

Vol. LXVI. Fascicule 1.

Février 1958

ARCHIVES INTERNATIONALES
DE
PHYSIOLOGIE
ET DE
BIOCHIMIE

Continuation des
ARCHIVES INTERNATIONALES DE PHYSIOLOGIE
fondées en 1904 par Léon FREDERICQ et PAUL HEGER

PUBLIÉES PAR

HENRI FREDERICQ

Z. M. BACQ et M. FLORKIN

DOSAGE DU CORTISOL
A L'AIDE D'ANHYDRIDE ACÉTIQUE TRITIÉ
ÉTUDE DU RENDEMENT DE L'ACÉTYLATION

PAR

E. DEMEY et W. G. VERLY

(Services de Chimie Médicale et de Clinique Médicale A et Laboratoire des Isotopes
du Service de Pathologie Générale, Université de Liège)

(3 figures)

ABONNEMENTS :

IMPRIMERIE H. VAILLANT-CARMANNE, S.J.A., ÉDITEURS
4, PLACE SAINT-MICHEL, LIÈGE (BELGIQUE)

Titre abrégé pour les citations : *Arch. internat. Physiol. Bioch.*, 1958, 66.

28588

IMPRIMÉ EN BELGIQUE

RECOMMANDATIONS AUX AUTEURS

Les ARCHIVES INTERNATIONALES DE PHYSIOLOGIE ET DE BIOCHIMIE publient, en français ou en anglais, des travaux originaux de caractère expérimental, à l'exclusion de toutes « Revues générales », « Berichte », « Ergebnisse », « Analyses » ou « Referats ».

Titre et rédaction. — Les auteurs choisiront un titre qui donne une idée précise du contenu de leur travail et condenseront leur rédaction de manière à ne dépasser qu'exceptionnellement l'étendue d'une feuille d'impression (16 pages).

Manuscrits dactylographiés. — Nous invitons les auteurs à fournir des manuscrits dactylographiés sous forme *ne varietur*, et dont la rédaction soit *entièrement terminée* (afin d'éviter sur les épreuves les remaniements et les corrections, très onéreux et qui sont à la charge des auteurs).

Résumé. — Chaque article sera suivi d'un court résumé, objectif, pouvant être utilisé directement comme « Analyse » ou « Réferat » par les organisations bibliographiques.

Citations. — Les citations seront réunies à la fin de l'article sous la rubrique « Bibliographie » (Pour les mémoires en langue anglaise, le titre sera « References »). Elles seront classées par ordre alphabétique des noms d'auteurs.

Chaque citation comprendra :

1^o Nom et prénom (ou initiales des prénoms) de l'auteur en PETITES CAPITALES (souligner deux fois dans le manuscrit); 2^o année de publication, entre parenthèses; 3^o titre abrégé du recueil, en italique (souligner une fois dans le manuscrit); 4^o tome, en chiffres arabes, caractères gras (souligner d'un trait ondulé); 5^o première et dernière pages du mémoire en chiffres arabes ordinaires.

Les indications Vol., T., Bd., pag. sont supprimées.

Exemples :

ZWAARDEMAKER, H. (1904). — *Arch. internat. Physiol.*, 1, 1-16.

RITCHIE, J. M. (1954). — *J. of Physiol.*, 124, 605-612.

Pour les livres cités dans la Bibliographie, on indiquera :

1^o nom et initiales des prénoms de l'AUTEUR; 2^o (date de publication); 3^o titre de l'ouvrage; 4^o nom de l'éditeur; 5^o ville.

Dans le texte, le nom de l'auteur (souligner deux fois) et l'année de publication (entre parenthèses) suffisent à renvoyer à la Bibliographie. Si plusieurs travaux du même auteur, publiés la même année, sont cités, l'indication chronologique est donnée par les lettres a, b, c (en italique, souligner une fois), placées après l'indication de l'année.

Exemples :

BREMER, F. (1947, a).

BREMER, F. (1947, b).

Figures. — Leur nombre doit être limité au minimum strictement indispensable à l'intelligence du texte.

Les dessins seront exécutés à l'encre de Chine sur carton bristol blanc, et uniquement en traits, hachures et points, sans « gris » ni « dégradés ».

Les graphiques originaux doivent être tracés en lignes bien blanches sur fond uniformément noir.

Pour les courbes sur papier quadrillé, employer du papier millimétré noir ou rouge si le quadrillé doit apparaître sur la figure définitive; du papier millimétré bleu si le quadrillé doit disparaître.

Ce n'est qu'à titre exceptionnel que les « Archives » peuvent accepter de publier des photographies ou des tracés destinés à être reproduits en similigravure sur cuivre; dans ce cas une entente préalable avec la Direction scientifique est nécessaire.

Les dimensions de toutes les figures seront réduites au minimum. La dimension des clichés sera telle que toutes les figures puissent être intercalées dans le texte.

Il est d'ailleurs conseillé de fournir des figures originales très grandes, destinées à être réduites aux 2/3, à la 1/2, au 1/4, etc. (la réduction ainsi indiquée porte sur les dimensions linéaires). Tenir compte de la réduction prévue dans les dimensions à donner aux chiffres, lettres et signes conventionnels incorporés dans les dessins et graphiques.

Prière de réduire dans la même proportion toutes les figures d'un même mémoire.

Les légendes des figures doivent être fournies dactylographiées, sur feuillets séparés, et non incorporées dans le manuscrit.

Tableaux. — Leur nombre et leurs dimensions seront réduits au minimum indispensable. Ne pas publier deux fois les mêmes données numériques, une fois sous forme de tableaux, une autre fois sous forme de courbes.

Reçu le 10 janvier 1958.

**DOSAGE DU CORTISOL
A L'AIDE D'ANHYDRIDE ACÉTIQUE TRITIÉ
ÉTUDE DU RENDEMENT DE L'ACÉTYLATION**

PAR

E. DEMEY et W. G. VERLY

*(Services de Chimie Médicale et de Clinique Médicale A et Laboratoire des Isotopes
du Service de Pathologie Générale, Université de Liège)*

(3 figures)

Le cortisol réagit avec l'anhydride acétique pour donner le 21-acétate de cortisol. Cette acétylation, si elle est quantitative et réalisée avec un réactif marqué, doit permettre de doser le cortisol : la connaissance de la radioactivité totale du 21-acétate de cortisol et de l'activité spécifique du réactif suffit pour calculer la quantité de cortisol soumise à la réaction. Par ailleurs, la méthode de la dilution isotopique permet d'obtenir une mesure correcte de la radioactivité totale sans qu'il soit nécessaire d'isoler la totalité de l'acétate de cortisol.

Nous avons choisi le tritium pour marquer l'anhydride acétique parce que cet isotope permet d'atteindre des activités spécifiques très élevées et par conséquent confère à la mesure une très grande sensibilité.

Détails expérimentaux

CONDITIONS D'ACÉTYLATION DU CORTISOL

On place dans un tube environ 100 μ g. de cortisol, 0.05 ml. d'anhydride acétique et 0.1 ml. de pyridine. Le tube, scellé sous vide, est laissé 1 heure à la température du laboratoire ; il est alors ouvert et l'anhydride acétique et la pyridine sont distillés sous vide. Le résidu est chromatographié sur papier (benzène : éther de pétrole (5 : 5) saturé de méthanol : eau (7 : 3) — Bush, 1951) et la position des substances réductrices révélée par le bleu de tétrazolium : une seule tache apparaît qui a le

R_f (0.67) du 21-acétate de cortisol ; le cortisol libre (R_f 0.20) a complètement disparu.

Lorsque le temps de contact entre le cortisol et le réactif est prolongé ou que la température est plus élevée, une deuxième puis une troisième taches apparaissent sur le chromatogramme. Ces taches, radioactives lorsque l'anhydride acétique utilisé pour l'acétylation est tritié, sont formées par des substances moins polaires que le 21-acétate de cortisol et qui contiennent vraisemblablement plusieurs groupements acétyle.

SYNTHÈSE DE L'ANHYDRIDE ACÉTIQUE TRITIÉ

Nous suivons la méthode décrite par AVIVI, SIMPSON, TAIT et WHITEHEAD (1954). Après échange à 80° C. et pendant 8 heures entre 0.5 ml. d'eau tritiée ayant une activité spécifique de 1.43 mC. par milliéquivalent hydrogène et 958 mg. d'acide malonique, ce dernier est décarboxylé. L'acide acétique tritié obtenu est transformé en sel sodique. Les appareils utilisés pour cette préparation sont ceux décrits par VERLY (1957).

0.5 ml. d'anhydride acétique ordinaire est marqué par échange d'acétyle en le chauffant à 140° C. pendant 4 heures au contact de l'acétate sodique tritié après que celui-ci ait été complètement déshydraté.

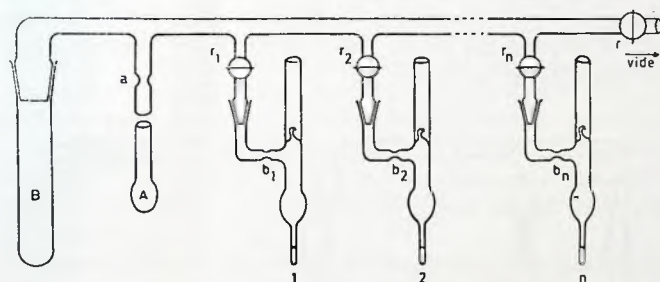


FIG. 1

Le tube A qui contient l'acétate sodique tritié est soudé à l'appareil représenté dans la figure 1. On fait le vide dans l'appareil pendant 1 heure à l'aide d'une pompe mécanique en plaçant le tube A dans un bain d'huile à 140° C. On réadmet de l'air sec et on place 0.5 ml.

d'anhydride acétique ordinaire dans le tube *B*. Ce dernier est plongé dans l'azote liquide. On fait le vide, on ferme le robinet *r*, on enlève *B* de l'azote liquide et on y plonge *A*. Quand tout l'anhydride acétique a distillé, *A* est scellé au niveau de l'étranglement *a*; l'extrémité scellée est étirée en un capillaire recourbé. Le tube *A* est chauffé 4 heures dans une étuve à 140° C.

Quand *A* est refroidi, il est introduit, capillaire en bas, dans le tube *B* plus large. On attache à l'appareil représenté dans la figure 1 les tubes 1, 2, ... *n*, on fait le vide dans tout le système, puis on ferme *r*. Un léger choc permet de briser le capillaire de *A* et le tube gradué 1 est plongé dans la carboglace; le robinet *r*₁ est fermé lorsque 0.05 ml. d'anhydride acétique s'est condensé dans le tube 1. Le tube 2 est alors plongé dans la carboglace tandis que le tube 1 est scellé à l'étranglement *b*₁. Le processus est poursuivi jusqu'à ce que tout l'anhydride acétique tritié soit partagé en fractions de 0.05 ml.

Pour accélérer la distillation de l'anhydride acétique, nous plaçons l'ensemble de l'appareil dans une enceinte maintenue à 70° C. à l'exception du récepteur qui est plongé dans la carboglace ou l'azote liquide.

Pour mesurer la radioactivité de l'anhydride acétique tritié ainsi préparé, nous le faisons réagir avec l' α -naphtylamine. La N- α -naphtylacétamide obtenue après recristallisation dans l'alcool : eau, fond à 158-159° C. (corr.); elle est diluée 1262 fois avec de la N- α -naphtylacétamide non marquée. La radioactivité est mesurée sur l'hydrogène provenant de la réduction de l'eau de combustion du produit dilué suivant la méthode de VERLY, BRICTEUX-GRÉGOIRE, KOCH et ESPREUX (1955). Corrigée pour la dilution, elle est de $1.89 (\pm 0.02) \times 10^7$ désintégrations par seconde par millimole.

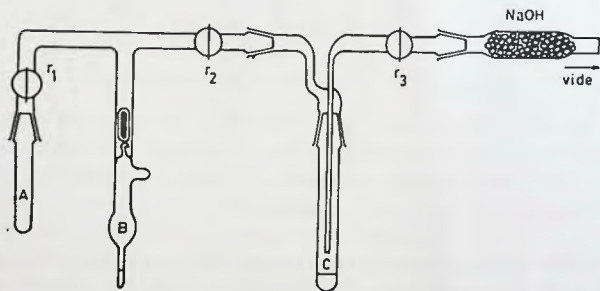


FIG. 2

Le tube *A* contient 80 mg. d' α -naphtylamine (léger excès) ; le tube *B*, qui contient 0.05 ml. d'anhydride acétique tritié, est soudé à l'appareil représenté dans la figure 2 après avoir placé un petit cylindre de fer entouré de verre sur son capillaire fermé (break seal). Après avoir fait le vide, *A* est plongé dans l'azote liquide et le capillaire de *B* est brisé au moyen de la pièce de fer manœuvrée de l'extérieur par un aimant. Lorsque l'anhydride tritié a complètement distillé, r_1 est fermé et le tout est laissé la nuit à la température du laboratoire.

On ajoute alors le piège *C* qui contient 0.6 ml. de NaOH N et un tube qui contient du NaOH en pastilles. *C* est plongé dans l'azote liquide et on fait le vide en aval de r_2 ; on ouvre ensuite r_2 et r_1 . L'acide acétique produit dans la réaction d'acétylation de l' α -naphtylamine par l'anhydride acétique est retenu dans le piège *C* ; r_2 et r_3 sont fermés et *C* est retiré de l'azote liquide ; l'acide acétique tritié est finalement récupéré sous la forme d'acétate sodique.

Le contenu du tube *A* est dissous dans 4 ml. de CH_2Cl_2 . Pour enlever l'excès d' α -naphtylamine, la solution est lavée trois fois avec 4 ml. de HCl 0.1 N, puis deux fois avec 4 ml. de H_2O . Après évaporation du CH_2Cl_2 , le résidu est cristallisé deux fois dans l'éthanol à 20 %. On obtient ainsi 63 mg. de cristaux, soit un rendement de 64 % calculé à partir de l'anhydride acétique, et le produit fond à 158-159° C. (corr.).

ACÉTYLATION DU CORTISOL PAR L'ANHYDRIDE ACÉTIQUE TRITIÉ

1. — *Anhydride acétique tritié vierge*

81.4 μg . de cortisol sont mis en présence de 0.05 ml. d'anhydride acétique tritié vierge et de 0.1 ml. de pyridine ordinaire pendant 1 heure à la température du laboratoire. Après distillation de l'anhydride acétique et de la pyridine, on ajoute au résidu 43.0 mg. de 21-acétate de cortisol non radioactif (« carrier ») et le tout est dissous dans un minimum d'acétone bouillante ; en refroidissant, la solution donne des cristaux qui, après une deuxième cristallisation dans l'acétone, fondent à 222-224° C. (corr.) (221-226° C. (corr.) pour le 21-acétate inactif utilisé pour la dilution).

La radioactivité du produit d'acétylation dilué par le « carrier » est mesurée en couche mince sur un disque en aluminium pourvu de sillons concentriques, dans un compteur sans fenêtre à courant gazeux Tracerlab SC-16. Chaque disque reçoit 195.6 μg . du produit étalé d'une manière aussi constante que possible. L'activité mesurée est corrigée exclusivement pour le background. La moyenne des mesures faites sur 10 disques est de 188 c./min. ($\pm 2.7\%$).

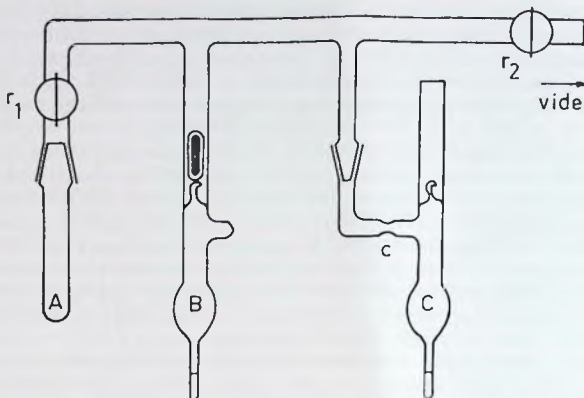


FIG. 3

Le tube *B* qui contient l'anhydride acétique tritié est soudé à l'appareil représenté dans la figure 3. Dans le tube *A*, on met 1 ml. d'une solution éthanolique de cortisol que l'on évapore à sec; on y ajoute 0.1 ml. de pyridine et on attache *A* à l'appareil. *A* est plongé dans la carboglace et on fait le vide; r_2 est fermé et le capillaire de *B* est brisé. Quand l'anhydride acétique tritié a distillé, on ferme r_1 , on enlève *A* de la carboglace et on laisse 1 heure à la température du laboratoire. On ouvre alors r_1 et on plonge *C* dans l'azote liquide; lorsque l'anhydride a distillé en *C*, on scelle à l'étranglement *c*. Le tube *C* contient l'anhydride acétique récupéré et la pyridine.

2. — Anhydride acétique ayant déjà servi

Cet anhydride acétique a été conservé trois mois au contact de la pyridine.

Dans cette expérience, 81.4 $\mu\text{g.}$ de cortisol sont acétylés et on ajoute 47.2 mg. de 21-acétate de cortisol comme « carrier ».

Pour les mesures de radioactivité, 192.5 $\mu\text{g.}$ de produit dilué sont déposés sur chaque disque en aluminium. L'activité par disque, corrigée uniquement pour le background, est de 178 c./min. ($\pm 1.8\%$) (moyenne de 3 séries de mesures sur 10 disques chacune).

MESURE DE L'ACTIVITÉ SPÉCIFIQUE
DE L'ANHYDRIDE ACÉTIQUE TRITIÉ
A L'AIDE DU COMPTEUR SANS FENÊTRE A COURANT GAZEUX

40.7 mg. de cortisol sont traités pendant 5 heures à température ordinaire par 0.05 ml. d'anhydride acétique tritié et 0.2 ml. de pyridine. Après distillation de l'anhydride acétique et de la pyridine, le résidu est recristallisé dans l'acétone. Les cristaux obtenus fondent à 219-224.5° C. (corr.) et un chromatogramme sur papier montre qu'ils contiennent moins de 1 % de cortisol non acétylé et qu'ils ne sont pas contaminés par les substances moins polaires dont l'existence avait été mise en évidence lorsqu'on acétylait pendant le même temps de très petites quantités de cortisol.

Pour les mesures de radioactivité, 195.5 μ g. de cet acétate de cortisol tritié dilué 28.2 fois avec du produit non radioactif, sont mis sur des disques en aluminium et comptés dans le compteur à courant gazeux. La radioactivité par disque est de 3184 c./min. (± 1.2 %) (moyenne de 7 séries de mesures sur 10 disques chacune), résultat corrigé uniquement pour le background. L'activité spécifique de l'anhydride acétique tritié est donc de 1.86×10^8 c./min. par millimole (± 1.2 %).

Discussion

1) La radioactivité de la N- α -naphtylacétamide permet de calculer le rendement de la synthèse de l'anhydride acétique à partir de l'eau tritiée. L'activité spécifique de cette dernière est de 1.43 mC. par milliéquivalent hydrogène. En tenant compte des quantités mises en œuvre, si les échanges entre l'eau tritiée et l'acide malonique d'une part, l'acétate sodique et l'anhydride acétique d'autre part, étaient complets, l'activité spécifique de l'anhydride acétique devrait être 4.4×10^7 dés./sec. par milliéquivalent acétyle. Expérimentalement, nous trouvons 1.89×10^7 dés./sec. milliéquivalent. Le rendement global des deux échanges est de 43 %. Rappelons que Avrami *et al.* (1954) avaient trouvé 53 % et observé que seul le deuxième échange n'était pas complet.

2) Etant donné la lenteur et la difficulté de la méthode, nous ne mesurons pas la radioactivité des acétates de cortisol

par la méthode de VERLY *et al.* (1955). Nous ne disposons pas d'un scintillateur liquide (FARMER et BERSTEIN, 1953; HAYES et GOULD, 1953) qui serait l'instrument idéal pour mesurer la radioactivité de ce produit soluble dans les solvants non polaires. Nous utilisons un compteur sans fenêtre à courant gazeux et, à cause de l'impossibilité de mesurer avec cet appareil la radioactivité d'un dépôt épais d'acétate de cortisol (par exemple un dépôt ayant une épaisseur égale ou supérieure à l'épaisseur infinie de 0.8 mg./cm^2 pour le tritium) (VERLY, BRICTEUX-GRÉGOIRE, KOCH et DEMEY, 1957), nous préparons des dépôts minces sur un support métallique. Ces supports sont des disques en aluminium de 24 mm. de diamètre pourvus de sillons concentriques. Le dépôt d'acétate de cortisol qui pèse 195 $\mu\text{g.}$ environ, est réalisé d'une manière aussi constante que possible; on obtient ainsi un film d'une épaisseur moyenne de $43 \text{ }\mu\text{g./cm}^2$, mais irrégulière puisqu'elle est plus grande au niveau des sillons.

Cette épaisseur du film n'est pas négligeable, car si nous comparons le nombre de coups enregistrés par le compteur à courant gazeux à l'activité absolue du dépôt (mesurée par la chambre à ionisation), nous constatons que le rendement du comptage n'est que de 16 %. On voit que la faiblesse du rayonnement du tritium ne permet pas de négliger l'auto-absorption. On peut en tenir compte de deux manières différentes: ou bien en ne comparant que des dépôts de même épaisseur, ou bien en établissant une table de correction.

Malgré le plus grand soin pour obtenir des dépôts qui soient aussi semblables que possible, nous constatons que, lorsque nous déposons 195 $\mu\text{g.}$ d'acétate de cortisol sur des disques en aluminium, les mesures de radioactivité ont une déviation standard de 10 % (soit une erreur standard de 3 % sur la moyenne des mesures faites sur 10 disques). La grandeur de cette erreur invite à ne pas établir une table de correction pour l'auto-absorption de manière à ne pas additionner les erreurs. Dans ce travail, nous comparons des activités mesurées sur des dépôts de même poids (donc d'épaisseur moyenne à peu près égale) et aussi de la même substance chimique; nous réduisons ainsi au minimum l'erreur expérimentale. Il est très important de ne comparer les activités que de dépôts de la même substance chimique: l'activité spécifique de l'anhydride acétique calculée

à partir d'un dépôt de 195 $\mu\text{g.}$ de N- α -naphtylacétamide est 10 % plus élevée que celle que l'on obtient en se servant d'un dépôt de 195 $\mu\text{g.}$ d'acétate de cortisol ; ceci est dû à ce que les irrégularités des dépôts de naphtylacétamide ne sont pas comparables à celles des dépôts d'acétate de cortisol.

3) Notre problème est de savoir quelle fraction du cortisol est acétylée quand on soumet environ 100 $\mu\text{g.}$ de cette substance à l'anhydride acétique en présence de pyridine, à la température du laboratoire pendant 1 heure.

Dans le cas de l'acétylation de 81.4 $\mu\text{g.}$ de cortisol par l'anhydride acétique tritié vierge, les cristaux isolés sont bien de l'acétate de cortisol (le point de fusion est correct). Bien que l'isolement ne soit pas quantitatif, nous pouvons calculer la quantité d'acétate de cortisol tritié formée au cours de l'acétylation grâce aux 43.0 mg. de 21-acétate de cortisol ordinaire ajoutés comme « carrier » pour diluer l'acétate marqué.

Soient en effet :

x le nombre de millimoles d'acétate formé dans le milieu (inconnue) ;

A son activité spécifique (par millimole) qui est celle de l'anhydride acétique utilisé par l'acétylation (1.86×10^8 c./min. méq.) ;

Y le nombre de millimoles de « carrier » (43.0/404) ;

a l'activité spécifique (par millimole) du produit dilué isolé ;

On a :

$$\text{activité totale} = Ax = a(Y + x)$$

$$\text{d'où} \quad x = \frac{aY}{A - a}$$

Dans le cas présent :

$$aY = \frac{188 \times 404}{0.1956} \times \frac{43}{404} = 4.13 \times 10^4 \text{ c./min. } (\pm 2.7 \%)$$

$$x = \frac{4.13 \times 10^4}{1.86 \times 10^8} = 2.22 \times 10^{-4} \text{ millimole } (\pm 3.9 \%) \quad (1)$$

(1) Nous avons négligé a qui est très petit par rapport à A .

On voit donc que $0.222 \times 362 = 80.4 \mu\text{g.}$ de cortisol ($\pm 3.1 \mu\text{g.}$) ont été acétylés par l'anhydride acétique tritié. Cette quantité n'est pas significativement différente des $81.4 \mu\text{g.}$ soumis à l'acétylation; nous concluons que, dans les conditions utilisées, l'acétylation est essentiellement complète.

Remarquons que la méthode chromatographique que nous avons utilisée pour mettre au point les conditions d'acétylation, permet de prévoir ce résultat. Toutefois, la démonstration ne peut être faite qu'avec des isotopes, car le bleu de tétrazolium ne révèle que les substances réductrices et rien ne permet d'exclure la formation de dérivés non réducteurs dans le milieu réactionnel.

4) Nous venons de prouver que, dans nos conditions expérimentales, le cortisol est quantitativement transformé en 21-acétate, nous pouvons donc utiliser la méthode d'acétylation par l'anhydride acétique marqué pour doser le cortisol. La méthode est vraisemblablement applicable à tous les stéroïdes 21-hydroxylés.

5) Lorsque $81.4 \mu\text{g.}$ de cortisol sont acétylés avec de l'anhydride acétique tritié récupéré et conservé au contact de la pyridine, on observe une radioactivité par disque qui permet de calculer une valeur de x égale à $84.9 (\pm 2.6) \mu\text{g.}$ de cortisol.

On peut tirer deux conclusions de cette observation : a) la totalité du cortisol a été acétylée; b) l'activité spécifique de l'anhydride n'a pas diminué par suite de la conservation. Il n'y a donc pas eu d'échange d'hydrogène entre l'anhydride acétique et la pyridine pendant la conservation et le même échantillon d'anhydride acétique tritié peut être utilisé pour plusieurs mesures de cortisol.

Nous voudrions même attirer l'attention sur le fait que, dans ce cas, la valeur trouvée est un peu trop élevée. Il n'est pas douteux que le fait d'avoir déposé $192.5 \mu\text{g.}$ au lieu de $195.5 \mu\text{g.}$ sur les disques en aluminium utilisés pour la mesure de la radioactivité et de n'avoir pas corrigé pour la différence d'auto-absorption qui en résulte, en est au moins partiellement responsable.

Résumé

1) Nous avons montré, à l'aide de tritium, qu'il est possible de préparer du 21-acétate de cortisol quantitativement à partir d'environ 100 µg. du corticoïde libre.

2) La méthode doit permettre un dosage quantitatif du cortisol dans un mélange complexe. La seule difficulté est la purification du 21-acétate de cortisol.

3) Cette méthode de dosage est vraisemblablement applicable à tous les stéroïdes 21-hydroxylés.

BIBLIOGRAPHIE

- AVIVI, P., SIMPSON, S., TAIT, J. F. et WHITEHEAD, J. K. (1954). — *II Radioisotope Conference, Oxford*, vol. I, 313.
- BUSH, I. E. (1951). — *Biochem. Journ.*, **50**, 370.
- FARMER, E. C. et BERSTEIN, I. A. (1953). — *Science*, **117**, 279.
- HAYES, F. N. et GOULD, R. D. (1953). — *Science*, **117**, 480.
- VERLY, W. G. (1957). — *Publ. Staz. Zool. Napoli*, sous presse.
- VERLY, W. G., BRICTEUX-GRÉGOIRE, S., KOCH, G. et ESPREUX, G. (1955). — *Bull. Soc. Chim. Belg.*, **64**, 491.
- VERLY, W. G., BRICTEUX-GRÉGOIRE, S., KOCH, G. et DEMEY, E. (1957). — Résultats non publiés.
-

EXCERPTA MEDICA

Édités à Amsterdam sous le patronage d'un corps de savants, avec le concours de 7000 professeurs et praticiens de 40 pays différents, les EXCERPTA MEDICA publient, en langue anglaise, un service extensif d'extraits des revues médicales du monde entier.

Le domaine immense de la médecine, théorique et expérimentale, est couvert en 18 sections qui font paraître chacune 12 fascicules mensuels par an.

Chaque section apporte mensuellement, en un tome de 600 à 1800 pages, une documentation unique aux Spécialistes, aux Hôpitaux, aux Facultés, aux Laboratoires.

BUREAU DE TRADUCTIONS

Nous désirons vous rappeler les facilités dont notre Bureau de Traductions dispose pour la traduction rapide soit de publications, soit de textes manuscrits. Vous y trouverez, prêts à vous rendre service, une équipe formée de traducteurs ayant l'expérience de la rédaction et de la terminologie médicales, vous donnant l'assurance d'un travail exact.

Prière de nous envoyer une description de la traduction requise. Vous recevrez un relevé du prix par retour du courrier.

Bureau de traductions :

FONDATION EXCERPTA MEDICA

Kalverstraat, 111, AMSTERDAM (Hollande)

Archives Internationales de Physiologie et de Biochimie

Conditions de la souscription

Les *Archives Internationales de Physiologie et de Biochimie* paraissent par fascicules de 150 à 200 pages, illustrés de nombreuses figures. Quatre fascicules forment un volume.

Le prix du volume 65 (affranchissement compris) est fixé à 500 francs belges. Tarif spécial pour les souscripteurs belges.

On est prié d'adresser tout ce qui concerne la **RÉDACTION** des *Archives* au Prof. Henri FREDERICQ, Place Xavier Neujean, 13^c, Liège (Belgique).

Les abonnements se prennent chez :

MM. VAILLANT-CARMANNE, S. A., Imprimeurs-Éditeurs, 4, Place St-Michel, Liège (Chèques postaux : Bruxelles, 43.274)

et dans toutes les librairies scientifiques importantes.

Les volumes anciens se vendent à la même adresse.

Aucune demande d'abonnement n'est reçue par la Direction scientifique de la Revue.

Les auteurs reçoivent gratuitement 40 tirages à part de leurs travaux. Ils peuvent en obtenir un plus grand nombre à leurs frais.

Prix des tirages supplémentaires (sans remaniement) du tome 65 (minimum 50 exemplaires) brochage compris (francs belges) :

Cahier de 16 pages : 50 ex., 172,— ; 50 ex. suivants, 145,— ; 50 ex. en plus, 116,—

Cahier de 8 pages : 50 ex., 126,— ; 50 ex. suivants, 105,— ; 50 ex. en plus, 86,—

Cahier de 4 pages : 50 ex., 91,— ; 50 ex. suivants, 79,— ; 50 ex. en plus, 67,—

Couverture : fr. 60 par 50 ex. minimum. — Titre spécial, 119 fr.

Les clichés sont offerts aux Auteurs à titre gracieux.