

microbia

ANNÉE 1975 TOME I N° 2

PAROI BACTERIENNE, MEMBRANE CYTOPLASMIQUE ET PENICILLINE

J.M. GHUYSEN (*)

La pénicilline, découverte par FLEMING en 1929, a été un outil d'un intérêt extraordinaire pour l'étude de la physiologie et de l'anatomie de la cellule bactérienne, en particulier de la paroi et de la membrane cytoplasmique. Nous voudrions retracer brièvement cette histoire.

LA CHIMIE DE LA PENICILLINE (2)

Les dix années qui suivirent la découverte de la pénicilline apportèrent peu de renseignements quant à la nature chimique de cette substance.

En 1940, deux découvertes importantes étaient faites. CHAIN, FLOREY, GARDNER, HEATLEY, JENNINGS, ORR-EWING et SANDERS obtenaient la pénicilline sous forme solide (quoique encore impure) et démontraient son efficacité *in vivo* contre divers organismes pathogènes. De même, ABRAHAM et CHAIN décrivaient la préparation, à partir d'*Escherichia coli*, d'une enzyme, la pénicillinase, qui hydrolysait et inactivait la pénicilline. Cette équipe de chercheurs de la SIR WILLIAM DUNN SCHOOL OF PATHOLOGY D'OXFORD créait ainsi l'antibiothérapie et ouvrait une ère extraordinairement fertile d'investigations médicales, biologiques et industrielles.

Manuscrit accepté le 28 avril 1975. Ce texte a fait l'objet d'une conférence donnée le 16 avril 1975 à la Faculté de Pharmacie de l'Université de NANCY I, NANCY, FRANCE.

(*) Service de Microbiologie appliquée aux Sciences Pharmaceutiques, Faculté de Médecine. Institut de Botanique, Université de LIEGE, Sart Tilman, LIEGE BELGIQUE.

Moins d'une décade plus tard, presque tout ce que l'on connaît actuellement sur la chimie de la pénicilline était découvert (2). Ces admirables travaux ont été rassemblés dans un livre « The Chemistry of Penicillin » publié en tant que « Report on a Collaborative Investigation by American and British Chemists under the Joint Sponsorship of the Office of Scientific Research and Development, Washington D.C., and the Medical Research Council, London ».

Dix ans plus tard, en 1960, la céphalosporine C avait été isolée par ABRAHAM et NEWTON des cultures d'un *Cephalosporium sp* ; mais sa structure n'était pas encore complètement élucidée. Cependant, on savait qu'elle n'était pas détruite par la pénicillinase, qu'elle inhibait compétitivement l'hydrolyse de la pénicilline par la pénicillinase et qu'elle induisait la synthèse de cette enzyme chez certaines bactéries.

On sait maintenant que pénicillines (naturelles et semi-synthétiques) et céphalosporines constituent une classe particulière d'antibiotiques caractérisés par la présence dans leur molécule d'un noyau β -lactame fortement réactionnel. Elles exercent leur activité antimicrobienne par un mécanisme fondamentalement identique.

NATURE DE LA CIBLE CELLULAIRE DE LA PENICILLINE (6,9)

Les premières observations relatives au mode d'action de la pénicilline étaient contradictoires. Les unes indiquaient une action bactériostatique, les autres une action bactéricide. En fait, la pénicilline est bien bactéricide, mais son action ne s'exerce que si les bactéries, auxquelles elle est ajoutée, sont en voie de multiplication. Très souvent, d'ailleurs, cette action bactéricide s'accompagne de la lyse de la culture bactérienne. Cette observation était extraordinaire car la pénicilline, en elle-même, n'était pas un agent lytique. Elle n'a pas d'action sur des bactéries au repos. Une fois l'antibiotique éliminé, ces bactéries peuvent croître et se développer normalement.

Plusieurs découvertes importantes furent faites aux environs de 1950 qui contribuèrent grandement à élucider cette énigme (pour une revue complète, voir (61)).

1) La lyse des bactéries en voie de multiplication exponentielle induite sous l'action de la pénicilline n'avait pas lieu si le milieu contenait un soluté approprié en concentration convenable (par exemple 20 % de saccharose). Les bactéries, cependant, se transformaient en corps sphériques (protoplastes et sphéropastes) métaboliquement actifs mais osmotiquement fragiles. L'élimination du saccharose du milieu provoquait leur éclatement immédiat.

2) La même transformation que celle observée avec la pénicilline pouvait être obtenue par action du lysozyme, enzyme découverte en 1925 également par FLEMING. Contrairement à la pénicilline, cependant, le lysozyme agissait sur les bactéries sensibles, qu'elles soient au repos ou en voie de multiplication.

3) SALTON qui, à cette époque, travaillait au Biochemical Department à Cambridge, U.K., isolait, pour la première fois, les parois bactériennes de diverses bactéries gram-positives et gram-négatives. Les parois isolées de cocci étaient sphériques ; celles isolées des bactéries en forme de bâtonnet étaient cylindriques. La paroi est la structure qui confère aux bactéries leur forme particulière et leur permet de vivre dans des milieux qui, le plus souvent, sont fortement hypotoniques.

SALTON, en plus, démontrait que le lysozyme dissolvait les parois bactériennes isolées en hydrolysant un hétéropolymère particulier qui en constitue le support rigide et insoluble. Le caractère unique et spécifiquement bactérien de cet hétéropolymère était bientôt précisé. Il est constitué de deux N-acétylhexosamines, la N-acétylglucosamine et son produit de substitution sur le carbone 3 par un groupement éther D-lactyle (ou acide N-acétylmuramique) et de quelques acides aminés. La L-alanine, la D-alanine, l'acide D-glutamique sont toujours présents. Un acide diaminé tel que la L-lysine ou l'acide *meso*-diaminopimélique se rencontre souvent. Cet hétéropolymère, formé à la fois d'hydrates de carbone et d'acides aminés, a été appelé par la suite peptidoglycane (les termes glycopeptide et muréine sont également utilisés).

4) EN 1949, PARK et JOHNSON démontraient que les métabolites qui s'accumulaient chez le staphylocoque intoxiqué par des doses sous-léthales de pénicilline, étaient des nucléotides. On pensa tout d'abord que la pénicilline interférait avec la biosynthèse des acides nucléiques. Mais cette idée était rapidement abandonnée. En effet, PARK, puis PARK et

STROMINGER, montraient que ces divers nucléotides (uridine-5'-pyrophosphate) étaient covalentiellement associés à des résidus de N-acétylglucosamine, d'acide N-acétylmuramique et d'acide aminés qui, précisément, étaient les constituants caractéristiques du peptidoglycane de la paroi.

Dès lors, une hypothèse de travail logique prenait forme : lysozyme et pénicilline avaient pour cible le peptidoglycane pariétal, mais agissaient par des mécanismes totalement différents. Le lysozyme dissolvait le peptidoglycane par action enzymatique directe. La pénicilline était, probablement, un inhibiteur spécifique d'une étape importante de sa biosynthèse.

STRUCTURE DU PEPTIDOGLYCANE (3,5)

En 1968, on avait enfin une idée précise sur la structure primaire des peptidoglycane des parois bactériennes. L'élucidation de ces structures a nécessité l'isolement et l'utilisation d'enzymes spéciales (glycosidases, amidases, peptidases), chacune de ces enzymes hydrolysant une liaison spécifique du peptidoglycane. Les fragments ainsi produits ont été isolés et identifiés et, à partir de ceux-ci, la structure du polymère intact a été reconstituée.

Les peptidoglycane sont des polymères à structure réticulaire (ce qui leur donne forme et rigidité). Des chaînes linéaires de glycane (formées par une alternance de résidus pyranosiques de N-acétylglucosamine et d'acide N-acétylmuramique, reliés entre eux par des liaisons β -1,4) sont associées entre elles par l'intermédiaire de chaînes peptidiques ramifiées.

Les résidus d'acide N-acétylmuramique des chaînes de glycane sont substitués par des térapeptides de structure générale L-Ala-D-Glu- \square -L-R₃-D-Ala. Le résidu L-R₃ varie selon les bactéries. Souvent, mais pas toujours, c'est un acide diaminé.

Enfin, les térapeptides appartenant à des chaînes de glycane adjacentes sont à leur tour reliés entre eux par des « ponts interpeptidiques ». Ces ponts interpeptidiques impliquent toujours le résidu D-Ala C-terminal d'un térapeptide et souvent, mais pas toujours, le groupement ω - animé

du résidu L-R₃ d'un second tétrapeptide. Ces ponts sont réalisés, soit de façon directe par les liaisons amidiques (N ω-D-Ala-L-R₃), soit par l'intermédiaire d'un ou plusieurs acides aminés supplémentaires. La localisation et la composition de ces ponts interpeptidiques a permis de classer les peptidoglycane bactériens en quatre chémotypes principaux (3) et ont été utilisés comme critère taxonomique (7).

BIOSYNTHESE DU PEPTIDOGLYCANE (5,8)

En même temps que ces études de structure progressaient, le mécanisme de la biosynthèse du peptidoglycane était élucidé, grâce principalement aux travaux de STROMINGER et de ses collègues.

Deux groupes d'enzymes, respectivement cytoplasmiques et membranaires interviennent. Les enzymes cytoplasmiques catalysent la synthèse de deux précurseurs uridyliques : l'uridine 5'-pyrophosphate (UDP) -N-acétylglycosamine et l'UDP-N-acétylmuramyl-L-Ala-D-Glu—L-R₃-D-Ala-D-Ala. Il faut remarquer que le peptide de ce dernier précurseur est un pentapeptide se terminant par une séquence D-Ala-D-Ala.

Ces deux précurseurs sont ensuite pris en charge par un système multi-enzymatique de la membrane qui, associé à un coenzyme lipidique particulier (un ester phosphorique d'un alcool polyisoprénoïde à 55 atomes de carbone), catalyse une suite coordonnée de réactions de transfert. Ce système fonctionne de façon cyclique et permet la synthèse d'un peptidoglycane naissant. Formé de chaînes de glycane substitué par les pentapeptides libres L-Ala-D-Glu—L-R₃-D-Ala-D-Ala (dans lesquelles un ou plusieurs acides aminés destinés à former les ponts interpeptidiques ont éventuellement été intégrés), ce peptidoglycane naissant émerge à la surface externe de la membrane cytoplasmique.

La fermeture des ponts interpeptidiques en provoque l'insolubilisation et l'intégration dans le peptidoglycane de la paroi préexistante. La fermeture des ponts interpeptidiques est réalisée par une réaction de transpeptidation et est catalysée par une transpeptidase également membranaire. Au cours de cette réaction (qui n'exige pas d'apport d'énergie exogène), le groupement carboxyle de l'avant-dernier résidu D-Ala C-terminal d'un peptide *donneur* est transféré au groupement aminé d'un peptide *accepteur*. Des liaisons interpeptidiques se forment et des quantités équivalentes de D-alanine sont libérées des peptides donneurs.

NATURE DE LA CIBLE MOLECULAIRE DE LA PENICILLINE (8)

En 1965, WISE et PARK, d'une part, et TIPPER et STROMINGER, d'autre part, montraient de façon indirecte que la pénicilline se comportait comme un inhibiteur spécifique de la réaction de transpeptidation. En 1966, STROMINGER et ses collègues réussissaient à obtenir d'*E. coli* et de *Salmonella sp* des fractions particulières qui, à partir des deux nucléotides précurseurs, catalysaient la synthèse complète d'un peptidoglycane, y compris la fermeture des ponts interpeptidiques. La seule activité de ces préparations à être inhibée par la pénicilline était la transpeptidase et, apparemment, cette activité n'était pas restaurée par lavage ou par traitement à la pénicillinase.

En 1967, cependant, la situation se compliquait. IZAKI et STROMINGER démontraient la présence chez *E. coli* d'une activité DD-carboxypeptidasique également sensible à la pénicilline. Cette DD-carboxypeptidase ne catalyse pas de réactions de transpeptidation mais hydrolyse la liaison peptidique C-terminale D-Ala-D-Ala du nucléotide précurseur UDP-N-acétylmuramyl-pentapeptide (en d'autres termes, détruit le groupement donneur requis pour la réaction de transpeptidation).

Des DD-carboxypeptidasases à activité similaire furent trouvées ultérieurement chez un grand nombre de bactéries. Ces enzymes pourraient jouer un rôle important dans la régulation de la biosynthèse du peptidoglycane en limitant le nombre de peptides donneurs disponibles pour la réaction de transpeptidation.

LES PREMIERES THEORIES SUR LE MECANISME D'ACTION DE LA PENICILLINE (5,8)

Chimiquement, la pénicilline est un puissant agent d'acylation. Selon ROGERS, elle réagirait avec le groupement aminé accepteur du peptide normalement impliqué dans la transpeptidation, empêchant ainsi toute action de la transpeptidase.

Selon TIPPER et STROMINGER (1965), la pénicilline, au contraire, réagirait spécifiquement avec l'enzyme (transpeptidase et DD-carboxypeptidase). L'interaction entre l'enzyme et la pénicilline serait causée par une étroite analogie de structure entre l'antibiotique et la séquence D-Ala-D-Ala du peptide donneur. De plus, cette interaction aurait pour effet d'hydrolyser la liaison amide du noyau β -lactame et, concomitamment, de provoquer l'acylation irréversible de l'enzyme sous la forme d'un complexe pénicilloyl-enzyme stable et inactif. Cette idée était une hypothèse raisonnable et extrêmement attrayante. De façon étrange, cependant, elle a acquis progressivement la valeur d'un dogme (et est présenté comme telle dans beaucoup de traités)... sans avoir jamais été démontrée !

LES SITES CELLULAIRES DE LIAISON DE LA PENICILLINE (1)

Sur la base de l'hypothèse de TIPPER et STROMINGER, on pouvait espérer qu'en isolant de diverses bactéries les sites cellulaires capables de fixer la pénicilline de façon irréversible, on arriverait à isoler la molécule de transpeptidase. Cette voie a été exploitée par STROMINGER et ses collègues et une revue très détaillée des résultats obtenus a été récemment publiée (1).

Ces recherches ont démontré que les bactéries renferment des sites de fixation de la pénicilline à la fois divers et multiples. Ainsi, cinq composants distincts présentant cette propriété ont été isolés de *Bacillus subtilis*. L'un d'entre eux, apparemment le plus abondant, a été isolé et caractérisé comme étant une DD-carboxypeptidase. Dans aucun cas, cependant, une transpeptidase n'a pu être isolée.

LES TRANSPEPTIDASES EXOCELLULAIRES

DE *STREPTOMYCES SP* (4)

En 1969, nous observions, à LIEGE, que certaines souches de *Streptomyces* avaient la propriété d'excréter durant leur croissance une enzyme qui catalysait la réaction $\text{Acétyl}_2\text{-L-Lys-D-Ala-D-Ala} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{D-Ala} + \text{Ac}_2\text{-L-Lys-D-Ala}$, c'est-à-dire qui se comportait comme une DD-carboxypeptidase.

Une étude approfondie de ces enzymes fut entreprise en collaboration avec H.R. PERKINS, alors au Medical Research Council, London U. K.

En 1972, il était démontré que certaines de ces enzymes (mais pas toutes) étaient également capables de catalyser *in vitro* des réactions de transpeptidation en utilisant le même tripeptide Ac₂-L-Lys-D-Ala-D-Ala comme donneur selon la réaction Ac₂-L-Lys-D-Ala-D-Ala + accepteur → D-Ala + Ac₂-L-Lys-D-Ala-accepteur. D-Ala était un produit commun aux réactions d'hydrolyse et de transfert. Ces enzymes étaient donc des DD-carboxypeptidases-transpeptidases. Leur double activité était inhibée par les pénicillines et céphalosporines.

Les DD-carboxypeptidases-transpeptidases, respectivement excrétées par *Streptomyces* R61 et R39, ont été purifiées jusqu'à homogénéité protéinique. Ce sont des protéines constituées d'une seule chaîne polypeptidique d'un poids moléculaire de 38.000 (R61) et 53.000 (R39). Leurs principales propriétés biochimiques et les caractéristiques cinétiques des réactions catalysées ont été décrites.

Pour être utilisés comme substrats donneur et accepteur, les peptides doivent suffisamment ressembler aux substrats naturels qui participent à la réaction de transpeptidation *in vivo* chez les organismes parents correspondants.

Mis en présence d'eau, de peptide donneur Ac₂-L-Lys-D-Ala-D-Ala et d'un accepteur approprié, les enzymes R61 et R39 catalysent concomitamment l'hydrolyse du donneur et la synthèse du peptide Ac₂-L-Lys-D-Ala-accepteur.

L'activité des enzymes peut être dirigée préférentiellement, soit vers la voie d'hydrolyse, soit vers la voie de synthèse, en modifiant les conditions expérimentales. Ainsi, la transpeptidation est largement favorisée aux dépens de l'hydrolyse en augmentant le rapport accepteur/donneur (l'accepteur se comportant comme un inhibiteur non-compétitif de l'hydrolyse) ou en réduisant le contenu en eau du milieu réactionnel (l'eau étant partiellement remplacée par un mélange de glycérol et d'éthylène glycol).

Ces résultats (et d'autres) suggéraient que ces enzymes exocellulaires étaient des formes solubles des transpeptidases membranaires responsables de la fermeture des ponts interpeptidiques au cours de la biosynthèse du peptidoglycane de la paroi.

LES TRANSPEPTIDASES MEMBRANAIRES DE *STREPTOMYCES SP* (4)

Sur la base des études réalisées à partir des transpeptidases exocellulaires, il devait être possible d'estimer directement l'activité transpeptidasique membranaire à l'aide de peptides donneurs et accepteurs artificiels appropriés, c'est-à-dire indépendamment des réactions de biosynthèse qui précèdent la fermeture des ponts interpeptidiques.

Ce procédé a été appliqué avec succès au système membranaire de *Streptococcus faecalis*, d'*E. coli* K12 et de divers *Streptomyces* (souche R61, K 15 et *rimosus*). Les résultats obtenus avec les *Streptomyces sp* sont présentés ici.

Le système responsable de la fermeture des ponts interpeptidiques, présent dans les membranes cytoplasmiques isolées de *Streptomyces* R61, est apparemment constitué d'une enzyme unique, une transpeptidase qui peut être mise en évidence au moyen de la réaction $\text{Ac}_2\text{-L-Lys-D-Ala-D-Ala} + \text{Gly-Gly} \rightarrow \text{D-Ala} + \text{Ac}_2\text{-L-Lys-D-Ala-Gly-Gly}$ ou au moyen d'autres systèmes identiques à ceux précédemment utilisés pour la transpeptidase exocellulaire correspondante. Cette transpeptidase membranaire fonctionne dans une phase essentiellement lipidique qui conserve une remarquable fluidité à des températures aussi basses que -30°C .

Les molécules de transpeptidase sont les seuls sites membranaires de fixation de la pénicilline (25 picomoles par mg de protéine) et l'inhibition de l'activité enzymatique est obtenue à des concentrations en pénicillines et céphalosporines équivalentes à celles requises pour inhiber la croissance de *Streptomyces* R 61.

La transpeptidase a été extraite soit des membranes isolées, soit directement du mycélium, à l'aide d'un ammonium quaternaire, le bromure de cétyltriméthyl ammonium. Elle a été ainsi obtenue sous une forme non

sédimentable par centrifugation à 200 000 g (2 heures) et filtrable sur Sephadex G-100 ($K_D = 0,45$). Partiellement purifiée, l'enzyme membranaire solubilisée manifeste une faible activité DD-carboxypeptidasique $Ac_2-L-Lys-D-Ala-D-Ala + H_2O \rightarrow D-Ala + Ac_2-L-Lys-D-Ala$, ce qui la fait ressembler d'autant plus à la transpeptidase exocellulaire.

Le même procédé d'extraction a été appliqué à *Streptomyces risomus* (dont la carte génétique est partiellement connue) et à *Streptomyces* K15. Chez cette dernière bactérie, le système membranaire est bi-enzymatique. Il est constitué d'une transpeptidase à faible activité DD-carboxypeptidasique et d'une DD-carboxypeptidase à faible activité transpeptidasique. Après extraction, ces deux enzymes ont été séparées l'une de l'autre et partiellement purifiées.

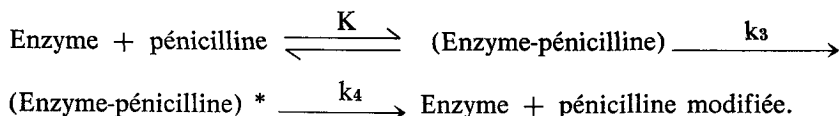
INTERACTION ENTRE PENICILLINE ET TRANSPeptIDASE (4)

En étudiant l'interaction entre les pénicillines et céphalosporines et les transpeptidases exocellulaires et membranaires, deux propriétés inattendues ont été observées :

1) Les complexes enzyme-antibiotique une fois formés, se dissocient spontanément avec une constante de vitesse variable selon l'enzyme, l'antibiotique et les conditions expérimentales ;

2) Au cours de cette dissociation, l'enzyme est réactivée et retrouve sa sensibilité initiale à l'antibiotique. Au contraire, celui-ci est libéré du complexe sous une forme chimiquement modifiée et biologiquement inactive. En d'autres termes, les pénicillines et céphalosporines sont des « substrats » des transpeptidases.

A ce jour, les interactions entre pénicillines et céphalosporines et les transpeptidases exocellulaires de *Streptomyces* R61 et R39 ont été étudiées en détail. La réaction se déroule selon le schéma :



La première étape est un processus d'équilibre rapide caractérisé par une constante de dissociation K . Le complexe ainsi formé s'isomérisé en un autre dans lequel la molécule d'antibiotique est modifiée, avec une constante de vitesse k_3 . Cette étape peut être très rapide et se dérouler à une « vitesse enzymatique ». Ainsi, par exemple, la valeur de k_3 est de 179 s^{-1} (à 25° C) pour l'interaction entre l'enzyme R61 et la benzylpénicilline.

Enfin, le complexe modifié se dissocie avec une constante de vitesse k_4 . Dans tous les cas étudiés, ce processus est lent, le temps de demi-vie variant de 40 mn à 40.000 mn selon l'enzyme et l'antibiotique.

Les valeurs des diverses constantes K , k_3 et k_4 ont été déterminées et il a été démontré que le paramètre important pour l'activité d'un antibiotique est le rapport k_3/K . Plus ce rapport est élevé, plus l'antibiotique est un puissant inhibiteur de l'enzyme.

PERSPECTIVES

Les transpeptidases reconnaissent spécifiquement peptide donneur, peptide accepteur et antibiotique à noyau β -lactame. L'identification des modifications chimiques subies par l'antibiotique lors de son interaction avec l'enzyme et la caractérisation des centres enzymatiques qui assurent respectivement les réactions de transfert, les réactions d'hydrolyse et la dégradation de l'antibiotique, constituent autant de problèmes qu'il convient de résoudre avant que l'on ne comprenne complètement comment la pénicilline tue les bactéries. Il n'est pas impossible que ces études, lorsqu'elles auront été conduites à bonne fin, n'ouvrent la voie à une recherche rationnelle d'agents antibactériens nouveaux.

Summary

Bacterial transpeptidases specifically recognize peptide donor, peptide acceptor and β -lactam antibiotics. The identification of the chemical modifications undergone by the antibiotic during its interaction with the enzyme and the characterization of the enzyme centers involved in hydrolysis, transpeptidation and breakdown of the antibiotic molecule are the next problems which must be solved in order to fully understand how penicillin kills bacteria.

Les recherches à LIEGE ont été réalisées dans le cadre d'un contrat (n° 1000) subventionné par le Fonds de la Recherche Fondamentale Collective (Bruxelles, Belgique)

BIBLIOGRAPHIE

- 1 — BLUMBERG P.M. and STROMINGER J. L.
Interaction of penicillin with bacterial cell : penicillin binding proteins and penicillin sensitive enzymes.
Bact. Rev., 1974 38, 291-335.
- 2 — CLARKE H. T., JOHNSON J. R. and ROBINSON R.
The Chemistry of Penicillin.
Princeton University Press, Princeton, New Jersey, 1949, 1-1042.
- 3 — GHUYSEN J. M.
Use of bacteriolytic enzymes in determination of wall structure and their role in cell metabolism.
Bact. Rev., 1968, 32, 425-464.
- 4 — GHUYSEN J. M., FRERE J. M., LEYH-BOUILLE M., DUSART J., NGUYEN-DISTECHE M., COYETTE J., MARQUET A., PERKINS H. R. and NIETO M.
Bacterial Transpeptidases and Penicillin.
Bull. Institut Pasteur, 1975, sous presse.
- 5 — GHUYSEN J. M., and SHOCKMAN G. D.
Biosynthesis of peptidoglycan.
In : Bacterial membranes and walls, vol. 1 (Ed. L. Leive), Dekker Inc., New York, 1973, 29-72.
- 6 — SALTON M. R. J.
The Bacterial Cell Wall.
Elsevier Publishing Co., Amsterdam, 1964.
- 7 — SCHLEIFER K. H. and KANDLER O.
Peptidoglycan types of bacterial cell walls and their taxonomic implications.
Bact. Rev., 1972, 36, 407-477.
- 8 — STROMINGER J. L.
Penicillin-sensitive enzymatic reactions in bacterial cell wall synthesis.
The Harvey Lectures, 1970, 64, 179-213.
- 9 — WELSCH M.
Antibiotiques, agents antimycobacterium, agents antifongiques.
In : Pharmacodynamie biochimique, 2^e édition, 477-640, Sciences et Lettres Ed., Liège, 1960.