

ACTION DES ENZYMES BACTÉRIOLYTIQUES, AUTRES QUE LE LYSOZYME, SUR LE PEPTIDOGLYCANE DES PAROIS CELLULAIRES BACTÉRIENNES

PAR

Jean-Marie GHUYSEN *, Jean-François PETIT **, Emilio MUÑOZ ***,
Melina LEYH-BOUILLE et Louis DIERICKX
Service de Bactériologie, Université de Liège (Belgique)

Quarante années se sont écoulées depuis que Fleming [5] isolait le lysozyme. A peu près simultanément, Gratia [6] réalisait la dissolution des staphylocoques au moyen d'« agents lytiques » contenus dans les filtrats de culture de *Streptomyces*. Welsch [36], peu après, en démontrait la nature enzymatique. Il y a 15 ans, Salton isolait la paroi d'un certain nombre de cellules bactériennes [26]. Il montrait que cette structure était le substrat du lysozyme et que sa destruction spécifique entraînait la lyse de la bactérie [25]. Il ouvrait ainsi des champs d'exploration nouveaux concernant non seulement l'anatomie bactérienne, mais aussi l'immunochimie, la chimiothérapie, les relations phage-bactérie, qui tous connaissent actuellement un remarquable développement.

La paroi cellulaire bactérienne [26] renferme plusieurs complexes macromoléculaires de nature différente, variables selon les parois, formant parfois des couches multiples individualisées. Un de ces constituants est, cependant, présent dans toute bactérie. Il s'agit d'un pepti-

* Supported in part by a grant (UR-E4-10-2) made by the U.S. Department of Agriculture under P. L. 480.

** Chargé de Recherches au Centre National (français) de la Recherche Scientifique, et bénéficiaire d'une bourse des Accords Culturels franco-belges.

*** Adresse permanente : Instituto de Biología Celular. Centro de Investigaciones Biológicas, Madrid (Espagne).

doglycane ou encore glycopeptide ou mucopeptide. Son rôle apparemment unique est de donner à la paroi une rigidité telle que la cellule bactérienne résiste à la pression osmotique dont elle est le siège.

Le terme « bag-shaped macromolecule » proposé par Weidel et Pelzer [35] traduit bien la principale caractéristique de ce peptidoglycane. Cette molécule géante a la taille et la forme même de la bactérie. Elle résulte de l'assemblage de 100 à 200 millions de molécules.

Un très petit nombre de molécules différentes sont utilisées par la bactérie pour former le peptidoglycane de la paroi : deux N-acétylhexosamines, la N-acétyl-D-glucosamine (GNAc), et l'éther 3-O-D-lactique de la N-acétyl-D-glucosamine ou l'acide N-acétylmuramique (MurAc), et quelques acides aminés parmi lesquels sont toujours présents : la L-alanine, la D-alanine, l'acide D-glutamique et un acide aminé dibasique : la L-lysine ou un des isomères LL, DD, LD de l'acide diaminopimélique (DAP). A cause de cette caractéristique, il est évident que l'hydrolyse chimique partielle ne pouvait fournir que très peu de renseignements sur la structure fine du polymère. C'est par des dégradations de la paroi bactérienne isolée, réalisées au moyen d'enzymes spécifiques, que la structure du peptidoglycane d'un certain nombre de parois a pu être démontrée. Parallèlement à ces travaux, d'autres groupes de chercheurs élucidaient les divers mécanismes utilisés par la cellule bactérienne pour réaliser la synthèse du peptidoglycane de la paroi [28]. Ces deux voies d'investigation se sont remarquablement complétées.

STRUCTURE GÉNÉRALE DU PEPTIDOGLYCANE DES PAROIS CELLULAIRES BACTÉRIENNES

Quoique de nombreuses variations individuelles existent certainement, le peptidoglycane de toute paroi bactérienne est construit selon un même schéma général (fig. 1). Une suite alternée de résidus GNAc et MurAc forme des chaînes polysaccharidiques linéaires. Tous les résidus MurAc ou certains d'entre eux sont substitués par des térapeptides L-Ala-D-isoGlu-L-lys-D-Ala ou L-Ala-D-isoGlu-DAP-D-Ala. Enfin ces peptides sont reliés entre eux soit par des liaisons directes, soit par l'intermédiaire d'acides aminés supplémentaires tels que la glycine, la L-alanine, la L-thréonine. L'ensemble qui en résulte se présente dès lors sous la forme d'un réseau à deux et peut-être à trois dimensions.

La solubilisation du réseau peut être induite par l'hydrolyse soit de liaisons glycosidiques, soit de liaisons peptidiques. Chaînes polysaccharidiques et chaînes peptidiques jouent donc un rôle d'égale importance dans le maintien de la résistance mécanique du peptidoglycane. Cependant, cette dissolution n'a pas lieu aussi longtemps qu'un nombre suffisant de liaisons, variable selon les cas, n'est pas rompu.

Cette propriété permet au réseau *in situ* d'être le siège d'hydrolyses et de synthèses de liaisons covalentes, nécessaires à la croissance et à la division bactérienne, sans que la rigidité de la paroi et, par conséquent, la vie de la bactérie ne soient en danger.

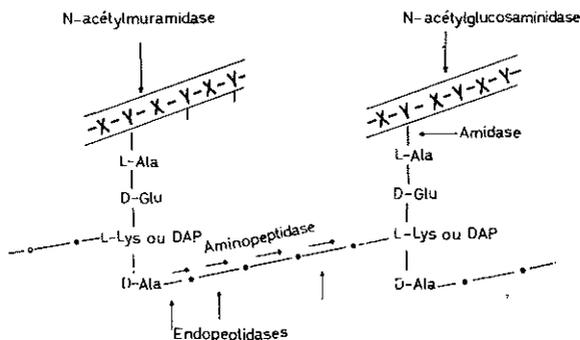


FIG. 1. — Représentation schématique d'une portion du réseau de peptidoglycane de la paroi cellulaire bactérienne et site d'action des trois types connus d'enzymes bactériolytiques.

X = N-acétyl-D-glucosamine.

Y = éther 3-O-D-lactique de la N-acétyl-D-glucosamine ou acide N-acétylmuramique.

— — = l'association entre résidus térapeptidiques peut être réalisée soit par des liaisons directes D-alanyl-ε-lysine ou D-alanyl-DAP, soit par l'intermédiaire d'acides supplémentaires.

Deux types de ponts interpeptidiques sont connus : pentaglycines chez *S. aureus*, tri-L-Ala-L-Thr chez *M. roseus*.

Les ponts interpeptidiques ouverts par une endopeptidase peuvent être ensuite dégradés, à partir de l'extrémité N terminale, par une aminopeptidase.

ENZYMES ACTIFS SUR LE PEPTIDOGLYCANE DES PAROIS CELLULAIRES BACTÉRIENNES

Trois classes d'enzymes bactériolytiques sont connues. Certains dégradent la fraction polysaccharidique. Ce sont, soit des endo-N-acétylmuramidases hydrolysant les liaisons MurAc-GNac, soit des endo-N-acétylglucosaminidases hydrolysant les liaisons GNac-MurAc. D'autres enzymes séparent les chaînes polysaccharidiques des chaînes peptidiques. Ce sont des N-acétylmuramyl-L-alanine amidases hydrolysant les liaisons MurAc-L-Ala. D'autres enzymes enfin sont des hydrolases intra-peptidiques. Ils dissocient les chaînes térapeptidiques les unes des autres, soit qu'ils hydrolysent les liaisons qui les relient directement, soit qu'ils coupent et éventuellement dégradent les ponts interpeptidiques.

D'autres enzymes, non bactériolytiques, permettent une dégradation plus poussée des fragments résultant d'une digestion du peptidoglycane par un ou plusieurs enzymes bactériolytiques. Ce sont pour la plupart des exo-N-acétylhexosaminidases et des exopeptidases.

On trouvera ailleurs [14] la liste des enzymes, lytiques et non lytiques, actifs sur le peptidoglycane des parois cellulaires bactériennes et dont la spécificité est connue, ainsi que la description des procédés qui permettent de les caractériser.

LES CHAINES POLYSACCHARIDIQUES DU PEPTIDOGLYCANE DES PAROIS CELLULAIRES BACTÉRIENNES

Il est devenu classique de décrire les chaînes polysaccharidiques comme une suite alternée de résidus GNAC et MurAc reliés entre eux par des liaisons β 1-4. Cette généralisation est peut-être hâtive. En effet, cette structure n'a été établie avec certitude que dans le cas du peptidoglycane des parois de *Staphylococcus aureus* souche Copenhagen dont la fraction polysaccharidique a été totalement dégradée en l'une ou l'autre des unités disaccharidiques isomères suivantes : β 1-4 N-acétylglucosaminyl-acide N-acétylmuramique [9, 10, 30], β 1-4 N-acétylmuramyl-N-acétylglucosamine [32] et les dérivés correspondants chez lesquels le C6 des résidus MurAc est substitué par un radical O-acétyle. Dans ce but, ont été utilisés d'une part les N-acétylmuramidases 32 de *Streptomyces albus* G [8], F₁ de *Streptomyces albus* G [4, 22] et B de *Chalariopsis* [16, 29] qui hydrolysent toutes les liaisons MurAc-GNAC, et d'autre part la N-acétylglucosaminidase de la lysostaphine [2, 27, 33] qui, inversement, hydrolyse toutes les liaisons GNAC-MurAc. Les unités disaccharidiques isomères résultant de l'un ou l'autre type de digestion ont ensuite été quantitativement libérées de la portion peptidique du peptidoglycane par l'intervention d'une acétylmuramyl-L-alanine amidase. Elles ont enfin été isolées et leur structure a été établie.

Le polysaccharide du peptidoglycane des parois de *Micrococcus roseus* a, très probablement, une structure identique, excepté toutefois qu'aucun résidu n'est substitué par des O-acétyles. Comme précédemment, la N-acétylmuramidase F₁ fragmente totalement le polysaccharide en disaccharides β 1-4 N-acétylglucosaminyl-acide N-acétylmuramique. Ceux-ci sont ensuite libérés par la N-acétylmuramyl-L-alanine amidase de *Streptomyces*. L'alternance des deux N-acétylhexosamines et la nature β 1-4 de 50 % des liaisons glycosidiques sont donc établies [22]. La nature β 1-4 des liaisons MurAc-GNAC n'a pas encore été démontrée directement par l'isolement et l'établissement de la structure du disaccharide isomère du premier. Elle est fortement suggérée par le fait que ces liaisons, sensibles à la N-acétylmuramidase F₁, sont chez le staphylocoque β 1-4.

Le lysozyme hydrolyse jusqu'à 80 % des liaisons MurAc-GNAC des parois de *Micrococcus lysodeikticus* et la N-acétylglucosaminidase de la

lysostaphine jusqu'à 74 % des liaisons GNac-MurAc, avec, dans l'un et l'autre cas, scission partielle des chaînes polysaccharidiques en unités disaccharidiques. La majeure partie au moins des chaînes polysaccharidiques est à nouveau une suite alternée de résidus GNac et MurAc reliés par des liaisons β 1-4 [19]. Les parois de *M. lysodeikticus* ont cependant une propriété qui les distingue de celles de *S. aureus* ou *M. roseus*. Les N-acétylmuramidases les dissolvent en libérant des oligosaccharides sans que l'intervention de la N-acétylmuramyl-L-alanine amidase soit nécessaire. Il a été établi que plus de 50 % des unités disaccharidiques ne sont pas substituées par des chaînes peptidiques [11, 22]. Il apparaît dès lors que le réseau du peptidoglycane de *M. lysodeikticus* est plus lâche que celui de *S. aureus* ou de *M. roseus*. Ceci explique pourquoi l'hydrolyse d'un petit nombre de liaisons glycosidiques suffit à induire la solubilisation des parois de *M. lysodeikticus*. Au contraire, une suspension de parois de *S. aureus* ou de *M. roseus* n'est complètement dissoute par la N-acétylmuramidase F₁, par exemple, que lorsque 100 % des liaisons MurAc-GNac sont hydrolysées [9, 29]. Parmi les fragments oligosaccharidiques libérés directement des parois de *M. lysodeikticus* et dont la taille peut atteindre jusqu'à 8 résidus de N-acétylhexosamines, le tétrasaccharide GNac ^{β 1-4}MurAc ^{β 1-4}GNac ^{β 1-4}MurAc (ou G₂³M₂²G₁¹M₁) a été isolé et sa structure a été complètement élucidée. Dans ce but [19, 20] tous les produits de dégradation possibles de ce tétrasaccharide au moyen d'enzymes appropriés ont été préparés, à savoir : le trisaccharide G₂³M₂²G₁, le trisaccharide M₂²G₁¹M₁, le disaccharide interne M₂²G₁ et les deux disaccharides G₂³M₂ et G₁¹M₁.

L'alternance des résidus GNac et MurAc a aussi été démontrée chez *Escherichia coli* mais l'identification du type et de l'anomérisation des liaisons glycosidiques requiert de nouvelles investigations [35]. Enfin, des communications émanant de divers laboratoires décrivent l'isolement, quoique toujours en petite quantité, d'unités disaccharidiques à partir de parois bactériennes diverses.

Il est donc permis de supposer que les chaînes polysaccharidiques des peptidoglycans présentent une structure uniforme dans la plupart des parois bactériennes. Cette règle cependant n'est probablement pas sans exception. Des liaisons 1-3 par exemple existeraient dans une portion de peptidoglycane des parois de *Streptococcus pyogenes* [1].

Le spectre lytique de beaucoup de N-acétylhexosaminidases est limité. Cette propriété est probablement le résultat d'inhibitions dues à la présence dans la paroi bactérienne de composants non glycopeptidiques, ou aux caractéristiques mêmes du réseau glycopeptidique, ou encore à la présence de groupements particuliers tels que des O-acétyles. Il y a là un domaine d'investigation pratiquement inexploré. La N-acétylmuramidase F₁, toutefois, présente un spectre lytique étendu au moins vis-à-vis des bactéries Gram positif [23]. Elle lyse les bactéries, ou

digère les parois isolées correspondantes, appartenant aux genres : *Sarcina*, *Micrococcus*, *Streptococcus*, *Propionibacterium*, *Corynebacterium*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Listeria*, *Bifidobacterium*. Les cinétiques de la digestion de ces parois montrent que le nombre de liaisons glycosidiques rompues est très variable et indiquent que l'affinité de l'enzyme pour les liaisons β 1-4 requiert probablement la substitution du résidu acide N-acétylmuramique par un peptide [23].

LA PORTION PEPTIDIQUE DU PEPTIDOGLYCANE DES PAROIS CELLULAIRES BACTÉRIENNES

L'établissement de la structure de la fraction peptidique du peptidoglycane des parois bactériennes repose sur :

- 1) L'isolement des unités de base qui le constituent.
- 2) La caractérisation du mode d'association entre ces unités de base (liaisons ou ponts interpeptidiques).

L'existence d'une unité structurale tétrapeptidique L-Ala-D-isoglu-L-Lys (ou DAP)-D-Ala a été longtemps une simple hypothèse de travail basée sur l'isolement à partir de cellules bactériennes dont la synthèse de la paroi était bloquée de façon adéquate, du nucléotide N-acétylmuramyl-pentapeptide : uridine-5'-pyrophosphoryl-N-acétylmuramyl-L-Alanyl-D-isoglutamyl-L-Lysyl (ou diaminopimétyl)-D-Alanyl-D-Alanine [24, 28].

La séquence L-Alanyl-D-isoglutamyl dans la fraction peptidique du peptidoglycane des parois bactériennes isolées, a été démontrée chez *S. aureus* et *M. lysodeikticus* en appliquant la dégradation d'Edman aux peptides isolés [34]. La fonction α -COOH de l'acide glutamique est, chez *S. aureus*, sous la forme d'une carboxamide et chez *M. lysodeikticus*, substituée par un résidu de glycine.

L'existence de tétrapeptides Ala-Glu-DAP-Ala en tant qu'unités structurales de base a d'abord été reconnue chez *E. coli* [35]. L'examen par chromatographie sur papier des produits de digestion du peptidoglycane par le lysozyme ou l'enzyme de phage T_2 , a permis de démontrer l'existence de deux fragments principaux. L'un et l'autre sont composés de GNac, MurAc, Ala, Glu, DAP dans la proportion 1/1/2/1/1. Le dosage du groupement α -aminé du DAP suggérerait qu'un des fragments avait vraisemblablement la séquence : disaccharide -Ala-Glu-DAP-Ala et que le second était un dimère du premier par l'intermédiaire d'une liaison interpeptidique dans laquelle un résidu DAP était engagé.

Des fragments analogues, mais contenant de la lysine à la place du DAP, avaient auparavant été isolés, quoique en très faible quantité, des

parois de *M. lysodeikticus* digérées par le lysozyme ou la N-acétylmuramidase F₁ [7].

Récemment, les unités tétrapeptidiques du peptidoglycane des parois de *S. aureus* [11, 12, 13, 15] et de *M. roseus* [15] ont été obtenues avec un bon rendement. Les peptidoglycanes de ces deux parois présentent beaucoup d'analogie. Tous les résidus MurAc sont substitués par des tétra-peptides, eux-mêmes associés par des ponts interpeptidiques qui s'étendent du groupement COOH du résidu D-alanine terminal d'un tétra-peptide au groupement ϵ -NH₂ du résidu L-lysine d'un second tétra-peptide. Chez *S. aureus*, les ponts interpeptidiques sont constitués en moyenne de 5 résidus de glycine; chez *M. roseus*, ils sont formés par la séquence L-Ala-L-Ala-L-Ala-L-Thré.

Les parois de ces deux bactéries ont été dissoutes par la SA. endopeptidase 1 de *Streptomyces albus* G qui ouvre les ponts peptidiques à leur extrémité N-terminale, libérant ainsi les groupements COOH des résidus D-Ala terminaux. Une fois ouverts, les ponts ont ensuite été dégradés par une aminopeptidase provenant également de *Streptomyces albus* G. Cet enzyme libère les résidus de glycine chez *S. aureus*, de L-Alanine d'abord, de L-Thréonine ensuite, chez *M. roseus*, jusqu'à ce que le groupement ϵ -aminé de la lysine de chaque tétra-peptide soit libre. Finalement, toutes les liaisons β 1-4 MurAc-GNac du glycane ont été hydrolysés par la N-acétylmuramidase F₁. Les unités β 1-4-GNac-MurAc-L-Ala-D-Glu-L-Lys-D-Ala ainsi libérées ont enfin été isolées et purifiées par chromatographie sur Sephadex. En pratique, le rendement final a été de 55 à 60 % du rendement théorique. Les dissaccharide-peptides des deux parois ont été incubés avec une $\text{exo-}\beta$ -N-acétylglucosaminidase qui a libéré le résidu GNac de l'extrémité non réductrice du disaccharide et avec la N-acétylmuramyl-L-Alanine amidase qui a séparé le disaccharide du résidu peptidique. Enfin, la proportion des acides aminés constitutifs et le dosage des fonctions NH₂ et COOH terminales, avant et après l'action de la N-acétylmuramyl-L-Alanine amidase, démontrent que la majeure partie du résidu peptidique a, dans les deux cas examinés, la séquence L-Ala-D-Glu-L-Lys-D-Ala.

Comme il vient d'être exposé, l'isolement des unités tétrapeptidiques par dégradations enzymatiques du peptidoglycane nécessite l'intervention d'une série d'enzymes appropriés et, en particulier, de peptidases spécifiques. Plusieurs endopeptidases lytiques ont été isolées et pour certaines d'entre elles, la spécificité a été déterminée.

La SA. endopeptidase, la ML. endopeptidase et la MR. endopeptidase [15], toutes trois sécrétées par *Streptomyces albus* G, ne lysent pas les parois de bactéries Gram positif contenant du DAP et ne sont chacune actives que sur un petit nombre de parois de bactéries Gram positif contenant de la lysine. La SA. endopeptidase dont le mécanisme d'action vient d'être décrit, lyse également *Staphylococcus albus* et *Gaffkya tétragona*. La MR. endopeptidase n'est active, parmi les parois examinées, que sur celles de *M. roseus* dont elle ouvre les ponts interpeptidiques

au niveau de la liaison L-Ala-L-Thré. La ML. endopeptidase digère les parois de *M. lysodeikticus*, *Micrococcus citreus*, *Micrococcus flavus* et *Sarcina lutea*. Chez *M. lysodeikticus*, elle hydrolyse des liaisons alanyl- ϵ -lysine. Ceci démontre que chez cette bactérie les associations interpeptidiques sont obtenues par des liaisons directes sans que n'interviennent des acides aminés supplémentaires. D'ailleurs, la proportion Ala/Glu/Lys/Gly des parois de *M. lysodeikticus* est 2/1/1/1. Elle exclut la possibilité de ponts interpeptidiques puisque les résidus de glycine qui seuls étaient éventuellement disponibles, substituent les résidus d'acide isoglutamique en position α . La structure de la fraction peptidique du peptidoglycane de *M. lysodeikticus* est cependant particulière. En effet, d'une part 70 % des résidus lysine ont leur groupement ϵ -aminé libre, ce qui indique une faible fréquence dans les associations interpeptidiques, mais, par contre, aucun résidu alanine n'a sa fonction COOH libre. D'autre part, au moins 50 % des résidus MurAc ne sont pas substitués par des peptides mais, par contre, il n'y a que très peu de résidus Ala dont la fonction aminée est libre. Il est donc vraisemblable que chez *M. lysodeikticus* les unités térapeptidiques sont à la fois polymérisées par l'intermédiaire de liaisons L-Ala-D-Ala et que les polypeptides qui en résultent sont associés entre eux par des liaisons D-Ala- ϵ -Lys, sensibles à la ML. endopeptidase.

Le constituant principal de la lysostaphine [2, 3, 27] est également une peptidase. Elle est spécifiquement active sur les parois des staphylocoques dont elle hydrolyse plusieurs des liaisons glycyglycine des ponts pentaglycine. Un mécanisme d'action similaire est attribué à l'enzyme L₁₁ sécrété par *Flavobacterium* [17, 18].

Le complexe enzymatique L₃ sécrété par un streptomycète contient en plus d'une N-acétylmuramyl-L-Alanine amidase, une peptidase qui hydrolyse les liaisons D-Ala-DAP des parois de *Corynebacterium* [18, 21]. Le même type de liaison serait hydrolysé chez *E. coli* par une peptidase du système autolytique [35].

Les variations structurales des portions peptidiques des peptidoglycans des parois bactériennes portent donc non seulement sur la nature de l'acide aminé dibasique, mais aussi sur le mode d'association des térapeptides entre eux. Ces associations interpeptidiques semblent toujours se faire aux dépens d'un résidu D-Ala terminal et d'une des fonctions aminées de l'acide aminé dibasique, soit par une liaison directe (*M. lysodeikticus*, *Corynebacterium*, *E. coli*), soit par l'intermédiaire de ponts peptidiques (polyglycine chez *S. aureus*, tri-L-Ala-L-Thré chez *M. roseus*). Enfin, il est possible que l'unité peptidique soit elle-même de plus grande taille et résulte de la polymérisation de térapeptides (*M. lysodeikticus*).

CONCLUSIONS

La structure réticulaire proposée pour le peptidoglycane des parois cellulaires bactériennes permet de comprendre les propriétés apparemment contradictoires de résistance mécanique et d'extensibilité qui caractérisent cette structure anatomique, unique dans le monde vivant, destinée à protéger contre l'éclatement osmotique des êtres unicellulaires dont le temps de génération est parfois de quelques dizaines de minutes.

Ces études de structure basées sur des dégradations enzymatiques contrôlées, jointes aux recherches sur la biosynthèse du peptidoglycane, ont également permis d'interpréter le mécanisme d'action d'un certain nombre d'antibiotiques. La pénicilline, en particulier, a pour effet d'induire chez *S. aureus* la formation d'un peptidoglycane fragile dont beaucoup de chaînes polyglycine ont leurs extrémités NH₂ libres [31, 37]. Chez ces cellules intoxiquées, la réaction de transpeptidisation qui assure normalement la fermeture des ponts, est inhibée. Il est frappant de constater que l'inhibition de la biosynthèse de la liaison D-alanyl-glycine par la pénicilline provoque la lyse d'une culture de staphylocoques en voie de multiplication et que l'ouverture de cette même liaison par la SA. endopeptidase a pour effet de dissoudre les parois staphylococciques isolées.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] BARKULIS S. S., SMITH C., BOLTRALIK J. J. et HEYMANN H. : *Bac. Proc.*, 1964, 32, et *J. Biol. Chem.*, 1964, 239, 4027. — [2] BROWDER H. P., ZYGMUT W. A., YOUNG J. R. et TAVORMINA P. A. : *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 1965, 3, 383. — [3] CROPP C. B. et HARRISON E. F. : *Canadian J. of Microbiology*, 1964, 10, 823. — [4] DIERICKX L. et GHUYSEN J. M. : *Biochim. Biophys. Acta*, 1962, 58, 7. — [5] FLEMING A. : *Proc. Roy. Soc. B. (London)*, 1922, 93, 306. — [6] GRATIA A. et DATH S. : *C. R. Soc. Biol.*, 1924, 91, 1442. — [7] GHUYSEN J. M. : *Biochim. Biophys. Acta*, 1961, 47, 561. — [8] GHUYSEN J. M., LEYH-BOUILLE M. et DIERICKX L. : *Biochim. Biophys. Acta*, 1962, 63, 286. — [9] GHUYSEN J. M. et STROMINGER J. L. : *Biochemistry*, 1963, 2, 1110. — [10] GHUYSEN J. M. et STROMINGER J. L. : *Biochemistry*, 1963, 2, 1119.
- [11] GHUYSEN J. M., LEYH-BOUILLE M., DIERICKX L., SIMONS A., STROMINGER J. L., TIPPER D. J. et BIRGE C. H. : *Estrato de III symposium Internazionale sul Liozima di Fleming*, Milano, April, 30/T.R., 1964. — [12] GHUYSEN J. M., DIERICKX L., LEYH-BOUILLE M., STROMINGER J. L., BRICAS E. et NICOT C. : *Biochemistry*, 1965, 4, 2237. — [13] GHUYSEN J. M., TIPPER D. J., BIRGE C. H. et STROMINGER J. L. : *Biochemistry*, 1965, 4, 2245. — [14] GHUYSEN J. M., TIPPER D. J. et STROMINGER J. L. : *Methods in Enzymology*, ed. S. P. Colowick et N. O. Kaplan (New York and London) : Academic Press, Inc., 8, sous presse, 1966. — [15] GHUYSEN J. M., PETIT J. F. et MUNOZ E. : soumis pour publication. — [16] HASH J. H. : *Arch. Biochem. Biophys.*, 1963, 102, 379. — [17] KATO K., KOTANI S., MATSUBARA T., KOGAMA J., HASHIMOTO S., CHIMORI M. et KAZEKAWA I. : *Biken's J.*, 1962, 5, 155. — [18] KATO K. : en préparation. — [19] LEYH-BOUILLE M. : Structure de la

- fraction polysaccharidique du glycopeptide de *Micrococcus lysodeikticus*. Thèse de doctorat, Université de Liège, Belgique, 1965. — [20] LEYH-BOUILLE M. et TIPPER D. J. : *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1965, 47, 1905.
- [21] MORI Y., KATO K., MATSUBARA T. et KOTANI S. : *Biken's J.*, 1960, 3, 139. — [22] MUNOZ E. et GHUYSEN J. M. : en préparation. — [23] MUNOZ E., TINELLI R. et GHUYSEN J. M. : en préparation. — [24] PARK J. T. et STROMINGER J. L. : *Science*, 1957, 125, 99. — [25] SALTON M. R. J. : *Nature*, 1952, 170, 746. — [26] SALTON M. R. J. : *The Bacterial cell wall*. Elsevier Publishing Co, 1964. — [27] SCHINDLER C. A. et SHUHARDT V. T. : *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 1964, 51, 414. — [28] STROMINGER J. L. : *The Bacteria* (I. C. Gunsalus et R. Y. Stanier, eds.) Vol. III. Academic Press, New York, 1962. — [29] TIPPER D. J., STROMINGER J. L. et GHUYSEN J. M. : *Science*, 1964, 146, 781. — [30] TIPPER D. J., GHUYSEN J. M. et STROMINGER J. L. : *Biochemistry*, 1965, 4, 468.
- [31] TIPPER D. J. et STROMINGER J. L. : *Proc. N.A.S.*, 1965, 54, 1133. — [32] TIPPER D. J. et STROMINGER J. L. : soumis pour publication. — [33] TIPPER D. J. : en préparation. — [34] TIPPER D. J., KATO K., JARVIS D., STROMINGER J. L. et GHUYSEN J. M. : soumis pour publication. — [35] WEIDEL W. et PELZER H. : *Advances in Enzymology*, 1964, 26, 193. — [36] WELSCH M. : *Rev. Belge Pathol. Méd. exp.*, 1947, 28, suppl. 2, 1. — [37] WISE E. M. et PARK J. T. : *Proc. N.A.S.*, 1965, 54, 75.
-
-