

stage de formation
5 & 6 février 2015

atelier n° 3

Les médiateurs solubles de l'immunité innée : exemple du Lysozyme

Christine Montixi
Marianne Naspetti

contact ✉ nathalie.davoust-nataf@ens-lyon.fr
informations et ressources ✉ <http://acces.ens-lyon.fr/acces/ressources/immunite-et-vaccination>

immunité
innée



Cette œuvre est mise à disposition selon les termes de la
[Licence Creative Commons Attribution - Pas d'Utilisation Commerciale -](#)
[Partage dans les Mêmes Conditions 4.0 International](#)

Les médiateurs solubles de l'immunité innée : exemple du Lysozyme

Christine Montixi, lycée Marie-Curie & Marianne Naspetti, lycée Marseilleveyre,
enseignantes de BGB & SVT, académie d'Aix-Marseille, équipe ACCES, IFE-ENS de Lyon

INTRODUCTION

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

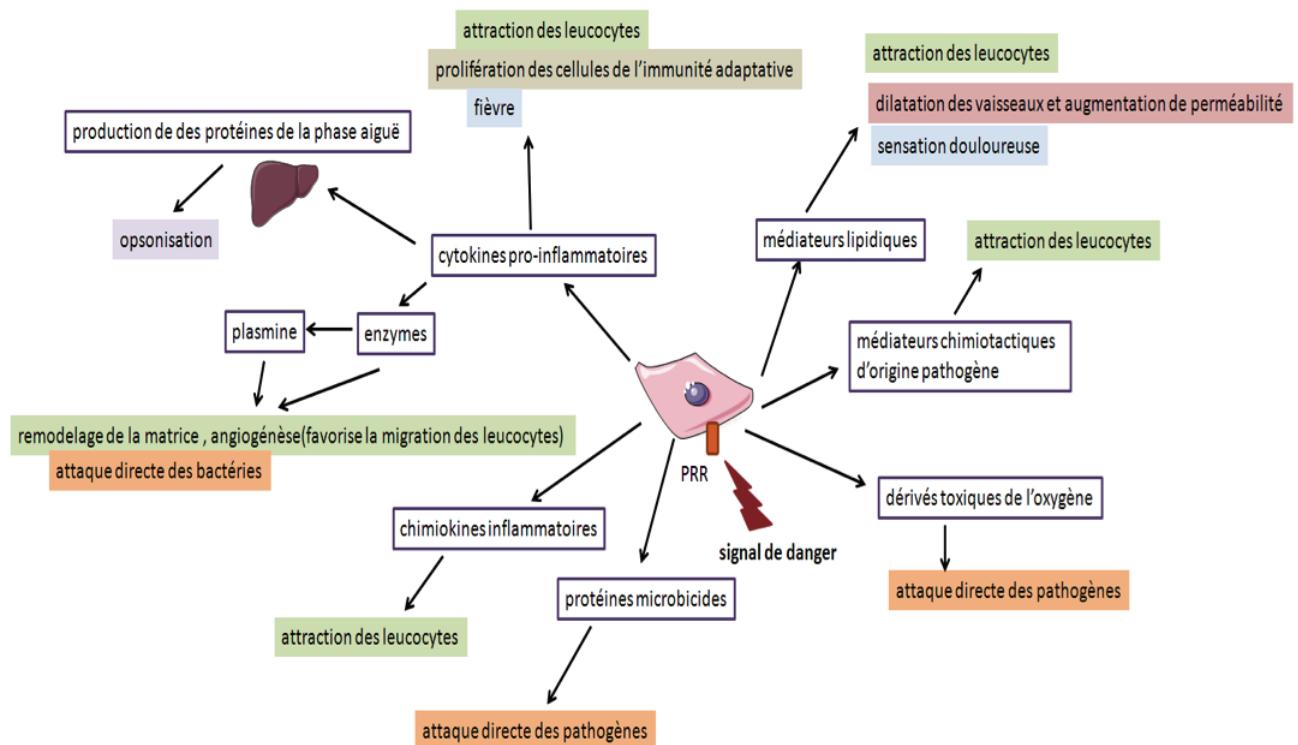
- constitutifs : la barrière cutanéomuqueuse, la phagocytose
- inducibles : la réponse inflammatoire déclenchée par des interactions entre composants infectieux et récepteurs cellulaires (TLR) ou solubles (complément).

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 polynucléaires, les cellules tueuses naturelles ou NK pour *Natural Killer*, les macrophages, etc.).

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 naturelle (PN, 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://acces.ens-lyon.fr/acces/ressources/immunite-et-vaccination/immunite-innee-barrières-naturelles-et-reaction-inflammatoire/>

LE LYSOZYME ET LES PEPTIDES ANTIMICROBIENS

Les facteurs chimiques de la réponse innée constituent une ligne de défense importante que rencontreront les micro-organismes sur la barrière cutanéomuqueuse ou 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, d'**origine lysosomiale**, provenant des cellules phagocytaires et présente, entre autres, dans le sérum à la concentration de 1-2 µg/ml. On la retrouve également dans divers liquides biologiques, comme la salive, le mucus nasal, les larmes, le lait ou le mucus cervical.

L'immunité innée fait intervenir en outre de nombreux **peptides dotés d'activité antimicrobienne**. Parmi ces peptides, on dénombre différentes familles chez l'homme telles que les **cathélicidines**, et les **défensines**.

- Les **défensines** (peptides cationiques non glycosylés riches en feuillets β) peuvent être classées en deux groupes : les α **défensines** (HBD-1 et HBD-2) produites dans la peau et le *tractus respiratoire* et les α **défensines** (ou cryptidines) présentes au

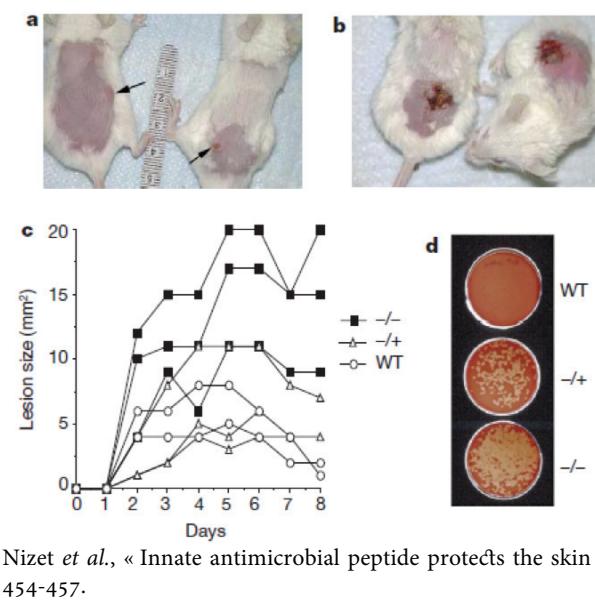
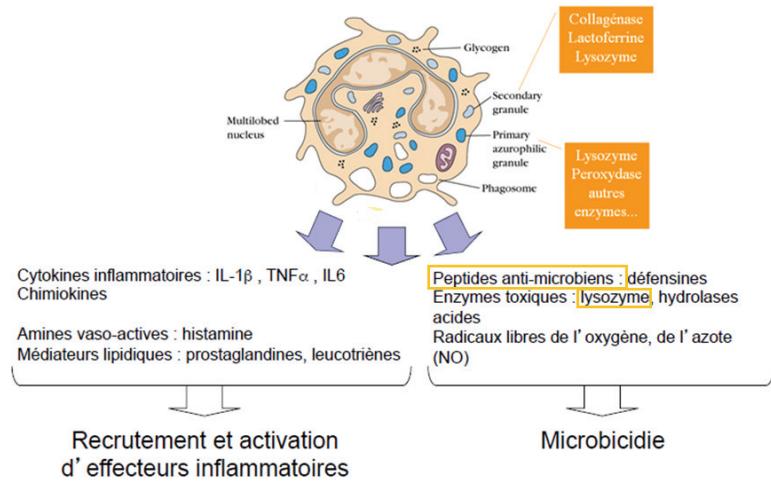
sein de certains granules sécrétaires des leucocytes ou de cellules immunitaires spécialisées.

- Le terme **cathélicidine** désigne des protéines contenant un domaine « cathelin like » ainsi qu'un domaine cationique à activité antimicrobienne. Ce dernier est clivé à partir de la protéine précurseur pour donner la forme mature du peptide antimicrobien nommé peptide cathélicidine. Chez les mammifères, les structures de ces peptides sont variées mais la plus commune est linéaire, adoptant une structure d'hélice α dans un environnement mimant une membrane biologique. Un seul gène codant pour une cathélicidine a pu être retrouvé chez l'homme : son produit, hCAP-18 (*Human cathelicidin antimicrobial protein*), donne naissance à son peptide carboxy-terminal, le **LL-37**.

Ces protéines et peptides antimicrobiens sont produits par de multiples types cellulaires : glandes sous-muqueuses, cellules épithéliales, cellules « spécialisées » de l'immunité naturelle (Polynucléaires neutrophiles, Macrophages). Selon les cas, leur action est extracellulaire, intracellulaire (sur des microorganismes phagocytés) ou les deux.

Quelques données pour illustrer le rôle *in vivo* du lysozyme et des peptides antimicrobiens

Production de protéines et peptides antimicrobiens par les cellules spécialisées de l'immunité naturelle (Polynucléaires neutrophiles, Macrophages)



Nizet *et al.*, « Innate antimicrobial peptide protects the skin from invasive bacterial infection », *Nature*, 2001, n° 414 ; p. 454-457.

Rôle *in vivo* chez la souris des cathélicidines lors d'une infection par des streptocoques du groupe A

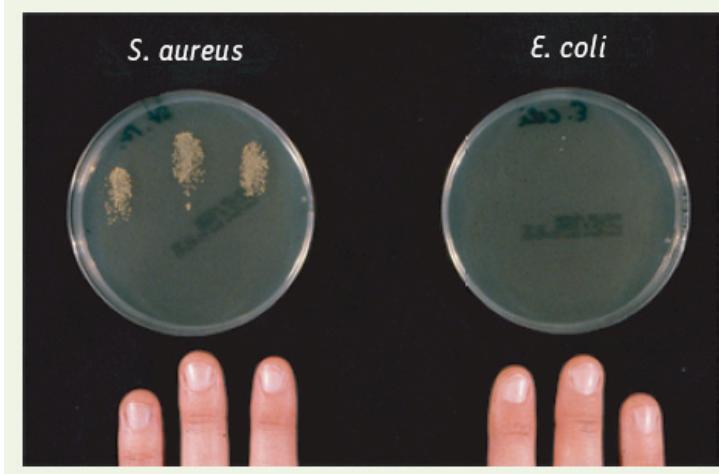
Des souris déficientes en protéine CRAMP (*Cathelicidin-related antimicrobial peptide*, homologue murin de LL37) sont plus susceptibles que les souris sauvages aux infections cutanées causées par des streptocoques du groupe A.

a) souris « sauvages » et b) souris déficientes en protéine CRAMP suite à une injection sous-cutanée de streptocoques du groupe A (échelle en centimètres).

c) évolution de la surface des ulcérasions au cours du temps pour des individus sauvages (ronds), hétérozygotes CRAMP +/- (triangles), et homozygotes CRAMP -/- (carrés).

d) streptocoques du groupe A cultivés à partir des biopsies de souris sauvages, hétérozygotes CRAMP +/- et homozygotes CRAMP -/-.

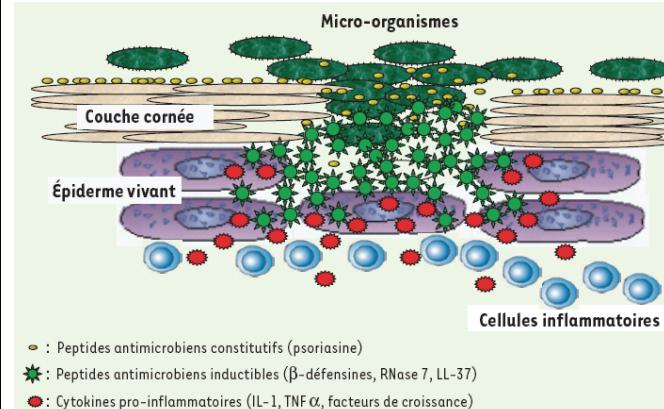
Constat du rôle des peptides antimicrobiens cutanés



Les extrémités des doigts, lavés, d'un volontaire sain sont inoculées artificiellement avec une souche de *S. aureus* ou d'*E. coli*. Après exposition pendant trente minutes, les extrémités des doigts sont appliquées sur un gel d'agar, et les colonies de *S. aureus* (à gauche) ou *E. coli* (à droite) dénombrées. *E. coli* n'est pas transféré, suggérant que la peau humaine produit de façon constitutive une défense chimique capable de tuer les souches d'*E. coli*.

(M/S, 2006, vol. 22, n° 22, p. 153-157 : Peptides antimicrobiens naturels cutanés)

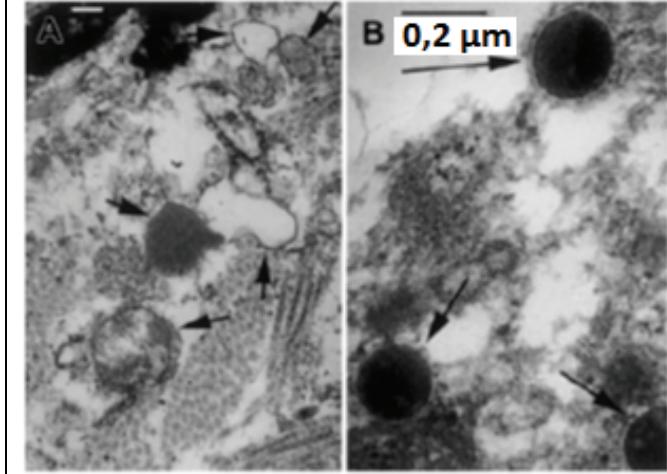
Organisation de la « barrière chimique » cutanée



Les bactéries résistant à la surface de la peau sont prises en charge par des peptides antimicrobiens constitutifs (notamment par la psoriasine). Lorsque la barrière physique est détruite, les bactéries ou leurs dérivés induisent la production de cytokines pro-inflammatoires ou de peptides (ou protéines) antimicrobiens par les kératinocytes et les leucocytes infiltrés.

(M/S, 2006, vol. 22, n° 22, p. 153-157 : Peptides antimicrobiens naturels cutanés)

Rôle in vivo du lysozyme chez la souris lors d'une infection par *Micrococcus luteus*



Microographies (MET) de lésions sept heures 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.

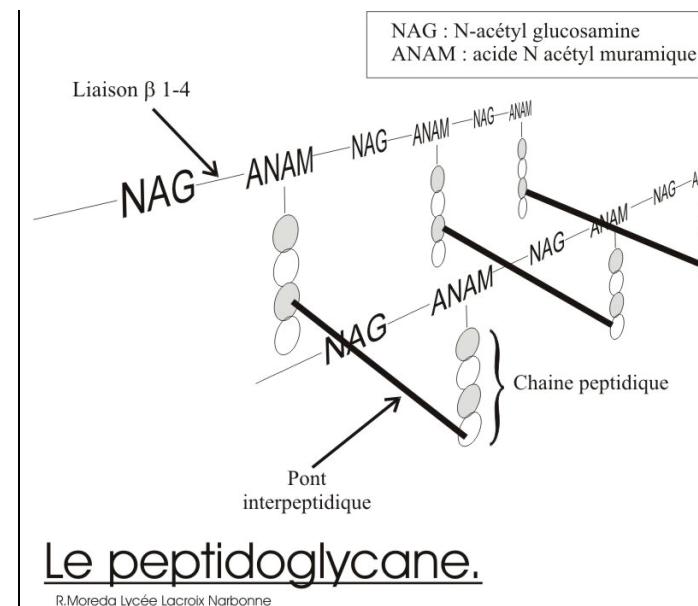
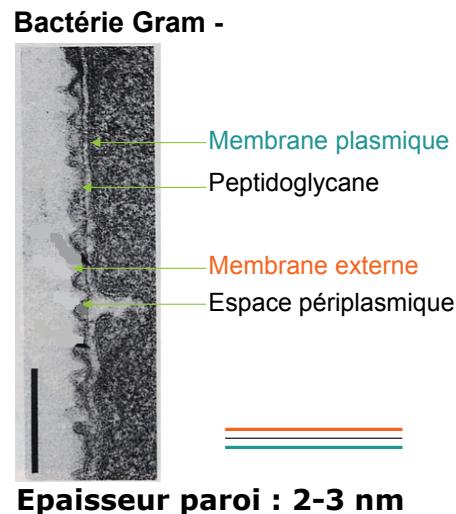
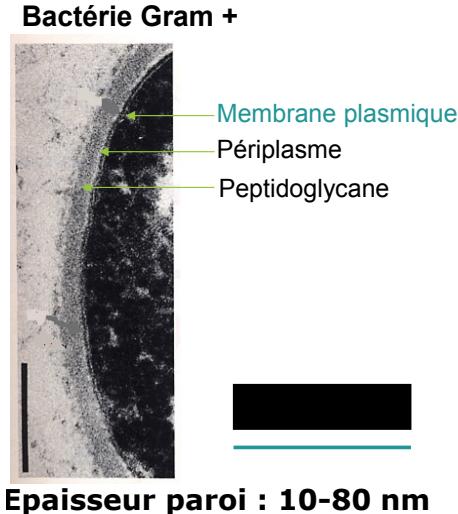
(Ganz et al. *Blood*, 2003)

CHOIX DU SUJET D'ETUDE : LE LYSOZYME

- Protéine antimicrobienne **produite par de très nombreux organismes** (animaux, végétaux) et impliquée dans l'immunité innée.
- **Bibliographie abondante** concernant cette protéine, y compris récente, depuis sa découverte en 1922 par Alexander Fleming.
- Première enzyme et seconde protéine (après la myoglobine) dont la **structure tridimensionnelle a été établie** par radiocristallographie.
- Enzyme facile à purifier, **peu onéreuse** (lysozyme du blanc d'œuf de poule p. ex) et présentant une totale **innocuité** : donc facile à manipuler en classe.

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 14,6 kDa.

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.



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. La méthode décrite est aussi une méthode classique pour mettre en évidence et doser l'activité bactéricide de divers peptides antimicrobiens.

MISE EN EVIDENCE ET DOSAGE DE L'ACTIVITE LYTIQUE DU LYSOZYME (CONTRE *MICROCOCCUS LYSODEIKTICUS*)

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*.

Plusieurs méthodes sont envisageables :

- Approche cinétique et quantitative par suivi de l'opacimétrie d'une suspension de *Micrococcus lysodeikticus* (cf. les ressources sur le site de l'équipe ACCES (IFE-ENS de Lyon) : http://acces.ens-lyon.fr/acces/ressources/immunite-et-vaccination/formations/2014/index_html-Ateliers ;
- Dosage microbiologique par méthode de diffusion en gélose.

C'est cette deuxième méthode qui sera mise en œuvre dans l'atelier. Nous verrons en perspective que cette méthode peut aussi être adaptée au dosage d'autres peptides antimicrobiens, qui peuvent aussi par ailleurs être dosés par méthode ELISA.

Dosage microbiologique par méthode de diffusion en gélose

Matière d'œuvre :

- *Micrococcus lysodeikticus*
- Lysozyme (*Lysozyme from chicken egg white*, Sigma #L3790-1ML, solution stock à 10 mg/mL, -20°C)
- Milieu de culture liquide (LB par exemple)
- 1 boîte de milieu de culture solide (Mueller-Hinton) précoûlée ou 20 mL de gélose Mueller-Hinton en surfusion (56°C) et une boîte de Petri de 90 mm.
- 2 tubes d'eau physiologique stérile de 9 mL
- [Des pipettes stériles de 1 mL]
- (un écouvillon stérile)
- PBS stérile
- 10 disques de papier filtre de 6mm de diamètre non pré-imprégnés et stériles
- Une pince stérilisable ou stérile
- Pipettes automatiques p20 et p100 et p1000 avec cônes stériles associés
- Une étuve réglée à 37°C

Avant la manipulation, préparer :

- La veille, lancer une préculture de microcoques en LB ; le jour même préparer une suspension en phase exponentielle de croissance ($A_{600\text{nm}} < 0.6-0.7$) en LB.
- Une solution de lysozyme stérile à 10 mg/mL en PBS et ses dilutions en PBS.

Protocole :

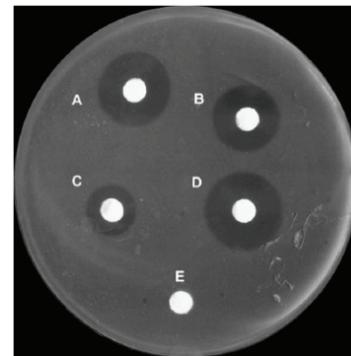
⌚ Cette manipulation nécessite d'être réalisée en conditions stériles, par exemple dans l'environnement stérile de la flamme d'un béc Bunsen.

1. Le protocole consiste d'abord à inoculer la boîte de milieu Mueller-Hinton par la souche de *Micrococcus lysodeikticus* :
 - Soit par écouvillonnage avec une suspension de *Micrococcus* (suspension est réalisée par une dilution au 100^e en eau physiologique de la suspension $A_{600\text{nm}} < 0.6-0.7$ en LB) ;
 - soit en mélangeant 0.1 mL de suspension en phase exponentielle de croissance ($A_{600\text{nm}} < 0.6-0.7$) en LB avec 20 mL de gélose Mueller-Hinton en surfusion (56°C), le tout à couler dans une boîte de Petri stérile.
2. Lorsque la boîte ensemencée est sèche, on dépose des disques stériles selon un gabarit (6 à 7 disques /boîtes sur une gélose de 90mm de diamètre) avec une pince stérilisée.
3. Puis on dépose sur les disques 10 microlitres d'une solution de lysozyme à 10 mg/mL ou de ses dilutions en PBS.
4. La boîte est placée à l'étuve 24 heures et observée le lendemain. **L'effet antimicrobien du lysozyme vis-à-vis du microcoque se manifeste par l'apparition de zones translucides d'inhibition de la croissance** de la souche autour des disques, d'un diamètre variant avec la concentration de charge du disque. La réalisation d'une gamme de dilution du lysozyme permet d'établir cet essai en traçant une courbe « diamètre de la zone d'inhibition = f (log[concentration en lysozyme]) »

Exemples de résultats attendus utilisant ce protocole

Yang et al., « Characterization of bioactive recombinant Human Lysozyme expressed in Milk of cloned transgenic cattle ». *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 *Public Library of Science 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 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.

Autres perspectives expérimentales et exploitations pédagogiques

Mesure de la dégradation du peptidoglycane par le lysozyme en gel d'agarose

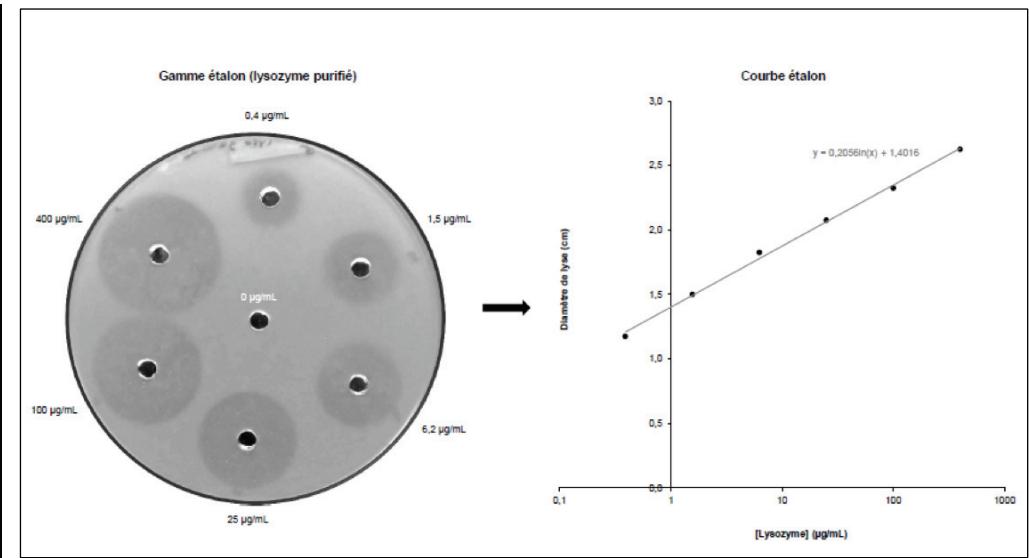
On peut, si des manipulations en atmosphère stérile ne sont pas envisageables, utiliser un protocole alternatif pour mettre en évidence et doser l'activité lytique du lysozyme sur le peptidoglycane (attention ici on ne met pas en évidence l'action antimicrobienne au sens strict).

Matière d'œuvre

Micrococcus lysodeikticus (*Micrococcus lysodeikticus*, ATCC No 4698, Sigma # M3770-5g, -20°C) ; Lysozyme (*Lysozyme from chicken egg white*, Sigma #L3790-1ML, solution stock à 10 mg/mL, -20°C) ; Agarose ; une boîte de Petri de 90 mm ; PBS stérile ; Pipettes automatiques p10, p100 et p1000 avec cônes stériles associés ; Une étuve réglée à 37°C

Protocole

- Préparer une solution d'agarose à 1% dans une solution de PBS 1X (Vf = 100 mL) et la faire bouillir;
- Laisser refroidir (80°C) ;
- Préparer 1 mL d'une suspension de bactéries *Micrococcus lysodeikticus* à 1 mg/mL dans une solution de PBS 1X ;
- Faire chauffer à 80°C pendant dix minutes puis mélanger à la gélose préalablement préparée ;
- Déposer 25 mL de gélose contenant les bactéries chauffées dans des boîtes de Pétri de 10 cm de diamètre et laisser refroidir ;
- Réaliser à l'aide d'un emporte-pièce (pipette pasteur) des trous dans la gélose ;
- Réaliser une gamme étalon à l'aide d'une solution de lysozyme purifié et déposer le(s) échantillon(s) à tester (30 µL par puits) ;
- Placer à 30°C sur la nuit ;
Mesurer les diamètres des zones de dégradation du peptidoglycane par le lysozyme. NB : La visualisation de l'activité du lysozyme peut être accélérée en augmentant les concentrations en enzyme et en travaillant à 37°C !



• Dosage de l'activité bactéricide de peptides antimicrobiens par diffusion radiale

(Issu de Travis et al., « Bactericidal Activity of Mammalian Cathelicidin-Derived Peptides », *Infect Immun.*, 2000, vol. 68, n° 5, p. 2748-2755)

Le protocole proposé par les auteurs pour tester l'activité bactéricide des peptides cathélicidines provenant de divers Mammifères utilise ici encore la diffusion radiale. Des dilutions en série de peptides sont testées contre ***Pseudomonas aeruginosa PAO1*** (bacille Gram-).

Protocole :

- Les bactéries sont d'abord cultivées dans un bouillon trypticase soja jusqu'à atteindre le milieu de leur phase exponentielle de croissance puis sont lavées avec du tampon phosphate à 10 mmol.L⁻¹ et pH 7,4.
- Approximativement 2.10⁵UFC (unités formant colonies) par mL sont incorporées dans 10 mL de gélose contenant 1% d'agarose, en tampon phosphate 10 mM, pH 7,4 et 0,3 mg de trypticase soja par mL ; le mélange est coulé dans une boîte de Petri de 90 mm de diamètre.
- Des trous sont creusés dans la gélose, régulièrement espacés et 8 µL de chaque aliquote de peptides ou de ses dilutions y sont déposés.
- Après trois heures, une couche de gélose est ajoutée. Les boîtes de gélose sont alors mises à étover à 37°C, durant vingt-quatre heures.
- Les diamètres sont mesurés à 0,1 mm près et sont exprimés en unités (1 U = 0,1 mm) après avoir soustrait le diamètre des trous.

Il existe une relation linéaire entre le diamètre mesuré de la zone d'inhibition et le log de la concentration en peptide antimicrobien, permettant ainsi un dosage.

• Exploitations pédagogiques

La recherche et le dosage d'activités antimicrobiennes peut être menée par ces méthodes dans un certain nombre liquides biologiques, comme la salive, le mucus nasal, les larmes, le lait (les larmes, le lait, la salive étant assez faciles à collecter...).

On peut aussi envisager de vérifier le dosage du lysozyme dans un antiseptique local, après l'avoir solubilisé de manière judicieuse profitant ainsi de l'occasion d'étudier une fiche de composition d'un médicament.

Fiche composition d'un antiseptique local (Lysopaïne) préconisé en cas de mal de gorge peu intense, sans fièvre ou d'aphtes, de petites plaies de la bouche :

COMPOSITION (exprimée par comprimé)	CONTRE-INDICATIONS
<p>Principes actifs</p> <p>Cétypyridinium 13,5 mg ; Lysozyme 20,0 mg</p> <p>Excipients</p> <p>Saccharine (E 954) ; Magnésium stéarate (E 572) ; Sorbitol (E 420) (effet notoire) ; Arôme menthe ; Menthe poivrée huiles essentielles ; Gomme arabique (E 414)</p>	<p>CONTRE-INDICATIONS</p> <ul style="list-style-type: none">- 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'oeuf).

CONSIDERATIONS EVOLUTIVES

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. Mais 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 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'elongation 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			
	Espèce et nom du Lysozyme	Origine et référence des données	Protéine Nombre d'aa	Fichier .pdb
Logiciel Rastop Logiciel Anagène	<i>Gallus gallus</i> (Poule) Lysozyme de type C	NCBI Protéine 2VB1_A	129 aa	2VB1
	<i>Homo sapiens</i> (Homme) Lysozyme de type C	NCBI Protéine 1JWR_A	130 aa	1JWR
	<i>Anser anser anser</i> (Goose = Oie) Lysozyme de type g	NCBI Protéine 153L	185 aa	153 L
	<i>Bombyx mori</i> (Papillon) Lysozyme de type C	NCBI Protéine 1GD6_A	119 aa	1GD6
	<i>Ruditapes philippinarum</i> (Tapes japonica) Lysozyme de type i	NCBI Protéine 2DQA_A	124 aa	2DQA
	<i>Hordeum vulgare</i> (Orge) Lysozyme de type c	NCBI Protéine 2BAA	243 aa	2BAA
	<i>Mytilus galloprovincialis</i> (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 α et les feuillets β (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 %) 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 galloprovincialis</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 galloprovincialis</i> (Moule)	25.3	24	32.5	100	
<i>Hordeum vulgare</i> (Orge)	6.6	8.6	9.5	13.5	100

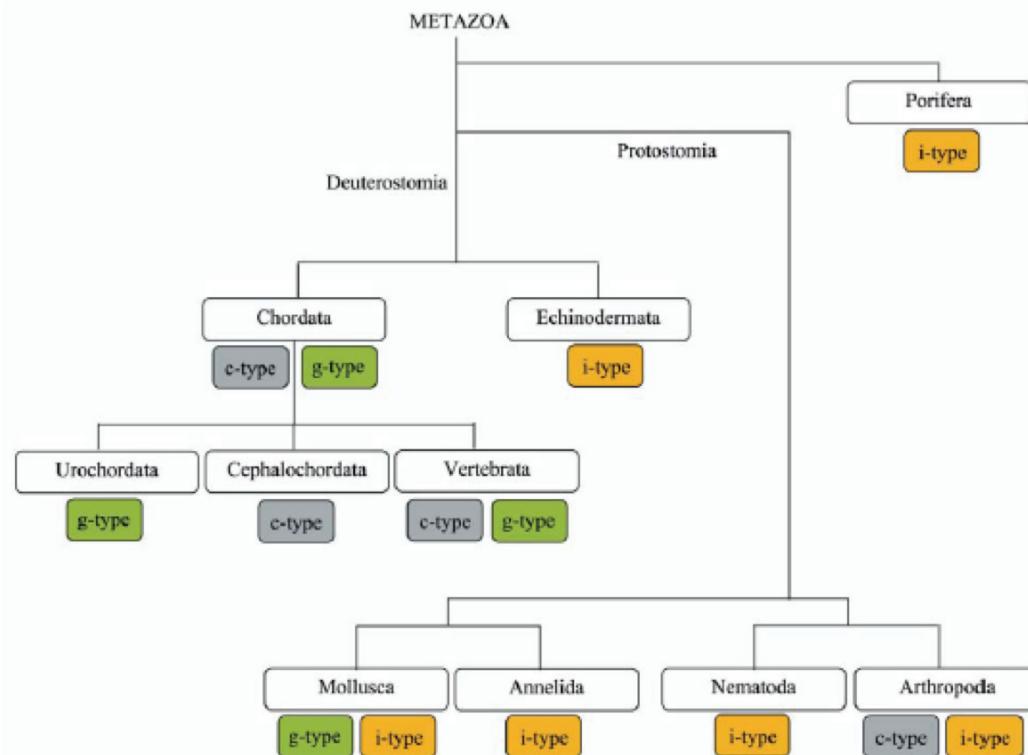
NB : Ces résultats ont été obtenus en choisissant une séquence de référence (la première) et en maintenant toutes les autres.
Du fait de l'algorithme de comparaison, ces résultats peuvent être légèrement différents de ceux obtenus par comparaison des séquences deux à deux.

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, identité elle-même définie comme une ressemblance parfaite entre deux séquences.

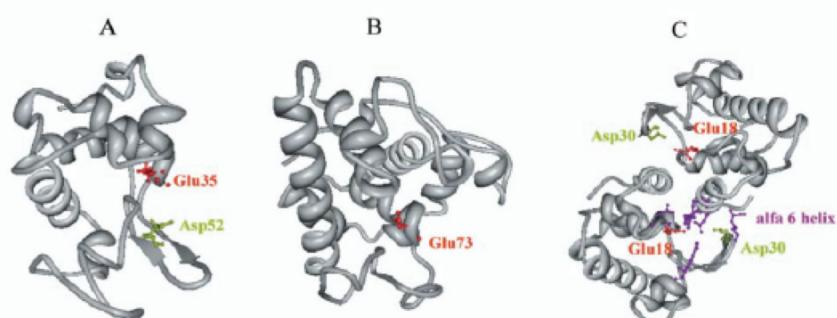
- **Noter les différences et ressemblances à l'échelle des séquences et des structures et conclure en s'appuyant sur les données des documents joints.**

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

Données issues de L. Callewaert et CW Michiels. « Lysozymes in the animal kingdom ». *J. Biosci.*, 2010, 35(1), 127-160.



Ribbon diagrams of three-dimensional structure of (A) HEWL (Protein Data Bank, <http://www.rcsb.org/pdb/>, entry 2VB1), (B) GEWL (PDB, entry 153L) and (C) dimer of TjL (PDB, entry 2DQA).



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).

A : Lysozyme du blanc d'œuf de poule (type C) ;

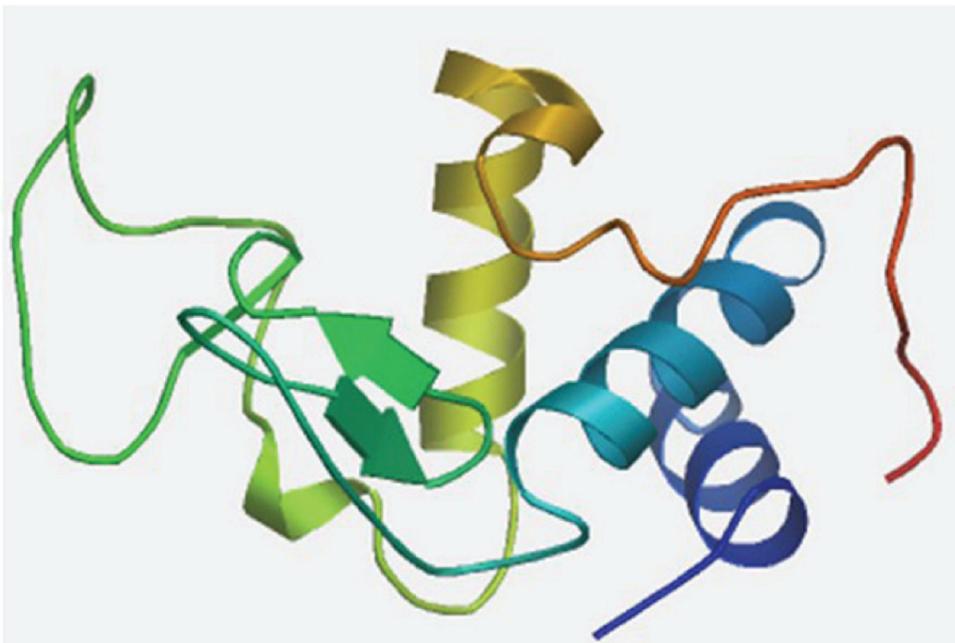
B : Lysozyme de type G ;

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 β plissé et l'autre principalement constitué d'hélices α , 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.*, « A novel C-type lysozyme from *Mytilus galloprovincialis* : insight into innate immunity and molecular evolution of invertebrate C-type lysozymes ». *PLoS One*, 2013, vol. 20 ; 8(6)



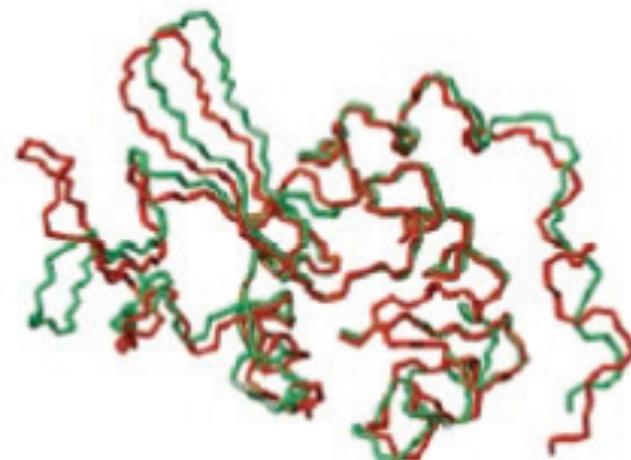
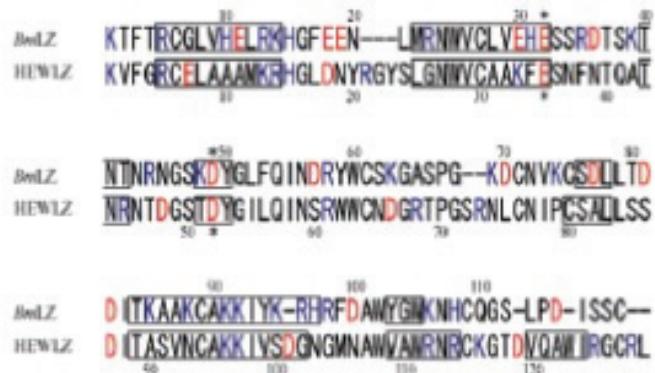
Structure en 3D de MgCLYZ lysozyme de type C de *Mytilus Galloprovincialis*

M.galloprovincialis	MPS CGG GIL FVS ILL VLV GVG YGAT KTK-CQV VQAL RNQ--GVP-DS DL RD N C L V K H E S N F H Y D A I G-TNS-GS-DY G I F Q I N G E I N C	84
C.sinensis	MIV FN-VKFL VLV LLMI IET--SRA AT KTK-CQV VQAL RAQ--GVT SD S E L R N W C L V E R E S S F R Y D V T N-SNS NG S-DY G I F Q I N D G E I N C	83
S.nigrimamm	--MNT LVF VTV VILL E W N S P V A A K Q F R T D-C E L V R A L R Q N--GFP EN Q L P D N W C L V R A P S G L K T H A T N H-NK NG S-DY G I F Q I N G E I N C	83
A.gambiae	--M K F F I V V L L A I V A C C A V A E K F T K-C E L A K A L A N N--C I A K A S L P E N W C L V Q M E S A F T S S A T N K-NK NG S-DY G I F Q I N G E I N C	81
P.includens	--M Q K L T V F L L --A V A R A L C L S C E A K Y F T K-C E L V H E L R Q Q--GFP E D K M R D N W C L V E R E S S R Y D T E V G R V N K E N G S-DY G I F Q I N D G E I N C	83
M.sexta	--M Y K L V I F --A L F A F A Y H S E A K H F S R-C E L V H E L R Q Q--GFP E N L M R D N W C L V E R E S S R Y D T E V G R V N K E N G S-DY G I F Q I N D G E I N C	80
M.domestica	--M K F F I V V A L A L A P A M G K T F T R-C O S L A R E N Y A L--GVP K S E L P Q M C I A E R E S S S Y R T N V V G P T N S N G S-DY G I F Q I N Y Y I N C	81
O.nubilalis	--M A R L A V V V L V--F V V A R A L W S E A K I L K R-C O S L A R E N R S Q--GFP E S Q M R D N W C L V E R E S S A G N T G K V S P T N E N G S-DY G I F Q I N D R I N C	82
D.melanogaster	--M A R F L V I C A L T L T A V A T Q A R T H D R-C O S L A R E N S L--G V P R D Q L A K E N W C I A Q B E S S F R T G V V G P A N S G S-DY G I F Q I N K E I N C	81
S.gregaria	--M R T S T A V I L G I A L V L V L G S D A E K I L Q R-C E I V S A L K R H--G I T S D-L E N N W C L V E R E S S G G R D E K G P R N K E N G S-DY G I F Q I N G E I N C	83
P.americana	--M E R R T L M I L-L V A L A R I V T P S T A T V Y S R-C G L V Q A L R A Q--G F G D-L S N W C L V E R E S S E R S S T A A K G G P N T D G S-DY G I F Q I N G E I N C	81
H.discus hamai	--M M G P T T I L S L L A V A M V A D G R P Y S K-C O L A S L V S Q--H G I N R D D A P E N W C M A F P E S S L N T A A T N T N S-G S S-DY G I F Q I N S Y I N C	82
D.variabilis	--M Q L H V P L A L F V L L S A A S A K K Y R-C E L A S I L V R N--G I P R N Q V P D N W C L A T A E S S L N S K A V H R N R-N R S-DY G I F Q I N N G E I N C	79
M.japonicus	--M R V L P L L L L V A L V G A S E A K I F R K-C E P A E L L E T R--Y Y I S R N D I N W C I A E P E S S F N T A A T N R N R-N R S-DY G I F Q I N N G E I N C	80
P.monodon	--M R V L P L A L L V G L L A V S D A K V F G K-C E P A E L L E T R--Y N L S R N D I N W C I A E P E S S F N T A A T N R N R-N R S-DY G I F Q I N N G E I N C	80
F.chinensis	--M R V L P L A L L G A L L A S D A K V F G K-C E P A E L L K R D--Y Y I S R N D I N W C I A E P E S S F N T A A I N R N R-N R S-DY G I F Q I N N R Y I N C	80
L.vannnamei	--M R V L P L A L L G A L L A S D A K V F G K-C E P A E L L K R D--Y Y I S R N D I N W C I A E P E S S F N T A A I N R N R-N R S-DY G I F Q I N N R Y I N C	80
S.rhombus	--M R C I L F L--L L V A V A G A K V F F R-C E L A R L K E S Y G M N N Y R G I S L A D W W C L S Q E S S Y N T R A T R N R T-D G S-DY G I F Q I N G E I N C	79
B.taurus	--M K A L L I L G L L L S V A V Q G E T F F R-C E L A K T E K N L G L A G Y K G V S L A N N W C L A E G E S S Y N T Q A R N Y N P G G E S S-DY G I F Q I N E R I N C	83
H.sapiens	--E V F E R-C E L A R T L K E L G M D G Y R G I S L A N N W C L A K E E S G Y N T R A T R N Y A G D S S-DY G I F Q I N E R I N C	65
M.galloprovincialis	G R P S G T S T S I C N R V N T Y G C A D S C T S L T N S D I S N D A Y C A R V E-E R K C G-----G F S E K W N G E D I S--N V Q G S E Y D Y S T C-----	154
C.sinensis	G K S N G Y S G T I C N W R L R T N Q C Q D S C S S F L N S D I S N D A N C R V R-E R K C D-----G F S R W E G N W N C K G R E N N L N K P K Y D P S G C-----	155
S.nigrimamm	G-----Q G R T G G-D C K I K C S S L N N D I D A D D S C E K R L-E R K R-----H G F S A W Y G W N S D C E G K A L P N I S D C-----	141
A.gambiae	D-----S G Y G S N-D C K I A C K N L L N D D I T D D I P C A R L-E R K R-----H G F N A W Y G W N H N C G K E L P N V S S C F-----	140
P.includens	S-----K T S P G K D O N V I C A D M L L D D I T K A S T C A R K E Y K R-----H E F Q A W Y G W R N E Q G-A L P D I S K C-----	141
M.sexta	S-----N G S T P G K D O N V C O S D L L I D D I T K A S T C A R K E Y K R-----H E F Q A W Y G W R N E Q G-S L P D I S S C-----	138
M.domestica	Q P S-----N G R F S T Y N B C O N L S C O A L L T D N I S N S V I C A R R E R S Q-----Q G W T A N S T W K-Y C S G-S L P S I N D C F-----	141
O.nubilalis	T-----R S G P A G K D C H V T C A R E V I T D D I T K A S T C A R K E Y K R-----H G F R A W Y G W R N E Q G-S L P D I S N C-----	140
D.melanogaster	E P A-----D G R F S T Y N B C O S G L S C N A L L T D D I T N S V P C A R E R E Q R Q-----Q G W T A N S T W K-Y C S G-S L P S I N C F-----	141
S.gregaria	G-----I G X V A G-D O R L E C D D L N N D L S D D V P C A R E R E Q R-----H G F R A W Y G W R N E Q G-S L P D I S S C-----	141
P.americana	G-----Q G G V G G -D C N L N C D S L L D D I S N D S T C A R L-E F S R-----H G F S A W Y G W R Q S E-Q G T L P D I S G C-----	139
H.discus hamai	D P Q-----D G R T E N Q C H P C S D Y Q N S N I G D D V I C W Q E L R E H G-----H G W F S I Y G H A V A C S-S V T S S Y L S G C T Y-----	146
D.variabilis	S-----P G R E N V C K V S C O S A L K S D N I L P S I C R K Q Y Y R R-----H G F N A Y G W K R I C K G K E L L S S Y V K G C R Y-----	139
M.japonicus	D-----S S Y G K N A D G I P C S D L M S D D I T A A L P C A E A R E R R D T E G F R G R G N G Y T A N V A Y N N E C E N R D L D R Y M A D C W S R P S N I Y P F-----	158
P.monodon	G-----S D Y G K N V C G I P C S D L T S D D I T A A V A C A E T R R D T E Y M R G R G E G Y T A N V A Y N N E C E N R D L D Q Y M A E C W S R G S N S V F E F-----	158
F.chinensis	G-----S D Y G K N V C G I P C S D L T S D D I T A A L P C A E T R R D T E Y R R G R G E G Y T A N V A Y N N E C E N R D L D Q Y M A E C W S R G S N S I F F-----	158
L.vannnamei	G-----S D Y G K N V C K I P C S D L M S D D I T A E L P C A E T R R D T E Y R R G R G E G Y T A N V A Y N N E C E N R D L D Q Y M A E C W S R G S N S I F F-----	158
S.rhombus	N N G-----Q T P-T S N A C G I S C A L L T D D V I A A I C A R R E R V V D P-----N G I G A M V A V K S E C E G R D L S P Y L A G C G V-----	143
B.taurus	N D G-----K T P K A V N C G V S C A L L E D D I T Q A V A C A K E R E V S Q-----Q G I T A N V A T N E C E R N R D L T S V K G C G V-----	147
H.sapiens	N D G-----E K T P G A V N A C H L S C O S A L L Q D N I A D A V A C A K E R E V R D P-----Q G I R A W A V R N S E C Q N R D V R Q V V Q G C G V-----	130

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.*, « Structural analysis of an insect lysozyme exhibiting catalytic efficiency at low temperatures », *Biochemistry*, 2002 Oct 8;41(40).



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

BIBLIOGRAPHIE

- Callewaert L¹, Michiels CW. « Lysozymes in the animal kingdom ». *J. Biosci.* 2010 Mar;35(1):127-60.
- Wang Q. *et al.* « A novel C-type lysozyme from *Mytilus galloprovincialis*: insight into innate immunity and molecular evolution of invertebrate C-type lysozymes ». *PLoS One.* 2013 Jun 20;8(6).
- Matsuura A. *et al.* « Structural analysis of an insect lysozyme exhibiting catalytic efficiency at low temperatures » *Biochemistry*. 2002 Oct 8;41(40).
- Yang B. *et al.* « Characterization of bioactive recombinant human lysozyme expressed in milk of cloned transgenic cattle ». *PLoS One.* 2011 Mar 16;6(3).
- Gordon S, Todd J, Cohn ZA. « In vitro synthesis and secretion of lysozyme by mononuclear phagocytes ». *J. Exp Med.* 1974 May 1;139(5):1228-48.