

Préparation enzymatique de peptides du type $L\text{-Ala-}D\text{-Glu-}\left[\begin{array}{c} \text{ } \\ \text{ } \end{array}\right]-(L)\text{meso-diaminopiméyl}(L)\text{-}D\text{-Ala}^{[14C]}$ par réactions d'échange entre les peptides correspondants non radioactifs et la $D\text{-alanine } [^{14C}]$.

François ARMINJON *, Micheline GUINAND *, Georges MICHEL \diamond *,
Jacques COYETTE ** et Jean-Marie GHUYSEN **.

* Laboratoire de Biochimie microbienne, Université de Lyon I,
69621 Villeurbanne, France.

** Service de Microbiologie, Faculté de Médecine, Institut de Botanique,
Université de Liège, Liège, Belgique.

(25-6-1976).

Summary. — Membrane bound LD -transpeptidase of *Streptococcus faecalis* ATCC 9790 was used to catalyse transpeptidation reactions between non radioactive peptide donors of the general type : $L\text{-Ala-}D\text{-Glu-}\left[\begin{array}{c} \text{ } \\ \text{ } \end{array}\right]-(L)\text{meso-A}_2\text{pm}(L)\text{-}D\text{-Ala}$ and $D\text{-}[^{14C}]$ alanine acceptor. The presence of one or two amide residues on the carboxyl groups of glutamic acid and *meso*-diaminopimelic acid increases the transfer reactions and subsequently the yield in radioactive peptides $L\text{-Ala-}D\text{-Glu-}\left[\begin{array}{c} \text{ } \\ \text{ } \end{array}\right]-(L)\text{meso-A}_2\text{pm}(L)\text{-}D\text{-}[^{14C}]$ Ala.

INTRODUCTION.

La γ - D -glutamyl-(L)*meso*-diaminopimélique endopeptidase de *Bacillus sphaericus* 9602 en cours de sporulation hydrolyse spécifiquement la liaison γ - D -Glu-(L)*meso*- A_2 pm des chaînes peptidiques constituant le peptidoglycane des spores des bactéries du genre *Bacillus*. Une préparation particulière de *B. sphaericus* 9602 agit sur le tripeptide $L\text{-Ala-}\gamma$ - D -Glu-(L)*meso*- A_2 pm et sur le térapeptide $L\text{-Ala-}\gamma$ - D -Glu-(L)*meso*- A_2 pm(L)- D -Ala dont elle libère respectivement l'acide *meso*-diaminopimélique et le dipeptide *meso*- A_2 pm(L)- D -Ala. Elle est sans action sur les peptides analogues où l'acide *meso*-diaminopimélique est remplacé par la L -lysine [1]. Une activité enzymatique similaire a été mise en évidence chez *B. subtilis* et certains mutants en cours de sporulation [2].

Dans le but d'étudier le profil enzymatique de cette endopeptidase, nous avons préparé une série

Abréviations :

GlcNAc : N -acétylglucosamine.
MurNAc : acide N -acétylmuramique.
MurNGlyc : acide N -glycolylmuramique.
meso- A_2 pm : acide *meso*-diaminopimélique ou $\left[\begin{array}{c} L \\ \text{ } \\ D \end{array}\right]$

\diamond A qui toute correspondance doit être adressée.

de térapeptides radioactifs, amidés ou non,
 $L\text{-Ala-}D\text{-Glu (OH ou amide)-}\left[\begin{array}{c} L \\ \text{ } \\ D \end{array}\right]-D\text{-Ala}^{[14C]}$
 γ (OH ou amide)

Les peptides non radioactifs correspondants ont été obtenus au préalable par dégradation enzymatique de diverses parois bactériennes et le résidu D -alanine C terminale de ces peptides a été remplacé, au moins partiellement, par la D -alanine $[^{14C}]$. La réaction d'échange : térapeptide non radioactif + $D\text{-Ala } [^{14C}] \rightarrow$ térapeptide radioactif + $D\text{-Ala}$ a été catalysée par la LD -transpeptidase membranaire de *Streptococcus faecalis* ATCC 9790 [3].

MATERIEL ET METHODES.

SOUCHES ET PAROIS.

La figure 1 montre la structure des unités tri et térapeptidiques des portions peptidiques des peptidoglycanes pariétaux de *Bacillus megaterium* [4], de *Streptomyces* R 39 (en fait, probablement un *Actinomadura*) [5], de *Streptomyces mediterranei* [6] et de *Nocardia kirovani* [7].

Dans les parois, ces peptides sont attachés aux chaînes de glycane du peptidoglycane par des

liaisons amides *N*-acétylmuramyl-*L*-alanine. De plus, une certaine proportion d'unités tétrapeptidiques sont reliées entre elles par des liaisons *D*-Ala-*D*-meso- A_2pm (figure 2).

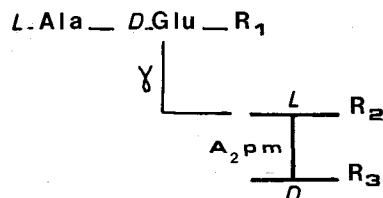


FIG. 1. — Peptides constituant des peptidoglycanes de *Bacillus megaterium*, *Streptomyces* R 39, *Streptomyces mediterranei* et *Nocardia kirovani*.

Tripeptides $R_2 = OH$, Tétrapeptides $R_2 = D-Ala$, *Bacillus megaterium* $R_1 = OH$, $R_3 = OH$, *Streptomyces* R 39 $R_1 = NH_2$, $R_3 = OH$, *Streptomyces mediterranei* $R_1 = OH$, $R_3 = NH_2$, *Nocardia kirovani* $R_1 = NH_2$, $R_3 = NH_2$.

ment des cellules aux ultrasons (appareil MSE 500W) et centrifugations différentielles. Les parois de *Nocardia kirovani* ont en plus subi divers traitements à l'urée, à la trypsine et aux solvants organiques comme décrit précédemment [9].

ENZYMES.

L'activité des différentes enzymes utilisées est schématisée sur la figure 2. Ces enzymes sont les suivantes : 1 — le lysozyme de blanc d'œuf (Armour) hydrolyse, au moins partiellement, les chaînes de glycane des peptidoglycanes pariétaux en unités disaccharidiques [10] ; 2 — la *DD*-carboxypeptidase de S.R 39 hydrolyse les liaisons *D*-Ala-*D*-Ala et les liaisons interpeptidiques *D*-Ala-*D*-meso- A_2pm qui sont en position α d'une fonction $COOH$ libre [11]. Une unité d'enzyme catalyse l'hydrolyse de 1 nmole de N^α , N^ϵ -diacétyl-

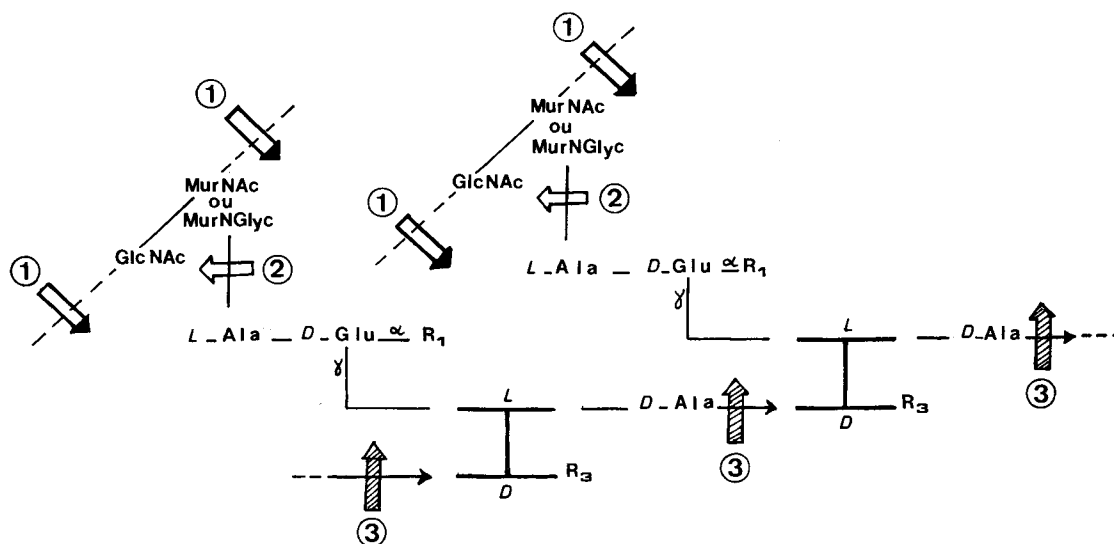


FIG. 2. — Peptidoglycanes de *Bacillus megaterium*, *Streptomyces* R 39, *Streptomyces mediterranei* et *Nocardia kirovani*.

Pour la signification de R_1 et R_3 voir la légende de la figure 1. Le lysozyme hydrolyse les liaisons (1), la *N*-acétylmuramyl-*L*-alanine amidase hydrolyse les liaisons (2), les *DD*-carboxypeptidases hydrolysent les liaisons (3).

Les parois des *Streptomyces* et *Nocardia* ont été choisies comme source de tétrapeptides.

S.R 39 est cultivé à 28°C en milieu peptoné A [8]. *S. mediterranei* ME/R 6468 (Laboratoire de Recherches, Lepetit Spa, Milan, Italie) est cultivé à 30°C dans un milieu contenant 13 g de « bouillon nutritif Oxoid » et 10 g d'extrait de levure Difco. *N. kirovani* IM 1374 (Institut Mérieux, 69 Marcy l'Etoile) est cultivé à 37°C en milieu de Sauton. Les parois ont été préparées par traite-

L-lysyl-*D*-alanyl-*D*-alanine par heure à 37°C à une concentration en peptide égale à 10 fois la valeur de K_m (0,8 mM) dans un tampon Tris-HCl 0,03 M à pH 7,5, + $MgCl_2$ 3.10^{-3} M ; 3 — une poudre acétonique contenant l'ensemble du complexe lytique excrété par *Streptomyces albus* G. Cette préparation renferme en plus d'une glycosidase semblable au lysozyme, une *N*-acétylmuramyl-*L*-alanine amidase ainsi qu'une endopeptidase (KM endopeptidase) [12, 13]. Cette endopeptidase est particulièrement active sur les liaisons *D*-Ala-*D*-meso- A_2pm

où la fonction carboxylique est libre (activité *DD*-carboxypeptidasique) mais elle hydrolyse également, quoique avec une efficacité moindre, cette même liaison lorsque la fonction COOH est substituée par une amide comme c'est le cas dans les peptidoglycanes de *S. mediterranei* et de *N. kirovani* (figure 2). L'activité *DD*-carboxypeptidasique de cette préparation sur le tripeptide N^2 , N^2 -diacétyl-*L*-lysyl-*D*-alanyl-*D*-alanine est de 0,12 μ mole de *D*-alanine libérée par mg de poids sec, par mn, à une concentration en substrat égale à 10 fois la valeur de K_m (0,3 mM) à 37°C et dans un tampon Tris-HCl 0,02 M à pH 7,5, + $MgCl_2$ 2.10^{-3} M.

PRODUITS.

La *D*-alanine [^{14}C] (48,5 mCi/mmole) provient de Radiochemical Center (Amersham, Angleterre).

La résine Aminex Q 15 S est un produit Bio-Rad Laboratories.

MÉTHODES ANALYTIQUES.

Le dosage des acides aminés est effectué à l'autoanalyseur Technicon. On utilise la méthode au dinitrofluorobenzène pour la détermination et le dosage des groupements N terminaux [14].

Les chromatographies sur couches minces ont été réalisées sur poudre de cellulose MN 300 G Polygram Cel 300 (Macherey-Nagel) dans le solvant méthanol-pyridine-acide acétique-eau (18:50:4:28). Les produits radioactifs, séparés par chromatographie sur couches minces, sont détectés par autoradiographie avec des films Kodirex (Kodak, Inc.). Les radioactivités sont mesurées dans un spectromètre à scintillation liquide Packard. Le liquide à scintillation contient 4 g de 2,5 diphényloxazole et 100 mg de 1,4 bis-2-(5-phényl oxazolyl) benzène par litre de toluène.

Pour l'analyse des peptides non radioactifs les électrophorèses sont effectuées sur papier Whatman n° 1 à pH 4,1 dans le tampon pyridine-acide acétique-eau (2,5:9:1000) avec un appareil Phorograph (30 V/cm).

RESULTATS.

PRÉPARATION DES PEPTIDES NON RADIOACTIFS.

A — *Tétrapeptide de N. kirovani*. La technique précédemment décrite a été utilisée [7]. Rendement : 10 μ moles de tétrapeptide pour 228 mg de parois.

B — *Tétrapeptide de S. R. 39*. Par incubation pendant 16 heures à 37°C en tampon Tris-HCl 20 mM pH 7,0, les parois (260 mg) s'autolysent sous l'action de la *N*-acétylmuramyl-*L*-alanine ami-

dase endogène (5). Les ponts interpeptidiques *D*-Ala-(*D*)-*meso*-A₂pm sont ensuite hydrolysés par action de la *DD*-carboxypeptidase de *S. R. 39*, puis la solution est filtrée sur deux colonnes de Sephadex G 50-G 25 montées en série (V_0 : 610 ml), le liquide d'élution est une solution 0,1 M de LiCl. Le dosage des groupements NH_2 terminaux permet de mettre en évidence deux fractions principales (K_D = 0,8 et 0,9) renfermant respectivement un mélange d'octa et de tétrapeptides (fraction K_D = 0,8) et de tétra et tripeptides (fraction K_D = 0,9). La fraction K_D = 0,9 (30 μ moles) est dessalée sur Sephadex G 25 et une partie du matériel obtenu (10 μ moles) est fractionnée sur Aminex Q 15 S. Pour les conditions voir la légende de la figure 3. On obtient ainsi 6,6 μ moles de tétrapeptide pur (figure 3, fraction I).

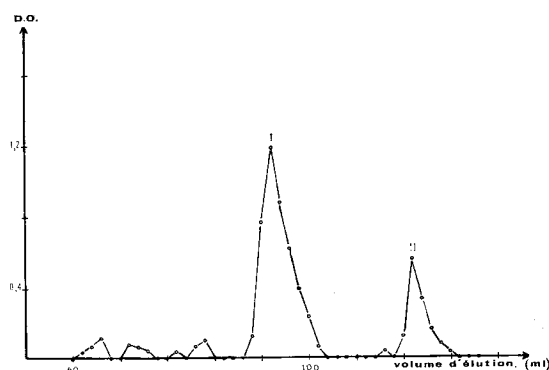


FIG. 3. — Purification du tétrapeptide de *S. R. 39* par chromatographie sur colonne de résine Aminex Q 15 S. Fraction I : tétrapeptide (voir figure 1), Fraction II : tripeptide (voir figure 1).

Les peptides sont chargés à pH 2,5 sur la colonne de résine (1 \times 7 cm) maintenue à 50°C. L'élution est effectuée successivement par 40 ml de tampon pyridine-acide acétique pH 3,1 (0,2 M en pyridine) puis par un gradient linéaire réalisé avec 300 ml de tampon pH 3,1 et 300 ml du tampon pyridine-acide acétique pH 5,1 (0,2 M en pyridine). Sur une partie aliquote des fractions de 1 ml recueillies, les acides aminés sont dosés par la ninhydrine après hydrolyse alcaline [15].

C — *Tétrapeptides de S. mediterranei*. Une suspension de parois (265 mg) dans 50 ml d'eau distillée est clarifiée par action du lysozyme (30 mg) à 37°C pendant 4 h. La solution rendue 20 mM en Tris-HCl pH 8 et 2 mM en $MgCl_2$, est additionnée de 14 mg de poudre acétonique de *S. albus* G et incubée à 37°C pendant 16 h. La filtration sur Sephadex G 50-G 25 en présence de LiCl permet d'isoler deux fractions (K_D = 0,7 et 0,9 respectivement). La fraction K_D = 0,9 est dessalée sur Sephadex G 25 et une partie aliquote est chromatographiée sur Aminex Q 15 S (figure 4).

La courbe obtenue comporte 4 pics. L'analyse des aminoacides et des groupements N terminaux

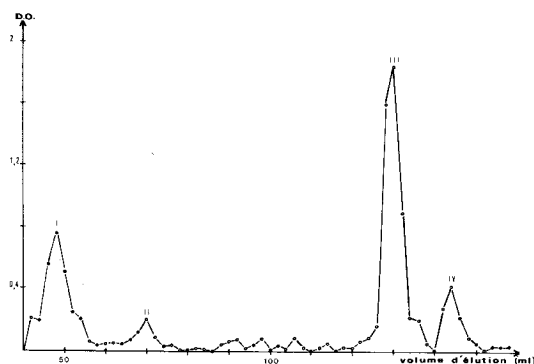


FIG. 4. — Purification des tétrapeptides de *S. mediterranei* par chromatographie sur colonne de résine Aminex Q 15 S, à 50°. Pour les conditions voir la figure 3.

Fraction I : tétrapeptide non amidé, Fraction II : tripeptide non amidé (figure 1, $R_1 = OH$, $R_3 = OH$).

Fraction III : tétrapeptide monoamidé, Fraction IV : tripeptide monoamidé (figure 1, $R_1 = OH$, $R_3 = NH_2$).

TABLEAU I.

Analyse des acides aminés des pics I, II, III et IV de la figure 4.

Pics	Composition en acides aminés			Acides aminés N-terminaux	
	Ala	Glu	A ₂ pm	Ala	A ₂ pm
I	1,8	1,2	1	0,8	0,7
II	1	1,2	1	0,9	0,9
III	1,7	1	1	0,7	0,9
IV	1,1	1,2	1	1	0,9

La composition en acides aminés est exprimée en moles pour 1 mole de A₂pm. Les valeurs des acides aminés N-terminaux sont rapportées à 1 mole de peptide. A₂pm est mono N-terminal.

(tableau I), le comportement électrophorétique à pH 4,1 en présence de témoins [6, 7] et la comparaison des volumes de rétention avec des résultats antérieurs [6] permettent de déterminer la nature des peptides. Ce sont le tétrapeptide (pic I) et le tripeptide (pic II) non amidés, le tétrapeptide (pic III) et le tripeptide (pic IV) monoamidés. Il faut admettre que quelques unités peptidiques du peptidoglycane de *S. mediterranei* peuvent exister sous forme non amidée. Un résultat analogue avait été obtenu avec *N. kirovani* : une forte proportion de tétra et tripeptides diamidés était accompagnée d'une faible quantité de tétra et tripeptides monoamidés [7].

On obtient à partir de 176 mg de parois, 14,4 µmoles de tétrapeptide monoamidé (figure 4, fraction III) et 1,9 µmole de tétrapeptide non amidé (figure 4, fraction I).

PRÉPARATION DES PEPTIDES RADIOACTIFS.

A — A l'échelle qualitative. Le mélange réactionnel, peptide non radioactif (2 mM, concentration finale), *D*-alanine [¹⁴C] (0,675 mM, concentration finale ; 500 nCi au total), EDTA (10⁻³ M, concentration finale) et 260 µg de membranes de *S. faecalis* (concentration exprimée en protéines), dans un volume final de 20 µl de tampon cacodylate 10⁻² M pH 6, est incubé pendant 20 h à 37°C. Après addition de Triton X-100 (2 p. cent concentration finale), la *D*-alanine [¹⁴C] non échangée est séparée du peptide par électrophorèse sur papier soit à pH 2, soit à pH 6,5. Les peptides radioactifs sont localisés à l'aide d'un détecteur Packard. Après comptage, le rendement de la réaction d'échange est exprimé en pourcentage de *D*-Ala [¹⁴C] incorporée dans le peptide (tableau II).

B — A l'échelle quantitative. Le mélange réactionnel, peptide non radioactif, *D*-alanine [¹⁴C] et

TABLEAU II.

Etude de la réaction d'échange entre peptides non radioactifs et la *D*-alanine [¹⁴C] dans des conditions standards (rapport peptide/*D*-Ala [¹⁴C] : 3/1).

Peptides	pH d'électrophorèse	Migration vers la cathode relative à <i>D</i> -Ala [¹⁴ C]	<i>D</i> -Ala [¹⁴ C] incorporée p. cent
Tétrapeptide non amidé	2	0,84	8
Tétrapeptide monoamidé (Glu α NH ₂) ..	2	0,9	50
Tétrapeptide monoamidé (A ₂ pm ω NH ₂) ..	2	1,05	67
Tétrapeptide diamidé	6,5	4,65	31

Conditions d'incubation : voir le texte. Les électrophorèses (3 h dans chaque cas) sont réalisées avec un appareil Gilson DW à haut voltage (60 V/cm). Tampons d'électrophorèse : pH 2 : acide formique 0,5 M, pH 6,5 : collidine-acide acétique-eau (9,1 :2,65:1000).

membranes de *S. faecalis* aux concentrations indiquées dans le tableau III, est incubé à 37°C pendant 18 h dans 80 µl de tampon cacodylate 12 mM pH 6 et 1,2 mM en EDTA.

est enfin effectuée par filtration sur Sephadex G 15 avec élution par l'eau. La pureté des peptides est estimée par chromatographie sur couches minces (figure 5 A, B).

TABLEAU III.

Préparation de peptides radioactifs par réaction d'échange entre les peptides non radioactifs et la *D*-alanine [^{14}C].

Peptide donneur non radioactif	µmoles peptide donneur	<i>D</i> -Ala [^{14}C] accepteur (a) µmoles (b) µCi	Rapport molaire peptide donneur/accepteur	mg de protéines membranaires par µmoles de peptide donneur	Radioactivité spécifique du peptide purifié (cpm/µmoles)	<i>D</i> -Ala [^{14}C] incorporée p. cent
Tétrapeptide monoamidé (Glu α NH ₂)..	3,0	(a) 0,3 (b) 12	10/1	1,7	1,7 10 ⁶	37
Tétrapeptide monoamidé (A ₂ pm ω NH ₂)	4,5	(a) 0,54 (b) 20	8/1	2,3	4,2 10 ⁶	76
Tétrapeptide diamidé.....	0,77	(a) 0,27 (b) 10	3/1	6	5,5 10 ⁶	36

Pour les autres conditions, voir le texte.

Les peptides sont purifiés par chromatographie sur Aminex Q 15 S. L'alanine radioactive résiduelle est éluee à pH 3,1 et les peptides par un gradient de pH 3,1 à 5,1. Une dernière purification

Dans tous les cas, les taches révélées par la ninhydrine correspondent aux composés radioactifs. La radioactivité spécifique de chaque peptide (tableau III) a été déterminée après analyse quantitative des acides aminés à l'autoanalyseur Technicon.

CONCLUSIONS.

La réaction de transpeptidation $\text{X-L-Lys-D-Ala} + \text{accepteur} \rightarrow \text{X-L-Lys-accepteur} + \text{D-Ala}$, catalysée par la *LD*-transpeptidase membranaire de *Streptococcus faecalis* a été étudiée avec de nombreux peptides et aminoacides donneurs et accepteurs [3]. La plus forte activité transpeptidasique a été observée avec la *D*-alanine accepteur et avec les donneurs suivants : les dipeptides N² Ac-L-Lys-D-Ala et N² N⁵ di Ac-L-Lys-D-Ala et les tétrapeptides substitués disaccharide-L-Ala-D-isoGln - L-Lys-D-Ala et disaccharide-L-Ala-D-isoGln - L-Lys (N¹ D-isoAsn)-D-Ala.

Dans le travail présenté ici nous avons utilisé des tétrapeptides non substitués sur la *L*-alanine N terminale et avec l'acide *meso*-diaminopimélique à la place de la *L*-lysine. L'acide *D*-glutamique et l'acide *meso*-diaminopimélique sont amidés ou non amidés. L'étude à l'échelle qualitative indique un bon rendement lorsque l'un des groupements carboxyles ou les deux groupements carboxyles sont amidés. Le meilleur rendement est obtenu avec le tétrapeptide de *Streptomyces mediterranei* (figure 1, R₁ = OH, R₃ = NH₂) il est plus faible

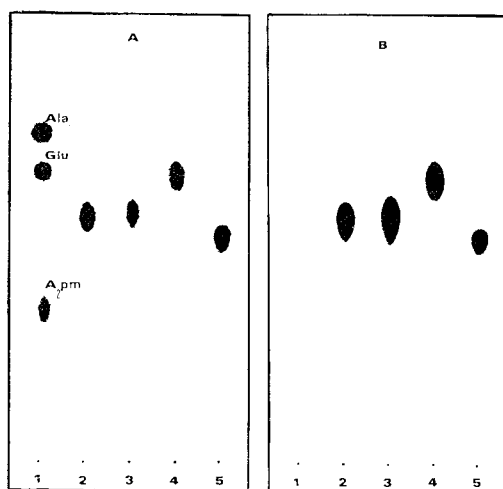


FIG. 5. — Chromatographie en couches minces sur poudre de cellulose dans le solvant méthanol-pyridine-acide acétique-eau (18:50:4:28).

- 1 : acides aminés témoins.
- 2 : tétrapeptide de *Streptomyces* R 39 (monoamidé sur Glu).
- 3 : tétrapeptide de *Streptomyces mediterranei* (monoamidé sur A₂pm).
- 4 : tétrapeptide de *Nocardia kirovani* (diamidé sur Glu et A₂pm).
- 5 : tétrapeptide non amidé L-Ala-γ-D-Glu-(L)-*meso*-A₂pm(L)-D-Ala.

A — Révélation ninhydrine B — Autoradiogramme.

dans le cas des tétrapeptides de *Streptomyces* R 39 (figure 1, $R_1 = \text{NH}_2$, $R_3 = \text{OH}$) et de *Nocardia kirovani* (figure 1, $R_1 = \text{NH}_2$, $R_3 = \text{NH}_2$). Le plus mauvais substrat dans la réaction de transpeptidation est le tétrapeptide non amidé (figure 1, $R_1 = \text{OH}$, $R_3 = \text{OH}$). La présence d'un groupement amide au niveau de l'acide glutamique et de l'acide *meso*-diaminopimélique a donc une influence sur la réaction de transpeptidation.

Ce procédé d'échange a permis de préparer des substrats à haute radioactivité spécifique qui ont été utilisés pour l'étude de la γ -D-glutamyl-(L)*meso*-diaminopimélique endopeptidase et de la LD-carboxypeptidase de *Bacillus sphaericus* [16].

Remerciements.

Ce travail a bénéficié de l'aide de la DGRST (contrat n° 75-7-1336), du CNRS, du Commissariat à l'Energie Atomique (France) et du Fonds de la Recherche Fondamentale collective, Bruxelles (Belgique).

RÉSUMÉ.

Des réactions de transpeptidation ont été effectuées avec la LD-transpeptidase membranaire de *Streptococcus faecalis* ATCC 9790, entre des peptides donneurs du type L-Ala-D-Glu — (L)*meso*-A₂pm(L)-D-Ala et la

D-alanine [¹⁴C] accepteur. La réaction de transfert et par suite le rendement en peptides radioactifs L-Ala-D-Glu — (L)*meso*-A₂pm (L)-D-Ala [¹⁴C], sont favorisés

par la présence d'une ou de deux fonctions amides sur les groupements carboxyles des acides glutamique et *meso*-diaminopimélique.

BIBLIOGRAPHIE.

1. Guinand, M., Michel, G. & Tipper, D. J. (1974) *J. Bacteriol.*, **120**, 173-184.
2. Guinand, M., Michel, G. & Balassa, G. (1976) *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **68**, 1287-1293.
3. Coyette, J., Perkins, H. R., Polacheck, I., Shockman, G. D. & Ghuysen, J. M. (1974) *Eur. J. Biochem.*, **44**, 459-468.
4. Van Heijenoort, J., Elbaz, L., Dezélee, P., Petit, J. F., Bricas, E. & Ghuysen, J. M. (1969) *Biochemistry*, **8**, 207-213.
5. Ghuysen, J. M., Leyh-Bouille, M., Campbell, J. N., Moreno, R., Frère, J. M., Duez, C., Nieto, M. & Perkins, H. R. (1973) *Biochemistry*, **12**, 1243-1251.
6. Bordet, C., Karahjoli, M., Gateau, O. & Michel, G. (1972) *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **22**, 251-259.
7. Vacheron, M. J., Guinand, M., Michel, G. & Ghuysen, J. M. (1972) *Eur. J. Biochem.*, **29**, 156-166.
8. Leyh-Bouille, M., Coyette, J., Ghuysen, J. M., Idczak, J., Perkins, H. R. & Nieto, M. (1971) *Biochemistry*, **10**, 2163-2170.
9. Guinand, M., Vacheron, M. J. & Michel, G. (1970) *FEBS Letters*, **6**, 37-39.
10. Ghuysen, J. M. (1968) *Bacteriol. Rev.*, **32**, 425-464.
11. Leyh-Bouille, M., Nakel, M., Frère, J. M., Johnson, K., Ghuysen, J. M., Nieto, M. & Perkins, H. R. (1972) *Biochemistry*, **11**, 1290-1298.
12. Ghuysen, J. M., Dierickx, L., Coyette, J., Leyh-Bouille, M., Guinand, M. & Campbell, J. N. (1969) *Biochemistry*, **8**, 213-221.
13. Ghuysen, J. M., Leyh-Bouille, M., Bonaly, R., Nieto, M., Perkins, H. R., Schleifer, K. H. & Kandler, O. (1970) *Biochemistry*, **9**, 2955-2961.
14. Ghuysen, J. M., Tipper, D. J. & Strominger, J. L. (1966) *Methods Enzymol.*, **8**, 685-699.
15. Moore, S. & Stein, W. H. (1954) *J. Biol. Chem.*, **211**, 893-906.
16. Arminjon, F. (1976) Thèse Doctorat de Spécialité, Biochimie.