

Stage de formation
17 & 18 mars 2014

Conférences

Institut français de l'Éducation

Ateliers

École normale supérieure de Lyon (site Monod)

Médiateurs solubles de l'immunité innée

Christine Montixi

Marianne Naspetti

Informations et ressources & **<http://acces.ens-lyon.fr/acces/ressources/immunité-et-vaccination>**

immunité

Introduction

L'immunité innée constitue la première ligne de défense vis-à-vis des agents pathogènes. Elle met en jeu des mécanismes :

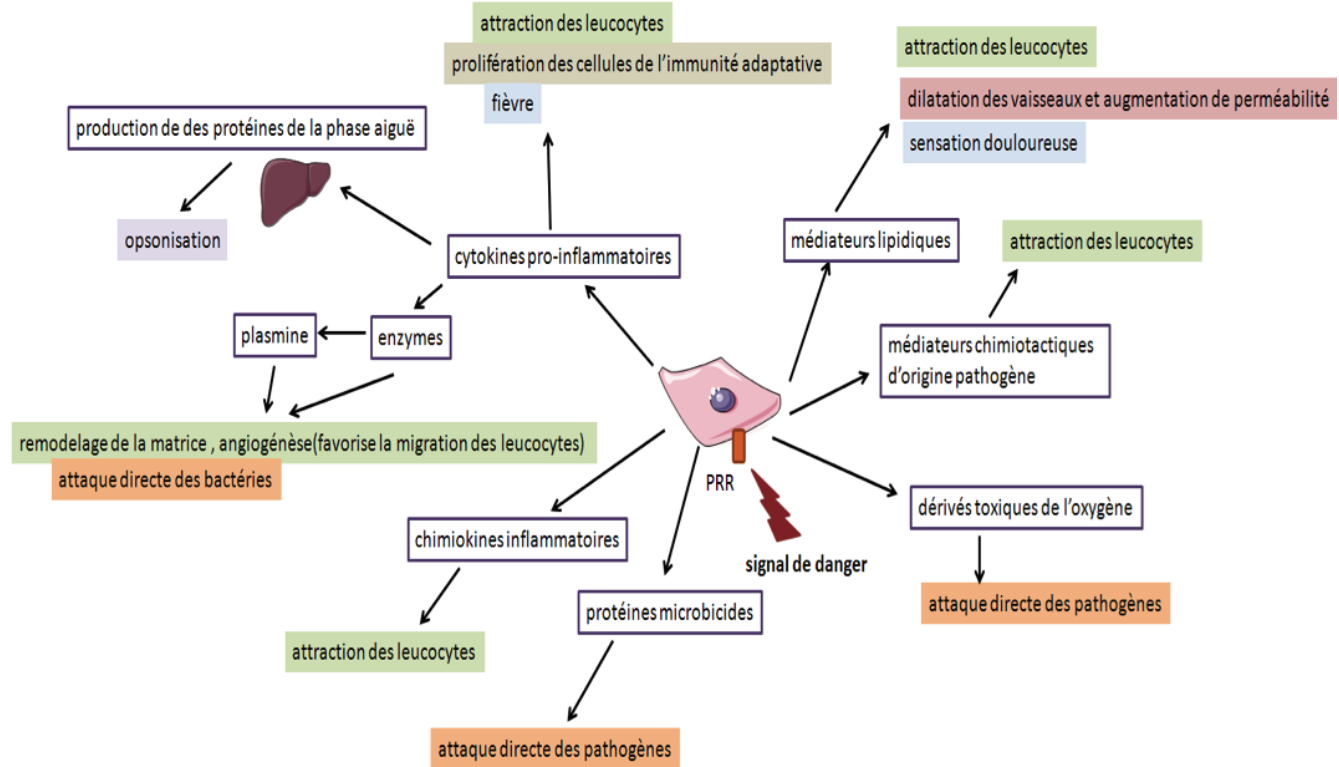
- constitutifs : la barrière cutanéomuqueuse, la phagocytose
- inductibles : la réponse inflammatoire déclenchée par des interactions entre composants infectieux et récepteurs cellulaires (TLR) ou solubles (complément).

Elle repose sur des mécanismes humoraux (**complément**, cytokines, protéines de la phase aiguë de l'inflammation, etc.) et cellulaires (**cellules à fonction phagocytaire ou lytique**, telles que les polymorphonucléaires, les cellules tueuses naturelles ou NK pour « *Natural Killer* », les macrophages).

Le premier opposant à l'infection est la barrière cutanéomuqueuse. Elle est en contact permanent avec le monde des agents infectieux. Elle présente différents systèmes qui préviennent la colonisation – première étape de la plupart des infections – systèmes qui sont de nature mécanique, chimique ou biologique. Leur déficit entraîne des manifestations pathologiques locales et/ou systémiques.

Parmi eux, de très nombreuses molécules constitutives ou induites participent à la défense anti-infectieuse : les acides gras de la peau, le **lysozyme** et la phospholipase A2 des larmes et de la salive, le pH acide de l'estomac, les enzymes digestives et sels biliaires du tractus gastro-intestinal. Les peptides antimicrobiens, produits par de nombreux types cellulaires dont les cellules spécialisées de l'immunité (polymorphonucléaires, macrophages) jouent également un rôle crucial dans cette défense passive.

Cette première barrière étant franchie, de nombreuses molécules solubles participent à la défense innée comme les cytokines, les protéines de la cascade du complément et les protéines de la phase aiguë de l'inflammation.

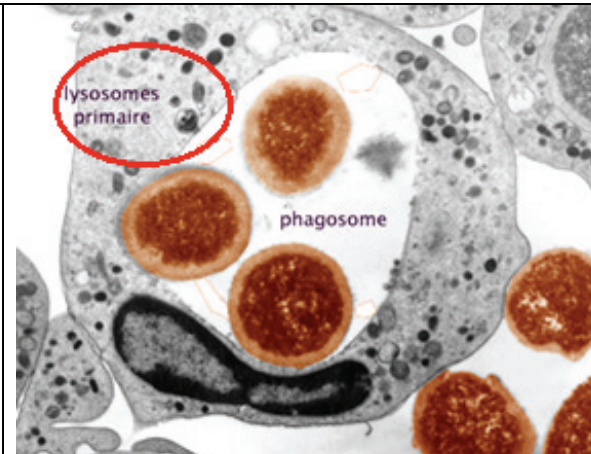
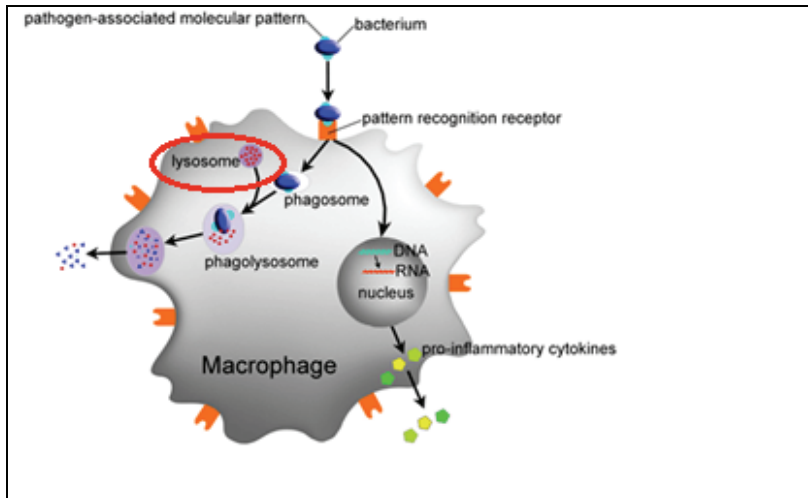


<http://accs.ens-lyon.fr/accs/ressources/immunité-et-vaccination/immunité-innée-barrières-naturelles-et-réaction-inflammatoire/>

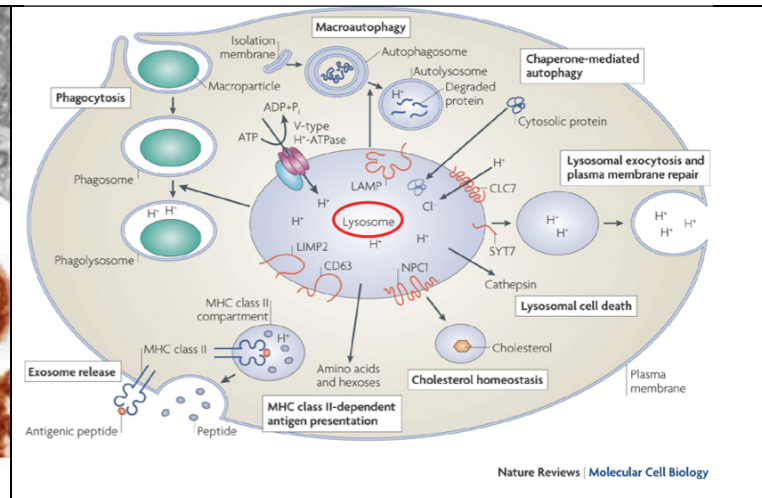
Le Lysozyme

Les facteurs humoraux de la réponse innée constituent la deuxième ligne de défense que rencontreront les micro-organismes après pénétration dans l'organisme à travers une peau ou une muqueuse lésée ou fragilisée. Il s'agit de substances solubles retrouvées dans le sérum et autres liquides de l'organisme. Parmi elles on retrouve le **lysozyme**, protéine de faible poids moléculaire, thermostable. C'est une substance d'origine lysosomiale, provenant des cellules phagocytaires et présente dans le sérum à la concentration de 1-2 µg/ml (on la retrouve également dans la salive, le mucus nasal, les larmes, le lait ou le mucus cervical).

Lysozymes, lysosomes et phagocytes



Phagocytose de levures par des polymorphonucléaires neutrophiles



Nature Reviews | Molecular Cell Biology

(a) Neutrophil

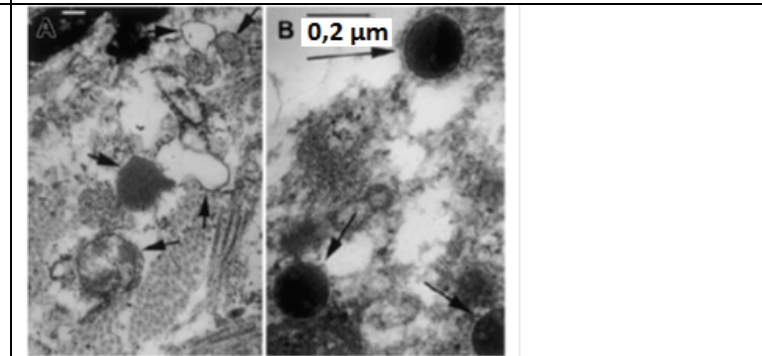
Collagénase
Lactoferrine
Lysozyme

Lysozyme
Peroxydase
autres enzymes...

Labels in the diagram: Glycogen, Multilobed nucleus, Secondary granule, Primary azurophilic granule, Phagosome.

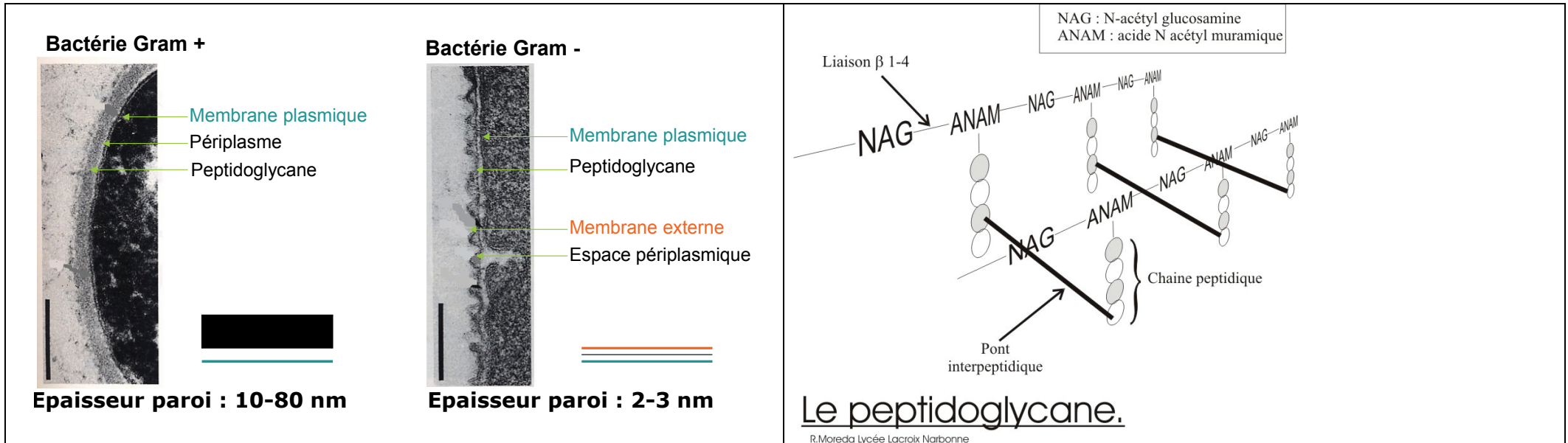
Afin de détruire le corps étranger présent à l'intérieur du phagosome, les neutrophiles ont recours à une voie associée à la libération du contenu de leurs granules.

Les neutrophiles sont en effet des cellules porteuses d'un grand nombre de granules dont le contenu est riche de divers composants (dont le lysozyme). Ainsi, les granules peuvent libérer leur contenu à l'intérieur du phagosome ou à l'extérieur de la cellule.



Micrographies (MET) de lésions 7h après une infection par *Micrococcus luteus* chez des souris normales (A) ou déficientes en lysozyme (B). Sur le cliché A, les bactéries présentent une paroi altérée (fantômes marqués par des flèches) et apparaissent intactes sur le cliché B. (Ganz *et al.*, *Blood*, 2003)

Le lysozyme permet la destruction du peptidoglycane de la paroi bactérienne en catalysant l'hydrolyse de la liaison osidique qui relie la N-acétylglucosamine et l'acide N-acétylmuramique. Le « squelette » du peptidoglycane (appelé aussi muréine) de la paroi bactérienne est en effet un copolymère constitué de l'enchaînement covalent de ces deux molécules, en alternance, sur lesquelles sont fixés des peptides qui pontent les chaînes du polymère.



C'est la première enzyme et la seconde protéine (après la myoglobine) dont la structure tridimensionnelle a été établie par radiocristallographie. Les séquences d'acides aminés et la structure tridimensionnelle des lysozymes de différentes espèces sont proches et ressemblent également à celles de l'alpha-lactalbumine, une protéine présente dans le lait.

Le lysozyme de poule est formé d'une seule chaîne protéique de forme globulaire de 129 acides aminés comportant quatre ponts disulfures et a une masse moléculaire de l'ordre de 14600 Da.

L'activité proposée ici permet d'approcher cet acteur moléculaire soluble de la réponse innée présent dans les liquides biologiques en mettant en évidence son activité lytique directe sur des bactéries.

On peut mettre en évidence l'action du lysozyme *in vitro* en utilisant des bactéries sensibles à son action telles que le coque Gram + *Micrococcus lysodeikticus*.

Matière d'œuvre

<p>Matériel :</p> <ul style="list-style-type: none"> - Tampon phosphate pH 6,24 : 100 mL de dihydrogénophosphate de potassium 0,066 M ajusté à pH 6,24 avec KOH 1M. - Lysozyme de blanc d'œuf (<i>Lysozyme from chicken egg white</i>, Sigma #L3790-1mL, solution stock en tampon phosphate à 10 mg/mL) - Suspension de <i>Micrococcus lysodeikticus</i> (<i>Micrococcus lysodeikticus</i>, ATCC No 4698, Sigma # M3770-5g) : 0,015% en tampon phosphate (p/V) <p>15 mg de bactéries lyophilisées dans 100 mL de tampon phosphate</p> <ul style="list-style-type: none"> - Une souche d'<i>E. coli</i> isolée sur une gélose nutritive (à titre de contrôle) 	<ul style="list-style-type: none"> - Un spectrophotomètre réglé sur 450 nm et cuves en plastique à usage unique - Logiciel Excel (par exemple) ou autre tableur
---	---

Approche cinétique et quantitative (protocole issu de la fiche technique « *Enzymatic Assay of Lysozyme* » EC 3.2.1.17, Sigma)

- Après préchauffage de la lampe, utiliser le spectrophotomètre en mode « Acquisition manuelle » ou en mode « Cinétique » à la longueur d'onde 450 nanomètres ; réaliser un « blanc » à l'aide d'une solution de tampon phosphate puis mesurer l'absorbance des suspensions bactériennes (volume final 2,9 mL) ;
- introduire ensuite une cuve contenant 2,9 mL de suspension bactérienne (*Micrococcus lysodeikticus* puis *Escherichia coli*) ;
- mesurer l'absorbance pendant deux minutes (temps entre chaque point de mesure 5 s) puis introduire dans la cuve 100 µL de la solution de lysozyme à tester (0,3 ; 3,30 puis 300 µg/mL, concentrations finales) ou 100 µL de tampon potassium (contrôle négatif) ;
- continuer la mesure d'absorbance pendant au moins cinq minutes ;
- les données sont exportées au format Excel pour être exploitées dans ce programme ;
- pour chaque courbe, déterminer le temps correspondant à une diminution de moitié de l'absorbance initiale (T50%) puis tracer le graphique $T50\% = f([\text{Lysozyme}])$.

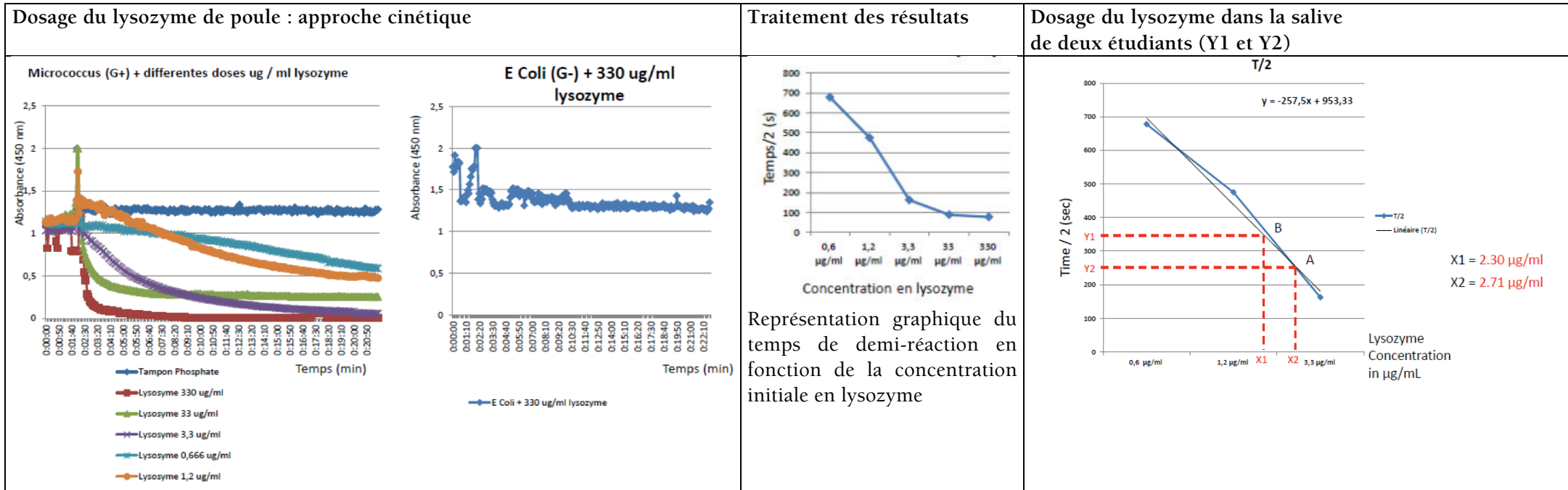
REMARQUES

- Une unité de lysozyme est responsable de la diminution de l'absorbance à 450 nanomètres de 0,001/min à 25°C.
- La vitesse initiale de réaction (mesurée par la pente à l'origine de l'ajout de lysozyme pendant au moins une minute) est directement proportionnelle à la concentration en lysozyme dans une gamme allant de 0,2-2 µg/ml.

BIBLIOGRAPHIE

- D. Shugar (1952), « The measurement of lysozyme activity and the ultra-violet inactivation of lysozyme ». *Biochimica et Biophysica Acta*, 8(3), p. 302-209.

Exemples de résultats obtenus par des élèves de Terminale S lors d'un stage en laboratoire (association « Tous chercheurs ») :



Exploitations pédagogiques

DOCUMENT 1 : fiche composition d'un antiseptique local (*Lysopaine*) préconisé en cas de mal de gorge peu intense, sans fièvre ou d'aphtes, de petites plaies de la bouche :

COMPOSITION (EXPRIMÉE PAR COMPRIMÉ)

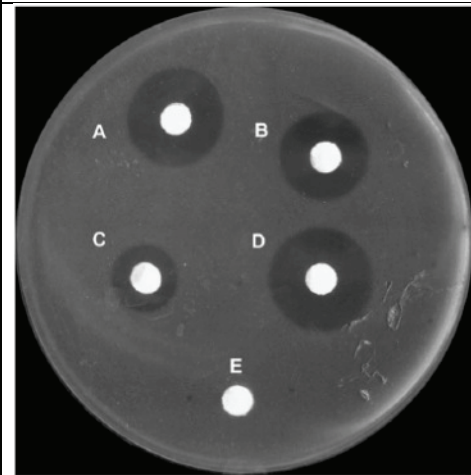
- Principes actifs :
Cétylpyridinium 1,5 mg ; Lysozyme 20,0 mg
- Excipients :
Saccharine (E954) ; Magnésium stéarate (E572) ; Sorbitol (E420) (effet notoire) ; Arôme menthe : Menthe poivrée huiles essentielles ; Gomme arabique (E414)

CONTRE-INDICATIONS

- Ne pas utiliser chez l'enfant de moins de 6 ans.
- Antécédents d'allergie à l'un des composants du médicament (dont allergie au lysozyme ou allergie à l'œuf).

DOCUMENT 2 : création biotechnologique d'un « lait de vache maternisé » enrichi en lysozyme humain recombinant :

	Lait humain	Lait de vache
Valeur énergétique (kcal/litre)	690	705
Protéines (g/l)	10.6 g/l	32.0 g/l
Caséines	3.7	26.0
Protéines solubles	6.9	6.0
α-lactalbumine	3.6	2.7
β-lactalbumine	-	1.5
Lactoferrine	1.5	traces
Lysozyme	3.0	traces
Albumine sérique	0.5	0.3
Immunoglobulines	1.0	0.7
IgA sécrétoires	1.00	-
IgG	0.01	-
IgM	0.01	-
IgD	traces	-



Activité lytique contre *Micrococcus lysodeikticus* du lysozyme humain commercial (HLZ), du lysozyme humain recombinant purifié à partir du lait de vache recombinante (rHLZ), et du lysozyme du blanc d'œuf de poule (Hew-LZ). Les disques de papier stériles sont imprégnés de 2µg de protéines testées à 0,2 mg/mL ou d'eau stérile (contrôle) et déposées sur une gélose préalablement ensemencée par *Micrococcus lysodeikticus*.
A : HLZ commercial ; B : rHLZ purifié avant dessalage ; C : lysozyme de blanc d'œuf Hew-LZ ; D : rHLZ purifié ; E : témoin eau distillée.

Characterization of Bioactive Recombinant Human Lysozyme Expressed in Milk of Cloned Transgenic Cattle

Bin Yang¹, Jianwu Wang¹, Bo Tang², Yufang Liu¹, Chengdong Guo¹, Penghua Yang¹, Tian Yu¹, Rong Li², Jianmin Zhao², Lei Zhang², Yunping Dai¹, Ning Li^{1*}

¹ State Key Laboratory for Agrobiotechnology, China Agricultural University, Beijing, People's Republic of China, ² Beijing GenProtein Biotechnology Company, Beijing, People's Republic of China

PloS One, mars 2011

Des chercheurs chinois ont réussi à produire une vache transgénique en bonne santé exprimant un lysozyme humain recombinant. Les travaux publiés dans la revue « PLoS One » détaillent le développement de clones bovins transgéniques capables d'exprimer dans leur lait la protéine rHLZ, un lysozyme bactéricide qui protège les nourrissons des infections microbiennes. Selon les chercheurs, le lysozyme humain recombinant obtenu montre les mêmes propriétés physico-chimiques que la protéine humaine naturelle. Par ailleurs, la composition du lait transgénique (teneur en lactose, protéines totales, matières grasses et matières solides) diffère peu de la composition du lait conventionnel.

Activité catalytique contre *Micrococcus lysodeikticus*, déterminée par méthode turbidimétrique. Exprimée en U/mg (unités internationales)

	Concentration (mg/ml) ¹	Activity (mean ± S.D., U/mg)
Commercial HLZ	0.901	114,413.8 ± 22,470.78
rHLZ	0.1966	117,089.3 ± 9,471.50
Hew-LZ	86.3764	42,604.25 ± 5,657.47

The concentration of HLZ and rHLZ was quantified by ELISA. The commercial hew-LZ was quantified by UV spectrophotometer.

HLZ is purified lysozyme from human milk that was purified using the same methodology used to purify rHLZ. Hew-LZ is hen egg white lysozyme.

Considérations évolutives

Le lysozyme est produit par de nombreux organismes évolutivement éloignés. Cette observation a été le point de départ de différentes études sur l'évolution du lysozyme et de la caractérisation de différentes familles de lysozymes. En 1932, Fleming fait l'observation que les lysozymes issus de différents tissus et sécrétions ont des capacités antibactériennes assez variables. De manière générale, le terme lysozyme est utilisé pour désigner le lysozyme de blanc d'œuf de poule, qui est en effet le représentant classique de ce type d'enzyme.

Avec le développement des études sur le lysozyme, il est vite devenu évident qu'il existait des lysozymes distincts de celui du blanc d'œuf de poule, découverts chez les oiseaux, les phages, les bactéries, les mycètes, les invertébrés et les plantes. A la suite de cela, les lysozymes ont été divisés en différents types (voir document n° 1 chez les animaux) : lysozymes de type-c (pour « chicken »), lysozymes de type-g (pour « goose »), lysozymes de type-i (pour « invertebrate »), les lysozymes de plantes, les lysozymes bactériens et les lysozymes phagiques. Le lysozyme de blanc d'œuf de poule est associé aux lysozymes de type-c.

Dans chacun des grands phylums dans lequel le lysozyme a été identifié, celui-ci peut jouer des rôles différents. Les génomes de bactériophages codent des lysozymes dont le rôle est de favoriser le relargage de virions par la lyse de la cellule hôte ou de faciliter l'infection. Les lysozymes bactériens jouent un rôle dans l'autolyse, l'élongation et la division cellulaire. Chez les végétaux, les lysozymes ont également une activité chitinase et auraient un rôle protecteur aussi bien contre les infections bactériennes que fongiques. Chez certains organismes (ruminants, insectes), le lysozyme est exprimé à différents endroits du tractus digestif. Ces enzymes auraient un rôle digestif et permettraient entre autre d'utiliser les bactéries comme source d'énergie, de phosphore et d'azote.

Les lysozymes diffèrent par leurs structures, leurs propriétés physicochimiques, et leurs critères immunologiques. Le seul critère commun à toutes ces enzymes est la capacité à cliver la liaison β -glycosidique entre le C-1 du NAM et le C-4 du NAG du PG.

On peut dès lors s'interroger sur la parenté de ces différentes molécules et sur leur origine commune éloignée, signe de la conservation de mécanismes fondamentaux de la vie cellulaire.

Outils

Matériel :	Séquences disponibles :																																
<ul style="list-style-type: none"> - Logiciel Rastop - Logiciel anagène 	<table border="1"> <thead> <tr> <th data-bbox="1211 1002 1473 1038">Espèce et nom du Lysozyme</th> <th data-bbox="1480 1002 1659 1038">Origine et référence des données</th> <th data-bbox="1666 1002 1767 1038">Protéine Nbre aa</th> <th data-bbox="1774 1002 1883 1038">Fichier .pdb</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td data-bbox="1211 1054 1473 1102">Gallus gallus (Poule) Lysozyme de type C</td> <td data-bbox="1480 1054 1659 1102">NCBI Protéine 2VB1_A</td> <td data-bbox="1666 1054 1767 1102">129 aa</td> <td data-bbox="1774 1054 1883 1102">2VB1</td> </tr> <tr> <td data-bbox="1211 1118 1473 1166">Homo sapiens (Homme) Lysozyme de type C</td> <td data-bbox="1480 1118 1659 1166">NCBI Protéine 1JWR_A</td> <td data-bbox="1666 1118 1767 1166">130 aa</td> <td data-bbox="1774 1118 1883 1166">1JWR</td> </tr> <tr> <td data-bbox="1211 1182 1473 1230">Anser anser anser (Goose = Oie) Lysozyme de type g</td> <td data-bbox="1480 1182 1659 1230">NCBI Protéine 153L</td> <td data-bbox="1666 1182 1767 1230">185 aa</td> <td data-bbox="1774 1182 1883 1230">153 L</td> </tr> <tr> <td data-bbox="1211 1246 1473 1294">Bombyx mori (Papillon) Lysozyme de type C</td> <td data-bbox="1480 1246 1659 1294">NCBI Protéine 1GD6_A</td> <td data-bbox="1666 1246 1767 1294">119 aa</td> <td data-bbox="1774 1246 1883 1294">1GD6</td> </tr> <tr> <td data-bbox="1211 1310 1473 1358">Ruditapes philippinarum (Tapes japonica) Lysozyme de type i</td> <td data-bbox="1480 1310 1659 1358">NCBI Protéine 2DQA_A</td> <td data-bbox="1666 1310 1767 1358">124 aa</td> <td data-bbox="1774 1310 1883 1358">2DQA</td> </tr> <tr> <td data-bbox="1211 1374 1473 1422">Hordeum vulgare (Orge) Lysozyme de type c</td> <td data-bbox="1480 1374 1659 1422">NCBI Protéine 2BAA</td> <td data-bbox="1666 1374 1767 1422">243 aa</td> <td data-bbox="1774 1374 1883 1422">2BAA</td> </tr> <tr> <td data-bbox="1211 1437 1473 1485">Mytilus galoprovincialis (Moule méditerranéenne) Lysozyme de type C</td> <td data-bbox="1480 1437 1659 1485">NCBI Protéine AFM43653</td> <td data-bbox="1666 1437 1767 1485">154 aa</td> <td data-bbox="1774 1437 1883 1485">Inexistant</td> </tr> </tbody> </table>	Espèce et nom du Lysozyme	Origine et référence des données	Protéine Nbre aa	Fichier .pdb	Gallus gallus (Poule) Lysozyme de type C	NCBI Protéine 2VB1_A	129 aa	2VB1	Homo sapiens (Homme) Lysozyme de type C	NCBI Protéine 1JWR_A	130 aa	1JWR	Anser anser anser (Goose = Oie) Lysozyme de type g	NCBI Protéine 153L	185 aa	153 L	Bombyx mori (Papillon) Lysozyme de type C	NCBI Protéine 1GD6_A	119 aa	1GD6	Ruditapes philippinarum (Tapes japonica) Lysozyme de type i	NCBI Protéine 2DQA_A	124 aa	2DQA	Hordeum vulgare (Orge) Lysozyme de type c	NCBI Protéine 2BAA	243 aa	2BAA	Mytilus galoprovincialis (Moule méditerranéenne) Lysozyme de type C	NCBI Protéine AFM43653	154 aa	Inexistant
Espèce et nom du Lysozyme	Origine et référence des données	Protéine Nbre aa	Fichier .pdb																														
Gallus gallus (Poule) Lysozyme de type C	NCBI Protéine 2VB1_A	129 aa	2VB1																														
Homo sapiens (Homme) Lysozyme de type C	NCBI Protéine 1JWR_A	130 aa	1JWR																														
Anser anser anser (Goose = Oie) Lysozyme de type g	NCBI Protéine 153L	185 aa	153 L																														
Bombyx mori (Papillon) Lysozyme de type C	NCBI Protéine 1GD6_A	119 aa	1GD6																														
Ruditapes philippinarum (Tapes japonica) Lysozyme de type i	NCBI Protéine 2DQA_A	124 aa	2DQA																														
Hordeum vulgare (Orge) Lysozyme de type c	NCBI Protéine 2BAA	243 aa	2BAA																														
Mytilus galoprovincialis (Moule méditerranéenne) Lysozyme de type C	NCBI Protéine AFM43653	154 aa	Inexistant																														

Analyses

- Lancer le logiciel Rastop ; ouvrir les images du dossier Lysozyme (fichiers .pdb) en fonction des besoins : ouvrir les différentes molécules chacune dans une fenêtre.
 - Ouvrir plusieurs fenêtres avec Fichier, Nouveau...
 - Réorganiser les fenêtres
 - Cliquer dans une fenêtre pour la rendre active. Le bandeau supérieur de la fenêtre devient bleu.
 - Charger un fichier de molécule dans chaque fenêtre.
 Chacune des molécules se manipule indépendamment des autres.
- Afficher les structures secondaires (on peut visualiser aisément ce type de structure en affichant le mode « Rubans »).
- Repérer les hélices alpha et les feuilletés bêta (onglet « Atomes » – « colorer » – « structures ») ainsi que l'encoche contenant le site actif.
- Charger les séquences primaires des différentes formes de lysozyme en utilisant le logiciel anagène (fichiers .edi).
- Procédez à une comparaison de séquences par alignements multiples avec discontinuité sur des groupes de séquences que vous aurez préalablement déterminés en choisissant une séquence de référence. Construire- en changeant la séquence de référence- la matrice des identités (en pourcentages) à partir des séquences fournies.

A titre d'exemple :

% d'identité	<i>Gallus gallus</i> (Poule)	<i>Homo sapiens</i> (Homme)	<i>Bombyx mori</i> (Papillon)	<i>Mytilus galoprovincialis</i> (Moule)	<i>Hordeum vulgare</i> (Orge)
<i>Gallus gallus</i> (Poule)	100				
<i>Homo sapiens</i> (Homme)	60	100			
<i>Bombyx mori</i> (Papillon)	44.5	42	100		
<i>Mytilus galoprovincialis</i> (Moule)	25.3	24	32.5	100	
<i>Hordeum vulgare</i> (Orge)	6.6	8.6	9.5	13.5	100

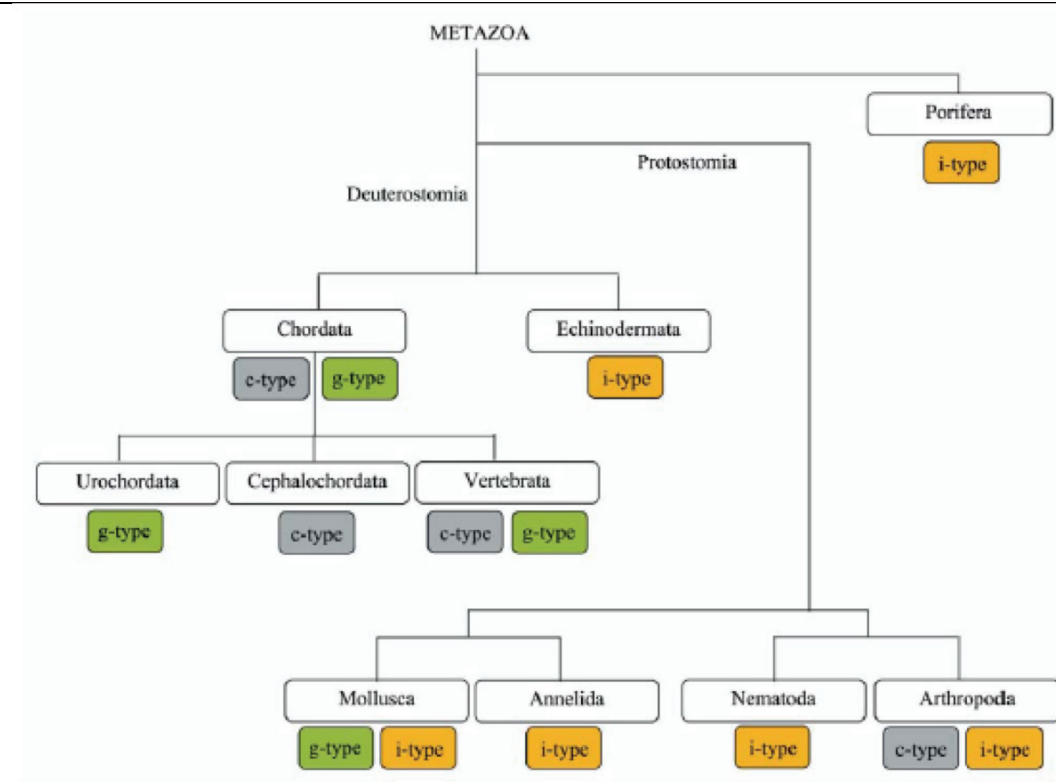
NB : Ces résultats ont été obtenus en choisissant une séquence de référence (la première) et en maintenant toutes les autres. Du fait de l'algorithme de comparaison, ces résultats peuvent être légèrement différents de ceux obtenus par comparaison des séquences deux à deux.

On admet que lorsque deux séquences protéiques présentent plus de 20% de similitudes, ces similitudes ne peuvent pas être dues au hasard et témoignent d'une parenté entre les séquences. La similitude est une quantité qui se mesure en pourcentages d'identité, cette dernière étant définie comme une ressemblance parfaite entre deux séquences.

- Noter les différences et ressemblances à l'échelle des séquences et des structures et conclure en s'appuyant sur les données des documents joints.

DOCUMENT 1 : Comparaison des différents types de lysozymes retrouvés dans le monde animal

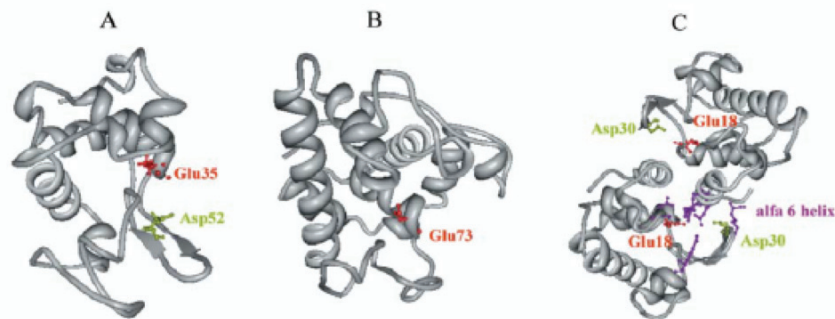
Données issues de L. Callewaert & C. W. Michiels (2010)



Distribution des différents types de lysozymes décrits dans le règne animal

- Le Type C : c'est une forme retrouvée chez la plupart des Vertébrés dont les Mammifères ; l'archétype est le lysozyme du blanc d'œuf de poule. Mis à part les Mammifères, d'autres Vertébrés tels que les poissons, les oiseaux, les reptiles et les amphibiens produisent du lysozyme de type C ou présentent le gène de cette enzyme. Sur la base des séquences génomiques disponibles, on ne retrouve pas de lysozyme de type C chez les Invertébrés autres que les Arthropodes et les Céphalochordés.
- Le Type G : décrit initialement dans le blanc d'œuf d'oie (*Goose* en anglais), ce lysozyme est retrouvé dans les œufs de nombreuses espèces d'oiseaux, majoritairement ou avec le lysozyme de type C. Considéré initialement comme une forme uniquement présente chez les Vertébrés, des gènes fonctionnels ont depuis été décrits chez certains Invertébrés, mollusques bivalves et Urochordés.
- Le Type I : ou « type invertébré » ; la première séquence décrite fut celle d'un mollusque bivalve marin *Tapes japonica* (TjL ; Ito *et al.*, 1999). Les connaissances actuelles indiquent que ce type de Lysozyme est présent au moins dans les phyla des Mollusques, Annélides, échinodermes, Nématodes et Arthropodes (mais pas chez les vertébrés).

Ribbon diagrams of three-dimensional structure of (A) HEWL (Protein Data Bank, <http://www.rcsb.org/pdb/>, entry 2VBI), (B) GEWL (PDB, entry 153L) and (C) dimer of TjL (PDB, entry 2DQA).

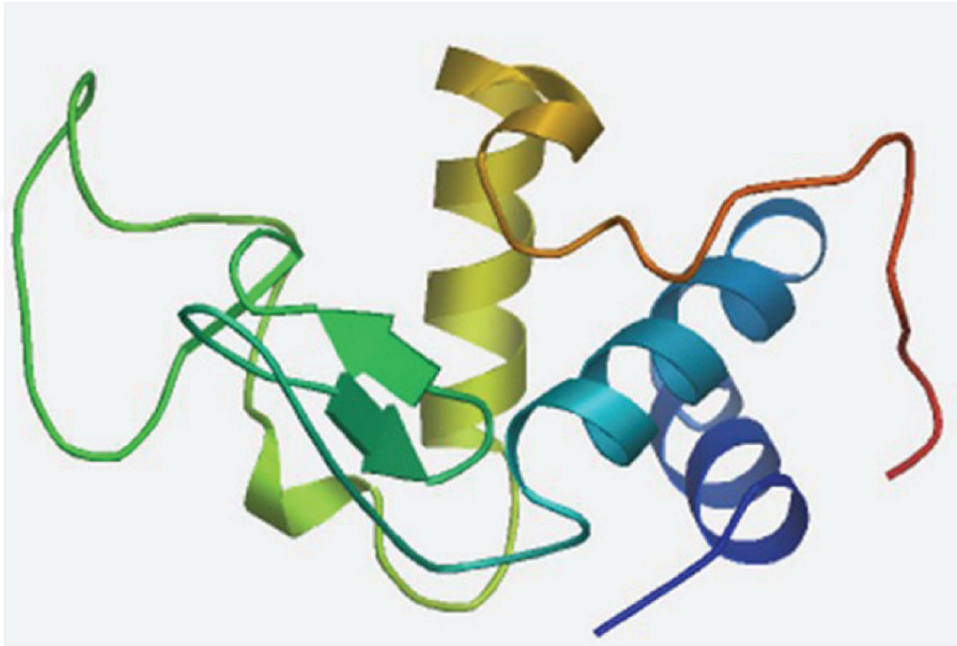


- A : Lysozyme du blanc d'œuf de poule (type C) ;
B : Lysozyme de type G ;
C : Lysozyme de type I (*Tapes japonica*).

Bien que les similitudes dans la structure primaire de ces protéines soient limitées, leur structure 3D présente de frappantes similarités avec deux types de domaines séparés par une encoche profonde contenant le site actif, l'un consistant principalement en un feuillet bêta plissé et l'autre principalement constitué d'hélices alpha, y compris dans le cas du lysozyme de type I qui présente par ailleurs une structure dimérique.

DOCUMENT 2 : Caractéristiques du lysozyme de type C de la moule méditerranéenne

Données issues de Q. Wang *et al.* (2013)



```

M.galloprovincialis MPSCGGILFVSIILLVVLVGVSYGATETK--CQVVQALRNQ--GVP-DSDLRD... 84
C.sinensis MIVFN-VRFVLVLLMIET--SRAATETK--CQVVQALRAQ--GVTSDSEL... 83
S.nigrimanum --MNTLVFVTVILLVSNVPAARQFTD--CELVRALEQN--GFFENQLAD... 83
A.gambiae ---MKVFFTVLLAI VACCAVARAKTFGR--CELAKALANN---GIKASLP... 81
P.includens --MQKLTVFL--AVAALCLSCAKYFKTM--CELVHELRRQ---GFFEDK... 83
M.sexta --MYKLVIF---ALFAPAYHSEAKHFSR--CELVHELRRQ---GFFENL... 80
M.domestica ----MKFFIVLVAAALAAPAMGKTFTF--CELAREMYAL---GVPK... 81
O.nubilalis --MARLAVVVL--FVVAALWSEAKILKR--CQIARELRSQ---GFFESQ... 82
D.melanogaster ----MKAFVICALTLTAVATQARTMDR--CELAREMSKL---GVP... 81
S.gregaria --MRTSVAVLLGIALVLVLSGDAKELQR--CEIVSALERH---GITSD-L... 83
P.americana --MERTLMML--VALAAIVTPTATVYSR--CGLVQALRAQ---GFGD--L... 81
H.discus hannai ---MMGPTTILSLLAVAMVAVDGRFYSK--CGLASELVSQ---HGINR... 82
D.variabilis ----MQLHVPLALFVLLSAAAKYGR--CELASILVRN---GIPRNV... 79
N.japonicas ----MRVLPALLLVAVGASEAKIFRR--CEFAELLERR---YLSREDI... 80
P.monodon ----MRILPLALLVGLLAVSDAKVFRK--CEFAELLETR---YLSR... 80
F.chinensis ----MRVLPALLLVGLLAVSDAKVFGK--CEFAELLETR---YLSR... 80
L.vannameli ----MRVLPALLGALLAASDAKVFGR--CEFAELLETR---YLSR... 80
S.rhombus ----MKCLLFL--LLVAVAGAKVFRK--CELAELLESYGMNHYRGLAD... 79
B.taurus ----MKALLILGLLLSVAVQGKTFKR--CELAELLESYGMNHYRGLAD... 83
H.sapiens -----KVFPER--CELAELLESYGMNHYRGLAD... 65
    
```

```

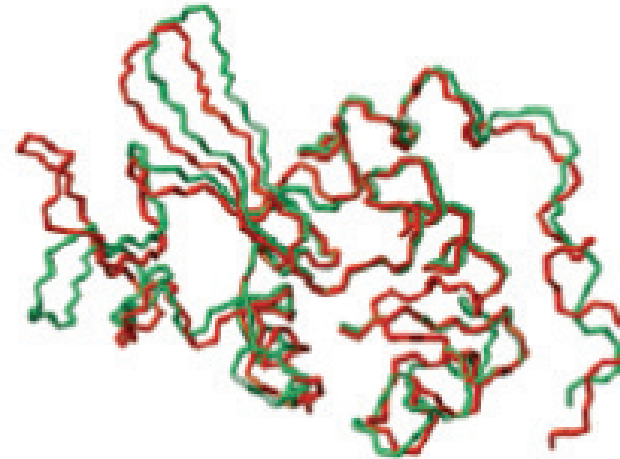
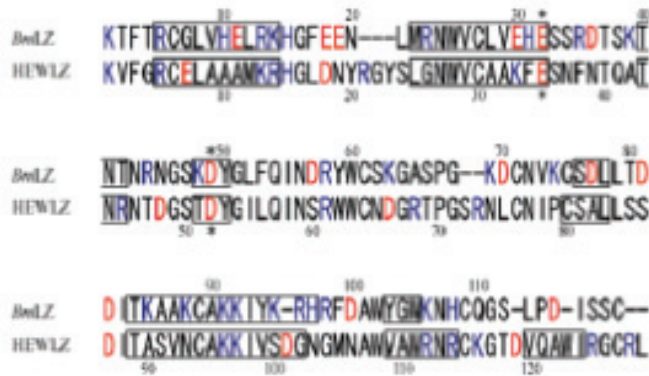
M.galloprovincialis GRPSGTSTSIICNRVNTYGCADSDTSLTNSD... 154
C.sinensis GKSNGYSGTICNRLRTNGCQDSGSSFLNSD... 155
S.nigrimanum G-----QGRTEG--DCHICENLNDDD... 141
A.gambiae D-----SGYGSN--DCHICENLNDDD... 140
P.includens S-----KTSPTGKH--DCHICENLNDDD... 141
M.sexta S-----NGSTPGKH--DCHICENLNDDD... 138
M.domestica QPS-----NGRFSYNECHLSDALLTDN... 141
O.nubilalis T-----RSGFAGKH--DCHICENLNDDD... 140
D.melanogaster EPA-----DGRFSYNECHLSDALLTDN... 141
S.gregaria G-----IGKVAG--DCHICENLNDDD... 141
P.americana G-----QGGVGG--DCHICENLNDDD... 139
H.discus hannai DPQ-----DGRKTKNGCHPCHSDYQNSN... 146
D.variabilis S-----PGRHNVCVHSCSALKSDMLPSI... 139
M.japonicas D-----SSYGNACGIFCSDLMSDD... 158
P.monodon G-----SDYGNVCGIFCSDLMSDD... 158
F.chinensis G-----SDYGNVCGIFCSDLMSDD... 158
L.vannameli G-----SDYGNVCGIFCSDLMSDD... 158
S.rhombus NNG-----QTF-TSNAAGIISCSALLTD... 143
B.taurus NDG-----KTFKAVNGCGVCSGALLQD... 147
H.sapiens NDG-----KTFKAVNGCGVCSGALLQD... 130
    
```

Structure en 3D de MgCLYZ lysozyme de type C de *Mytilus galloprovincialis*

Alignements multiples de la séquence primaire du lysozyme de type C de *Mytilus galloprovincialis* (MgCLYZ) avec d'autres lysozymes de type C orthologues dans Genbank

DOCUMENT 3 : Comparaison du lysozyme d'insecte *Bombyx mori* (BmLZ) et du lysozyme de poule (HEWLZ).

Données issues de A. Matsuura *et al.* (2002)



Alignement des séquences protéiques de HEWLZ et BmLZ : les * correspondent aux résidus catalytiques, les encadrés aux régions présentant des structures secondaires

Structures 3D superposées de HEWLZ (orange) et BmLZ (vert)

BIBLIOGRAPHIE

- L. Callewaert et C. W. Michiels (2010), « Lysozymes in the animal kingdom », *Journal of Biosciences*, vol. 35, n° 1, p. 127-160.
- Q. Wang *et al.* (2013), « A novel C-type lysozyme from *Mytilus galloprovincialis* : insight into innate immunity and molecular evolution of invertebrate C-type lysozymes », *PLoS One*, vol. 8, n° 6.
- A. Matsuura *et al.* (2002), « Structural analysis of an insect lysozyme exhibiting catalytic efficiency at low temperatures », *Biochemistry*, vol. 41, n° 40, p. 12086-12092.
- B. Yang *et al.* (2011), « Characterization of bioactive recombinant human lysozyme expressed in milk of cloned transgenic cattle », *PLoS One*, vol. 6, n° 3.
- S. Gordon, J. Todd et Z. A. Cohn (1974) « *In vitro* synthesis and secretion of lysozyme by mononuclear phagocytes », *The Journal of Experimental Medicine*, vol. 139, n° 5, p. 1228-1248.
- Y. Ito *et al.* (1999), « Amino acid sequences of lysozymes newly purified from invertebrates imply wide distribution of a novel class in the lysozyme family », *European Journal of Biochemistry*, n° 259 p. 456-461.