTERAAN, *Ann. de parasitologie*, XXI, 1946, 356-375. — N.D.L.R.

III. Relation entre nombre d'unités de pénicilline par cm^3 (u./cc.) et diamètre (d) de zone d'inhibition. — Supposons que sur la gélose d'une boîte de Petri nous disposions quatre cylindres ; chacun de ces quatre cylindres pourra recevoir la même dilution de la solution étalon correspondant à 1 u./cc. ; ou bien chacun des quatre cylindres pourra recevoir une dilution différente, préparée à partir de la même solution étalon, par exemple correspondant à 1/4, 1/2, 1, 2 u./cc. ; enfin les cylindres n° 1 et n° 3 pourraient recevoir, le premier, la solution contenant 1/2 u./cc., l'autre la solution contenant 1 u./cc., préparées à partir de la solution étalon, tandis que les cylindres n° 2 et 4 recevraient des solutions au dixième et au centième d'une certaine solution à l'étude et dont la teneur en pénicilline est à déterminer. Enfin le cylindre n° 1 seul pourrait recevoir la solution préparée à partir du « standard » (solution de référence), les trois autres cylindres recevant des dilutions au dixième, au centième, au millième, de la solution à l'étude.

Dans cette dernière alternative, où chaque plaque ne reçoit qu'un échantillon de la solution de référence, contenant par exemple 1 u./cc., il importe de savoir quel degré de confiance on peut accorder au diamètre de la zone d'inhibition mesuré autour de ce cylindre de référence ; en d'autres termes, soit $d = 20 \text{ mm. } 5$, diamètre mesuré autour de ce cylindre ; si nous avons rempli les quatre cylindres chacun de la même solution de référence, à 1 u./cc., quelles seraient les quatre valeurs d' , d'' , d''' , d'''' , du diamètre des zones d'inhibition ?

Si, au contraire, le seul cylindre contenant une dilution de la solution « standard » étant entouré d'une zone d'inhibition de 20 mm. 5, l'un des cylindres contenant une dilution (par exemple au dixième) de la solution à l'étude, est, lui aussi, entouré d'une zone de 20 mm. 5, quelle est la probabilité que cette dilution au dixième correspond à 1 u./cc. et, par conséquent, que la solution à l'étude contienne 10 u./cc. ?

En d'autres termes, si nous répétons 100 fois l'auxanographie, dans des conditions aussi identiques que possible, telles qu'elles sont prescrites par exemple pour le « standard cup plate assay », quelle sera la valeur moyenne (d) des 100 diamètres mesurés autour du cylindre contenant la solution de référence à 1 u./cc. et quelle sera la valeur moyenne du nombre d'u./cc. déterminé pour la dilution au dixième de la solution à l'étude ?

Enfin, quelle sera la dispersion des 100 diamètres individuellement mesurés et quelle sera la « déviation standard » pour la solution de référence et pour la solution à l'étude ?

Pour autant que la pénicilline diffuse librement dans l'épaisseur de la gélose, à partir de la base de la colonne liquide que forme la solution dans le cylindre (reposant sur la plaque en formant joint étanche mais sans y pénétrer de manière à gêner la diffusion latérale), il tend à s'établir un gradient de concentrations dans l'hémisphère d'agar, ayant pour centre le centre de la circonférence d'insertion du cylindre sur la plaque.

Si le rayon ($d/2$) de cet hémisphère est inférieur à l'épaisseur de la plaque, la diffusion peut être considérée comme s'effectuant librement ; si, au contraire, ce rayon excède la profondeur de la gélose, la diffusion, contrariée en profondeur, tendra à faire apparaître une zone d'inhibition dont le diamètre excédera celui qui apparaîtrait sur une plaque plus profonde ; l'excès dépendra des variations fortuites de l'épaisseur de la gélose, dans une boîte dont le fond n'est pas rigoureusement plat ou n'est pas maintenu rigoureusement horizontal, au cours de la solidification de la gélose.

Sur les plaques de 1 mm. 7 employées par Foster et Woodruff (1944), de 3 mm. 2 préconisées par Schmidt et Moyer (1944), de 3 à 5 mm. employées par Heatley (1944), la variation fortuite d'épaisseur de la gélose, d'une région à l'autre d'une même boîte, et surtout d'une boîte à l'autre, constitue la principale cause de variation du diamètre (d) mesuré autour de cylindres contenant le même nombre d'unités par cm^3 (u./cc.).

Hayes (1945) a obtenu, pour 50 déterminations effectuées sur gélose mince (2 mm.) et épaisse (8 mm.), les diamètres moyens suivants (d) affectés des déviations standard (s).

u/cc	2 mm		8 mm	
	d	s	d	s
2.....	21,0 $\pm$ 0,56		15,6 $\pm$ 0,35	
1.....	17,9 $\pm$ 0,66		11,6 $\pm$ 0,39	
0,5.....	12,8 $\pm$ 0,59		10,4 $\pm$ 0,35	

Non seulement la variabilité diminue quand augmente l'épaisseur des plaques, mais la forme de la fonction mathématique qui lie le diamètre d au nombre d'unités (u./cc.) se modifie.

IV. Influence de la profondeur de la gélose sur la variabilité du diamètre des zones d'inhibition, autour de cylindres contenant la même solution de pénicilline. — Pour la préparation des boîtes destinées aux « standard cup-plate assays », on coule dans chaque boîte (de 90 mm. de diamètre) 32 cm³ de gélose nutritive, qu'on laisse se solidifier, puis dont on couvre la surface de 3 cm³ de suspension de *Staphylococcus aureus* (N.R.R.L. 313) dans de la gélose.

En utilisant seulement 16 ou 22 cm³ (au lieu de 32), ou en utilisant 46 cm³ de gélose nutritive, nous obtenons, après ensemencement avec les 3 cm³ de suspension bactérienne, des plaques de 2 mm. 8, 4 mm., 5 mm. 5 ou 7 mm. 5 d'épaisseur qui nous permettent d'étudier :

a. l'influence de l'épaisseur sur la variabilité des diamètres (d) et sur la valeur moyenne $\bar{d}$ des diamètres des zones d'inhibition obtenues par diffusion de pénicilline à partir de cylindres contenant un même nombre d'unités par cm³ ;

b. l'influence de l'épaisseur sur la ligne de régression des diamètres (d) sur le nombre des unités (u./cc.).

Pour chaque épaisseur de gélose (2,8, 4, 5,5, 7 mm. 5) et pour chaque concentration (0,375, 075, 1,5, 3 u./cc.), nous mesurons douze diamètres d'inhibition, $d_1, d_2, \dots, d_{12}$, que nous rangeons par ordre de grandeur croissante ; si ces douze chiffres représentent douze valeurs individuelles d'une « distribution normale », ils doivent se distribuer autour de leur valeur moyenne $\bar{d}$ de façon à ce que 6 de ces valeurs excèdent $\bar{d}$ et que les 6 autres soient inférieures à $\bar{d}$ et aussi de manière à ce que 16 % de ces 12 valeurs (c'est-à-dire au plus 2 d'entre elles) n'atteignent pas la valeur $\bar{d} - \sigma$, tandis que 84 % d'entre elles atteignent au plus la valeur $\bar{d} + \sigma$ où sigma (figuré par la lettre grecque σ) représente la « déviation standard » prise pour mesure de la variabilité.

Lorsque le nombre des mesures est relativement petit (inférieur à 25), il est particulièrement avantageux d'employer une méthode graphique pour déterminer la valeur moyenne $\bar{d}$ et sa « déviation standard » σ ; à cet effet, une « règle à calcul multiple » a été imaginée et construite au Collège de Pharmacie du « U.C. Medical Center ».

Pour la détermination graphique, on porte les douze diamètres, ordonnés par ordre de grandeur croissante, chacun à son rang sur l'échelle des diamètres (d), et chacun à son rang de fréquence (premier, deuxième..... douzième) sur l'échelle de probabilité normale (voir graphiques 1-4).

Graphiques 1, 2, 3, 4. — Les diamètres des zones d'inhibition sont indiqués au bas de chaque graphique sur échelle horizontale (abscisses).

A gauche de chaque graphique, l'échelle verticale « de probabilité normale » indique les valeurs de pourcentage : 5, 10, 20, 30, 40,

GRAPHIQUE 1

GRAPHIQUE 2

50, 60, 70, 80, 90 et 95 ; l'horizontale au niveau 50 % définit, pour chaque distribution, le niveau au-dessus duquel se situent 6 des douze diamètres mesurés ; les horizontales aux niveaux 16 et 84 % respectivement, définissent les niveaux au-dessous et au-dessus desquels doivent se trouver deux des douze valeurs.

En haut de chaque graphique figure l'indication du nombre d'unités par cm^3 de pénicilline pour chacune des distributions de 12 diamètres (soit 0,375, 0,75, 1, 1,5, 3 u./cc.). Pour chacune de ces

concentrations, les 12 x marquent la situation des 12 diamètres mesurés, à leur rang de grandeur sur l'échelle des diamètres et à leur rang de distribution sur l'échelle de probabilité normale. La droite inclinée passant au mieux parmi ces 12 x coupe les horizontales aux niveaux 50 %, 16 % et 84 % sur des verticales élevées de l'échelle

GRAPHIQUE 3

GRAPHIQUE 4

des diamètres aux valeurs correspondant respectivement à la moyenne d et à $d \pm \sigma$; la déviation standard (σ), affectant chaque mesure, est d'autant plus grande que la droite fait un angle plus grand avec la verticale ; pour la solution la plus diluée (0,375 u./cc.), la dispersion est d'autant moindre que la gélose est plus épaisse ; pour les solutions moins diluées (1 à 3 u./cc.), l'augmentation d'épaisseur a moins d'effet sur la variabilité.

V. Détermination de la concentration d'antibiotique dans une solution par auxanographie rapide : la méthode dite de « trois heures » du Collège de Pharmacie (U.C. Medical Center). — Les méthodes, officielles aux E.U., de « cup-plate assays », prescrivent de laisser les plaques auxanographiques à l'étuve pendant un temps assez long pour que se développe, autour des zones d'inhibition, un fond de colonies assez dense, sur lequel les zones se dessinent en clair.

Mais, bien avant que cet effet ne soit obtenu, la diffusion de la pénicilline (ou de tel autre antibiotique à l'essai) a provoqué, autour de chaque cylindre, des modifications des microorganismes employés comme tests, qui, pour n'être pas immédiatement évidentes, n'en sont pas moins capables d'être « révélées », soit par la technique de « développement physique », soit par l'emploi d'indicateurs d'oxydo-réduction.

Non seulement des méthodes d'auxanographie rapide permettent de raccourcir de 16 heures ou davantage à 3 heures ou même 2 heures la durée de la diffusion, c'est-à-dire le temps qui s'écoule entre le moment où la solution à essayer devient disponible et la détermination de sa concentration en antibiotique, mais elles permettent d'effectuer les mesures au moment où le microorganisme employé comme test possède sa sensibilité cytochimique maxima, où les colonies sont particulièrement riches en déshydrogénases, où la plupart des microorganismes sont normalement en période de croissance logarithmique, et où très peu d'entre eux sont déjà affectés de sénescence.

Chaque population microbienne manifeste un cycle de développement : à l'ensemencement sur gélose succède une période de latence, préparatoire à la période de croissance logarithmique, qui aboutit, après quelques heures, à la sénescence. La durée relative de chaque période dépend naturellement de la densité initiale, c'est-à-dire du nombre de microorganismes ensemencés par cm^3 .

Autour d'un cylindre contenant 1 u./cc. de pénicilline, toutes choses égales d'ailleurs, la zone d'inhibition sera d'autant plus grande et son contour d'autant plus nettement délimité par un anneau d'hyperactivité de croissance, que ce contour, correspondant au seuil de concentration bactériostatique, se sera établi au lieu et au moment où les colonies, manifestant une croissance plus active, étaient plus riches en déshydrogénases.

Bach a étudié les variations d'activité des diverses déshydrogénases de *Staph. aureus*, en fonction de l'âge des colonies.

En ce qui concerne la race de *Staph. aureus* N.R.R.L. 313, em-

ployée comme test pour les « cup-plate assays », les travaux récemment effectués à l'Université du Wisconsin ont mis en évidence les variations d'activité enzymatique au cours des dix premières heures du développement ; ces microorganismes sont particulièrement

FIG. 1 et 2. — Modifications cytochimiques révélées par développement physique, sur plaques exposées à la diffusion de la pénicilline, à partir d'une solution tamponnée à pH 7 et contenant 1 u./cc.

FIG. 1. — Plaqueensemencée de *Staph. aureus* ; *sp.*, colonie où les microorganismes ont laissé transsuder des substances réductrices, donnant lieu à la formation d'« un miroir argentique », figuré en noir ; *d*, formes diplocoques témoignant de l'incapacité du microorganisme à parachever une division cellulaire ébauchée ; les substances réductrices tendent à s'accumuler aux deux extrémités, ainsi qu'en témoigne la coloration bipolaire ; *lysis*, stade de gonflement où les microorganismes ont perdu tout pouvoir réducteur.

aptes à réagir de la 3^e à la 6^e heure, période qui est précisément celle mise en œuvre par la « méthode de trois heures ».

Développement physique des plaques auxanographiques. — 1. Préparer les plaques de gélose nutritive et les ensemercer comme pour les « standard cup-plate assays » ; maintenir à 38° pendant 3 heures pour *Staph. aureus* N.R.R.L. 313, ou pendant le temps néces-

saire au développement de microcolonies, riches en déshydrogénases, quel que soit l'organisme employé comme test. Alors, les plaques « sensibilisées » peuvent être utilisées pour l'auxanographie, immédiatement, ou après conservation à la glacière.

FIG. 2. — Plaqueensemencée de *B. subtilis* ; en haut, les formes filamenteuses du microorganisme se détachent sur un fond (*background*) de grains microscopiques d'argent ; c'est sur ce fond noir que se détache en clair chaque zone d'inhibition ; à la périphérie de la zone d'inhibition, les microorganismes, ayant perdu tout pouvoir de réduire les sels d'argent, manifestent les symptômes de lyse (*lysis*) ; plus près du cylindre d'où diffuse la pénicilline, le contour des microorganismes se dessine sur un fond de miroir argentique (*inner zone*), dû, en partie, à la précipitation de l'argent par les phosphates diffusant de la solution tampon contenant la pénicilline. Les divisions de l'échelle valent 10 μ .

2. La gélose ayant été amenée à température convenable (25-30°) reçoit les cylindres où sont réparties les dilutions connues de solution étalon et les dilutions de la solution à étudier. Les boîtes sont soumises à une incubation secondaire de 3 heures (pour *Staph. aureus*) ou de durée convenable pour tout autre organisme.

3. Les boîtes étant retirées du thermostast, enlever le couvercle et verser sur la gélose 30 cm³ de solution neutre à 0,1 % de AgNO³ et exposer (à 35 cm.) sous lampe fluorescente de 40 watts (3.600 lumens par m²) pendant 3 minutes.

4. Siphoner la solution de nitrate d'argent et la remplacer par 30 cm³ de révélateur physique, qu'on laisse agir de 7 à 10 minutes pour révéler l'image latente des zones d'inhibition, en clair sur fond noir.

RÉVÉLATEUR PHYSIQUE. — *Solution A.*

1. — Dissoudre 80 gr. de thiosulfate de sodium et 20 gr. de sulfite de sodium anhydre dans 300 cm³ d'eau distillée.

2. — Dissoudre 8 gr. de nitrate d'argent dans 200 cm³ d'eau distillée. Verser lentement (2) dans (1) en agitant. Ce mélange constitue la solution A.

Solution B. — Dissoudre 20 gr. de sulfite de sodium dans 500 cm³ d'eau distillée, puis ajouter 3 gr. 8 de chlorhydrate de 2-4 diamidophénol. Conserver (A) et (B) dans la glacière ; pour l'emploi, mélanger parties égales de (A) et de (B) et diluer 1 vol. du mélange dans 3 vol. d'eau distillée (Goyan et al., 1947).

VI. Développement des plaques auxanographiques au moyen d'indicateurs d'oxydo-réduction. — Pasteur avait reconnu le pouvoir réducteur des microorganismes en actif développement, et son élève, Raulin, avait reconnu l'aptitude de microorganismes à décolorer des colorants tels que le carmin d'indigo.

Prudhomme (1938) a indiqué que les bactéries vivantes décolorent les solutions de 1-naphtol-2-sodium sulfonate-indo-2-6 dibromophénol, 0-crésol-2-6 dichlorophénol, 0-chlorophénol-indo-2-6 dichlorophénol, tandis que les bacilles tués par chauffage à 100° ont perdu ce pouvoir de réduire les colorants en leuco-dérivés.

Levaditi a signalé, comme premier effet manifeste de la pénicilline sur *Staph. aureus*, l'inhibition du pouvoir de précipiter l'argent d'une solution de nitrate. Des méthodes de dosage de la pénicilline ont, d'autre part, utilisé l'inhibition de la réduction des nitrates en nitrites.

Les méthodes de « développement » des images latentes des zones d'inhibition sur plaque auxanographique, après 2 ou 3 heures de diffusion de l'antibiotique, utilisent le « phénomène de seuil » ; autour des zones d'inhibition révélabes, les organismes sensibles manifestent une hyperactivité réductrice, une avidité

intense pour l'oxygène moléculaire des nitrates, des oxydes, tels que le tétr oxyde d'osmium, les ferricyanures, de colorants tels que le vert Janus (qui, par réduction réversible, donne la diéthylsafranine rouge, et par réduction plus complète et irréversible, le leuco-dérivé), la rosaazurine...

De façon générale, dans l'anneau qui entoure les zones d'inhibition, les accepteurs d'hydrogène sont rapidement hydrogénés ; l'intérieur des zones d'inhibition se caractérise par l'absence d'activité réductrice et par l'activité indophénol-oxydasique.

Ce qui délimite la zone d'inhibition, c'est un seuil de potentiel d'oxydo-réduction tel, par exemple, qu'autour de la zone, sur plaqueensemencée de *Staph. aureus* ou de *B. subtilis* et exposée à l'air, les déshydrogénases intra-cellulaires catalysent, à un niveau de potentiel d'environ $-0,080$ volt, le transfert d'hydrogène qui transforme le chlorure de tétrazonium, soluble dans l'eau et incolore, en formazan, rouge et insoluble :

Les méthodes auxanographiques conviennent particulièrement à l'emploi, comme test, de microorganismes aérobies,ensemencés à la surface des plaques d'agar largement exposées à l'air ; mais, étant donné que l'effet de seuil, mis en évidence par les recherches cytochimiques effectuées au Collège de pharmacie, ne dépend pas de l'utilisation de l'oxygène atmosphérique, mais de l'utilisation exagérément rapide, sous l'influence de concentrations sub-bactériostatiques, de l'oxygène moléculaire ou de tout autre accepteur d'hydrogène, et du blocage de cette utilisation par une concentration bactériostatique, la méthode auxanographique peut être employée pour des plaquesensemencées d'anaérobies, à l'abri de l'oxygène atmosphérique : à titre d'exemple, nous étudierons statistiquement les résultats de l'étude auxanographique de l'action du marfanil (chlorhydrate de p. aminométhyl benzène sulfonamide) sur l'hémolyse, en agar au sang, sous atmosphère d'hydrogène, par *Clostridium welchii* (Siebenmann et Plummer, 1945).

L'équation des « orthogonal polynomials » : $Y = y + Bz_1 + Cz_2$ (ici $Y = 18,5 + 2z_1 + 0,5z_2$) permet de calculer facilement les diamètres correspondant aux diverses valeurs de x ; en faisant, dans l'équation, successivement x égal à 1, à 2, à 3 et à 4, on obtient les valeurs de 13, 16, 20, 25 pour les valeurs de y correspondant aux concentrations, croissant suivant la progression géométrique

MARFANIL DILUTIONS	DIAMÈTRES OBSERVÉS								
	x	y	$z_1 = \frac{y - \bar{y}}{2(x - \bar{x})}$	z_1^2	$z_1 y$	z_2	z_2^2	$z_2 y$	y^2
1/1600 ...	1	13	-3	9	-39	+1	1	13	169
1/800	2	16	-1	1	-16	-1	1	-16	256
1/400	3	20	+1	1	+20	-1	1	-20	400
1/200	4	25	+3	9	+75	+1	1	+25	625
Total....		$\bar{y}$	$\bar{0}$	$\bar{40}$	$\bar{40}$	$\bar{0}$	$\bar{4}$	$\bar{2}$	$\bar{1450}$

moyenne : $\bar{x} = 2,5$

$\bar{y} = 74/4 = 18,5$ $B = 40/20 = 2$ $C = 2/4 = 0,5$

indiquée, et dont les log., également espacés, peuvent être représentés par la série 1, 2, 3, 4. Les diamètres sont donc liés aux log. des concentrations appliquées par une fonction du second degré ; la courbe de régression des diamètres (y) sur les log. des concentrations est une parabole, très voisine d'allure d'une courbe asymptotique puisque, ainsi que le montre le tableau suivant, la relation entre (log. concentrations) et (log. diamètre) est une fonction du premier degré et peut se représenter par une droite.

On voit que la relation entre log. concentration (x) et log. diamètres des zones mesurées (y) peut être considérée comme rectilinéaire.

La relation rectilinéaire entre (log. dosage) et (log. réaction) nous paraît fondamentale : elle apparaît à la lumière de l'auxanographie sur plaque ensemencée de *Staph. aureus*, trois heures avant mise en place des cylindres, et sur lesquelles la diffusion est réduite à 2 heures 1/2 :

x	LOG. DIAMÈTRES y	z_1	z_1 LOG. y	LOG. y CALCULÉS	DIAMÈTRES CALCULÉS
1.....	1,11394	-3	-3,34182	1,1191	13,15
2.....	1,20412	-1	-1,20412	1,2068	16,05
3.....	1,30103	+1	+1,30103	1,3017	20,05
4.....	1,39794	+3	+4,19382	1,3966	24,95

Moyenne : $\bar{y} = 1.25426$

PÉNICILLINE u/cc	DIAMÈTRES MESURÉS (d)	LOG (d)	DIAMÈTRES CALCULÉS			
			LINÉAIRE		QUADRATIQUE	
			LOG (d)	(d)	LOG (d)	(d)
0,5	13,28	1,123	1,130	13,49	1,127	13,39
1	14,91	1,173	1,167	14,69	1,168	14,71
2	16,23	1,210	1,204	16,01	1,208	16,13
4	17,30	1,238	1,242	17,44	1,242	17,45
8	18,93	1,277	1,279	19,00	1,278	18,99

VII. Courbes de référence pour la détermination auxanographique des antibiotiques, et en particulier de la pénicilline. — Nous ne ferons que signaler les méthodes qui font usage d'une courbe de référence empirique, établie en laissant diffuser la pénicilline d'un certain nombre de solutions correspondant à divers « dosages » (1/4, 1/2, 1, 2, 4 u./cc.) préparés à partir d'une même solution étalon, puis en portant en ordonnées, sur échelle arithmétique, les diamètres correspondant aux dosages portés sur échelle arithmétique en abscisses. Une telle courbe de référence a l'allure d'une parabole ou celle d'une courbe exponentielle, mais n'a pas de signification mathématique qui puisse être définie par une fonction simple.

Tant du point de vue pratique que du point de vue théorique, toute technique auxanographique doit tendre à permettre d'obtenir une relation du premier degré entre « logarithme du dosage appliqué » (exprimé en u./cc. dans le cas de la pénicilline ou des autres antibiotiques en solution dans les cylindres) et la « réaction mesurée » (zone d'inhibition sur les plaques), ou mieux encore « logarithme de cette réaction ». D'autre part, le choix des échelles d'abscisses et d'ordonnées doit être tel que la relation entre « log. du dosage appliqué » et « réaction » (ou « logarithme de la réaction ») soit représentée par une ligne droite inclinée environ de 45° ; toutes choses égales d'ailleurs, la meilleure technique est celle qui permet d'obtenir une ligne droite dans l'étendue aussi grande que possible des réactions mesurables.

Tandis que beaucoup d'essais microbiologiques, employant comme tests des animaux de laboratoire, permettent d'obtenir une relation rectilinéaire entre log. dosage et log. réaction, les essais microbiologiques, en particulier ceux qui mettent en œuvre les

méthodes auxanographiques de détermination de la concentration de solutions d'antibiotiques, ont été le plus souvent interprétés statistiquement en admettant une relation rectilinéaire entre (log. u./cc.) et diamètre de zone.

Les méthodes auxanographiques mises au point au Collège de Pharmacie du U.C. Medical Center et décrites comme « three-hour method », ont, entre autres avantages, celui de fournir une fonction rectilinéaire entre log. dose et log. diamètre, dans une grande étendue de diamètres mesurables.

Qu'il s'agisse de définir la fonction mathématique qui lie (log. u./cc.) soit au diamètre (d), soit au logarithme du diamètre (log. d), ce qui importe c'est que les dilutions de la solution étalon, réparties dans les divers cylindres, forment une progression géométrique.

Critique statistique de la relation entre (log. u./cc.) et diamètre des zones d'inhibition. — Le tableau I indique les diamètres moyens obtenus au cours de 15 jours successifs d'études auxanographiques sur gélose d'épaisseur standard (32 cm³ par boîte, soit 5 mm. 5), par la « standard cup plate assay » (16 heures à 38°) avec *Staph. aureus*.

Les concentrations (u./cc.) dans les cylindres croissant en progression géométrique, leurs log. croissant en progression arithmétique et pouvant se représenter par la série ($x = 1, x = 2, \dots, x = 5$), il est alors aisé, en employant la méthode d'« orthogonal polynomials » (décrite en appendice à la fin de cette revue), de déterminer si la fonction mathématique qui lie les « diamètres » aux « log. u./cc. » peut s'écrire simplement en utilisant des termes en (x) ou s'il faut introduire des termes en (x^2), en (x^3).....

Ces résultats montrent que, pratiquement, la fonction qui lie la réaction (mesurée sous forme de diamètre) au logarithme du dosage (exprimé par log. u./cc.) peut être considérée comme linéaire et représentée par une droite, mais que, mathématiquement, cette fonction est du 3^e degré et se représente par une courbe en S, très tendue.

Sur plaque épaisse (7 mm. 5) une fonction du 1^{er} degré (linéaire) donne une représentation satisfaisante de la distribution des diamètres en fonction du log. des concentrations ; cette représentation est quelque peu améliorée par l'utilisation d'une fonction du 2^e degré, et est rendue numériquement exacte par l'utilisation d'une fonction du 3^e degré :

TABLEAU I

PÉNICILLINE u/cc	LOG. (u/cc)	x	DIAMÈTRES MESURÉS (d)	DIAMÈTRES CALCULÉS :		
				LINÉAIRE	QUADRA- TIQUE	CUBIQUE
0,25	1,398	1	14,90	15,268	14,788	14,892
0,50	1,699	2	18,67	18,449	18,689	18,663
1,00	0,000	3	21,99	21,630	21,110	21,950
2,00	0,301	4	24,90	24,711	24,951	24,897
4,00	0,602	5	27,69	27,992	27,512	27,723
Moyenne...				21,65		

TABLEAU II

PÉNICILLINE u/cc	DIAMÈTRES MESURÉS	DIAMÈTRES CALCULÉS		
		LINÉAIRE	QUADRATIQUE	CUBIQUE
0,375	16,95	16,915	16,965	16,95
0,750	20,00	20,005	19,955	20,00
1,500	23,00	23,095	23,045	23,00
3,000	26,25	26,185	26,235	26,25
Moyenne...		21,55		

L'approximation à une fonction linéaire entre « log. u./cc. » et diamètre de zone est plus ou moins bonne selon l'épaisseur des plaques. Par exemple, en faisant diffuser la pénicilline à partir de disques de papier imprégnés de solutions plus ou moins diluées, de Beer et Sheerwood (1945) obtinrent une relation rectilinéaire entre u./cc. et diamètres, sur plaques de 2 mm. 36 à 3 mm. 53 d'épaisseur, ensemencées avec *B. subtilis*, mais non sur plaque plus mince (1 mm. 57) ou plus épaisse (5 mm. 30). Ces auteurs ont trouvé, et nous avons confirmé, que, toutes choses égales d'ailleurs, le diamètre d'une zone est une fonction linéaire du log. de l'épaisseur de l'agar.

L'analyse statistique de nos résultats expérimentaux montre que sur plaque de gélose d'épaisseur standard, la diffusion, pendant

16 heures à 38°, peut faire apparaître des zones dont le diamètre (d) est approximativement lié au logarithme de la concentration en pénicilline (u./cc.) par une relation rectilinéaire.

Mais cette relation entre « réaction » et « logarithme de la dose d'agent » paraît fortuite et liée aux conditions spéciales de l'épreuve auxanographique : épaisseur de la gélose, durée..... En microbiologie, comme en physiologie, la relation fondamentale paraît lier le logarithme de la dose de l'agent au logarithme de la réaction mesurable. C'est ce que nous nous proposons maintenant d'expliquer pour une échelle très étendue de concentration de pénicilline, croissant de 0,15 u./cc. à 8 u./cc., diffusant pendant 16 heures à 38° sur plaques ensemencées en coulant 5 cm³ de suspension de *Staph. aureus* dans l'agar, à la surface de plaques d'épaisseurs variables, obtenues en coulant 46, 32, 22 et 16 cm³ de gélose nutritive par boîte de Petri.

Les résultats obtenus pour un certain jour sont consignés dans le tableau III.

TABLEAU III. — Effet de la profondeur de la gélose sur le diamètre des zones obtenues sur plaque ensemencée de *Staph. aureus*, après 16 heures d'incubation à 38° (6/2/1946).

GÉLOSE CM ³ PAR BOÎTE	PÉNICILLINE u./cc.								
	0,15	0,30	0,60	1	1,2	2	4	6	8
16....	12,4	15,0	18,25	20,5	21,66	23,5	26,2	30,0	32
22....	13,1	15,25	18,25	21,33	22,0	25,7	27,5	29	31
32....	12,40	15,05	18,40	21,25	21,5	24,4	27,7	28,7	30,2
46....	12,75	15,20	18,00	21,50	21,16	23,6	26,2	27,8	29,5

Les diamètres ci-dessus, portés en ordonnées (sur échelle logarithmique), pour les diverses concentrations correspondantes de pénicilline (portées en abscisses sur échelle logarithmique) donnent, dans la limite de 0,15 à 2 u./cc., une série de lignes droites diversement inclinées et se coupant à une abscisse correspondant à log. 0,6 ; entre 2 et 8 u./cc., on obtient une deuxième famille de droites, divergeant à mesure qu'augmentent les concentrations.

Cet exemple particulier illustre un phénomène que nous avons montré être très général, à savoir que, dans les conditions de l'« assay standard », si les logarithmes des diamètres des zones

d'inhibition sont portés en ordonnées et les logarithmes des concentrations de pénicilline dans les cylindres en abscisses, on obtient entre 0,25 et 1,25 u./cc. une série de points alignés sur une droite de pente voisine de 0,275, et entre 1,25 et 8 u./cc. une autre série de points définissant une ligne moins inclinée et dont la pente n'est guère que 0,175.

A cet égard, il est intéressant de rappeler que W. Stiles (1920), étudiant la pénétration d'électrolytes dans les gels d'agar, avait trouvé une relation log.-log. avec changement de pente.

Le tableau IV indique les diamètres de zones mesurées (d) autour de cylindres contenant des solutions de pénicilline de concentration croissant selon une progression géométrique, 0,25, 0,50, 1, 2, 4, 8 u./cc. sur des plaques de gélose obtenues en coulant, dans des boîtes de Pétri, 46, 32, 22 ou 16 cm³ de gélose nutritive, puis en ensemençant la surface avec une couche de 3 cm³ de suspension de *Staph. aureus* dans de la gélose ; les plaques sur lesquelles furent disposés les cylindres avaient respectivement 7 mm. 5, 5 mm. 5, 4 mm. et 2 mm. 8 d'épaisseur.

Etant donné que les concentrations de pénicilline croissent en progression géométrique, c'est-à-dire que les logarithmes de ces concentrations diffèrent entre eux d'une valeur constante, il est possible d'appliquer la méthode de Fisher et Yates (dite *orthogonal polynomials*) pour calculer les équations du 1^{er} degré (linéaire), 2^e degré (quadratique), 3^e degré (cubique) ou 4^e degré, permettant de représenter la fonction mathématique qui lie le diamètre des zones au logarithme de la concentration en pénicilline.

La comparaison des diamètres mesurés (d) et calculés (y), dans l'hypothèse d'une relation rectilinéaire (ou du 1^{er} degré) entre logarithme des concentrations (log. u./cc.) et diamètre (y), montre que l'accord est satisfaisant pour les plaques de 7 mm. 5, 5 mm. 5 et 4 mm. d'épaisseur, mais non pour les plaques minces.

Dans les trois premiers cas, la variation totale est presque entièrement due à la variation linéaire ; les variations « quadratique », « cubique » et du « 4^e degré » ne sont pas significatives, si on les compare à la variation résiduelle, ou « déviation », imputable aux erreurs expérimentales (tableau IV, graphique 5).

Par contre, sur plaques de 2 mm. 8 d'épaisseur, pour obtenir une représentation acceptable de la distribution des diamètres (d) en fonction des logarithmes des concentrations de pénicilline (log. u./cc.), il faut calculer l'équation du second degré, voire même du troisième degré (tableau V).

TABLEAU IV. — Zones d'inhibition mesurées (d) et calculées (y) autour de cylindres contenant u./cc. pénicilline, sur plaques de gélose de différentes épaisseurs.

ÉPAISSEURS	46 cm ² (7,5 mm)		32 cm ² (5,5 mm)		22 cm ² (4 mm)		16 cm ² (2,8 mm)	
u./cc	d	y	d	y	d	y	d	y
0,25	14,99	14,965	14,60	14,638	15,344	15,19	15,62	15,31
0,50	18,16	18,051	17,85	17,880	18,180	18,29	18,60	18,60
1,00	20,98	21,137	21,27	21,122	22,040	21,69	21,68	21,80
2,00	24,30	24,223	24,37	24,361	24,687	24,97	24,76	25,04
4,00	27,05	27,309	27,47	27,606	28,040	28,23	27,64	28,28
8,00	30,60	30,395	30,90	30,848	31,750	31,49	32,25	31,52
Moyennes ..	22,68		22,743		23,34		23,42	
Variations :								
linéaire	166,706		183,800		186,460		183,627	
quadra- tique	0,031		0,012		0,025		0,568	
cubique	0,036		0,009		0,030		0,302	
4 ^e degré	0,017		0,029		0,070		0,070	
déviation..	0,114		0,550		0,364		0,083	
Total	166,904		184,400		186,95		184,640	
	0,084		0,05		0,125		0,940	

TABLEAU V

PÉNICILLINE u./cc.	DIAMÈTRES MESURÉS	DIAMÈTRES CALCULÉS			
		LINÉAIRE	QUADRATIQUE	CUBIQUE	4 ^e DEGRÉ
0,25	15,62	15,31	15,79	15,59	15,66
0,50	18,60	18,60	18,52	18,68	18,47
1,00	21,68	21,80	21,64	21,64	21,78
2,00	24,76	25,04	25,00	24,84	24,98
4,00	27,64	28,28	28,00	27,92	27,71
8,00	32,25	31,52	31,99	32,19	32,26
Moyenne... 23,4					

VIII. Interprétation statistique des résultats auxanographiques. —

Les méthodes auxanographiques permettent de mesurer la « réaction » (diamètre de zone d'inhibition) provoquée par la diffusion d'un antibiotique dont le « dosage » est exprimé soit en unités par cm^3 (u./cc.), dans le cas de la pénicilline, soit en microgramme

GRAPHIQUE 5. — En portant en ordonnées, sur échelle logarithmique, les diamètres mesurés autour des cylindres contenant les concentrations indiquées en u./cc. sur échelle logarithmique des abscisses, on obtient, sur plaques de 16, 22, 32 et 46 cm^2 , les séries linéaires de triangles, de cercles pleins, de cercles ouverts et enfin d' $\times$; chaque série linéaire montre un changement de pente pour des diamètres de 23 à 24 mm., correspondant à environ 2 u./cc.; ce changement de pente est particulièrement marqué sur plaque mince (triangles) où s'exagère le diamètre des zones autour des cylindres contenant les solutions les moins diluées; la cassure est d'autant moins accusée que la plaque est plus épaisse. Autour des cylindres contenant 0,6 u./cc., le diamètre des zones n'est guère affecté par les variations d'épaisseur.

par cm^3 de la solution disposée dans les cylindres reposant sur les plaquesensemencées d'organismes sensibles.

Nous admettrons qu'il existe, entre le log. du dosage (log. u./cc.) et le diamètre mesuré (ou le log. de ce diamètre), une relation mathématique simple; nous nous efforcerons de déterminer les conditions dans lesquelles une équation du 1^{er} degré suffit à définir la variation des diamètres (d) ou de leur log. (log. d), en fonction de la variation des log. des concentrations (log. u./cc.). Pour établir

la courbe de référence, permettant de déterminer le diamètre de zone d'inhibition que doit faire apparaître un certain dosage, on détermine d'abord la valeur moyenne des diamètres (d) autour de cylindres contenant l'une des dilutions de la solution étalon.

La courbe de référence étant déterminée pour une certaine série d'essais, permet, pour une série homologue d'essais, de définir la concentration (u./cc.) d'antibiotique autour d'un cylindre qu'entoure une zone de diamètre (d).

Une courbe de référence est d'autant mieux utilisable qu'elle est définie par un plus petit nombre de constantes ; par exemple, une droite de référence est définie par deux de ses points, que permettront de déterminer la méthode des « 32 points ».

Chaque valeur de u./cc., c'est-à-dire chaque « dosage » appliqué, devra être l'un des termes d'une progression géométrique ; c'est dire que les diverses solutions réparties dans les cylindres doivent être préparées par dilution successive d'une solution étalon initiale, obtenue en dissolvant, dans un volume connu de solution tampon, un poids connu d'un échantillon de référence de benzylpénicilline cristallisée (dont le titre en u./mgr. est supposé connu) ; par exemple, des dilutions $1/2$, $1/4$, $1/8$, $1/16$ d'une solution à 10 u./cc. donneront des solutions à 5, 2,5, 1,25, 0,625... u./cc. ; les « log. u./cc. » pourront conventionnellement se représenter par la série 1, 2, 3, 4, 5.... x.

Suivant que nous nous proposons d'étudier la régression des diamètres eux-mêmes (d) ou de leur logarithme, sur les ($\log$ u./cc.), nous représenterons par (y) soit les diamètres (d), soit leur $\log$. ($\log. d$).

Ayant déterminé expérimentalement n valeurs de (y) correspondant chacune à une valeur de (x), on peut calculer l'équation d'une courbe d'ordre ($n - 1$) qui passe par ces n points.

Par exemple, on peut joindre deux points par une droite dont l'équation sera $Y = a + b_1 (x - \bar{x})$; trois points par une courbe quadratique d'équation $Y = a + b_1 (x - \bar{x}) + b_2 (x - \bar{x})^2$; pour faire passer une courbe par 4 points, il peut être nécessaire d'introduire un terme en x^3 .

Pour calculer la courbe de référence par la méthode des « *orthogonal polynomials* » : calculer la différence entre chaque valeur de x et la moyenne $\bar{x}$, soit $z_1 = (x - \bar{x})$; multiplier chaque valeur de z_1 par la valeur correspondante de y , additionner ces produits pour obtenir $S(z_1 y)$; élever au carré chaque valeur de z_1 , faire la somme de ces carrés $S(z_1^2)$, calculer $B = S(z_1 y) / S(z_1^2)$ et l'introduire dans l'équation qui prend alors la forme : $y = \bar{y} + B z_1$.

En remplaçant z_1 par chacune de ses valeurs numériques, on obtient chaque fois la valeur correspondante de y ; chaque valeur calculée de y est voisine de la valeur observée, si la régression des diamètres (ou de leur log.) sur les log. des concentrations (log. u./cc.) peut se représenter par une droite.

Dans ce cas la courbe de régression est entièrement définie si l'on connaît deux de ses points, ou un point et la pente (B).

Dans les essais auxanographiques de la pénicilline, on admet généralement une relation rectilinéaire entre (log. u./cc.) et diamètre (d) ; on se contente alors de déterminer pour chaque série d'essais, la « droite de régression » pour « deux doses » de la solution étalon et une « droite de régression » pour « deux doses » de la solution à l'étude.

Méthode des deux points permettant de déterminer les diamètres correspondant à 2 dilutions de la solution étalon et à 2 dilutions de la solution à l'étude, pour chaque boîte de Petri. — Certains auteurs préconisent de fixer deux points de la courbe de référence en faisant diffuser, concomitamment avec la pénicilline de la solution à l'étude, la pénicilline de deux concentrations connues, S_1 et S_2 , de la solution étalon.

Méthode de de Beer (1). — Soient, par exemple, deux dilutions de la solution de la pénicilline à l'étude, telles que la dilution de l'une, U_2 , soit quatre fois plus grande que la dilution de l'autre, U_1 .

Supposons que l'étude auxanographique de 4 boîtes de Petri, mesurant 90×15 mm. et contenant 20 cm^3 d'agar (c'est-à-dire une plaque épaisse de 3 mm. 15), donne les diamètres suivants de zones d'inhibition autour de cylindres d'où diffusent les solutions 1/4 et 1 de la solution étalon et 1/4 et 1 de la solution à l'étude :

PLAQUE	ÉTALON (S)		A L'ÉTUDE (U)	
	1/4	1	1/4	1
1.....	23	27	17	22,5
2.....	23,75	27,75	18,5	22,75
3.....	23,25	27	18	22,75
4.....	22,5	26,75	18,75	22
Total.....	92,5	108,5	72,25	90

(1) *J. bact.*, L, 1945, 461.

Le logarithme du rapport de la concentration la plus forte à la concentration la plus faible est ici $d = \log. (4/1) = 0,602$. Le quotient $0,602 [(90,0 + 72,25) - (108,5 + 92,5)] / [(90,0 - 72,25) + (108,5 - 92,5)]$ auquel on ajoute 2 (pour la transformation en pourcentage) représente l'antilogarithme du « dosage » de la solution à l'étude, en pourcentage du « dosage » de la solution étalon, soit ici antilog. $(2 - 0,6923) = 20,36 \%$.

Méthode de Bliss. — Bliss fait dissoudre 2,7 microgrammes (correspondant à 1 u./cc.) de son échantillon de référence de benzyl-pénicilline par cm^3 de solution tampon ; il compare les zones autour de cylindres contenant, les uns cette solution étalon SH, et les autres une dilution UH de la solution à l'étude. D'autre part, il dilue 2 cm^3 3 de chacune des solutions SH et UH dans 5 cm^3 de tampon. Chaque plaque, recevant 4 cylindres, permet d'estimer les zones correspondant à UH, UL, SH, SL, où (L) est à (H) comme (7,3) est à (2,3), ou comme 1 est à 3,16, c'est-à-dire que $\log. (L/H) = \log. (1/3,16) = \log. 1 - \log. 3,16 = 1/2$.

Pour chaque plaque on calcule :

$$y_1 = UH - SH + UL - SL \text{ et } y_2 = UH - UL + UH - SL$$

D'une série de quatre plaques on déduit 4 valeurs de y_1 dont on divise la somme par le double de la somme des 4 déterminations de y_2 ; on obtient ainsi le log. du nombre d'u./cc. de pénicilline dans la solution à l'étude, $M' = S(y_1)/2S(y_2)$.

TABLEAU VI. — Variation de diamètres des zones d'inhibition en fonction de la variation de la concentration de pénicilline dans les cylindres ; les concentrations (u./cc.) augmentant en proportion géométrique, les log. de ces concentrations augmentent en progression arithmétique ; leur accroissement est représenté par la série $x = 1$; $x = 2$; $x = 3$; $x = 4$; $x = 5$.

PÉN ICILLINE u./cc.	$\underline{x}$	DIAMÈTRES MESURÉS (d)	DIAMÈTRES CALCULÉS :		
			LINÉAIRE	QUADRATIQUE	PARABOLE
0,25	1	14,90	15,268	14,788	14,8065
0,50	2	18,67	18,449	18,689	18,7090
1,00	3	21,99	21,630	22,110	22,1213
2,00	4	24,90	24,711	24,951	25,0716
4,00	5	27,69	27,992	27,512	27,5305
$\bar{y} = 21,63$			B = 3,181	C = 0,2407	

Méthodes des trois points et des cinq points. — Ainsi que le fait remarquer Finney (1), ces « méthodes de deux points » ne permettent aucune vérification de la « rectilinéarité » de la courbe de régression. Finney a insisté sur l'avantage des méthodes de trois points ou de cinq points, permettant, la première, une « épreuve de curvilinéarité du 2^e degré », la seconde une « épreuve de curvilinéarité du 3^e degré ». A titre d'exemples, nous étudierons « les cinq points » pour deux séries de dilutions : 0,25 à 4 u./cc. et 0,5 à 8 u./cc.

Cet exemple montre qu'entre 0,25 et 4 u./cc., la méthode standard des « cup-assays » fournit une régression des diamètres mesurés (d) sur ($\log$. u./cc.), où les termes du 2^e degré jouent un rôle non négligeable.

ÉQUATIONS :	
Linéaire,	$Y_1 = 21,63 + 3,181 z_1$
Quadratique,	$Y_2 = 21,63 + 3,181 z_1 - 0,2407 z_2$
Parabole,	$Y = - 0,2407 x^2 + 4,6252 x + 10,422$

TABLEAU VII

PÉNICILLINE u./cc.	DIAMÈTRES MESURÉS	DIAMÈTRES CALCULÉS		
		LINÉAIRE	QUADRATIQUE	CUBIQUE
0,5.....	16,375	16,775	16,355	16,392
1.....	19,750	19,575	19,785	19,710
2.....	22,750	22,375	22,795	22,795
4.....	25,500	25,175	25,385	25,422
8.	27,500	27,975	27,555	27,517
Moyenne...		22,375		
Variation (carré moyen)		78,400	0,642	0,141

(1) *Biochem. J.*, XLI, V, 1947.

L'exemple suivant (tableau VII) nous montrera qu'entre 0,5 et 8 u./cc., les termes du 2^e degré méritent encore d'être pris en considération ; pour obtenir une approximation à une fonction rectilinéaire il faut employer, comme plaque auxanographique, une plaque « sensibilisée » par incubation de 2 ou 3 heures, avant mise en place des cylindres, et réduire la durée de la diffusion à 3 heures au plus (tableau VIII).

La variation totale étant de 79,0628, la variation résiduaire, imputable aux « erreurs » ou « déviations » est de 0,0067 ; la varia-

TABLEAU VIII. — Auxanographie, 3 heures.

PÉNICILLINE u./cc.	DIAMÈTRES MESURÉS	DIAMÈTRES CALCULÉS		
		LINÉAIRE	QUADRATIQUE	CUBIQUE
0,5.....	13,08	13,118	13,228	13,087
1.....	14,715	14,715	14,665	14,847
2.....	16,240	16,312	16,212	16,212
4.....	17,560	17,909	17,859	17,577
8.....	19,750	19,506	19,606	19,747
Moyenne	16,312			
VARIATION (CARRÉ MOYEN)		25,504	0,0345	0,1988

tion « quadratique » peut être estimée statistiquement par rapport à la variation résiduelle, c'est-à-dire en fonction du rapport 0,642/0,0067 qui correspond à la valeur élevée de 95 ; la courbure de la ligne de régression est donc significative dans l'étendue de 0,5 à 8 u./cc.

La variation totale étant de 25,8009, la variation résiduelle imputable aux « déviations » est 0,536.

La contribution « quadratique » n'est pas statistiquement significative, en fonction du rapport 0,1988/0,0536, dont la valeur n'est ici que de 3,7 (au lieu de 95 pour l'auxanographie poursuivie pendant 16 heures).

La simple comparaison des diamètres « mesurés » et calculés selon la régression linéaire suffit à montrer que l'accord est très satisfaisant. En fait, la ligne de régression est une courbe du

TABLEAU IX

PÉNICILLINE u./cc.	DIAMÈTRES MESURÉS	D'AMÈTRES CALCULÉS		
		LINÉAIRE	QUADRATIQUE	CUBIQUE
0,5.....	13,28 ± 0,085	13,392	13,358	13,272
1.....	14,91 ± 0,082	14,761	14,778	14,950
2.....	16,23 ± 0,081	16,130	16,164	16,164
4.....	17,30 ± 0,076	17,489	17,472	17,300
8.....	18,93 ± 0,100	18,868	18,834	18,920
Moyenne 16,13				
Variation (carré moyen)		18,742	0,00445	0,07569

3° degré, c'est-à-dire une sigmoïde ou courbe en S, mais l'S est tellement tendu que, pratiquement, on peut considérer la courbe comme une droite.

Cette conclusion, tirée de l'étude statistique des résultats auxanographiques d'un certain jour (tableau VIII), est valable pour la courbe étalon établie en intégrant les résultats de 100 essais auxanographiques effectués au cours de 3 jours consécutifs (tableau IX).

La variation totale $S(y-16,13)^2$ est 18,8298 ; la variation résiduelle est $18,8298 - (18,7420 + 0,00445 + 0,07569) = 0,0084$. La variation imputable à la régression cubique a une valeur significative vis-à-vis de la variation résiduelle ($0,07569/0,0084 = 9$) ; la ligne de régression est une courbe du 3° degré qui, pratiquement, peut être représentée par une droite.

RÉSUMÉ

En résumé, les méthodes d'auxanographie permettent de déterminer une fonction mathématique simple entre le logarithme de la « dose appliquée » (concentration, ou (u./cc.) de l'antibiotique dans la solution placée dans un cylindre ou ayant servi à imbiber un disque de papier) et la « réaction » (diamètre de zone d'inhibition) ou le « log. de la réaction » (log. d).

Dans des limites étroites, lorsque la dilution varie de 1 à 4, et dans des conditions prescrites d'épaisseur de plaque de gélose, de

Beer, Bliss et divers autres auteurs admettent qu'il existe une fonction rectilinéaire entre (log. u./cc.) et (diamètre) ; ils préconisent la détermination de 2 points d'une courbe de référence et de 2 points de la courbe de régression pour la solution à l'étude. Dans les conditions de « standard cup-plate assays », une méthode de 5 points, pour des dilutions variant de 1 à 16, permet de déterminer une fonction quadratique entre (log. u./cc.) et (diamètres) ; elle permet de définir, de 0,25 à 2 u./cc. et de 2 à 4 u./cc., une relation rectilinéaire entre (log. u./cc.) et (log. diamètre) ; chaque droite est définie par sa pente, plus forte entre 0,25 et 2 qu'entre 2 et 4.

La plus grande simplification est obtenue en sensibilisant les plaques auxanographiques par incubation préliminaire, avant mise en place des cylindres et début de la diffusion ; la méthode dite de « préincubation » ou de « 3 heures » permet, et ce n'est pas son moindre avantage, non seulement d'obtenir une relation rectilinéaire acceptable entre log. u./cc. et diamètre (d), lorsque u./cc. varie de 0,5 à 8, mais même d'obtenir une représentation rectilinéaire de (log. d) en fonction de (log. u./cc.) et, par conséquent, de faire rentrer les essais auxanographiques de la pénicilline dans le cadre des « bio-assays », où le log. de la réaction est fonction du log. du dosage appliqué.

BIBLIOGRAPHIE CHRONOLOGIQUE DE L'AUXANOGRAPHIE

1889. — BEIJERINGK (M. W.). — L'auxanographie ou la méthode de diffusion dans la gélatine, appliquée aux recherches microbiologiques. *Archives néerland. des Sc. Exactes et Nat.*, III, A, 1889, 367.
1915. — CRABILL (C. A.) et REED (H. S.). — Convenient methods for demonstrating the biochemical action of microorganisms. *Bioch. Bull.*, IV, 1915, 30-34.
1920. — STILES (W.). — Penetration of electrolytes into gels : I. The penetration of sodium chloride into gels of agar containing AgNO_3 . *Bioch. J.*, XIV, 1920, 58.
1925. — EFFRONT (J.). — Sur le pouvoir absorbant de l'agar-agar. *C.R. Acad. sc.*, CLXXX, 1925, 29-33.
1929. — MORAVEK (V.). — Ueber die Diffusion in Gelen. *Kolloid Ztschr.*, XLIX, 1929, 39.
1930. — BIGWOOD (E. J.). — Distribution of ions in Gels. *Transact. Faraday Soc.*, XXVI, 1934, 704.
1931. — HIMEBAUGH (L. C.). — U.S. Food and Drug Administration. Methods of testing antiseptics and disinfectants. *U.S.D.A. Circ. n° 198*, 1931.
1934. — LODDER (J.). — Die anaskoprogenen Hefen. *Die Hefesammlung des « Centraalbureau voor Schimmelcultures »*. *Beiträge zu einer Monographie der Hefearten*. II Teil, Erste Hälfte, Utrecht, 1934.

1938. — LANGERON (M.) et GUERRA (P.). — Nouvelles recherches de Zymologie médicale. *Ann. parasitol.*, XVI, 1938, 36-84, 430-525.
1941. — ABRAHAM (E. P.), CHAIN (E.), FLETCHER (C. M.), GARDNER (A. D.), HEATLEY (N. G.), JENNINGS (M. A.) et FLOREY (H. W.). — Further observations on penicillin. *Lancet*, II, 1941, 177-189.
1943. — FOSTER (J. W.) et WOODRUFF (H. B.). — Microbiological aspects of penicillin. *J. Bact.*, XLVI, 1945, 187-202.
— Quantitative estimation of Streptothricin. *J. Bact.*, XLV, 1943, 408-409.
1944. — BLISS (C. I.). — Relative potency as applied to the assay of penicillin. *Science*, C, 1944, 577-578.
— A simplified calculation of the potency of penicillin and other drugs assayed biologically with a graded response. *J. Am. Statistic. Assoc.*, XXXIX, 1944, 479-487.
- EPSTEIN (J. A.), FOLEY (E. J.), PERRINE (I.), et LEE (S. W.). — Convenient assay method for penicillin and similar substances. Use of large plates and filter paper circles. *J. Lab. Clin. Med.*, XXIX, 1944, 319-320.
- HEATLEY (N. G.). — A method for the assay of penicillin. *Biochem. J.*, XXXVIII, 1944, 61.
- SCHATZ (A.), BUGIE (E.) et WAKSMAN (S. A.). — Streptomycin, a substance exhibiting antibiotic activity against gram-positive and gram-negative bacteria. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, LV, 1944, 66-69.
- SCHMIDT (W. H.) et MOYER (A. J.). — Penicillin. I, Methods of assay, *J. Bact.*, XLVII, 1944, 199-208.
- SHERWOOD (M. B.). — A rapid quantitative method for the determination of penicillin. *Science*, XCIX, 1944, 247.
- THOMAS (A. R.), LEVINE (Max) et VITAGLIANO (G. R.). — Simplified procedures for ascertaining concentrations of and bacterial susceptibility of penicillin. *Proc. Soc. Exper. Biol. Med.*, LVI, 1944, 264-267.
- VINCENT (J. G.) et VINCENT (H. W.). — Filter paper disk modification of the Oxford cup method determination. *Proc. Soc. Exper. Biol. Med.*, LV, 1944, 162-164.
- WIEDLING (Sten). — The production of antibiotics by *Penicillium* sp. *Botaniska Notiser*, IV, 1944, 433-439.
1945. — ABRAHAM (E. P.). — The effect of proactinomycin on *Staph. aureus*, in heart broth. *Brit. J. Exp. Path.*, XXVI, 1945, 339-356.
- ASHESHOV (I. N.) et STRELITZ (F.). — A simplified method for the assay of antibiotics. *Science*, CI, 1945, 621.
- AVERY (R. C.) et WARD (W. B.). — The inhibitory effect of Atabrine and Acridine derivatives on acid-fast bacilli. *J. Pharm. Exp. Therap.*, LXXXV, 1945, 258-264.
- BEADLE (G. W.), MITCHELL (H. K.) et BONNER (D.). — Improvements in the cylinder plate method for penicillin assay. *J. Bact.*, XLIX, 1945, 101-104.
- BEER (de) (J. E.). — The calculation of biological assay results by graphic methods : the all or none type of response. *J. Pharm. Exper. Therap.*, LXXXV, 1945, 1-13.
- BEER (de) (J. E.) et SHERWOOD (M. B.). — The paper disc-agar plate method for the assay of antibiotic dilutions. *J. Bact.*, L, 1945, 459-467.
- BRODIE (J.). — A simple and convenient method for the assay of penicillin. *J. Path. Bact.*, LVIII, 1945, 257-258.

- CHAIN (E.) et DUTHIE (E. S.). — Bactericidal and bacteriolytic action of penicillin on the *Staphylococcus*. *Lancet*, I, 1945, 652-656.
- CHANDLER (V. L.), PRICE (C. W.) et RANDALL (W. A.). — Control and evaluation of blood serum assays for penicillin. *Science*, CII, 1945, 325.
- COGHILL (R. D.) et KOCH (R. S.). — Penicillin, a war-time accomplishment. *Chem. Eng. News*, XXIII, 1945, 2310-2316.
- COOKE (J. V.). — A simple clinical method for the assay of penicillin. *J. Am. Med. Ass.*, CXXVII, 1945, 445.
- COPELAND (J.). — Method of testing sensitivity of microorganisms to penicillin. *Bull. U.S. Army Med. Dept.*, IV, 1945, 596-599.
- COWAN (S. T.). — The variation in sensitivity to penicillin of strains of the Oxford *Staphylococcus*. *J. Path. Bact.*, LVII, 1945, 145-148.
- EMMONS (C. W.). — Fungicidal and fungistatic agents. *Amer. J. Public Health*, XXXIV, 1945, 887-888.
- FRIEDEN (E. H.). — The diffusion constant of Penicillin. *Science*, CI, 1945, 21.
- HAYES (W.). — The effect of agar depth in the plate method for assay of penicillin. *J. Path. Bact.*, LVII, 1945, 457-467.
- HERRERO (J. F.). — Indices de bichloruro de mercurio. *Arch. Farm. y Bioquim.*, Tucuman, II, 1945, 181.
- Accion de cationes sobre el desarrollo de bacterias, nuevo metodo para su estudio. *Arch. Farm. y Bioquim.*, Tucuman, II, 1945, 239-319.
- HOYT (R. E.) et al. — The activity of penicillin at temperatures above 37°. *J. Lab. Clin. Med.*, XXX, 1945, 736-738.
- KNUDSEN (L. F.). — The use of statistics in biological experimentation and assay. *J. Assoc. Off. Agric. Chemists*, XXVIII, 1945, 806-813.
- KNUDSEN (L. F.) et RANDALL (W. A.). — Penicillin assay and its control chart analysis. *J. Bact.*, L, 1945, 187-200.
- LASSEUR (Ph.), DUPAIX-LASSEUR (A.), PÉPIN (J.), LÉVÊQUE (M.-Th.), GIRARD (Th.) et AUBRY (J.). — Contribution à l'étude de la pénicilline. *Trav. Lab. Microb. Fac. Pharm. Nancy*, XIV, 1945, 68-96.
- LEVINE (M.) et THOMAS (A. R.). — The inhibition-zone technique for determination of Bacterial resistance to Penicillin. *J. Lab. Clin. Med.*, XXX, 1945, 883-890.
- LOO (Y. H.) et al. — Assay of streptomycin by the paper disc plate method. *J. Bact.*, L, 1945, 701-709.
- MOHRS (P. E.). — A simple quantitative test for the penicillin sensitivity of bacteria : the « radial streak » method. *J. Lab. Clin. Med.*, XXX, 1945, 800-802.
- MOREIRA (N. M.). — Diagnostico micologico pelo metodo auxanografico de Beijerinck. *Biol. Medica*, VIII, 1945, 53-61.
- PONTECORVO (G.). — Assay of the rates of secretion of antibiotic in different regions of a growing mould colony. *Nature*, CLV, 1945, 515.
- REEVES (M. D.) et SCHMIDT (W. H.). — A device for placing cylinders on assay plates. *J. Bact.*, XLIX, 1945, 395-400.
- REILLY (H. C.), SCHATZ (A.) et WAKSMAN (S. A.). — Antifungal properties of antibiotic substances. *J. Bact.*, XLIX, 1945, 585-594.
- SCHMIDT (W. H.), WARD (G. E.) et COGHILL (R. D.). — Effect of dissociation phases of *B. subtilis* on penicillin assays. *J. Bact.*, XLIX, 1945, 411-412.

- SELBIE (F. R.) et al. — Bacteriological aspects of penicillin therapy. *J. Path. and Bact.*, LVII, 1945, 47-58.
- SIEBENMANN (Ch. O.) et PLUMMER (H.). — On the action of marfanil and other anticlostridial agents on anaerobic blood agar plates. *J. Pharm. Exp. Therap.*, LXXXIV, 1945, 291-300.
- WAKSMAN (S. A.) et REILLY (H. C.). — Agar streak method for assaying antibiotic substances. *Ind. Eng. Chem. Anal. Ed.*, XVII, 1945, 556-558.
- WIEDLING (Sten.). — A thermostabile fungistatic factor from *Escherichia coli*. *Nature*, CLVI, 1945, 204.
1946. — ABRAHAM (E. P.) et DUTHIE (E. S.). — Effect of pH of the medium on activity of streptomycin and penicillin and other chemotherapeutic substances. *Lancet*, 30 mars 1946, p. 455.
- BLISS (C. I.). — A revised cylinder plate assay for penicillin. *J. Am. Pharmac. Assoc.*, XXXV, 1946, 6-12.
- BUSH (M. T.) et al. — Antibiotic substances active against *M. tuberculosis*. *J. Pharm. and Expt. Therap.*, LXXXV, 1946, 237.
- CHRISTIAN (J. E.) et NEURATH (M. L.). — A new sterile technique for preparing agar cup-plates. *Science*, CIII, 1946, 172-173.
- COOPER (K. E.) et WOODMAN (D.). — The diffusion of antiseptics through agar gels, with special reference to the agar cup method of estimating the activity of penicillin. *J. Path. Bact.*, I, 1946, 75-84.
- DAS (R.), GIRI (K. V.), RAO (P. L. N.). — A micromethod for the detection of phosphatases by « agar plate » method. *Science and Culture*, XI, 1946, 700-701.
- EISNER (H.) et PORZECANSKI (B.). — Inactivation of penicillin by zinc salts. *Science*, CIII, 1946, 629-630.
- ELWYN (H. M.). — Determination of the penicillin sensitivity of bacteria. *Naval Medic. Bull.*, XLVI, 1946, 1879.
- ERIKSEN (K. R.). — Lytic action of penicillin on *Staphylococcus* and *Pneumococcus*. *Acta path. Microb. Scand.*, XXIII, 1946, 221.
- HUMPHREY (J. H.) et JOULES (H.). — Penicillin inhalation in pulmonary disease. *Lancet*, 1946, 221.
- KLEIN (M.) et KALTER (S. S.). — The combined action of penicillin and the sulfonamides *in vitro*: the nature of the reaction. *J. Bact.*, LI, 1946, 95-105.
- LE PAGE (G. A.) et CAMPBELL (E.). — Preparation of Streptomycin. *J. Biol. Chem.*, CLXII, 1946, 163.
- LUTERAAN (Ph.-J.). — La diffusion dans la gélose et ses applications à l'étude de la physiologie des microorganismes. *Ann. parasitol.*, XXI, 1946, 356-373.
- LUTERAAN (Ph.-J.) et DENIS. — Application de la méthode auxanographique à l'étude des facteurs de croissance. *C.R. Soc. Biol.*, CXL, 1946, 131.
- MELIN (E.) et WIKEN (T.). — Antibacterial substances in water extracts of pure forest litter. *Nature*, CLVIII, 1946, 200.
- NATHANSON (M. H.) et LIEBHOLD (R. A.). — Diffusion of sulfonamides and penicillin into fibrin. *Proc. Soc. Exper. Biol. Med.*, LXII, 1946, 83-86.
- VESTERDAL (Jorgen). — The agar cup plate method of estimating penicillin. *Acta Pharmacol. Tox.*, II, 1946, 9-21.

1947. — DUFRÉNOY (J.) et PRATT ROBERTSON. — Cytochemical mechanisms of penicillin action. I. Oxidation-reduction levels. *J. Bact.*, LIII, 1947, 657-666.
- — III. Effect on reaction to the Gram stain in *Staph. aureus*. *J. Bact.*, LIV, 1947, 283-289.
- FINNEY (D. S.). — Statistical Aspects of Microbiological Assays. *Bioch. J.*, XLI, 1947, 5.
- GOYAN (F. M.) et DUFRÉNOY (J.). — A graphical calculator for bioassays. *J. Amer. Pharm. Assoc.*, XXXVI, 1947, 305-309.
- GOYAN (F. M.), DUFRÉNOY (J.), STRAIT (L. A.) et PRATT ROBERTSON. — A three-hour physical development cup-plate assay for penicillin. *J. Amer. Pharm. Assoc.*, XXXVI, 1947, 65-68.
- HEATLEY (N. G.). — Methods for the assay of antibiotics. *Bioch. J.*, XLI, 1947, 12-15.
- PRATT, ROBERTSON et DUFRÉNOY (J.). — Practical three-hour and two-hour cylinder-plate assays for penicillin. *Nature*, CLIX, 1947, 576.
- — Changes in reactions of *Staph. aureus* to vital dyes. *J. Bact.*, LIV, 1947, 127-133.
- — Comparative responses of Gram-positive and Gram-negative bacteria to penicillin. *J. Bact.*, LIV, 1947, 719-730.

*Université de Californie, Collège de pharmacie,
Centre médical, San Francisco 22.*