

MESURES POLAROGRAPHIQUES DE LA CONSOMMATION
D'OXYGÈNE DU CŒUR ÉTALÉ OUVERT DE GRENOUILLE
EN CONTRACTIONS RÉGULIÈRES PROLONGÉES *IN VITRO*.

par H. FABEL (*), D. W. LÜBBERS (*) et B. RYBAK (**).

Laboratoire de Zoophysologie, Faculté des Sciences, Caen (Calvados).

(Mémoire reçu le 10 février 1964).

Dans la plupart des travaux sur la consommation d'oxygène du cœur extirpé de Grenouille (cf. notamment A. J. CLARK et ses collaborateurs [1] seule a été étudiée la captation de l'oxygène d'une solution physiologique venant en contact avec la surface *interne* du cœur. Quoique le cœur soit ainsi soumis à la pression liquidienne, les valeurs de consommation d'oxygène obtenues dans ces conditions sont trop basses du fait que, de par sa structure spongieuse, le cœur de Grenouille peut absorber aussi des quantités importantes d'oxygène par sa surface externe [2]. Ceci tient à ce que, d'après des mesures de structure faites sur le ventricule vivant de cœur intact de Grenouille, l'épaisseur de la paroi externe est de l'ordre de 10 à 20 μ et celle de la *spongiosa* d'environ 50 μ [3]. D'autre part les valeurs de consommation d'oxygène dépendent évidemment de l'état contractile et de la régularité des contractions [4] [5] et elles dépendent aussi de la possibilité de renouvellement de l'ambiance, de sorte que, sur des préparations non tendues — comme il en va généralement dans l'appareil de WARBURG — les valeurs de consommation d'oxygène sont trop faibles quoique la consommation relative de l'oreillette par rapport au ventricule puisse être significative [6].

La technique décrite ci-dessous permet de saisir réellement la consommation totale d'oxygène du cœur, celui-ci étant soumis à des contraintes statiques définies après avoir été étalé dans un plan de sorte que les surfaces interne et externe sont également baignées par la solution physiologique. A cet effet des mesures polarographiques ont été conduites avec une électrode de platine spécialement construite pour cette expérience et qui est largement indépendante des phénomènes de convection.

(*) Abteilung für angewandte Physiologie und Arbeitsphysiologie am physiologischen Institut der Universität, Marburg/Lahn.

(**) Ce travail a été fait avec l'aide matérielle de la Délégation générale à la Recherche scientifique et technique (Convention 63-FR-071).

TECHNIQUES.

Le cœur est préparé par ouverture ventrale [7] et mis sous tension par des poids de telle sorte qu'il reprenne son rythme normal [8]. Ce cœur ouvert est ensuite placé dans une solution non phosphatée et non glucosée de RINGER emplissant une cellule cylindrique spécialement conçue pour l'expérience et dont le volume est de 5,7 ml (figure 1) ou éventuellement de volume plus réduit. Les 6 poids tenseurs de 1 g appliqués à 60° les uns des autres sont appendus au cœur par l'intermédiaire de 6 crochets montés sur fils de nylon et de telle sorte que ces fils passent hors de la cellule par des bras latéraux munis de petites boules qui permettent une obturation hermétique à l'aide d'une goutte de mercure (joints glissants). Le couvercle de la cellule comporte deux ouvertures de remplissage obturables à la graisse au silicone et une ouverture axiale rodée pour l'électrode de platine. Celle-ci est du type à membrane de CLARK [9] modifiée selon GLEICHMANN et LÜBBERS [10]. Mais le modèle ordinaire — avec fil de platine de 1,5 mm de diamètre — a le désavantage pour des mesures reproductibles de nécessiter une convection constante et la plus forte possible (si avec cette électrode la convection cesse, pour une même pO_2 de la solution, le courant de réduction tombe à 40-60 p. 100 de la valeur). Les travaux de BÜRGER, LÜBBERS et OCKENGA [11], POLGER et FORSTER [12] et surtout SEVERINGHAUS [13] ont montré que l'action de la convection — effet d'agitation — sur le courant de réduction de l'oxygène est d'autant plus petite que le courant de réduction est plus faible et plus épaisse la membrane. C'est pourquoi nous avons trouvé avantageux de réduire le diamètre du fil de platine à 15 μ . Une telle électrode revêtue d'une membrane de cellophane de 12 μ d'épaisseur (couche de stabilisation) et d'une membrane de Teflon également de 12 μ d'épaisseur présente pour un courant de 1,5-2 nA dans l'air un temps de réponse d'environ 4 secondes (95 p. 100) et un effet de convection de 5-6 p. 100 à 20°C ; avec une membrane de cellophane de 12 μ et une membrane de Teflon de 25 μ , le courant tombe à 1,0-1,5 nA et l'effet d'agitation à 3-4 p. 100. Avec cette électrode une légère agitation de la solution de RINGER (à l'aide d'un rotor magnétique dont les faibles effets thermiques sont dissipés dans une masse d'eau thermostatique), est telle que le courant de réduction de l'oxygène est le même que dans le gaz ; d'autre part nous avons noté que les modifications de la convection par les contractions cardiaques n'affectent pas les mesures. La tension de la polarisation utilisée est de 700 mV. L'étalonnage de l'électrode de platine a été fait avec trois mélanges gazeux dont la composition était déterminée avec l'appareil d'analyse des gaz de SCHOLANDER. Pour contrôler l'électrode on utilisait l'air ambiant (20,95 p. 100 en volume d' O_2) après avoir fait passer cet air au moyen d'une pompe d'aquarium à travers un récipient rempli d'eau pour l'humidifier et le réchauffer ; dans ces conditions la pO_2 est mesurée à 1 mm Hg près (pour les détails cf. [10]).

BULL. SOC. CHIM. BIOL., 1964, 46, n° 5-6.

Le calcul de la consommation

$$A = \frac{\alpha}{760}$$

dans laquelle :

A = consommation d'oxygène

α = coefficient de BUNSEN.

ΔpO_2 = variation de la pression (mm Hg).

V = volume du récipient en l.

P = poids du cœur essoré en g.

Comme instruments de mesure remètre de Siemens et en partie analysator » de la Maison Eschweiler, l'inscripteur à suiveur de spot « ou avec un montage constitué d'un « Photodyne » PH D 8 Sefram.

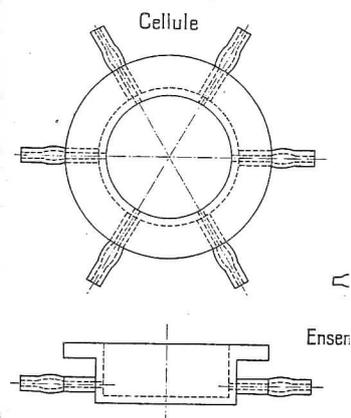


Fig. 1. — Le puits central, rodé, sert à la mesure de l'oxygène ; les puits étroits diamétraux servent au remplissage de la cellule ; le couvercle, sert à certaines interventions.

Il ne doit se trouver aucune mesure et notamment les hameçons et qui servent à tendre le cœur doivent être en verre ; de toute façon nous avons préalablement des expériences conduites en septembre et octobre de 20°C avec des *Rana esculenta* la température maintenue à une température

BULL. SOC. CHIM. BIOL., 1964, 46, n° 5-6.

TECHNIQUES.

par ouverture ventrale [7] et mis sous tension...
 te qu'il reprenne son rythme normal [8]. Ce
 placé dans une solution non phosphatée et non
 blissant une cellule cylindrique spécialement
 et dont le volume est de 5,7 ml (figure 1) ou
 ne plus réduit. Les 6 poids tenseurs de 1 g
 les autres sont appendus au cœur par l'inter-
 montés sur fils de nylon et de telle sorte que
 cellule par des bras latéraux munis de petites
 obturation hermétique à l'aide d'une goutte
 ts). Le couvercle de la cellule comporte deux
 ge obturables à la graisse au silicone et une
 our l'électrode de platine. Celle-ci est du type
] modifiée selon GLEICHMANN et LÜBBERS [10].
 — avec fil de platine de 1,5 mm de diamètre
 des mesures reproductibles de nécessiter une
 a plus forte possible (si avec cette électrode
 une même pO₂ de la solution, le courant de
 p. 100 de la valeur). Les travaux de BÜRGER,
 , POLGER et FORSTER [12] et surtout SEVERIN
 e l'action de la convection — effet d'agitation
 uction de l'oxygène est d'autant plus petite
 on est plus faible et plus épaisse la membrane.
 is trouvé avantageux de réduire le diamètre
 Une telle électrode revêtue d'une membrane
 épaisseur (couche de stabilisation) et d'une
 ement de 12 μ d'épaisseur présente pour un
 l'air un temps de réponse d'environ 4 second
 de convection de 5-6 p. 100 à 20°C ; avec une
 de 12 μ et une membrane de Teflon de 25 μ,
 5 nA et l'effet d'agitation à 3-4 p. 100. Avec
 agitation de la solution de RINGER (à l'aide
 nt les faibles effets thermiques sont dissipés
 thermostatique), est telle que le courant de
 le même que dans le gaz ; d'autre part nous
 ations de la convection par les contractions
 ; les mesures. La tension de la polarisation
 talonnage de l'électrode de platine a été fait
 x dont la composition était déterminée avec
 iz de SCHOLANDER. Pour contrôler l'électrode
 (20,95 p. 100 en volume d'O₂) après avoir
 yen d'une pompe d'aquarium à travers un
 our l'humidifier et le réchauffer ; dans ces
 esurée à 1 mm Hg près (pour les détails

Le calcul de la consommation d'oxygène se fait selon la formule :

$$A = \frac{\alpha}{760} \cdot \Delta pO_2 \cdot V \cdot \frac{10^3}{P}$$

dans laquelle :

- A = consommation d'oxygène en ml /O₂/g/mn.
- α = coefficient de BUNSEN.
- ΔpO₂ = variation de la pression partielle d'oxygène par mn (en mm Hg).
- V = volume du récipient en ml.
- P = poids du cœur essoré en mg.

Comme instruments de mesure on a utilisé en partie le nanoampèremètre de Siemens et en partie le bloc d'alimentation du « Combinanalysator » de la Maison Eschweiler. L'enregistrement a été fait avec l'inscripteur à suiveur de spot « Multiflex MG4 » de la Maison Lange ou avec un montage constitué d'un galvanomètre TS 1 C Sefram et d'un « Photodyne » PH D 8 Sefram.

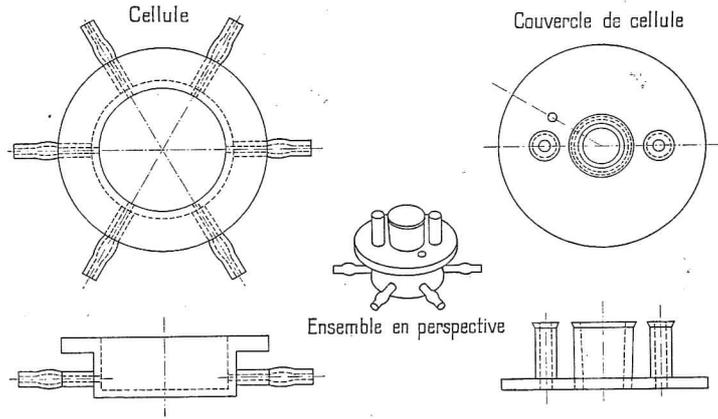


FIG. 1. — Le puits central, rodé, sert à la mise en place de l'électrode ; les puits étroits diamétraux servent au remplissage de la cellule et sont obturés par une graisse de silicone ; le trou sans cheminée, également obturable, sert à certaines interventions sur le cœur.

Il ne doit se trouver aucune matière oxydable dans la cellule de mesure et notamment les hameçons métalliques atenant aux poids et qui servent à tendre le cœur doivent être remplacés par des hameçons en verre ; de toute façon nous recommandons de faire parallèlement ou préalablement des expériences à blanc. Les expériences ont été conduites en septembre et octobre à une température de l'ordre de 20°C avec des *Rana esculenta* provenant d'un terrarium de stabulation maintenu à une température de 14°C.

RÉSULTATS ET DISCUSSION.

Nous ferons état ici des deux types de courbes qui se sont avérées les plus représentatives de nos expériences.

La figure 2 montre l'enregistrement de la chute de pO_2 pour un cœur de poids essoré égal à 73 mg, plongé dans une solution de RINGER saturée d'oxygène par bullage immédiatement avant le remplissage de la cellule. Après une assez forte baisse de la pO_2 au début, on arrive à un régime permanent caractérisé par une courbe strictement linéaire.

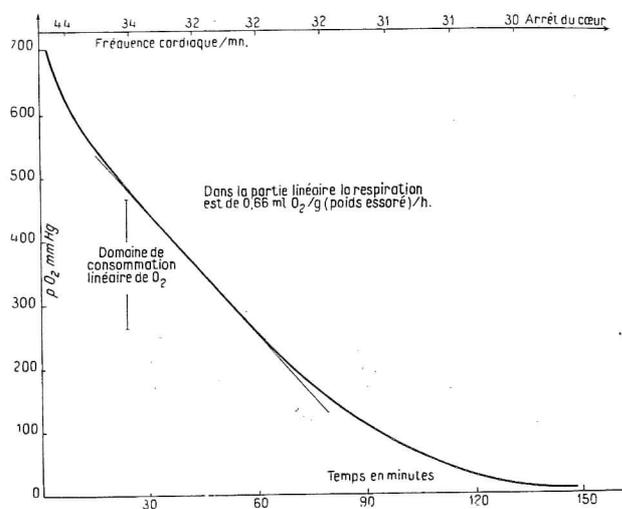


FIG. 2. — Cœur de *Rana esculenta* de 73 mg (poids essoré).

Si la pression d'oxygène tombe à environ 250 mm Hg, la courbe s'écarte de la rectilinéarité et de façon d'autant plus marquée que les pO_2 deviennent plus faibles ; or, pendant la durée de l'expérience, la fréquence du cœur n'a pratiquement pas varié.

La figure 3 montre le ralentissement respiratoire après l'adjonction d'acétylcholine-HCl pour un cœur dont le poids essoré était de 86 mg ; on remarque qu'après l'adjonction asystolisante le développement de la courbe (dont le coefficient angulaire diminue) est rectilinéaire.

Les calculs pour ces courbes ont été conduits de la façon suivante :

Figure 2, consommation de 0,66 ml O_2 /g/h.

Volume du récipient : 3,14 ml.

Poids du cœur : 73 mg.

$$\begin{aligned} \text{Volume corrigé (volume du réci} \\ \alpha(20^\circ\text{C}) &: 3,943 \cdot 10^{-5} \\ \frac{760}{} & \\ \Delta pO_2/h &: 394 \text{ mm Hg } pO_2/h. \\ A &= \frac{3,943 \times 10^{-5} \cdot 394 \cdot 3,08 \times}{73} \end{aligned}$$

Figure 3, consommation de 0,57

Volume du récipient : 5,70 ml.

Poids du cœur : 86 mg.

Volume corrigé : 5,61 (4).

$$\begin{aligned} \alpha(24^\circ\text{C}) &: 3,65 \cdot 10^{-5} \\ \frac{760}{} & \\ \Delta pO_2/h &: 239 \text{ mm Hg } pO_2/h. \\ A &= \frac{3,65 \times 10^{-5} \cdot 239 \cdot 5,61 \times 10}{86} \end{aligned}$$

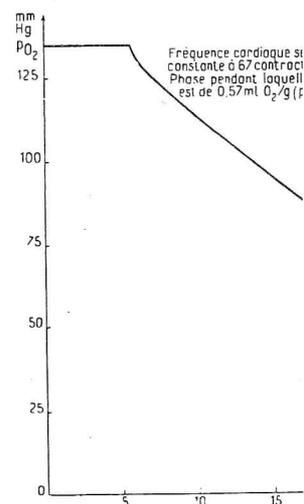


FIG. 3. — Cœur de *Rana esculenta*.

L'exactitude de telles mesures est

1°) du volume du récipient de est petit, plus forte dans l'unité de même consommation d'oxygène ;

2°) de la précision de la mesure comme nous l'avons dit la pO_2] Ainsi avec un coefficient de BUNSEN RINGER à 24°C) pour une variation

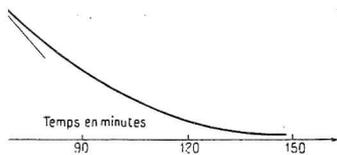
ET DISCUSSION.

types de courbes qui se sont avérées
expériences.

ment de la chute de pO_2 pour un cœur
plongé dans une solution de RINGER
immédiatement avant le remplissage de
baisse de la pO_2 au début, on arrive à
par une courbe strictement linéaire.

32 31 31 30 Arrêt du cœur

linéaire la respiration
 O_2/g (poids essoré)/h.



culenta de 73 mg (poids essoré).

à environ 250 mm Hg, la courbe
façon d'autant plus marquée que les
pendant la durée de l'expérience, la
lent pas varié.

ement respiratoire après l'adjonction
dont le poids essoré était de 86 mg ;
on systolisante le développement de
gulaire diminue) est rectilinéaire.

nt été conduits de la façon suivante :

6 ml $O_2/g/h$.

Volume corrigé (volume du récipient — poids du cœur) : 3,077
 $\alpha(20^\circ C) : 3,943 \cdot 10^{-5}$

$\Delta pO_2/h : 394 \text{ mm Hg } pO_2/h.$

$$A = \frac{3,943 \times 10^{-5} \cdot 394 \cdot 3,08 \times 10^3}{73} = 0,65 \text{ (5) ml } O_2/g/h.$$

Figure 3, consommation de 0,57 ml $O_2 : g/h$.

Volume du récipient : 5,70 ml.

Poids du cœur : 86 mg.

Volume corrigé : 5,61 (4).

$\alpha(24^\circ C) : 3,65 \cdot 10^{-5}$

$\Delta pO_2/h : 239 \text{ mm Hg } pO_2/h.$

$$A = \frac{3,65 \times 10^{-5} \cdot 239 \cdot 5,61 \times 10^3}{86} = 0,56 \text{ (9) ml } O_2/g/h.$$

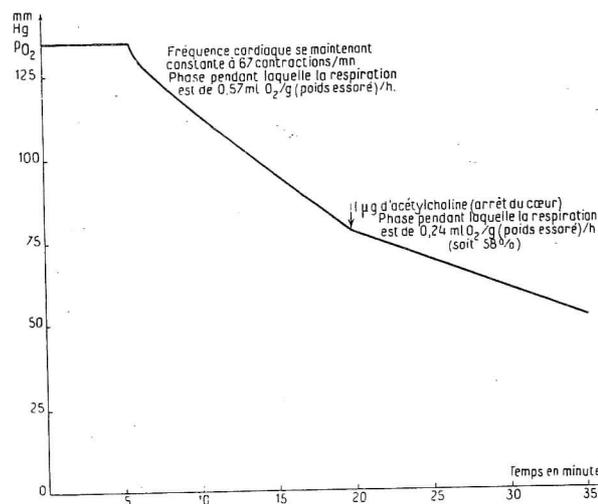


FIG. 3. — Cœur de *Rana esculenta* de 86 mg (poids essoré).

L'exactitude de telles mesures de consommation d'oxygène dépend :
1° du volume du récipient de verre et, évidemment, plus celui-ci est petit, plus forte dans l'unité de temps est la chute de pO_2 pour une même consommation d'oxygène ;

2° de la précision de la mesure de pO_2 ; avec l'électrode utilisée, comme nous l'avons dit la pO_2 peut être mesurée à 1 mm Hg près. Ainsi avec un coefficient de BUNSEN α de 0,02776 (avec la solution de RINGER à $24^\circ C$) pour une variation de pression de 1 mm Hg appré-

ciable encore à 0,02 mm Hg près sur l'échelle de l'instrument de mesure, on a une variation de la quantité d'oxygène dans la cellule de $3,65 \cdot 10^{-5}$ ml O₂, de sorte qu'avec notre technique pour une pO₂ de $2 \cdot 10^{-1}$ mm Hg on peut mesurer jusqu'à :

$$3,65 \times 10^{-5} \cdot 5,7 \cdot 2 \times 10^{-1} = 41,6 \times 10^{-6} \text{ ml} \sim 0,04 \mu\text{l}.$$

Par exemple pour une chute de pression de 6 mm Hg/mn, la quantité d'oxygène utilisé par la préparation cardiaque dans la minute atteint 0,248 μl . Si la chute de pO₂ est constante, la consommation d'oxygène est déterminée à 1 p. 100 près. Nous voudrions attirer l'attention sur ce que le volume du récipient et la température influent considérablement sur la sensibilité. Ainsi avec un récipient de 3,14 ml à $\theta = 20^\circ\text{C}$ ($\alpha = 0,02997$) nous pouvons pousser la sensibilité à 0,02 μl . D'ailleurs avec de nouvelles électrodes multifils plus sensibles encore, la pression critique d'oxygène dans des suspensions de mitochondries a été mesurée et des variations de pO₂ de 0,02 mm Hg sont nettement décelables, ce qui correspond à 37°C pour une cuve de 0,8 ml à une sensibilité de l'ordre de 4×10^{-7} ml O₂ (D. W. LÜBBERS, à paraître).

Nous interprétons le fait que la courbe s'aplatit pour pO₂ < 250 mm Hg malgré des conditions extérieures inchangées en supposant que le ventricule, par suite de son épaisseur, n'est plus suffisamment approvisionné en O₂ et doit par conséquent trouver une partie de son énergie de façon anaérobie, aspect de l'énergétique du cœur de Grenouille qui va dans le sens notamment des résultats antérieurs obtenus par l'un d'entre nous [14, 15]. De fait, si on utilise seulement une solution de RINGER en équilibre avec l'air, la pO₂ est insuffisante et les courbes exprimant la cinétique de captation de l'oxygène ne sont plus rectilinéaires. On peut supposer, étant donné que le cœur n'est pas perfusé, que les méats musculaires de la masse spongieuse ventriculaire présentent une irrigation insuffisante pour assurer une bonne oxygénation quand la pO₂ du liquide physiologique est trop basse.

En ce qui concerne la rectilinéarité de la courbe de cinétique de captation d'oxygène dans le cœur arrêté par l'acétylcholine, il faut considérer que dans ces conditions adynamiques la captation d'oxygène est suffisante pour assurer un métabolisme oxydatif de repos correspondant à la respiration de base du myocarde (cf. [4, 5]).

En conclusion la technique que nous présentons fournit pour la première fois des résultats absolus de consommation d'oxygène par le cœur ouvert en contraction de Grenouille pour une pO₂ > 200-250 mm Hg. Nous attirons d'ailleurs l'attention sur ce que la technique polarographique à électrode sensible et stable décrite ici dans le cas d'un organe entier est susceptible d'être utilisée avec tout système respirant — notamment des suspensions de mitochondries — et elle présente donc une généralité étendue.

RÉSUMÉ

Avec la préparation originale de c une électrode polarographique de p la convection, on a mesuré pour le absolue d'oxygène d'un cœur total.

La technique permet de mesurer d d'oxygène aussi petites que 0,04 μl et de biochimie respiratoire.

SUMMA

With the original frog heart preparat polarographic electrode praticaly inse oxygen consumption of a total heart ha

This technique makes possible a sa of oxygen as low as 0,04 μl and can b ratory biochemistry.

ZUSAMMEN

Mit Hilfe eines ausgebreiteten geöffnc graphischen Platinelcktrode, die prak wurde zum ersten Mal der absolute Sa zens gemessen.

Das Verfahren erlaubt es, auf befri messen, die so klein als 0,04 μl sind, un Atmungsbiochemie benutzt werden.

BIBLIOGR

1. CLARK, A. J., EGGLETON, M. G., EGG P. — The metabolism of the fro. 308 pp.
2. BARBEY, K. — Sauerstoffversorgu Froschherzens in Ruhe. Dissertat
3. ARNDT, H. et LÜBBERS, D. W. — (So
4. RYBAK, B. — C. R. Acad. Sc., 1955,
5. RYBAK, B. — C. R. Acad. Sc., 1956,
6. RYBAK, B. et BOIVINET, P. — C. R. A
7. RYBAK, B. et CORTOT, H. — C. R. S
8. RYBAK, B. — C. R. Acad. Sc., 1960, 2
9. CLARK, L. C. — Amer. Soc. Art. Int
10. GLEICHMANN, U. et LÜBBERS, D. W. — 431.
11. BÜRGER, H., LÜBBERS, D. W. et OCKI 1957, 265, 172.
12. POLGER, G. et FORSTER, R. E. — Pf
13. SEVERINGHAUS, J. W. — Communica
14. RYBAK, B. et TRÉPEAU, J. — C. R. S
15. RYBAK, B. — C. R. Soc. Biol., 1957

près sur l'échelle de l'instrument de la quantité d'oxygène dans la cellule de notre technique pour une pO_2 de jusqu'à :

$$-1 = 41,6 \times 10^{-6} \text{ ml} \sim 0,04 \mu\text{l}.$$

de pression de 6 mm Hg/mm, la quantification de la consommation d'oxygène dans la minute de pO_2 est constante, la consommation est de l'ordre de 100 p.p.m. Nous voudrions attirer l'attention sur la sensibilité de l'appareil. Ainsi avec un récipient de 3,14 ml nous pouvons pousser la sensibilité à 0,02 μl . Les électrodes multifils plus sensibles encore, dans des suspensions de mitochondries de pO_2 de 0,02 mm Hg sont nettement à 37°C pour une cuve de 0,8 ml à une consommation de 100 p.p.m. (D. W. LÜBBERS, à paraître).

La courbe s'aplatit pour $pO_2 < 250$ mm Hg. Les courbes inchangées en supposant que le cœur n'est plus suffisamment approvisionné en énergie. On ne peut pas trouver une partie de son énergie dans les résultats antérieurs obtenus par la technique de LÜBBERS et RYBAK, si on utilise seulement une solution de pO_2 est insuffisante et les courbes de consommation de l'oxygène ne sont plus rectilignes. On a donné un cœur n'est pas perfusé. On a une masse spongieuse ventriculaire prête pour assurer une bonne oxygénation. La technique de LÜBBERS et RYBAK est trop basse.

La linéarité de la courbe de cinétique de consommation d'oxygène par le cœur arrêté par l'acétylcholine, il faut noter que les courbes adynamiques la captation d'oxygène par un métabolisme oxydatif de repos de la base du myocarde (cf. [4, 5]).

Le tableau ci-dessous nous présentons fournit pour la pression de consommation d'oxygène par le cœur de grenouille pour une $pO_2 > 200-250$ mm Hg. On a l'impression sur ce que la technique polarographique est stable décrite ici dans le cas d'un cœur utilisé avec tout système respirant de mitochondries — et elle présente

RÉSUMÉ.

Avec la préparation originale de cœur étalé ouvert de Grenouille et une électrode polarographique de platine pratiquement insensible à la convection, on a mesuré pour la première fois la consommation absolue d'oxygène d'un cœur total.

La technique permet de mesurer de façon satisfaisante des quantités d'oxygène aussi petites que 0,04 μl et peut être utilisée pour toute étude de biochimie respiratoire.

SUMMARY.

With the original frog heart preparation spread out open and a platinum polarographic electrode practically insensitive to convection, the absolute oxygen consumption of a total heart has been measured for the first time.

This technique makes possible a satisfactory measurement of amounts of oxygen as low as 0,04 μl and can be employed for any study of respiratory biochemistry.

ZUSAMMENFASSUNG.

Mit Hilfe eines ausgebreiteten geöffneten Froschherzens und einer polarographischen Platinelektrode, die praktisch konvektionsunempfindlich ist, wurde zum ersten Mal der absolute Sauerstoffverbrauch eines ganzen Herzens gemessen.

Das Verfahren erlaubt es, auf befriedigende Weise Sauerstoffmengen zu messen, die so klein als 0,04 μl sind, und kann für jede Untersuchung in der Atmungsbiochemie benutzt werden.

BIBLIOGRAPHIE.

1. CLARK, A. J., EGGLETON, M. G., EGGLETON, P., GADDIE, R. et STEWART, C. P. — The metabolism of the frog's heart. Oliver and Boyd ed. (1938), 308 pp.
2. BARBEY, K. — Sauerstoffversorgung und Sauerstoffverbrennung des Froschherzens in Ruhe. Dissertation, Kiel (1953).
3. ARNDT, H. et LÜBBERS, D. W. — (Sous presse).
4. RYBAK, B. — *C. R. Acad. Sc.*, 1955, 241, 1411.
5. RYBAK, B. — *C. R. Acad. Sc.*, 1956, 242, 282.
6. RYBAK, B. et BOIVINET, P. — *C. R. Acad. Sc.*, 1959, 249, 2231.
7. RYBAK, B. et CORTOT, H. — *C. R. Soc. Biol.*, 1956, 150, 2216.
8. RYBAK, B. — *C. R. Acad. Sc.*, 1960, 250, 3391.
9. CLARK, L. C. — *Amer. Soc. Art. Int. Org.*, 1956, 2, 41.
10. GLEICHMANN, U. et LÜBBERS, D. W. — *Pflüg. Arch. ges. Physiol.*, 1960, 271, 431.
11. BÜRGER, H., LÜBBERS, D. W. et OCKENGA, T. — *Pflüg. Arch. ges. Physiol.*, 1957, 265, 172.
12. POLGER, G. et FORSTER, R. E. — *Pflüg. Arch. ges. Physiol.*, 1954, 260, 87.
13. SEVERINGHAUS, J. W. — Communication privée.
14. RYBAK, B. et TRÉPEAU, J. — *C. R. Soc. Biol.*, 1957, 151, 101.
15. RYBAK, B. — *C. R. Soc. Biol.*, 1957, 151, 107.