

## DÉGRADATION DE L'ARGININE PAR LA FLORE MICROBIENNE DE L'INTESTIN DU PORC

### I. — ÉTUDE « IN VITRO »

M.-C. MICHEL

avec la collaboration technique de Simone BOCHE et Geneviève HANNEQUART

*Station de Physiopathologie de la Nutrition  
Centre de Recherches zootechniques, et vétérinaires sur les Ruminants  
63 - Theix, près Clermont-Ferrand  
Institut national de la Recherche agronomique*

---

### SOMMAIRE

La flore microbienne totale du cæcum du porc dégrade rapidement l'arginine *in vitro*. En phase proliférante, en présence de glucose et d'urée, à un pH de 6,5 et un potentiel d'oxydo-réduction de 300 millivolts, l'arginine est dégradée à la fin de la période de croissance des germes. Il apparaît d'abord de l'ornithine, puis de la citrulline et enfin de la putrescine. L'activité des diverses enzymes impliquées dans cette dégradation, mesurée sur les germes en phase stationnaire, est la suivante, exprimée en  $\mu\text{M}/\text{heure}/\text{ml}$  de suspension : arginase 2,85, arginine-désimidase 0,85, ornithine décarboxylase 1, carbamoylphosphate-synthétase 0,15, carbamoylphosphate-transférase 4,6, arginine-décarboxylase 0,25, agmatinase 0,25, uréase 75, enzymes dégradant la putrescine 1,3.

Cette dégradation s'effectue également chez l'animal vivant, et est très élevée dans les cas de diarrhées. L'influence exacte sur le métabolisme de l'hôte reste à préciser.

---

### INTRODUCTION

Les microorganismes qui prolifèrent dans les diverses parties du tractus intestinal possèdent un équipement enzymatique très important. *In vitro*, ils dégradent de nombreuses substances alimentaires, et en particulier tous les acides aminés ; la vitesse de dégradation est particulièrement élevée à l'égard de l'arginine, de la lysine et de la thréonine (MICHEL, 1966).

Dans l'intestin de l'animal vivant, les amines biologiques que l'on peut mettre

en évidence (putrescine, cadavérine, tyramine, amines volatiles, etc.), sont très vraisemblablement produites par les microbes intestinaux ; en effet, l'ingestion d'antibiotiques par l'animal limite leur production (LARSON et HILL, 1960, MICHEL et al., 1964). De plus, on n'en trouve jamais dans l'intestin de l'animal axénique (MICHEL et SACQUET, 1966).

On ne sait pas encore exactement quelle est l'importance de ce catabolisme chez l'animal vivant, et de quelle manière les substances impliquées dans ces réactions agissent sur le métabolisme de l'hôte et, par voie de conséquence, sur sa vitesse de croissance. Il a été démontré en effet que la contamination de tube digestif d'animaux aseptiques par diverses espèces microbiennes provoquait une dépression de la croissance de l'hôte. C'est le cas du poulet monocontaminé par *Clostridium welchii* (LEV et FORBES, 1959), par *Streptococcus faecalis* (HUHTANEN et PENSACK, 1965), par des entérocoques (EYSSSEN et De SOMER, 1965). Il est à remarquer que toutes ces espèces microbiennes présentent une activité catabolique élevée à l'égard des substances azotées.

Parmi les hypothèses émises pour expliquer cet effet dépressif, et qui sont appuyées par un certain nombre de faits expérimentaux, on peut retenir : a) une augmentation de la sécrétion d'azote endogène dans la lumière intestinale, b) une modification, par dégradation microbienne, de la teneur respective des diverses substances provenant de la digestion, par exemple des acides aminés, c) la formation des substances toxiques. Ces divers aspects sont discutés dans les revues de FRANÇOIS (1962), et FRANÇOIS et MICHEL (1968).

La résolution des problèmes posés suppose des informations plus détaillées sur l'activité métabolique (biochimique) de la flore microbienne intestinale. Le but de ce travail est l'étude du catabolisme de l'arginine en présence de la flore intestinale du porc.

## MÉTHODES

### 1. Isolement de la flore intestinale du porc

À l'abattage de l'animal (porcs de 100 kg), le contenu du cæcum est prélevé. On mélange des prises de 100 g effectuées sur 10 animaux. Le volume est amené à 2 litres avec de l'eau distillée. Après filtration sur toile fine, qui élimine la plupart des particules alimentaires, la suspension est conservée à + 4°C jusqu'au moment de l'emploi, 48 heures au maximum.

a) *Pour les essais en phase non proliférante.* — Cette suspension est diluée au 1/5 dans le substrat d'acides aminés et de tampon phosphate (la concentration finale est de M/100 pour les acides aminés et d'environ M/25 pour le tampon de pH 6,6).

b) *Essais en phase proliférante.* — Avec 200 ml de suspension, on inocule le milieu suivant : Glucose 12 g, tryptone Difco 7 g, urée 9 g, L-arginine HCl 2,1 g, PO<sub>4</sub>H<sub>2</sub>K 3,1 g, PO<sub>4</sub>HK<sub>2</sub> 2,7 g, H<sub>2</sub>O q.s. 800 ml. Ce milieu est placé pendant 20 minutes au bain-marie bouillant et refroidi à 38°C avant d'ajouter l'inoculum.

L'incubation est effectuée au bain-marie à 38°C, en flacons bouchés au coton, sous agitation lente. Le CO<sub>2</sub> libéré, provenant de la dégradation du glucose, la forte densité de l'inoculum, assurant d'emblée un potentiel d'oxydo-réduction de l'ordre de — 300 millivolts, identique à celui du contenu intestinal. Des prises de 10 ml sont effectuées toutes les heures. On mesure la densité optique à 570 mμ, après dilution au 1/10 dans l'eau distillée.

Le reste de l'échantillon est placé 10 minutes à 100°C, afin de bloquer l'activité enzymatique. La suspension refroidie est centrifugée et le surnageant conservé à — 20°C jusqu'à l'analyse.

## 2. Les techniques analytiques

Les techniques suivantes ont été utilisées, quant à l'analyse des acides aminés, amides et uréides. On effectue d'abord une séparation chromatographique de l'extrait sur une colonne de résine ; l'effluent obtenu est traité par divers réactifs. Les substances, identifiées d'après leur comportement chromatographique et leurs réactions colorées, sont ensuite ajoutées en surcharge dans les extraits de manière à vérifier l'homogénéité des pics.

La résine employée (carboxylique faible), est la Bio-Rex 70 (Calbiochem). Elle est d'abord amenée sous forme hydrogène, d'après la technique de MOORE et STEIN (1951). On ajuste ensuite le pH de la suspension à 8,6 (mesuré à l'électrode de verre), à l'aide de soude 10 N. Après sédimentation, le liquide surnageant est décanté et remplacé par du tampon citrate 0,5 N pH 6 (un tiers de la hauteur de la résine).

Les colonnes (0,8 × 65 cm) sont remplies de suspension épaisse, par aspiration sous vide. Après sédimentation, la résine est tassée à l'aide d'azote (1 kg/cm<sup>3</sup>) et on laisse s'écouler le surnageant. Après passage de l'échantillon à doser (0,1 à 1 ml), suivant sa teneur, on développe par un gradient de tampon citrate 0,5 N pH 6 à 2 N pH 5 (fiole de 100 ml).

## Formule des tampons

	NaOH	Acide citrique	HCl pur	H <sub>2</sub> O
2 N	80,3 g	96,7 g	75 ml	q.s.p. 1 litre

On ajuste le pH exactement à 5. Le tampon 0,5 N est obtenu en diluant le précédent au 1/4, puis en ajustant le pH à 6 à l'aide de quelques gouttes de soude 10 N. L'effluent (fraction de 0,8 ml) est traité par les réactifs suivants :

1. *réactif de MOORE et SAX* (1965), à la diacétylmonoxime, qui réagit avec le groupement  $\begin{matrix} \text{O} \\ \parallel \\ \text{R}-\text{NH}-\text{C}-\text{NH}_2 \end{matrix}$  (urée, citrulline, etc.) ;
2. *réactif de Rosen* (1961), dans lequel nous avons remplacé le KCN par de l'acide ascorbique : couleur bleue violacée avec les acides aminés et amines (MICHEL, sous presse) ;
3. *réactif de Chinard*, d'après RATNER (1962), spécifique de l'ornithine (seule la lysine donne une très faible coloration) ;
5. *réactif de Sakaguchi*, d'après SATAKE (1958), qui réagit avec le groupement guanidique ;
5. *réactif de Nessler*, d'après MICHEL (1961 a). L'ammoniac donne une coloration jaune et les diamines un précipité blanc.

L'ordre de sortie des substances étudiées (mesuré par le nombre de fractions de 0,8 ml) est le suivant : urée 30, citrulline 40, ornithine 85, arginine 100, NH<sub>3</sub>, 160, cadavérine 275, agmatine 330.

## RÉSULTATS ET DISCUSSION

## 1. Dégradation de l'arginine par la flore en phase proliférante

Avec le milieu utilisé, et une densité d'inoculum élevée, la croissance des germes est très rapide (la phase exponentielle dure à peine deux heures). Pendant ce temps, le glucose et l'urée sont dégradés à la même vitesse, ce qui fait que le pH du milieu reste au voisinage de la neutralité ( $6,5 \pm 0,4$ ) (fig. 1). La dégradation de l'arginine ne commence qu'à la fin de la période de croissance des germes, au début de la phase d'autolyse. Au cours de cette dégradation, on observe l'apparition d'une quantité importante d'ornithine, puis un peu avant que toute l'arginine ait été dégradée, la formation de putrescine. De la citrulline se forme en même temps que l'ornithine, mais en quantité beaucoup plus faible. La somme — en micromoles — de l'arginine et de ses métabolites est constante, ce qui prouve que, aux erreurs d'expérience près, il ne se produit pas d'autres réactions que celles mises en évidence, ou bien que certains intermédiaires ont une durée de vie trop courte pour être mis en évidence.

Dans ces essais, le CO<sub>2</sub> et le NH<sub>3</sub> n'ont pas été mesurés, étant donné la valeur élevée de l'endogène. En effet, on ne peut mesurer avec précision ces deux substances, qui pourraient provenir de la dégradation de l'arginine, puisque les quantités produites à partir du glucose et de l'urée sont beaucoup plus importantes.

Ces résultats appellent divers commentaires, quant à la nature des réactions enzymatiques impliquées dans cette dégradation.

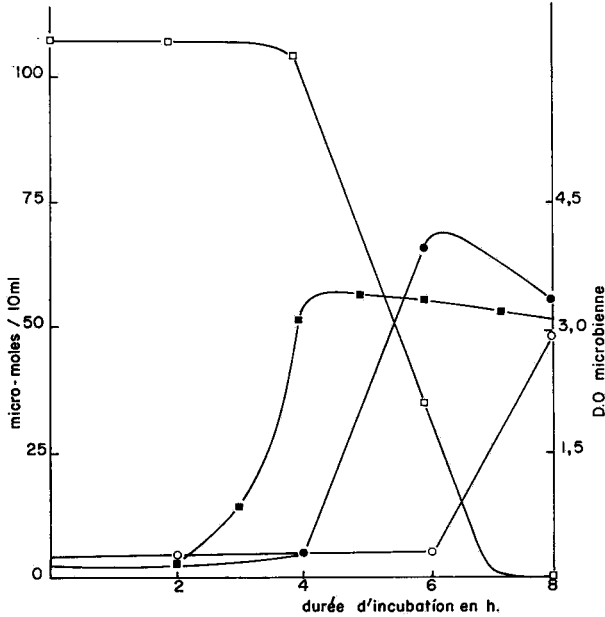
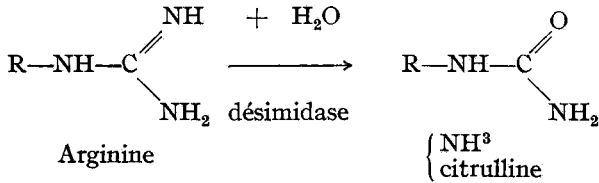


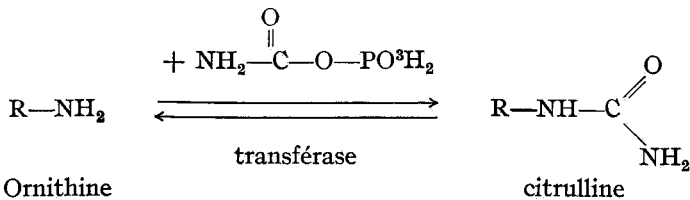
FIG. 1. — Métabolisme de l'arginine par la flore du cæcum de porc. Essai in vitro, en phase proliférante  
 □ Arginine ■ Densité optique microbienne ● Ornithine ○ Putrescine

a) *En ce qui concerne la citrulline.* — On sait que celle-ci peut être formée de deux manières différentes :

1. soit par l'arginine désimidase (voir la revue de ROCHE, 1960) ;



2. soit à partir de l'ornithine, par la carbamoylphosphate-transférase, l'équilibre de la réaction étant en faveur de la citrulline (KNIVETT, 1960), (COHEN, 1962).



L'action de cet enzyme suppose la formation préalable de carbamoylphosphate (CAP). Celui-ci peut être synthétisé soit par voie enzymatique, par la carbamoylphosphate-synthétase, à partir du carbamate et de  $\text{NH}_3$ , soit par voie non enzymatique, par addition de quantités équimoléculaires de cyanate et de phosphate (JONES *et al.*, 1955).

b) *En ce qui concerne l'ornithine.* — Celle-ci peut résulter de la phosphorolyse de la citrulline, réaction inverse de la précédente, ou bien de l'action de l'arginase, qui produit de l'urée et de l'ornithine à partir de l'arginine.

c) *Cas de l'agmatine.* — La décarboxylation directe de l'arginine, avec formation équimoléculaire d'agmatine et de  $\text{CO}_2$ , est produite *in vitro* par diverses souches microbiennes (GALE, 1946). Un grand nombre de celles-ci, en particulier des entérobactéries, sont représentées dans l'intestin. Or, avec des cultures complexes, nous n'avons que très rarement obtenu cette amine, et dans ces cas, en très faible quantité. L'observation suivante peut rendre compte de ces faits : 14 souches d'*Escherichia coli*, fraîchement isolées de l'intestin du porc, dégradaient l'arginine avec formation équimoléculaire de putrescine et d'urée. Après un an de conservation sur des milieux classiques, ces souches ne produisaient plus que de l'agmatine. Sur des souches de collection, nous avons obtenu des résultats voisins ; une d'entre elles, *Escherichia coli*, « ATCC n° 11 776 » provoquait la formation de 90 p. 100 d'agmatine et d'environ 10 p. 100 de putrescine et d'urée. On peut supposer que l'agmatinase, laquelle dégrade l'agmatine en urée et putrescine, est une enzyme adaptative, ou que sa synthèse ne s'effectue plus dans les conditions de culture des milieux classiques, alors qu'elle est possible dans le milieu intestinal. Il est à noter que les propriétés des germes peuvent être différentes *in vitro* et *in vivo*, ainsi que l'ont montré DUCLUZEAU *et al.* (1966), dans le cas de l'uréase de *Proteus morgani*.

## 2. Dégradation de l'arginine par la flore en phase stationnaire

Afin de préciser la nature de cette dégradation, ainsi que le sens des réactions, la dégradation de l'arginine a été effectuée avec les germes en phase stationnaire, sans incubation préalable avec le milieu glucose-urée : l'addition de carbamoylphosphate au milieu réactionnel a été effectuée dans le but de mettre en évidence une activité transférasique possible (tabl. 1).

Les résultats obtenus permettent de calculer l'activité des divers enzymes impliqués dans la dégradation de l'arginine et de ses métabolites (tabl. 2), ainsi que de tracer le schéma global de réaction (fig. 1).

Les réactions principales sont les suivantes : arginine  $\rightarrow$  ornithine  $\rightarrow$  putrescine. L'urée formée au cours de la première réaction est dégradée dès son apparition, étant donné l'activité uréasique élevée de la flore. La formation de citrulline est plus rapide à partir de l'arginine qu'à partir de l'ornithine, ce qui implique une certaine activité désimidasiq. La carbamoylphosphate-transférase, dont l'activité est élevée, ne peut synthétiser que peu de citrulline à partir de l'ornithine, à cause de la faible activité de la carbamoylphosphate-synthétase.

Quant à la voie de l'agmatine, que nous avons mise en évidence de manière indirecte, il est difficile d'apprécier son importance relative, les produits finaux de ce catabolisme ( $\text{CO}_2$ ,  $\text{NH}_3$  et putrescine) étant communs à plusieurs réactions.

TABLEAU I

*Dégradation de l'arginine et de ses métabolites par la flore en phase stationnaire moyenne sur 30 animaux*

Substrat	$\mu\text{M}$ dégradées par heure par ml (1)	Substances apprues	$\mu\text{M}/\text{heure}/\text{ml}$
Arginine	4,2	Ornithine Citrulline Putrescine $\text{NH}_3$	2,7 1 0,5 6,3
Arginine + CAP (2)	4,2	Ornithine Citrulline Putrescine $\text{NH}_3$	1 3,1 0,1 5,2
Ornithine	1,2	Citrulline Putrescine $\text{NH}_3$	0,15 1 0
Ornithine + CAP	4,7	Citrulline Putrescine $\text{NH}_3$	4,6 0,1 0
Citrulline	0,5	Putrescine $\text{NH}_3$	0,5 1,1
Urée	75		
Putrescine	0,75	$\text{NH}_3$	1,4
Agmatine	0,25	Putrescine $\text{NH}_3$	0,25 0,45

(1) Calculé en rapportant l'activité à la concentration initiale de la flore ( $\neq$  6 g de poids sec/litre).

(2) Obtenu en ajoutant au milieu, du cyanate de potassium qui réagit avec le phosphate du milieu pour fournir du carbamoylphosphate.

TABLEAU 2

*Activité des divers enzymes impliqués dans la dégradation de l'arginine (1)*  
(micromoles de substrats dégradées par heure par ml de suspension à la concentration initiale)

Arginase.....	2,85
Arginine-désimidase .....	0,85
Ornithine-décarboxylase .....	1
Carbamoylphosphate-Synthétase .....	0,15
Carbamoylphosphate-transférase .....	4,6
Arginine-décarboxylase .....	0,25
Agmatinase .....	0,25
Uréase .....	75
Enzyme dégradant la putrescine .....	1,3

(1) Ces valeurs ont été calculées d'après les résultats du tableau 1.

En ce qui concerne la nature des germes présents dans la flore complexe et susceptibles d'exercer ces actions cataboliques, nous avons démontré précédemment que les lactobacilles homofermentaires, qui sont généralement dominants, étaient sans action. En revanche, divers lactobacilles et streptocoques exerçaient une activité catabolique élevée (mesurée par le dégagement d'ammoniac). Les entérobactéries avaient une activité faible (MICHEL, 1961). Il semble donc que les streptocoques, présents en quantité élevée, soient responsables de la majeure partie de la dégradation de l'arginine. En effet, les travaux d'AKASI (1959), de GALE (1946), ont montré que ces germes dégradaient l'arginine avec formation d'ornithine et de putrescine. L'étude de KNIVETT (1960), sur la désimination totale de l'arginine en deux étapes, aboutit aux mêmes résultats. Les *Clostridia*, qui possèdent une activité catabolique élevée (NISMAN et THOUVENAT, 1948 ; SCHMIDT *et al.*, 1952) pourraient jouer

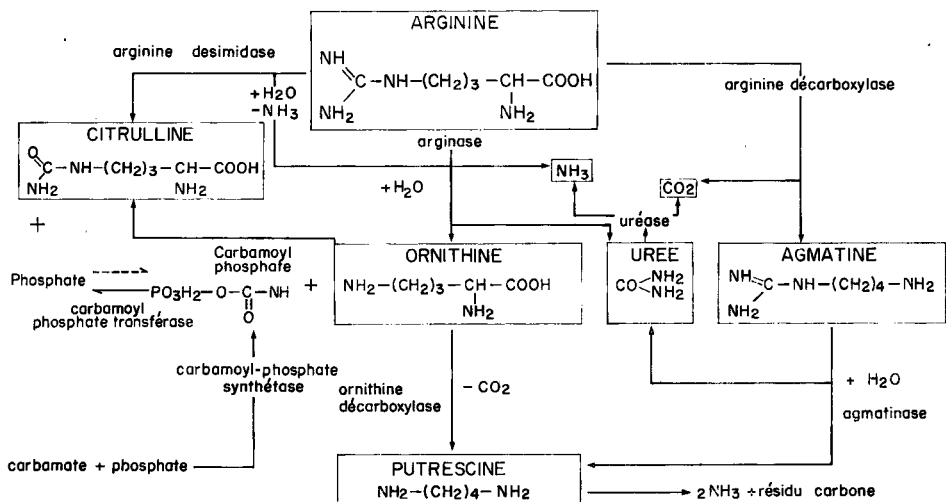


FIG. 2. — Schéma de dégradation de l'arginine par la flore microbienne de l'intestin du porc (essais *in vitro*)

un rôle si leur nombre était suffisamment élevé, ce qui n'est généralement pas le cas chez le Porc. En ce qui concerne les entérobactéries, la faible quantité relative de ces germes rend douteuse une activité catabolique importante ; les travaux de RAIBAUD (1958) ont montré que, dans l'intestin du porc, leur nombre était d'environ  $10^7$  par g de contenu, ce qui représente environ 100 mg de poids sec par litre. De ce fait, les résultats d'essais *in vitro* effectués avec des germes traités par l'acétone, ou des préparations cellulaires, à de fortes concentrations (TAYLOR et GALE, 1945), ne peuvent être comparés qu'avec précaution à l'activité de microbes vivants dans des conditions physiologiques.

Nous n'avons jamais pu mettre en évidence de dégradation oxydative. Dans le cas de la désamination, celle-ci conduit à l'oxo-arginine et est produite par *Proteus vulgaris* (STRUMPF et GREEN, 1944). La décarboxylation, qui produit de la guanido-butylamide, est provoquée par *Streptomyces griseus* (THOAI *et al.*, 1956).

En conclusion, le cycle de dégradation de l'arginine par la flore microbienne de l'intestin du porc comprend deux parties. La première, qui met en jeu des hydrolases

conduit à des substances (ornithine et citrulline) qui ne sont pas toxiques, et peuvent rentrer dans le cycle hépatique de l'urée. Celles-ci exercent un rôle protecteur dans l'intoxication ammoniacale (CHIOSA, 1965). En revanche, la deuxième partie comprend l'action des décarboxylases et d'enzymes dégradant la putrescine, lesquels conduisent à des substances non dénuées d'activité physiologique (agmatine, putrescine,  $\text{NH}_3$ ). La part respective de ces divers mécanismes dépend pour une large part de l'état physiologique et du régime alimentaire du sujet, ainsi que l'ont montré des études qualitatives de LARSON et HILL (1960), et de MICHEL *et al.*, (1964), sur le porcelet. Chez le Veau, des mesures quantitatives ont montré que l'excrétion fécale de putrescine était très faible à l'état normal (0,5 p. 100 de l'arginine ingérée), mais pouvait atteindre 35 p. 100 de l'ingéré dans les cas de diarrhée (MICHEL et MATHIEU, sous presse).

Ce catabolisme peut exercer un rôle défavorable sur l'hôte par les voies suivantes :

- a) diminution de la quantité d'arginine effectivement absorbée par l'intestin ;
- b) effet de substances toxiques (amines,  $\text{NH}_3$ , etc.) ;
- c) effet tissulaire direct des enzymes impliqués dans cette dégradation (uréase en particulier).

Ces deux dernières hypothèses sont appuyées en particulier par les travaux de MCDERMOTT (1966) ; cet auteur a mis en évidence le rôle toxique de l'ammoniac formé par l'action de l'uréase sur l'urée présente dans le gros intestin d'individus cirrhotiques ou porteurs d'anastomoses porte-cave. VISEK (1965) considère que les enzymes microbiens peuvent être nuisibles à l'hôte par leur action immunologique sur la muqueuse intestinale, d'où il résulte une augmentation de la dépense endogène. Nos propres travaux soutiennent les mêmes conclusions, étant donné que les substances susceptibles d'inhiber l'activité enzymatique microbienne possèdent corrélativement la propriété de stimuler la croissance animale (MICHEL et FRANÇOIS, 1955).

*Reçu pour publication en février 1968.*

## SUMMARY

### DEGRADATION OF ARGININE BY THE MICROBIAL FLORA OF THE INTESTINE OF THE PIG.

#### I. STUDY « IN VITRO »

The object of the study was to estimate *in vitro* the course of degradation of arginine by the intestinal flora of the pig.

The total microbial flora from the cæcum of the pig was isolated, immediately after the pig had been killed, by dilution and elimination of food particles by filtration. This suspension actively degraded arginine in conditions close to those in the medium of the intestine (pH 6.5, Eh 300 mV, temperature 38°C, concentration of bacteria, etc.).

The resultant metabolites were estimated quantitatively after separation by chromatography on ion-exchange resin. The activity of the different enzymes concerned in this degradation, expressed in micromoles per hour per ml suspension at the initial concentration were as follows : arginase 2.85 (arginine → urea + ornithine), arginine deimidase 0.85 (arginine → citrulline +  $\text{NH}_3$ ), ornithine decarboxylase 1.00 (ornithine → putrescine +  $\text{CO}_2$ ), carbamoylphosphate synthetase 0.15 (carbamate +  $\text{CO}_2$  + phosphate → carbamoylphosphate), arginine decarboxylase 0.25 (arginine → agmatine +  $\text{CO}_2$ ), agmatinase 0.25 (agmatine → urea + putrescine) and enzymes degrading putrescine 1.3.

*In vivo* this degradation follows the same pattern and is seen to a great degree in the case of



diarrhoea. The bacteria capable of bringing about these reactions, heterofermentative lactobacilli, streptococci, enterobacteriae, clostridia, etc., occur widely in the intestine.

Different experiments allow the suggestion that these reactions could have an unfavourable effect on the host by the following mechanisms.

- a) Reduction of the biological value of the diet as regards the amino acids.
- b) Immunological effect on the intestinal mucosa by the enzymes involved in the reactions (particularly urease), and increase in endogenous loss.
- c) Toxic effects of the metabolites formed (amines and  $\text{NH}_3$ ).

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- AKASI, 1939. *Acta Schol. Med. Univ. Imp. Kiota*, **22**, 433. (Cité par GUGGENHEIM, 1951).
- CHIOSA L., NICULESCU V., BONCIOCAT C., STANCU C., 1965. The protective action of N-acetyl and N-carbamyl derivatives of glutamic and aspartic acids against ammonia intoxication. *Biochem. Pharmacol.*, **14**, 1635-1643.
- COHEN P. P., MARSHALL M., 1962. Carbamyl group transfer in : BOYER P. D., LARDY H., MYRBACK K. « *The Enzymes* » 2nd ed., **6**, 327-338. Academic Press, New York, London.
- DUCLUZEAU R., RAIBAUD P., DICKINSON A. B., SACQUET E., MOCQUOT G., 1966. Hydrolyse de l'urée *in vitro* et *in vivo*, dans le cæcum de rats gnotobiotiques, par différentes souches bactériennes isolées du tube digestif de rats conventionnels. *C. R. Acad. Sci.*, **262**, 944-947.
- EYSSEN H., SOMER P. de, 1965. Studies on gnotobiotic chicks : effects of controlled intestinal flora's on growth and nutrient absorption. *Ernährungsforschung*, **10**, 264-273.
- FRANÇOIS A.-C., 1962. Mode of action of antibiotics on growth. *World Review of Nutrition and Dietetics. Pitman Medical Publication*, **3**, 1-64.
- FRANÇOIS A.-C., MICHEL M. C., Mode d'action des antibiotiques sur la croissance in « *Antibiotiques en Agriculture* ». *C. R. 5<sup>e</sup> Coll. Groupe europ. Nutr.*, Jouy-en-Josas 1966. (Karger, Basel/New York, 1968). *Nutritio et Dieta*. **10**, 35-39.
- GALE E. F., 1956. The bacterial aminoacid-decarboxylases. *Advances in Enzymology.*, **6**, 1-32.
- GUGGENHEIM M. *Die biogenen Amine und ihre Bedeutung für die Physiologie und Pathologie des tierischen und tierischen Stoffwechsels*, 4. Aufl. (Karger, Basel/New York, 1951).
- HUHTANEN C. N., PENSACK S. M., 1965. The role of *Streptococcus faecalis* in the antibiotic growth effect in chickens. *Poultry Sci.*, **44**, 830-834.
- JONES M. G., SPECTOR L., LIPMANN F., 1955. Carbamyl-phosphate, the carbamyl donor in enzymatic citrulline synthesis. *Amer. chem. Soc.*, **77**, 819-820.
- KNIVETT V. A., 1960. Biochimie comparée des acides aminés basiques. *Colloque intern. Cent. nat. Rech. Sci.*, **XCII**, 243-260.
- LARSON N. L., HILL E. G., 1960. Amine formation and metabolic activity of microorganisms in the ileum of young swine fed chlortetracycline. *J. Bact.*, **80**, 188-192.
- LEV M., FORBES M., 1959. Growth response to dietary penicillin of germ-free chicks and of chicks with a defined intestinal flora. *Brit. J. Nutr.*, **13**, 78-84.
- MC DERMOTT W. V., 1966. Treatment of ammonia intoxication by exclusion of the colon. *Gastroenterology*, **51**, 721-723.
- MICHEL M.-C., FRANÇOIS A.-C., 1955. Relation entre l'influence des antibiotiques sur la croissance du porc et l'inhibition des désaminases de la flore intestinale. *C. R. Acad. Sci.*, **240**, 808-810.
- MICHEL M.-C., 1961 a. Application de la méthode de Nessler au microdosage de l'azote alpha-aminé en milieu biologique. *Ann. Biol. anim. Bioch. Biophys.*, **1**, 449-456.
- MICHEL M.-C., 1961 b. Activité métabolique de la flore totale isolée de l'intestin du Porc. Rôle des différentes espèces microbiennes. *Ann. Biol. anim. Bioch. Biophys.*, **1**, 16-28.
- MICHEL M.-C., JOUANDET C., SALMON-LEGAGNEUR E., AUMAITRE A., FRANÇOIS A. C., 1964. Influence de l'acrylate de sodium sur la croissance du porcelet. *Ann. Zootech.*, **13**, 341-350.
- MICHEL M.-C., SACQUET E., 1966. Aminosäuren und deren Abbauprodukte im Darminhalt keimfreier und konventioneller Ratten. *Ernährungsforschung*. **11**, 69-72.
- MICHEL M.-C., 1966. Métabolisme de la flore intestinale du porc. Dégradation des formes L et D des acides aminés. *Ann. Biol. anim. Bioch. Biophys.*, **6**, 33-46.
- MICHEL M.-C., MATHIEU C. M. Métabolisme de l'azote et diarrhées chez le Veau préruminant (sous presse).
- MOORE J.-J., SAX S. M., 1965. A revised automated procedure for urea nitrogen. *Clin. Chim. Acta*, **11**, 475-476.
- MOORE S., STEIN W. H., 1951. Chromatography of amino acids on sulfonated polystyrene resins. *J. Biol. Chem.*, **192**, 663.

- NISMAN B., THOUVENOT M., 1948. Étude du métabolisme des acides aminés chez les bactéries anaérobies du groupe Cl sporogènes. *Ann. Inst. Pasteur*, **75**, 310-319.
- RAIBAUD P., 1958. Travaux de la Commission des antibiotiques du C. N. E. R. N. A., *Ann. Nutr. Alim.*, **12**, 135-150.
- RATNER S., 1962. Transaminase in COLWICK S. P., KAPLAN N. O., *Methods in Enzymology V*, 843-848. Academic Press, New York, London.
- ROCHE J., 1960. Biochimie comparée des acides aminés basiques. *Colloque intern Cent. nat. Rech. Sci., XCII*, 221-241.
- ROSEN H., BERARD C. W., LEVENSON S. M., 1962. A simplified procedure for automatic amino acid analysis. *Analyt. Biochem.*, **4**, 213-221.
- SATAKE K., MURRAY-LUCK J., 1958. The spectrophotometric determination of arginine by the Sakaguchi reaction. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **40**, 1743-1756.
- SCHMIDT G. C., LOGAN M. A., TYTELL A. A., 1952. The degradation of arginine by *Clostridium perfringens*. *J. Biol. Chem.*, **198**, 771-783.
- STUMPF P. K., GREEN D. E., 1944. L-aminoacid oxydase of *Proteus vulgaris* × 19. *J. Biol. Chzm.*, **153**, 387.
- TAYLOR E. S., GALE E. F., 1945. *Biochem. J.* **39**, 52.
- THOAI N. V. et al., 1956. Sur la présence de nombreux dérivés carbamoylés et guanidiques dans les urines et leur signification biologique. *C. R. Soc. Biol.*, **150**, 2160-2164.
- VISEK W. J., 1965. Enzyme immunity in nutrition. *Nutr. Rev.*, **23**, 257-260.
-