

ETUDE *in vivo* ET *ex vivo* DE LA DEGRADATION DES PROTEINES CONSTITUTIVES DE MEMBRANES BASALE PAR LA SERINE-PROTEASE D'*Aspergillus fumigatus*

Reçu le 31/03/2003 – Accepté le 20/06/2004

Résumé

Des travaux ont mis en évidence la capacité d'une sérine-protéase sécrétée par *Aspergillus fumigatus*, à dégrader les protéines constitutives des membranes basales. Nous avons étudié, dans notre travail, la dégradation par la sérine-protéase purifiée, de la laminine et le collagène type IV, constituants des membranes basales, au sein du matrigel et sur des coupes d'organes de rat. Cette étude a mis en évidence la dégradation rapide de ces protéines par la sérine-protéase purifiée.

Mots clés: *Aspergillus fumigatus*, sérine-protéase, Matrigel, Laminine, Collagène type IV.

Abstract

Work highlighted the capacity of serine-protease secreted by *Aspergillus fumigatus* to degrade proteins of the basement membrane. Our work studied degradation of the laminine and standard collagen IV by the purified serine-protease, components of the basement membrane, within the matrigel and on cuts of fabrics of rat. This study highlighted the fast degradation of these proteins by the purified serine-protease.

Keywords: *Aspergillus fumigatus*, Serine-protease, Matrigel, Laminine, Standard collagen IV.

M. AISSI

Laboratoire de Parasitologie
Ecole Nationale Vétérinaire
Alger (Algérie)

Parmi les nombreux composants élaborés par *Aspergillus fumigatus*, considérés comme des facteurs potentiels de virulence, la sécrétion de protéases semble jouer un rôle important dans l'invasion des tissus de l'hôte. Des travaux portant sur la sécrétion par *Aspergillus fumigatus*, d'une protéase alcaline de type chymotrypsine/subtilisine, [4, 6, 7, 9, 10] révèlent qu'elle possède une activité fibrinogénolytique [7], élastinomytique [25] et est capable de dégrader le collagène type IV [21] et la laminine [13].

Notre étude tente d'identifier les protéines cibles de la protéase au niveau des membranes basales par incubation du matrigel (membrane basale reconstituée) et des coupes à congélation de foie et de rein de rat, en présence de la protéase purifiée.

MATERIELS ET METHODES

Organismes et conditions de culture

1 – Souche utilisé

Cette étude a été réalisée sur la souche *Aspergillus fumigatus* 113.26, isolée du sol, obtenue du Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS) à Baarn (Pays-Bas). Cette souche est entretenue par repiquages hebdomadaires sur milieu PDYA (peptone pancréatique, glucose, extrait de levure, agar-agar ; Difco) additionné de chloramphénicol. Elle est également conservée sous forme lyophilisée.

Les colonies d'*Aspergillus fumigatus* sur milieu Sabouraud gélosé, sont blanchâtres, puis bleu vert virant ensuite au vert foncé à gris noirâtre. Les colonies présentent une croissance rapide à 37°C (3 jours) et leur température optimale est de 40 à 42°C. *Aspergillus fumigatus* est un champignon qui se développe très bien à 45°C jusqu'à 57°C.

ملخص

أعمال وضحت قدرة *Aspergillus fumigatus* serine protease في التخفيف التدريجي لنقي مركبة للأغشية صدر وفي قطع أعضاء الفأر القاعدية. هذه الدراسة وضحت التخفيف التدريجي والسريع للبروتينات عن طريق نق مفرزة من طرف serine-protease.

الكلمات المفتاحية: *Aspergillus fumigatus*,
Matrigel, *Laminine*, *Collagen IV*,
Serine-protease

Microscopiquement, il est caractérisé par un conidiophore court (300 μm), lisse et incolore avec un évasement progressif au sommet, une vésicule sub-hémisphérique de 20 à 30 μm , des phialides directement portées par la vésicule, dressées, densément groupées, des conidies ou spores globuleuses, vertes, échinulées de 2.5 à 3 μm de diamètre et enfin une tête aspergillaire unisériée, dressée en colonne compacte (Fig. 1).

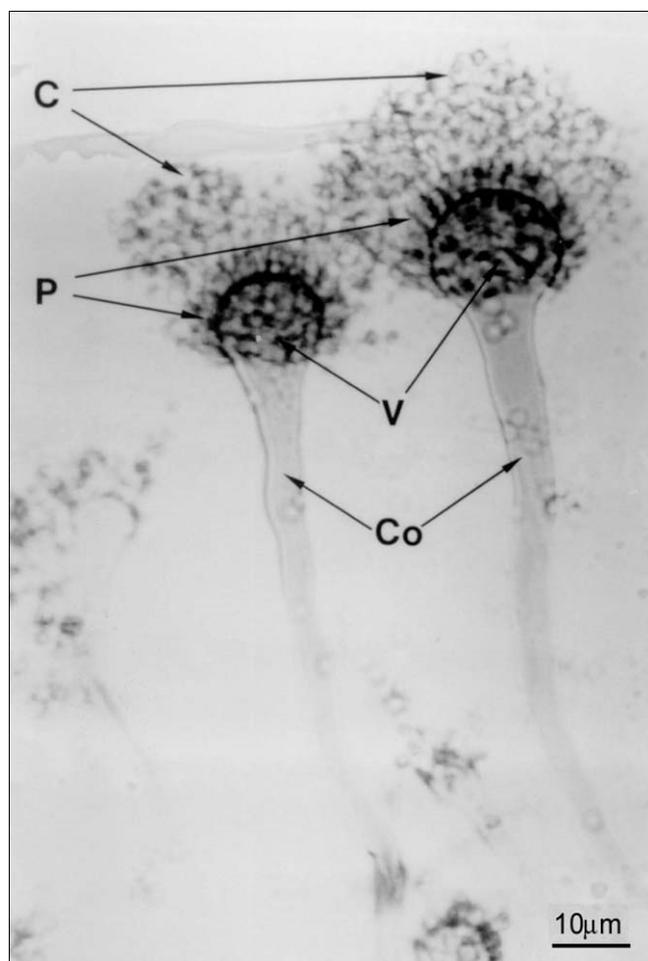


Figure 1: Observation en microscopie photonique de la tête conidienne d'*Aspergillus fumigatus*.

C: conidies; P: phialides; V: vésicule; Co: conidiophore.

2 – Obtention d'une suspension de spores

Des cultures sur boîtes de petri (10 boîtes) de la souche CBS 113.26, âgées 05 jours maintenues à 37°C, sont raclées dans de l'eau distillée stérile. La suspension obtenue, est filtrée sur la toile bluter dont les pores font 25 μm de diamètre (membrane de nylon Monyl Scrynel NY 25 HC; Züricher Beuteltuchfabrik A.G., ZBF), pour éliminer les têtes aspergillaires, les filaments mycéliens et les éventuels débris de gélose. Après une centrifugation à 1500 g pendant 5 minutes, les spores sont remises en suspension dans un petit volume d'eau distillée stérile et dénombrée à la cellule de Malassez (4. 10⁹ spores/ml).

Production de l'exoprotéase

La suspension de spores est inoculée en milieu liquide

[2] contenant du glucose (10g/l), de la peptone (1g/l), du phosphate dipotassique (1g/l), du sulfate ferreux 7H₂O (0.01 g/l), du sulfate de magnésium (0.5 g/l), du chlorure de potassium (0.5 g/l), et du chloramphénicol (10 g/l). Au bout de 5 jours d'incubation à 37°C, le surnageant de culture est filtré successivement sur papier filtre, puis sur filtres Whatman en nitrate de cellulose de 47 millimètres de diamètre et de porosité décroissante (05 μm , puis 01 μm , et 0.2 μm) Le filtrat est ensuite concentré par dialyse pendant 24h à 48 heures à + 4°C contre du polyéthylène glycol 35 000(PEG ; Fluka) dans des sacs de collodion ayant un seuil d'exclusion de 8 à 10 kDa (Union Carbide). Le concentré est ensuite dialysé contre du tampon Tris-HCl 50 mM pH 7.5 additionné de NaCl 0.15 M (Tris buffered saline, TBS).

Purification de l'exoprotéase

La purification de l'exoprotéase est réalisé selon une technique chromatographique décrite par Larcher et Coll. [16]. Ce protocole comporte deux temps, d'abord une chromatographie d'exclusion moléculaire suivie d'une chromatographie d'affinité. Ces deux étapes sont réalisées à température ambiante.

- Chromatographie d'exclusion moléculaire sur Séphadex G-75

Le produit de dialyse est précipité par addition de sulfate d'ammonium à 80% de saturation finale. La suspension obtenue est centrifugée, et le culot de centrifugation est repris par un minimum d'eau distillée. Cette solution est dialysée pendant 24 heures contre de l'eau distillée, puis lyophilisée. Le lyophilisat est ensuite repris par un volume minimum de TBS, puis filtré sur une membrane de porosité 0.45 μm .

La filtrat est déposé sur une colonne (100 cm x 2.5 cm) de Séphadex G-75 (Pharmacia – LBK), préalablement équilibrée dans le même tampon. L'élution est réalisée sous un débit de 6 ml/h et les fractions sont collectées à raison d'1 ml par tube (Collecteur Pharmacia, Frac-300). Les pics protéiques sont mesurés à 280 nm grâce à un détecteur U.V. (Single-path U.V.-1monitor Pharmacia-LKB). L'élution achevée, une mesure de l'activité chymotrypsique est effectuée sur chaque tube afin de récupérer la protéase. Les tubes présentant une activité enzymatique sont rassemblés et l'ensemble est dialysé contre de l'eau distillée, puis lyophilisé

La colonne est préalablement calibrée grâce à la migration de marqueurs de masse moléculaires solubilisés, à raison de 1 mg/ml de TBS pour chacun d'eux; bleu dextran (2x10³ kDa; Pharmacia-LKB); aldolase (158 kDa; Pharmacia-LKB); Sérum albumine bovine (BSA) (67 kDa; IBF); chymotrypsine A (25 kDa; Sigma Chemicals Co.) et phénylalanine (158 Da; Sigma). Le volume mort est déterminé à partir du premier pic obtenu qui correspond au bleu dextran, et le volume total de la colonne est déterminé à partir du dernier pic correspondant à la phénylalanine. Par ailleurs, tous les tampons utilisés sont préalablement dégazés.

- Chromatographie d'affinité sur phénylalanine-agarose

Dans notre expérience, le gel utilisé est constitué de billes d'agarose couplées par l'intermédiaire d'un bras de

triéthylènetétramine à de la phénylalanine qui est l'un des acides aminés reconnus spécifiquement par les protéases de type chymotrypsine/subtilisine.

Après lyophilisation, l'échantillon issu de la chromatographie d'exclusion moléculaire est repris par un volume minimum de TBS, puis déposé sur une colonne (10 cm x 1.14 cm) contenant 10 ml de gel d'affinité (Na - CBZ)-D phénylalanine-agarose (Pierce). La colonne ayant été préalablement équilibrée TBS, l'adsorption de l'enzyme est réalisée dans le même tampon sous un débit de 20 ml/h. Le gel est ensuite rincé par trois fois son volume de tampon, puis l'enzyme est éluée par l'acide acétique 0.1 M pH 5. L'éluat est collecté par fractions de 0.1 ml dans des tubes contenant 200 µl de tampon tris-HCl 500 mM pH 10. La purification est suivie par mesure de l'absorbance des fractions à 280 nm et détermination de l'activité chymotrypsique sur chacun des tubes. Ceci permet de repérer les fractions enzymatiques qui sont ensuite rassemblées. La conservation est réalisée sous forme d'aliquotes à -20°C.

Détermination de l'activité chymotrypsique

L'activité enzymatique est déterminée par l'hydrolyse d'un substrat synthétique : le N-Succinyl-Alanyl-Alanyl-prolyl-Phénylalaninyl-paranitroanilide (N-Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA ; Sigma), substrat spécifique des sérines protéases de type chymotrypsine/subtilisine. Il est solubilisé dans du DMSO (Diméthylsulfoxyde) à raison de 10 mg/ml, soit une concentration finale de 5.3 mM. Des microplaques de 96 puits à fond plat (Stérilin M 29A) sont utilisés pour cette réaction. Dix microlitres de la solution de substrat sont ajoutés à l'extrait enzymatique, ou à des dilutions de 1/2 en 1/2 de cet extrait en tampon Tris-HCl 50 mM pH 7.5, sous un volume final de 200 µl par puit. Après une incubation d'1 h à 37°C, l'intensité de la coloration est mesurée au spectrophotomètre Titertek Multiskan (LabSystems) à 405 nm. L'unité d'activité enzymatique (U) est définie comme la quantité d'enzyme libérant 0.1 nmol de paranitroaniline par minute à 37°C.

Obtention des anticorps anti-laminine

Pour l'obtention des anticorps, deux lapins ont été hyper-immunisés par des injections répétées d'un volume égal de protéines (500 µl d'une solution en PBS à 200 µg/ml pour la laminine) et d'adjuvant complet de Freund (Sigma). Chaque lapin a reçu cinq injections (les deux premières en sous-cutané à j0 et j10, les suivantes en sous-scapulaire à j20, j30, j40), ce qui représente une dose totale de 500 µg de laminine par lapin. Dix jours après la dernière injection, une ponction intra-cardiaque est effectuée sur ces lapins.

Les anticorps anti-laminine sont purifiés par chromatographie d'affinité sur colonne de laminine-Sépharose en tampon HCl-glycine 0.2 M pH 2.5. L'éluat est récupéré à la sortie de la colonne en tampon Tris-HCl 100 mM pH 8. Les anticorps sont repérés par mesure de l'absorbance à 208 nm. Les anticorps anti-collagènes de type IV sont obtenus dans le commerce (Collaborative Biomedical Products).

Préparation du matrigel

Le matrigel a été obtenu à partir de la tumeur murine EHS. C'est une tumeur du tissu conjonctif sous-cutané qui produit des quantités importantes de composants de membrane basale (21). La tumeur est broyée à + 4° C à l'aide d'un couteau électrique dans un volume 10 fois plus important, de tampon Tris-HCl 50 mM pH 7.4, additionné de chlorure de sodium 3.4 M et d'inhibiteurs de protéases : Acide éthylène diamine tétraacétique (EDTA) 4 mM et N-éthylmaléimide (NEM) 2 mM. La suspension obtenue est centrifugée à 20 000 g pendant 30 minutes à + 4°C. Le surnageant est rejeté, puis le culot est à nouveau broyé dans le même tampon et centrifugé à +4°C pendant 30 minutes à 20 000 g. Cette opération est répétée plusieurs fois jusqu'à l'obtention d'un surnageant limpide.

Le culot est repris dans du tampon Tris-HCl 50 mM pH 7.4 additionné d'urée 2M, d'EDTA 4 mM et de NEM 2 mM, et incubé pendant une nuit à + 4°C sous agitation constante. Le lendemain, la suspension est centrifugée à 20 000 g pendant 30 minutes à +4°C, et le surnageant est récupéré. La même opération est effectuée sur ce dernier culot, et le surnageant de la nouvelle centrifugation. Les deux surnageants obtenus sont rassemblés, puis dialysés contre du TBS (tampon tris salin) pendant 48 h à + 4°C. Une dernière centrifugation est effectuée à 20 000 g pendant 20 minutes à + 4°C de façon à éliminer le matériel insoluble. Un dosage protéique est réalisé sur ce surnageant et conservé à -20°C sous forme d'aliquotes.

Etude de la dégradation des composants de la membrane basale au sein du matrigel par la protéase purifiée

Le matrigel en solution à 10 mg/ml est incubé pendant des temps variables allant de 5 minutes à 24 heures avec la protéase purifiée en solution à 10 µg/ml, soit un rapport pondéral enzyme-substrat de 1/100. Parallèlement, des témoins sont effectués par incubation du matrigel pendant 24 heures en l'absence de protéase, ou en présence de protéase inactivée par chauffage au bain-marie bouillant.

Les échantillons sont analysés par électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de Dodécyl sulfate de sodium (SDS-PAGE), selon le protocole de Laemmli [10] en conditions réductrices sur gel résolutif à 6.5% de polyacrylamide. La dégradation des composants du matrigel est recherchée après coloration du gel à l'argent. Les masses moléculaires apparentes des différentes bandes sont extrapolées à partir de la migration des marqueurs de masse moléculaires élevés (Pharmacia-LBK); myosine, 212 kDa ; α_2 - macroglobuline, 170 kDa ; β -galactosidase, 116 kDa ; transférine, 76 kDa ; glutamic deshydrogenase, 53 kDa.

Parallèlement, une immuno-détection de la laminine, ou de ses produits de clivage, est réalisée après Western-blotting selon le protocole de Towbin et Coll. (24).

Les anticorps anti-laminine sont obtenus après hyper-immunisation de lapins et les anticorps anti-collagène type IV sont obtenus dans le commerce.

Etude *ex vivo* de la dégradation de la membrane basale par la protéase purifiée

Cette étude est réalisée sur des coupes à congélation de 7 μm d'épaisseur de foie et de rein de rat. La dégradation des protéines est révélée par immunofluorescence indirecte. Les coupes d'organes sont incubés à 37°C pendant des temps variables allant de 30 minutes à 3 heures avec des solutions de protéases purifiées allant de 0.2 $\mu\text{g/ml}$ à 1 $\mu\text{g/ml}$ en PBS. Les coupes sont ensuite lavées deux fois en PBS puis incubées pendant 30 minutes à 37°C avec les anticorps dilués au 1/100^{ème}. Les coupes sont à nouveau lavées deux fois puis incubées avec des anticorps anti-IgG de lapin couplés à l'isothiocyanate de fluorescéine diluée au 1/1000^{ème} en tampon phosphate salin (PBS) additionné de 0.01% de bleu d'Evans. Après deux lavages en PBS, les coupes sont montées en glycérine tamponnée.

RESULTATS

Une étude précédente nous a permis de produire et de purifier la sérine protéase d'*Aspergillus fumigatus* à partir d'un filtrat de culture brut [1]. Nous avons montré par une analyse électrophorétique que ce champignon produisait dès la 24^{ème} heure de culture à 37°C en milieu liquide additionnée de laminine iodée, une sérine-protéase. Cette enzyme a été capable de dégrader la laminine dès la 72^{ème} heure d'incubation [1]. Au vue de nos précédents résultats, nous nous sommes intéressés à l'action de cette enzyme *in vitro* et *ex vivo* sur la laminine et le collagène type IV, constituants des membranes basales, au sein du matrigel et sur des coupes d'organes.

L'analyse électrophorétique des produits d'incubation du matrigel en présence de la protéase purifiée révèle, après coloration au bleu de Coomassie, une dégradation progressive des composants du matrigel. La digestion est rapide puisque dès 5 minutes d'incubation, une diminution importante de l'intensité des bandes protéiques correspondant vraisemblablement aux chaînes B1 et B2 de la laminine est observée. Parallèlement, on assiste à l'apparition de produits de clivage de 100, 80, 60, et 45 Kda dont l'intensité atteint un maximum après 2 heures d'incubation, puis diminue témoignant d'une protéolyse séquentielle. Par contre, aucune dégradation n'est observée lorsque le matrigel est incubé en l'absence de protéase ou en présence de la protéase préalablement inactivée par chauffage au bain-marie bouillant. La coloration à l'argent confirme ce résultat (Fig.2). Toutefois, certains composants mineurs du matrigel, détectés seulement après coloration à l'argent, semblent beaucoup plus résistants à la protéolyse. Ainsi, un composant de masse moléculaire très homogène et légèrement inférieure à 400 Kda, n'est détecté qu'à la suite de la digestion de la chaîne A, et persiste sur l'électrophorèse même après une incubation de 24 heures (Fig. 2, piste 8). De même, un composant de masse moléculaire d'environ 200 Kda n'est que très peu affecté par la protéase aspergillaire.

L'analyse en immuno-blotting permet de visualiser spécifiquement au sein de ce mélange protéique la dégradation de la laminine. La chaîne A de la laminine qui est beaucoup mieux révélée sur les témoins que les chaînes B1 et B2, apparaît très sensible à la protéolyse puisqu'elle n'est plus détectable dès 30 minutes d'incubation, alors que les chaînes

B1 et B2 persistent jusqu'à deux heures d'incubation (Fig. 3, pistes 3 et 5).

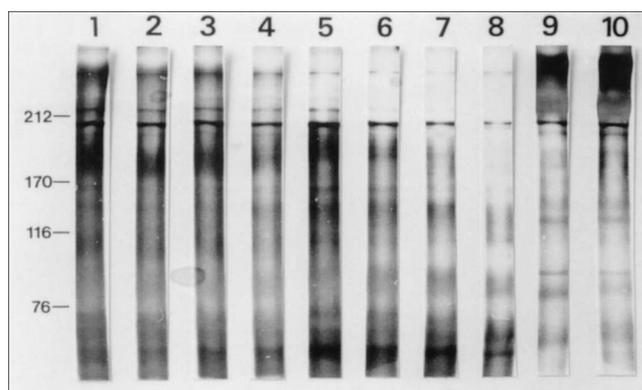


Figure 2: Etude par SDS-PAGE de la cinétique de dégradation du Matrigel par la protéase purifiée.

Des aliquotes de la protéase purifiée sont incubés en présence du Matrigel (50 μg de protéines par piste). La digestion des composants matriciels est révélée par SDS-PAGE et coloration à l'argent. Les pistes 1 à 8 correspondent aux différents temps d'incubation : 5min, 15min, 30min, 1h, 2h, 3h, 6h, et 24h, respectivement. Les pistes 9 et 10 correspondent aux témoins effectués par incubation du Matrigel en l'absence de protéase ou en présence de protéase inactivée par la chaleur. Les marqueurs de masse moléculaire, en kDa, sont indiqués sur la gauche (myosine, 212 kDa ; α_2 -macroglobuline, 170 kDa ; β -galactosidase, 116 kDa ; transférine, 76 kDa ; glutamic deshydrigenase, 53 kDa).

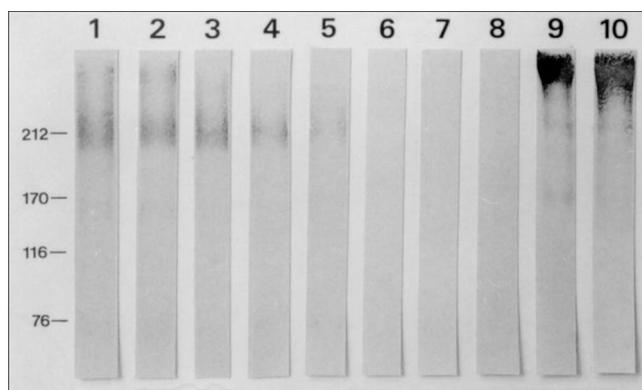


Figure 3: Etude par immunoblotting de la cinétique de dégradation de la laminine par la protéase purifiée.

Des aliquotes de la protéase purifiée sont incubés en présence du Matrigel (50 μg de protéines par piste). Le clivage de la laminine est révélé spécifiquement par immunoblotting. Les pistes 1 à 8 correspondent aux différents temps d'incubation : 5min, 15min, 30min, 1h, 2h, 3h, 6h, et 24h, respectivement. Les pistes 9 et 10 correspondent aux témoins effectués par incubation du Matrigel en l'absence de protéase ou en présence de protéase inactivée par la chaleur. Les marqueurs de masse moléculaire, en kDa, sont indiqués sur la gauche (myosine, 212 kDa ; α_2 -macroglobuline, 170 kDa ; β -galactosidase, 116 kDa ; transférine, 76 kDa ; glutamic deshydrigenase, 53 kDa).

Nous avons également recherché par immunofluorescence, la dégradation de la laminine et du collagène type IV sur des coupes à congélation de foie et de rein de rat. Sur les coupes témoins, la laminine est révélée

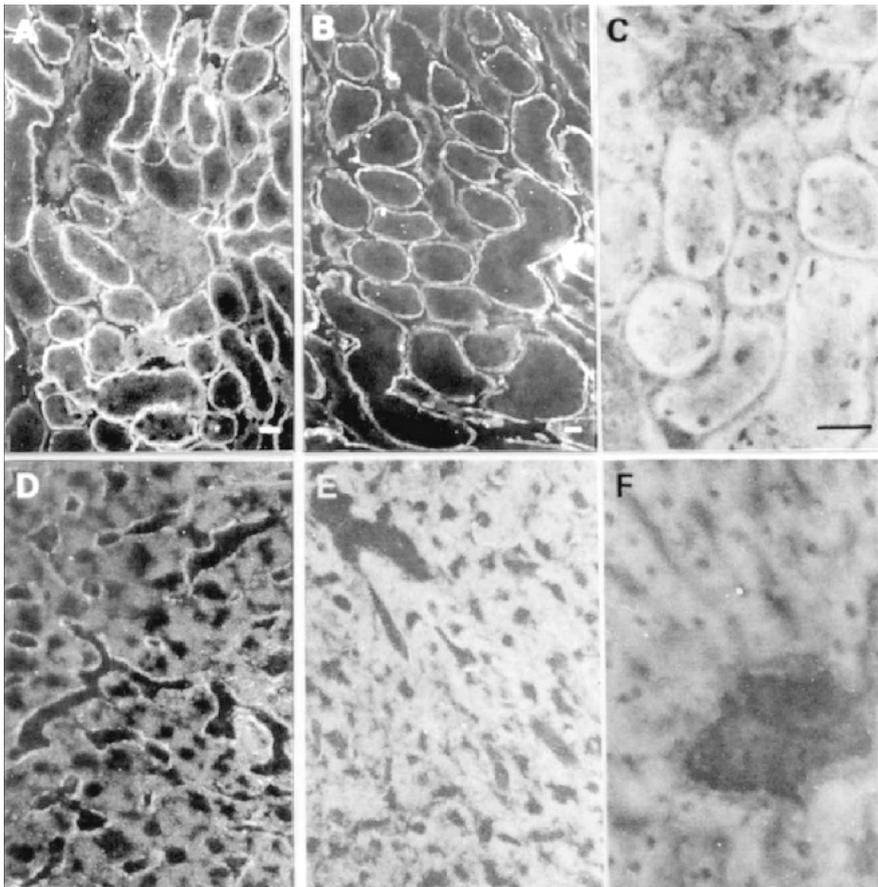


Figure 4: Etude en immunofluorescence de la dégradation par la protéase purifiée de la laminine sur coupes de rein (A à C) et du collagène type IV sur coupes de Foie (D à F).

Les coupes sont préalablement incubés en présence de tampon (A et D) ou de protéase (B,C,E,F), pendant 1h (B et E) ou 3h (A,C,D,F), puis la laminine (A à C) et le collagène IV (D à F) sont détectés à l'aide d'anticorps spécifiques. L'incubation en présence de la protéase se traduit par une diminution de l'intensité de fluorescence au bout d'1h, et sa disparition totale au bout de 3h. Les barres indiquent 10 μ m.

sous forme d'un liseré régulier le long des membranes basales des glomérules et des tubules rénaux ou des vaisseaux sanguins hépatiques (Fig. 4 A). La pré-incubation des coupes pendant 3 heures en présence du tampon de l'enzyme n'affecte pas le profil de la fluorescence. Par contre, un amincissement et une fragmentation des membranes basales, est observée sur les coupes d'organes et une diminution de son intensité. Ceci est particulièrement net sur les coupes de rein pour lesquelles les tubules rénaux sont moins intimement agencés (Fig. 4 B). La dégradation de la laminine est complète au bout de 3 heures d'incubation en présence de la protéase. Le tissu est alors entièrement détruit et aucune fluorescence n'est observée (Fig. 4 C).

L'action de la protéase s'exerce aussi *in situ* sur le collagène type IV dont la destruction est identique à celle de la laminine (Fig. 4 D). Sa sensibilité à la protéase est comparable à celle de la laminine puisqu'une fluorescence très diffuse est observée après traitement des coupes pendant 1 heure (Fig. 4 E), et une disparition totale de la fluorescence au bout de 3 heures (Fig. 4 F).

DISCUSSION

Le rôle des membranes basales est très important, elles permettent notamment, le maintien de l'architecture et constituent un support physique pour les tissus [15]. Les principales protéines les constituant, sont la laminine qui permet notamment, l'induction et la croissance cellulaire, stimule la migration et la différenciation cellulaire et le collagène, protéine la plus abondante dans l'organisme des mammifères, est le collagène type IV dans les membranes basales, sert notamment à maintenir assemblée les cellules en unités discrètes [17].

La déorganisation structurale de la membrane basale, notamment lors de la dégradation de certaines protéines constitutives, par les protéases d'*Aspergillus fumigatus* constituerait un facteur non négligeable de virulence [16,18, 15,17,22,23,20,19,14]. Notre étude a mis en évidence la dégradation rapide par la sérine-protéase d'*Aspergillus fumigatus*, les chaînes lourdes de la laminine et du collagène type IV. En effet, dès les 05 premières minutes d'incubation avec la protéase purifiée, ces deux protéines subissent une importante dégradation visualisée par l'apparition de produits de clivages (Fig. 2 et Fig. 3). Nos résultats corroborent ceux obtenus par

Bozner et Coll. [3], qui ont constatés une plus grande sensibilité des chaînes $\alpha 1$ du collagène type IV sous l'action d'une systéine-protéase de *Trichomonas tenax*, ainsi que d'autres auteurs qui ont mis en évidence la dégradation *in vitro* du collagène par des enzymes secrétées par *Aspergillus fumigatus*. [20, 19].

Notre étude *ex vivo*, de la dégradation de ces deux protéines au sein des membranes basales sous-endothéliales ou sous-épithéliales sur des coupes de tissus sains, révèle une dé-organisation importante de ces membranes, qui se traduit par une perte de la cohésion tissulaire au bout d'1 heure d'incubation en présence de l'enzyme purifiée et sa destruction totale au bout de 3 heures.

CONCLUSION

De notre étude, il semble que la sérine protéase d'*Aspergillus fumigatus* est un facteur non négligeable de virulence puisqu'elle est capable de dégrader les principaux composants de membranes basales chez l'hôte. La sécrétion de cette enzyme a été mis en évidence dans les poumons de patients infectés par

d'*Aspergillus fumigatus* et localisée au niveau de la paroi fongique [20], il serait donc intéressant d'étudier la dégradation *in vivo* de ces composants de membranes basale par la sérine protéase.

REFERENCES

- [1]- Aissi M., Bouchara J.P., Tronchin G., Larcher G., Vigny J. et Chabasse D., "Etude *in vitro* d'une exoprotéase d'*Aspergillus fumigatus* dégradant les protéines constitutives de membranes basales", *Sciences et Technologie, (revue Univ. Constantine, Algérie)*, **18**, (2002), pp.85-90.
- [2]- Bouchara J.P., Larcher G., Joubaud F., Penn P., Tronchin G. and Chabasse D., "Extracellular fibrinolytic 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.
- [3]- 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.
- [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.455-458.
- [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.L., Zimmerman P., Ceselliski 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]- Laemmli U.K., "Cleavage of structural proteins during the assembly of head of bacteriophage T4", *Nature (London)*, **227**, (1970), pp.680-685.
- [11]- Larcher G., Bouchara J.P., Annaix V., Symoens F., Chabasse D. and Tronchin G., "Purification and characterization of a fibrinolytic serine proteinase from *Aspergillus fumigatus* culture filtrate", *FEBS Lett.*, (1992), **308**, pp.65-69.
- [12]- Latgé J.P., "Aspergillus and aspergillosis", *Clinical Microbiology Reviews*, **vol.12, n°2**, (1999), pp.310-350.
- [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.95 S.
- [14]- Markaryan A., Morozova I., Yu H., and Kolattukudy P.E., "Purification and characterization of an elastolytic metalloprotease from *Aspergillus fumigatus* and immunoelectron microscopic evidence of secretion of this enzyme by the fungus invading the murine lung", *Infect. Immun.*, **vol. 62, n°6**, (1994), pp.2149-2157.
- [15]- Martin G.R. and Timpl R., "Laminin and other basement membrane components", *Annu. Rev. Cell. Biol.*, **3**, (1987), pp.57-85.
- [16]- McKerrow J.H., Keene W.E., Joeng K.H. and Werb Z., "Degradation of extracellular matrix by larvae of *Schistosoma mansoni*. I. degradation *cercariae* as a model for initial parasite invasion of host", *Lab. Invest.*, **49**, (1983), pp.195-200.
- [17]- Mercier P. and O.G. Ekindjia N., "Le collagen IV : principal constituant des membranes basales. Connaissances actuelles", *Ann. Biol. Clin.*, **48**, (1990), pp.695-711.
- [18]- 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.
- [19]- Monod M., Paris S., Sanglard D., Jatton-Ogay K., Bille J. and Latgé J.P., "Isolation and characterization of a secreted metalloprotease of *Aspergillus fumigatus*", *Infect. Immun.*, **vol. 61, n°10**, (1993), pp.4099-4104.
- [20]- Moutouakil M., Monod M., Prevost M.C., Bouchara J.P., Paris S., and Latgé J.P., "Identification of the 33-kDa alkaline protease of *Aspergillus fumigatus in vitro* and *in vivo*", *The journal of Medical Microbiology*, **vol.39**, Issue 5, (1993), pp.393-399.
- [21]- Orkin R.W., Gehron P., McGoodwin E.B., Martin G.R., Valentine T. and Swarm R., "A murine tumor producing a matrix of basement membrane", *J. Exp. Med.*, **145**, (1977), pp.204 - 220.
- [22]- Ruoslahti E., "Structure and biology of proteoglycans", *Annu. Rev. Cell. Biol.*, **4**, (1988), pp.229-257.
- [23]- Timpl R.H. Wiedeman, van Delden V., Furthmayer H. and Kuhn K., "A network model for the organisation of type IV collagen molecules in basement membrane", *Eur. J. Biochem.*, **120**, (1981), pp.20-32.
- [24]- Towbin H., Staehlin T. and Gordon J., "Electrophoretic transfert of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets : procedure and some applications", *Proc. Natl. acad. Sci. USA.*, **76**, (1979), pp.4350-4354.
- [25]- Zhu W.S., Wojdyla K., Donlon K., Thomas P.A. and Eberle H.I., "Extracellular proteases of *Aspergillus flavus* : fungal feratitits, proteases, and pathogenesis", *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, **13**, (1990), pp.491-497. □