

Les médiateurs solubles de l'immunité innée

Le lysozyme : une Protéine AntiMicrobienne conservée au cours de l'évolution

Immunité
Vaccination

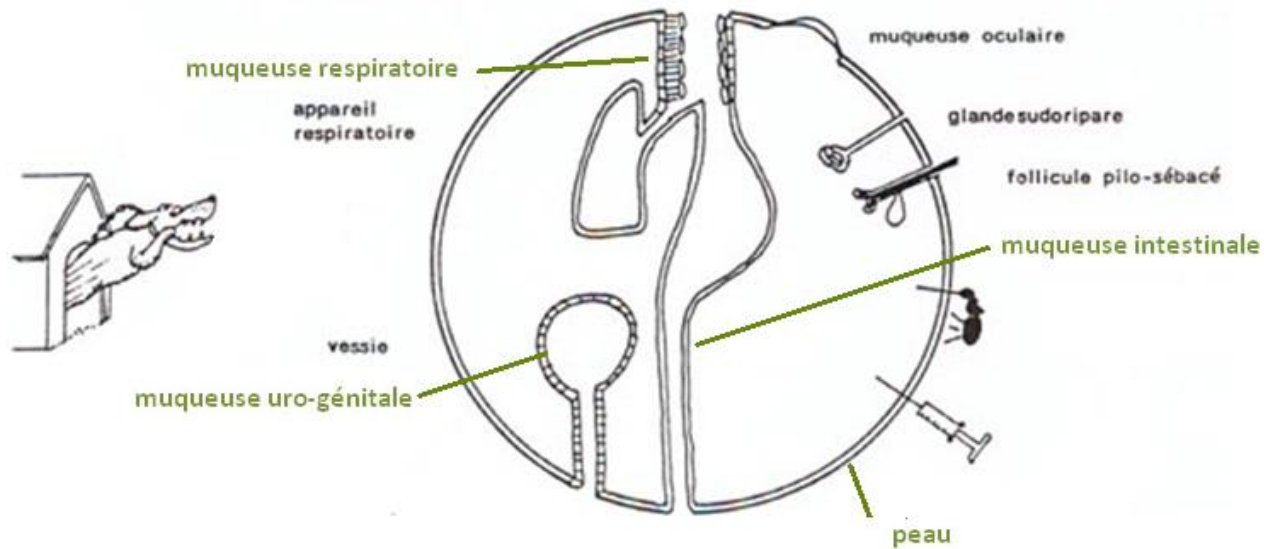
Immunité innée

L'immunité innée ne nécessite pas d'apprentissage préalable, est génétiquement héritée et est présente dès la naissance. **Elle repose sur des mécanismes de reconnaissance et d'action très conservés au cours de l'évolution.**

Très rapidement mise en œuvre, l'immunité innée est la première à intervenir lors de situations variées (atteintes des tissus, infection, cancer). **C'est une première ligne de défense** qui agit d'abord seule puis se prolonge pendant toute la réaction immunitaire.

Les « barrières »

La meilleure façon d'éviter l'infection tissulaire, c'est d'empêcher l'introduction de l'agresseur : rôle de la **barrière cutanéomuqueuse** qui constitue la **première ligne de défense de l'organisme**.



Barrières épithéliales et tissus sous-jacents

Pénétration et détection de l'agent infectieux
Inflammation et élimination de l'agent infectieux

Les « intrus »

Voies d'entrée des pathogènes			
<i>Voie d'entrée</i>	<i>Mode de transmission</i>	<i>Pathogène</i>	<i>Maladie</i>
Muqueuses			
Aérienne	Inhalation de gouttelettes	Virus influenza <i>Neisseria meningitidis</i>	Grippe Méningite à méningocoques
Gastro-intestinale	Eau et aliments contaminés	<i>Salmonella Typhi</i> Rotavirus	Fièvre typhoïde Diarrhée
Génitale	Contact physique	<i>Treponema pallidum</i>	Syphilis
Epithélium externe			
Blessures et abrasions	Blessures par pique Contact avec des animaux infectés	<i>Bacillus anthracis</i> <i>Clostridium tetani</i> <i>Pasteurella tularensis</i>	Anthrax Tétanos tularémie
Piqures d'insectes	Piqure de moustiques (<i>Aedes aegyti</i>) Piqure de puces Piqure de moustiques (Anophèles)	Flavivirus <i>Borrelia burgdorferi</i> Plasmodium spp	Fièvre jaune Maladie de Lyme Malaria

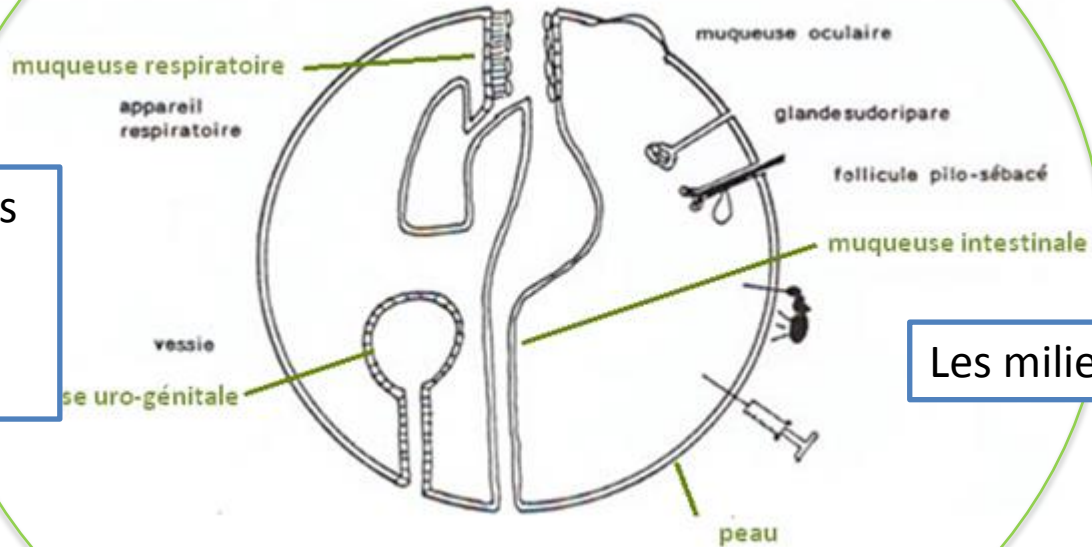
Les défenses « de barrière »

Le mucus et « l'escalator muco-ciliaire »

La peau et le sébum
(rôle antibactérien des acides gras)

Les flores commensales
(intestin, vagin, etc.)

- Colicine et diverses bactériocines...



Les milieux acides

Les protéines et peptides antimicrobiens (PAM)

Les Protéines et peptides AntiMicrobiens chez l'Homme (PAM)

- Enzymes : **ex. lysozyme** (250-500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ dans les sécrétions nasales, salive, larmes)
- Lactoferrine (chélation du fer)
- Défensines (feuillet β)
 - β défensines (HBD-1 et HBD-2)
 - Peau et tractus respiratoire
 - α défensines (=cryptidines)
 - Cellules de Paneth de l'intestin
- Cathélicidines (hélices α)
- Protéines A et D du surfactant (*opsonines* primitives)

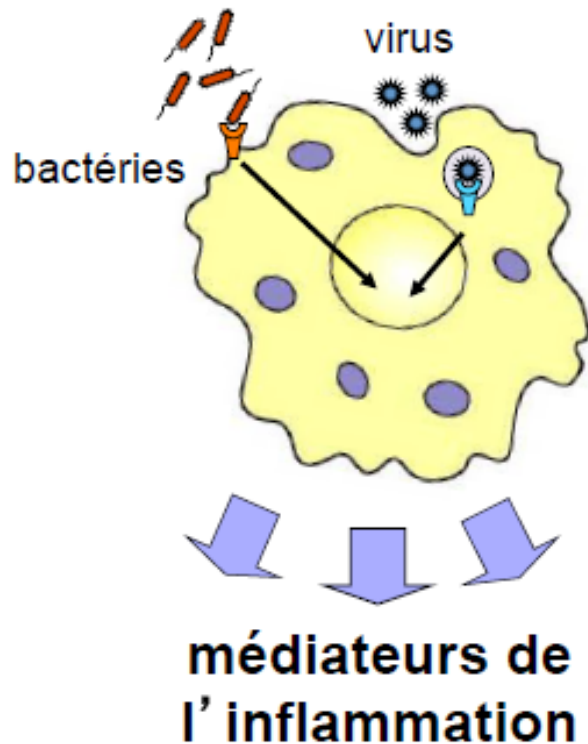
→ **Rôle essentiel dans les défenses de première ligne**

Les Protéines et peptides AntiMicrobiens : PAM

- Produits par de multiples types cellulaires
 - Glandes sous-muqueuses
 - Cellules épithéliales
 - Cellules « spécialisées » de l'immunité naturelle
 - **Polynucléaires neutrophiles**
 - **Macrophages**
- Selon les cas, action extracellulaire, intracellulaire (sur des microorganismes phagocytés) ou les deux

Par exemple, s'agissant de la production de Protéines et peptides AntiMicrobiens par les phagocytes (polynucléaires neutrophiles, macrophages) ...

La reconnaissance d'une infection bactérienne ou virale



Signal de **DANGER**

des motifs conservés sur des classes de pathogènes

PAMP: pathogen associated molecular pattern

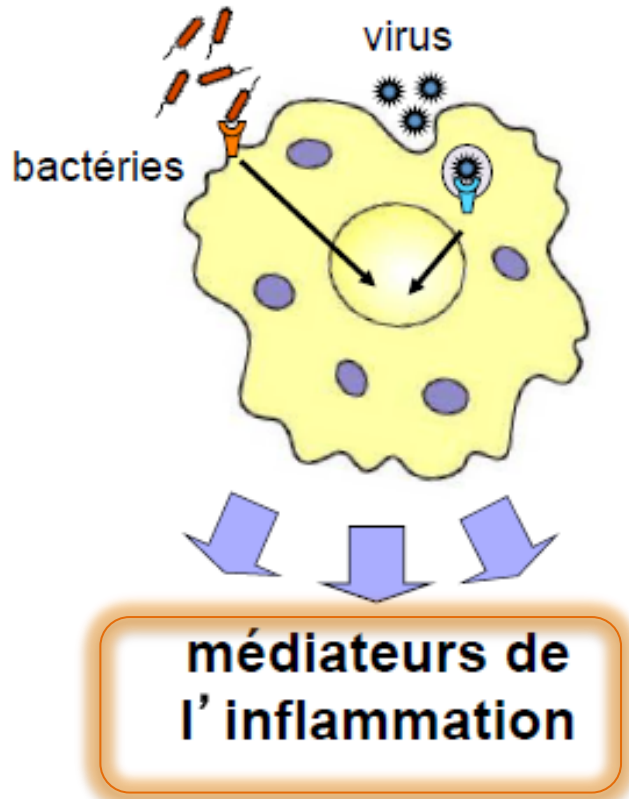
des récepteurs qui discriminent les pathogènes

PRR: pattern recognition receptor

Exemples de PAMP (signatures)

- Flagelline des flagelles bactériens
- Peptidoglycane des bactéries à G+
- Lipopolysaccharide (endotoxine) des bactéries à G-
- ARN double brin
- ADN non méthylé

La reconnaissance d'une infection bactérienne ou virale



Signal de **DANGER**

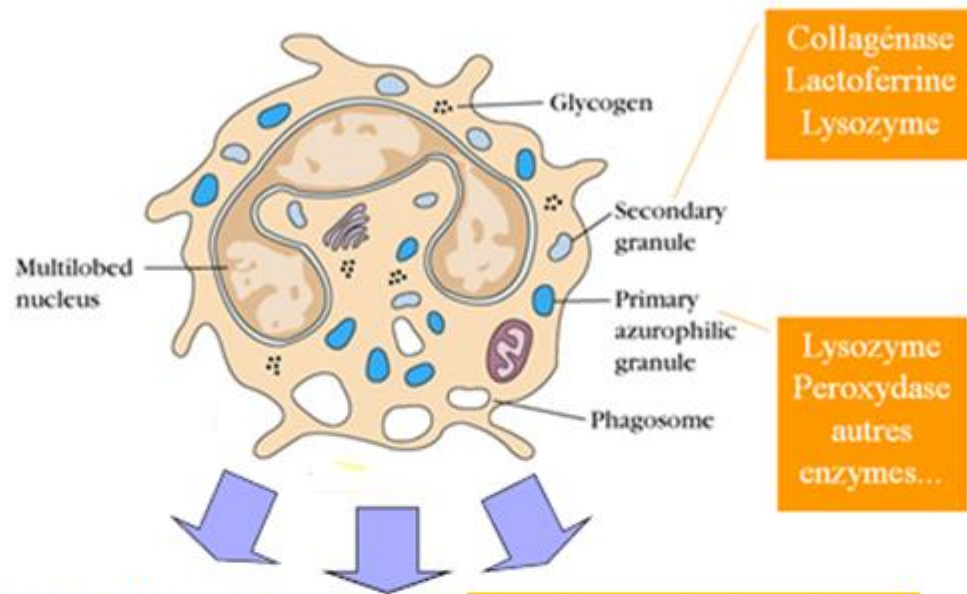
des motifs conservés sur des classes de pathogènes

PAMP: pathogen associated molecular pattern

des récepteurs qui discriminent les pathogènes

PRR: pattern recognition receptor

Zoom sur les médiateurs de l'inflammation



Cytokines inflammatoires : IL-1 β , TNF α , IL6
Chimiokines

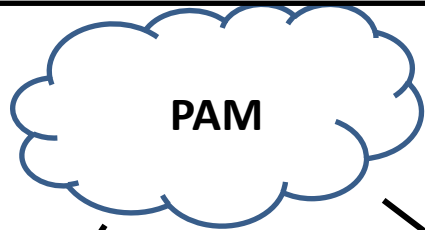
Amines vaso-actives : histamine
Médiateurs lipidiques : prostaglandines, leucotriènes

Recrutement et activation
d' effecteurs inflammatoires

Peptides anti-microbiens : défensines
Enzymes toxiques : lysozyme, hydrolases
acides
Radicaux libres de l' oxygène, de l' azote
(NO)

Microbicidie

... S'agissant du rôle des PAM :

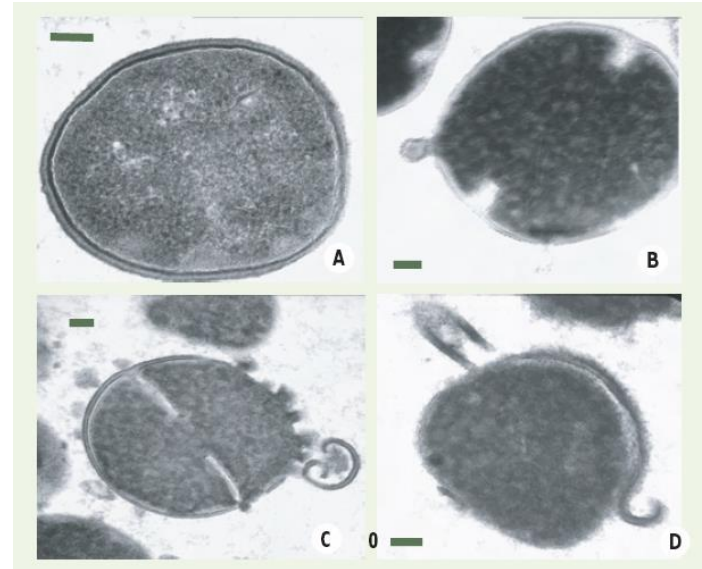


Principale ligne de
défense de
l'immunité innée

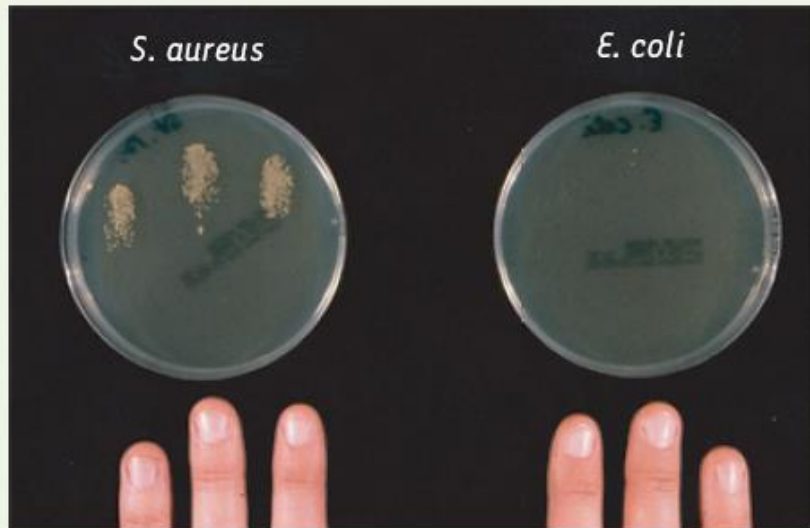
Activité
chimiotactique
favorisant le
recrutement de
monocytes

Influencent la
réponse
adaptative ?

Régulation de la
production de
cytokines pro-
inflammatoires



Modifications morphologiques
observées sur *S. aureus* traité par hBD-3
(β défensine inducible épithéliale)

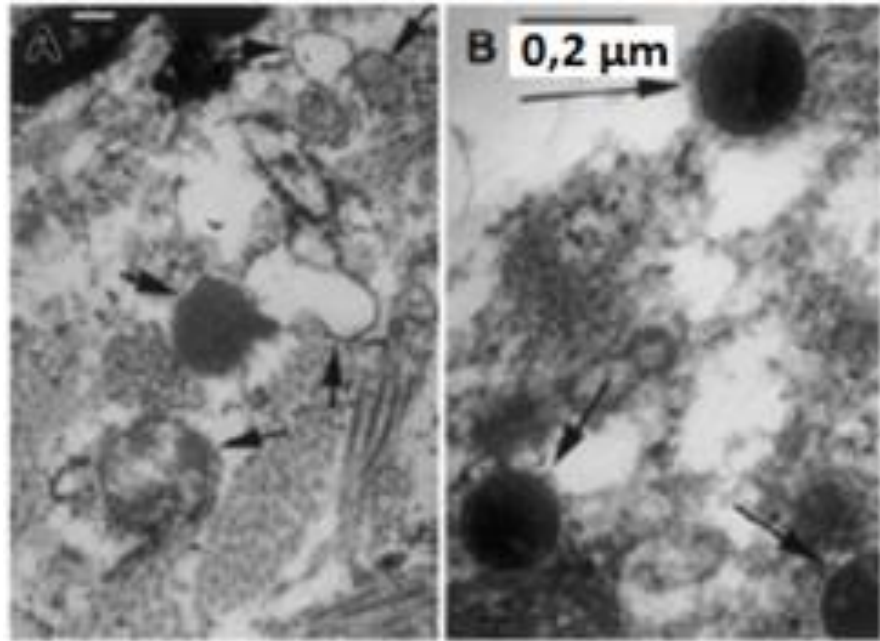


Les extrémités des doigts, lavés, d'un volontaire sain sont inoculées artificiellement avec une souche de *S. aureus* ou d'*E. coli*. Après exposition pendant 30 minutes, les extrémités des doigts sont appliquées sur un gel d'agar, et les colonies de *S. aureus* (à gauche) ou *E. coli* (à droite) dénombrées. *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 Volume 22, numéro 2, février 2006, p. 153-157
Peptides antimicrobiens naturels cutanés

... et plus particulièrement de celui du lysozyme :

Des souris déficientes en lysozyme M présentent des lésions beaucoup plus sévères après une injection sous cutanée de *M. luteus*



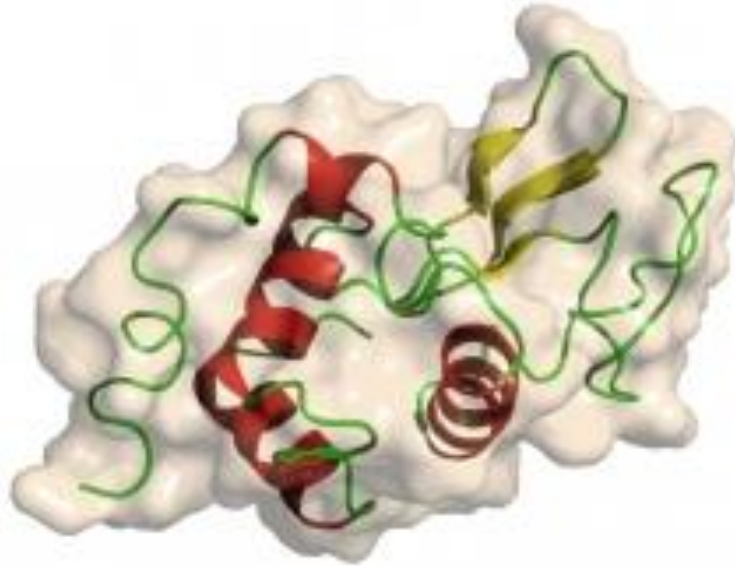
Micrographies (MET) de lésions cutanées 7h après une infection par *Micrococcus luteus* chez **des souris normales** (A) ou **déficientes en lysozyme** (B).

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)

Choix du sujet d'étude : 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 d'œuf de poule

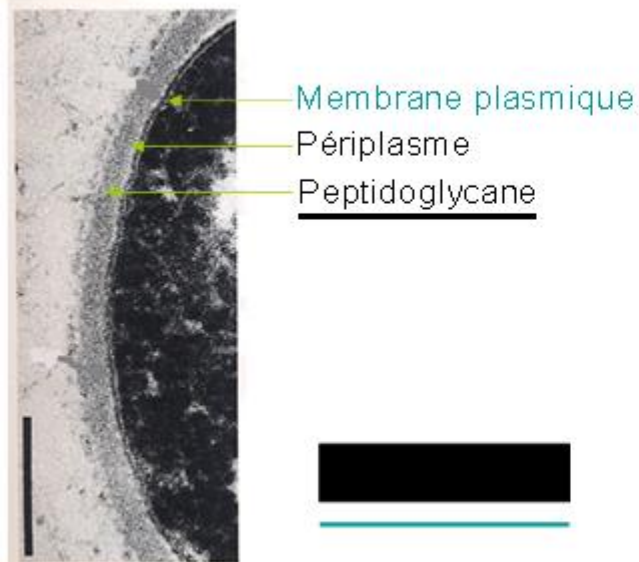


- une seule chaîne protéique
- forme globulaire
- 129 acides aminés
- 4 ponts disulfures
- masse moléculaire de l'ordre de 14,6 kDa.

Mécanisme d'action du lysozyme

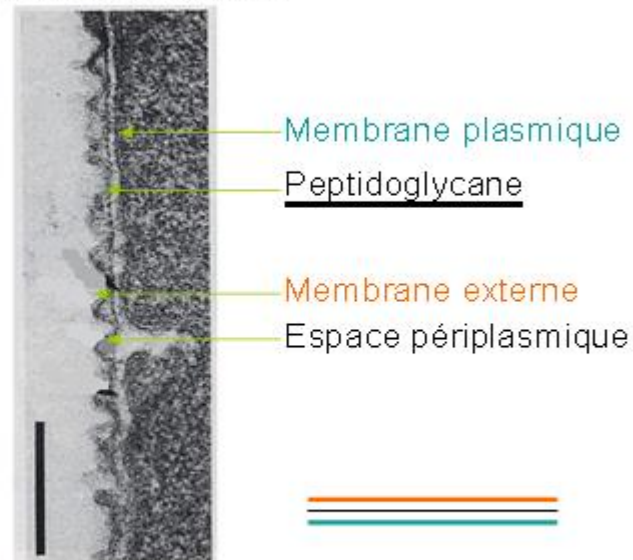
- Le lysozyme permet la destruction du **peptidoglycane** de la paroi bactérienne :

Bactérie Gram +



Epaisseur paroi : 10-80 nm

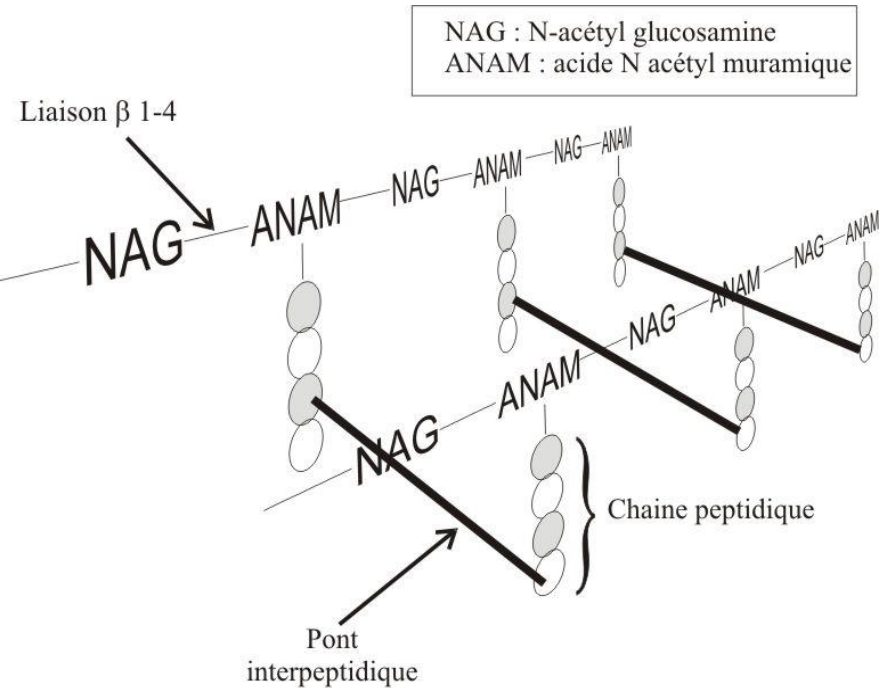
Bactérie Gram -



Epaisseur paroi : 2-3 nm

Structure du peptidoglycane

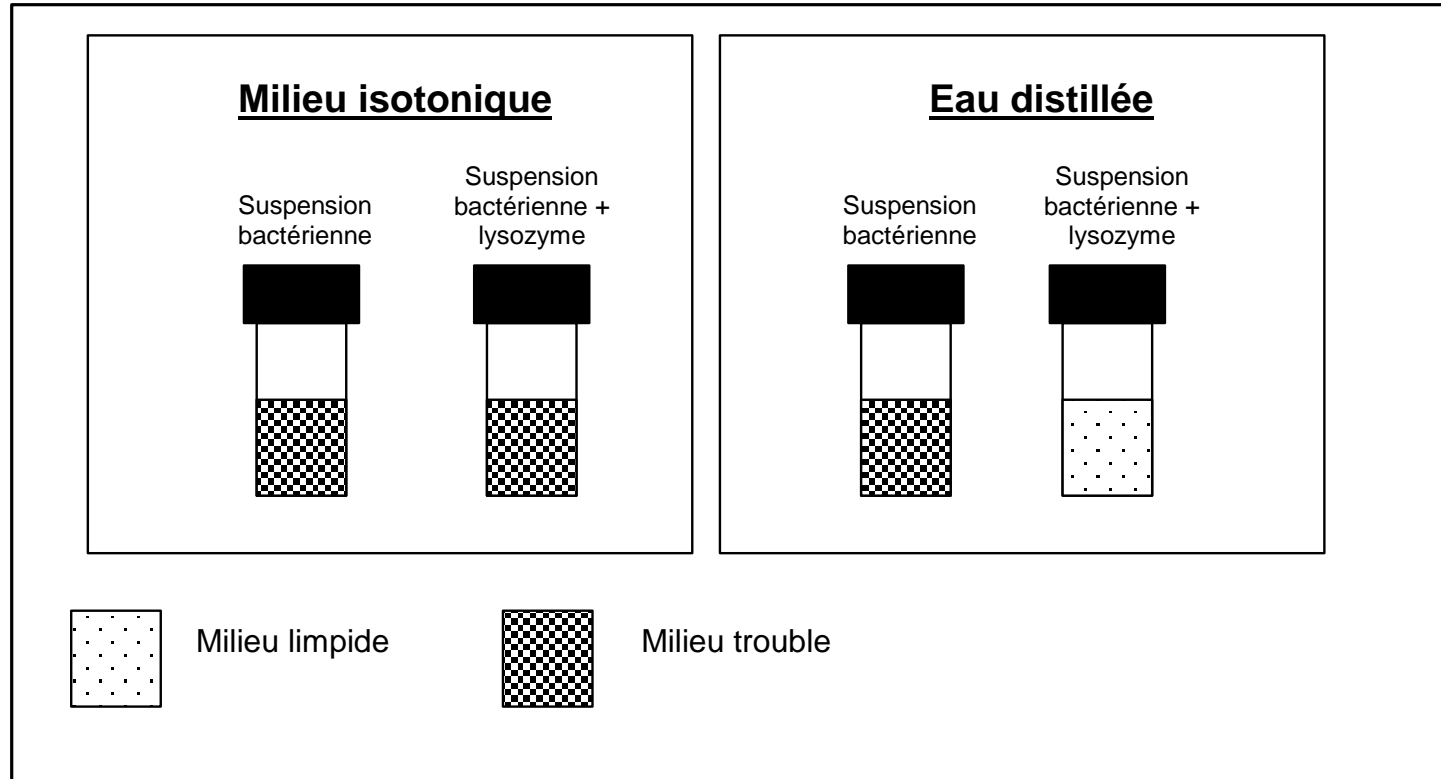
- Le lysozyme catalyse l'hydrolyse de la liaison osidique en β 1-4 entre la N-acétylglucosamine (**NAG**) et l'acide N-acétylmuramique (**NAM**)



Le peptidoglycane.

R.Moreda Lycée Lacroix Narbonne

Conséquences



L'action du Lysozyme **en milieu hypotonique** conduit à la lyse bactérienne (nette chez les Gram +) visualisable par une chute de la turbidité de la suspension.

Mise en évidence de l'activité du lysozyme sur une souche sensible – Dosage

Matériel :

- Tampon phosphate pH 6,24 :

100 mL de dihydrogénophosphate de potassium 0,066 M ajusté à pH 6,24 avec KOH 1M : **tampon hypotonique.**

- Lysozyme de blanc d'œuf :

Lysozyme from chicken egg white, Sigma #L3790-1mL, solution stock en tampon phosphate à **10 mg/mL**)

- Suspension de *Micrococcus lysodeikticus*

Micrococcus lysodeikticus, ATCC No 4698, Sigma # M3770-5g) : **0,015%** en tampon phosphate (p/V) : 15 mg de bactéries lyophilisées dans 100 mL de tampon phosphate.

- Une souche d'E. coli :

Souche isolée sur une gélose nutritive (à titre de contrôle)

- Spectrophotomètre

réglé sur **450 nm** et cuves en plastique à usage unique

- Logiciel Excel (par exemple) ou autre tableur

Protocole : Approche cinétique et quantitative

- utiliser le spectrophotomètre en mode « Acquisition manuelle » ou en mode « Cinétique » à la **longueur d'onde 450 nm** ;
- réaliser un « blanc » à l'aide d'une solution de tampon phosphate ;
- Introduire ensuite une cuve contenant 2,9 mL de suspension bactérienne (*Micrococcus lysodeikticus*) ;
- mesurer l'absorbance pendant 2 minutes (temps entre chaque point de mesure 5 s) puis introduire dans la cuve 100 µL de la solution de lysozyme à tester ou 100 µL de tampon potassium (contrôle négatif) - continuer la mesure d'absorbance pendant au moins 5 minutes ;
- les données sont exportées au format Excel pour être exploitées dans ce programme ;

Remarque :

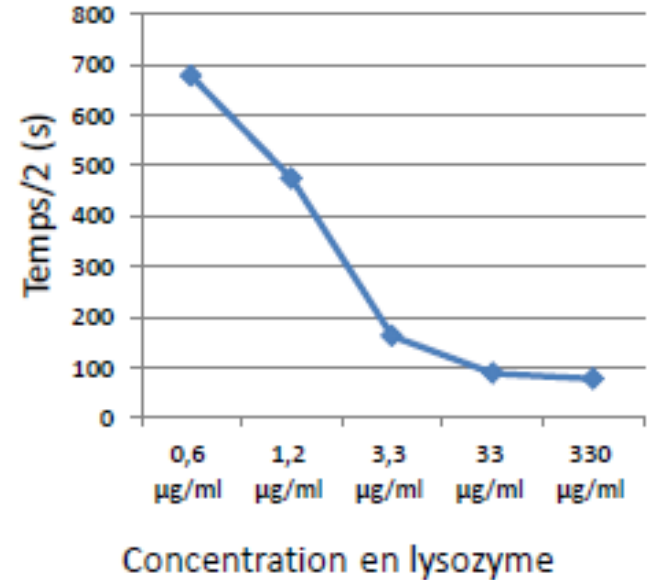
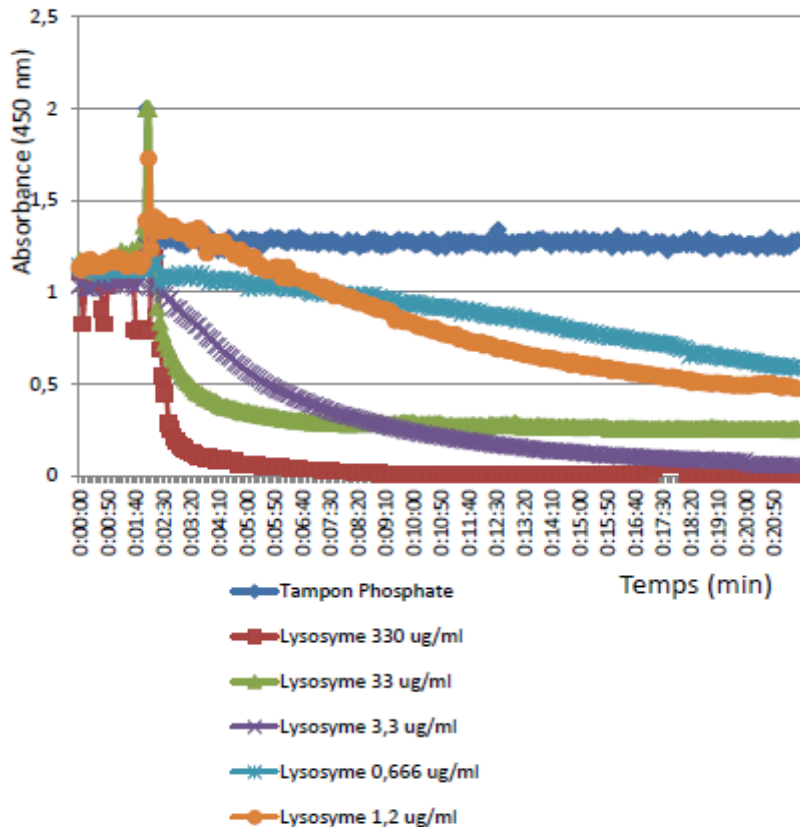
Une unité de lysozyme est responsable de la diminution de l'absorbance à 450 nanomètres de 0,001/min à 25°C.

Exemple de résultats obtenus avec le lysozyme humain sur une suspension de *Micrococcus lysodeikticus*

temps en s	Densité optique à 450 nm				
	lysozyme 200 µg/mL	lysozyme humain 20 µg/mL	lysozyme 2 µg/mL	lysozyme 0,2 µg/mL	contrôle
0	0,641	0,638	0,637	0,635	0,642
5	0,641	0,638	0,637	0,635	0,642
10	0,641	0,638	0,637	0,635	0,642
15	0,641	0,638	0,637	0,635	0,642
20	0,641	0,638	0,637	0,635	0,642
25	0,641	0,638	0,637	0,635	0,642
30	0,641	0,638	0,637	0,635	0,642
35	0,464	0,307	0,548	0,571	0,642
40	0,296	0,248	0,503	0,562	0,642
45	0,205	0,22	0,437	0,556	0,642
50	0,174	0,197	0,39	0,551	0,642
55	0,153	0,177	0,361	0,545	0,642
60	0,14	0,163	0,319	0,537	0,642
65	0,13	0,149	0,3	0,529	0,642
70	0,123	0,138	0,294	0,523	0,642
75	0,118	0,13	0,285	0,517	0,642
80	0,114	0,122	0,276	0,512	0,642
85	0,111	0,116	0,27	0,506	0,642
90	0,108	0,11	0,265	0,5	0,642
95	0,106	0,106	0,26	0,494	0,642

Traitement des résultats

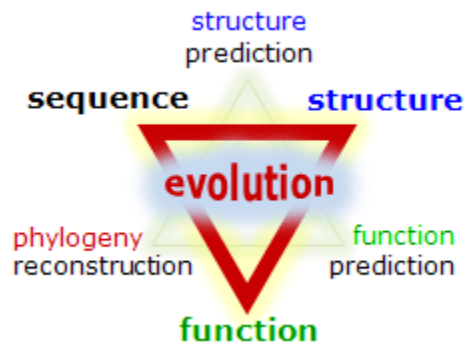
Micrococcus (G+) + différentes doses ug / ml lysozyme



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 à quelques µg/ml.

Pistes d'exploitations pédagogiques

- Dosage du lysozyme dans des liquides biologiques : **sérum, larmes, salive, lait...**
- Comparaison de la **teneur en lysozyme du lait de vache et du lait maternisé.**
- Dosage du lysozyme dans un antiseptique local (Lysopaine) préconisé en cas de mal de gorge peu intense, sans fièvre ou d'aphtes, de petites plaies de la bouche.



Lysozyme et évolution

- Le lysozyme est une enzyme produite par de très nombreux organismes, **animaux, végétaux**, (voire bactéries et bactériophages) permettant, entre autres, la lutte contre les microorganismes.
- Dans chacun des grands phylums dans lequel il a été identifié, le lysozyme présente la **capacité d'hydrolyser la liaison β -glycosidique entre le C-1 du NAM et le C-4 du NAG du PG**, évoquant une **conservation de son rôle biologique** dans les mécanismes de défense innée au cours de l'évolution.

Comparaisons de séquences primaires et de structures : logiciels Rastop et Anagène

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

Distribution des différents types de lysozymes décrits dans le règne animal

Le type c :

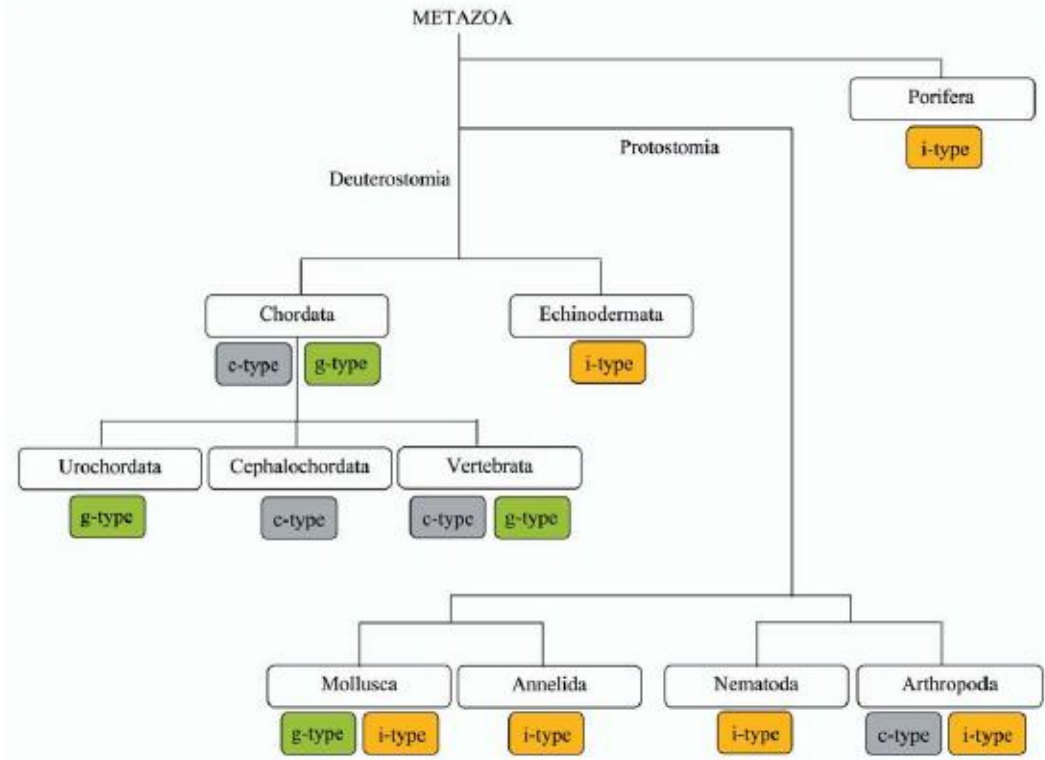
- plupart des Vertébrés dont les Mammifères ;
- *archétype* : lysozyme du blanc d'œuf de poule.
- Sur la base des séquences génomiques disponibles, on ne retrouve pas de lysozyme de type C chez les Invertébrés autres que les Arthropodes et les Céphalochordés.

Le Type g :

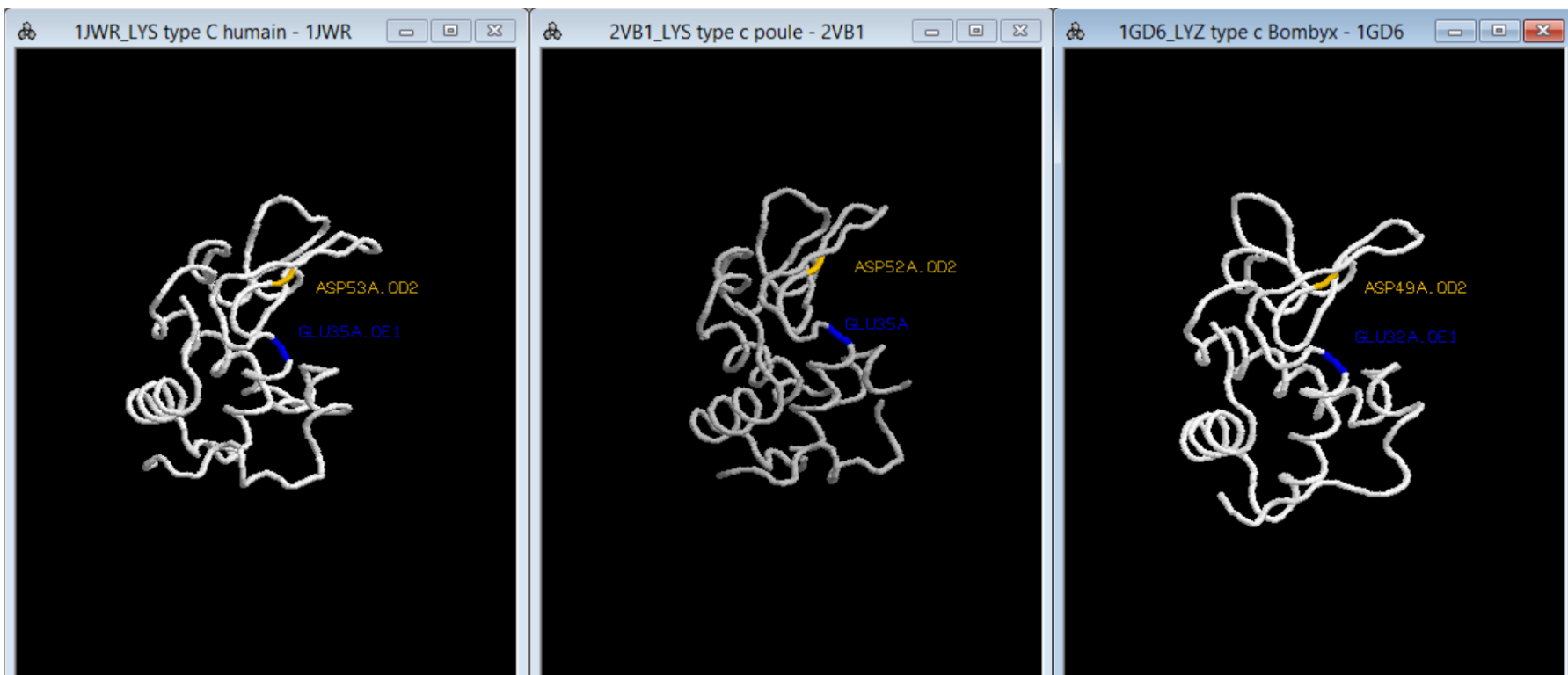
- décrit initialement dans le blanc d'œuf d'oie (Goose en anglais),
- dans les œufs de nombreuses espèces d'oiseaux, majoritairement ou avec le lysozyme de type C.
- des gènes fonctionnels ont été décrits chez certains Invertébrés, mollusques bivalves et Urochordés.

Le type i : ou « type invertébré » ;

- première séquence décrite chez un mollusque bivalve marin *Tapes japonica* (TjL ; Ito et al. 1999).
- présent au moins dans les phylum des Mollusques, Annélides, échinodermes, Nématodes et Arthropodes (mais pas chez les vertébrés).



Comparaison de structures 3D de 3 lysozymes de type C (homme, poule, papillon)



Alignement des séquences primaires dans Anagène (comparaison par alignement multiple)

Affichage des séquences

2VB1.meg	<	>	0	LysValPheGlyArgCysGluLeuAlaAlaAlaMetLysArgHisGlyLeuAspAsnTyrArgGlyTyrSerLeuGlyAsnTrpValCysAlaAlaLysPheGluSerAsnPheAsnThrGln
1JwR.meg	<	>	0	LysValPheGluArgCysGluLeuAlaArgThrLeuLysArgLeuGlyMetAspGlyTyrArgGlyIleSerLeuAlaAsnTrpMetCysLeuAlaLysTrpGluSerGlyTyrAsnThrArg
1GD6.meg	<	>	0	LysThrPheThrArgCysGlyLeuValHisGluLeuArgLysHisGlyPheGluGluAsnLeuMetArgAsnTrpValCysLeuValGluHisGluSerSerArgAspThrSerLysThrAsn

Sélection : 0/3 lignes

Comparaison avec alignement

Traitement	<	>	0	e séquences peptidiques
Identités	<	>	0	* . : : : * : : : * * : * . : * * . : * * * *
2VB1.meg	<	>	0	LeuAlaAlaAlaMetLysArgHisGlyLeuAspAsnTyrArgGlyTyrSerLeuGlyAsnTrpValCysAlaAlaLysPheGluSerAsnPheAsnThrGlnAlaThrAsnArgAsnThr
1JwR.meg	<	>	0	- - ArgThrLeu- - Leu- Met- Gly- - - Ile- - Ala- - Met- Leu- - - Trp- - GlyTyr- - Arg- - - Tyr- AlaGly
1GD6.meg	<	>	0	- ValHisGluLeuArgLys- - PheGluGluAsn - - - LeuMetArg- - - - LeuValGluHis- - SerArgAsp- SerLys- - Thr- Arg

Sélection : 0/5 lignes

BmLZ	K	T	F	T	R	C	G	L	V	H	E	L	R	K	H	G	F	E	E	N	---	L	M	R	N	W	V	C	L	V	E	H	E	S	S	R	D	T	S	K	I	
HEWLZ	K	V	F	G	R	C	E	L	A	A	A	M	K	R	H	G	L	D	N	Y	R	G	Y	S	L	G	N	W	V	C	A	A	K	E	S	N	F	N	T	Q	A	I

BmLZ	N	T	N	R	N	G	S	K	D	Y	G	L	F	Q	I	N	D	R	Y	W	C	S	K	G	A	S	P	G	---	K	D	C	N	V	K	C	S	D	L	L	T	D
HEWLZ	N	R	N	T	D	G	S	T	D	Y	G	I	L	Q	I	N	S	R	W	W	C	N	D	G	R	T	P	G	S	R	N	L	C	N	I	P	C	S	A	L	L	S

BmLZ	D	I	T	K	A	A	K	C	A	K	I	Y	K	-	R	H	R	F	D	A	W	Y	G	M	K	N	H	C	Q	G	S	-	L	P	D	-	I	S	S	C	-	-
HEWLZ	D	I	T	A	S	V	N	C	A	K	I	V	S	D	G	N	G	M	N	A	W	V	A	W	R	N	R	C	K	G	T	D	V	Q	A	W	I	R	G	C	R	L

Alignement simple des séquences protéiques de HEWLZ (lysozyme de poule) et BmLZ (lysozyme C de Bombyx mori) : les * correspondent aux **résidus catalytiques**, les encadrés aux régions présentant des structures secondaires

conclusions

Bien que les **similitudes dans la structure primaire** de ces protéines soient **limitées**, leur structure 3D présente de frappantes similarités :

- Deux types de domaines , l'un consistant principalement en un feuillet bêta plissé et l'autre principalement constitué d'hélices alpha.
- Domaines séparés par une encoche profonde;
- Encoche contenant le site actif, dont les **acides aminés intervenant dans la catalyse sont conservés.**

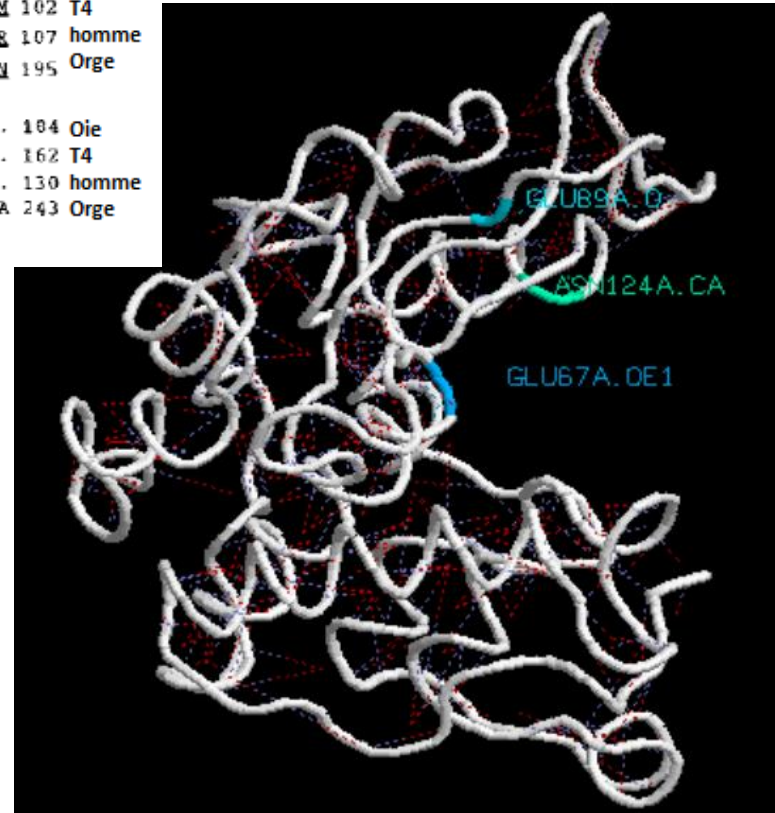
Acides aminés impliqués dans la catalyse (issu de la bibliographie)

Espèce et nom du Lysozyme	Acides aminés impliqués dans la catalyse
Gallus gallus (Poule) Lysozyme de type C	Glu 35 - Asp 52
Homo sapiens (Homme) Lysozyme de type C	Glu 35 - Asp 53
Anser anser anser (Goose = Oie) Lysozyme de type g	Glu 73 - Asp 86
Bombyx mori (Papillon) Lysozyme de type C	Glu 32 - Asp 49
Ruditapes philippinarum (Tapes japonica) Lysozyme de type i	Glu 18 - Asp 30
Hordeum vulgare (Orge) Lysozyme de type c	Glu 67 - Asn 124
Mytilus galoprovincialis (Moule méditerranéenne) Lysozyme de type C	Glu 56 - Asp 72

Chez les végétaux ... les endochitinases végétales

RTDCYGNVNRIDTTGASCKTAKPEGLSYCGVSASKKIAGRDLQAMD.....RYKTLIK.KVGEKL.CV.....	61	Oie
.....		T4
KVF.....EERa.....ELARTLERLGMDCGYRGI.....	23	homme
SVSSIVSRAUFLI.....EMLLRNDGaaQAKGFYTYDAEY.AAAAF.PGFGITGSADA	52	Orge
		* ** *
...EPAVLAGIISRS.....HAGKVLKNGWGD...R...G.....NGFQLNQVDK	98	Oie
...MNIFFMLRIDEG.....LRL.....KIYKDFEG...Y.....YTIG.IGHLL	33	T4
...SLANWMLAKWFS.....GYNT...RATNY...NAGDRS.....TDYQIFQINS	61	homme
OKREVA AFLAQTSHFTGGWATAPDGAFAWGYaF...KQER...G...ASSDYBTPSAQWPBAPGKRYYGHPIQLSH	121	Orge
* ** ** *		* ** *
RSHK.....PQGIWN..GEVHTTGGTLLINEI.TLQKAF.....PSWTKD.....DOLKGGIS	144	Oie
TKSPSLNAKSELDKAIQRNCGVIT..KDEAEKLENDVDAAVIRGILRNAKLKPVYDSLDAV.....RRCALINM	102	T4
RYWcNDGKTPGAVNAdHLS.cSALLQDNFADAVAdAKRYVDRDQ.....GIR	107	homme
NYNKGPRAGRAIGVDLLANP..DLVATD..ATVGEKTAIWFEMTAQ.PPKPSSHAVIA.GQWSPSGADRAAGRVPUGVLLIN	195	Orge
** * * *		
AYNAGACNVR.SYARMDIGT.....TH...DDYANDVVAR.AQVYEQHCY.....	104	Oie
VFDMGFTGVAGFTINSLRMLQCKRWDEAAVNLAKSRWYNQ...PNBAKRYITT.ERTGTWDAYK.....	162	T4
AWYA.....NENEbQNRDVROYWQCaGV.....	130	homme
LING.....GI.....EeGHGQDSRVADRICE.YKRYCDILGVGYGNLDeYSQRPEA	243	Orge
		*

Alignement multiple des séquences primaires des lysozymes humain, d'oie (type g), du phage T4 et d'orge : les * correspondent aux résidus conservés au sein des endochitinases végétales, les zones surlignées aux régions présentant des structures secondaires.



En terme d'homologies

Comparaison de séquences de lysozymes de type C par alignements multiples avec discontinuité dans Anagène

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

NE : 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.

La **similitude** est une quantité qui mesure le **pourcentage d'identité** entre deux séquences. L'homologie quant à elle est une propriété qui a une connotation évolutive. Deux séquences sont dites homologues si elles possèdent un ancêtre commun.

Partant d'une séquence d'intérêt, il est possible d'identifier un ensemble de séquences homologues par des comparaisons par paires avec les séquences des bases de données.

L'alignement multiple de ces séquences homologues a ensuite pour objectif d'agencer en colonne les acides aminés qui possèdent la même histoire évolutive. L'obtention de ces alignements multiples constitue une étape essentielle de l'analyse bio-informatique car elle permet de mettre en évidence les positions importantes pour la structure et/ou la fonction.

L'homologie peut être déduite de la similitude. On considère qu'une similitude significative (avec un **pourcentage d'identité supérieur à 40 %**) est signe d'homologie, sauf si les séquences présentent une faible complexité. L'inverse n'est par contre pas vrai. Une absence totale de similarité ne signifie pas absence d'homologie.

L'augmentation importante du nombre de structures 3D connues a fait clairement apparaître que dans de nombreux cas, deux séquences présentant des identités de séquence de l'ordre de 20% à 40% (cf le cas de certains lysozymes) adoptent des repliements proches et peuvent posséder des fonctions voisines. On parle alors d'**homologie** définie sur une base non plus génétique mais **structurale**. Cette homologie structurale est souvent liée à une **homologie fonctionnelle**.

Bibliographie

- [Callewaert L](#), [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).
- [Liisa Holm](#), [Chris Sander](#) “**Structural similarity of plant chitinase and lysozymes from animals and phage: An evolutionary connection**” [Febs letters.](#) 1994 Feb 28; 340 (1-2):129–132.