

ACTION ANTAGONISTE DE CERTAINS CATIONS DIVALENTS
SUR UN ENZYME SECRÉTÉ PAR LA MUQUEUSE GASTRIQUE ET
JOUANT UN RÔLE DANS L'HÉMATOPOÏÈSE

par

E. LEDERER ET M. LOURAU

Institut de Biologie Physico-chimique, Paris (France)

L'un de nous a montré qu'un enzyme intervenant dans l'hématopoïèse est, *in vivo*, inhibé par le plomb¹. La présence de cet enzyme dans la muqueuse gastrique, son passage dans la cavité stomacale au moment de la digestion, les particularités de son fonctionnement suggèrent que cet enzyme est identique au facteur intrinsèque de CASTLE² qui fait la synthèse du facteur antipernicieux gastrique à partir d'un substrat commun à beaucoup d'aliments (facteur extrinsèque). De fait, deux substances disparaissent chez les animaux qui reçoivent du plomb: l'une possède les caractères du facteur gastrique, l'autre dérive de la première, se trouve dans le foie et possède les caractères du facteur antipernicieux hépatique³.

Cette inhibition de l'enzyme gastrique par le plomb est réversible; elle peut être levée par l'un ou par l'autre des facteurs antipernicieux. Ceux-ci se comportent donc *in vivo* comme des antagonistes du plomb; sous leur influence, le facteur intrinsèque reprend son activité fonctionnelle et la carence disparaît. Un fait remarquable est qu'il suffit de très petites doses de facteur antipernicieux pour compenser l'effet de doses de plomb bien plus considérables⁴.

D'autre part, la synthèse du facteur antipernicieux ne reprend qu'au moment de la digestion. Lorsqu'un animal à jeun reçoit du facteur antipernicieux par voie orale, il reste carencé comme un animal témoin; après traitement parentéral, la carence ne disparaît qu'après absorption du premier repas. Encore la reprise du processus de synthèse est-elle imparfaite, si la nourriture n'est pas donnée en même temps que l'injection⁴. La synthèse du facteur antipernicieux gastrique exige donc un facteur d'origine alimentaire. Nous retrouvons là un fait que CASTLE² a mis le premier en évidence dans ses belles recherches sur l'anémie de Biermer.

En première approximation, l'antagonisme du plomb et des substances antipernicieuses nous était apparu comme spécifique³. Depuis, nous avons constaté que cette spécificité n'était pas absolue. Dans le présent travail, nous montrons que certains *cations divalents sont également antagonistes du plomb*, qu'ils sont capables de libérer le facteur intrinsèque et de faire disparaître la carence en substances antipernicieuses produite par ce métal.

TECHNIQUES

I. ESSAIS BIOLOGIQUES

Pour le détail des techniques utilisées dans ce travail, nous renvoyons aux mémoires

précédents, en particulier à⁵. Nous rappellerons simplement quelques notions essentielles. L'activité du facteur intrinsèque et ses fluctuations ont une répercussion sur l'hématopoïèse. En particulier, la reprise de son activité est marquée par des phénomènes sanguins caractéristiques, auxquels participent tous les éléments sanguins: érythrocytes, leucocytes, thrombocytes. Les modifications des érythrocytes sont, à notre point de vue, les plus intéressantes, car elles permettent de titrer les substances actives⁵.

Ces modifications consistent en des variations de la *valeur globulaire** analogues à celles qui figurent en I (a, b, c). Le phénomène est généralement diphasique: la première réaction apparaît peu après l'injection, la deuxième 2 à 4 jours plus tard. Toutes deux sont sous la dépendance de la digestion: un animal traité à jeun ne réagit pas (traitement oral) ou réagit seulement après l'absorption du premier repas (traitement parentéral) (fig. 1 d).

Cette réaction sanguine est purement qualitative: l'intensité des variations ne dépend pas de la quantité de substance active administrée. Mais elle obéit à la loi du "tout ou rien", c'est-à-dire qu'on l'obtient toujours, sur tous les animaux, avec la même dose minima active. Cette dose peut donc servir de terme de comparaison et être prise comme unité: nous l'appelons *Unité-Lapin* (U.L.).

Nous attribuons donc une fonction antipernicieuse à toute substance capable de provoquer une réaction sanguine caractéristique chez des lapins préparés avec de l'acétate de plomb selon notre technique habituelle**. Il faut en outre s'assurer que cette réaction correspond à la reprise de la synthèse des substances antipernicieuses, et dépend par conséquent de l'apport d'un facteur alimentaire.

Les substances que nous avons examinées ont été injectées en solution aqueuse, par voie intraveineuse, et sous le volume de 1 ml.

II. ESSAIS CHIMIQUES

Les sels minéraux utilisés dans ce travail étaient, pour la plupart, des sels Prolabo R.P.; les solutions de nickel ont été préparées à partir de nickel métallique obtenu par calcination d'un diméthylglyoxime de nickel précipité à partir d'une solution de NiCl₂ R.P. et recristallisée deux fois. Le chlorure de cobalt R.P. a été recristallisé deux fois avant usage.

Comme nous l'exposons plus loin, les deux cations cobalt et nickel agissent, à de très

* La *valeur globulaire* ou *index colorimétrique* est la teneur d'une hématie en hémoglobine. C'est le rapport:

$$\frac{\text{Hémoglobine}}{\text{Nombre d'hématies}} \text{ par mm}^3 \text{ de sang}$$

Plusieurs notations peuvent être utilisées pour exprimer ce rapport. Nous utilisons la notation clinique où:

$$\text{Valeur Globulaire} = \frac{\text{Hémoglobine (en \% de la valeur arbitrairement choisie comme normale)}}{20 \text{ fois le chiffre d'hématies (en millions) par mm}^3 \text{ de sang}}$$

Nous titrons l'hémoglobine colorimétriquement, après l'avoir transformée en hématine acide. L'étalon (SAHLI) est un verre coloré de la marque Crista (Maison Hawksley, Londres) dont le 100% correspond à une teneur en hémoglobine de 14 g pour 100 ml de sang.

Le plus grand soin doit être apporté à ces lectures ainsi qu'à la numération des hématies. Nous employons un hématimètre de Malassez fabriqué par la Maison Stiassnie, et nous lisons la totalité des rectangles subdivisés de l'hématimètre (soit 25 rectangles ou 500 carrés). Le sang est dilué à 1/500^{ème}.

** Pour préparer les animaux, on donne par voie buccale, à la pipette, un jour sur deux pendant quinze jours, une solution aqueuse d'acétate neutre de plomb. Le titre de la solution est calculé de manière que l'animal reçoive dans chaque prise, et sous un volume de 2 à 3 ml, une dose de 10 mg environ de plomb métallique.

faibles doses, en antagonistes du plomb. Ceci nous a conduits à chercher des réactifs spécifiques permettant d'éliminer quantitativement des traces de cobalt et de nickel. Voici comment nous opérons:

Élimination de traces de sels de nickel. A 3 ml d'une solution aqueuse contenant environ 15 γ de NiCl_2 par ml, on ajoute 1 ml d'une solution alcoolique de diméthylglyoxime à 1%, puis 1 ml d'une solution aqueuse de 4 mg d'acétate de soude. On place le tube à essais contenant ce mélange pendant 3 heures dans un bain-marie à 95–100°. Le lendemain, on épuise la solution par 4 \times 5 cm³ de CHCl_3 pour en enlever la totalité du complexe de Ni formé.

Inactivation de traces de sels de cobalt. A 1 ml d'une solution de 15 γ de CoCl_2 dans l'eau, on ajoute 1 ml d'eau contenant 10 mg de colamine (HOFFMANN-LA ROCHE). On conserve ce mélange pendant au moins 36 heures avant d'en faire l'essai. Le complexe ainsi formé est biologiquement inactif.

RÉSULTATS

En étudiant la stabilité des substances que nous titrons par notre méthode dans des extraits de foie préparés selon⁶, nous avons constaté que l'ébullition à reflux pendant une heure avec de l'acide sulfurique à 1%, entraînait une augmentation d'activité considérable. Normalement, nos extraits contiennent 2000 U.L. de substance active par gramme de foie frais²; après ce traitement acide, l'activité est portée à 20000000 U.L. Des augmentations analogues, quoique moins impressionnantes, ont été observées par BRIGGS et coll.⁷ pour la teneur en acide folique d'extraits de foie et de levure autoclavés à pH 3 ou 4.

En analysant ce phénomène, nous avons été amenés à essayer les cendres des extraits bruts, non hydrolysés. Nous les avons trouvés très actifs, à des doses correspondant à 0.6 γ 10⁻⁴ de foie environ.

Cette activité était évidemment due à des éléments minéraux. Nous avons alors recherché les cations responsables de cette activité. Ont été trouvés inactifs, à des doses variant de 0.2 à 2 mg: Barium, Bismuth, Cadmium, Caesium, Calcium, Cérium, Cuivre, Fer, Lanthane, Magnésium, Manganèse, Or, Rubidium, Scandium, Thallium, Thorium, Uranium et Zirconium.

Ont été trouvés actifs en solution non purifiée, un alun de chrome et les quatre cations suivants: Nickel, Cobalt, Etain, Strontium. L'injection de 1 ml de chlorure de Ni^{++} 10⁻¹⁷ m, ou de chlorure de Co^{++} 10⁻¹⁵ m, a donné une réaction positive (Fig. a, b, c). Le seuil d'activité des autres cations était de l'ordre de 10⁻¹¹ m.

Le nickel étant de beaucoup le plus actif, on pouvait se demander si les autres sels ne devaient pas leur activité à des traces de ce métal. Nous avons pu résoudre cette question en faisant usage de quelques réactifs spécifiques.

En effet, le nickel peut être complètement inactivé en traitant ses solutions, à chaud, par une solution alcoolique de diméthylglyoxime et en épuisant par le chloroforme le complexe ainsi formé.

Le cobalt n'est pas inactivé par ce traitement. Il forme avec le même réactif des complexes hydrosolubles qui ne passent pas dans le chloroforme⁸. Ces complexes conservent leur activité dans notre essai biologique.

Par contre, l'alun de chrome devient complètement inactif: il ne devait donc son activité qu'à des traces de nickel.

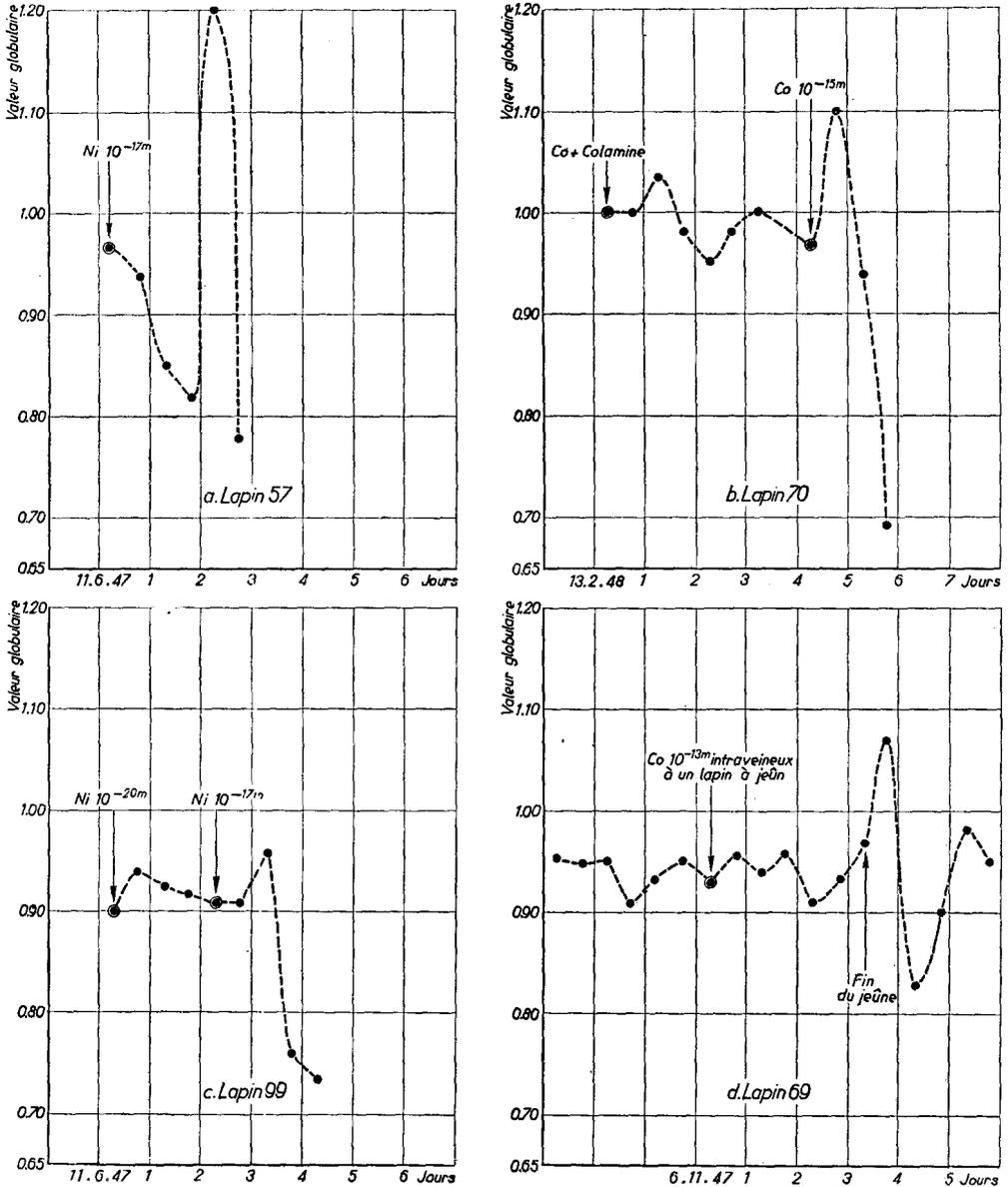


Fig. 1. Variations de la valeur globulaire après injection de chlorure de nickel ou de cobalt à des Lapins dont le facteur intrinsèque a été inhibé par du plomb.

a) injection de 1 ml de $NiCl_2\ 10^{-17}\ m$; réaction positive, très caractéristique, diphasique;
 b) une solution de $CoCl_2\ 10^{-15}\ m$ a été injectée; une première fois après adjonction de colamine: la réaction est négative; une deuxième fois sans adjonction de colamine: la réaction est positive;
 c) deux solutions de $NiCl_2$ ont été injectées: 1 ml d'une solution $10^{-20}\ m$, la réaction est négative; 1 ml d'une solution à $10^{-17}\ m$ donne une réaction positive;
 d) après une période d'observation, dans laquelle la valeur globulaire est restée stable, 1 ml de chlorure de cobalt $10^{-13}\ m$ a été injecté à un Lapin à jeun. Le jeûne a été maintenu pendant trois jours, l'animal ne recevant que de l'eau à discrétion; on n'observe pendant ce temps aucune variation significative de la valeur globulaire. Le quatrième jour, l'animal reçoit de la nourriture, sans qu'il soit fait d'autre injection de cobalt: des variations caractéristiques de la valeur globulaire apparaissent.

D'autre part, en solution très diluée, le cobalt est inactivé par addition d'un excès de colamine (par exemple 10 mg de colamine pour 13 γ de CoCl_2)* (Fig. b). Il se forme un complexe qui, préparé à l'état pur selon⁹, n'a plus d'activité biologique. Un complexe de cobalt avec la nicotinamide est également inactif aux doses de 0.4 mg.

Les solutions de NiCl_2 ne sont pas inactivées par ce traitement. Celles d'étain non plus, mais celles de strontium le sont. Il est donc vraisemblable qu'elles ne doivent leur activité qu'à des traces de cobalt. Notre solution de SnCl_2 a été, par contre, inactivée par un traitement combiné au diméthylglyoxime et à la colamine**.

Deux cations: Ni et Co, sont donc antagonistes du plomb en ce qui concerne les phénomènes envisagés ici. Nous nous sommes naturellement assurés que les réactions hématologiques observées chez nos animaux sont dues à une reprise de l'activité du facteur intrinsèque.

Nous avons d'abord vérifié que les deux métaux n'agissent pas sur l'hématopoïèse lorsqu'ils sont injectés à des animaux maintenus à jeun, chez lesquels le facteur intrinsèque ne peut exercer son activité (Fig. d). Il importait de vérifier ce fait, surtout pour le cobalt dont l'action polycythémique est bien connue (SCHULTZE¹⁰, CAUJOLLE¹¹).

D'autre part, nous avons titré les substances antipernicieuses dans le foie et l'estomac d'animaux carencés par le plomb, puis traités par du nickel ou par du cobalt. Nous avons constaté que ce traitement fait disparaître la carence: les titres des substances antipernicieuses redeviennent normaux au bout de 3 à 5 jours.

Les métaux antagonistes du plomb divalent sont divalents ou capables de l'être. Cet antagonisme est cependant très spécifique, puisque toute une série de métaux bivalents sont inactifs.

Le fait que les complexes de cobalt avec la colamine ou l'acide nicotinique sont biologiquement inactifs, peut expliquer les résultats que nous avons mentionnés au début de ce travail: l'ébullition avec de l'acide sulfurique à 1% ainsi que l'incinération, peuvent détruire des complexes métalliques dans lesquels le métal est inactif et libérer des cations actifs. Dans tous les organes, singulièrement dans le foie, on trouve en effet des traces de Co et de Ni. D'après BERTRAND ET MACHEBOEUF¹², 1 kilo de foie de veau sec contient 0.5 mg de Ni et 0.4 mg de Co. Une partie au moins de ces métaux passe dans les extraits de foie puisque 1 g de poudre sèche d'extrait de foie (ELI LILLY) contient 0.0002 mg de cobalt¹³.

Des *antagonismes spécifiques* de certains métaux ont été signalés à plusieurs reprises; nous n'en citerons que quelques cas. Le cuivre guérit l'intoxication du bétail par le molybdène (FERGUSON, LEWIS ET WATSON^{14***}); il guérit aussi, en partie, l'intoxication du bétail et des rats par le zinc (SMITH ET LARSON¹³). SCHUBERT¹⁵ a signalé récemment que le zirconium déplace le plutonium du foie et des os des rats, et des chiens intoxiqués par ce métal.

D'autre part, on a signalé à plusieurs reprises que certains cations agissent spécifiquement sur différents enzymes. C'est ainsi que par exemple le magnésium de la carboxylase peut être remplacé par Mn, Fe, Co, Cd, Zn et d'autres métaux divalents¹⁶. La

* Nous n'avons pas essayé l'inactivation avec des solutions plus concentrées.

** Les seuils d'activité des solutions de chlorure de Ni et de Co ont fait l'objet de nombreux contrôles. Les résultats ont été concordants. Par contre les solutions d'étain et de strontium traitées par la diméthylglyoxime et la colamine n'ont pas toujours été inactives. Nous attribuons cette discordance à des impuretés introduites au cours des manipulations.

*** Phénomène que viennent d'étudier très récemment J. B. NEILANDS, F. M. STRONG ET C. A. ELVEHJEM, *J. biol. Chem.*, 172 (1948) 431.

phosphomonoestérase alcaline est activée au maximum avec alanine + Mg; d'autres cations divalents (Ca, Fe, Mn, Zn) réactivent l'enzyme à des degrés divers¹⁷.

Une activation par cations divalents a été rapportée le plus souvent pour des peptidases. BERGER ET JOHNSON^{18, 19}, MASCHMANN^{20, 21}, d'autre part, ont montré que le magnésium, le manganèse, le cobalt et le zinc, activent très fortement et à divers degrés les dipeptidases bactériennes. Pour chaque cation, le degré d'activation varie suivant la nature de la peptidase et celle du substrat. SMITH²² ainsi que ROCHE et coll.²³ ont trouvé que le manganèse et le magnésium activent spécifiquement la l-leucine aminopeptidase intestinale, et récemment YUDKIN ET FRUTON²⁴ ont signalé que la déhydropeptidase trouvée dans les reins et le foie, est fortement activée par le zinc et inhibée par le nickel.

Ces travaux ont pour nous un intérêt particulier, car ÅGREN ET WALDENSTRÖM^{25, 26} ont pensé que le *facteur intrinsèque* pouvait être identique à l'aminopeptidase de la muqueuse pylorique. Toutefois, cette affirmation a été contestée par ANDERSEN ET FABER²⁷.

De notre côté, nous avons pensé que l'enzyme inhibé par le plomb pouvait s'apparenter à une *conjugase folique*, enzyme qui hydrolyse les différentes formes conjuguées de l'acide folique et les rend directement utilisables pour l'organisme des vertébrés^{28, 29}. Nous avons communiqué notre suggestion à Mr. LASKOWSKI qui avait purifié la conjugase du pancréas de poulet^{28, 30}. Notre collègue nous a informé que le plomb détruit effectivement l'activité de son ferment purifié, à la concentration de 10^{-5} , mais que cette inhibition n'était pas levée par le cobalt à une concentration de 10^{-3} mol. Le cobalt seul n'active pas la conjugase. Ces essais négatifs de Mr. LASKOWSKI n'infirmant pas complètement notre supposition car les conjugases des divers vertébrés ont des propriétés différentes^{28, 29}.

Un fait intéressant ressort de nos expériences: c'est le rôle éventuel du cobalt comme constituant — ou activant — du facteur intrinsèque. Si ce rôle était confirmé, on saurait par quel mécanisme ce métal intervient dans l'hématopoïèse. Cette intervention est indéniable^{10, 11}. Nous ne parlerons pas ici de la polyglobulie cobaltique dont le mécanisme est encore controversé*, mais des observations qui ont la valeur d'une véritable expérience physiologique, faites en Australie, en Nouvelle Zélande et en Écosse, au sujet d'une maladie qui atteint le bétail de certaines régions côtières, et appelée, suivant le pays: enzootic marasmus, bush sickness, pining or MORTON MAIN'S disease^{10, 11, 35}. L'anémie est l'un des syndromes majeurs de cette maladie. Après avoir éliminé toutes sortes d'hypothèses explicatives, on s'avisa que cette maladie était une maladie de carence. Elle n'apparaît que dans les régions dont le sol est pauvre en cobalt, et il suffit d'ajouter au fourrage de petites quantités de ce métal pour la faire disparaître. On ignore d'ailleurs si le cobalt intervient dans la synthèse de l'hémoglobine ou s'il est nécessaire à la prolifération des cellules sanguines.

Signalons également les observations de GORDON et coll.³⁶ sur l'anémie due à

* POLONOVSKI ET BRISKAS³¹ pensent que la polycythémie cobaltique n'est qu'apparente. Elle résulterait d'une diminution de l'hydrémie. FABRE et coll.³² pensent que le phénomène essentiel est une splénocontraction qui chasse dans la circulation des hématies existantes. ORTEN ET DAVIS^{33, 34} affirment au contraire qu'il s'agit d'une polycythémie vraie, due à une hyperplasie médullaire. Mais celle-ci ne serait qu'une hyperplasie compensatrice, provoquée par une augmentation de l'hémolyse (ORTEN³³) ou par une diminution de la capacité respiratoire des hématies (DAVIS³⁴). Quel qu'en soit le mécanisme, cette hyperglobulie cobaltique n'intervient pas dans nos expériences; aux doses que nous utilisons, le cobalt n'a pas d'action directe sur l'hématopoïèse.

l'ablation de la thyroïde: la thyroxine ne suffirait pas à rétablir l'équilibre sanguin des animaux thyroïdectomisés; il faudrait également lui adjoindre du cobalt. De même, WINTROBE et coll.³⁷ ont trouvé que l'anémie due à des injections de térébenthine peut être empêchée par administration simultanée de cobalt.

Par contre, on n'a jamais signalé que le nickel fût indispensable à l'hématopoïèse¹⁰.

RÉSUMÉ

1. Un enzyme gastrique, possédant les caractères du facteur intrinsèque de CASTLE est inhibé par le plomb. Les substances antipernicieuses se comportent vis-à-vis de cet enzyme comme des antagonistes de ce métal, elles redonnent à l'enzyme inhibé son activité fonctionnelle.

2. Il en est de même de deux cations divalents: le nickel et le cobalt. Leur activité se manifeste pour de très faibles doses.

3. Le facteur intrinsèque aurait ainsi quelque analogie de comportement avec de nombreux enzymes activés par des métaux divalents.

SUMMARY

1. A gastric enzyme having the characteristics of CASTLE's "intrinsic factor" is inhibited by lead. Anti-pernicious substances behave towards this enzyme as antagonists of this metal; they restore to the inhibited enzyme its functional activity.

2. The same is true of two divalent cations, nickel and cobalt. Their activity is manifested at very low concentrations.

3. The "intrinsic factor" therefore is in some sense analogous in behaviour to numerous enzymes activated by divalent metals.

ZUSAMMENFASSUNG

1. Ein Enzym des Magens, das die Charakteristika des "intrinsic factor" von CASTLE hat, wird durch Blei gehemmt. Die antiperniziösen Stoffe verhalten sich gegenüber diesem Enzym wie Antagonisten dieses Metalls: sie geben dem gehemmten Enzym seine funktionelle Aktivität zurück.

2. Die zweiwertigen Kationen, Nickel und Kobalt, sind ebenfalls Antagonisten des Bleis. Ihre Aktivität tritt bereits in sehr kleinen Mengen auf.

3. Der "intrinsic factor" hat also eine gewisse Analogie in seinem Verhalten mit den zahlreichen Enzymen, die durch zweiwertige Metalle aktiviert werden.

BIBLIOGRAPHIE

- ¹ M. LOURAU, *Le Sang*, 17 (1946) 242; *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 29 (1947) 44.
- ² W. B. CASTLE, *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* (1937).
- ³ M. LOURAU, *Le Sang*, 17 (1946) 517; *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 29 (1947) 34.
- ⁴ M. LOURAU, *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 29 (1947) 535.
- ⁵ M. LOURAU, *Le Sang*, 17 (1946) 363.
- ⁶ M. LOURAU, *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 29 (1947) 531.
- ⁷ G. M. BRIGGS Jr., T. D. LUCKEY, C. A. ELVEHJEM ET E. B. HART, *J. Biol. Chem.*, 155 (1944) 687.
- ⁸ H. CHEFTEL, J. BAIL, R. FOUASSON ET P. CLAVIÉ, *Bull. Soc. Chim.* (1947) 311.
- ⁹ H. BRINTZINGER ET B. HESSE, *Z. anorg. Chem.*, 248 (1941) 345.
- ¹⁰ M. O. SCHULTZE, *Physiol. Rev.*, 20 (1940) 37.
- ¹¹ F. CAUJOLLE, *Biochimie du cobalt: Exposés annuels de Biochimie médicale*, 7ème série, 1947, p. 199, Paris Masson éd.
- ¹² G. BERTRAND ET M. MACHEBOEUF, *Bull. Soc. Chim. France*, 37 (1925) 934; 39 (1926) 942.
- ¹³ S. E. SMITH ET E. J. LARSON, *J. Biol. Chem.*, 163 (1946) 29.
- ¹⁴ W. S. FERGUSON, A. H. LEWIS ET S. J. WATSON, *J. Agric. Sci.*, 33 (1943) 44.
- ¹⁵ J. SCHUBERT, *Science*, 105 (1947) 389.
- ¹⁶ D. E. GREEN, D. HERBERT ET V. SUBRAHMANYAN, *J. Biol. Chem.*, 135 (1940) 795.
- ¹⁷ NGUYEN-VAN THOAI, J. ROCHE ET M. ROGER, *Acta Biochim. et Biophys.*, 1 (1947) 61.
- ¹⁸ J. BERGER, M. J. JOHNSON ET W. H. PETERSON, *J. Biol. Chem.*, 124 (1938) 395.
- ¹⁹ J. BERGER ET M. J. JOHNSON, *J. Biol. Chem.*, 130 (1939) 641.

- ²⁰ E. MASCHMANN, *Biochem. Z.*, 302 (1939) 332.
²¹ E. MASCHMANN, *Naturwissenschaften*, 29 (1941) 370.
²² E. L. SMITH, *J. Biol. Chem.*, 163 (1946) 15.
²³ J. ROCHE, NGUYEN-VAN THOAI ET NGUYEN-KIM BAI, *C.R.Soc.Biol.*, 141 (1947) 509.
²⁴ W. H. YUDKIN ET J. S. F. FRUTON, *J. Biol. Chem.*, 170 (1947) 421.
²⁵ G. ÅGREN, *Nature*, 154 (1944) 430.
²⁶ G. ÅGREN ET J. WALDENSTRÖM, *Acta Med. Scand.*, 119 (1944) 167; 128 (1947) 432.
²⁷ J. ANDERSEN ET M. FABER, *Nord. Med.*, 29 (1946) 1379.
²⁸ M. LASKOWSKI, V. MIMS ET P. L. DAY, *J. Biol. Chem.*, 157 (1945) 731.
²⁹ O. O. BIRD, S. B. BENKLEY, E. S. BLOOM, A. D. EMMETT ET J. J. PFIFFNER, *J. Biol. Chem.*, 157 (1945) 413.
³⁰ V. MIMS ET M. LASKOWSKI, *J. Biol. Chem.*, 160 (1945) 493.
³¹ M. POLONOVSKI ET S. BRISKAS, *C. R. Soc. Biol.*, 129 (1938) 379, 493; 130 (1939) 1077, 1588.
³² R. FABRE, C. FRANK, G. ROUGIER ET R. BALLANGER, *C. R. Soc. Biol.*, 141 (1947) 72.
³³ J. M. ORTEN, *Am. J. Physiol.*, 114 (1935-36) 414.
³⁴ J. E. DAVIS, *Am. J. Physiol.*, 129 (1940) 140.
³⁵ W. STILES, *Trace Elements in Plants and Animals*, Cambridge University Press, 1946.
³⁶ A. S. GORDON, P. C. KADOW, G. FINKELSTEIN ET H. A. CHARIPPER, *Am. J. Med. Sci.*, 212 (1946) 385.
³⁷ M. M. WINTROBE, M. GRINSTEIN, J. J. DUBASH, S. R. HUMPREYS, H. ASHENBRUCKER ET W. WORTH, *Blood*, 2 (1947) 323.

Reçu le 30 mars 1948

Note ajoutée le 30 juillet 1948:

Dans une note récente (*Nature*, 162 (1948) 144), LESTER SMITH signale que la Vitamine B₁₂, antipernicieuse, contient 4% de cobalt. Ce fait, combiné avec nos observations, permet d'avancer une hypothèse sur la constitution et la fonction du facteur intrinsèque de CASTLE: cet enzyme aurait un groupement prosthétique contenant du cobalt, et sa fonction serait d'introduire ce métal dans une molécule organique (facteur extrinsèque) destinée à devenir la Vitamine B₁₂.