

## ETUDE IN VITRO D'UNE EXOPROTEASE D'*ASPERGILLUS FUMIGATUS* DEGRADANT LES PROTEINES CONSTITUTIVES DE MEMBRANES BASALES

Reçu le 14/04/2001 - Accepté le 01/07/2002

### Résumé

*Aspergillus fumigatus* est un champignon opportuniste responsable d'infections variées touchant principalement l'appareil respiratoire de l'homme et des animaux. Chez des sujets fortement immunodéprimés, l'aspergillose revêt souvent un caractère invasif, avec une évolution très rapide et généralement fatale. Depuis quelques années, des études considérables ont tenté d'élucider les mécanismes pathogéniques d'*Aspergillus fumigatus* qui président à son installation dans l'organisme hôte. En effet, il a été mis en évidence une corrélation entre la sécrétion *m vitro* par ce champignon d'une sérine-protéase de type chymotrypsine/subtilisine et ses capacités d'invasion tissulaire chez la souris. Nous avons étudié la dégradation de deux protéines constitutives des membranes basales, la laminine et le collagène type IV par cette enzyme. Notre étude a démontré au cours d'expériences réalisées *in vitro* la capacité de la protéase purifiée à dégrader les protéines constitutives de la membrane basale.

**Mots clés:** Sérine-protéase, *Aspergillus fumigatus*, Dégradation, Laminine, Collagène type IV.

### Abstract

*IV. Aspergillus fumigatus* is an opportunist fungus mainly responsible of acute infection of the respiratory tract of human and animals. The immunosuppressed patient shows mainly invasiveness and fatal Aspergillosis. This last years, many researcher have studied the pathogenic mechanism of *Aspergillus fumigatus* in the invasion of the tissue host. Effectively, there is a correlation between an *in vitro* secretion of serine proteinase- chymotrypsin/subtilisin by the fungus and his capacity of invasiveness in mice tissue. We have studied the degradation of two basement membrane protein, the laminin and the collagene type IV, by this enzyme. Our *in vitro* experiments have demonstrated the serine proteinase capacity of degradation the basement membrane protein.

**Key words:** Serine-proteinase, *Aspergillus fumigatus*, Degradation, Laminine, Collagene type IV.

M. AISSI<sup>1</sup>  
J.P. BOUCHARA<sup>2</sup>  
G. TRONCHIN<sup>2</sup>  
G. LARCHER<sup>2</sup>  
J. VIGNY<sup>3</sup>  
D. CHABASSE<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Ecole Nationale Vétérinaire  
Laboratoire de Parasitologie  
Alger, Algérie  
<sup>2</sup> C.H.U. Angers  
Laboratoire de Parasitologie-  
Mycologie  
Angers, France  
<sup>3</sup> I.N.S.E.R.M.  
U118 - Paris - France

### ملخص

إن الأسبيرجيلوس فوميفاطوس فطر انتازي مسؤول عن الاصابات المختلفة التي تصيب بصفة خاصة الجهاز التنفسي للإنسان والحيوانات، وكثيرا ما يكتسي داء الرشاشيات طابعا غزويا، عند الاشخاص ذوي المناعة المنخفضة، مع تطور جد سريع وعموما قاتل. وسعت دراسات مهمة، منذ سنوات، في توضيح الالويات الامراضية للأسبيرجيلوس فوميفاطوس التي تشرف على إقامته في الجسم المضيف. وفعلا، فإنه تم توضيح علاقة متبادلة بين الإفراز في بيئة مصطنعة بهذا الفطر لحميرة سبرين-جروتياز من نوع كيموتريپيس/ سوبتيليزين وقدراتها على الغزو النسيجي عند الفأرة. ودرسنا اتلاف هيولييين أنين مكونين للأغشية القاعدية: اللامينين والكولاجين نوع IV بهذه الخميرة. وبينت دراستنا خلال التجارب المنجزة في بيئة مصطنعة قدرة البروتياز المطهرة على اتلاف الهيوليينات المكونة للغشاء القاعدي.

**الكلمات المفتاحية:** سيرين-بروتياز *serine-protease*، الأسبيرجيلوس فوميفاطوس *Aspergillus fumigatus*، اتلاف، لامينين *laminine*، كولاجين نوع IV.

Des études ont mis en évidence la capacité de microorganismes à dégrader, par le biais de protéases, les constituants des matrices extracellulaires {*Bacteroides gingivalis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Trichomonas tenax*, *Entamoeba histolytica* ou *Schistosoma mansoni* [2,4,7,14,22,23,26]. Les travaux concernant les *Aspergillus* se sont orientés vers l'amélioration des connaissances sur la physiopathologie des infections aspergillaires. Différents auteurs ont démontré la sécrétion par *Aspergillus fumigatus* d'une sérine-protéase de type chymotrypsine/ subtilisine dégradant le fibrinogène [12], la laminine [25], le collagène type I [17] et l'élastine [6,9,13,17,21].

Cette enzyme constitue un facteur potentiel de la virulence d'*Aspergillus fumigatus*, en contribuant à l'invasion des tissus de l'hôte par les filaments mycéliens en franchissant les membranes basales. Nous avons tenté de préciser l'action de cette protéase sur les composants des membranes basales comme la laminine et le collagène type IV, par la mise en évidence de sa production au cours de la croissance du champignon, et par une étude cinétique de la dégradation de ces dites protéines.

### MATERIELS ET METHODES

#### A- ORGANISMES ET CONDITIONS DE CULTURE

##### 1- Obtention d'une suspension de spores

La souche d'*Aspergillus fumigatus* utilisée pour cette étude est la CBS 113.26. 10 cultures sur boites de petri, de la souche CBS 113.26 âgées de 5 jours maintenues à 37°C sur milieu PDYA (peptone pancréatique, glucose, extrait de levure, agar-agar; Difco), sont raclées

dans de l'eau distillée stérile. La suspension obtenue est filtrée sur toile à bluter (membrane de nylon Monyl Scrynel NY 25 HC, ZBF) dont les pores font 25 µm de diamètre, pour éliminer les têtes aspergillaires, filaments mycéliens et les éventuels débris de gélose. Cette dernière suspension de spores est centrifugée à 1500 g pendant 5mn et le culot est remis en suspension dans un petit volume d'eau distillée stérile ( $4.10^{10}$  spores/ml).

## 2 - Production de l'exoprotéase

La suspension de spores obtenue précédemment est inoculée en milieu liquide contenant du glucose (10g/l) comme source de carbone, de la peptone bactériologique (1g/l) comme source d'azote [1] additionné de chloramphénicol (1g/l). Au bout de 5 jours d'incubation à 37°C, le surnageant de culture est stérilisé par filtration successivement sur papier filtre, puis des filtres Whatman en nitrate de cellulose de 47 mm de diamètre et de porosité décroissante (05µm, puis 01 µm et 0,2µm). Le filtrat est ensuite dialysé pendant 24 à 48 h à +4°C contre du polyéthylène glycol 35000 dans des sacs de collodion ayant un seuil d'exclusion de 8 à 10 Kda. Le concentré obtenu est ensuite dialysé contre du tampon Tris-HCl pH 7,5 additionné de NaCl 0,15 M (Tris buffered saline, TBS).

## 3 - Purification de l'exoprotéase

La purification de l'exoprotéase a été réalisée selon une technique chromatographique décrite par Larcheret *et al.* [12]. Ce protocole comporte deux temps; d'abord, une chromatographie d'exclusion moléculaire sur colonne de Séphadex G-75 équilibrée dans du tampon TBS, suivie d'une chromatographie d'affinité sur phénylalanine-agarose, l'un des acides aminés étant reconnus spécifiquement par les protéases de type chymotrypsine/subtilisine. Après chaque étape de purification, une détermination de l'activité chymotrypsique et un dosage des protéines totales sont effectués.

## B - PURIFICATION ET RADIOMARQUAGE DE LA LAMININE ET DU COLLAGÈNE TYPE IV

### 1 - Purification de la laminine

L'extraction de la laminine a été réalisée à partir de la tumeur murine Englebreth-Holm-Swarm (EHS), tumeur du tissu conjonctif sous-cutané qui produit des quantités importantes de composants de membrane basale. Ce sarcome nous a été gracieusement fourni par le professeur Vigny (INSERM, U118, Paris). L'extraction et la purification de la laminine ont été réalisées selon une modification du protocole de Timpl *et al.* [24].

La purification est réalisée par chromatographie d'échange ionique sur colonne de QA-Trisacryl M avec élution en tampon Tris/HCl 20 mM pH9,6 contenant 0,25 M de NaCl. Après dialyse à +4°C pendant une nuit contre du tampon Tris/HCl 50 mM pH 7,4, NaCl 0,5 M, EDTA 2mM, additionné de PEG 35000 20%, la solution est chromatographiée sur une colonne de Fractogel TSK HW-50. La purification est contrôlée par électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de dodécyl sulfate de sodium (SDS-PAGE) et, après dosage des protéines selon la

méthode de Bradford [3], le pic correspondant à la laminine est conservé sous forme d'aliquotes à - 80°C.

## 2 - Marquage du collagène type IV et de la laminine à l'Iode 125

Le marquage du collagène type IV (Collaborative Biomédical Products) et de la laminine a été effectué selon la méthode de la chloramine T [8].

La radioactivité est mesurée à l'aide d'un compteur Y (Crystal 5400, Packard Instrument Company) sur 50 µl d'une dilution de 1/100 en tampon phosphate salin (PBS) de chacune des fractions obtenues.

## C - DETERMINATION DE L'ACTIVITE CHYMYOTRYPSIQUE

L'activité chymotrypsique est déterminée par l'hydrolyse d'un substrat synthétique spécifique des sérine-protéases de type chymotrypsine-subtilisine (le N-Succinyl-alanyl-Alanyl-Prolyl-Phénylalaninyl-paranitroanilide). Ce substrat est utilisé à une concentration finale de 5,3mM dans du diméthylsulfoxyde (DMSO). L'extrait enzymatique en tampon Tris-HCl 50mM pH7,5 est incubé en présence du substrat durant 1h à 37°C. L'unité d'activité enzymatique (U) est défini comme étant la quantité d'enzyme libérant 1nmol de paranitroaniline/mn à 37°C. L'intensité de la coloration est mesurée au spectrophotomètre Titertek Multiskan à 405 nm.

## D - DETERMINATION DU TAUX DE PROTEINES TOTALES

Le taux de protéines totales des différentes fractions est déterminé selon la méthode de Bradford [3], en utilisant le réactif de coloration Bio-Rad.

Des dilutions sériées de 1/2 en 1/2 des échantillons enzymatiques à doser sont réalisées en tampon Tris-HCl 50mM pH7,5, auxquelles est rajouté le réactif Bio-rad dilué au 1/5<sup>ème</sup>. Après 15mn d'incubation à l'obscurité, la lecture est effectuée au spectrophotomètre à 620nm. Le taux de protéines totales est déterminé en comparant la densité optique obtenue à celle du sérum albumine bovine (BSA) pour laquelle une courbe d'étalonnage a été établie avec une gamme de concentrations comprises entre 0,2 et 1,4 mg/ml.

## E - ETUDE DE LA DEGRADATION DE LA LAMININE AU COURS DE LA CROISSANCE DU CHAMPIGNON

Une suspension de spores de la souche CBS 113.26 est incubée dans des tubes contenant un milieu liquide supportant la production de la sérine-protéase ( $10^7$  spores/ml milieu de culture) à 37°C [1,5], pendant des temps variables allant de 1h à 72h, et additionnée de laminine radiomarquée ( $5 \times 10^7$  cpm/ml de milieu de culture). Le mycélium et les spores sont récupérés par filtration sur filtres Wathman (pré-tarés) de 0,45 µm de porosité, et sont lyophilisés pour la détermination du poids sec (mg). Parallèlement, la laminine fixée à la surface des éléments fongiques (pores et mycélium) est solubilisée par leur dissociation dans du tampon de reprise des échantillons additionné de 2-ME, et chauffage au bain-marie pendant 5mn. Après centrifugation à 12000g durant 5mn, la surnageant est récupéré et la radioactivité est évaluée au compteur Y, ainsi que sur le filtrat de culture. Une activité

chymotrypsique est déterminée sur ce même filtrat. La laminine libre ou fixée sur les éléments fongiques est visualisée par une analyse électrophorétique sur gel résolutif à 6,5% de polyacrylamide, suivie d'une autoradiographie.

La culture du champignon dans un milieu favorable à la production de protéase en présence de la laminine radiomarquée a été suivie:

- 1/ par mesure du poids sec du mycélium, ce qui permet d'apprécier la croissance fongique,
- 2/ par dosage du pNA libéré lors de l'hydrolyse d'un substrat chromogénique spécifique des chymotrypsine sous l'effet des filtrats de cultures, conduisant au suivi de la sécrétion de cette protéase,
- 3/ et enfin par mesure de la radioactivité dans les filtrats de culture et sur le mycélium. Ensuite, analyse des produits radiomarqués par SDS-PAGE, puis autoradiographie.

#### F - ETUDE DE LA DEGRADATION DE LA LAMININE ET DU COLLAGÈNE TYPE IV PAR LA PROTEASE PURIFIEE

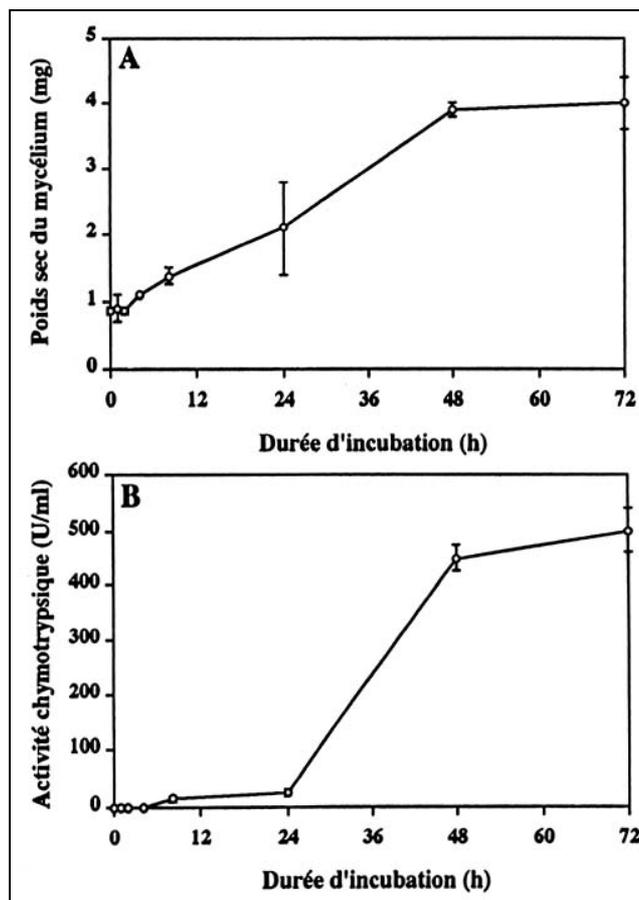
La protéase purifiée en solution à 10 µg/ml en tampon Tris-HCl pH7,6 est incubée à 37°C sous agitation constante en présence de la solution de laminine ou du Collagène iodé ( $1,5 \times 10^6$  cpm). Après incubation pendant des temps variables de 5mn à 24h, la réaction est arrêtée par chauffage au bain-marie à 100°C, durant 3mn. La dégradation des protéines iodées est ensuite recherchée par analyse électrophorétique en conditions réductrices sur gel résolutif à 6,5% de polyacrylamide, puis autoradiographie. Les témoins réalisés sont la laminine et le collagène type IV iodés, incubés pendant 24h en l'absence de protéase pour vérifier l'absence de dégradation spontanée des protéines, ou en présence de la protéase préalablement dénaturée par chauffage au bain-marié à 100°C pendant 3mn. Parallèlement, nous avons effectué des expériences d'inhibition de la dégradation des protéines radiomarqués par la protéase sous l'effet de différents inhibiteurs potentiels : des agents réducteurs ou alkylants comme le 2-mercaptol-éthanol (2-ME) à 1% et le N-éthylmaléimide (NEM) à 2mM, des agents chélatants comme l'acide éthylène diamine tétraacétique (EDTA) à 10mM, ainsi que des inhibiteurs de protéases acides ou de sérine-protéases, la pepstatine à 100 µM, le phénylméthylsulfonyl fluoride (PMSF) à 1 µM, l'inhibiteur trypsique de soja (SBTI) à 50µM, l'elastatinal à 100 µM et la chymostatine à 100 µM. La protéase purifiée est donc incubée pendant 30mn à température ambiante sous agitation constante en présence de solutions d'inhibiteurs 10 fois concentrées. La laminine et le collagène type IV sont ensuite rajoutés, et incubés à 37°C sous agitation constante pendant 1h pour la laminine et 2h pour le collagène type IV. La réaction est arrêtée par chauffage au bain-marie pendant 3mn et addition de tampon échantillon pour électrophorèse concentré dix fois. La protéolyse ou son inhibition sont visualisées par SDS-PAGE et autoradiographie.

#### RESULTATS

Le poids sec du mycélium (mg) reste stable pendant les deux premières heures d'incubation (Fig.1A). Une phase

linéaire de croissance survient et se poursuit jusqu'à 48h d'incubation, puis débute la phase stationnaire qui se traduit par un plateau dans la courbe d'évolution du poids sec.

Pendant les premières heures d'incubation, aucune activité chymotrypsique n'est détectable (Fig.1B). L'activité enzymatique est décelable à partir de 24h d'incubation, correspondant à l'apparition dans le milieu de culture du phase filamentaire du champignon. Cette activité augmente progressivement pour atteindre un maximum au bout de 48h d'incubation, puis reste stable.



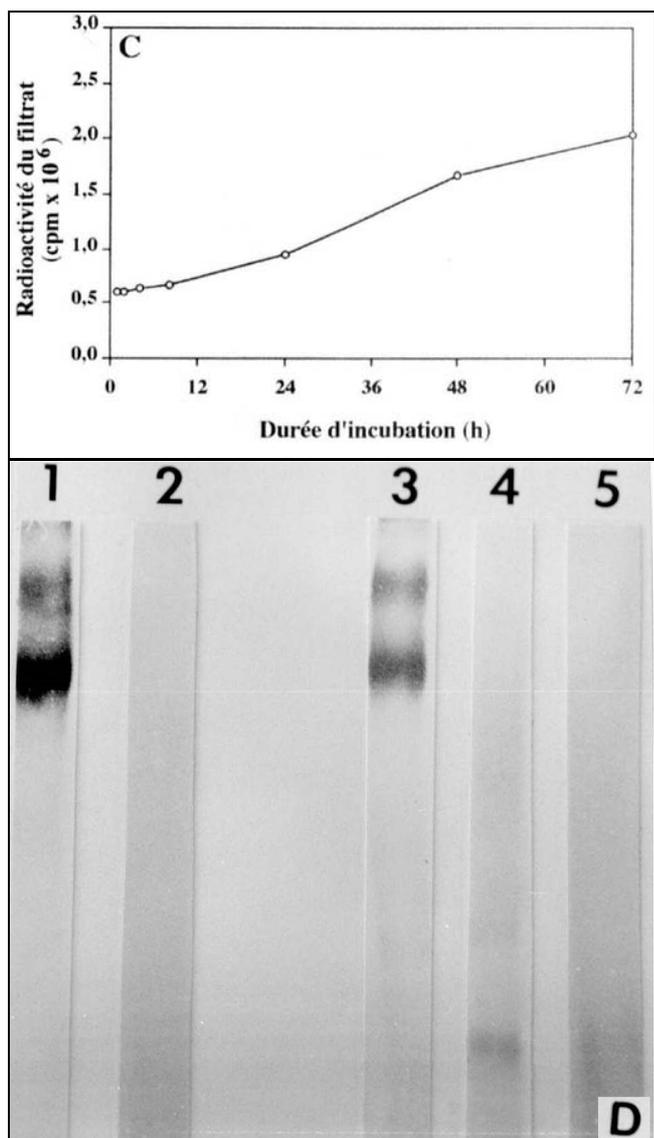
**Figure 1 :** Dégradation de la laminine iodée au cours de la croissance fongique *in vitro*.

A: Courbe de croissance. B: Etude de la cinétique de sécrétion de la chymotrypsine.

La radioactivité détectée dans le filtrat de culture présente peu de variations pendant les 8 premières heures d'incubation (Fig. 1C). Elle est 10 fois inférieure à la dose de laminine introduite dans le milieu de culture, vraisemblablement par fixation d'une partie de la laminine iodée à la surface des spores. La radioactivité augmente ensuite progressivement pendant la durée de l'expérimentation, et ne devient réellement significative qu'à partir de 24h d'incubation.

L'analyse électrophorétique du filtrat de culture et du matériel élué de la surface des éléments fongiques, montre que les trois chaînes constitutives de la laminine sont dégradés progressivement à partir de la 8<sup>ème</sup> heure d'incubation (Fig.1D, pistes 1 et 3). A partir de 24h, des

produits de clivage de faible masse moléculaire, détectés dans le filtrat de culture (Fig.1D, piste 4), sont totalement digérés au bout de 72h (Fig.1D, pistes 2 et 5).



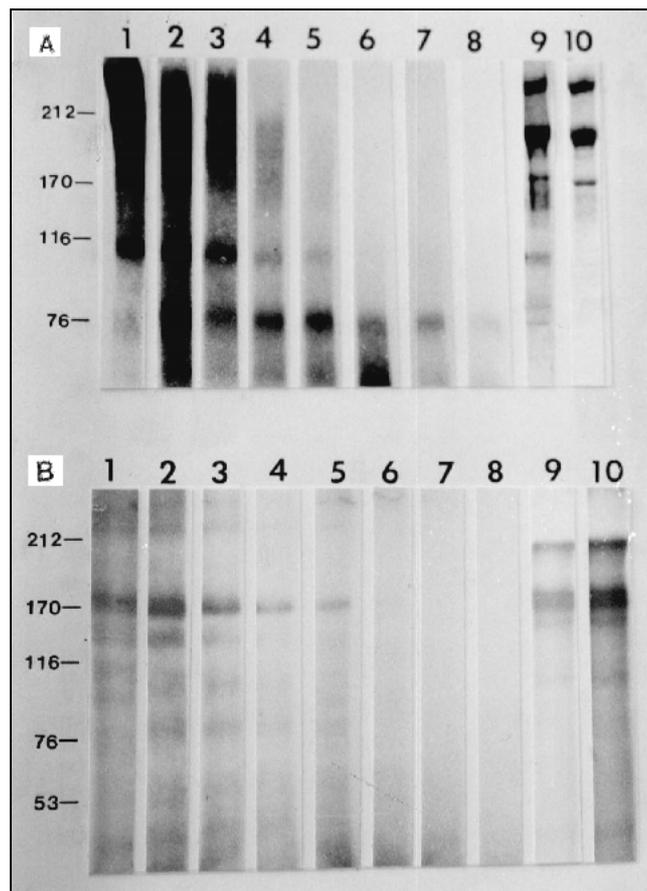
**Figure 1** : Dégradation de la laminine iodée au cours de la croissance fongique *in vitro*.

**C**: Variation de la radioactivité dans le filtrat de culture.

**D**: Autoradiogramme du matériel élué de la surface des éléments fongiques (pistes 1 et 2) et du filtrat de culture (piste 3 et 5) après incubation pendant 8h (pistes 1 et 3), 24h (piste 4) et 72h (pistes 2 et 5). Les échantillons protéiques ( $5 \times 10^5$  cpm) sont analysés par SDS-PAGE sur gel résolutif à 6,5% de polyacrylamide, puis autoradiographie.

L'incubation de la laminine radiomarquée en présence de la protéase se traduit par une dégradation rapide de la molécule. L'analyse électrophorétique des produits de clivage révèle la disparition totale de la chaîne A après 30mn d'incubation, alors que les chaînes B1 et B2 disparaissent seulement au bout de 1h puis apparaissent des produits de clivage d'environ 100 et 80 Kda (Fig.2A). La dégradation du collagène type IV est également très rapide puisqu'elle est déjà détectée au bout de 2h (Fig. 2B, piste 5).

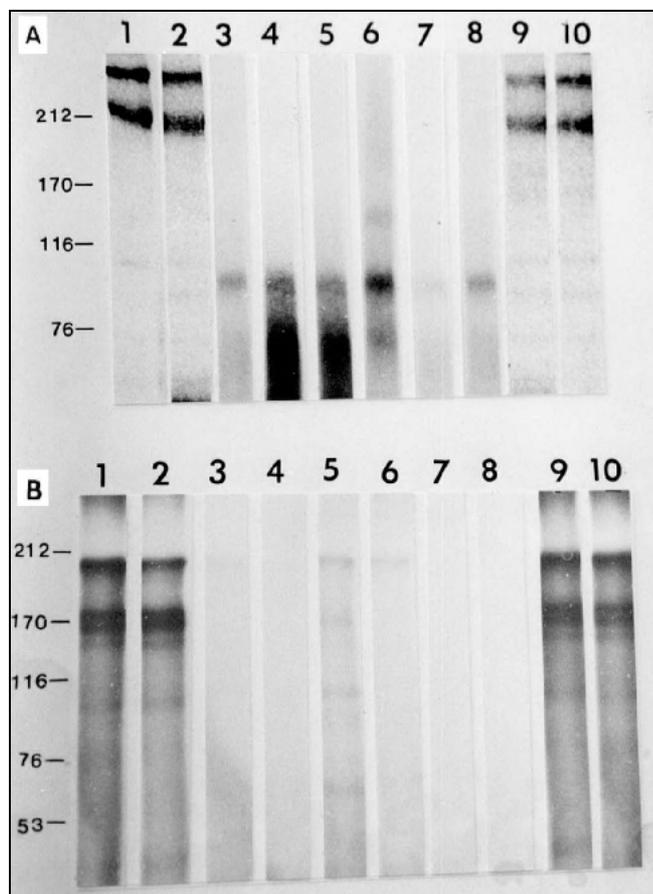
En outre, les contrôles effectués par incubation des composants radiomarqués en absence d'extrait protéasique ou en présence de la protéase préalablement inactivée par chauffage, attestent de l'absence d'autolyse et du rôle de l'enzyme dans la dégradation (Fig. 2A et B, pistes 9 et 10).



**Figure 2** : Etude de la cinétique de dégradation de la laminine (A) et du collagène type IV (B) par la protéase purifiée.

Des aliquotes de la protéase purifiée (100  $\mu$ l à 10 $\mu$ l/ml) sont incubées en présence d'une dose fixe de la laminine ou du collagène iodé, pendant des temps variables. La dégradation des protéines iodées est analysée par SDS-PAGE en conditions réductrices ( $5 \times 10^5$  cpm/piste) et autoradiographie. Les pistes 1 à 8 correspondent aux différents temps d'incubation: 5mn, 15mn, 30mn, 1h, 2h, 3h, 6h et 24h, respectivement. Les pistes 9 et 10 correspondent aux témoins effectués par incubation de la protéine iodée en absence de protéase ou en présence de protéase inactivée par la chaleur. Les marqueurs de masse moléculaire, en kDa, sont indiqués sur la gauche.

La dégradation de la laminine et collagène type IV radiomarqués est inhibée en présence du phénylméthylsulfonylfluoride (PMSF), ou de chymotrypsine qui agit plus spécifiquement sur les sérine-protéases de type chymotrypsine/subtilisine (Fig. 3 A et B, pistes 1 et 2). Par contre, aucune inhibition n'est observée en présence d'inhibiteurs des autres classes de protéases, SBTI et élastatinal pour les sérine-protéases de type trypsine et élastase, NEM et 2-ME pour les cystéines-protéases, EDTA et pepstatine A pour les métalloprotéases et les aspartyl-protéases (Fig. 3A et B, pistes 3 et 8).



**Figure 3:** Expériences d'inhibition de la dégradation de la laminine (A) et du collagène type IV (B) par la protéase purifiée. Des aliquotes de la protéase purifiée (100  $\mu$ l à 10 $\mu$ l/ml) sont incubées en présence d'une dose fixe de la laminine ou du collagène iodé, et d'inhibiteurs enzymatiques: PMSF, 1mM (piste 1), Chymostatine, 100  $\mu$ M (piste 2), SBTI, 50  $\mu$ M (piste 3), élastatine, 100 $\mu$ M (piste 4), NEM, 2 mM (piste 5), 2-ME 1% (piste 6), EDTA, 10mM (piste 7) et pepstatine A, 100 $\mu$ M (piste 8). Les pistes 9 et 10 correspondent aux témoins effectués en absence de tout inhibiteur potentiel, ou en présence de protéase inactivée par la chaleur. La dégradation des protéines iodées est analysée par SDS-PAGE en conditions réductrices (5  $\times$  10<sup>5</sup> cpm/piste) et autoradiographie. Les marqueurs de masse moléculaire, en kDa, sont indiqués sur la gauche.

## DISCUSSION

Les travaux ont porté ces dernières années principalement sur la sécrétion de protéases, considérées comme indispensable à l'invasion des tissus de l'hôte. Dès 1977, Miyaji *et al.* [15] et plus tard, Kothary *et al.* [10] ont établi une relation entre l'activité protéolytique d'*Aspergillus fumigatus* et sa capacité à envahir le cerveau chez la souris. Diverses protéases ont ainsi été isolés et caractérisées chez *Aspergillus fumigatus*, [16,18-20], notamment, une protéase alcaline de type chymotrypsine/subtilisine [6,12,13,17,21], qui présente des propriétés fibrinolytiques [12] et dégrade également le collagène type I [17,21] et la laminine [25].

Nous avons montré, à travers une analyse électrophorétique du filtrat de culture, qu'au cours de sa croissance à 37°C, en milieu liquide additionné de laminine

iodée, la souche CBS 113.26 d'*Aspergillus fumigatus* produit dès la 24<sup>ème</sup> heure de culture, une enzyme protéolytique dégradant la laminine qui disparaît totalement au bout de 72h d'incubation.

Cette dégradation coïncide avec l'apparition dans le filtrat de culture, d'une activité chymotrypsique (fig. 1B), ainsi qu'un accroissement du poids sec du mycélium (fig. 1A). La dégradation de la laminine serait assurée par une sérine-protéase sécrétée par *Aspergillus fumigatus* au cours de sa phase filamenteuse, qui cliverait la laminine radiomarquée libre ou liée aux éléments fongiques et libérerait dans le milieu de culture des produits de clivage radiomarqués.

Une fois purifiée à partir du filtrat de culture, cette enzyme conserve son aptitude à dégrader la laminine radiomarquée, et agit également sur un autre composant fondamental des membranes basales, le collagène type IV. Son action est rapide. En effet, la dégradation de la laminine est totale au bout de 3h, plus rapide encore pour le collagène type IV, puisque les trois chaînes consécutives de cette glycoprotéine sont entièrement dégradées après incubation pendant 2h en présence de l'enzyme. Ces expériences ont par ailleurs montré pour la laminine, une plus grande sensibilité des chaînes A comparé aux chaînes B1 et B2.

Cette plus grande sensibilité des chaînes lourdes est également observée pour le collagène type IV, ce qui corrobore les résultats obtenus par Bozner *et al.* [2] qui constatent une plus grande sensibilité des chaînes  $\alpha_1$  (IV) à l'action de la cystéine-protéase de *Trichomonas tenax*.

Nos expériences ont permis de mettre en évidence la capacité de la sérine-protéase d'*Aspergillus fumigatus* sécrétée durant la phase filamenteuse, à dégrader rapidement deux composants principaux de membranes basales, la laminine et le collagène type IV. Ces résultats nous permettent de considérer la sérine protéase comme un facteur non négligeable de la virulence d'*Aspergillus fumigatus*.

## REFERENCES

- [1]- Bouchara J.P., Larcher G., Joubaud F., Penn P., Tronchin G. and Chabasse D., "Extracellular fibrinogenolytic enzyme of *Aspergillus fumigatus* : substrate-dependent variations in the proteinase synthesis and characterisation of the enzyme", *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, 7, (1993), pp. 81-92.
- [2]- Bozner P. and Dems P., "Degradation of collagen types I, III, IV and V by extracellular proteinase of an oral flagellate *Trichomonas tenax*", *Arch. Oral Biol.*, 36, (1991), pp. 765-770.
- [3]- Bradford M.M., "A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding", *Anal. Biochem.*, 72, (1976), pp. 248-254.
- [4]- Courtney H.S., "Degradation of connective tissue proteins by serine proteases from *Streptococcus pneumoniae*", *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 175, (1991), pp. 1023-1028.
- [5]- Denning D.W., Elliott J. and Keaney M., "Temperature-dependent expression of elastase in *Aspergillus* species", *J. Med. Vet. Mycol.*, 31, (1993), pp. 455-158.
- [6]- Frosco M., Chase T. and MacMillan J.D., "Purification and properties of the elastase from *Aspergillus fumigatus*", *Infect. Immun.*, 60, (1992), pp. 728-734.
- [7]- Grenier D., Uitto V. and McBride B.C., "Cellular location of a

- Treponema denticola* chymotrypsinlike protease and importance of the protease in migration through the basement membrane", *Infect. Immun.*, 58, (1990), pp. 347-351.
- [8]- Hunter W.H. and Greenwood F.C., "Preparation of iodine-131 labeled human growth hormone of high specific activity", *Nature* (London), 194, (1962), pp. 495-496.
- [9]- Kolattukudy P.E., Lee J.D., Rogers L.M., Zimmerman P., Ceselski S., Fox B., Stein B. and Copelan E.A., "Evidence for possible involvement of elastolytic serine protease in aspergillosis", *Infect. Immun.*, 61, (1993), pp. 2357-2368.
- [10]- Kothary M.H., Chase T.Jr. and McMillan J.D., "Correlation of elastase production by some strains of *Aspergillus fumigatus* with ability to cause pulmonary invasive aspergillosis in mice", *Infect. Immun.*, 43, (1984), pp. 320-325.
- [11]- Laemmli U.K., "Cleavage of structural proteins during the assembly of head of bacteriophage", T4, *Nature* (London), 227, (1970), pp. 680-685.
- [12]- Larcher G., Bouchara J.P., Annaix V., Symoens F., Chabasse D. and Tronchin G., "Purification and characterization of a fibrinogenolytic serine proteinase from *Aspergillus fumigatus* culture filtrate", *FEBS Lett.*, 308, (1992), pp. 65-69.
- [13]- Luisetti M., Guglielminetti M., Piccioni P.D., Iadarola P., Gandola L., Poena V. and Garetta G., "The elastase produced by *Aspergillus fumigatus* is a serine chymotrypsin-like proteinase", *Chest*, 102, (1992), p. 958.
- [14]- McKerrow J.H., Keene W.E., Joeng K.H. and Werb Z., "Degradation of extracellular matrix by larvae of *Schistosoma mansoni*. 1. Degradation cercariae as a model for initial parasite invasion of host", *Lab. Invest.*, 49, (1983), pp.195-200.
- [15]- Miyaji M. and Nishimura K., "Relationship between proteolytic activity of *Aspergillus fumigatus* and the fungus invasiveness of mouse brain", *Mycopathologia*, 62, (1977), pp. 161-166.
- [16]- Monod M., Paris S., Sanglard D., Sarfati J., Jatton-Ogay, Ave P. and Latgé J.P., "Isolation and characterization of a secreted metalloprotease of *Aspergillus fumigatus*", *Infect. Immun.*, 61, (1993), pp. 4099-4104.
- [17]- Monod M., Togni G., Rahalison L. and Frenk E., "Isolation and characterization of an extracellular alkaline protease of *Aspergillus fumigatus*", *J. Med. Microbiol.*, 35, (1991), pp. 23-28.
- [18]- Panneerselvam M. and Dhar S.C., "Chromatographic purification and homogeneity of extracellular acid proteinase of *Aspergillus fumigatus*", *Ital. J. Biochem.*, 29, (1980), pp. 102-112.
- [19]- Panneerselvam M. and Dhar S.C., "Physicochemical properties of acid proteinase from *Aspergillus fumigatus*", *Ital. J. Biochem.*, 30, (1981), pp. 63-74.
- [20]- Piechura J.E., Kurup V.P. and Daft L.J., "Isolation and immunochemical characterization of fractions from membranes of *Aspergillus fumigatus* with protease activity", *Can. J. Microbiol.*, 62, (1990), pp. 79-85.
- [21]- Reichard U., Buttner S., Eiffert H., Staib F. and Ruchel R., "Purification and characterization of an extracellular serine proteinase from *Aspergillus fumigatus* and its detection in tissue", *J. Med. Microbiol.*, 33, (1990), pp. 243-251.
- [22]- Rodier M.H., Elmoudni B., Kauffmannlacroix C., Daniault G. and Jacquemin J.L., "A *Candida albicans* metalloprotease degrades constitutive proteins of extracellular matrix", *FEMS Microbiology Letters*, Vol. 177, Iss 2, (1999), pp. 205-210.
- [23]- Schulte W. and Scholze H., "Action of major protease from *Entamoeba histolytica* on proteins of the extracellular matrix", *J. Protozool.*, 36, (1989), pp. 538-543.
- [24]- Timpl R., Rohde H., Gehron-Robey P., Rennard S.L., Foidart J.M. and Martin G., "Laminin - A glycoprotein from basement membranes", *J. Biol. Chem.*, 254, (1979), pp. 9933-9937.
- [25]- Tronchin G., Bouchara J.P., Larcher G., Lissitzky J.C. and Chabasse D., "Interactions between *Aspergillus fumigatus* and basement membrane laminin: Binding substrate degradation", *Biol. Cell*, 77, (1993), pp. 201-208.
- [26]- Uitto V., Larjava H., Heino J. and Sorsa T., "A protease of *Bacteroides gingivalis* degrades cell surface and matrix glycoproteins of cultured gingival fibroblasts and induces secretion of collagenase and plasminogen activator", *Infect. Immun.*, 57, (1989), pp. 213-218. □