

Université du Québec
INRS-Institut-Armand-Frappier
Centre de Recherche en Santé Humaine

**MESURE DE L'ACTIVITÉ PROTÉOLYTIQUE AU NIVEAU PULMONAIRE
LORS DE L'INFECTION PAR LE VIRUS DU SYNDROME
REPRODUCTEUR ET RESPIRATOIRE PORCIN**

Par
Manon Girard

Mémoire (par article) présenté
pour l'obtention
du grade de Maître ès Sciences (M.Sc.)
en Immunologie et Virologie

Jury d'évaluation

Président du jury
et examinateur interne

Claude Daniel, Santé Humaine

Examineur externe

Jean Gosselin
Centre de recherche du CHUL
Université Laval

Directeur de recherche

Yves St-Pierre, Santé Humaine

Codirecteur de recherche

Serge Dea, Microbiologie et
Biotechnologie

À ma mère
Marcelle Harvey
(1950-2000)

Avant-propos

Afin d'éclaircir la compréhension de toute la problématique entourant la variation de la sécrétion de protéases extracellulaires lors d'une inflammation, la revue de littérature, en plus d'une section sur le VSRRP, comprends également une section sur la matrice extracellulaire. Cette dernière section décrit les principales composantes de la matrice, les principales protéases extracellulaires et des exemples démontrant l'impact de l'augmentation de la sécrétion des protéases dans un contexte pathologique.

Table des matières

Page titre	i
Dédicace.....	ii
Avant-propos.....	iii
Table des matières.....	iv
Liste des abréviations.....	vii
Liste des schémas, figures et tableaux	xi
Sommaire	xiii
INTRODUCTION GÉNÉRALE	1
REVUE DE LITTÉRATURE.....	4
1. Caractéristiques biochimiques et biologiques du VSRRP.....	5
1.1 Historique.....	5
1.2 Classification.....	6
1.3 Structure virale	9
1.4 Caractéristiques physico-chimiques.....	10
1.5 Organisation génomique	10
1.6 Cycle de réplication virale	15
1.7 Tropisme	15
1.8 Mode d'infection	16
1.9 Principaux signes cliniques	16
2. La matrice extracellulaire	18
2.1 Les composantes structurales de la matrice extracellulaire	18
2.1.1 Les protéoglycans	18
2.1.2 L'élastine.....	19
2.1.3 Les fibronectines.....	22
2.1.4 L'acide hyaluronique.....	22
2.1.5 Les laminines.....	23
2.1.6 Les collagènes.....	24
2.2 Les protéases extracellulaires.....	28

2.2.1 Les protéases à sérine	28
2.2.1.1 L'élastase des leucocytes	29
2.2.1.2 La cathepsine G	30
2.2.1.4 La tryptase des mastocytes	30
2.2.1.3 La chymase des mastocytes	31
2.2.1.5 Les inhibiteurs des protéases à sérine	31
2.2.2 Les protéases à cystéine	32
2.2.2.1 La cathepsine B	32
2.2.2.2 La cathepsine H	32
2.2.2.3 La cathepsine L	32
2.2.2.4 La cathepsine K	33
2.2.2.5 La cathepsine S	34
2.2.2.6 Les inhibiteurs des protéases à cystéines	34
2.2.3 Les protéases aspartiques	35
2.2.3.1 La cathepsine D	35
2.2.3.2 La cathepsine E	36
2.2.3.3 Les inhibiteurs des protéases aspartiques	36
2.2.4 Les métalloprotéases	36
2.2.4.1 Les collagénases	38
2.2.4.1.1 MMP-1	41
2.2.4.1.2 MMP-8	41
2.2.4.1.3 MMP-13	41
2.2.4.2 Les stromélysines	42
2.2.4.2.1 MMP-3	43
2.2.4.2.2 MMP-10	43
2.2.4.3 Les gélatinases	44
2.2.4.3.1 MMP-2	44
2.2.4.3.2 MMP-9	45
2.2.4.4 Les MMPs membranaires	46
2.2.4.4.1 MMP-14	46
2.2.4.5 Les autres MMPs	47

2.2.4.5.1 MMP-7.....	47
2.2.4.5.2 MMP-12.....	48
2.2.4.5.3 MMP-11.....	48
2.2.4.5.4 MMP-20.....	49
2.2.4.6 Les inhibiteurs des MMPs.....	49
2.3 Implication des protéases dans les pathologies pulmonaires.....	51
2.3.1 L'élastase des leucocytes.....	51
2.3.2 Les MMPs.....	53
2.3.3 Des protéases dans l'infection produite par le VSRRP.....	54
ARTICLE.....	56
Accusé de réception.....	57
Attestation de la contribution des auteurs.....	58
Page Titre.....	59
Résumé.....	60
Introduction.....	61
Matériel et méthodes.....	64
Résultats.....	69
Discussion.....	85
Remerciements.....	88
Liste des références.....	89
DISCUSSION/CONCLUSION GENERALE.....	93
REMERCIEMENTS.....	102
BIBLIOGRAPHIE.....	103
ANNEXE A : Pré-expérimentation.....	135
ANNEXE B: Liste des présentations et séances d'affiche.....	146

Liste des abréviations

α_1-AT	alpha-1-antitrypsine
α_1-PI	alpha-1-proteinase inhibitor
α_2-mg	alpha-2-macroglobuline
ADN (DNA)	acide désoxyribonucléique (deoxyribonucleic acid)
ATCC	American Type Culture Collection
ARN (RNA)	acide ribonucléique (ribonucleic acid)
ARN_m (mRNA)	ARN messenger (messenger RNA)
BALs	lavages bronchoalvéolaires (bronchoalveolar lavages)
CD	antigène de surface (cluster of differentiation number)
CTD	domaine de queue carboxylique hautement conservé du VSRRP (carboxylic tail domain)
CMH (MHC)	complexe majeur d'histocompatibilité (major histocompatibility complex)
CP	protéase à cystéine virale (cysteine protease)
CPE	mesure d'effet cytopathique (cytopathic effect)
DICT₅₀ (TCID₅₀)	dose infectieuse en culture de tissus causant un effet cytopathique dans 50 % des cultures inoculées (tissus culture infective dose 50)
DMEM	Dulbecco's modified Eagle medium
DTT	dithiothréitol
EAV	virus de l'artérite infectieuse équine (Equine Arthritis Virus)
EC	numéro de classification officielle selon la liste établie par la Commission sur les Enzymes (Enzyme Commission)
ED₅₀	dose à laquelle on retrouve 50% de l'activité totale (Effective Dose 50%)
EDTA	acide éthylènediamine tétra-acétique (ethylenediamine tetra acetic acid)
EF	fluide œdémateux (edematous fluid)
EMCV	virus de l'encéphalomyocardite (encephalomyocarditis virus)
EGF	facteur de croissance épidermique (epidermal growth factor)

FASC	fluorescence activated substrate conversion
FITC	fluorocein isothiocyanate
FGF	facteur de croissance fibroblastique (fibroblast growth factor)
GAG	glycosaminoglycan
GP	glycoprotéines d'enveloppe du VSRRP
HE	hematoxylin-eosin staining
HEL	hélicase virale
HEV	virus hémagglutinant de l'encéphalite porcine (haemagglutinating encephalomyelitis virus)
IAF-K8	anticorps monoclonal contre la souche Klop du VSRRP
IAF-Klop	souche nord-américaine du VSRRP
ICAM-1	molécule d'adhésion intercellulaire (intercellular adhesion molecule-1)
Ig	immunoglobuline
IIF	immunofluorescence indirecte (indirect immunofluorescence)
IL	interleukine
IFN	interféron
kb	kilobases
kDa	kiloDalton
LDV	virus de l'élévation de la déshydrogénase lactique murine (lactate deshydrogenase virus)
LPS	lipopolysaccharide (enveloppe bactérienne)
LTB4	leucotriène B4
MB	domaine de liaison avec un ion métallique (VSRRP)
MBP	protéine basique de la myéline (myelin basic protein)
MEP	protéine excrétée majeure (major excreted protein)
MMPs	métalloprotéases de la matrice (matrix metalloproteases)
MT-MMPs	MMPs de type membranaire (membrane-type MMPs)
M_r	masse moléculaire

NC-IUBMB	comité de nomenclature de l'Union Internationale de Biochimie et de Biologie Moléculaire (nomenclature comitee of the international union of Biochemistry and Molecular Biology)
NCAM	molécule d'adhésion des cellules neurales (neural cellular adhesion molecule)
ORF	cadre de lecture ouvert (open reading frame)
PAMs	culture primaire de cellules alvéolaires porcines (porcine alveolar macrophages)
PBS	tampon phosphate (phosphate buffer saline)
PC	cellules pyknotiques (Pyknotic cells)
PCP	protéase à cystéine virale ressemblant à la papaïne (papain-like cystein proteases)
PDGF	facteur de croissance dérivé des plaquettes sanguines (platelet-derived growth factor)
PECAM	molécule d'adhésion des cellules endothéliales périphériques (peripheric endothelial cellular adhesion molecule)
PGE₂	prostaglandine E ₂
p.i.	post-infection
PMNs	leucocytes polymorphonucléaires (polymorphonuclear lymphocytes)
POL	polymérase virale
PPV	parvovirus porcine (porcine parvovirus)
REL	réticulum endoplasmique lisse (smooth endoplasmic reticulum)
RT-PCR	réaction de transcription inverse suivie d'une réaction en chaîne de la polymérase (reverse transcription polymerase chain reaction)
SDRA (ARDS)	syndrome de détresse respiratoire aiguë (acute respiratory distress syndrome)
SDS	sodium dodecyl sulfate
SDS-PAGE	électrophorèse sur gel de polyacrylamide contenant du SDS
SHFV	virus de la fièvre hémorragique du singe (simian hemorrhagic fever virus)

SIDA (AIDS)	syndrome d'immunodéficience acquise (acquired immunodeficiency syndrome)
SIV	virus d'immunodéficience simien (simian immunodeficiency virus)
SLPI	inhibiteur sécrétoire de la leucoprotéase (secretory leucoprotease inhibitor)
SP	protéase à sérine virale (serine protease)
SPF	animaux exempts de micro-organismes pathogènes spécifiques (specific pathogen-free)
TGEV	virus de la gastroentérite transmissible des porcs (transmissible gastroenteritis virus)
TGF	facteur de croissance tumoral - cytokine (tumor growth factor)
TIMPs	inhibiteurs tissulaires des MMPs (tissue inhibitors of MMPs)
TNF	facteur de nécrose tumorale – cytokine (tumor necrosis factor)
v/v	volume sur volume
VEGF	facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (vascular endothelium growth factor)
VIH (HIV)	virus d'immunodéficience humaine (human immunodeficiency virus)
VSRRP (PRRSV)	virus du syndrome reproducteur et respiratoire porcin (porcine reproductive and respiratory syndrome virus)

Liste des schémas, figures et tableaux

SCHÉMA 1: Représentation schématique du virus SRRP	8
SCHÉMA 2: Organisation génomique du VSRRP	12
SCHÉMA 3: Disposition en réseau des ARN messagers sous-génomiques du VSRRP	14
SCHÉMA 4: Les protéines composant la matrice extracellulaire	21
SCHÉMA 5: Le collagène fibreux	27
SCHÉMA 6 Les différentes MMPs humaines et leurs domaines respectifs.....	40
FIGURE 1: Proteolytic activity in the bronchoalveolar fluids of PRRSV-infected piglets.....	74
FIGURE 2: Gelatinolytic activity in BALs (i) and serum (ii) of PRRSV-infected piglets as determined by zymography analysis. (i)76, (ii)78	
FIGURE 3: Histological sections of control (A to C) and PRRSV-infected piglets (D to F).	81
FIGURE 4: PRRSV-induced severe interstitial pneumonitis.	83
FIGURE 5: Activité protéolytique des lavages bronchoalvéolaires de la pré- expérimentation	140
FIGURE 6: Activité gélatinolytique contenue dans les BALs de la pré- expérimentation	142

TABLEAU 1: RT-PCR detection of PRRSV genomic RNA in different organs	70
TABLEAU 2: Viral titers in lungs and spleen.....	71
TABLEAU 3: Histological findings in infected organs.....	84
TABLEAU 4: Inhibition de l'activité protéolytique des BALs de la pré- expérimentation	143

Sommaire

On retrouve une fluctuation de la sécrétion de protéases extracellulaires dans diverses maladies inflammatoires chroniques et auto-immunitaires telles l'arthrite rhumatoïde, le cancer, l'emphysème pulmonaire, la fibrose kystique et l'asthme. Parmi les protéases les plus souvent sécrétées dans le milieu extracellulaire, on retrouve l'élastase des leucocytes, les cathepsines, la tryptase et la chymase des mastocytes, et les métalloprotéases de la matrice (MMPs). Ces enzymes sont sécrétées par des cellules myéloïdes et lymphoïdes majoritairement, bien que les MMPs puissent être également sécrétées par des cellules stromales. Ces maladies dégénératives sont également caractérisées par une infiltration massive des tissus impliqués par des cellules du système immunitaire, possiblement favorisée par le relargage des protéases extracellulaires. L'infection causée par le virus du syndrome reproducteur et respiratoire porcin (VSRRP), virus s'attaquant principalement aux macrophages alvéolaires et ayant de forts impacts sur la production porcine québécoise et mondiale, est elle aussi caractérisée par une infiltration massive de cellules monocytaires et lymphocytaires. Plus particulièrement, cette infiltration se retrouve au niveau de l'interstice alvéolaire, des zones périvasculaires et péribronchiolaires. Cette étude visait donc à étudier la variation de l'activité protéolytique nette dans les poumons de porcs infectés par le VSRRP.

Pour ce faire, des porcelets âgés de quatre semaines ont été inoculés par voie intratrachéale avec une préparation de VSRRP ayant un titre infectieux évalué à 10^7 DICT₅₀/ml. Ensuite, les poumons de trois porcelets ont été prélevés pour chacun des jours post-infection choisis, soit les jours 3, 7, 14 et 42 post-infection (p.i.), afin d'effectuer sur ceux-ci des lavages bronchoalvéolaires (BALs). Des échantillons de poumons, ainsi que de rates, de reins, de ganglions thoraciques et mésentériques ont été prélevés pour fins de détection d'ARN viral par RT-PCR, d'isolement viral et d'analyses histologiques. Les résultats d'analyses par RT-PCR ont permis de démontrer la présence d'ARN viral dans les poumons des porcs infectés pour tous les jours post-infection, et que l'infection était systémique du jour 3 p.i. au jour 14 p.i. inclusivement. L'isolement viral a démontré que l'infection était maximale au jours 7 et 14 p.i. autant au niveau des poumons qu'au niveau de la rate, et que l'infection systémique (rate) était terminée au jour

42 p.i. L'analyse de l'activité protéolytique nette s'est faite par l'utilisation de la technique de FASC, qui permet de mesurer l'activité protéolytique nette présente au niveau de divers fluides biologiques. Les résultats obtenus ont démontré que l'activité nette contenue dans les BALs, au niveau des poumons, augmentait de façon significative aux jours 7 et 14 p.i., et que cette augmentation d'activité protéolytique était transitoire. L'analyse des BALs par zymographie (gel SDS-PAGE contenant un substrat intégré) a révélé que les gélatinases A et B (MMP-2 et MMP-9, respectivement), bien connues pour leur implication dans diverses maladies dégénératives, augmentaient également aux jours 7 et 14 p.i.. Les niveaux de MMP-2 et -9 sériques furent par contre stables, démontrant que le débalancement de l'activité protéolytique induit par le virus est spécifique aux poumons. L'analyse des lésions histologiques induites par l'infection par le VSRRP a permis de mettre au jour une corrélation entre l'apparition des lésions et l'augmentation transitoire de la sécrétion de protéases extracellulaires et de MMPs. Ces résultats indiquent que la sécrétion des protéases extracellulaires au niveau des poumons peut également être augmentée lors d'une infection virale, comme cela a été démontré dans le cas des maladies dégénératives non-virales telles la fibrose kystique, l'asthme et l'emphysème pulmonaire. Cette augmentation de l'activité protéolytique pourrait jouer un rôle prépondérant dans la pathologie, notamment en favorisant un état d'immunosuppression local et transitoire propice à l'établissement d'agents infectieux opportunistes.

INTRODUCTION GÉNÉRALE

Nombre d'études ont démontré qu'une surproduction locale de protéases extracellulaires peut jouer un rôle important dans le déroulement des maladies pulmonaires dégénératives comme l'emphysème, l'asthme aiguë, la bronchite chronique et la fibrose kystique (revue par Greenberger, 1997). La réponse immune est affectée lorsque les protéases dégradent des molécules impliquées au niveau de l'immunité cellulaire, comme par exemple l'élastase des leucocytes qui peut cliver des immunoglobulines (Ig) ainsi que des récepteurs de molécules du complément, le CR1 et le C3bi (Tosi *et al.*, 1990; Bazil, 1995). Les protéases peuvent également nuire aux fonctions respiratoires en agissant sur l'architecture même du poumon, c'est-à-dire la matrice extracellulaire qui compose le squelette respiratoire. Collectivement, lorsque stimulées adéquatement, l'ensemble des protéases extracellulaires produites par les cellules résidentes des poumons peut dégrader toutes les composantes de la matrice extracellulaire. Lors d'une infection bactérienne, ou encore virale, autant l'intégrité de la réponse cellulaire que celle de l'architecture pulmonaire sont des facteurs cruciaux au bon fonctionnement de la réponse immune nécessaire pour circonscrire l'infection. Le VSRRP est reconnu pour causer une infection respiratoire caractérisée par un changement dans l'architecture des poumons causé par suite d'une infiltration massive des septa alvéolaires par des cellules monolymphocytaires. Notre hypothèse de départ était que l'infection par le VSRRP engendre une modulation de la sécrétion des protéases extracellulaires dans les poumons des jeunes porcs, contribuant directement ou non aux changements physiques associés à cette infection.

Notre objectif principal était de vérifier s'il y a une modulation significative de la sécrétion de protéases extracellulaires lors de l'infection par le VSRRP. Après avoir confirmé l'infection par RT-PCR et par isolement viral, un substrat universel a été utilisé afin de déterminer s'il y avait une augmentation ou une diminution de l'activité protéolytique nette dans les poumons des porcs infectés. Le premier objectif secondaire consistait à déterminer le(s) type(s) de protéases extracellulaires concerné(s) par cette modulation, à l'aide de divers tests enzymatiques faisant appel à des substrats et inhibiteurs variés. Finalement, nous voulions déterminer s'il existe une corrélation entre

la hausse/baisse de protéases et l'apparition des lésions histopathologiques typiques de l'infection par l'analyse de coupes histologiques.

La première partie de cet ouvrage consiste donc en une revue de littérature détaillant les caractéristiques biochimiques et biologiques du VSRRP et de l'infection qu'il cause chez l'espèce porcine, suivi de l'exposé des différentes composantes de la matrice extracellulaire, les principales protéases extracellulaires ainsi que l'implication de ces dernières dans les pathologies pulmonaires. Un article scientifique reflétant la majeure partie des résultats obtenus lors de cette étude constitue le cœur de cet ouvrage. Finalement, nous présentons en annexe les résultats obtenus lors d'expériences préliminaires ayant pour objectif de déterminer les conditions optimales du modèle expérimental.

REVUE DE LITTÉRATURE

1. Caractéristiques biochimiques et biologiques du virus du Syndrome Reproducteur et Respiratoire Porcin (VSRRP)

1.1 Historique

Le Syndrome Reproducteur et Respiratoire Porcin (SRRP) a été décrit pour la première fois en 1987, aux États-Unis (Keffaber, 1989). Par la suite, d'autres pays comme le Canada en 1988 (Bilodeau *et al.*, 1991) et l'Allemagne en 1990 (Busse *et al.*, 1992) ont également rapporté ce syndrome au sein de leurs fermes de production porcine. Les symptômes observés étaient de deux types : respiratoires et reproducteurs. Ainsi chez les jeunes porcs âgés de huit semaines et moins, on observait des troubles respiratoires attribuables à une pneumonie de type interstitielle, une perte d'appétit associée à une perte de poids et à un retard de croissance, ainsi qu'une augmentation des taux de mortalité en bas âge. Par ailleurs, chez les truies gestantes, les principaux problèmes observés étaient une fièvre de longue durée au cours de la période du dernier tiers de la gestation, une augmentation marquée du nombre d'avortements tardifs, de momifications fœtales, de mises-bas prématurées, ainsi qu'une réduction de la taille des portées due à l'augmentation du nombre de porcelets mort-nés. Plusieurs chercheurs tentèrent en vain d'identifier l'agent étiologique principal de ce syndrome. Vers la fin de l'an 1990, un groupe de chercheurs des Pays-Bas (Wensvoort *et al.*, 1991) a identifié un virus à ARN enveloppé capable de reproduire les symptômes associés au syndrome SRRP lorsqu'inoculé à des truies gravides ainsi qu'à de jeunes porcs (Terpstra *et al.*, 1991; Pol *et al.*, 1991). Le virus alors identifié fut désigné sous le nom de « virus de Lelystad » en reconnaissance du lieu de la découverte. Par la suite, ce nom est resté lié à la souche de référence européenne du virus, tandis que pour le virus lui-même, on a préféré garder le nom du syndrome. La communauté scientifique eût tôt fait de relier ces épidémies à celles de la « maladie mystérieuse du porc » qui faisait rage aux États-Unis depuis 1987 (Keffaber, 1989). Par la suite, des chercheurs des États-Unis (Benfield *et al.*, 1992; Collins *et al.*, 1992) et du Canada (Dea *et al.*, 1992) isolèrent eux aussi, à partir des tissus d'animaux d'élevages affectés, des virus apparentés des points de vue sérologique et génomique au virus de Lelystad.

1.2 Classification

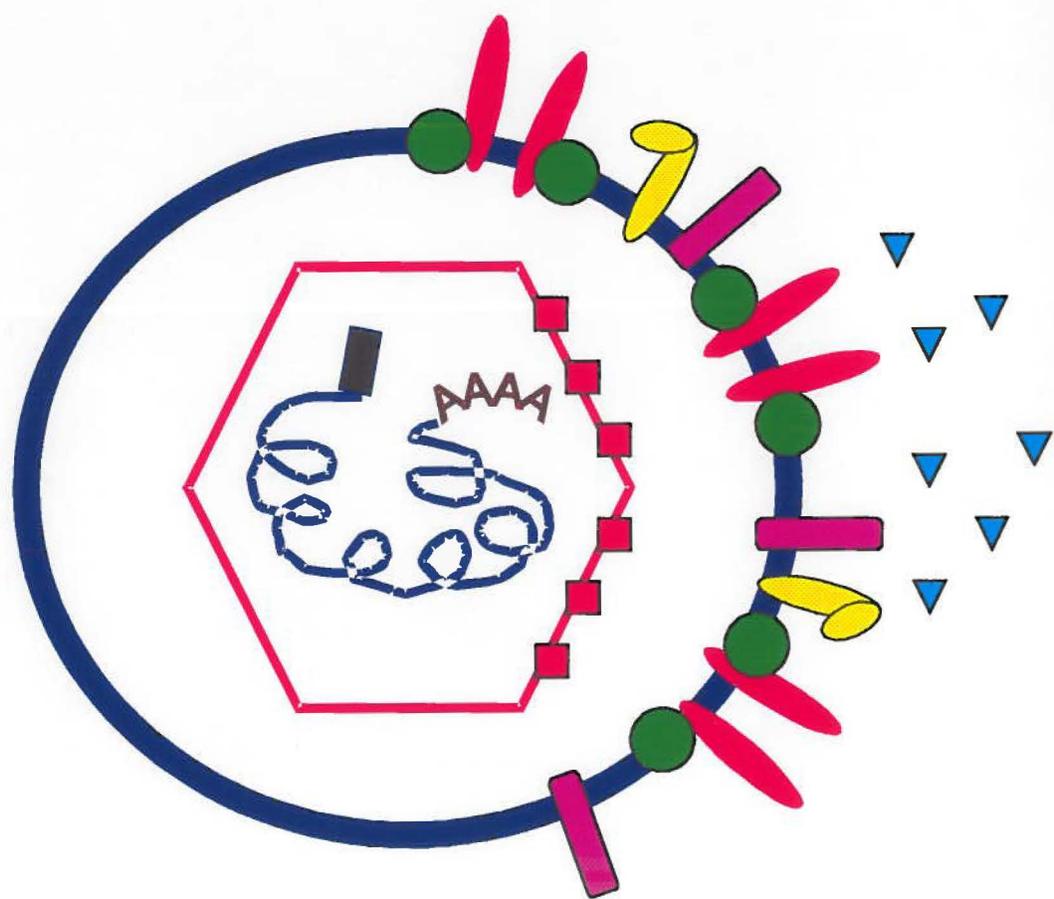
De par son organisation génomique, sa stratégie d'expression et son ultrastructure, le virus du syndrome reproducteur et respiratoire porcin (VSRRP) est très proche du virus de l'élévation de la déshydrogénase lactique (LDV) murine, du virus de l'artérite infectieuse équine (EAV), et du virus de la fièvre hémorragique du singe (SHFV). Ces quatre virus sont regroupés dans le genre *Arterivirus* (Plagemann, 1992; Conzelmann *et al.*, 1993; Meulenberg *et al.*, 1993a; Snijder & Meulenberg, 1998). Lors de son identification aux Pays-Bas (Wensvoort *et al.*, 1991) et aux États-Unis (Benfield *et al.*, 1992), le VSRRP avait été classé temporairement dans la famille *Togaviridae*, avec les autres *Arterivirus*, à cause de ses caractéristiques morphologiques : la forme icosaédrique de sa capsid de 20 à 30 nm de diamètre entourée d'une enveloppe qui ne comporte pas de spicules proéminents (voir SCHÉMA 1). Suite aux travaux sur les caractéristiques de l'ARN génomique (den Boon *et al.*, 1991) et du mode de réplication des *Arterivirus* (de Vries *et al.*, 1992), des changements majeurs ont été apportés quant à la taxonomie de ces virus. Ainsi, lors du X^e Congrès International de Virologie (Jérusalem, 1996), le Comité International sur la Taxonomie des Virus a officiellement placé le genre *Arterivirus* (et le SRRP de surcroît) dans une famille qui lui est propre, soit la famille *Arteriviridae*, sous l'ordre *Nidovirales*, où figure également la famille *Coronaviridae* qui elle comprend les genres *Coronavirus* et *Torovirus* (Cavanagh, 1997). Les caractéristiques des virus appartenant au nouvel ordre *Nidovirales*, sont les suivantes :

1. Génome linéaire, non-segmenté, fait d'ARN simple brin à polarité positive
2. Organisation du génome avec les gènes codant pour les fonctions répliquatives au niveau de l'extrémité 5' (répliquase, polymérase, hélicase) et les gènes des protéines structurales du côté de l'extrémité 3'
3. Synthèse d'un réseau d'ARN messagers (ARNm) sous-génomiques partageant leur extrémité 3'
4. ARN génomique servant d'ARNm pour la traduction de l'ARN polymérase ARN-dépendante.
5. Uniquement la partie distincte des ARNm sous-génomiques, située au niveau de l'extrémité 5', est traduite.

SCHÉMA 1 REPRÉSENTATION SCHÉMATIQUE DU VIRUS DU SRRP (VSRRP).

- N (nucléoprotéine) = ■
M (matrice) = ●
GP2 (glycoprotéine 2) = ○
GP3 (glycoprotéine 3) = ▽
GP4 (glycoprotéine 4) = ▬
GP5 (glycoprotéine 5) = ◄
ARN viral (simple brin) = ~~~~~
Analogue de coiffe = ■
Queue polyadénylée = AAAAA

Adapté de Dea *et al.*, 2000a.



1.3 Structure virale

Les particules virales peuvent être observées en microscopie électronique dans les vacuoles cytoplasmiques et les vésicules de l'appareil de Golgi des macrophages alvéolaires porcins infectés. Le VSRRP est un virus enveloppé d'une membrane formée de lipides et d'hydrates de carbone, d'environ 50 à 70 nm de diamètre (voir SCHÉMA 1). Les protéines structurales majeures retrouvées au niveau de l'enveloppe sont la protéine de la matrice M et la glycoprotéine GP5. La protéine M, codée par l'ORF6, est formée de 173-174 acides aminés et possède une masse moléculaire (M_r) de 18-19 KDa, ainsi que trois domaines transmembranaires hydrophobes. Par ses caractéristiques topographiques, la protéine M est donc peu accessible aux anticorps et est très peu antigénique (Meng *et al.*, 1995; Meulenberg *et al.*, 1995b; Mardassi *et al.*, 1995 & 1996). La GP5, codée par l'ORF5, est formée de 200-201 acides aminés, et possède une M_r de 24,5-26 KDa (Meulenberg *et al.*, 1995b; Mardassi *et al.*, 1996; Pirzadeh & Dea, 1997). On retrouve aussi, au niveau de l'enveloppe, des glycoprotéines mineures présentes en faibles quantités dans le virion, dont la GP2 (codée par l'ORF2, 29 kDa), la GP4 (codée par l'ORF4, 31 Kda) (Meulenberg *et al.*, 1993a, 1995b, 1997; Meulenberg & Pettersen-Den Besten, 1996; Mardassi *et al.*, 1995), et la GP3 (codée par l'ORF3, 42 kDa). La présence de la GP3 au niveau de l'enveloppe semble varier selon l'origine des souches. En effet, elle est plutôt considérée comme une protéine non-structurale dans le cas des souches Nord Américaines (Gonin *et al.*, 1998; Mardassi *et al.*, 1998; Gonin *et al.*, 1999).

L'enveloppe englobe une nucléocapside à symétrie icosaédrique de 20 à 35 nm de diamètre composée d'une seule protéine, la protéine N (ORF7), fortement basique et interagissant avec l'ARN génomique. La protéine N, est constituée de 123 à 128 acides aminés et a une M_r d'environ 14 Kda (Meulenberg *et al.*, 1995a; Mardassi *et al.*, 1994b; Meng *et al.*, 1995). Elle est la protéine la plus abondante du virion (20 à 40%), et est très antigénique (Meulenberg *et al.*, 1995a, 1998; Wootton *et al.*, 1998). Plusieurs anticorps monoclonaux dirigés contre cette protéine (Nelson *et al.*, 1993; Drew *et al.*, 1995; Dea *et al.*, 1996; Dea *et al.*, 2000b) ont été développés et sont utilisés entre autre pour le diagnostic de l'infection.

1.4 Caractéristiques physico-chimiques

Le virion a une densité de flottaison de 1,13 à 1,15 g/cm³ sur gradients de saccharose et de 1,18 à 1,20 g/cm³ sur gradients de chlorure de césium (CsCl) (Benfield *et al.*, 1992; Mardassi *et al.*, 1994a). Le coefficient de sédimentation se situe entre 214S et 230S (Plagemann, 1996). Le VSRRP est sensible aux solvants lipidiques comme l'éther et le chloroforme. Ce virus est sensible à des valeurs de pH inférieures à 5,0 et supérieures à 7,0, ainsi qu'à des températures supérieures à 22°C (Benfield *et al.*, 1992).

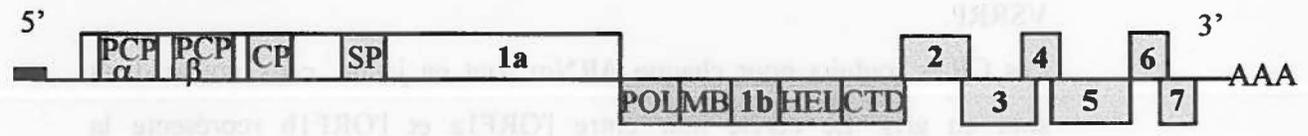
1.5 Organisation génomique

Le génome du VSRRP est composé d'une molécule d'ARN monocaténaire d'environ 15 Kb à polarité positive (Conzelmann *et al.*, 1993), possédant une coiffe méthylée à son extrémité 5' et une queue polyadénylée à son extrémité 3' (Meulenberg *et al.*, 1993b; Meng *et al.*, 1994). L'ARN viral est polycistronique et organisé en 8 cadres de lecture ouverts (ORFs), soit les ORFs1a et 1b, et les ORFs 2 à 7 (voir SCHÉMA 2) (Meulenberg *et al.*, 1993b). Les protéines non-structurales codées par les ORFs 1a et 1b forment 75% du génome. L'ORF1a code pour deux protéases à cystéine ressemblant à la papaïne (PCP α et PCP β), une protéase à cystéine (CP) et une protéase à sérine (SP). L'ORF 1b contient quatre domaines conservés chez tous les nidovirus : une ARN polymérase dépendante de l'ARN (POL), un domaine de liaison avec un ion métallique (MB), une hélicase à ARN (HEL) et un domaine de queue carboxylique hautement conservé (CDT). En fait, la polyprotéine 1ab est clivée en 12 sous-unités servant à divers degrés dans la réplication virale (revue par Snijder & Meulenberg, 1998; Allende *et al.*, 1999). Les ORFs 2 à 7 sont chevauchants, sauf les ORFs 5 et 6, et codent pour 6 protéines structurales de différente importance, soit la nucléocapside N (ORF7), la matrice M (ORF6), et les glycoprotéines d'enveloppe GP2 (ORF2), GP3 (ORF3), GP4 (ORF4) et GP5 (ORF5) (revue par Dea *et al.*, 2000a) (voir SCHÉMA 2 et 3).

SCHÉMA 2 ORGANISATION GÉNOMIQUE DU VSRRP.

ARN polycistronique à 8 ORFs, les ORFS 1a et 1b codant pour les protéines non-structurales, et les ORFs 2 à 7 pour les composantes du virion (en gris). On retrouve des protéases (en mauve) dans l'ORF 1a. PCP- α et - β = protéases à cystéine apparentées à la papaïne, CP = protéase à cystéine et SP = protéase à sérine. L'ORF 1b code pour les protéines responsables de la réplication et de la traduction (en bleu). POL = polymérase, MB = domaine de liaison avec cofacteur, HEL = hélicase et CTD = domaine terminal carboxylé. Adapté de Snijder & Meulenberg, 1998.

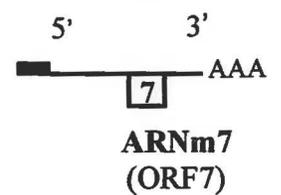
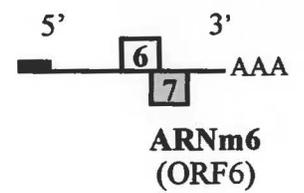
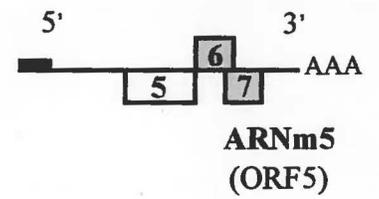
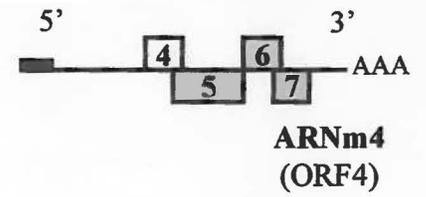
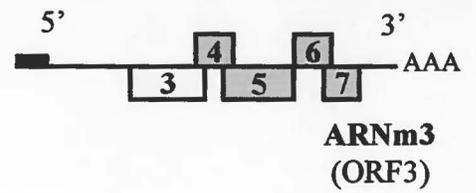
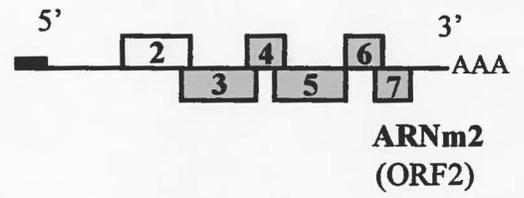
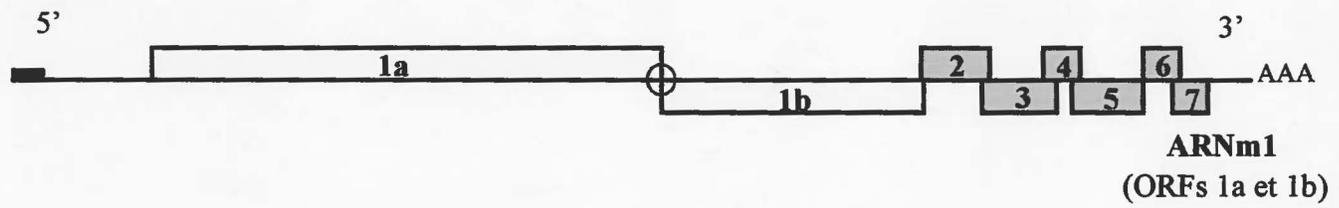
SCHEMA 3. DIRECTION EN REBAT DES AEN MESSAGES KAS-GEMOEDER 100



adunco glisane permetant à l'ORF1b repédente la
l'ORF1a. Adapté de Snijder & Meesters, 1998.

SCHÉMA 3 DISPOSITION EN RÉSEAU DES ARN MESSAGERS SOUS-GÉNOMIQUES DU VSRRP.

Les ORFs traduits pour chaque ARNm sont en jaune, ceux non-traduits sont en gris. Le cercle noir entre l'ORF1a et l'ORF1b représente la séquence glissante permettant à l'ORF1b d'être traduit à la suite de l'ORF1a. Adapté de Snijder & Meulenberg, 1998.



1.6 Cycle de réplication virale

Le cycle viral du VSRRP débute par la transcription des ORFs 1a et 1b à partir du génome lui-même. Cela permet l'expression des protéines non-structurales ayant des fonctions dans la réplication du virus, comme l'hélicase, la polymérase et les quatre protéases. L'ORF1b est transcrit grâce à une séquence dite « glissante » située en amont d'un pseudo-noeud près de la jonction entre l'ORF1a et l'ORF1b, ce qui cause un changement de cadre ribosomal (en anglais : ribosomal frameshifting). Suite à cette étape, l'ARN génomique sert de modèle ou de gabarit pour la synthèse d'un brin intermédiaire à polarité négative qui lui servira à fabriquer les six brins d'ARNm sous-génomiques servant à la production des différentes protéines structurales codées par les ORFs 2 à 7. Chacun des brins d'ARNm sous-génomique possède sa coiffe méthylée et une séquence de tête à son extrémité 5' commune non-codante de 200 nucléotides et une queue polyadénylée de longueur variable à son extrémité 3' (Meulenberg *et al.*, 1993b; Conzelmann *et al.*, 1993; Snidjer & Meulenberg, 1998) (voir SCHÉMA 3). Parce que tous les brins ont la même séquence à leur extrémité 3' et que seule leur séquence distincte au niveau de leur extrémité 5' est traduite, on dit de ces brins qu'ils sont en réseau (en anglais, on utilise les termes "nested" subgenomic mRNAs). C'est de cette caractéristique qu'origine le nom de l'ordre des *Nidovirales*, *nidus* signifiant nid en latin ("nest" est la traduction anglaise pour nid). Les différentes protéines composant le virion s'accumulent au niveau du lumen du réticulum endoplasmique lisse (REL) et des vésicules de l'appareil de Golgi. Les capsides nouvellement formées acquièrent leur enveloppe lors de leur bourgeonnement au travers de la membrane du REL ou de l'appareil de Golgi (Mardassi *et al.*, 1994a; Snijder & Meulenberg, 1998) et sortent de la cellule par exocytose (Pol *et al.*, 1991; Dea *et al.*, 1995).

1.7 Tropisme

En général, les *Arterivirus* ont un tropisme assez restreint. L'EAV infecte spécifiquement les chevaux et les ânes, le LDV les souris, le SHFV les singes Africains et Asiatiques de différents genres, et le VSRRP infecte les porcs (Snijder & Meulenberg, 1998). *In vivo*,

toutefois, il semble que tous les *Arterivirus* ont comme principale cible les macrophages et les monocytes (Pol & Wagenaar, 1992; Voicu, 1994). Bien que le VSRRP puisse être isolé à partir de spermatoocytes, spermatides et de cellules épithéliales du canal séminal (Sur *et al.*, 1997), et de pneumocytes de type II (Sur *et al.*, 1996), le LDV quant à lui ne peut être cultivé que sur des cultures primaires de macrophages. Le SHFV et le VSRRP se répliquent dans les cultures primaires de macrophages alvéolaires (PAM) ainsi que dans les lignées cellulaires permissives CL2621 et MARC-145, toutes deux dérivées de la lignée de cellules de rein de singe MA-104 (Benfield *et al.*, 1992; Kim *et al.*, 1993). L'EAV est cependant moins restrictif, pouvant se répliquer dans différentes lignées de cellules de reins provenant de diverses espèces animales ainsi que dans les cultures primaires de macrophages.

1.8 Mode d'infection

Le VSRRP, ainsi que les autres *Arterivirus*, sont transmis principalement par la voie oronasale. La transmission du VSRRP par aérosols a été observée à quelques reprises en Europe, notamment aux Pays-Bas, où la première épidémie en 1995, s'est propagée du sud-ouest vers le nord, en partant de la frontière Allemande (pays où la première épidémie Européenne fut rapportée en 1990) en suivant le sens du vent (Komijin, 1991). Cependant, la persistance du VSRRP dans la semence des mâles infectés, via l'infection des spermatides et spermatoocytes, soulève l'hypothèse d'une possible transmission sexuelle, bien qu'il y ait encore des débats sur l'impact réel de ce mode de transmission durant les épidémies de VSRRP (Sur *et al.*, 1997). De surcroît, il a également été démontré que la souche vaccinale atténuée du virus, ATCC-VR874, peut persister plus de 35 jours dans la semence des verrats (Christopher-Hennings *et al.*, 1998).

1.9 Principaux signes cliniques

Les signes cliniques du SRRP sont extrêmement variables d'un porc à l'autre, d'une ferme à l'autre, et même d'une épidémie à l'autre (White, 1992; Albina, 1997). La sévérité des symptômes semble être influencée par la souche virale ainsi que par l'âge et

l'état de santé de l'animal infecté. L'infection peut être sous-clinique ou caractérisée par une grande variété de symptômes, tant au niveau du système respiratoire que du système reproducteur. Il arrive souvent que l'infection passe inaperçue au sein d'un troupeau pendant un certain temps avant le déclenchement des signes cliniques chez la majorité des animaux de la ferme (Meldrum, 1992). Des études ont suggéré que la qualité de l'entretien de la ferme, l'état de santé des animaux, le système d'hébergement et la quantité de virus étaient tous des facteurs importants pour l'apparition des signes cliniques de la maladie (Dee, 1993). Les signes cliniques traduisant une atteinte respiratoire peuvent également être multi-factoriels, dû notamment à la présence sur les fermes de nombreux autres agents pathogènes à tropisme respiratoire.

En général, chez les porcelets âgés de moins de huit semaines, les signes cliniques les plus souvent observés sont des symptômes de type grippal, associés à une léthargie, une baisse d'appétit, une perte de poids, un retard de croissance, de la toux, une respiration sifflante et abdominale, de la fièvre de faible amplitude, et de la mortalité en bas âge. Chez les porcs plus âgés, on observe généralement peu de signes, mis à part un syndrome grippal modéré dans certains cas. Chez les truies gestantes, on observe une augmentation du taux d'avortements tardifs, de mises-bas prématurées, de momifications foetales, du nombre de porcelets mort-nés ou faibles à la naissance, ainsi qu'un allongement anormal de la durée de gestation dans certains cas et de la période de retour des chaleurs. En ce qui concerne les verrats, on observe chez ces derniers en plus des problèmes respiratoires, une baisse de la qualité du sperme (Albina, 1997).

Bien que le VSRRP soit bien caractérisé biochimiquement, au niveau moléculaire, le syndrome dont il est la cause est plutôt mal défini. L'infection par le VSRRP induit une forte infiltration de cellules immunitaires au niveau des poumons, comme c'est le cas pour d'autres maladies pulmonaires auto-immunitaires. Cette infiltration est souvent associée à des effets sur l'intégrité tissulaire des poumons, notamment un remodelage de la matrice extracellulaire. Hors, l'intégrité tissulaire pulmonaire repose sur un fragile équilibre entre les protéines de la matrice et l'action de protéases extracellulaires présentes au niveau des tissus. C'est pourquoi l'étude de la matrice extracellulaire est essentielle à la compréhension, au niveau moléculaire, de la réponse pulmonaire anti-VSRRP.

2. La matrice extracellulaire

2.1 Les composantes structurales de la matrice extracellulaire

La matrice extracellulaire est formée d'un ensemble d'éléments protéiques structuraux constituant l'architecture des différents tissus dont nous sommes constitués. La matrice extracellulaire pourrait aussi se définir comme l'ensemble des molécules qui sont immobilisées à l'extérieur des cellules. Au cours des dernières années, les connaissances au niveau des composantes de la matrice extracellulaire n'ont cessé d'augmenter, facilitant ainsi notre compréhension des divers mécanismes et phénomènes entourant l'assemblage et le remodelage de cet ensemble complexe favorisant les interactions intercellulaires. Les principales composantes structurales de la matrice extracellulaire sont les collagènes, les glycoprotéines non-collagéniques et les protéoglycans.

2.1.1 Les protéoglycans

Les protéoglycans sont des protéines que l'on peut retrouver à la surface des cellules, dans les vésicules intracellulaires ou encore incluses dans la matrice extracellulaire. Les protéines que l'on classe dans ce groupe ont en commun le même type de modification post-traductionnelle impliquant l'ajout d'unités glycosaminoglycan (GAG). Les GAGs sont des polysaccharides différents des chaînes d'oligosaccharides liés en O ou en N que l'on retrouve chez la plupart des protéines sécrétées ou retrouvées à la surface des cellules (protéines glycosylées), et qui peuvent constituer jusqu'à 95% de la masse du protéoglycan (Kjellen & Lindahl, 1991). On croit que les groupement GAGs auraient une forte influence sur les qualités biochimiques et réguleraient les fonctions des protéines qui possèdent de tels groupements (Jackson *et al.*, 1991). Les unités GAG des chaînes polysaccharides sont formées de deux monosaccharides qui alternent le long de la chaîne de longueur variable, et qui sont par la suite modifiés. On retrouve plusieurs différentes chaînes GAG, liées à une même protéine se trouvant ainsi au centre de l'entité appelée protéoglycan (voir SCHÉMA 4A). Parmi la famille des protéoglycans, on

retrouve l'héparine et l'héparan sulfate, le chondroitin sulfate (ex. aggrecan, versican), le dermatan sulfate, le kératan sulfate et l'acide hyaluronique (voir section 2.1.4). Plusieurs molécules de la matrice extracellulaire s'y lient, comme les laminines (section 2.1.5), les fibronectines (section 2.1.3) et les collagènes (section 2.1.6). Les protéoglycans peuvent également se lier à divers facteurs de croissance (FGF, PDGF, VEGF, TGF- β , IFN- γ , chimiokines) leur permettant d'influencer les réponses extracellulaires, et ils peuvent aussi se lier à des molécules d'adhésion (NCAM, PECAM-1, sélectines) régulant les interactions intercellulaires et cellule-matrice (Fransson *et al.*, 1986; Hardingham & Fosang, 1992). Par exemple, l'héparine et l'héparan sulfate se lient notamment à des protéases (élastase, cathepsine G) et des inhibiteurs de protéases de la cascade de la coagulation sanguine (antithrombine III, thrombine), régulant ainsi l'activité de ces enzymes (Jackson *et al.*, 1991). Au niveau du cartilage, le protéoglycan aggrecan se lie à l'acide hyaluronique via une protéine liante pour former un agrégat multi-moléculaire donnant ses propriétés particulières (i.e. grande résistance à la force de tension) au cartilage (Hardingham & Fosang, 1992).

2.1.2 L'élastine

On retrouve l'élastine dans les tissus où l'extensibilité et la déformation sont cruciales à leurs fonctions et à leur intégrité, comme par exemple les grosses artères, les poumons, et la peau. L'élastine tient son importance physiologique de ses propriétés élastiques uniques. L'élastine est tout d'abord sécrétée sous une forme soluble, la tropoélastine (70kDa) (révisé par Mecham, 1999). Cette molécule est constituée d'une alternance entre des domaines hydrophobiques (glycine, proline et valine) et des domaines rigides (paires de résidus lysine situées au travers de séquences très riches en alanine ou en proline) ayant la capacité de former des ponts intermoléculaires (voir SCHÉMA 4B). Ce sont les domaines hydrophobiques qui sont considérés comme importants pour la propriété élastique de cette protéine. En effet, Gosline & Rosenbloom (1984) ont proposé un modèle selon lequel les groupements libres non-polaires des acides aminés formant les chaînes polypeptidiques sont exposés aux molécules d'eau lorsque l'élastine est étirée par une force externe. Ensuite, les groupements non-polaires se

SCHEMA 4 LES PRINCIPALES COMPOSANTES DE LA MATRICE EXTRACELLULAIRE.

A) Exemple de protéoglycan formé d'une protéine à laquelle sont rattachés des unités GAG (glucosaminoglycan) de différentes longueurs et composition. Adapté de Lander, 1999.

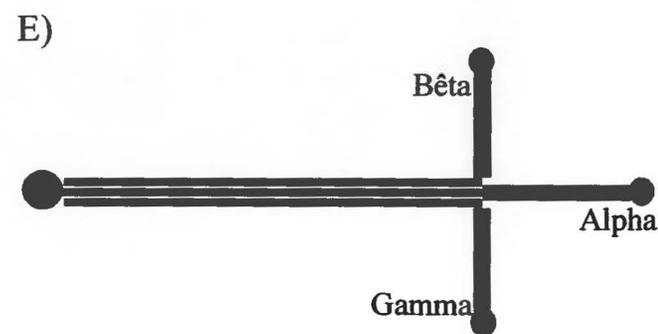
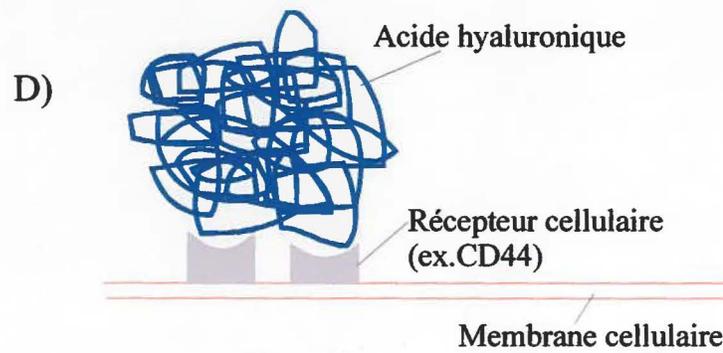
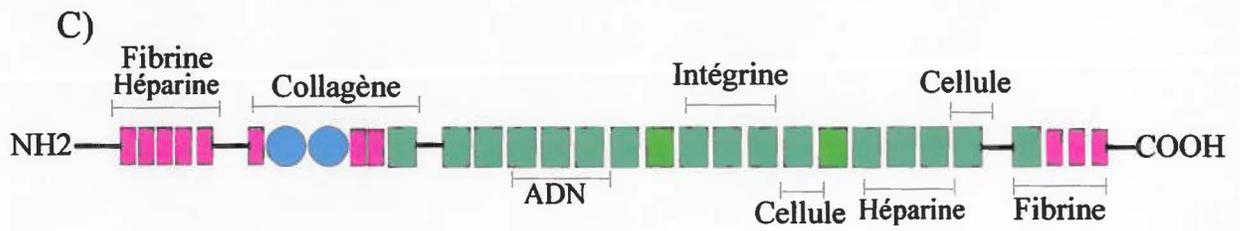
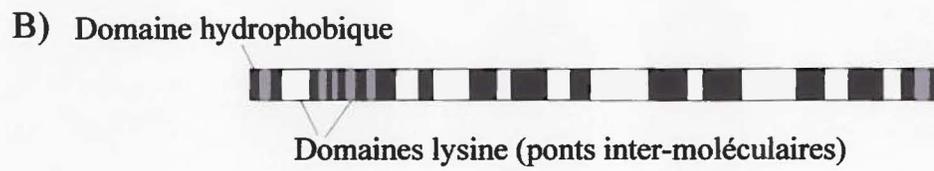
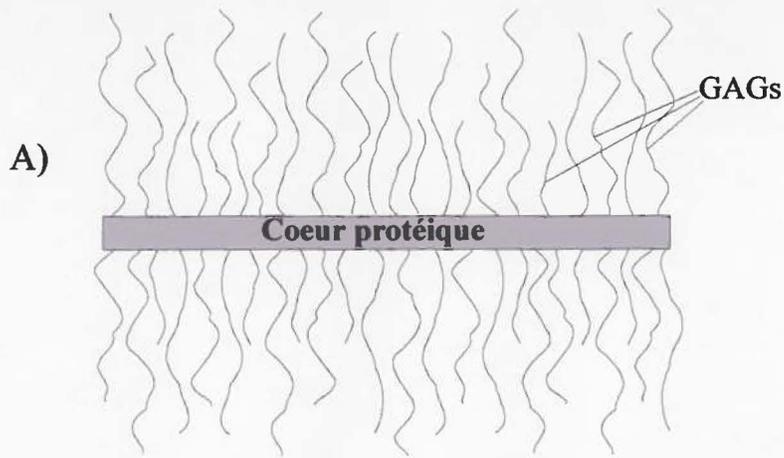
B) Schéma représentant l'agencement des différents domaines composant l'élastine. Les domaines hydrophobes sont en noir, les domaines riches en lysine et en alanine sont en blanc et les domaines riches en lysine et en proline sont en gris. Adapté de Mecham, 1990.

C) Représentation de l'agencement des différents types de modules composant les domaines structuraux et fonctionnels d'une molécule de fibronectine. Adapté de Mosher, 1989 et de Hynes, 1990.

■ type I ● type II ■ type III ■ épissage alternatif du type III

D) Représentation de l'acide hyaluronique à la surface d'une cellule. Adapté de Laurent, 1989.

E) Molécule de laminine montrant les trois types de chaînes organisées en forme de crucifix. Adapté de Martin & Timpl, 1987.



réaggrègeraient en expulsant les molécules d'eau lorsque la force externe disparaît. Dans les tissus, l'élastine peut être retrouvée sous trois formes majeures: (1) sous forme de petites fibres de différentes longueur ressemblant un peu à de la corde, comme dans le cas des ligaments, des poumons et de la peau; (2) sous forme de feuillets concentriques ou lamelles, comme dans les grosses artères (ex. aorte); et (3) sous forme d'alvéoles de ruches d'abeilles, comme dans les cartilages élastiques. Les domaines rigides, quant à eux, sont responsables des interactions de l'élastine avec les desmosines et les isodesmosines retrouvées dans les jonctions tissulaires (Eyre *et al.*, 1984).

2.1.3 Les fibronectines

Les fibronectines sont des glycoprotéines multi-adhésives de haut poids moléculaire dont les différentes formes (isoformes) résultent d'un épissage alternatif (French-Constant, 1995). Initialement, la fibronectine est sécrétée sous forme dimérique soluble, mais une fois au niveau de la matrice extracellulaire, des polymères de fibronectine de haut poids moléculaire se forment (Heinegard & Oldberg, 1989; Hynes, 1990). Chaque sous-unité de fibronectine est faite d'une série d'unités composées de trois types de modules (I,II,III) qui sont répétés, formant des domaines structuraux et fonctionnels spécialisés dans l'adhésion aux récepteurs cellulaires, la migration, la différenciation et l'organisation du cytosquelette (voir SCHÉMA 4C) (Hynes, 1990). Les fibronectines sont fortement exprimées chez l'embryon ainsi que chez l'adulte, au niveau des régions où il y a une morphogenèse active, une migration cellulaire, ou encore de l'inflammation. La principale fonction des fibronectines est de lier les cellules aux autres composantes de la matrice extracellulaire (Heinegard & Oldberg, 1989).

2.1.4 L'acide hyaluronique

L'acide hyaluronique est un polysaccharide de fort poids moléculaire fortement anionique composé de disaccharides répétés de β 1-4-glucuronate et de β 1-3-N-acetylglucosamine. Tel que discuté précédemment (section 2.1.1), l'acide hyaluronique fait parti de la famille des protéoglycans, bien que contrairement aux autres GAGs, l'acide

hyaluronique n'est pas lié de manière covalente avec les protéines et ne contient pas de sulfate (Laurent, 1992). L'acide hyaluronique est un composant fort répandu de la matrice extracellulaire et de la face externe des membranes cellulaires. Il est rattaché à ces deux structures via des protéines, les hyaladhérines (CD44, RHAMM) (Toole, 1997). L'acide hyaluronique forme ainsi un réseau étendu, rigide, torsadé et enroulé sur lui-même (Voir SCHÉMA 4D) emprisonnant une grande quantité d'eau, et lui conférant ainsi une grande viscosité (Laurent, 1992). Par exemple, une molécule d'acide hyaluronique occupe un volume environ 1000 fois supérieur à celui prédit par sa masse moléculaire (Jackson *et al.*, 1991). On retrouve de grandes quantités d'acide hyaluronique dans le liquide synovial, au niveau du cordon ombilical, de la plèvre, du derme et du tissu sous-cutané, où il maintient une certaine balance osmotique, régule l'adhésion cellulaire ou encore contribue à l'hydratation de la matrice extracellulaire (Laurent, 1992).

2.1.5 Les laminines

Les laminines constituent une famille de protéines formées d'hétérotrimères de chaînes α (300-400 KDa), β , et γ (ou $\beta 2$) (180-200 KDa) principalement co-localisées au niveau des membranes basales (Engel, 1992). La forme tridimensionnelle des laminines, telle qu'observée au microscope électronique, est celle d'une structure ayant la forme d'un trident (ψ) (voir SCHÉMA 4E), formé d'un long bras (80 nm) et de deux ou trois bras plus courts (40nm) (Beck *et al.*, 1990; Engel, 1992). Le long bras est fait d'un domaine en forme de ressort constitué de la partie carboxylée des trois chaînes, ainsi que du domaine globulaire de l'extrémité carboxylée de la chaîne α (Sasaki *et al.*, 1988). Les bras plus courts sont formés de chaînes uniques terminées par des domaines globulaires (Beck *et al.*, 1990; Engel, 1992). Les laminines peuvent interagir entre elles de manière homotypique ou hétérotypique, interagir avec d'autres ligands extracellulaires, notamment le collagène de type IV au niveau des membranes basales (Yurchenco & Schittny, 1990), et rendre possible des interactions cellulaires par l'entremise de différents récepteurs membranaires (intégrines ou autres) (Ekblom & Timpl, 1996).

2.1.6 Les collagènes

Le collagène est la structure moléculaire la plus importante en poids moléculaire et en nombre de molécules présentes dans la matrice extracellulaire. Elle constitue également la protéine la plus abondante du règne animal (Parry, 1988). Les 16 différents types de collagène répertoriés chez les mammifères sont formés à partir de quelques 30 chaînes polypeptidiques génétiquement distinctes se retrouvant dans les différents tissus d'un même animal (Vuorio & de Crombrughe, 1990; van der Rest & Bruckner, 1993). Le collagène est tout d'abord fabriqué sous forme soluble monomérique appelé tropocollagène et est constitué de 3 chaînes d'acides aminés appelées chaînes α (alpha) (voir SCHÉMA 5) qui sont chacune enroulées sur elles-mêmes dans le sens anti-horaire (lévogyre). Ces chaînes sont formées par quelques 1050 acides aminés, dont près de 1000 forment l'hélice centrale. La glycine constitue plus de 30% du total en acides aminés des chaînes, la proline et l'hydroxyproline constituent quant à elles de 15 à 30% des acides aminés. On retrouve également de la lysine et de l'hydroxylysine dans les chaînes formant la molécule de collagène. On retrouve ces acides aminés organisés selon le motif répété Gly-X-Y (X et Y représentant des acides aminés quelconques mais différents). La proline souvent retrouvée en position Y, confère la structure hélicoïdale lévogyre aux chaînes α (SCHÉMA 5A) (Engel & Prockop, 1991). C'est la répétition de la glycine (plus petit acide aminé) à tous les trois acides aminés qui permet aux trois chaînes α de s'imbriquer les unes dans les autres afin de former la triple hélice à rotation horaire (dextrogyre) qui constitue la molécule de collagène (voir SCHÉMA 5B). Les nombreux types de collagène diffèrent entre eux par la longueur du segment hélicoïdal des chaînes, ainsi que par la forme tridimensionnelle des segments qui interrompent les triples hélices, c'est-à-dire les extrémités carboxylées et aminées des polypeptides (Vuorio & de Crombrughe, 1990). Les formes les plus abondantes, dites "classiques" sont les collagènes de type I, II et III. Ceux-ci font partie des collagènes dits fibreux, c'est-à-dire qu'ils sont formés majoritairement de chaînes α constituées à 90% de la répétition Glycine-X-Y et formant des fibrilles *in vivo* (voir SCHÉMA 5C et 5D) (Jones & Miller, 1991). Les fibrilles sont formées à partir de plusieurs molécules de collagène d'un même type placées les unes adjacentes aux autres afin de former des fibres de 50 à 200 nm de

diamètre (Parry, 1988). Dans ces fibrilles, les molécules de collagène sont également décalées les unes par rapport aux autres (Parry, 1988; Jones & Miller, 1991). Les molécules de collagène individuelles sont liées les unes aux autres à l'intérieur des fibrilles par des ponts moléculaires covalents entre les lysines et hydroxylysines des extrémités carboxylées d'une molécule de collagène et les résidus similaires des extrémités aminées d'une molécule adjacente (Eyre *et al.*, 1984). Ce sont ces liens qui donnent leur force aux fibrilles de collagènes. Les fibrilles de collagène contiennent généralement plus d'un type de collagène et sont arrangés en différents motifs dans différents tissus (Lisenmayer *et al.*, 1990). Dans les tendons, on retrouve des groupes de fibrilles parallèles, des couches s'entrecroisant dans la cornée et des spirales dans les os.

Dans le collagène de type IV, qui n'est pas de type fibreux par contre, les domaines à hélices sont séparés les uns des autres par des domaines globulaires (très flexibles). Cet arrangement a la particularité de former une structure en feuillets qui se trouve presque exclusivement au niveau des membranes basales (Yurchenco & Ruben, 1987). Cette grande flexibilité confère également à la structure une plus grande susceptibilité aux protéases.

Au niveau du poumon, le collagène de type I constitue la protéine structurale majeure (Goldstein, 1991). On retrouve également, en moindre quantité, de nombreux autres types de collagène (Bradley *et al.*, 1974), dont le collagène de type II au niveau du cartilage de la trachée et des bronches et le collagène de type III qui est sécrété par les fibroblastes (Hance *et al.*, 1976). On retrouve également une petite quantité de collagène de type VI au niveau des vaisseaux sanguins et des bronches, ainsi que dans l'espace interstitiel en général; quantité qui est augmentée lors de phénomènes engendrant la fibrose des tissus endommagés au niveau des poumons (Specks *et al.*, 1995).

La matrice extracellulaire ne se limite pas à ces composantes structurales. En effet, nombre de cellules et d'enzymes protéolytiques sont enchevêtrées dans la matrice extracellulaire. Les protéases extracellulaires et leurs inhibiteurs font partie de cet ensemble dynamique et sont responsables du maintien de son homéostasie.

SCHÉMA 5 REPRÉSENTATION DU COLLAGÈNE FIBREUX.

- A) Chaîne alpha du collagène type I.
 - B) Assemblage de trois chaînes formant une molécule de collagène en hélice.
 - C) Disposition des molécules de collagène dans un fibrille.
 - D) Photographie en microscopie électronique d'un fibrille de collagène.
- Adapté de Voet & Voet, 1995. Photo tirée de Voet & Voet, 1995.

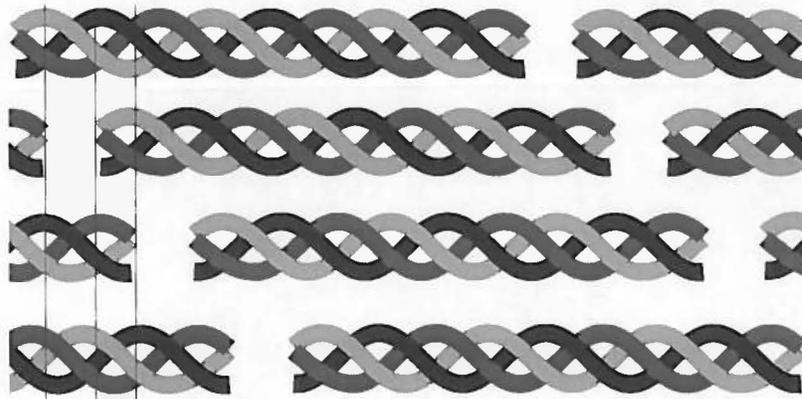
A)



B)



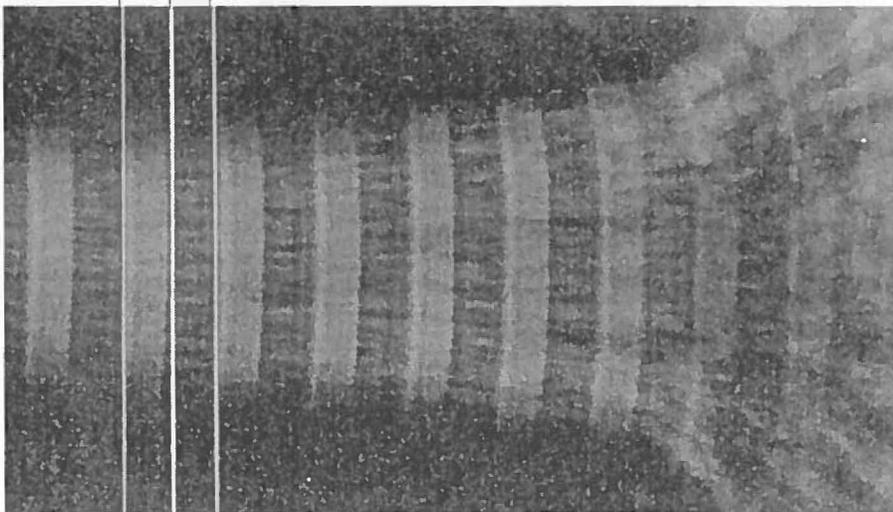
C)



Zone
"Trouée"
($0,6D$)

Zone
de
Superposition
($0,4D$)

D)



2.2 Les protéases extracellulaires

Plusieurs types d'enzymes protéolytiques sont impliquées dans les divers phénomènes de dégradation de la matrice extracellulaire et de molécules à la surface des cellules. Ainsi, les protéases extracellulaires et leurs inhibiteurs respectifs ont un rôle important à jouer dans divers processus physiologiques comme l'embryogénèse, la résorption osseuse et la réparation de tissus, ainsi que dans des processus pathologiques tels le cancer et les mécanismes inflammatoires comme l'arthrite rhumatoïde .

Les différentes protéases (protéinases, peptidases ou enzymes protéolytiques) impliquées dans la dégradation de la matrice extracellulaire sont classées selon la particularité de leur site catalytique. On retrouve quatre grandes familles d'enzymes; les protéases à sérine, les protéases à cystéine, les protéases aspartiques et les métalloprotéases. Toutes sont d'abord sécrétées sous forme de pro-enzymes et doivent être activées par protéolyse ou par une augmentation significative du pH. Habituellement, le clivage d'un seul lien peptidique est nécessaire pour libérer l'enzyme active. Ces enzymes possèdent un numéro officiel de classification. Cette classification fut proposée initialement par la Commission sur les Enzymes (Webb, 1993) et est maintenant révisée régulièrement par le comité de nomenclature de l'Union Internationale de Biochimie et de Biologie Moléculaire (NC-IUBMB). On peut d'ailleurs consulter la liste qui est mise-à-jour périodiquement sur le site officiel de cette association (<http://www.chem.qmw.ac.uk/iubmb/enzyme/index.html>).

2.2.1 Les protéases à sérine (EC 3.4.21)

Les protéases à sérine possèdent un mécanisme catalytique commun caractérisé par la présence d'une sérine hautement réactive au niveau de leur site actif. Elles sont reconnues facilement à leur triade catalytique caractéristique formée de résidus histidine, acide aspartique et sérine (pas nécessairement dans cet ordre). Elles se lient à leur substrat de manière covalente, et leur groupement hydroxyle agit en nucléophile attaquant le lien

peptidique (Takahashi *et al.*, 1988). Historiquement, les protéases à sérine ont été caractérisées à partir des enzymes digestives du pancréas. On ne retrouve pas seulement les protéases à sérine au niveau du tube digestif (trypsine – EC 3.4.21.4, chimotrypsine – EC 3.4.21.1 et élastase pancréatique- EC 3.4.21.36) (Northrop *et al.*, 1939; Baló & Banga, 1949), mais également parmi les facteurs de coagulation (thrombine - EC 3.4.21.5 et plasmine – EC 3.4.21.7) (Lundblad *et al.*, 1976). Les protéases à sérine peuvent aussi être sécrétées par des cellules du système immunitaire, soient les mastocytes (chymase et tryptase), les lymphocytes, les monocytes (élastase des leucocytes) et les neutrophiles (élastase des leucocytes et cathepsine G); ces dernières se retrouvant toutes au niveau pulmonaire.

Au niveau des protéases de la matrice extracellulaire, les protéases à sérine sont responsable de l'activation de toute une série d'enzymes, dont la cascade des métalloprotéases (section 2.2.4).

2.2.1.1 L'élastase des leucocytes (EC 3.4.21.37)

Identifiée en 1968 par Janoff & Scherer, l'élastase des leucocytes est l'une des protéases les plus abondantes retrouvée dans les granules des leucocytes polymorphonucléaires (PMNs) (Liou & Campbell, 1995). Cette localisation cellulaire permet à l'élastase d'être relarguée très rapidement et en très grande quantité sous forme active dans le milieu extracellulaire. Cette protéase a un champ d'action très vaste de par sa grande variété de substrats et sa capacité à activer d'autres protéases extracellulaires. Entre autre, l'élastase des leucocytes peut cliver l'élastine, le collagène de type I, II, III, IV, VIII, IX, X et XI (Pipoly & Crouch, 1987; Gadher *et al.*, 1988; Kittelberger *et al.*, 1992), la fibronectine, la laminine (Heck *et al.*, 1990), le protéoglycan du cartilage (Janusz & Doherty, 1991). Elle peut également activer par clivage des métalloprotéases de la matrice (MMPs), comme les procollagénases, les prostromélysines et les progélatinases (Rice & Banda, 1995). Elle clive aussi des médiateurs importants de la réponse immune comme les IgGs, les IgMs, les molécules du complément C3 et C5, ainsi que différents facteurs de coagulation (Turkington, 1991; Anderssen *et al.*, 1993), en plus de CD2, CD4 et CD8 (Doring *et al.*, 1995), ICAM-1 (Champagne *et al.*, 1998), et IL-2

(Ariel *et al.*, 1998). Ainsi, elle est considérée comme jouant un rôle important dans la pathologie de diverses maladies comme l'emphysème pulmonaire et la fibrose kystique (voir section 2.3).

2.2.1.2 La cathepsine G (EC 3.4.21.20)

La cathepsine G est responsable d'une activité similaire à la chymotrypsine dans les neutrophiles (Dewald *et al.*, 1975). Dans la cellule, cette enzyme possédant une forte activité antibactérienne est responsable de la dégradation des particules phagocytées. Une fois relarguée dans le milieu extracellulaire, la cathepsine G est notamment connue pour la dégradation de la laminine, du fibrinogène, de la caséine, des protéoglycans, de l'hémoglobine, ainsi que des télopeptides des collagènes de type I et II (Starkey, 1977; Roughley & Barrett, 1977), et pour l'activation d'autres protéases extracellulaires comme les stromélysines (section 2.2.4.2) et les collagénases (section 2.2.4.1) (Okada *et al.*, 1989; Capodici *et al.*, 1989). Tout comme l'élastase des leucocytes, la cathepsine G est également retrouvée dans les granules des PMNs où elle est responsable de la dégradation des particules phagocytées, et peut elle aussi endommager la matrice pulmonaire lorsqu'elle est relarguée en grande quantité sous forme active (voir section 2.3).

2.2.1.3 La tryptase des mastocytes (EC 3.4.21.59)

La tryptase fut découverte comme une enzyme détectée dans les granules des mastocytes et possédant une activité similaire à la trypsine (Glenner & Cohen, 1960). Cette enzyme tétramérique représente 20% du contenu protéique total des mastocytes (Schwartz *et al.*, 1981). Tout comme l'élastase et la cathepsine G, la tryptase se retrouve dans des granules sous sa forme active, et elle est sécrétée massivement suite à l'activation des mastocytes (Schwartz *et al.*, 1981). La tryptase possède la capacité de dégrader la fibronectine, d'activer l'enzyme MMP-2 (Lohi *et al.*, 1992) et d'induire le relargage de l'histamine par les mastocytes (Shaoheng *et al.*, 1998). La tryptase, ainsi que d'autres protéases, sont impliquées dans les mécanismes responsables de l'asthme (révisé par Barnes, 1992).

2.2.1.4 La chymase des mastocytes (EC 3.4.21.39)

Tandis que la tryptase possède une activité similaire à la trypsine, la chymase est plutôt apparentée à la chimotrypsine (Fukami *et al.*, 1998). Cette protéase est un médiateur important de la réponse d'hypersensibilité de type I au niveau de la peau et des voies respiratoires. En plus de générer l'angiotensine II (Caughey *et al.*, 2000), la chymase peut dégrader les composantes de la matrice extracellulaire comme le collagène de type IV (Schechter *et al.*, 1986), activer les procollagénases et générer les cytokines et autres peptides bioactifs par clivage (Fukami *et al.*, 1998). Tout comme l'élastase des leucocytes, la chymase possède un puissant pouvoir sécrétoire, c'est-à-dire qu'elle induit une forte sécrétion de mucus au niveau des glandes sous-mucosales de la voie respiratoire (Nadel, 1991), et peut potentiellement compliquer la pathogénèse de la réponse inflammatoire.

2.2.1.5 Les inhibiteurs des protéases à sérine

Les inhibiteurs naturels des protéases à sérine étant libérés dans le milieu extracellulaire sont généralement présents dans le sérum. Ils sont très importants en ce qui a trait à la régulation de l'activité des protéases extracellulaires. L'alpha-1-protéinase inhibiteur (α_1 -PI, 53 kDa), alpha-1-antitrypsine (α_1 -AT, 52kDa) et l'alpha-2-macroglobuline (α_2 -mg, 725 kDa) sont les principaux inhibiteurs naturels des protéases à sérine, tandis que l'aprotinine est un inhibiteur synthétique de cette classe d'enzymes. Pour ce qui est de l'élastase des leucocytes, on retrouve également au niveau sérique l'inhibiteur sécrétoire de la leukoprotéase (SLPI, 11,7 kDa), l'élafine (6 kDa) et la thrombospondine (protéine des plaquettes). La chymase et la tryptase des mastocytes quant à elles peuvent être inhibées par les inhibiteurs synthétiques chymostatin et trypstatin, respectivement (Powers *et al.*, 1985).

De par leur influence sur l'activité protéolytique nette, les inhibiteurs de protéases sont déterminants dans certaines maladies dégénératives. Par exemple, une anomalie génétique du gène codant pour l' α_1 -PI est responsable d'une variante héréditaire de l'emphysème pulmonaire (Crystal, 1996).

2.2.2 Les protéases à cystéine (EC 3.4.22)

Les protéases à cystéine sont des enzymes sulfhydriques, c'est-à-dire qu'elles nécessitent la présence d'un groupement sulfhydryde libre pour leur activité catalytique. Leur action dépend d'un résidu cystéine situé au niveau de leur site actif et retrouvé au sein d'une dyade catalytique formée de résidus de cystéine et d'histidine (cys/his ou his/cys). Tout comme les protéases à sérine, les protéases à cystéine forme un lien covalent avec leur substrat, et les acides aminés de leur site actif servent de nucléophile, attaquant le lien peptidique du substrat. Les enzymes types de cette famille sont la papaine et la bromélaïne, deux enzymes d'origine végétale. Chez les mammifères, les enzymes de cette famille sont les cathepsines lysosomales B, H, L, K et S. Bien que leur pH optimal soit acide (c'est pourquoi les protéases lysosomales sont quelquefois appelées protéases acides), elles sont tout de même encore actives à pH neutre (i.e. lorsque relarguées dans le milieu extracellulaire) (Barrett & Kirschke, 1981). Lorsque ces protéases d'origine lysosomale se retrouvent sécrétées dans le milieu extracellulaire, elles peuvent aggraver certaines pathologies inflammatoires.

2.2.2.1 La cathepsine B (EC 3.4.22.1)

La cathepsine B fut le premier membre de la famille des cathepsines lysosomales à être identifié, initialement au niveau de la rate (Fruton *et al.*, 1941). Elle est associée au système intracellulaire de dégradation des protéines, mais peut également être retrouvée au niveau du cytoplasme, du noyau et de la membrane plasmique. La cathepsine B peut aussi être sécrétée dans le milieu extracellulaire et alors être associée à la présence de tumeurs (Berquin & Sloane, 1996), à diverses maladies inflammatoires du système respiratoire (Burnett *et al.*, 1995) ainsi qu'à des désordres de articulations et des os (Buttle, 1994).

2.2.2.2 La cathepsine H (EC 3.4.22.16)

La cathepsine H est une enzyme lysosomale très proche de la cathepsine B, découverte par purification de lysosomes provenant de foie de rats (Kirschke *et al.*, 1977b). Cette enzyme est exprimée par tous les types de cellules chez les mammifères, bien que la plus forte concentration de cette enzyme est retrouvée au niveau des reins (Kominami *et al.*, 1985). Elle possède une activité élastolytique (Xin *et al.*, 1992). L'expression de l'ARNm codant pour la cathepsine H est augmentée par la présence de l'IFN- γ (Lafuse *et al.*, 1995), ce qui suggère que la cathepsine H pourrait avoir un rôle à jouer dans la présentation d'antigènes, étant donné que l'augmentation de l'expression de l'ARNm codant pour la cathepsine H correspond temporellement avec l'apparition de l'ARNm codant pour le CMH de classe II et de la chaîne invariante dans les macrophages. La cathepsine H est la seule parmi les protéases à cystéine ribosomale à posséder à la fois une activité endopeptidase et aminopeptidase, les autres n'étant que des endopeptidases (Kirschke *et al.*, 1977).

2.2.2.3 La cathepsine L (EC 3.4.22.15)

La cathepsine L est une enzyme associée à la protéolyse lysosomale qui a été isolée à partir de cellules de foie de rats par l'équipe de Bohley en 1971, et puis caractérisée plus en détails quelques années plus tard par l'équipe de Kirschke (1977a). Elle est capable de cliver des protéines cytosoliques (Bohley & Seglen, 1992), le collagène (Kirschke *et al.*, 1982) et l'élastine (Mason *et al.*, 1986). La présence du précurseur de cette enzyme, appelé protéine excrétée majeure (MEP), dans le milieu extracellulaire, a été associé à la croissance tumorale (Gottesman, 1978).

2.2.2.4 La cathepsine K (EC 3.4.22.38)

La cathepsine K est une enzyme très particulière de par sa localisation tissulaire unique. En effet, on la retrouve surtout au niveau des cartilages articulaires et des os (Rantakokko *et al.*, 1996) où elle est produite par les ostéoclastes (Tezuka *et al.*, 1994).

On attribue donc un rôle crucial à cette enzyme au niveau de la résorption osseuse, de par sa grande activité collagénolytique contre le collagène de type I (qui constitue près de 90% de la matrice organique des os), ainsi que sa grande activité gélatinolytique et élastolytique (Bromme *et al.*, 1996). La cathepsine K est également capable de cliver l'ostéonectine (Bossard *et al.*, 1996). Chez l'humain, cette enzyme est responsable d'une maladie génétique appelée pycnodysostose, impliquant de sérieuses anomalies osseuses (ex. nanisme) et caractérisée par l'insertion et la modification de codons "stop" (antisens) à l'intérieur du gène codant pour la cathepsine K (Gelb *et al.*, 1996).

2.2.2.5 La cathepsine S (EC 3.4.22.27)

La cathepsine S fut tout d'abord purifiée à partir de ganglions provenant de veaux (Turnsek, 1975). Elle est différente mais très apparentée à la cathepsine L. Bien que les autres cathepsines (B, K et L) garde une certaine activité à pH neutre, la cathepsine S est celle qui reste le plus efficace dans les conditions physiologiques (Kirschke *et al.*, 1989). La cathepsine S démontre une activité collagénolytique (Kirschke *et al.*, 1989) et élastolytique (Xin *et al.*, 1992). La cathepsine S est moins abondante au niveau des tissus que les cathepsines L et H; les niveaux les plus élevés ont été répertoriés dans les ganglions lymphatiques, la rate, les macrophages et autres phagocytes. Les fonctions physiologiques normales de la cathepsines S impliquent la dégradation des protéines dans les lysosomes (Rakoczy *et al.*, 1994) ainsi que le chargement et le clivage de la chaîne invariante associée au CMH de classe II (Riese *et al.*, 1996). La cathepsine S a également été suggérée comme pouvant être impliquée dans la pathogénèse de la maladie d'Alzheimer (Munger *et al.*, 1995; Lemere *et al.*, 1995) ainsi que dans des maladies dégénératives associées aux cellules phagocytaires mononucléaires (Reddy *et al.*, 1995).

2.2.2.6 Les inhibiteurs de protéases à cystéines

L'inhibiteur synthétique de la famille des protéases à cystéines est le E-64, et c'est un inhibiteur irréversible. Les cathepsines lysosomales à cystéine sont naturellement inhibées par l' α_2 -mg (Starkey & Barrett, 1973), les inhibiteurs de la famille des cystatines

(Barrett, 1986) et de la famille des équistatines (pour la cathepsine B) (Lenarcic *et al.*, 1997).

2.2.3 Les protéases aspartiques (EC 3.4.23)

Aussi appelées protéases acides ou carboxyliques, les protéases aspartiques possèdent une dyade catalytique formée de deux résidus d'acide aspartique au niveau de leur site actif. Leur pH optimal est acide, et contrairement aux protéases à sérine et à cystéine, c'est une molécule d'eau qui agit à titre de nucléophile pour ces protéases, et non un acide aminé provenant de la chaîne polypeptidique. Le résidu acide aspartique sert donc de ligand à la molécule d'eau activée. Toutes les protéases aspartiques sont des endopeptidases et sont initialement synthétisées sous forme de zymogènes. Chez les mammifères, les protéases aspartiques comprennent la cathepsine E et la cathepsine D et des enzymes gastriques comme la pepsine (EC 3.4.23.1) et la gastrine (EC 3.4.23.3).

2.2.3.1 Cathepsine D (EC 3.4.23.5)

La cathepsine D est un des constituants majeurs des lysosomes (Dean & Barrett, 1976) et elle se retrouve dans la plupart des types cellulaires des mammifères (Sakai *et al.*, 1989). Elle est impliquée dans le recyclage des protéines cellulaires ainsi que dans le remodelage tissulaire, notamment au niveau du tractus digestif (Saftig *et al.*, 1995). On lui attribue également un rôle dans la présentation d'antigènes de par la capacité de la pepstatin (voir section 2.3.3) à inhiber le clivage de la chaîne invariante associée au CMH de classe II (Maric *et al.*, 1994). On retrouve une surexpression de cathepsine D dans des tumeurs du sein et des lignées provenant de telles tumeurs (Rocherfort, 1990), et on l'utilise même comme marqueur pronostique dans cette maladie, bien qu'on ne connaisse pas encore le rôle exact de cette protéase dans l'étiologie de la maladie (Westley & May, 1999). On attribue également à cette protéase un rôle au niveau de la régulation de l'apoptose, ce qui pourrait expliquer son implication au niveau des tumeurs (Saftig *et al.*, 1995).

2.2.3.2 Cathepsine E (EC 3.4.23.34)

Découverte après la cathepsine D, la cathepsine E est retrouvée dans un éventail de cellules plus restreint (Lapresle *et al.*, 1986). On la retrouve également dans les couches épithéliales du tractus gastro-intestinal, au niveau des poumons, des reins, de la vessie, de la rate, du thymus et autres organes lymphoïdes (Arbustini *et al.*, 1994). On la retrouve dans les globules rouges (érythrocytes) (Yonezawa & Nakamura, 1991). D'ailleurs, l'hémoglobine semble être son substrat spécifique et est même utilisée pour faire des zymogrammes (Jupp *et al.*, 1988). La cathepsine E n'est pas considérée comme une enzyme lysosomale et n'est pas non plus sécrétée; on la retrouve plutôt au niveau de vésicules associées au réticulum endoplasmique et compartiments endosomaux (Bennet *et al.*, 1992), à l'exception des érythrocytes matures, où on la retrouve associée à la face cytosolique de la membrane plasmique (Ueno *et al.*, 1989). On croit qu'elle pourrait avoir un rôle à jouer dans la synthèse de l'endothéline (Lees *et al.*, 1990), dans la présentation d'antigènes et le clivage de la chaîne invariante (Bennet *et al.*, 1992) ainsi que dans la dégénération du cerveau associée au vieillissement (Nakanishi *et al.*, 1994). Une forme mutée instable de cette enzyme a été retrouvée dans des cellules gastriques cancéreuses (Aoki *et al.*, 1995).

2.2.3.3 Les inhibiteurs de protéases aspartiques

La pepstatin est l'inhibiteur synthétique le plus couramment utilisé pour inhiber l'action des protéases aspartiques. L'inhibiteur physiologique connu de ces enzymes est l' α_2 -mg, bien que ce dernier ne puisse plus agir très efficacement en deçà d'un pH de 6.2 (Thomas *et al.*, 1989).

2.2.4 Les métalloprotéases (EC 3.4.24)

Les métalloprotéases forment un groupe très diversifié d'enzymes, dont plus de la moitié se reconnaissent par le motif HEXXH qui est responsable de l'interaction avec le zinc, un ion nécessaire à l'activité protéolytique des métalloprotéases. Au niveau de la

matrice extracellulaire, une famille particulière de ce groupe d'enzyme retient notre attention, ce sont les métalloprotéases de la matrice (MMP). Tout comme les protéases aspartiques, les MMPs utilisent une molécule d'eau activée comme nucléophile attaquant le lien peptidique. Dans le cas des MMPs, c'est l'atome de zinc qui est responsable de l'activation de la molécule d'eau. Cet atome de zinc est maintenu en place par des acides aminés particuliers (His et Glu), généralement au nombre de trois. Chez les MMPs, il y a deux atomes de zinc, et donc trois résidus histidine et un résidu acide glutamique. Le calcium sous forme ionique est un cofacteur requis pour l'attachement des MMPs à leur substrat, et donc nécessaire pour l'activité catalytique. Le calcium permet à l'enzyme de se maintenir dans la conformation (structure tertiaire) nécessaire à ses fonctions catalytiques. L'EDTA (l'acide éthylènediamine tétra-acétique) peut donc inhiber l'activité collagénolytique en séquestrant les ions calcium. Les MMPs possèdent des substrats différents qui peuvent parfois se chevaucher, mais si elles sont toutes réunies, elles sont capables de dégrader pratiquement toutes les molécules formant la matrice extracellulaire. Chez les mammifères, les MMPs ont évolué pour la dégradation du collagène et autres protéines de la matrice extracellulaire. Cinq principales caractéristiques servent à définir les MMPs : (1) elles partagent des séquences en acides aminés; (2) leur activité protéolytique est inhibée par les inhibiteurs tissulaires des MMPs - TIMPs (abréviation tirée de l'anglais « tissue inhibitors of MMPs »); (3) elles sont soit sécrétées, soit transmembranaires, mais sont toutes retrouvées sous forme de proenzymes qui ont besoin d'être activés ; (4) leur site actif contient un ion zinc (Zn^{2+}) et nécessite un second cofacteur comme le calcium (Ca^{2+}) pour sa conformation; (5) leur activité est maximale aux conditions de pH physiologique.

Les MMPs sont impliquées dans de nombreuses maladies dégénératives. Dans les conditions normales toutefois, elles sont notamment impliquées dans l'attachement du trophoblaste à la paroi utérine, le développement de l'embryon, le remodelage de l'endomètre, l'ovulation et l'angiogénèse. Il y a plus d'une vingtaine (là numérotation va jusqu'à 26, mais certains numéros ne sont pas attribués) de MMPs répertoriées à ce jour. Les MMPs sont sous-classées selon leur spécificité de substrat et l'homologie de leurs domaines respectifs (voir SCHÉMA 6). On retrouve donc dans les sections suivantes, les collagénases interstitielles, les stromélysines, les gélatinases, les MMPs membranaires et

les MMPs non classées. Les MMPs les mieux caractérisées à ce jour seront donc présentées ici.

2.2.4.1 Les collagénases

Les collagénases forment un groupe d'enzymes qui catalysent le clivage enzymatique du collagène non dénaturé (natif). Les collagénases interstitielles, ou collagénases de type I, sont capables d'hydrolyser le collagène non-dénaturé (sous forme de triple-hélice) de type I, II et III dans les conditions physiologiques. D'autres enzymes doivent cliver les collagènes de type IV et V avant que ces collagénases puissent à leur tour les dégrader. Les collagénases-1,-2 et-3 clivent le collagène fibreux au niveau d'un lien peptidique Gly-Ile/Leu situé aux trois quarts de la distance de l'extrémité aminée vers l'extrémité carboxylée. Ce clivage caractéristique génère des fragments de collagène ayant soit les trois-quarts, soit le quart de la longueur d'une molécule de collagène fibreux intacte. Par la suite, les fragments de collagène fibreux se dénaturent spontanément et deviennent susceptibles à l'activité des gélatinases et d'autres enzymes. Lorsqu'elles sont accompagnées d'autres enzymes capables d'agir sur les constituants des tissus conjonctifs ou sur les structures membranaires (élastases, peptidases spécifiques, hyaluronidases, phospholipases), les collagénases peuvent participer au phénomène de remodelage tissulaire (embryogénèse, cicatrisation). Les domaines des collagénases qui ont été identifiés comme cruciaux en ce qui a trait au clivage du collagène natif sont le pont moléculaire et le domaine apparenté à l'hémopexine (voir SCHÉMA 6B) (Murphy *et al.*, 1992; Sanchez-Lopez *et al.*, 1993).

SCHÉMA 6 Les différentes MMPs humaines et leurs domaines respectifs.

Pre = domaine de localisation extracellulaire.

Pro = domaine conférant l'inactivité catalytique aux MMPs comportant 100 acides aminés et présentant le motif conservé PRCGVPDV.

F = motif consensus de reconnaissance et de clivage par la furine.

Cat = domaine possédant l'activité catalytique et présentant le motif conservé HEXGHXXGXXHS.

Fn = domaine apparenté au module de type II de la fibronectine.

Col * = domaine liant le collagène (*unique à MMP-9)

H = région très flexible ("hinge").

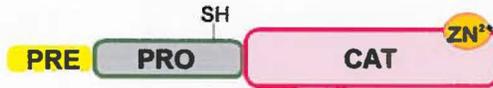
HEM = domaine apparenté à l'hémopexine/vitronectine.

TM = domaine transmembranaire.

© = queue cytoplasmique.

Adapté de Coussens & Werb, 1996.

A) MMP comportant le minimum de domaines (MMP-7)



MMPs avec domaine d'homologie à l'hémopexine/vitronectine

B) Simple (Collagénases, Stromélysines, MMP-12, 19, Énamélysine)



C) Activées par la furine (MMP-11)



D) Trans membranaires et activées par la furine (MT-MMPs)



E) Pouvant lier la gélatine (Gélatinases)



2.2.4.1.1 La collagénase interstitielle, MMP-1 (EC 3.4.24.7)

Aussi connue sous le nom de collagénase-1, la MMP-1 fut tout d'abord remarquée au niveau des queues de têtards disparaissantes à cause de sa capacité à cliver le collagène fibreux natif dans les conditions physiologiques reproduites *in vitro* (Gross & Lapière, 1962). En plus des collagènes fibreux de type I, II et III, la MMP-1 est également capable de cliver les collagènes de types VII et X (Gadher *et al.*, 1988; Seltzer *et al.*, 1989). Son substrat préféré est le collagène de type III. Elle a par contre une activité limitée sur la gélatine et la protéine formant le cœur des protéoglycans. La MMP-1 a la particularité de pouvoir cliver l' α_2 -mg (Mortensen *et al.*, 1981), ainsi que l' α_1 -PI et l' α_1 -AT, les deux inhibiteurs sériques de protéases à sérine les plus importants (Desrochers *et al.*, 1991). Tandis que le clivage des deux serpins les rend inactives, le clivage de l' α_2 -mg par contre active cette dernière, formant ainsi une boucle limitant l'action destructrice de la MMP-1. La MMP-1 joue un rôle dans la résorption osseuse et le remodelage tissulaire (Birkedal-Hansen *et al.*, 1995), et également dans divers processus pathologiques tels l'arthrite rhumatoïde, l'ostéoarthrite, la périodontite, l'invasion des tumeurs, l'angiogénèse, l'ulcération cornéenne, l'athérosclérose et les anévrismes (révisé par Birkedal-Hansen *et al.*, 1993).

2.2.4.1.2 La collagénase des neutrophiles, MMP-8 (EC 3.4.24.34)

La MMP-8, aussi appelée collagénase-2, fut découverte dans des granules spécifiques des PMNs (Murphy *et al.*, 1977), bien qu'elle soit également exprimée au niveau des chondrocytes (Cole *et al.*, 1996). Dans les granules des PMNs, la MMP-8 est sous sa forme proenzyme inactive. C'est une fois relarguée dans le milieu extracellulaire qu'elle est activée. La collagénase des neutrophiles est capable de cliver les collagènes fibreux de type I, II et III natifs générant les fragments un quart et trois-quarts (Hasty *et al.*, 1987). Son substrat préféré est le collagène de type I (Horwitz *et al.*, 1977). Elle peut également cliver divers autres substrats tels la gélatine, la fibronectine, les protéoglycans

(Tschesche *et al.*, 1992), l'aggrécan du cartilage (Fosang *et al.*, 1993) et l' α_1 -PI (Desrochers & Weiss, 1988).

2.2.4.1.3 La collagénase-3, MMP-13 (pas encore de # EC attribué)

La collagénase-3 fut découverte grâce à une banque d'ADN complémentaire provenant d'un carcinome mammaire (Freije *et al.*, 1994). On l'appelle aussi la collagénase des rongeurs car ceux-ci ne possèdent que la collagénase-3 (Sang & Douglas, 1996). Contrairement à MMP-1, la MMP-13 clive plus rapidement le collagène dénaturé (gélatine) que le collagène fibreux natif (Welgus *et al.*, 1982; Welgus *et al.*, 1985). La MMP-13 a aussi une bonne facilité à dégrader l'aggrécan du cartilage (Fosang *et al.*, 1996). Cette enzyme préfère de loin le collagène de type II au collagène de type I (Mitchell *et al.*, 1996). Chez l'humain, il semble que son expression soit restreinte aux carcinomes mammaires et aux chondrocytes (on retrouve beaucoup de collagène de type II dans les tissus conjonctifs), tandis que chez les rongeurs, cette enzyme est exprimée dans tous les types de tissus, ce qui semble logique étant donné que c'est la seule collagénase qu'ils possèdent. La MMP-13 peut être induite par l'IL-1 et le TNF- α (Reboul *et al.*, 1996), comme d'autres collagénases. Une implication de cette enzyme au niveau de l'ostéoarthritis est suggérée (Reboul *et al.*, 1996).

2.2.4.2 Les stromélysines

Les stromélysines sont souvent impliquées dans l'activation d'autres MMPs, et peuvent inactiver plusieurs inhibiteurs de protéases à sérine. Les protéases à sérine sont d'ailleurs responsables de l'activation des pro-stromélysines (Nagase, 1995). Elles ont également leur propre activité protéolytique. Elles peuvent cliver les collagènes de type III et IV, ainsi que d'autres protéines de la matrice extracellulaire comme les protéoglycans, les laminines et la fibronectine (Révisé par McDonnell *et al.*, 1999) (voir SCHÉMA 6B).

2.2.4.2.1 La stromélysine-1, MMP-3 (EC 3.4.24.17)

Le nom stromélysine implique que cette métalloprotéase provient des cellules stromales et dégrade la matrice extracellulaire par hydrolyse (Chin *et al.*, 1985). Sa découverte remonte à 1974 (Sapolsky *et al.*, 1974). La stromélysine-1 est particulière parmi les MMPs en ce sens qu'elle est active de façon optimale à des valeurs de pH entre 5.5 et 6.0, bien qu'elle ait un regain d'activité à des valeurs de pH de 7.5 à 8.0 (Wilhelm *et al.*, 1993). La stromélysine-1 peut cliver l'aggrécan, la fibronectine, la laminine, les collagènes de type III, IV, IX, et X, ainsi que les télopeptides (extrémités globulaires) du collagène de type I. Elle dégrade aussi l'IL-1 β , l' α_1 -AT et l' α_1 -PI, et a la particularité de pouvoir activer d'autres MMPs comme la MMP-1, la MMP-8, la MMP-13 et la MMP-9 (Tschesche *et al.*, 1992). L'implication de cette enzyme au niveau du remodelage de la matrice et des processus pathologiques de dégradation de la matrice se situe probablement au niveau de son action à la fois sur les composantes de la matrice et sur les autres MMPs.

2.2.4.2.2 La stromélysine-2, MMP-10 (EC 3.4.24.22)

La stromélysine-2 fut clonée en utilisant l'ADN complémentaire de la stromélysine-1 comme amorce (Muller *et al.*, 1988). Elle clive les collagènes de types III, IV et V, la fibronectine, la gélatine, l'aggrécan, et les protéoglycans du cartilage (Nicholson *et al.*, 1989; Fosang *et al.*, 1991). Et tout comme la stromélysine-1, elle est également capable d'activer d'autres MMPs. La plus grande différence entre la stromélysine-1 et la stromélysine-2 vient du fait qu'elles sont régulées différemment. En effet, il semble que la MMP-10 soit moins sensible aux cytokines et aux facteurs de croissance que ne l'est la MMP-3 (Brinckerhoff *et al.*, 1992). La MMP-10 semble être également exprimée dans des tissus différents de la MMP-3 (révisé par Powell & Matrisian, 1996). Par exemple, durant la réparation de tissus, la stromélysine-2 et la stromélysine-1 sont exprimées par des populations distinctes de fibroblastes de la membrane basale (Saarialho-Kere *et al.*, 1994).

2.2.4.3 Les gélatinases

Les gélatinases (collagénases de type IV) sont deux enzymes plus spécifiquement associées au clivage des chaînes natives du collagène IV, du collagène V, du collagène dénaturé (gélatine), de l'élastine (Senior *et al.*, 1991) ainsi que d'autres protéines matricielles. Elles se distinguent des autres MMPs par la présence d'un domaine apparenté à la fibronectine à l'intérieur du domaine catalytique (voir SCHÉMA 6E) leur permettant de lier la gélatine et de la dégrader (Banyai & Patthy, 1991). Elles ont souvent les mêmes affinités pour des substrats semblables, mais elles sont régulées différemment au niveau transcriptionnel et extracellulaire (voir section 2.2.4.6 sur les inhibiteurs des MMPs). Elles sont également les MMPs les plus étudiées pour leur implication reconnue au niveau de nombreuses maladies dégénératives impliquant un mécanisme inflammatoire (voir section 2.3). La technique de zymographie avec gélatine permet l'identification très rapide de ces deux protéases et ce, peu importe qu'il s'agisse de fluides biologiques ou de lysats cellulaires (Kleiner & Seltler-Stevenson, 1994).

2.2.4.3.1 La gélatinase A, MMP-2 (EC 3.4.24.24)

La gélatinase A, ou MMP-2 (72 kDa) fut décrite pour la première fois en 1972 (Harris & Krane), en référence à une activité dégradant la gélatine provenant du milieu de culture de tissus synoviaux rhumatoïde. Ce n'est que beaucoup plus tard que l'enzyme fut clonée (Collier *et al.*, 1988) et caractérisée (Seltzer *et al.*, 1990). La MMP-2 est capable de cliver tous les types de collagènes une fois qu'ils sont dénaturés. Elle peut aussi cliver la forme soluble du collagène de type I natif en fragments de $\frac{3}{4}$ et de $\frac{1}{4}$ de longueur (Aimes & Quigley, 1995). Elle peut également cliver le collagène de type IV, V (Murphy *et al.*, 1985), VII (Seltzer *et al.*, 1989), ainsi que l'aggrécane du cartilage (Fosang *et al.*, 1992). Son domaine apparenté à la fibronectine lui confère l'habileté de lier le collagène dénaturé de type IV et V, l'élastine et le collagène de type I natif (Steffensen *et al.*, 1995). Il est probable que la forme de l'enzyme attachée à la membrane par MT1-MMP (voir section 2.2.4.4.1) soit impliquée dans le remodelage du collagène (Everts *et al.*, 1996), et dans l'invasion cellulaire propre à certaines cellules tumorales (Chen, 1996). Dans

certains types cellulaires, il est possible que la MMP-2 soit induite par le TGF- β (Overall, *et al.*, 1991), mais en général, l'expression de la gélatinase A est peu affectée par les cytokines et les facteurs de croissance, comparativement aux autres MMPs.

2.2.4.3.2 La gélatinase B, MMP-9 (EC 3.4.24.35)

La gélatinase B, ou MMP-9 (92 kDa), diffère de la MMP-2 et de toutes les autres MMPs de par la présence d'un domaine présentant une homologie avec la chaîne $\alpha 2$ du collagène de type V (voir SCHÉMA 6E) (Wilhelm *et al.*, 1989). Tout comme les autres MMPs, la MMP-9 est activée par le clivage de son propeptide (Wilhelm *et al.*, 1989), ce qui peut être fait par la stromélysine-1 (Sang *et al.*, 1995), ou encore par la gélatinase A (Fridman *et al.*, 1995). Malgré le fait que les substrats des deux gélatinases se ressemblent beaucoup, des différences existent au niveau de la spécificité des séquences des substrats et au niveau du site actif de ces deux enzymes (Netzel-Arnett *et al.*, 1993). *In vitro*, la gélatine semble être le substrat préféré de la MMP-9, bien que l'enzyme puisse également cliver les collagènes de type III, IV et V (Birkedal-Hansen, 1995), l'élastine (Senior *et al.*, 1991), le domaine interglobulaire de l'aggrécan du cartilage (Fosang *et al.*, 1993), le télépeptide de la chaîne $\alpha 2$ du collagène de type I (Okada *et al.*, 1995), ainsi que la protéine basique de la myéline (MBP) (Proost *et al.*, 1993). La MMP-9 a la particularité de pouvoir former des homodimères ainsi que des hétérodimères avec la MMP-1, formant ainsi des complexes qui ne peuvent être inhibés par les TIMPs (voir section 2.2.4.6), et dans le cas du complexe MMP-9/MMP-1, capable de dégrader autant la gélatine et le collagène IV que le collagène fibreux (Goldberg *et al.*, 1992). À la différence de MMP-2, MMP-9 est présente dans les principaux centres d'inflammation étant donné qu'elle est à la fois sécrétée par les monocytes activés (Welgus *et al.*, 1990) et retrouvée dans les granules des neutrophiles (Kjeldsen *et al.*, 1992). De plus, sa production est modulée positivement par l'activation des lymphocytes T (Weeks *et al.*, 1993a; Leppert *et al.*, 1995). Elle est également produite par les ostéoclastes et semble jouer un rôle dans la résorption osseuse (Reponen *et al.*, 1994; Witty *et al.*, 1996). La gélatinase B est également retrouvée au niveau des sites des tumeurs, au niveau des infiltrats (Pyke *et al.*, 1992; Gallegos *et al.*, 1995; Knox *et al.*, 1996), ainsi qu'au niveau des membranes

synoviales et des régions cartilagineuses des patients arthritiques (Koolwijk *et al.*, 1995), du liquide céphalo-rachidien des patients avec des maladies neuro-dégénératives (Norga *et al.*, 1995) (voir section 2.3 pour plus de détails sur l'implication de MMP-9 dans les pathologies pulmonaires). Au niveau des conditions normales, on retrouve la MMP-9 dans les foyers de réparation tissulaire au niveau respiratoire (Buisson *et al.*, 1996) et de la peau (Oikarinen *et al.*, 1993), au niveau de l'implantation de l'embryon (Reponen *et al.*, 1995) et de son développement (Canete-Soler *et al.*, 1995), ainsi qu'au niveau de l'endomètre (Marbaix *et al.*, 1992). L'expression de la gélatinase B est contrôlée par une multitude de facteurs comme des cytokines et des signaux de transduction (Huhtala *et al.*, 1991; Sato *et al.*, 1993; Huhtala *et al.*, 1995).

2.2.4.4 Les MMPs membranaires (MT-MMPs)

Les MT-MMPs sont les seules MMPs à posséder un domaine transmembranaire et une courte queue cytoplasmique (voir SCHÉMA 6D). Elles sont activées intracellulairement par la furine, comme c'est le cas pour la stromélysine-3 (MMP-11). Une fois à la surface des cellules, elles servent de récepteur pour TIMP-2 et TIMP-3. Lorsque des MMPs sont attachées aux TIMPs, les MT-MMPs les activent en clivant leur prodomaine. Outre la MT1-MMP, qui est la mieux connue, on retrouve également la MT2-MMP (MMP-15), la MT3-MMP (MMP16), la MT4-MMP (MMP17), la MT5-MMP (MMP-24) et la MT6-MMP (MMP25).

2.2.4.4.1 MT1-MMP, MMP-14 (pas encore de # EC attribuée)

La MT1-MMP fut la première MT-MMP à être clonée, en utilisant des amorces dégénérées dérivées des séquences conservées chez toutes les MMPs (Sato *et al.*, 1994). La principale fonction attribuée (à ce jour) à la MT1-MMP est l'activation de la progélatinase A ou pro-MMP-22 (Sato *et al.*, 1994). L'activation de la pro-MMP-2 requiert une petite quantité de TIMP-2 (Strongin *et al.*, 1995). La concentration de ce dernier à la surface des cellules est très importante dans cette réaction. MT1-MMP active également la procollagénase-3, possiblement par un mécanisme similaire (Knauper *et al.*,

1996b). De plus, la MT-1-MMP est capable de cliver divers constituants de la matrice extracellulaire comme la fibronectine, la vitronectine, la laminine, le protéoglycan dermatan sulfate (Ohuchi *et al.*, 1997; Pei & Weiss, 1996), la gélatine, la caséine, l'élastine (Imai *et al.*, 1996; Pei & Weiss, 1996), et les collagènes interstitiels (Ohuchi *et al.*, 1997). La MT1-MMP est surexprimée par une variété de tumeurs comme celles du sein (Davies *et al.*, 1993) et du poumon (Sato *et al.*, 1994). Son implication dans ces pathologies est explicable du point de vue de sa capacité à activer pro-MMP-2.

2.2.4.5 Les autres MMPs

Les MMPs suivantes ne sont pas classées dans les catégories précédentes dû au fait qu'elles ont des particularités qui leur sont propres.

2.2.4.5.1 La matrilysine, MMP-7 (EC 3.4.24.23)

La matrilysine est la plus petite des MMPs (19kDa) puisqu'elle ne possède pas de pont moléculaire ni de domaine d'homologie à l'hémopexine comme les autres MMPs (SCHÉMA 6A). Malgré l'absence de ces domaines, la MMP-7 est tout de même capable de cliver un grand nombre de protéines de la matrice, comme la gélatine de types I, III, IV et V, la fibronectine, le collagène IV, la laminine, l'entactine/nidogène, l'aggrécan, l'élastine (Wilson & Matrisian, 1996) et la vitronectine (Imai *et al.*, 1995). La MMP-7 clive aussi diverses protéines comme le précurseur du TNF- α , l' α_1 -PI, la transferrine et la caséine (Wilson & Matrisian, 1996). La matrilysine est capable de cliver le pro-peptide de la pro-MMP-1, la pro-MMP2 (Crabbe *et al.*, 1992) et la pro-MMP-9 (Sang *et al.*, 1995) activant celles-ci. Le gène de la MMP-7 est induit par l'ester de phorbol et l'EGF, et réprimé par le TGF- β . La MMP-7 a une distribution tissulaire assez restreinte. Jusqu'à maintenant, on ne l'a retrouvé que dans les cellules épithéliales glandulaires de l'endomètre utérin, de la peau, du pancréas, des reins, des cellules promonocytaires et des monocytes sanguins (Busiek *et al.*, 1995), de l'épithélium des glandes mammaires, de la vésicule biliaire, de la prostate et des glandes parotides (Wilson & Matrisian, 1996). Son

implication dans les cancers d'origine épithéliale est suggérée par le fait que les souris n'exprimant pas la MMP-7 ont une tumorigénicité réduite (Wilson *et al.*, 1997).

2.2.4.5.2 La métalloélastase, MMP-12 (EC 3.4.24.65)

Cette enzyme est particulière parmi les MMPs de par sa capacité à dégrader l'élastine insoluble, et de par sa localisation particulière, c'est-à-dire qu'on la retrouve majoritairement dans les macrophages (Banda & Werb, 1981). Cette enzyme est facilement identifiable par zymographie en utilisant la κ -élastine ou encore la caséine comme substrats (Senior *et al.*, 1991). En plus de l'élastine, la métalloélastase peut cliver d'autres composantes de la matrice extracellulaire, comme l'entactine, la laminine, la fibronectine, divers protéoglycans, le pepsinogène, le collagène de type IV, l' α_1 -PI (Banda *et al.*, 1980), le fibrinogène, la MBP, la caséine (Banda & Werb, 1981) et les IgGs de souris (Banda *et al.*, 1983). Cette enzyme semble donc être importante pour les macrophages puisque les souris déficientes en métalloélastase ont des macrophages qui ne sont pas capables d'être recrutés au niveau des foyers d'inflammation (Shipley *et al.*, 1996). Un fait intéressant pour la possible implication de cette protéase au niveau des pathologies pulmonaires est que chez les souris déficientes en MMP-12, l'emphysème ne se développe pas suite à l'exposition de ces souris à la fumée de cigarette (Hautamaki *et al.*, 1997).

2.2.4.5.3 La stromélysine 3, MMP-11 (pas de # EC attribué)

La stromélysine-3 (45-47 kDa) fut clonée par comparaison de banques d'ADN complémentaire provenant d'échantillons de tumeurs bénignes et malignes de cancer du sein (Basset *et al.*, 1990). La MMP-11 fut la première MMP à être associée spécifiquement avec la phase invasive du cancer du sein (Basset *et al.*, 1990). Beaucoup de particularités dans la séquence de la MMP-11 font qu'elle n'est pas classée avec les autres stromélysines, même si elle leur ressemble structurellement (d'où son nom). Contrairement à toutes les autres MMPs, la stromélysine-3 ne clive pas les composantes de la matrice extracellulaire, sauf lorsqu'elle est sous sa forme tronquée de 28 kDa

(Murphy *et al.*, 1993), elle présente alors une faible activité contre les protéines matricielles. Également, on peut retrouver la MMP-11 active dans le milieu de culture *in vitro* (Pei *et al.*, 1994), alors que les autres MMPs sont d'abord sécrétées sous forme de proenzyme. En effet, une proprotéine convertase intracellulaire appelée furine et située dans le *trans*-Golgi clive le prodomaine de la MMP-11 au niveau d'une séquence spécifique localisée entre le prodomaine et le domaine catalytique (voir SCHÉMA 6C) (Pei & Weiss, 1995). La stromélysine-3 clive les inhibiteurs membres de la famille des serpins, les rendant inactifs, comme par exemple l' α_1 -PI, l' α_2 -antiplasmine et l'inhibiteur de l'activateur du plasminogène-2 (Pei *et al.*, 1994). Malgré son association avec le cancer du sein, les mécanismes par lesquels cette enzyme peut favoriser les tumeurs restent inconnus étant donné le fait qu'elle ne clive pas les composantes de la matrice extracellulaire.

2.2.4.5.4 L'énamélysine, MMP-20 (pas de #EC attribué)

Cette métalloprotéase fut découverte à l'aide d'une banque d'ADN complémentaire provenant de l'organe de l'émail (lieu de formation des dents) d'un porc (Bartlett *et al.*, 1996). On a ensuite cloné son homologue chez l'humain (Llano *et al.*, 1997). Jusqu'à maintenant, le seul endroit où l'on retrouve cette MMP est au niveau la formation de l'émail dentaire. Lors de la formation de l'émail, les améloblastes sécrètent une matrice organique composée majoritairement d'amélogénine, qui est ensuite remodelée continuellement lors du processus de biominéralisation de l'émail dentaire, ce qui laisse croire que la MMP-20 pourrait avoir un rôle très important à jouer dans ce processus. Cette enzyme a une faible activité contre la gélatine, mais est capable de cliver la caséine et les différents isoformes de l'amélogénine (Llano *et al.*, 1997).

2.2.4.6 Les inhibiteurs des MMPs

L' α_2 -mg est un inhibiteur sérique non spécifique de toutes les MMPs (Sottrup-Jensen, 1989). La 1,10-phénanthroline, les hydroxamates et l'EDTA sont des inhibiteurs

synthétiques des MMPs. La tétracycline inhibe les collagénases. Les stromélysines sont inhibées par la cystéine et le DTT.

En temps normal, les MMPs sont exprimées en équilibre avec les inhibiteurs tissulaires des MMPs (TIMPs) et elles sont généralement régulées par divers autres mécanismes selon l'endroit où elles se trouvent. Les TIMPs constituent une famille (à ce jour) d'au moins quatre protéines de 22 à 29 kDa capables d'inhiber spécifiquement et de façon réversible les MMPs (Greene *et al.*, 1996; Leco *et al.*, 1997). Les quatre TIMPs ont une séquence semblable; leurs principales différences se situent au niveau de leurs cibles préférentielles, de la régulation de leurs gènes, et de leur distribution tissulaire (Murphy & Willenbrock, 1995). Les TIMPs inhibent les MMPs de manière stœchiométrique (1:1).

TIMP-1 possède une activité de facteur de croissance qui semble indépendante de sa fonction d'inhibiteur de MMP (Docherty *et al.*, 1985). TIMP-1 inhibe MMP-1 (Cawston *et al.*, 1983), MMP-3 (Murphy & Willenbrock, 1995), MMP-7 (Ward *et al.*, 1991), MMP-8 (Kleine *et al.*, 1993), MMP-10 (Windsor *et al.*, 1993), MMP-11 (Murphy *et al.*, 1993), MMP-12 (Shapiro *et al.*, 1992) et MMP-13 (Knauper *et al.*, 1996a). MMP-9 lie TIMP-1 dans sa forme pro-enzyme, ce qui empêche la formation de l'hétérodimère MMP-9/MMP-1 et l'activation de MMP-9 par MMP-3 (Goldberg *et al.*, 1992).

Comme c'est le cas pour TIMP-1, TIMP-2 semble également posséder une activité de facteur de croissance (Murphy & Willenbrock, 1995). TIMP-2 inhibe MMP-1 (DeClerck *et al.*, 1991), MMP-3 (Murphy & Willenbrock, 1995), MMP-7 (Ward *et al.*, 1991), MMP-8 (Stetler-Stevenson *et al.*, 1989), MMP-10 (Windsor *et al.*, 1993), MMP-11 (Murphy *et al.*, 1993), MMP-13 (Knauper *et al.*, 1996a) et MMP-20 (Llano *et al.*, 1997). En ce qui concerne MMP-2, TIMP-2 est l'inhibiteur qui se lie le plus fortement à cette enzyme, bien que TIMP-1 et TIMP-3 soient également capables de l'inhiber (Howard & Banda, 1991; Imai *et al.*, 1996).

TIMP-3 est une glycoprotéine présente dans la plupart des tissus (Leco *et al.*, 1997); elle inhibe MMP-9 (Reponen *et al.*, 1995), MMP-11 (Murphy *et al.*, 1993), MMP-14 (Will *et al.*, 1996), MMP-13 (Knauper *et al.*, 1996), ainsi que MMP-1, MMP-2 et MMP-3 (Apte *et al.*, 1995).

TIMP-4 est l'inhibiteur qui a été le moins étudié, probablement dû au fait qu'il est surtout exprimé au niveau du tissu cardiaque adulte (Greene *et al.*, 1996). On sait entre autres qu'il inhibe MMP-2, MMP-1, MMP-3, MMP-7 et MMP-9 (Liu *et al.*, 1997).

Autant pour les MMPs que pour les autres protéases de la matrice extracellulaire, l'équilibre avec leurs inhibiteurs naturels est primordial pour l'homéostasie des tissus. Cependant, cet équilibre est fragile, et au niveau pulmonaire, il existe de nombreux exemples des effets d'un tel déséquilibre.

2.3 Implication des protéases dans les pathologies pulmonaires

La fibrose kystique, l'asthme ainsi que l'emphysème ont en commun l'infiltration massive par des leucocytes et la surproduction de protéases extracellulaires. Au niveau de l'appareil respiratoire, les cellules résidentes comme les macrophages alvéolaires, les cellules stromales, les fibroblastes et les cellules épithéliales pulmonaires sont également capables de produire de grandes quantités de protéases lorsqu'elles sont stimulées (Goldstein, 1983; Canete-Soler *et al.*, 1994; Yao *et al.*, 1996; Herbert *et al.*, 1996). La dégradation de la matrice par les protéases augmentent la perméabilité de la membrane basale entourant les capillaires sanguins et permet le recrutement des leucocytes attirés par les cytokines. Parmi les différentes protéases sécrétées par les neutrophiles, lymphocytes, macrophages et cellules résidentes des tissus conjonctifs, on retrouve notamment l'élastase, la cathepsine G, ainsi que des collagénases et des gélatinases (Weiss, 1989). L'équilibre entre ces protéases et leurs inhibiteurs respectifs est donc déterminant dans l'évolution des pathologies pulmonaires inflammatoires.

2.3.1 L'élastase des leucocytes

Des quantités importantes d'élastase sont retrouvées dans les BALs des poumons de patients atteints de fibrose kystique (Goldstein & Doring, 1986). Différentes recherches sur cette enzyme ont permis de démontrer qu'elle peut dégrader diverses

molécules immunomodulatrices telles que les anticorps de type IgG et IgM qu'elle clive dans la portion Fc, de même que le récepteur des molécules du complément (Tosi *et al.*, 1990), limitant ainsi la phagocytose des pathogènes. L'élastase peut aussi cliver le CD2, CD4 et CD8 (Doring *et al.*, 1995), nuisant ainsi directement aux fonctions des lymphocytes recrutés lors d'une réponse inflammatoire (Sanders & Vitetta, 1991; Ben-Baruch *et al.*, 1995; Butcher & Picker, 1996; Gilat *et al.*, 1996).

L'équipe de Konstan (1993) a démontré une augmentation de la concentration de leucotriène B4 (LTB4) dans les poumons de patients atteints de la fibrose kystique. Cette cytokine a été démontré comme facteur chimioattractant pour les neutrophiles capable de susciter leur dégranulation et donc de causer un relargage massif d'élastase et de cathepsine G au niveau des poumons (Campbell *et al.*, 1989). L'ensemble de ces activités de l'élastase dans les poumons des patients atteints de fibrose kystique est considéré comme favorisant l'établissement d'un état d'immunosuppression locale, ce qui contribue au maintien de l'infection par *Pseudomonas aeruginosa* (Amitani *et al.*, 1991).

La concentration d'élastase présente au niveau des poumons peut être liée à la présence de neutrophiles infiltrants. Par exemple, dans le cas de l'infection par le micro-organisme *Mycobacterium avium-intracellulare*, Yamazaki *et al.* (2000) ont démontré que les taux de cytokines pro-inflammatoires et d'élastase dans les BALs étaient en relation avec une augmentation des neutrophiles. De même, Dhimi *et al.* (2000) ont eux aussi démontré que dans leur modèle murin d'emphysème induit par la fumée de cigarette, la destruction des tissus conjonctifs était directement liée à la présence des neutrophiles. Chez le rat comme chez la souris, l'emphysème peut également être induite par une injection intra-trachéale massive d'élastase pancréatique (Finlay *et al.*, 1996). De cette manière, on peut relier directement la présence de l'élastase avec la présence de lésions typiques de l'emphysème, c'est-à-dire l'augmentation de l'épaisseur des fibres de collagène et leur accumulation désorganisée sur les parois des voies respiratoires. Par contre, étant donné l'implication du remodelage du collagène dans cette pathologie, on est en mesure de soupçonner également l'implication de collagénases.

2.3.2 Les métalloprotéases de la matrice

Tout comme l'élastase, les collagénases et plus particulièrement MMP-9 et MMP-2 sont également retrouvées dans les BALs de patients emphysémateux (Finlay *et al.*, 1997; Ohnishi *et al.*, 1998). Finlay *et al.* ont démontré *in vitro* que la MMP-9 retrouvée dans les BALs était sécrétée par des neutrophiles. La MMP-2 active et la MT1-MMP identifiées par l'équipe d'Ohnishi (1998), quant à elles, proviendraient plutôt de cellules résidentes de l'appareil respiratoire, comme les pneumocytes, les fibroblastes et les macrophages alvéolaires. Cette grande quantité et diversité de protéases ainsi retrouvées dans les poumons contribue fortement aux phénomènes d'amincissement et de destruction des parois alvéolaires, de fusion d'alvéoles adjacentes par perte des septa, et de l'affaissement des poumons due à la perte des tissus élastiques qui sont typiques de l'emphysème pulmonaire (Hutchison, 1994). On sait que les MMPs sont capables de dégrader l'élastine, tout comme l'élastase (Senior *et al.*, 1991). De plus, les protéases favorisent l'infiltration par les cellules du système immunitaire grâce à l'augmentation de la perméabilité des parois associée à l'amincissement de celles-ci et également parce que les produits de dégradation du collagène, ainsi que des autres composantes de la matrice peuvent servir de facteurs chimioattractants (Malone *et al.*, 1992).

Chez les patients atteints d'asthme chronique (stades avancés), on retrouve une induction de MMPs associée à une forte présence de neutrophiles (Lemjabbar *et al.*, 1999). Une partie de la MMP-9 qu'on y retrouve provient également de cellules épithéliales bronchiques activées en réponse aux dommages induits par les irritants qui provoquent l'asthme. À l'aide d'un modèle expérimental, l'accumulation de cellules inflammatoires dans les conduits et à l'intérieur des cloisons, ainsi que l'hyper-réactivité caractéristique de cette pathologie ont pu être liées directement à la présence des MMP-9 et MMP-2 dans les poumons asthmatiques (Kumagai *et al.*, 1999); ces symptômes disparaissent après que les souris aient été soumises à de fortes doses d'inhibiteurs de MMPs.

Lors de l'évolution du syndrome de détresse respiratoire aiguë (SDRA), on observe un maintien d'un ratio MMP-9/TIMP-1 très élevé (Ricou *et al.*, 1996), conduisant à l'augmentation de la dégradation du collagène dans un premier temps, puis,

finalement, l'équilibre semble changer et une accumulation de collagène est observée dans la phase terminale de la maladie, au moment où l'on observe une fibrose des tissus (Fulkerson *et al.*, 1996). Au niveau de l'asthme et de la bronchite chronique, deux pathologies caractérisées par un excès d'accumulation de matrice extracellulaire au niveau des parois des voies respiratoires nuisant à la respiration, l'équilibre entre les MMPs et leurs inhibiteurs est tout aussi critique. Chez tous les cas d'asthme et de bronchite chronique analysés par l'équipe de Vignola (1998), les niveaux de TIMP-1 excédaient les niveaux de MMP-9, bien que les deux protéines augmentaient de façon significative par rapport aux témoins. Les travaux antérieurs de l'équipe de Vignola (1996) avaient permis de déterminer que les macrophages alvéolaires extraits de ces patients produisaient de grandes quantités de TIMP-1, de TGF- β , et de fibronectine, facteurs contribuant à cette accumulation de matrice sur les parois.

Les macrophages alvéolaires constituent la première ligne de défense contre les micro-organismes et irritants inhalés (Green *et al.*, 1977; Golstein & Bartlema, 1977; Hocking & Golde, 1979). Ils jouent également le rôle de modulateurs clés dans la réponse inflammatoire par la production de cytokines pro- et anti-inflammatoires variées. En réponse à divers stimuli, les macrophages alvéolaires peuvent également produire des MMPs particulières, telles MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-9 et MMP-12. Gibbs *et al.* (1999a et b), ont démontré le rôle clé des macrophages alvéolaires dans leur modèle d'inflammation pulmonaire aiguë. Ils ont démontré l'inhibition complète des lésions par TIMP-2 dans un modèle n'impliquant que les macrophages (complexes immuns IgA) et l'inhibition partielle des lésions dans le modèle impliquant à la fois les macrophages et les neutrophiles (LPS). L'éventail des MMPs retrouvées dans les poumons des rats de ces deux expériences correspondaient également à celui produit par des macrophages alvéolaires provenant de ces mêmes rats et mis en culture, puis analysés par zymographie.

2.2.3 Des protéases dans l'infection produite par le VSRRP

Les macrophages alvéolaires constituent la principale cible du virus du SRRP (Wensvoort *et al.*, 1991; Benfield *et al.*, 1992) et sont donc impliqués directement dans la pathologie induite par ce virus. En effet, il semble que le VSRRP puisse induire la

production de cytokines pro-inflammatoires et de chimiokines (Beyer *et al.*, 1998; Chiou *et al.*, 2000) par les macrophages alvéolaires. Ainsi, l'équipe de Beyer ont démontré qu'il y avait augmentation d'IL-6, d'IL-8 et d'AMCF-II pendant les deux premières semaines de l'infection par le VSSRP. Chiou et ses collègues ont par ailleurs observé des variations significatives des niveaux de TNF- α et de PGE₂ dans les 48 premières heures post-infection. Une forte diminution du nombre de macrophages alvéolaires lors d'expériences *in vitro* et *in vivo* laissent croire que le VSRP pourrait également avoir un effet pro-apoptotique sur ce type cellulaire (Oliksiewicz & Nielsen, 1999). L'équipe de Suarez (1996) a en effet démontré que la glycoprotéine p25 contenue dans l'ORF 5 était responsable de l'induction de l'apoptose de cellules COS-1 transfectées avec un vecteur contenant cet ORF. Par contre, une étude par immunohistochimie des lésions a montré que les cellules apoptotiques ne colocalisaient pas avec les cellules infectées, suggérant un effet indirect (Sur *et al.*, 1998). Le VSRP pourrait également avoir des effets immunosuppresseurs, considérant le nombre important d'infections opportunistes observées dans les élevages porcins aux prises avec cette infection virale (Zeman, 1996).

Étant donné la capacité des macrophages alvéolaires à sécréter différentes protéases telles le lysozyme, la métalloélastase (MMP-12) et des gélatinases (Goldstein, 1983), il est fort possible que le VSSRP ait un effet direct ou indirect sur la fluctuation des protéases au niveau des poumons des porcs infectés. L'article faisant suite à cette revue de littérature a tenté de démontrer qu'une telle fluctuation se produisait lors de l'infection, et a aussi identifié les MMP-2 et -9 comme étant parmi les protéases induites préférentiellement lors de cette infection.

ARTICLE

Editor-in-Chief

Stuart G. Siddell
Germany

Professor S.G. Siddell
Institute of Virology and Immunology
University of Würzburg
Versbacher Str. 7
97078 Würzburg, Germany

Tel: +49 931 201 3896
FAX: +49 931 201 3970
e-mail: siddell@vim.uni-wuerzburg.de

Reviews Editor

Geoffrey L. Smith
UK

Dr. Y. St-Pierre
Centre de Recherche en Santé Humaine
INRS - Instiut Armand-Frappier
531 boul. des Prairies
Laval
Laval-des-Rapides
Québec H7N 4Z3
Canada

Editors

Andrew J. Davison
UK

Esteban Domingo
Spain

Richard M. Elliott
UK

30 January, 2001

Rob W. Goldbach
The Netherlands

JGV Paper No. 17442

Ursula A. Gompels
UK

Dear Dr. St-Pierre,

Tim J. Harrison
UK

Thomas C. Mettenleiter
Germany

The revised version of your paper has been accepted for publication. You should receive proofs in 6 to 8 weeks. I enclose two copyright assignment forms. Please complete one and return it to the editorial office; the other is for your files.

John P. Moore
USA

Robert D. Possee
UK

Thank you for sending this paper to the Journal.

Ken E. Richards
France

Bertus K. Rima
UK

Yours sincerely,

John T. Schiller
USA



Thomas F. Schulz
Germany

Heinz-Jürgen Thiel
Germany

Prof. Stuart G. Siddell
Editor-in-Chief

Editorial Office

Marlborough House
Basingstoke Road
Spencers Wood
Reading RG7 1AG
UK

Encl.

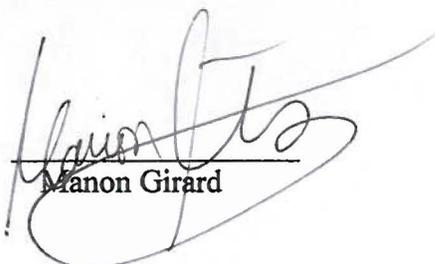
Tel: +44 118 988 1833
Fax: +44 118 988 1834
E-mail: jgv@sgm.ac.uk

Attestation de la contribution des auteurs

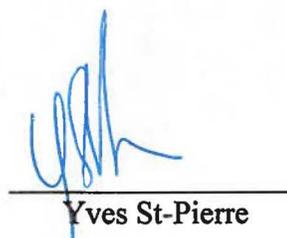
Mlle Girard, première auteure de l'article intitulé "Increased proteolytic activity and matrix metalloproteases (MMPs) expression in lungs during infection by porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV)" a effectué toutes les manipulations (analyses FASC, zymographies, RT-PCR, isolement viral) ayant mené aux résultats des tableaux 1 et 2, ainsi qu'aux figures 1 à 3 inclusivement. Les analyses histopathologiques, résumées dans le tableau III et aux figures 4 et 5, ont été réalisées par le Dr. Serge Dea.

Avec l'aide de M. Patrick Cléroux et du Dr. Serge Dea, Mlle Girard a participé aux études *in vivo*, notamment lors de la manipulation des animaux, des infections expérimentales, de la récolte des lavages bronchoalvéolaires, et du prélèvement des différents tissus lors des nécropsies. M. Cléroux a été responsable de la culture des cellules PAMs et de la multiplication de virus *in vitro* (préparation virale à inoculer aux porcs). Le Dr. Serge Dea a procédé aux anesthésies et à l'euthanasie des porcs avec la collaboration de M. Cléroux et de Mlle Girard. M. Pierre Tremblay a participé à la formation de Mlle Girard pour les techniques de zymographie et de FASC, notamment en ce qui a trait au développement des protocoles de FASC en présence des inhibiteurs de protéases.

La supervision du projet a été conjointement réalisée sous la responsabilité des Drs. Yves St-Pierre et Serge Dea.



Manon Girard



Yves St-Pierre

INCREASED PROTEOLYTIC ACTIVITY AND MATRIX METALLOPROTEASES (MMPs) EXPRESSION IN LUNGS DURING INFECTION BY PORCINE REPRODUCTIVE AND RESPIRATORY SYNDROME VIRUS (PRRSV).

Manon Girard¹, Patrick Cl  roux², Pierre Tremblay, Serge Dea² and Yves St-Pierre¹

¹Centre de Recherche en Santé Humaine et ²Centre de Recherche en Microbiologie et Biotechnologie, INRS-Institut Armand-Frappier, 531 boul. des Prairies, Laval, Laval-des-Rapides, Québec, Canada H7N 4Z3.

Author for correspondence : Yves St-Pierre.

FAX + 1 450 686 5501. TEL + 1 450 686 5354

e-mail yves_st-pierre@inrs-iaf.quebec.ca

Pierre Tremblay present address : Biopharmacopae Desing Inc., 350 rue Franquet, Sainte-Foy, Québec, Canada G1P 4P3

Shortened running title : Induction of proteases during PRRSV infection.

Total number of words in the main text: 3264

Total number of words in the summary: 245

Number of figures: 5

Number of tables: 3

Local increase in the secretion of extracellular proteases is a hallmark of chronic inflammation and autoimmunity for cleaving the extracellular matrix, thereby facilitating the infiltration of T cells, monocytes, and neutrophils. In pulmonary genetic diseases, such as emphysema and cystic fibrosis, proteases can also favor the development of a local immunodeficiency by degrading key regulators of the immune response, such as CD4, CD8, IgG, ICAM-1, and C3b receptors. Since several infectious agents can give rise to severe pulmonary disorders associated with opportunistic infections, we sought to determine whether an increase in proteolytic activity occurred during the infection with porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV), the causative agent of a new disease in swine characterized by severe respiratory problems in young pigs. Thus, piglets were infected with the virus, and bronchoalveolar lavages were collected at various times post-infection to measure the net proteolytic activity. We showed that PRRSV infection leads to a significant increase in the proteolytic activity in pulmonary fluids. Maximal activity was found at 7 and 14 days post-infection, with a return toward normal levels at day 42. Zymographic analyses showed a significant increase in the secretion of MMP-2 and MMP-9, two enzymes involved in tissue remodeling. Histological analyses showed a correlation between the increase in proteolytic activity and appearance of lesions which were characterized by massive lymphomononuclear cell infiltration. These results suggest that viral infection of the lungs can lead to a transient increase in proteolytic activity that could favor opportunistic infection.

Introduction

Immunosuppression related to viral infections of the respiratory tract often predisposed a host to subsequent respiratory tract diseases (Wright, 1997). The molecular mechanisms that lead to immunosuppression by respiratory viruses are not well-defined. In some cases, immunosuppression is believed to be due to the destruction of immune cells resulting from viral replication, such as the case of infections caused by HIV or SIV (Reviewed by Graziosi & Pantaleo, 1998; Mankowski *et al.*, 1998). In AIDS patients, destruction of CD4-positive immune cells is thought to severely compromise the local immune response, thereby favoring the establishment of opportunistic infections, most notably by *Pneumocystis carinii*, and *Mycobacterium tuberculosis* (Reviewed by Weeks, 1998; Gluck *et al.*, 2000; Murray *et al.*, 2000). A similar situation has been described in cattle in the case of the shipping fever syndrome (Reviewed by Shoo, 1989). This syndrome of bronchopneumonia, which often extends to a true fibrinous pleuropneumonia, represents the most economically important health problem in feedlot cattle. It is caused by a group of respiratory viruses, including bovine herpesvirus-1, parainfluenza virus-3, bovine respiratory syncytial virus, and bovine respiratory coronavirus, which contribute to the susceptibility of cattle to opportunistic bacteria such as *Pasteurella haemolytica* or *Pasteurella multocida*. These viruses are thought to interfere with bovine host defense mechanisms by: 1) altering macrophage and neutrophil functions in the lungs and airways; 2) causing severe inflammatory damages to the epithelial surfaces of the alveoli, and 3) modifying the surface properties of respiratory epithelial cells, thereby favoring bacterial adherence and growth (Babiuk *et al.*, 1988; Storz *et al.*, 1996; Wright, 1997).

A number of studies have shown that local production of extracellular proteases play a key role in immune lung disorders (Reviewed by Greenberger, 1997). The increased expression of extracellular proteases can affect the host's immune response against opportunistic infectious agents. In cystic fibrosis, for instance, opsonizing of *Pseudomonas aeruginosa* is ineffective because neutrophil-derived elastase released in the extracellular space cleaves immunoglobulins and digests the C3b receptor on neutrophils, thereby limiting phagocytosis of pathogens (Greenberger, 1997). The cellular immune response can also be altered whenever extracellular proteases cleave molecules involved in cell-mediated immunity, such as CD4, and CD8 (Döring *et al.*, 1995), ICAM-1 (Champagne *et al.*, 1998), and IL-2 (Ariel *et al.*, 1998). The local production of extracellular proteases, most notably matrix metalloproteases (MMPs), can also alter the local tissue architecture directly by degrading the proteins of the extracellular matrix (Shapiro, 1994). High levels of MMP-2 and MMP-9 in the lungs have been shown to promote the infiltration of inflammatory cells and exacerbate the symptoms associated with bronchial asthma (Kumagai *et al.*, 1999). Although both MMP-2 and MMP-9 have been shown to cleave denatured collagen (gelatin) and somewhat less efficiently native collagen type IV and V, they can also degrade elastin (Senior *et al.*, 1991), an important component of the lung architecture. Most of our understanding of the mechanisms responsible for immunologic lung disorders by proteases has, however, come from studies of specific genetic diseases. Whether increased proteolytic activity can be augmented in pulmonary viral infections remains unknown.

The porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) is an emerging viral disease causing late-term reproductive failure and severe pneumonia in unweaned and weaned piglets (Bilodeau *et al.*, 1991; Goyal, 1993). The causative agent, PRRS virus, is

a member of the new *Arteriviridae* family, order *Nidovirales*, which replicates in lung alveolar macrophages, producing an influenza-like illness associated with respiratory distress (Snijder & Meulenberg, 1998; Dea *et al.*, 2000). Respiratory disease in the nursery is indeed a common sign of PRRS virus infection in a herd, with the presence of classical interstitial pneumonia, along with lesions typical of co-infections by common pulmonary agents such as *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Mycoplasma hyorhinis*, *Pasteurella multocida*, and *Streptococcus suis* (Goyal *et al.*, 1993; Kobayashi *et al.*, 1996). The presence of these pathogens in lungs of PRRSV-infected piglets has been taken as an indication that the PRRSV infection can favor the establishment of opportunistic infectious agents (Dee & Joo, 1994; Molitor *et al.*, 1997), although it is yet unclear if indeed PRRS does lead to local immunosuppression (Drew, 2000; Samson *et al.*, 2000). One reason for this ambiguity is that the pathogenic mechanisms of PRRS remain poorly defined. The purpose of the present study was to investigate the possible involvement of extracellular proteases in the pathogenesis in the immune lung disorders associated with PRRS virus infection in pigs.

Methods

Reagents and antibodies. MMP-9 (gelatinase B) and MMP-2 (gelatinase A) were purified from supernatants of activated human monocytic cells (THP-1) by affinity chromatography on gelatin-sepharose, and their proteolytic activity confirmed by fluorescent-activated substrate conversion, as previously described (St-Pierre *et al.*, 1996). Coomassie Brilliant Blue G-250 was obtained from BioRad Laboratories (Mississauga, Ontario, Canada). Gelatin (300 bloom, type A: from porcine skin) was purchased from Sigma (St.Louis, MO). Monoclonal IAF-K8 directed to a well-preserved epitope of the nucleocapsid protein of the North American IAF-Klop strain of PRRS virus was produced and purified from ascitic fluid of pristane-primed mice inoculated with the secretory hybridoma (Dea *et al.*, 1996). RNase H, Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase and *Taq* DNA polymerase, RT-PCR buffers, DNA ladders, and cell culture media and antibiotics were all obtained from Life Technologies (Mississauga, ON, Canada). RNA guard was obtained from Amersham Pharmacia Biotech.

Animals. Fifteen crossbred F1 (Landrace x Yorkshire) castrated specific pathogen-free (SPF) piglets four to five weeks of age were obtained from a breeding farm located in Southern Quebec, Canada. Prior to shipping, the breeding stock and piglets were tested and proven to be seronegative for PRRSV, encephalomyocarditis virus (EMCV), porcine parvovirus (PPV), haemagglutinating encephalomyelitis virus (HEV), transmissible gastroenteritis virus (TGEV) and *Mycoplasma hyopneumoniae*. The piglets used in this study were from two different litters and were randomly divided into one

control group and four experimental groups (three piglets per group) and kept in facilities equipped with a microorganism-free, filtered in-flowing and out-flowing air systems. The animals were fed commercial feed and water *ad libitum*.

Viral infection. The Quebec cytopathogenic strain IAF-Klop of PRRSV (Mardassi *et al.*, 1994b), that has been propagated for 15 to 20 passages in MARC-145 cells, a clone of MA-104 cells highly permissive to PRRSV (Kim *et al.*, 1993), was used in this study. Prior to experimental inoculation of SPF piglets, the tissue culture-adapted PRRSV strain was propagated twice in primary cultures of porcine alveolar macrophages (PAMs) to increase its virulence for pigs. PAMs were obtained by bronchoalveolar lavages (BALs), as previously described (Wensvoort *et al.*, 1991). Virus infectivity titers of 10^7 TCID₅₀/ml were determined for the viral stock used for inoculation of the twelve experimental piglets. These were inoculated intratracheally under sedation with acepromazine/ketamine using a laryngoscope, then monitored daily for clinical symptoms for a 3-week observation period before euthanasia. Their lungs, spleen, kidneys, mesenteric and thoracic lymph nodes were aseptically collected and processed for histopathology, RT-PCR and cultivation attempts of PRRSV in MARC-145 cells. The three control piglets were mock-infected with virus-free culture medium.

Bronchoalveolar lavages (BALs). At days 3, 7, 14, and 42 post-infection, three piglets were euthanized, their lungs collected aseptically and filled with 100 ml of PBS (phosphate buffer saline) supplemented with 1% penicillin-streptomycin, 0,2% gentamycin, 1% anti-pplo (tylosin), and 0,4% amphotorycine (fungizone). The PBS-filled lungs were then massaged and 35-45 ml of lavage fluids were obtained by gently

applying uniform pressure onto the lungs. The BALs were then clarified by centrifugation at 300 x g for 20 minutes to remove the cells. Lung samples were specifically taken in dark red, collapsed zones showing typical signs of infection, some were frozen, others fixed in formalin. Spleen and kidney samples were also harvested for histopathological analysis. Samples from thoracic and mesenteric lymph nodes were also collected and frozen.

Histological examination. Thin sections (5 μ m thick) of formalin-fixed, paraffin-embedded tissues from the lungs, spleen and kidneys of control and experimentally-infected pigs were routinely processed for hematoxylin-eosin (HE) staining, as previously described (Dea *et al.*, 1991).

Measure of net proteolytic activity in BALs of PRRSV-infected pigs. The proteolytic activity of BALs was measured by fluorescence activated substrate conversion (FASC), as previously described (St-Pierre *et al.*, 1996). The enzymatic reactions were performed at 37°C for 18 hours in a final volume of 100 μ l of serum-free RPMI as the reaction medium. Briefly, samples for analysis contained 88 μ l of bronchoalveolar lavages (BALs) at various dilutions and 5 μ l of FITC-labeled substrate-coated microspheres. The volume was completed with serum-free RPMI medium. The reaction was stopped by adding 900 μ l of a 50mM Tris, 150mM NaCl, pH 9,5 solution and the samples were kept on ice until analysis. To titrate the proteolytic activity of the BALs, serial dilutions ranging from 1/5 to 1/625 (v/v) were performed. Affinity purified human MMP-9 was used as a positive control. Flow cytometric analyses were performed on a Coulter XL-

MCL (Coulter Electronics, Hialeah, FL) using standard optics for detection of FITC fluorescence, as previously described (St-Pierre *et al.*, 1996). The ED₅₀ corresponded to the dilution with 50% maximal proteolytic activity.

Detection of MMPs by zymography. Gelatinolytic activity in the serum and BALs of PRRSV-infected piglets was determined by SDS-PAGE gelatin zymography, as previously described (Aoudjit *et al.*, 1997), with minor modifications. Briefly, aliquots of serum (diluted 1:10 in distilled water) or BALs (concentrated 20-fold by lyophilization) were mixed with 5 µl of loading buffer (BioRad, Laemli loading buffer), then analyzed by electrophoresis on a 8% SDS-polyacrylamide gel containing 1mg/ml of denatured collagen. After electrophoresis, the gel was washed to remove SDS and incubated in a renaturing buffer (50mM Tris, 5mM CaCl₂, 1% TritonX-100, 0,02% NaN₃) for 18 hours at 37°C. The gel was then stained with Coomassie Brilliant blue and destained in a 30% (v/v) methanol/10% (v/v) acetic acid solution. The proteolytic activity was identified as a clear band on a blue background. Quantitative analysis was carried out using a computerized densitometric imager (model GS-670, BioRad Laboratories, Mississauga, ON, Canada). Results were expressed as arbitrary scanning units.

Virus isolation. Ten percent homogenates of lungs and spleen were prepared in serum-free DMEM medium, supplemented with 1% penicillin-streptavidin, 0,2% gentamycin, 0,4% fungizone, using a Dremel MultiPro (Model 395 type 5, Dremel, Racine, WI) apparatus. The homogenates were clarified by centrifugation at 3000 x g for 30 minutes, then further diluted to 1/100, 1/1000, and 1/10000 in serum-free DMEM prior

to inoculation onto confluent monolayers of MARC-145 cells in Linbro 24-well tissue culture plates. Following a four day-incubation period at 37°C, the virus was harvested by two freeze-thaw cycles of infected cultures. Aliquots of 200µl of clarified supernatant fluids were used for a subsequent passage on the same cell type and the cultures were then monitored daily for the presence of cytopathic changes (CPE). Viral titers were calculated using the Reed and Muench formula and expressed as TCID₅₀ per gram of tissue. Serological identification of PRRSV was obtained by indirect immunofluorescence (IIF) staining using MAb IAF-K8, as previously described (Mardassi *et al.*, 1994a).

RT-PCR and PCR experiments. Total RNA was extracted from frozen tissue samples with the Tripure reagent (Roche), according to the manufacturer's directions. Total RNA was resuspended in 20 µl of DEPC-treated water and processed for RT-PCR, as previously described (Mardassi *et al.*, 1994b). The oligonucleotide primers VR7.1.1S (5'ATGGCCAGCCAGTCAATCA) and VR7.2.2AS (5'CGGATCAGGCGCACAGTATG), designed to amplify a 303 bp DNA fragment of the ORF7 gene of North American and European strains of PRRSV, were used (Shin *et al.*, 1998). Multiplex PCR for better detection of porcine circovirus type α , *Mycoplasma hyopneumoniae* and *Mycoplasma hyorhinis* were also done, as described elsewhere (Ouardani *et al.*, 1999; Caron *et al.*, 2000).

Results

Viral detection and isolation.

Before addressing the question of proteolytic activity during PRRSV infection, it was crucial to establish the presence of the virus in all organs taken from piglets that were inoculated with the virus and had experienced typical or atypical signs of PRRS. First, analyses by RT-PCR using primers amplifying the N protein gene sequence of the viral genome were carried out. Three mock-infected piglets were used as a negative control. Data showed that all infected piglets were positive for viral RNA at day 3 post-inoculation in all the organs tested (Table 1). The infection persisted throughout the following two weeks. At day 42 post-infection, viral RNA was undetectable in specimens taken from most organs. It could still be detected, however, in the lungs and thoracic lymph nodes. Such pattern of viremia is typical of PRRS infection (Reviewed by Albina, 1997).

To confirm the presence of the PRRSV, two consecutive passages of lung and spleen homogenates from experimentally-infected piglets were performed on MARC-145 cells. Viral titers were expressed as the reciprocal of the highest dilution at which the presence of virus could still be detected by immunofluorescence. At 3 days post-infection, the virus could be detected in lungs and spleen of all infected piglets (Table 2). It persisted with high titers for the following two weeks, and then gradually disappeared. These results correlated with those obtained by RT-PCR.

Table 1. RT-PCR detection of PRRSV genomic RNA in different organs

Organs	Non-Infected Controls	Time Post-Infection (days)			
		3	7	14	42
Lungs	-	+	+	+	+/-
Spleen	-	+	+	+	-
Kidneys	-	+	+	+/-	+/-*
Thoracic Lymph Nodes	-	+	+	+	+/-
Mesenteric Lymph Nodes	-	+	+/-	+	-

Legend : +/-* = viral RNA hardly detectable

Table 2. Viral titers in lungs and spleen

Organs	Non-Infected Controls	Time Post-Infection (Days)			
		3	7	14	42
Lungs	N.D.	$10^{5.2}$	$>10^{5.7}$	$>10^{5.7}$	$10^{4.5}$
Spleen	N.D.	$10^{4.2}$	$>10^{5.7}$	$10^{5.7}$	N.D.

N.D. : Not Detectable

Viral titers were expressed as TCID₅₀ per gram of tissue

Proteolytic activity in bronchoalveolar lavages (BALs).

To determine whether the PRRSV could modulate the repertoire of extracellular proteolytic enzymes in the lungs, serial dilutions of BALs ranging from 1/5 to 1/625 (v/v) were performed, and cleavage of denatured collagen was measured by FASC, a method that allows quantitative measurements of the net proteolytic activity in biological fluids (St-Pierre *et al.*, 1996). An average of the values obtained for the three piglets at each day post-infection was calculated. The proteolytic activity found in the lungs of PRRSV-infected piglets at day 3 post-inoculation was similar to that of the controls (Fig. 1). A marked increase in net proteolytic activity was, however, observed at day 7 and day 14 post-infection. The degradation of gelatin substrate was not significantly inhibited by elastase-specific inhibitors (data not shown). This increase in proteolytic activity was transient as the level of activity progressively diminished and returned to normal at day 42 post-infection. These results show that PRRSV infection significantly increases the proteolytic activity in the lungs.

Measure of collagenolytic activity.

Collagen is found abundantly in the lungs, as it forms the bronchovascular skeleton. It is also found in the alveolar septum and lining basal membranes. To determine if the net increase in proteolytic activity observed could be correlated with an increase of collagenase activity, gelatin-zymography was performed on BALs of PRRSV-infected piglets. Data indicated that indeed, the levels of gelatinases A and B (MMP-2 and MMP-9, respectively) had significantly increased at days 7 and 14 post-infection (Fig. 2i). Densitometric analysis of the zymograms revealed that the collagenolytic activity of days 3 and 42 post-infection were comparable to that found in the mock-infected controls (Fig. 2i). The changes in the MMP levels were restricted to the lungs, as no differences in the MMP levels were detected in serum samples collected during the course of the infection (Fig. 2ii).

FIGURE 1 PROTEOLYTIC ACTIVITY IN THE BRONCHOALVEOLAR FLUIDS OF PRRSV-INFECTED PIGLETS.

Serial dilutions (1/5 to 1/625) (v/v) of the bronchoalveolar lavages (BALs) were incubated in presence of the FITC-conjugated gelatin substrate immobilized on polystyrene microspheres for 18 hours at 37°C. The reaction was stopped and the samples were analyzed with a Coulter XL flow cytometer. The lower and higher background values represent the proteolytic activities of BALs from mock-infected piglets as shown by dotted lines; these were comparable to the proteolytic activities found at day 3 post-infection. Data represent the mean values obtained from three piglets for each indicated post-inoculation day.

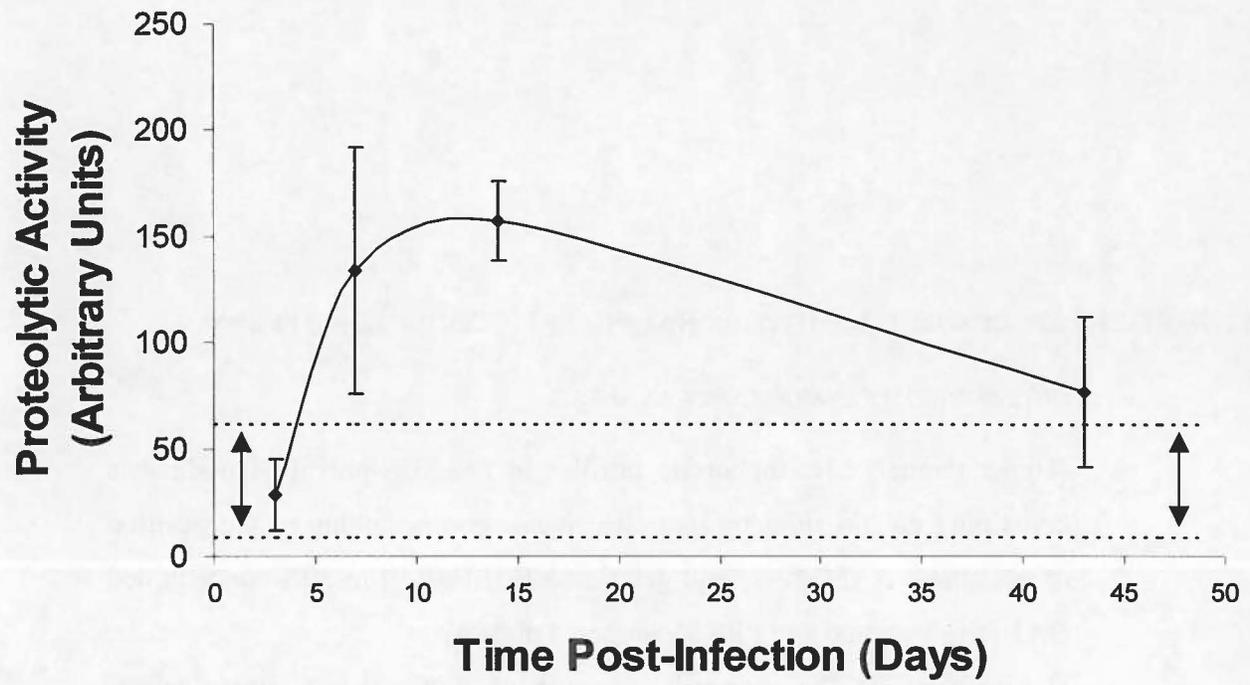


FIGURE 2i GELATINOLYTIC ACTIVITY IN BALs (i) OF PRRSV-INFECTED PIGLETS AS DETERMINED BY ZYMOGRAPHY ANALYSIS.

(Upper pannel) Electrophoretic profiles in 8%-SDS-polyacrylamide gels containing gelatin showing two clear bands corresponding to the position of gelatinase A (MMP-2) and gelatinase B (MMP-9) in 20X-concentrated BALs from normal and PRRSV-infected piglets.

(Lower pannel) Densitometric analysis of SDS-polyacrylamide-gelatin gels indicating the levels of MMP-9 and MMP-2 in BALs. The controls used in this experiment were three mock-infected piglets. The standards used were MMP-9 and MMP-2 purified from activated THP-1 cells.

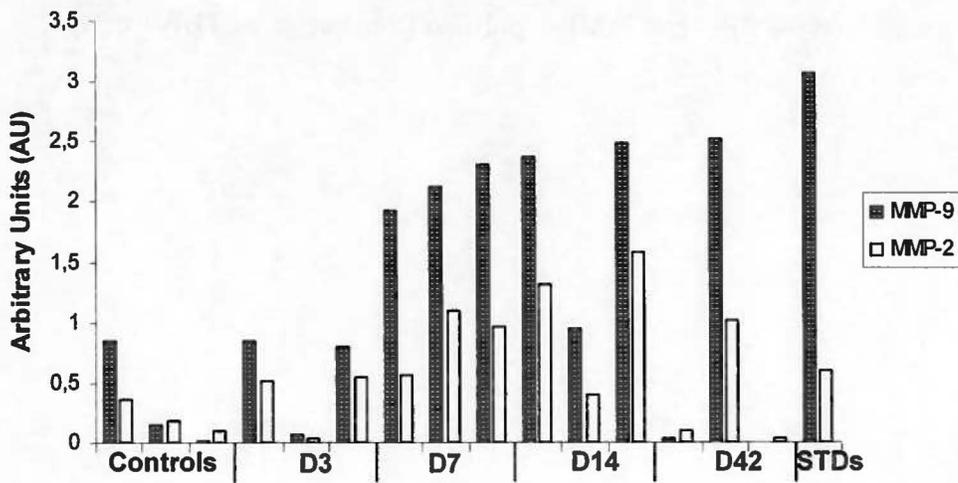
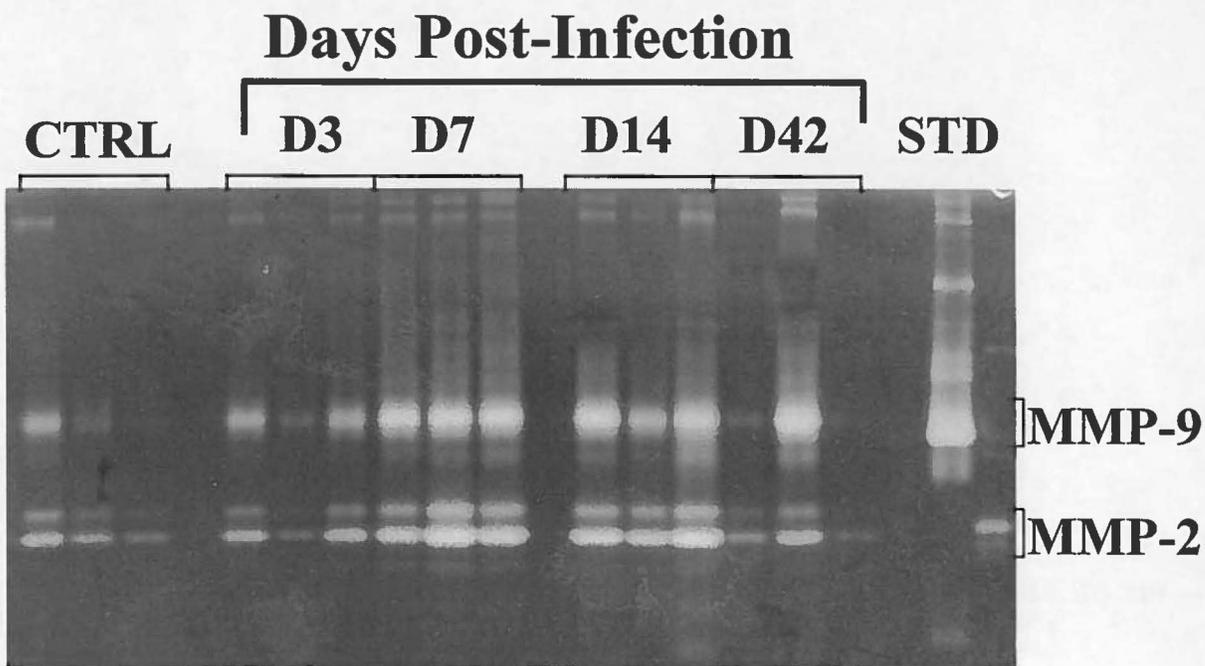
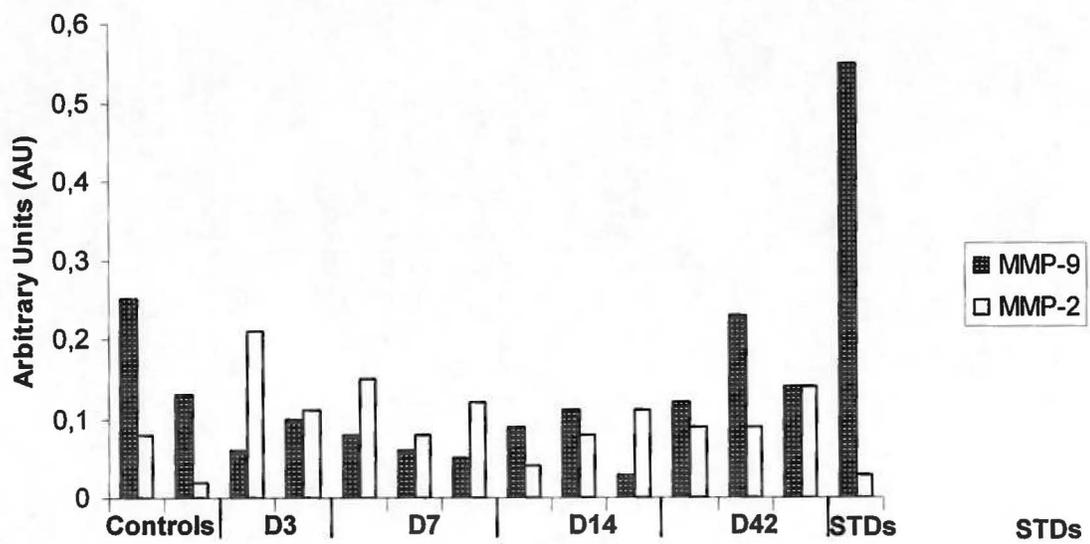
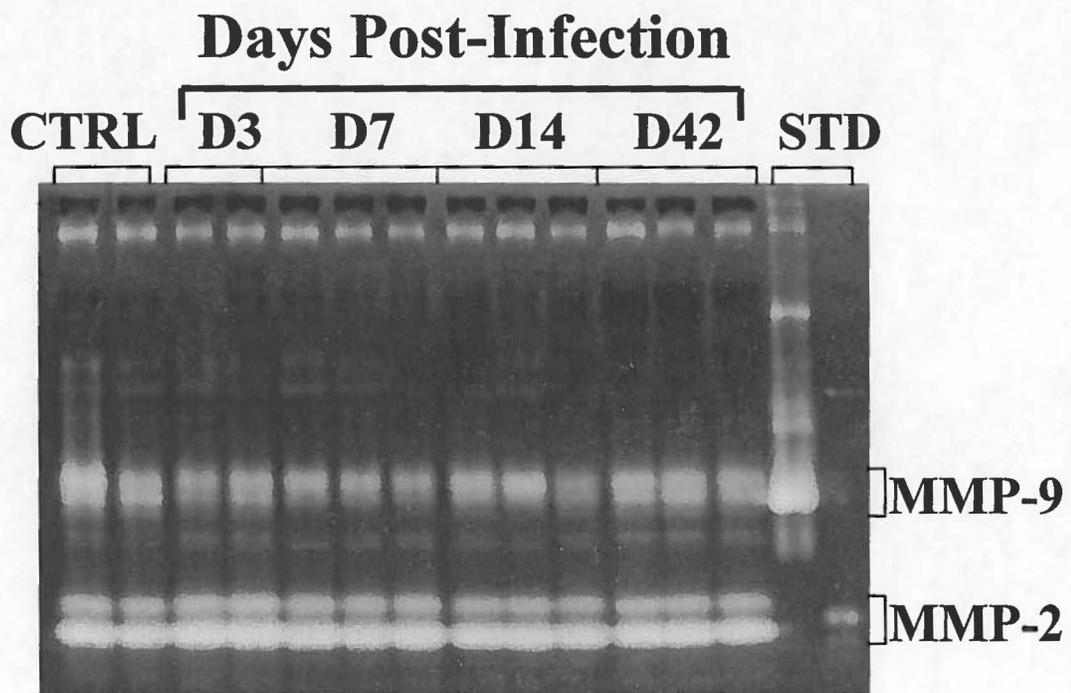


FIGURE 2ii GELATINOLYTIC ACTIVITY IN SERUM OF PRRSV-INFECTED PIGLETS AS DETERMINED BY ZYMOGRAPHY ANALYSIS.

(Upper panel) Electrophoretic profiles in 8%-SDS-polyacrylamide gels containing gelatin showing two clear bands corresponding to the position of gelatinase A (MMP-2) and gelatinase B (MMP-9) in 20X-concentrated BALs from normal and PRRSV-infected piglets.

(Lower panel) Densitometric analysis of SDS-polyacrylamide-gelatin gels indicating the levels of MMP-9 and MMP-2 in BALs. The controls used in this experiment were three mock-infected piglets. The standards used were MMP-9 and MMP-2 purified from activated THP-1 cells.



To correlate the changes in the proteolytic activity with the pathology of the PRRSV-infected lungs, formalin-fixed, paraffin-embedded tissues were stained with hematoxylin-eosin (HE). PRRSV infection led to an infiltrant and proliferative pneumonia characterized by perivascular and peribronchiolar infiltrate, as it has been commonly described (Reviewed by Albina, 1997). Typical examples of the interstitial pneumonia caused by PRRSV infection are shown in Fig. 3 (D, E, F) and 4 (A,B). In more advanced stages, the lungs were filled with lymphoid cells and adopted a glandular aspect (Fig. 4A). At such stages, pyknotic cells and edema fluid could also be seen in the infiltrates (Fig. 4B and Table 3) Light interstitial pneumonia and light hyperplasia of type II pneumocytes was observed at days 3 and 7 post-infection, the pneumonia and hyperplasia being the most severe at day 14 post-infection. A milder interstitial pneumonia was noticed at day 42 post-inoculation although it was still more severe than that found at day 3 post-infection. Other signs of the infection could also be observed at day 7 and 14 post-infection (Table 3). In the kidneys, the glomeruli were more cellular and proteinacious debris were found in the tubules. Focal activation of lymphocytes could also be observed in various areas of the spleen. These results showed a correlation between the increase in the proteolytic activity and the severity of histopathological manifestations of the disease.

FIGURE 3 HISTOLOGICAL SECTIONS OF CONTROL (A TO C) AND PRRSV-INFECTED PIGLETS (D TO F).

A) Spongiform aspect of the lungs of a normal pig showing well-delineated thin alveolar septa with the normal aspect of a small blood vessel.

B) General aspect of a normal bronchiole with cuboidal epithelium and absence of lymphomononuclear infiltration of the *muscularis mucosa* and absence of surrounding interstitial pneumonitis.

C) Normal appearance of a terminal bronchiole (longitudinal view) with absence of surrounding interstitial pneumonitis.

D) Massive perivascular lymphomononuclear infiltration at day 14 post-infection. Alveolar septa are also thickened by lymphomononuclear infiltration.

E) Marked peribronchiolar lymphomononuclear infiltration and hyperplasia of the bronchiolar epithelium (arrows) at day 42 post-infection.

F) Longitudinal view of a 7 day-infected terminal bronchiole showing the peribronchiolar lymphomononuclear infiltration. Focal activation of lymphoid cells (arrows) can be observed. HE staining. Magnifications: 100X (A) and 250X (B to F).

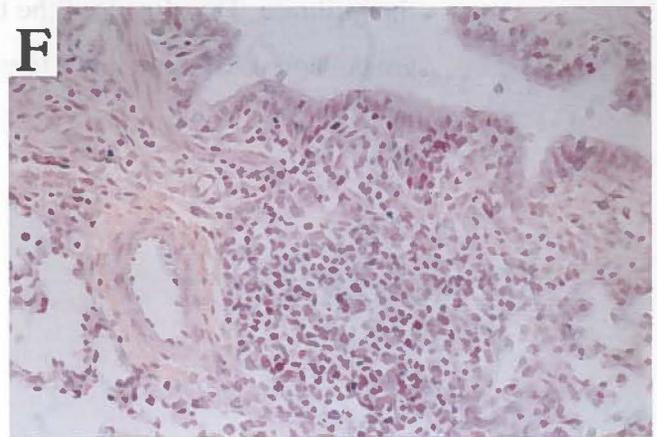
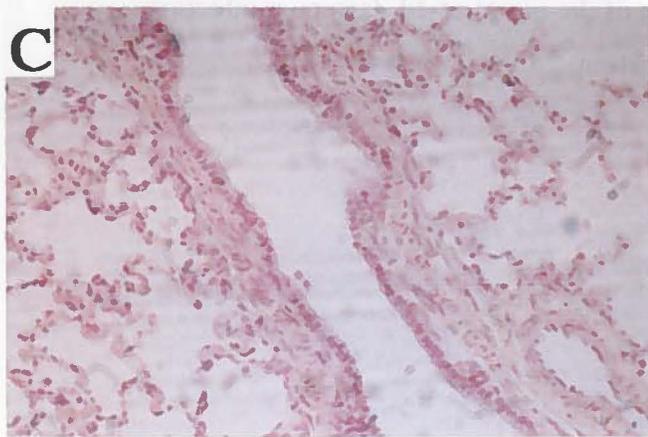
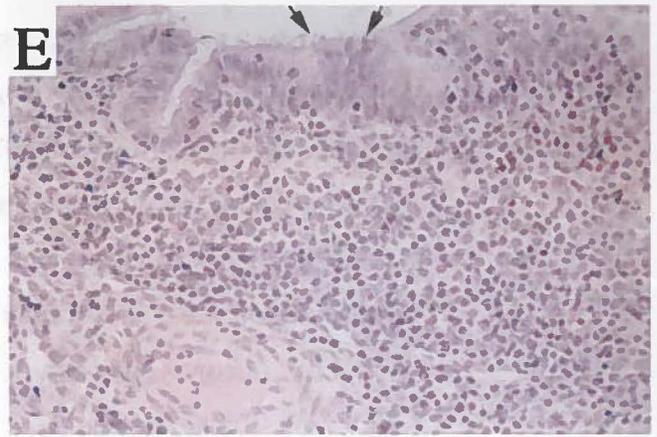
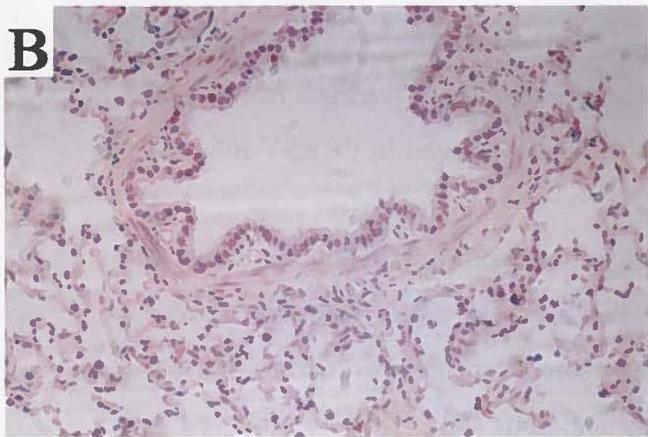
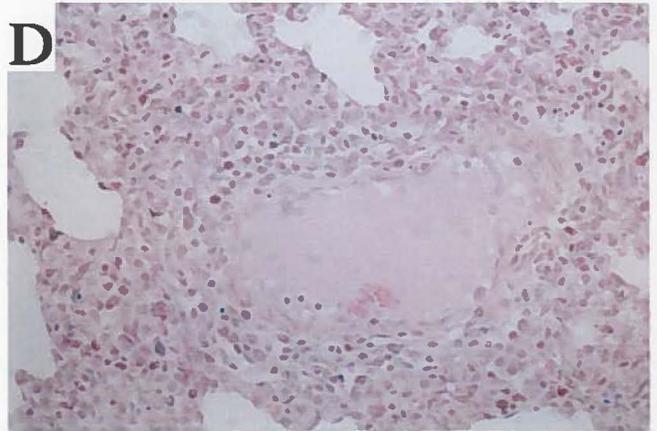
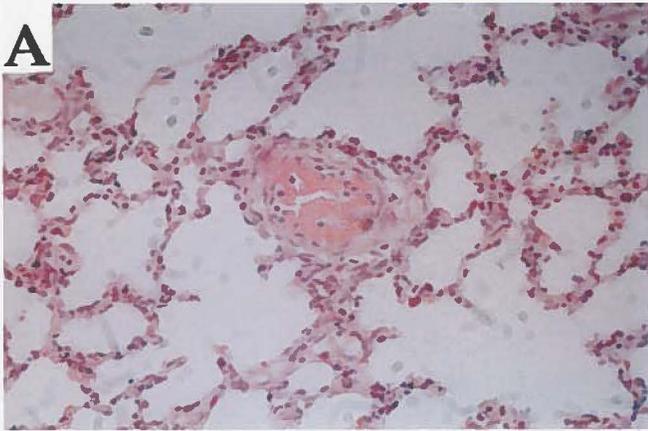


FIGURE 4 PRRSV-INDUCED SEVERE INTERSTITIAL PNEUMONITIS.

A) Proliferation of cells from the macrophage lineage inside the bronchiolar lumen blocking half of the airway as seen in PRRSV-infected piglets at 42 days post-inoculation.

B) Glandular appearance of the lungs resulting from an intense lymphomononuclear infiltration of the alveolar septa. The bronchiolar epithelium (arrows) was barely discernable from the surrounding normal lung tissue. Pyknotic cells (PC) and edematous fluid (EF) are observed in the infiltrate. The alveoli of the lung of the pig after 14 days post-infection are collapsed. HE staining. Magnification: 250X.

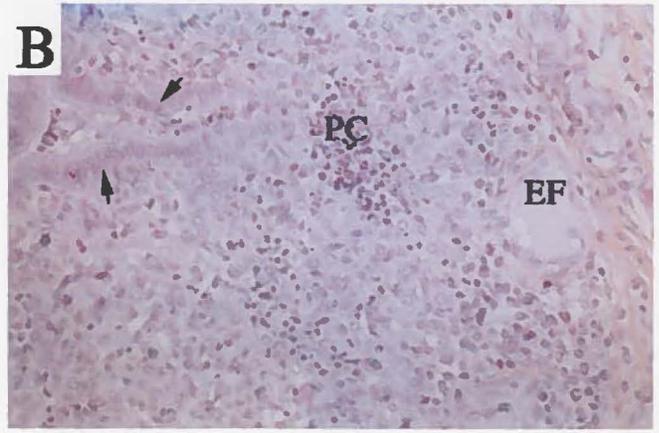
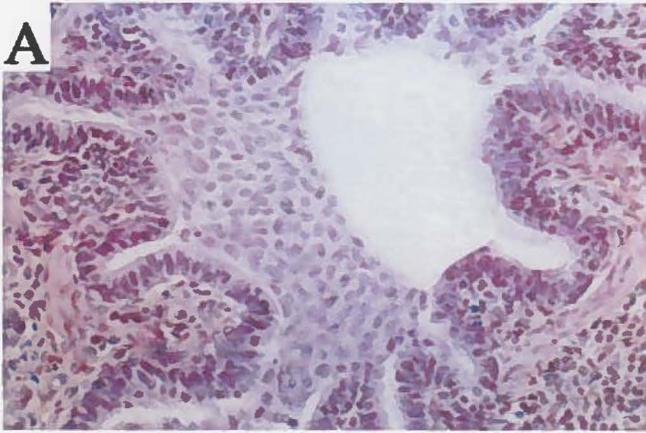


Table 3. Histological findings in infected organs

Microscopic lesions	Time Post-Infection (Days)			
	3	7	14	42
Interstitial pneumonia	+	+/++	+++	++/+++
Pyknotic cells in septae	+/-	+	+/+++	+/+++
Protein-rich exudate (alv. and bronchioles)	-	-/+++	+/-	-/+++
Macrophages and debris (alv. and alv. ducts)	-	-/+++	+/-	+/-
Hyperplasia (pneumocytes type II)	+	+/+++	+	+
Necrotizing bronchiolitis	-	-	-	-
Macrophages and debris (bronchioles)	-	+/-	+/+++	+/+++
Hyperplasia (bronchiolar epithelium)	+	+/+++	+/+++	+
Peribronchiolar infiltration	+	+	++	+/+++
Perivascular infiltration	-	+	++	+
Necrotizing bronchitis	-	-	-	-
Macrophages and debris (large bronchi)	-	+/-	-	+/-
Enlarged glomeruli (kidneys)	-	+/-	+	N.A.
Protein-rich exudate in tubules (kidneys)	-	+/-	+	N.A.
Focal activation of lymphocytes (spleen)	+/-	+/-	+	N.A.

Legend : alv. = alveole, alveolar ; N.A. = Not Available
 - normal appearance, +/- light, + moderate, ++ bad, +++severe
 N.B. control piglets were normal for all criteria

Discussion

In the present study, we demonstrated that : 1) intratracheal injection of PRRSV induces a significant increase of the proteolytic activity of cells in the pulmonary fluids of infected piglets, 2) the increase of the proteolytic activity is transient, being maximal between days 7 and 14 post-infection, with a return toward normal levels at 6 to 7 weeks post-infection, 3) a significant increase in the secretion of both MMP-2 and MMP-9 is observed in the BALs, but not in the serum, of infected piglets, 4) the increase in proteolytic activity is concomitant with the appearance of severe histological lung lesions in the infected piglets.

The data clearly showed that both MMP-2 and MMP-9, but not leukocyte elastase, were upregulated in the lungs of PRRSV-infected piglets. This pattern of proteolytic activity was not unexpected, as elastase-rich BALs are mostly associated with neutrophil infiltration, as observed in emphysema and cystic fibrosis (Greenberger, 1997). In fact, the finding by 7 to 14 days post-infection of increased amounts of extracellular MMP-2 and MMP-9 proteolytic enzymes in BALs, two proteases commonly secreted by cells of the lymphocytic/monocytic lineage, corroborates recent observations by other investigators who reported that the number of lymphocytes and monocytes considerably increased in the lungs of PRRSV-infected piglets from day 2 until day 21 post-infection (Shimizu *et al.*, 1996; Samsom *et al.*, 2000). In addition, Beyer *et al.* (1998) also showed that there is an increase in the alveolar macrophage chemokine AMCFII in the lungs following PRRSV infection, in addition to reporting histological data similar to ours. The increased secretion of both MMPs was only detectable in pulmonary fluids, and could not

be detected in serum samples, indicating that the modulation of the immune response during PRRS is only locally affected.

There has been some indications that PRRSV infection is associated with local immunosuppression that favors opportunistic infections (Dee & Joo, 1994; Molitor *et al.*, 1997; Drew, 2000). One possible reason that could explain this immunosuppression is the fact that the virus can temporarily compromise the immune system of infected pigs through its ability to infect alveolar macrophages (Oleksiewicz & Nielsen, 1999; Zhang *et al.*, 1999; Chiou *et al.*, 2000). Data showing that the viral infection induces a rapid increase in the proteolytic activity of BALs is another mechanism that may compromise for several days the pulmonary immune response of the PRRSV-infected pigs since such proteolytic enzymes can lead to the cleavage of key molecules involved in the development of the immune response (Döring *et al.*, 1995; Champagne *et al.*, 1998). Further experiments will be necessary, however, to determine if indeed such molecules are cleaved upon PRRSV infection, and to identify those that are more susceptible to the proteolytic activities of MMP-2 and MMP-9. The fact that the increased proteolytic activity of BALs could not be associated with an upregulated elastolytic activity suggests, however, that local expression of molecules such as CD4, CD8, and ICAM-1 could be intact during the infection process (Champagne *et al.*, 1998).

However, the exact mechanism(s) by which PRRSV might impair macrophage or lymphocyte functions remains to be elucidated. Interestingly, Zhang *et al.* (1999) have recently demonstrated that four gene transcripts are induced following infection of PAM cells by PRRSV, among which a gene that encodes a ubiquitin specific protease that regulates protein trafficking and degradation.

A number of studies have shown the presence of both PRRSV and mycoplasmas in the lungs of dyspneic piglets (Thacker *et al.*, 1999). Although it can be postulated that the increase in proteolytic activity of BALs induced upon PRRSV infection may favor secondary mycoplasmal infection, further studies are required to determine whether the mycoplasmal infections may also lead to an increased proteolytic activity in the lungs that could potentiate the effects of PRRSV, as recently suggested following vaccination against both agents.

In conclusion, the data obtained in the present study provide preliminary evidences that PRRSV pulmonary infection can modulate the local proteolytic activity, mainly a significant increase in the secretion of both MMP-2 and MMP-9 by cells of the lymphocytic/monocytic lineage previously associated with pulmonary dysfunctions (O'Connor & FitzGerald, 1994; Kumagai *et al.*, 1999). These results contribute to a better understanding of the molecular mechanisms underlying the PRRS disease, particularly the pulmonary dysfunctions and the transient immunodeficiency.

Acknowledgements

The authors wish to thank Hélène Drolet, Nicole Sawyer, Doris Legault, and Marcel Desrosiers for their excellent technical assistance. Particular thanks go to Dr. Edouard F. Potworowski for comments on the manuscript. This report was taken in part from a dissertation to be submitted by M. Girard to the Centre de Recherche en Santé, INRS-Institut Armand-Frappier, in partial fulfillment of the requirements for the M.Sc. degree.

This work was supported by the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (Strategic grant STP02002083) and Biovet Inc., St-Hyacinthe, Quebec, Canada. M. Girard was a recipient of a student grant from the Fondation Armand-Frappier.

References

Albina, E. (1997). Le syndrome dysgénésique et respiratoire porcin : dix ans d'expérience (1986-1996) sur une infection virale insolite. *Veterinary Research* **28**, 305-352.

Aoudjit, F., Estève, P.-O., Desrosiers, M., Potworowski, E.F. & St-Pierre, Y. (1997). Gelatinase B (MMP-9) production and expression by stromal cells in the normal and adult thymus and experimental thymic lymphoma. *International Journal of Cancer* **71**, 71-78.

Ariel, A., Yavin, E.J., HersHKoviz, R., Avron, A., Franitza, S., Hardan, I., Cahalon, L., Fridkin, M. & Lider, O. (1998). IL-2 induces T cell adherence to extracellular matrix: inhibition of adherence and migration by IL-2 peptides generated by leukocyte elastase. *The Journal of Immunology* **161**(5), 2465-2472.

Babiuk, L.A., Lawman, M.J. & Ohmann, H.B. (1988). Viral-bacterial synergistic interaction in respiratory disease. *Advances in Virus Research* **35**, 219-249.

Beyer, J., Fichtner, D., Schirrmeier, H., Granzow, H., Polster, U., Weiland, E., Berndt, A. & Wege, H. (1998). Arterivirus PRRSV. Experimental studies on the pathogenesis of respiratory disease. *Advances in Experimental Medicine and Biology* **440**, 593-599.

Bilodeau, R., Dea, S., Martineau, G.P. & Sauvageau, R. (1991). Porcine reproductive and respiratory syndrome in Québec. *Veterinary Records* **129**, 102-103.

Caron, J., Ouardani, M. & Dea, S. (2000). Diagnosis and differentiation of *Mycoplasma hyopneumoniae* and *Mycoplasma hyorhinis* infections in pigs by PCR amplification of the p36 and p46 genes. *Journal of Clinical Microbiology* **38**(4), 1390-1396.

Champagne, B., Tremblay, P., Cantin, A. & St-Pierre, Y. (1998). Proteolytic cleavage of ICAM-1 by human neutrophil elastase. *The Journal of Immunology* **161**, 6398-6405.

Chiou, M.-T., Jeng, C.-R., Chueh, L.-L., Cheng, C.-H. & Pang, V.F. (2000). Effects of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (isolate tw91) on porcine alveolar macrophages in vitro. *Veterinary Microbiology* **71**, 9-25.

Dea, S., Bilodeau, R., Sauvageau, R., & Martineau, G.P. (1991). Outbreaks in Québec pig farms of respiratory and reproductive problems associated with encephalomyocarditis virus. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* **3**, 275-282.

Dea, S., Cagnon, C.A., Mardassi, H. & Milane, G. (1996). Antigenic variability among North American and European strains of porcine reproductive and respiratory syndrome

virus as defined by monoclonal antibodies to the matrix protein. *Journal of Clinical Microbiology* 34 (6), 1488-1493.

Dea, S., Gagnon, C.A., Mardassi, H., Pirzadeh, B. & Rogan, D. (2000). Current knowledge on structural proteins of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus : comparison of the North American and European isolates. *Archives of Virology* 145, 659-688.

Dee , S.A. & Joo, H.S. (1994). Prevention of the spread of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in endemically infected pig herds by nursery depopulation. *Veterinary Record* 135, 6-9.

Doring, G., Frank, F., Boudier, C., Herbert, S. Fleischer, B. & Bellon, G. (1995). Cleavage of lymphocyte surface antigens CD2, CD4, and CD8 by polymorphonuclear leukocyte elastase and cathepsin G in patients with cystic fibrosis. *The Journal of Immunology* 154, 4842-4850.

Drew, T.W. (2000). A review of evidence for immunosuppression due to porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Veterinary Research* 31 (1), 27-39.

Gluck, T., Geerdes-Fenge, H.F., Straub, R.H., Raffenberg, M., Lang, B. & Lode Scholmerich, J. (2000). Pneumocystis carinii pneumonia as a complication of immunosuppressive therapy. *Infection* 28 (4), 227-230.

Goyal, S.M. (1993). Porcine reproductive and respiratory syndrome; Review article. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 5, 656-664.

Graziosi, C. & Pantaleo, G. (1998). Analysis of virologic and immunologic events in HIV infection. *Pathobiology* 66 (3-4), 123-127.

Greenberger, P.A. (1997). Immunologic aspects of lung diseases and cystic fibrosis. *Journal of the American Medical Association* 278 (22), 1924-1930.

Kim, H.S., Kwang, J., Yoon, I.J., Joo, H.S., & Frey, M.L. (1993). Enhanced replication of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus in a homogeneous subpopulation of MA-104 cell line. *Archives of virology* 133, 477-483.

Kobayashi, H., Morozumi, T., Miyamoto, C., Shimizu, M., Yamada, S., Ohashi, S., Kubo, M., Kimura, K., Mitani, K., Ito, N. & Yamamoto, K. (1996). Mycoplasma hyorhinis infection levels in lungs of piglets with porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS). *Journal of Veterinary Medical Science* 58 (2), 109-113.

Kumagai, K., Ohno, I., Okada, S., Ohkawara, Y., Suzuki, K., Shinya, T., Nagase, H., Iwata, K. & Shirato, K. (1999). Inhibition of matrix metalloproteinases prevents allergen-induced airway inflammation in a murine model of asthma. *The Journal of Immunology* 162 (7), 4212-4219.

Mankowski, J.L., Carter, D.L., Spelman, J.P., Nealen, M.L., Maughan, K.R., Kirstein, L.M., Didier, P.J., Adams, R.J., Murphey-Corb, M. & Zink, M.C. (1998). Pathogenesis of Simian Immunodeficiency Virus pneumonia. *American Journal of Pathology* **153**, 1123-1130.

Mardassi, H., Athanassious, R., Mounir, S., & Dea, S. (1994a). Porcine respiratory and reproductive syndrome virus : morphological, biochemical and serological characteristics of Quebec isolates associated with acute or chronic outbreaks of porcine respiratory and reproductive syndrome. *Canadian Journal of Veterinary Research* **58**, 55-64.

Mardassi, H., Wilson, L., Mounir, S., & Dea, S. (1994b). Detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus and efficient differentiation between Canadian and European strains by reverse transcription and PCR amplification. *Journal of Clinical Microbiology* **32** (9), 2197-2203.

Molitor, T.W., Bautista, E.M. & Choi, C.S. (1997). Immunity to PRRSV : Double-edged sword. *Veterinary Microbiology* **55**, 265-276.

Murray, J., Sonnenberg, P., Shearer, S. & Godfrey-Faussett, P. (2000). Drug-resistant pulmonary tuberculosis in a cohort of southern African goldminers with a high prevalence of HIV infection. *South African Medical Journal* **90** (4), 381-386.

O'Connor, C.M. & FitzGerald, M.X. (1994). Matrix metalloproteases and lung disease. *Thorax* **49** (6), 602-609.

Oleksiewicz, M.B. & Nielsen, J. (1999). Effect of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) on alveolar lung macrophage survival and function. *Veterinary Microbiology* **66**, 15-27.

Ouardani, M., Wilson, L., Jetté, R., Montpetit, C. & Dea, S. (1999). Multiplex PCR for detection and typing of porcine circoviruses. *Journal of Clinical Microbiology* **37**(12), 3917-3924.

Sansom, J.N., de Bruin, T.G.M., Voermans, J.J.M., Meulenberg, J.J.M., Pol, J.M.A. & Bianchi, A.T.J. (2000). Changes of leukocyte phenotype and function in the broncho-alveolar lavage fluid of pigs infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus : a role for CD8⁺ cells. *Journal of General Virology* **81**, 497-505.

Senior, R.M., Griffin, G.L., Fliszar, C.J., Shapiro, S.D., Goldberg, G.I. & Welgus, H.G. (1991). Human 92- and 72-kilodalton type IV collagenases are elastases. *Journal of Biological Chemistry* **266** (12), 7870-7875.

Shapiro, S.D. (1994). Elastolytic metalloproteinases produced by human mononuclear phagocytes. Potential roles in destructive lung disease. *American Journal of Respiratory Critical Care and Medicine* **150** (6 Pt 2), S160-164.

Shimizu, M., Yamada, S., Kawashima, K., Ohashi, S., Shimizu, S. & Ogawa, T. (1996). Changes of lymphocyte subpopulations in pigs infected with porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 50, 19-27.

Shin, J., Bautista, E.M., Kang, Y.-B. & Molitor, T.W. (1998). Quantitation of porcine reproductive and respiratory syndrome virus RNA in semen by single-tube reverse transcription-nested polymerase chain reaction. *Journal of Virological Methods* 72, 67-79.

Shoo, M.K. (1989). Experimental bovine pneumonic pasteurellosis: a review. *Veterinary Records* 124 (6), 141-144.

Snijder, E.J. & Meulenberg, J.J.M. (1998). The molecular biology of arteriviruses. *Journal of General Virology* 79, 961-979.

Storz, J., Stine, L., Liem, A. & Anderson, G.A. (1996). Coronavirus isolation from nasal swap samples in cattle with signs of respiratory tract disease after shipping. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 208, 1452-1454.

St-Pierre, Y., Desrosiers, M., Tremblay, P., Estève, P.-O. & Opdenakker, G. (1996). Flow cytometric analysis of Gelatinase B (MMP-9) activity using immobilized fluorescent substrate on microspheres. *Cytometry* 25, 374-380.

Thacker, E.L., Halbur, P.G., Ross, R.F., Thanawongnuwech, R. & Thacker, B.J. (1999). *Mycoplasma hyopneumoniae* potentiation of porcine reproductive and respiratory syndrome virus-induced pneumonia. *Journal of Clinical Microbiology* 37 (3), 620-627.

Weeks, B.S. (1998). The role of HIV-1 activated leukocyte adhesion mechanisms and matrix metalloproteinase secretion in AIDS pathogenesis (Review). *International Journal of Molecular Medicine* 1 (2), 361-366.

Wensvoort, G., Terpstra, C., Pol, J.M.A., ter Laak, E.A., Bloemraad, M., de Kluyver, E.P., Kragten, C., van Buiten, L., den Besten, A., Wagenaar, F., Boekhuijsen, J.M., Moonen, P.L.J.M., Zetstra, T., de Boer, E.A., Tibben, H.J., de Jong, M.F., van't Veld, P., Groenland, G.J.R., van Gennep, J.A., Voets, M. Th., Verheijden, J.H.M. & Braamskamp, J. (1991). Mystery swine disease in The Netherlands : isolation of Lelystad virus. *Veterinary Quarterly* 13, 121-130.

Wright, P.E. (1997). Respiratory diseases. In *Viral Pathogenesis*, pp. 703-743. Edited by N. Nathanson, R. Ahmed, F. Gonzalez-Srarano, D.E. Griffin, K.V. Holmes, F.A. Murphy, H.L. Robinson. Philadelphia : Lippincott-Raven publishers.

Zhang, X., Shin, J., Molitor, T.W., Schook, B. & Rutherford, M.S. (1999). Molecular responses of macrophages to porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection. *Virology* 262, 152-162.

DISCUSSION/CONCLUSION GÉNÉRALE

Au départ, nous avons établi comme hypothèse que l'infection produite par le VSRRP pourrait impliquer des protéases extracellulaires, à cause notamment de la présence: 1) de lésions caractérisées par une infiltration massive de cellules lymphocytaires et monocytaires (Shimizu *et al.*, 1996; Samsom *et al.*, 2000) et 2) d'infections secondaires opportunistes (Dee & Joo, 1994; Zeman, 1996; Molitor *et al.*, 1997; Thacker *et al.*, 1999).

Dans des cas bien connus de maladies dégénératives où l'implication des protéases extracellulaires a été démontrée, on retrouve également de fortes infiltrations leucocytaires. Par exemple, l'asthme est caractérisée par une infiltration massive des parois et de la lumière des voies respiratoires par des éosinophiles, des lymphocytes, des mastocytes et des basophiles (Kay, 1991; Busse, 1993). Ces cellules sont responsables du relargage de différents médiateurs chimiques de la réponse inflammatoire tels que l'histamine, les protéines contenues dans les granules des éosinophiles, ainsi que des leucotriènes (Bousquet *et al.*, 1990). À l'aide d'un modèle murin, l'équipe de Kumagai (1999), a également observé que des MMPs étaient sécrétées dans les BALs au tout début de l'induction de l'asthme. Ils ont démontré que ces MMPs facilitaient l'infiltration des tissus pulmonaires par les lymphocytes et les éosinophiles. Ces résultats permettent bien d'illustrer le lien étroit qui peut exister entre le relargage des protéases extracellulaires dans les poumons et l'infiltration de ces tissus par des leucocytes.

Chez les patients atteints de fibrose kystique, ce sont surtout les neutrophiles qui infiltreront les poumons (Greenberger, 1997). Ces neutrophiles relarguent, dans les poumons, de très grandes quantités d'élastase des leucocytes, enzyme qui, comme nous l'avons vu précédemment, est responsable de la dégradation de la matrice pulmonaire (Amitani *et al.*, 1991), ainsi que du clivage de nombreuses molécules immunomodulatrices. Dans cette maladie, l'élastase est également impliquée dans une boucle sans fin d'infection et d'inflammation, de par la capacité que possède cette enzyme à nuire à l'opsonisation des bactéries en clivant C3bi et CR1 (Tosi *et al.*, 1990). En effet, l'infection chronique des poumons par *Pseudomonas aeruginosa* est la cause majeure de la mortalité chez les patients atteints de fibrose kystique (Schreiber & Goldmann, 1986;

Greenberger, 1997). De telles infections secondaires opportunistes et infiltrations leucocytaires témoignent d'une immunosuppression locale possiblement induite par l'action des protéases extracellulaires.

L'ensemble de ces observations nous a amené vers l'hypothèse selon laquelle l'infection par le VSRRP induirait une variation de la sécrétion pulmonaire de protéases extracellulaires. Afin de valider notre modèle expérimental, nous avons déterminé, dans un premier temps, les paramètres expérimentaux de l'infection virale de façon à ce que celle-ci reproduise les symptômes observés dans les fermes de production porcine. Nous voulions ainsi nous assurer d'étudier la modulation des protéases dans le contexte d'une infection par le VSRRP typique (Pol *et al.*, 1991; Beyer *et al.*, 1997). Pour nous assurer de la productivité de l'infection, nous avons procédé à des tests par RT-PCR et des essais d'isolement en culture cellulaire afin de démontrer la présence du virus dans les différents tissus au début de l'infection, ainsi que pour suivre l'évolution de la virémie au cours de l'infection dans ces mêmes tissus. On a ainsi pu démontrer que les porcelets inoculés avec la préparation virale étaient positifs pour le VSRRP, que l'infection était systémique du jour 3 p.i. au jour 14 p.i.(inclusivement), et qu'elle se résorbait au jour 42 p.i.; l'infection se limitant alors aux poumons. Les titres viraux maximaux ont été enregistrés aux jours 7 et 14 p.i., et ce autant au niveau des poumons que de la rate.

Les travaux antérieurs de l'équipe de Serge Dea (résultats non-publiés et observations personnelles) ont démontré qu'étant donné que les infections en laboratoire sur des porcs SPF tendent à ne pas reproduire les signes classiques du SRRP, il semble que la quantité de virus, la méthode et le site d'inoculation soient déterminants pour la reproductibilité de l'infection expérimentale. Nous avons donc choisi d'inoculer les porcelets avec 10^7 TCID₅₀/ml de virus par voie intra-trachéale à l'aide d'un laryngoscope. La préparation virale, quant à elle, avait préalablement subi deux passages consécutifs sur cellules PAM, afin d'augmenter la virulence de cette souche adaptée à la culture tissulaire. Cette technique fut inspirée d'une étude qui a démontré l'importance de la virulence des souches virales utilisées lors d'infections expérimentales en terme de sévérité des

symptômes et des lésions observées (Rossow *et al.*, 1995). Ce faisant, nous avons pu établir une bonne virulence face aux cellules cibles pulmonaires.

La deuxième étape de cette étude visait à vérifier notre hypothèse selon laquelle il y aurait une modulation significative de l'activité protéolytique dans les BALs des porcs infectés par le VSRRP. Cette hypothèse est renforcée par le fait que le VSRRP a un tropisme reconnu pour les PAMs (Pol & Wagenaar, 1992) ainsi que pour d'autres types de cellules de la lignée monocyttaire (Voicu, 1994). Les macrophages alvéolaires sont responsables de la présentation des antigènes viraux dont dépend la réponse immune antivirale. Ces cellules sont également capable de sécréter diverses cytokines ainsi que des protéases extracellulaires (Goldstein, 1983; Green, 1997; Gibbs *et al.*, 1999a). Étant donné que les PAMs sont au cœur même de l'infection par le VSRRP, et qu'ils sont capables de sécréter plusieurs types de protéases extracellulaires ou de cytokines pouvant inciter d'autres types de protéases extracellulaires à sécréter de telles enzymes, il était logique de postuler qu'une infection par le VSRRP puisse induire une augmentation de l'activité protéolytique intra-pulmonaire.

Bien que nos travaux aient démontré que le niveau d'activité protéolytique augmentait significativement lors de l'infection par le VSRRP, nous n'avons pu attribuer cette augmentation à un type de protéase spécifique. Nous aurions voulu étudier la production de protéases extracellulaires par les cellules PAM, mais étant donné l'effet apoptotique du VSRRP sur les PAMs (Suarez *et al.*, 1996), ainsi que la mortalité rapide des PAMs en culture suite à l'infection par le VSRRP (Oliksiewicz & Nielsen, 1999), nous n'avons pu tirer de résultats concluants pour notre hypothèse. De plus, la présence constitutive de MMPs dans le sérum foetal de veau aurait nécessité que nous cultivions les PAMs sans sérum pour étudier la production des MMPs par zymographie, ce qui aurait sans doute été une tâche ardue, étant donné que les PAMs sont des cultures primaires. Pour compliquer encore plus les choses, nous devons également être conscients du fait que des études ont démontré que différentes populations de macrophages existent dans les poumons, et que la susceptibilité face à l'infection par le SRRP varie d'une population à l'autre (Shibata *et al.*, 1997, Done *et al.*, 1996). Des études par marquage *in situ* avec des

sondes moléculaires spécifiques aux différents ARNm codant pour les protéases extracellulaires pourraient représenter une alternative valable lors d'études ultérieures.

En ce qui a trait à l'étude des cellules possiblement responsables de cette augmentation d'activité protéolytique, nous devons également considérer le fait que l'effet du SRRP puisse être indirect. Il est certain que l'infection par le VSRRP induit la production de cytokines et autres molécules immunomodulatrices. Toutefois, nous ne savons pas si cette production est due à l'activation par les cellules du système immunitaire ou au relargage de ces cytokines suite à la lyse des cellules infectées (macrophages alvéolaires et/ou pneumocytes), ce qui favoriserait ensuite une surproduction de protéases extracellulaires par les cellules infiltrantes attirées au site d'infection par ces chimiokines. Cette dernière alternative est fort probable si l'on considère le fait que l'augmentation de l'activité protéolytique nette et de la sécrétion des MMP-2 et -9 que nous avons observé coïncidait avec l'apparition des lésions d'infiltration monolymphocytaire dans les poumons. De plus, les résultats d'une étude sur les cytokines et les immunomodulateurs produits lors de l'infection par le VSRRP (Beyer *et al.*, 1998) sont cohérents avec cette hypothèse. Dans leur étude, et comme dans la nôtre, les lésions de pneumonie infiltrante apparaissaient au jour 7 p.i., alors que les poumons et les autres organes (rate et ganglions) étaient fortement positifs pour l'ARN viral depuis le jour 4 p.i. Beyer et ses collègues ont démontré que l'expression de la cytokine pro-inflammatoire IL-6 était augmentée de manière significative dès le jour 4 p.i., comparée aux témoins, autant dans les poumons que dans les autres organes observés. L'expression de la chimiokine AMCF II, un facteur chimiotactique pour les macrophages alvéolaires, était augmentée significativement à partir du jour 7 p.i. Ces résultats semblent concorder avec nos observations histologiques où la réponse inflammatoire proprement dite semblerait plutôt débiter vers le jour 7 p.i.. En effet, ils ont noté le début de l'augmentation de l'expression de l'AMCF II au jour 7 p.i., alors que nous avons observé une prolifération de macrophages alvéolaires dans les lumières des bronchioles aux jours 14 et 42 p.i.

Nos résultats sur la variation de l'activité protéolytique lors de l'infection par le VSRRP soulèvent une question intéressante: est-il possible de retrouver une telle modulation de la sécrétion de protéases extracellulaires lors d'un autre type d'infection

virale ? Il semble que ce soit possible dans le cas d'un autre virus à tropisme monocytaire, soit dans le cas de l'infection pulmonaire associée à l'infection par le HIV et le SIV. En effet, des études *in vitro* ont démontré que le HIV-1 pouvait augmenter la sécrétion de MMP-9 par les lymphocytes du sang périphérique (Weeks *et al.*, 1993b) et les monocytes (Chapel *et al.*, 1994). Il semble que la protéine gp120 pourrait induire cette sécrétion par sa liaison aux co-récepteurs du HIV (Missé *et al.*, soumis). Dans le cas des monocytes, la protéine Tat a pu être liée à l'augmentation de la sécrétion de MMP-9 *in vitro* (Lafrenie *et al.*, 1996). Bien que les études *in vivo* ainsi que celles sur des cellules provenant de poumons n'aient pas été effectuées, les similitudes entre les lésions pulmonaires de l'infection par le SVRRP et celle du SIV et du HIV (Mankowski *et al.*, 1988; Graziosi & Pantaleo, 1998) nous indiquent qu'il pourrait y avoir une augmentation de protéases extracellulaires lors de l'infection causée par ces virus *in vivo*.

Pour la troisième partie de notre étude, nous avons comme objectif de tenter de caractériser le répertoire d'activité protéolytique pulmonaire tel qu'il est lors de l'infection par le VSRRP. L'élastase des leucocytes, associée à plusieurs maladies pulmonaires inflammatoires, était une cible logique comme point de départ à ces analyses. On la retrouve sécrétée en grande quantité dans les poumons des patients atteints de fibrose kystique, notamment (Goldstein & Doring, 1986). Afin de vérifier sa présence dans nos échantillons, nous avons utilisé un inhibiteur peptidique spécifique pour l'élastase des leucocytes, le MSAAPVCK (voir ANNEXE A). Nous n'avons pas pu mettre en évidence une production accrue de cette protéase dans les BALs, ce qui concorde avec notre observation selon laquelle peu de neutrophiles sont présents dans les infiltrats de poumons infectés par le VSRRP.

Après l'élastase des leucocytes, les gélatinases sont les protéases les plus souvent étudiées dans les pathologies où l'on retrouve une infiltration leucocytaire reliée à une réponse inflammatoire. On les retrouve sécrétées en grande quantité chez les patients atteints d'asthme (Lemjabbar *et al.*, 1999) et d'emphysème pulmonaire (Finlay *et al.*, 1997; Ohnishi *et al.*, 1998). Nous nous sommes donc concentrés sur l'étude des MMPs à l'aide de la technique de zymographie. Nous avons ainsi démontré que la sécrétion de

MMP-2 et MMP-9 était augmentée de manière significative dans les poumons lors de l'infection par le VSRRP.

Voulant savoir si d'autres types de protéases étaient présentes, nous avons tenté d'analyser les BALs plus en profondeur. En utilisant la technique FASC, nous avons incorporé des inhibiteurs spécifiques à chacune des grandes familles de protéases extracellulaires dans nos réactions (voir ANNEXE A). Ainsi, nous avons utilisé l'aprotinin, l' α_1 -PI, la chymostatin et le leupeptin pour les protéases à sérine, l'E-64 pour les protéases à cystéine, la pepstatin-A pour les protéases aspartiques, et finalement, l'EDTA pour les MMPs. L'ensemble des résultats obtenus avec cette technique ne nous ont pas permis d'identifier une classe de protéases majoritairement exprimée dans cette infection, même lorsque nous utilisions jusqu'à trois inhibiteurs différents en même temps. Ces résultats nous ont permis de conclure que nous étions en présence d'un répertoire visiblement vaste et varié de protéases extracellulaires. L'identification des protéases sécrétées, autres que MMP-2 et MMP-9 nécessitera l'utilisation de méthodes biochimiques préparatives et analytiques faisant appel à des colonnes d'affinité afin de séparer les différentes familles d'enzymes présentes et les caractériser ensuite à l'aide de tests biochimiques et d'inhibiteurs spécifiques.

Nous avons vu que les lymphocytes et les monocytes sont capables de produire des MMPs et d'autres protéases. Différentes équipes de chercheurs ont établi des liens circonstanciels entre la présence d'infiltrats leucocytaires et la surproduction de protéases, notamment dans le cas de l'infection par *Mycobacterium avium-intracellulare*, de l'emphysème pulmonaire, de la fibrose kystique et de l'asthme (voir revue de littérature). Le groupe de Samsom (2000) a démontré que les infiltrats de poumons infectés par le VSRRP étaient composés de cellules NK, de cellules T CD8⁺ ainsi que de monocytes. Ainsi, pour la quatrième et dernière partie de cette étude, nous avons évalué la possibilité d'un lien entre l'apparition des lésions de pneumonie interstitielle et l'augmentation de la sécrétion des protéases extracellulaires. Nous avons démontré lors de nos expériences que l'apparition des lésions où l'on retrouvait une forte infiltration par les cellules

lymphocytaires et monocytaires (jour 7 p.i.) coïncidait avec le début de la surproduction de protéases (jours 7 à 14).

En analysant nos résultats et en les comparant aux autres données de la littérature, nous en sommes venus à développer un modèle hypothétique qui tente d'expliquer l'incrimination ou le rôle de ces protéases extracellulaires dans la cinétique de l'infection respiratoire produite par le VSRRP. Tout d'abord, le virus entre dans les poumons et semble aller se loger dans les alvéoles pulmonaires et y cibler les macrophages alvéolaires et les pneumocytes de type II (Pol *et al.*, 1991; Halbur *et al.*, 1994; Beyer *et al.*, 1998). On sait de par notre étude et celles qui l'ont précédé (Pol *et al.*, 1991; Collins *et al.*, 1992; Beyer *et al.*, 1998), que l'infection devient très rapidement systémique (jour 3 p.i.). Nous supposons que le VSRRP pourrait induire une sécrétion de facteurs augmentant la perméabilité des membranes, ce qui favoriserait son passage dans le système sanguin. Sa propagation jusqu'aux organes filtrants (rate, ganglions et reins) serait alors assurée par les monocytes infectés (Voicu, 1994). La réplication virale dans les poumons se poursuivant activement, nous supposons que le VSRRP continuerait à induire la sécrétion de molécules immunomodulatrices dont des cytokines pro-inflammatoires et des chimiokines ce qui augmenterait encore plus la perméabilité des membranes et permettrait aux lymphocytes puis aux monocytes d'infiltrer massivement les zones infectées par le VSRRP. Il a été démontré que l'infiltration semble débiter par les cellules NK vers les jours 3 à 7 p.i., puis les cellules T CD8⁺ cytotoxiques et les monocytes augmentent aux jours 7 à 21 p.i., et finalement suivent les macrophages à partir du jour 14 au jour 21 p.i (Samsom *et al.*, 2000).

Ainsi, l'augmentation de l'activité protéolytique coïncide avec l'infiltration lymphocytaire et monocyttaire, c'est-à-dire du jour 7 au jour 14 p.i. Considérant ces observations circonstanciées, il est néanmoins plausible qu'une bonne partie de cette activité protéolytique soit produite par les cellules infiltrantes. Nous savons que les protéases produites ont pour principale fonction de remodeler la structure pulmonaire (voir revue de littérature) afin de: 1) favoriser l'infiltration d'autres cellules d'origine immunitaire et 2) de circonscrire physiquement l'infection. Par contre, cette

surproduction de protéases peut potentiellement causer un déséquilibre immunitaire favorisant la prolifération des agents pathogènes opportunistes souvent présents dans les fermes de production porcine. L'évidence principale établissant un lien entre le VSRRP et les infections secondaires n'est que circonstancielle. Elle provient de l'observation de Dee & Joo (1994) qui ont montré que l'élimination du VSRRP dans les fermes porcines provoquait en même temps une baisse dans les infections bactériennes pulmonaires en général. Les agents bactériens *Pasteurella multocida*, *Haemophilus parasuis* et *Streptococcus suis* et *Salmonella spp.* sont le plus souvent associés à ces infections opportunistes chez les porcs atteints du SRRP (Done & Paton, 1995; Zeman, 1996). Solano et ses collègues (1998) ont de plus démontré que les PAMs provenant de porcs infectés et collectés au jour 7 p.i. ont une efficacité d'opsonisation réduite. Ainsi, l'apport aux poumons de monocytes ayant des capacités effectrices réduites et pouvant agir comme cellules cibles pour le virus favoriserait l'infection virale et l'établissement des agents infectieux opportunistes.

Les résultats que nous avons obtenus lors de cette étude ouvrent de nouvelles perspectives quant à la caractérisation de la réponse immunologique contre le VSRRP. Ces résultats permettront à notre équipe de disposer de nouveaux paramètres d'évaluation de la protection locale induite par d'éventuels nouveaux vaccins. Présentement, seuls les titres d'anticorps sécrétés (réponse humorale) sont utilisés pour évaluer la protection vaccinale, ce qui ne donne aucune indication quant à la réponse immune cellulaire et mucoale. L'évaluation de la fluctuation de la sécrétion des protéases extracellulaires dans ce contexte particulier pourrait nous permettre d'évaluer le potentiel protecteur d'un vaccin.

Nombre de questions entourant la surproduction des protéases extracellulaires dans les BALs restent à élucider. Il sera notamment important de déterminer quels sont les effets spécifiques des protéases extracellulaires contenues dans les BALs sur l'attachement viral et les récepteurs viraux, ainsi que leur impact sur l'immunité mucoale, humorale et cellulaire, présente dans les poumons lors de l'infection virale.

REMERCIEMENTS

J'aimerais profiter de cette occasion pour remercier mes parents, mes frères, ainsi que Louis de Léséleuc et sa famille pour leur soutien moral exceptionnel.

J'aimerais remercier tout spécialement Pierre Tremblay et Patrick Cléroux pour leur aide et leur contribution à ce projet.

J'aimerais aussi remercier tous les gens qui m'ont aidé à réaliser mon projet de maîtrise que j'ai côtoyés quotidiennement et sans qui tout cela n'aurait été possible. Tout d'abord, mes directeur et codirecteur Yves St-Pierre et Serge Dea (également co-auteurs de l'article), pour leur soutien, leurs conseils et leur remarquable sens du jugement. Ensuite, les techniciennes de laboratoire Doris Legault, Claire Beauchemin, Nicole Sawyer, Louise Wilson, et Hélène Drolet, qui ont été d'un support moral et d'une aide technique extrêmement précieuse. Et finalement, les étudiants des laboratoires des Drs. Yves St-Pierre et Serge Dea, pour leur amitiés et leurs conseils pratiques.

À tous, mille fois merci !

BIBLIOGRAPHIE

AIMES, R.T. , J.P. Quigley. 1995. «Matrix metalloproteinase-2 is an interstitial collagenase. Inhibitor-free enzyme catalyzes the cleavage of collagen fibrils and soluble native type I collagen generating the specific 3/4- and 1/4-length fragments.» J Biol Chem, vol. 270, no.11, p. 5872-5876.

ALBINA, E. 1997. «[Porcine reproductive and respiratory syndrome: ten years of experience (1986-1996) with this undesirable viral infection]». Vet Res, vol. 28, no. 4, p. 305-352.

ALLENDE, R., T. L. Lewis, Z. Lu, D. L. Rock, G. F. Kutish, A. Ali, A. R. Doster et F. A. Osorio. 1999. «North American and European porcine reproductive and respiratory syndrome viruses differ in non-structural protein coding regions». J Gen Virol, vol. 80, no. Pt 2, p. 307-315.

AMITANI, R., R. Wilson, A. Rutman, R. Read, C. Ward, D. Burnett, R. A. Stockley et P. J. Cole. 1991. «Effects of human neutrophil elastase and *Pseudomonas aeruginosa* proteinases on human respiratory epithelium». Am J Respir Cell Mol Biol, vol. 4, no. 1, p. 26-32.

ANDERSSSEN, T., H. Halvorsen, S. P. Bajaj et B. Osterud. 1993. «Human leukocyte elastase and cathepsin G inactivate factor VII by limited proteolysis». Thromb Haemost, vol. 70, no. 3, p. 414-417.

AOKI, T., T. Takasaki, T. Furukawa, J. Morikawa, T. Yano et H. Watabe. 1995. «Conversion of cathepsin E to enzymatic unstable form in gastric cancer cells». Biol Pharm Bull, vol. 18, no. 11, p. 1522-1525.

AOUDJIT, F., P. O. Esteve, M. Desrosiers, E. F. Potworowski et Y. St-Pierre. 1997. «Gelatinase B (MMP-9) production and expression by stromal cells in the normal and adult thymus and experimental thymic lymphoma». Int J Cancer, vol. 71, no. 1, p. 71-78.

APTE, S. S., B. R. Olsen et G. Murphy. 1995. «The gene structure of tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP)-3 and its inhibitory activities define the distinct TIMP gene family [published erratum appears in J Biol Chem 1996 Feb 2;271(5):2874]». J Biol Chem, vol. 270, no. 24, p. 14313-14318.

ARBUSTINI, E., P. Morbini, M. Diegoli, M. Grasso, R. Fasani, P. Vitulo, R. Fiocca, P. Cremaschi, G. Volpato, L. Martinelli. 1994. «Coexpression of aspartic proteinases and human leukocyte antigen-DR in human transplanted lung». Am J Pathol, vol. 145, no. 2, p. 310-321.

ARIEL, A., E. J. Yavin, R. Hershkovich, A. Avron, S. Franitza, I. Hardan, L. Cahalon, M. Fridkin et O. Lider. 1998. «IL-2 induces T cell adherence to extracellular matrix: inhibition of adherence and migration by IL-2 peptides generated by leukocyte elastase». J Immunol, vol. 161, no. 5, p. 2465-2472.

- BABIUK, L. A., M. J. Lawman et H. B. Ohmann. 1988. «Viral-bacterial synergistic interaction in respiratory disease». Adv Virus Res, vol. 35, p. 219-249.
- BALÓ, J. et I. Banga. 1949. «Elastase and elastase inhibitor». Nature London, vol. 164, p. 491.
- BANDA, M. J. et Z. Werb. 1981. «Mouse macrophage elastase. Purification and characterization as a metalloproteinase». Biochem J, vol. 193, no. 2, p. 589-605.
- BANDA, M. J., E. J. Clark et Z. Werb. 1980. «Limited proteolysis by macrophage elastase inactivates human alpha 1- proteinase inhibitor». J Exp Med, vol. 152, no. 6, p. 1563-1570.
- BANDA, M. J., E. J. Clark et Z. Werb. 1983. «Selective proteolysis of immunoglobulins by mouse macrophage elastase». J Exp Med, vol. 157, no. 4, p. 1184-1196.
- BANYAI, L. et L. Patthy. 1991. «Evidence for the involvement of type II domains in collagen binding by 72 kDa type IV procollagenase». FEBS Lett, vol. 282, no. 1, p. 23-25.
- BARNES, P. J. 1992. «New aspects of asthma». J Intern Med, vol. 231, no. 5, p. 453-461.
- BARRETT, A. J. 1986. «The cystatins: a diverse superfamily of cysteine peptidase inhibitors». Biomed Biochim Acta, vol. 45, no. 11-12, p. 1363-1374.
- BARRETT, A. J. et H. Kirschke. 1981. «Cathepsin B, Cathepsin H, and cathepsin L». Methods Enzymol, vol. 80, no. Pt C, p. 535-561.
- BARTLETT, J. D., J. P. Simmer, J. Xue, H. C. Margolis et E. C. Moreno. 1996. «Molecular cloning and mRNA tissue distribution of a novel matrix metalloproteinase isolated from porcine enamel organ». Gene, vol. 183, no. 1-2, p. 123-128.
- BASSET, P., J. P. Bellocq, C. Wolf, I. Stoll, P. Hutin, J. M. Limacher, O. L. Podhajcer, M. P. Chenard, M. C. Rio et P. Chambon. 1990. «A novel metalloproteinase gene specifically expressed in stromal cells of breast carcinomas». Nature, vol. 348, no. 6303, p. 699-704.
- BAZIL, V. 1995. «Physiological enzymatic cleavage of leukocyte membrane molecules». Immunol Today, vol. 16, no. 3, p. 135-140.
- BECK, K., I. Hunter et J. Engel. 1990. «Structure and function of laminin: anatomy of a multidomain glycoprotein». Faseb J, vol. 4, no. 2, p. 148-160.
- BEN-BARUCH, A., D. F. Michiel et J. J. Oppenheim. 1995. «Signals and receptors involved in recruitment of inflammatory cells». J Biol Chem, vol. 270, no. 20, p. 11703-11706.

BENFIELD, D. A., E. Nelson, J. E. Collins, L. Harris, S. M. Goyal, D. Robison, W. T. Christianson, R. B. Morrison, D. Gorcyca et D. Chladek. 1992. «Characterization of swine infertility and respiratory syndrome (SIRS) virus (isolate ATCC VR-2332)». J Vet Diagn Invest, vol. 4, no. 2, p. 127-133.

BENNETT, K., T. Levine, J. S. Ellis, R. J. Peanasky, I. M. Samloff, J. Kay et B. M. Chain. 1992. «Antigen processing for presentation by class II major histocompatibility complex requires cleavage by cathepsin E». Eur J Immunol, vol. 22, no. 6, p. 1519-1524.

BERQUIN, I. M. et B. F. Sloane. 1996. «Cathepsin B expression in human tumors». Adv Exp Med Biol, vol. 389, p. 281-294.

BEYER, J., D. Fichtner, H. Schirrmeier, H. Granzow, U. Polster, E. Weiland, A. Berndt et H. Wege. 1998. «Arterivirus PRRSV. Experimental studies on the pathogenesis of respiratory disease». Adv Exp Med Biol, vol. 440, p. 593-599.

BILODEAU, R., S. Dea, R. A. Sauvageau et G. P. Martineau. 1991. «'Porcine reproductive and respiratory syndrome' in Quebec [letter] [see comments]». Vet Rec, vol. 129, no. 5, p. 102-103.

BIRKEDAL-HANSEN, H. 1995. «Proteolytic remodeling of extracellular matrix». Curr Opin Cell Biol, vol. 7, no. 5, p. 728-735.

BIRKEDAL-HANSEN, H., W. G. Moore, M. K. Bodden, L. J. Windsor, B. Birkedal-Hansen, A. DeCarlo et J. A. Engler. 1993. «Matrix metalloproteinases: a review». Crit Rev Oral Biol Med, vol. 4, no. 2, p. 197-250.

BOHLEY, P. et P. O. Seglen. 1992. «Proteases and proteolysis in the lysosome». Experientia, vol. 48, no. 2, p. 151-157.

BOHLEY, P., H. Kirschke, J. Langner, S. Ansorge, B. Wiederanders et H. Hanson. 1971. Dans «Intracellular protein breakdown». A. J. Barrett et J. T. Dingle, (éd.). Tissue Proteinases. London: North-Holland Publishing, p. 187-219.

BOUSQUET, J., P. Chanez, J.Y. Lacoste, G. Barneon, N. Ghavanian, I. Enander, P. Venge, S. Ahlstedt, J. Simony-Lafontaine, P. Godard. 1990. «Eosinophilic inflammation in asthma». N Engl J Med, vol. 323, no. 15, p. 1033-1039.

BOSSARD, M. J., T. A. Tomaszek, S. K. Thompson, B. Y. Amegadzie, C. R. Hanning, C. Jones, J. T. Kurdyla, D. E. McNulty, F. H. Drake, M. Gowen et M. A. Levy. 1996. «Proteolytic activity of human osteoclast cathepsin K. Expression, purification, activation, and substrate identification». J Biol Chem, vol. 271, no. 21, p. 12517-12524.

BRADLEY, K., S. McConnell-Breul et R. G. Crystal. 1974. «Lung collagen heterogeneity». Proc Natl Acad Sci U S A, vol. 71, no. 7, p. 2828-2832.

BRINCKERHOFF, C. E., K. L. Sirum-Connolly, M. J. Karmilowicz et D. T. Auble. 1992. «Expression of stromelysin and stromelysin-2 in rabbit and human fibroblasts». Matrix Suppl, vol. 1, p. 165-175.

BROMME, D., K. Okamoto, B. B. Wang et S. Biroc. 1996. «Human cathepsin O2, a matrix protein-degrading cysteine protease expressed in osteoclasts. Functional expression of human cathepsin O2 in *Spodoptera frugiperda* and characterization of the enzyme». J Biol Chem, vol. 271, no. 4, p. 2126-2132.

BUISSON, A. C., J. M. Zahm, M. Polette, D. Pierrot, G. Bellon, E. Puchelle, P. Birembaut et J. M. Tournier. 1996. «Gelatinase B is involved in the in vitro wound repair of human respiratory epithelium». J Cell Physiol, vol. 166, no. 2, p. 413-426.

BURNETT, D., M. Abrahamson, J. L. Devalia, R. J. Sapsford, R. J. Davies et D. J. Buttle. 1995. «Synthesis and secretion of procathepsin B and cystatin C by human bronchial epithelial cells in vitro: modulation of cathepsin B activity by neutrophil elastase». Arch Biochem Biophys, vol. 317, no. 1, p. 305-310.

BUSIEK, D. F., V. Baragi, L. C. Nehring, W. C. Parks et H. G. Welgus. 1995. «Matrilysin expression by human mononuclear phagocytes and its regulation by cytokines and hormones». J Immunol, vol. 154, no. 12, p. 6484-6491.

BUSSE, F. W., M. Alt, I. Janthur, W. Neumann et A. P. Scho'ss (1992). Epidemiological studies on porcine reproductive and respiratory syndrome (PEARS) in Lower Saxony of Germany. 12th Congress International Pig Veterinary Society., The Netherlands.

BUSSE, W. W., W. F. Calhoun et J. D. Sedgwick. 1993. «Mechanism of airway inflammation in asthma». Am Rev Respir Dis, vol. 147, no. 6 Pt 2, p. S20-24.

BUTCHER, E. C. et L. J. Picker. 1996. «Lymphocyte homing and homeostasis». Science, vol. 272, no. 5258, p. 60-66.

BUTTLE, D. J. 1994. Dans «Lysosomal cysteine endopeptidases in the degradation of cartilage and bone». J. T. Dingle et M. E. Davies, (éd.). Immunopharmacology of joints and connective tissue. London: Academic Press, p. 225-243.

CAMPBELL, E. J., E. K. Silverman et M. A. Campbell. 1989. «Elastase and cathepsin G of human monocytes. Quantification of cellular content, release in response to stimuli, and heterogeneity in elastase-mediated proteolytic activity». J Immunol, vol. 143, no. 9, p. 2961-2968.

CANETE-SOLER, R., L. Litzky, I. Lubensky et R. J. Muschel. 1994. «Localization of the 92 kd gelatinase mRNA in squamous cell and adenocarcinomas of the lung using in situ hybridization». Am J Pathol, vol. 144, no. 3, p. 518-527.

CANETE-SOLER, R., Y. H. Gui, K. K. Linask et R. J. Muschel. 1995. «Developmental expression of MMP-9 (gelatinase B) mRNA in mouse embryos». Dev Dyn, vol. 204, no. 1, p. 30-40.

- CAPODICI, C., G. Muthukumar, M. A. Amoroso et R. A. Berg. 1989. «Activation of neutrophil collagenase by cathepsin G». Inflammation, vol. 13, no. 3, p. 245-258.
- CARON, J., M. Ouardani et S. Dea. 2000. «Diagnosis and differentiation of *Mycoplasma hyopneumoniae* and *Mycoplasma hyorhinis* infections in pigs by PCR amplification of the p36 and p46 genes.». J. Clin. Micro., vol. 38, no. 4, p. 1390-1396.
- CAUGHEY, G. H., W. W. Raymond et P. J. Wolters. 2000. «Angiotensin II generation by mast cell alpha- and beta-chymases [In Process Citation]». Biochim Biophys Acta, vol. 1480, no. 1-2, p. 245-257.
- CAVANAGH, D. 1997. «Nidovirales: a new order comprising Coronaviridae and Arteriviridae». Arch Virol, vol. 142, no. 3, p. 629-633.
- CAWSTON, T. E., G. Murphy, E. Mercer, W. A. Galloway, B. L. Hazleman et J. J. Reynolds. 1983. «The interaction of purified rabbit bone collagenase with purified rabbit bone metalloproteinase inhibitor». Biochem J, vol. 211, no. 2, p. 313-318.
- CHAMPAGNE, B., P. Tremblay, A. Cantin et Y. St. Pierre. 1998. «Proteolytic cleavage of ICAM-1 by human neutrophil elastase». J Immunol, vol. 161, no. 11, p. 6398-6405.
- CHAPEL, C., V. Camara, P. Clayette, S. Salvat, A. Mabondzo, V. Leblond, D. Marce, C. Lafuma et D. Dormont. 1994. «Modulations of 92kDa gelatinase B and its inhibitors are associated with HIV-1 infection in human macrophage cultures». Biochem Biophys Res Commun, vol. 204, no. 3, p. 1272-1278.
- CHEN, W. T. 1996. «Proteases associated with invadopodia, and their role in degradation of extracellular matrix». Enzyme Protein, vol. 49, no. 1-3, p. 59-71.
- CHIN, J. R., G. Murphy et Z. Werb. 1985. «Stromelysin, a connective tissue-degrading metalloendopeptidase secreted by stimulated rabbit synovial fibroblasts in parallel with collagenase. Biosynthesis, isolation, characterization, and substrates». J Biol Chem, vol. 260, no. 22, p. 12367-12376.
- CHIOU, M. T., C. R. Jeng, L. L. Chueh, C. H. Cheng et V. F. Pang. 2000. «Effects of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (isolate tw91) on porcine alveolar macrophages in vitro». Vet Microbiol, vol. 71, no. 1-2, p. 9-25.
- CHRISTOPHER-HENNINGS, J., E. A. Nelson, J. K. Nelson, K. D. Rossow, J. L. Shivers, M. J. Yaeger, C. C. Chase, R. A. Garduno, J. E. Collins et D. A. Benfield. 1998. «Identification of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in semen and tissues from vasectomized and nonvasectomized boars». Vet Pathol, vol. 35, no. 4, p. 260-267.
- COLE, A. A., S. Chubinskaya, B. Schumacher, K. Huch, G. Szabo, J. Yao, K. Mikecz, K. A. Hasty et K. E. Kuettner. 1996. «Chondrocyte matrix metalloproteinase-8. Human articular chondrocytes express neutrophil collagenase». J Biol Chem, vol. 271, no. 18, p. 11023-11026.

COLLIER, I. E., S. M. Wilhelm, A. Z. Eisen, B. L. Marmer, G. A. Grant, J. L. Seltzer, A. Kronberger, C. S. He, E. A. Bauer et G. I. Goldberg. 1988. «H-ras oncogene-transformed human bronchial epithelial cells (TBE-1) secrete a single metalloprotease capable of degrading basement membrane collagen». J Biol Chem, vol. 263, no. 14, p. 6579-6587.

COLLINS, J. E., D. A. Benfield, W. T. Christianson, L. Harris, J. C. Hennings, D. P. Shaw, S. M. Goyal, S. McCullough, R. B. Morrison, H. S. Joo et et al. 1992. «Isolation of swine infertility and respiratory syndrome virus (isolate ATCC VR-2332) in North America and experimental reproduction of the disease in gnotobiotic pigs». J Vet Diagn Invest, vol. 4, no. 2, p. 117-126.

CONZELMANN, K. K., N. Visser, P. Van Woensel et H. J. Thiel. 1993. «Molecular characterization of porcine reproductive and respiratory syndrome virus, a member of the arterivirus group». Virology, vol. 193, no. 1, p. 329-339.

COUSSENS, L. M. et Z. Werb. 1996. «Matrix metalloproteinases and the development of cancer». Chem Biol, vol. 3, no. 11, p. 895-904.

CRABBE, T., F. Willenbrock, D. Eaton, P. Hynds, A. F. Carne, G. Murphy et A. J. Docherty. 1992. «Biochemical characterization of matrilysin. Activation conforms to the stepwise mechanisms proposed for other matrix metalloproteinases». Biochemistry, vol. 31, no. 36, p. 8500-8507.

CRYSTAL, R. G. 1996. Alpha-1-antitrypsin deficiency. Biology- pathogenesis-clinical manifestations- therapy. New York: Macel Dekker.

DAVIES, B., D. W. Miles, L. C. Happerfield, M. S. Naylor, L. G. Bobrow, R. D. Rubens et F. R. Balkwill. 1993. «Activity of type IV collagenases in benign and malignant breast disease». Br J Cancer, vol. 67, no. 5, p. 1126-1131.

DE VRIES, A. A., E. D. Chirside, M. C. Horzinek et P. J. Rottier. 1992. «Structural proteins of equine arteritis virus». J Virol, vol. 66, no. 11, p. 6294-6303.

DEA, S., R. Bilodeau, R. Sauvageau et G. P. Martineau. 1991. «Outbreaks in Quebec pig farms of respiratory and reproductive problems associated with encephalomyocarditis virus». J Vet Diagn Invest, vol. 3, no. 4, p. 275-282.

DEA, S., R. Bilodeau, R. Athanaseous, R. A. Sauvageau et G. P. Martineau. 1992. «PRRS syndrome in Quebec: isolation of a virus serologically related to Lelystad virus». Vet Rec, vol. 130, no. 8, p. 167.

DEA, S., N. Sawyer, R. Alain et R. Athanassious. 1995. «Ultrastructural characteristics and morphogenesis of porcine reproductive and respiratory syndrome virus propagated in the highly permissive MARC-145 cell clone». Adv Exp Med Biol, vol. 380, p. 95-98.

DEA, S., N. Sawyer, R. Alain et R. Athanassious. 1995. «Ultrastructural characteristics and morphogenesis of porcine reproductive and respiratory syndrome virus propagated in the highly permissive MARC-145 cell clone». Adv Exp Med Biol, vol. 380, p. 95-98.

DEA, S., C. A. Gagnon, H. Mardassi et G. Milane. 1996. «Antigenic variability among North American and European strains of porcine reproductive and respiratory syndrome virus as defined by monoclonal antibodies to the matrix protein». J Clin Microbiol, vol. 34, no. 6, p. 1488-1493.

DEA, S., C. A. Gagnon, H. Mardassi, B. Pirzadeh et D. Rogan. 2000a. «Current knowledge on the structural proteins of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus: comparison of the North American and European isolates». Arch Virol, vol. 145, no. 4, p. 659-688.

DEA, S., L. Wilson, D. Therrien et E. Cornaglia. 2000b. «Competitive ELISA for detection of antibodies to porcine reproductive and respiratory syndrome virus using recombinant *E. coli*-expressed nucleocapsid protein as antigen.». J. Virol. Methods., vol. 87, p. 109-122.

DEAN, R. T. et A. J. Barrett. 1976. «Lysosomes». Essays Biochem, vol. 12, p. 1-40.

DECLERCK, Y. A., T. D. Yean, H. S. Lu, J. Ting et K. E. Langley. 1991. «Inhibition of autoproteolytic activation of interstitial procollagenase by recombinant metalloproteinase inhibitor MI/ TIMP-2». J Biol Chem, vol. 266, no. 6, p. 3893-3899.

DEE, S. A. 1993. «An effort to eradicate PRRS». Swine Pract, p. 18-20.

DEE, S. A. et H. S. Joo. 1994. «Prevention of the spread of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in endemically infected pig herds by nursery depopulation». Vet Rec, vol. 135, no. 1, p. 6-9.

DEN BOON, J. A., E. J. Snijder, E. D. Chirnside, A. A. de Vries, M. C. Horzinek et W. J. Spaan. 1991. «Equine arteritis virus is not a togavirus but belongs to the coronaviruslike superfamily». J Virol, vol. 65, no. 6, p. 2910-2920.

DESROCHERS, P. E. et S. J. Weiss. 1988. «Proteolytic inactivation of alpha-1-proteinase inhibitor by a neutrophil metalloproteinase». J Clin Invest, vol. 81, no. 5, p. 1646-1650.

DESROCHERS, P. E., J. J. Jeffrey et S. J. Weiss. 1991. «Interstitial collagenase (matrix metalloproteinase-1) expresses serpinase activity». J Clin Invest, vol. 87, no. 6, p. 2258-2265.

DEWALD, B., R. Rindler-Ludwig, U. Bretz et M. Baggiolini. 1975. «Subcellular localization and heterogeneity of neutral proteases in neutrophilic polymorphonuclear leukocytes». J Exp Med, vol. 141, no. 4, p. 709-723.

DHAMI, R., B. Gilks, C. Xie, K. Zay, J. L. Wright et A. Churg. 2000. «Acute cigarette smoke-induced connective tissue breakdown is mediated by neutrophils and prevented by alpha1-antitrypsin». Am J Respir Cell Mol Biol, vol. 22, no. 2, p. 244-252.

DOCHERTY, A. J., A. Lyons, B. J. Smith, E. M. Wright, P. E. Stephens, T. J. Harris, G. Murphy et J. J. Reynolds. 1985. «Sequence of human tissue inhibitor of metalloproteinases and its identity to erythroid-potentiating activity». Nature, vol. 318, no. 6041, p. 66-69.

DONE, S. H. et D. J. Paton. 1995. «Porcine reproductive and respiratory syndrome: clinical disease, pathology and immunosuppression». Vet Rec, vol. 136, no. 2, p. 32-35.

DONE, S. H., Y. Spencer, D. J. Paton, T. Drew, D. Hannam, R. Higgins, N. Twiddy, J. R. Simmons et M. White. 1996. «The pathology of natural infections with porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) in the United Kingdom». Pig Vet J, vol. 36, p. 18-30.

DORING, G., F. Frank, C. Boudier, S. Herbert, B. Fleischer et G. Bellon. 1995. «Cleavage of lymphocyte surface antigens CD2, CD4, and CD8 by polymorphonuclear leukocyte elastase and cathepsin G in patients with cystic fibrosis». J Immunol, vol. 154, no. 9, p. 4842-4850.

DREW, T. W. 2000. «A review of evidence for immunosuppression due to porcine reproductive and respiratory syndrome virus». Vet Res, vol. 31, no. 1, p. 27-39.

DREW, T. W., J. J. Meulenberg, J. J. Sands et D. J. Paton. 1995. «Production, characterization and reactivity of monoclonal antibodies to porcine reproductive and respiratory syndrome virus». J Gen Virol, vol. 76, no. Pt 6, p. 1361-1369.

EKBLÖM, P. et R. Timpl. 1996. The laminins. Boston: Harwood Academic Reading.

ENGEL, J. 1992. «Laminins and other strange proteins». Biochemistry, vol. 31, no. 44, p. 10643-10651.

ENGEL, J. et D. J. Prockop. 1991. «The zipper-like folding of collagen triple helices and the effects of mutations that disrupt the zipper». Annu Rev Biophys Biophys Chem, vol. 20, p. 137-152.

EVERTS, V., E. van der Zee, L. Creemers et W. Beertsen. 1996. «Phagocytosis and intracellular digestion of collagen, its role in turnover and remodelling». Histochem J, vol. 28, no. 4, p. 229-245.

EYRE, D. R., M. A. Paz et P. M. Gallop. 1984. «Cross-linking in collagen and elastin». Annu Rev Biochem, vol. 53, p. 717-748.

FINLAY, G. A., M. D. O'Donnell, C. M. O'Connor, J. P. Hayes et M. X. FitzGerald. 1996. «Elastin and collagen remodeling in emphysema. A scanning electron microscopy study». Am J Pathol, vol. 149, no. 4, p. 1405-1415.

FINLAY, G. A., K. J. Russell, K. J. McMahon, M. D'Arcy E, J. B. Masterson, M. X. FitzGerald et C. M. O'Connor. 1997. «Elevated levels of matrix metalloproteinases in

bronchoalveolar lavage fluid of emphysematous patients [see comments]». Thorax, vol. 52, no. 6, p. 502-506.

FOSANG, A. J., P. J. Neame, T. E. Hardingham, G. Murphy et J. A. Hamilton. 1991. «Cleavage of cartilage proteoglycan between G1 and G2 domains by stromelysins». J Biol Chem, vol. 266, no. 24, p. 15579-15582.

FOSANG, A. J., P. J. Neame, K. Last, T. E. Hardingham, G. Murphy et J. A. Hamilton. 1992. «The interglobular domain of cartilage aggrecan is cleaved by PUMP, gelatinases, and cathepsin B». J Biol Chem, vol. 267, no. 27, p. 19470-19474.

FOSANG, A. J., K. Last, V. Knauper, P. J. Neame, G. Murphy, T. E. Hardingham, H. Tschesche et J. A. Hamilton. 1993. «Fibroblast and neutrophil collagenases cleave at two sites in the cartilage aggrecan interglobular domain». Biochem J, vol. 295, no. Pt 1, p. 273-276.

FOSANG, A. J., K. Last, V. Knauper, G. Murphy et P. J. Neame. 1996. «Degradation of cartilage aggrecan by collagenase-3 (MMP-13)». FEBS Lett, vol. 380, no. 1-2, p. 17-20.

FRANSSON, L. A., I. Carlstedt, L. Coster et A. Malmstrom. 1986. «The functions of the heparan sulphate proteoglycans». Ciba Found Symp, vol. 124, p. 125-142.

FREIJE, J. M., I. Diez-Itza, M. Balbin, L. M. Sanchez, R. Blasco, J. Tolivia et C. Lopez-Otin. 1994. «Molecular cloning and expression of collagenase-3, a novel human matrix metalloproteinase produced by breast carcinomas». J Biol Chem, vol. 269, no. 24, p. 16766-16773.

FRENCH-CONSTANT, C. 1995. «Alternative splicing of fibronectin--many different proteins but few different functions». Exp Cell Res, vol. 221, no. 2, p. 261-271.

FRIDMAN, R., M. Toth, D. Pena et S. Mobashery. 1995. «Activation of progelatinase B (MMP-9) by gelatinase A (MMP-2)». Cancer Res, vol. 55, no. 12, p. 2548-2555.

FRUTON, J. S., G. W. Irving et M. Bergmann. 1941. «On the proteolytic enzymes of animal tissues. III. The proteolytic enzymes of beef spleen, beef kidney, and swine kidney. Classification of the cathepsins». J Biol Chem, vol. 141, p. 763-774.

FUKAMI, H., H. Okunishi et M. Miyazaki. 1998. «Chymase: its pathophysiological roles and inhibitors». Curr Pharm Des, vol. 4, no. 6, p. 439-453.

FULKERSON, W. J., N. MacIntyre, J. Stamler et J. D. Crapo. 1996. «Pathogenesis and treatment of the adult respiratory distress syndrome». Arch Intern Med, vol. 156, no. 1, p. 29-38.

GADHER, S. J., D. R. Eyre, V. C. Duance, S. F. Wotton, L. W. Heck, T. M. Schmid et D. E. Woolley. 1988. «Susceptibility of cartilage collagens type II, IX, X, and XI to human synovial collagenase and neutrophil elastase». Eur J Biochem, vol. 175, no. 1, p. 1-7.

GALLEGOS, N. C., C. Smales, F. J. Savage, R. M. Hembry et P. B. Boulos. 1995. «The distribution of matrix metalloproteinases and tissue inhibitor of metalloproteinases in colorectal cancer». Surg Oncol, vol. 4, no. 2, p. 111-119.

GELB, B. D., G. P. Shi, H. A. Chapman et R. J. Desnick. 1996. «Pycnodysostosis, a lysosomal disease caused by cathepsin K deficiency». Science, vol. 273, no. 5279, p. 1236-1238.

GIBBS, D. F., R. L. Warner, S. J. Weiss, K. J. Johnson et J. Varani. 1999. «Characterization of matrix metalloproteinases produced by rat alveolar macrophages». Am J Respir Cell Mol Biol, vol. 20, no. 6, p. 1136-1144.

GIBBS, D. F., T. P. Shanley, R. L. Warner, H. S. Murphy, J. Varani et K. J. Johnson. 1999. «Role of matrix metalloproteinases in models of macrophage-dependent acute lung injury. Evidence for alveolar macrophage as source of proteinases». Am J Respir Cell Mol Biol, vol. 20, no. 6, p. 1145-1154.

GILAT, D., L. Cahalon, R. HersHKoviz et O. Lider. 1996. «Interplay of T cells and cytokines in the context of enzymatically modified extracellular matrix». Immunol Today, vol. 17, no. 1, p. 16-20.

GLENNER, G. G. et L. A. Cohen. 1960. «Histochemical demonstration of a species-specific trypsin-like enzyme in mast cells». Nature, vol. 185, p. 846-847.

GLUCK, T., H. F. Geerdes-Fenge, R. H. Straub, M. Raffenberg, B. Lang, H. Lode et J. Scholmerich. 2000. «Pneumocystis carinii pneumonia as a complication of immunosuppressive therapy [In Process Citation]». Infection, vol. 28, no. 4, p. 227-230.

GOLDBERG, G. I., A. Strongin, I. E. Collier, L. T. Genrich et B. L. Marmer. 1992. «Interaction of 92-kDa type IV collagenase with the tissue inhibitor of metalloproteinases prevents dimerization, complex formation with interstitial collagenase, and activation of the proenzyme with stromelysin». J Biol Chem, vol. 267, no. 7, p. 4583-4591.

GOLDSTEIN, E. 1983. «Hydrolytic enzymes of alveolar macrophages». Rev Infect Dis, vol. 5, no. 6, p. 1078-1092.

GOLDSTEIN, R. H. 1991. «Control of type I collagen formation in the lung». Am J Physiol, vol. 261, no. 2 Pt 1, p. L29-40.

GOLDSTEIN, E. et H. C. Bartlema. 1977. «Role of the alveolar macrophage in pulmonary bacterial defense». Bull Eur Physiopathol Respir, vol. 13, no. 1, p. 57-67.

GOLDSTEIN, W. et G. Doring. 1986. «Lysosomal enzymes from polymorphonuclear leukocytes and proteinase inhibitors in patients with cystic fibrosis». Am Rev Respir Dis, vol. 134, no. 1, p. 49-56.

- GONIN, P., H. Mardassi, C. A. Gagnon, B. Massie et S. Dea. 1998. «A nonstructural and antigenic glycoprotein is encoded by ORF3 of the IAF-Klop strain of porcine reproductive and respiratory syndrome virus». Arch Virol, vol. 143, no. 10, p. 1927-1940.
- GONIN, P., B. Pirzadeh, C. A. Gagnon et S. Dea. 1999. «Seroneutralization of porcine reproductive and respiratory syndrome virus correlates with antibody response to the GP5 major envelope glycoprotein». J Vet Diagn Invest, vol. 11, no. 1, p. 20-26.
- GOSLINE, J. M. et J. Rosenbloom. 1984. Dans «Elastin». K. A. Piez et A. H. Reddi, (éd.). Extracellular matrix biochemistry. New York: Elsevier, p. 191-228.
- GOTTESMAN, M. M. 1978. «Transformation-dependent secretion of a low molecular weight protein by murine fibroblasts». Proc Natl Acad Sci U S A, vol. 75, no. 6, p. 2767-2771.
- GOYAL, S. M. 1993. «Porcine reproductive and respiratory syndrome». J Vet Diagn Invest, vol. 5, no. 4, p. 656-664.
- GRAZIOSI, C. et G. Pantaleo. 1998. «Analysis of virologic and immunologic events in HIV infection». Pathobiology, vol. 66, no. 3-4, p. 123-127.
- GREEN, G. M., G. J. Jakab, R. B. Low et G. S. Davis. 1977. «Defense mechanisms of the respiratory membrane». Am Rev Respir Dis, vol. 115, no. 3, p. 479-514.
- GREENBERGER, P. A. 1997. «Immunologic aspects of lung diseases and cystic fibrosis». Jama, vol. 278, no. 22, p. 1924-1930.
- GREENE, J., M. Wang, Y. E. Liu, L. A. Raymond, C. Rosen et Y. E. Shi. 1996. «Molecular cloning and characterization of human tissue inhibitor of metalloproteinase 4». J Biol Chem, vol. 271, no. 48, p. 30375-30380.
- GROSS, J. et C. M. Lapière. 1962. «Collagenolytic activity in amphibian tissues: a tissue culture assay». Proc Nat Acad Sci USA, vol. 48, p. 1014-1022.
- HALBUR, P. G., J. J. Andrews, E. L. Huffman, P. S. Paul, X. J. Meng et Y. Niyo. 1994. «Development of a streptavidin-biotin immunoperoxidase procedure for the detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus antigen in porcine lung». J Vet Diagn Invest, vol. 6, no. 2, p. 254-257.
- HANCE, A. J., K. Bradley et R. G. Crystal. 1976. «Lung collagen heterogeneity. Synthesis of type I and type III collagen by rabbit and human lung cells in culture». J Clin Invest, vol. 57, no. 1, p. 102-111.
- HARDINGHAM, T. E. et A. J. Fosang. 1992. «Proteoglycans: many forms and many functions». Faseb J, vol. 6, no. 3, p. 861-870.
- HARRIS, E. D., Jr. et S. M. Krane. 1972. «An endopeptidase from rheumatoid synovial tissue culture». Biochim Biophys Acta, vol. 258, no. 2, p. 566-576.

- HASTY, K. A., J. J. Jeffrey, M. S. Hibbs et H. G. Welgus. 1987. «The collagen substrate specificity of human neutrophil collagenase». J Biol Chem, vol. 262, no. 21, p. 10048-10052.
- HAUTAMAKI, R. D., D. K. Kobayashi, R. M. Senior et S. D. Shapiro. 1997. «Requirement for macrophage elastase for cigarette smoke-induced emphysema in mice». Science, vol. 277, no. 5334, p. 2002-2004.
- HECK, L. W., W. D. Blackburn, M. H. Irwin et D. R. Abrahamson. 1990. «Degradation of basement membrane laminin by human neutrophil elastase and cathepsin G». Am J Pathol, vol. 136, no. 6, p. 1267-1274.
- HEINEGARD, D. et A. Oldberg. 1989. «Structure and biology of cartilage and bone matrix noncollagenous macromolecules». Faseb J, vol. 3, no. 9, p. 2042-2051.
- HERBERT, C. A., M. J. Arthur et C. Robinson. 1996. «Augmentation by eosinophils of gelatinase activity in the airway mucosa: comparative effects as a putative mediator of epithelial injury». Br J Pharmacol, vol. 117, no. 4, p. 667-674.
- HOCKING, W. G. et D. W. Golde. 1979. «The pulmonary-alveolar macrophage (first of two parts)». N Engl J Med, vol. 301, no. 11, p. 580-587.
- HOCKING, W. G. et D. W. Golde. 1979. «The pulmonary-alveolar macrophage (second of two parts)». N Engl J Med, vol. 301, no. 12, p. 639-645.
- HORWITZ, A. L., A. J. Hance et R. G. Crystal. 1977. «Granulocyte collagenase: selective digestion of type I relative to type III collagen». Proc Natl Acad Sci U S A, vol. 74, no. 3, p. 897-901.
- HOWARD, E. W. et M. J. Banda. 1991. «Binding of tissue inhibitor of metalloproteinases 2 to two distinct sites on human 72-kDa gelatinase. Identification of a stabilization site». J Biol Chem, vol. 266, no. 27, p. 17972-17977.
- HUHTALA, P., A. Tuuttila, L. T. Chow, J. Lohi, J. Keski-Oja et K. Tryggvason. 1991. «Complete structure of the human gene for 92-kDa type IV collagenase. Divergent regulation of expression for the 92- and 72-kilodalton enzyme genes in HT-1080 cells». J Biol Chem, vol. 266, no. 25, p. 16485-16490.
- HUHTALA, P., M. J. Humphries, J. B. McCarthy, P. M. Tremble, Z. Werb et C. H. Damsky. 1995. «Cooperative signaling by alpha 5 beta 1 and alpha 4 beta 1 integrins regulates metalloproteinase gene expression in fibroblasts adhering to fibronectin». J Cell Biol, vol. 129, no. 3, p. 867-879.
- HUTCHISON, D. C. 1994. «Pulmonary emphysema». Bmj, vol. 309, no. 6964, p. 1244-1245.
- HYNES, R. O. 1990. Fibronectins. New York: Springer.

IMAI, K., H. Shikata et Y. Okada. 1995. «Degradation of vitronectin by matrix metalloproteinases-1, -2, -3, -7 and -9». FEBS Lett, vol. 369, no. 2-3, p. 249-251.

IMAI, K., E. Ohuchi, T. Aoki, H. Nomura, Y. Fujii, H. Sato, M. Seiki et Y. Okada. 1996. «Membrane-type matrix metalloproteinase 1 is a gelatinolytic enzyme and is secreted in a complex with tissue inhibitor of metalloproteinases 2». Cancer Res, vol. 56, no. 12, p. 2707-2710.

JACKSON, R. L., S. J. Busch et A. D. Cardin. 1991. «Glycosaminoglycans: molecular properties, protein interactions, and role in physiological processes». Physiol Rev, vol. 71, no. 2, p. 481-539.

JANOFF, A. et J. Scherer. 1968. «Mediators of inflammation in leukocyte lysosomes. IX. Elastinolytic activity in granules of human polymorphonuclear leukocytes». J Exp Med, vol. 128, no. 5, p. 1137-1155.

JANUSZ, M. J. et N. S. Doherty. 1991. «Degradation of cartilage matrix proteoglycan by human neutrophils involves both elastase and cathepsin G». J Immunol, vol. 146, no. 11, p. 3922-3928.

JONES, E. Y. et A. Miller. 1991. «Analysis of structural design features in collagen». J Mol Biol, vol. 218, no. 1, p. 209-219.

JUPP, R. A., A. D. Richards, J. Kay, B. M. Dunn, J. B. Wyckoff, I. M. Samloff et K. Yamamoto. 1988. «Identification of the aspartic proteinases from human erythrocyte membranes and gastric mucosa (slow-moving proteinase) as catalytically equivalent to cathepsin E». Biochem J, vol. 254, no. 3, p. 895-898.

KAY, A. B. 1991. «Asthma and inflammation». J Allergy Clin Immunol, vol. 87, no. 5, p. 893-910.

KEFFABER, K. K. 1989. «Reproductive failure of unknown ethiology». Am Assoc Swine Pract Newsletter, vol. 2, p. 2-10.

KIM, H. S., J. Kwang, I. J. Yoon, H. S. Joo et M. L. Frey. 1993. «Enhanced replication of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus in a homogeneous subpopulation of MA-104 cell line». Arch Virol, vol. 133, no. 3-4, p. 477-483.

KIRSCHKE, H., A. A. Kembhavi, P. Bohley et A. J. Barrett. 1982. «Action of rat liver cathepsin L on collagen and other substrates». Biochem J, vol. 201, no. 2, p. 367-372.

KIRSCHKE, H., B. Wiederanders, D. Bromme et A. Rinne. 1989. «Cathepsin S from bovine spleen. Purification, distribution, intracellular localization and action on proteins». Biochem J, vol. 264, no. 2, p. 467-473.

KIRSCHKE, H., J. Langner, B. Wiederanders, S. Ansorge et P. Bohley. 1977. «Cathepsin L. A new proteinase from rat-liver lysosomes». Eur J Biochem, vol. 74, no. 2, p. 293-301.

KIRSCHKE, H., J. Langner, B. Wiederanders, S. Ansorge, P. Bohley et H. Hanson. 1977. «Cathepsin H: an endoaminopeptidase from rat liver lysosomes». Acta Biol Med Ger, vol. 36, no. 2, p. 185-199.

KITTELBERGER, R., T. J. Neale, K. T. Francky, N. S. Greenhill et G. J. Gibson. 1992. «Cleavage of type VIII collagen by human neutrophil elastase». Biochim Biophys Acta, vol. 1139, no. 4, p. 295-299.

KJELDSEN, L., O. W. Bjerrum, J. Askaa et N. Borregaard. 1992. «Subcellular localization and release of human neutrophil gelatinase, confirming the existence of separate gelatinase-containing granules [published erratum appears in Biochem J 1993 Feb 1;289(Pt 3):927]». Biochem J, vol. 287, no. Pt 2, p. 603-610.

KJELLEN, L. et U. Lindahl. 1991. «Proteoglycans: structures and interactions [published erratum appears in Annu Rev Biochem 1992;61:following viii]». Annu Rev Biochem, vol. 60, p. 443-475.

KLEINE, T., S. Bartsch, J. Blaser, S. Schnierer, S. Triebel, M. Valentin, T. Gote et H. Tschesche. 1993. «Preparation of active recombinant TIMP-1 from Escherichia coli inclusion bodies and complex formation with the recombinant catalytic domain of PMNL-collagenase». Biochemistry, vol. 32, no. 51, p. 14125-14131.

KLEINER, D. E. et W. G. Stetler-Stevenson. 1994. «Quantitative zymography: detection of picogram quantities of gelatinases». Anal Biochem, vol. 218, no. 2, p. 325-329.

KNAUPER, V., C. Lopez-Otin, B. Smith, G. Knight et G. Murphy. 1996. «Biochemical characterization of human collagenase-3». J Biol Chem, vol. 271, no. 3, p. 1544-1550.

KNAUPER, V., H. Will, C. Lopez-Otin, B. Smith, S. J. Atkinson, H. Stanton, R. M. Hembry et G. Murphy. 1996. «Cellular mechanisms for human procollagenase-3 (MMP-13) activation. Evidence that MT1-MMP (MMP-14) and gelatinase a (MMP-2) are able to generate active enzyme». J Biol Chem, vol. 271, no. 29, p. 17124-17131.

KNOX, J. D., C. Wolf, K. McDaniel, V. Clark, M. Loriot, G. T. Bowden et R. B. Nagle. 1996. «Matrilysin expression in human prostate carcinoma». Mol Carcinog, vol. 15, no. 1, p. 57-63.

KOBAYASHI, H., T. Morozumi, C. Miyamoto, M. Shimizu, S. Yamada, S. Ohashi, M. Kubo, K. Kimura, K. Mitani, N. Ito et K. Yamamoto. 1996. «Mycoplasma hyorhinis infection levels in lungs of piglets with porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS)». J Vet Med Sci, vol. 58, no. 2, p. 109-113.

KOMIJN, R. E., E. G. M. van Klink et W. J. H. Van der Sande. 1991. The possible effects of weather conditions on the spread of the 'new' pig disease in the Netherlands. Report of a seminar/ workshop on the new pig disease (porcine reproductive and respiratory syndrome), Brussels, European Commission.

- KOMINAMI, E., T. Tsukahara, Y. Bando et N. Katunuma. 1985. «Distribution of cathepsins B and H in rat tissues and peripheral blood cells». J Biochem (Tokyo), vol. 98, no. 1, p. 87-93.
- KONSTAN, M. W., R. W. Walenga, K. A. Hilliard et J. B. Hilliard. 1993. «Leukotriene B4 markedly elevated in the epithelial lining fluid of patients with cystic fibrosis». Am Rev Respir Dis, vol. 148, no. 4 Pt 1, p. 896-901.
- KOOLWIJK, P., A. M. Miltenburg, M. G. van Erck, M. Oudshoorn, M. J. Niedbala, F. C. Breedveld et V. W. van Hinsbergh. 1995. «Activated gelatinase-B (MMP-9) and urokinase-type plasminogen activator in synovial fluids of patients with arthritis. Correlation with clinical and experimental variables of inflammation». J Rheumatol, vol. 22, no. 3, p. 385-393.
- KUMAGAI, K., I. Ohno, S. Okada, Y. Ohkawara, K. Suzuki, T. Shinya, H. Nagase, K. Iwata et K. Shirato. 1999. «Inhibition of matrix metalloproteinases prevents allergen-induced airway inflammation in a murine model of asthma». J Immunol, vol. 162, no. 7, p. 4212-4219.
- LAFRENIE, R. M., L. M. Wahl, J. S. Epstein, I. K. Hewlett, K. M. Yamada et S. Dhawan. 1996. «HIV-1-Tat protein promotes chemotaxis and invasive behavior by monocytes». J Immunol, vol. 157, no. 3, p. 974-977.
- LAFUSE, W. P., D. Brown, L. Castle et B. S. Zwillig. 1995. «IFN-gamma increases cathepsin H mRNA levels in mouse macrophages». J Leukoc Biol, vol. 57, no. 4, p. 663-669.
- LAPRESLE, C., V. Puizdar, C. Porchon-Bertolotto, E. Joukoff et V. Turk. 1986. «Structural differences between rabbit cathepsin E and cathepsin D». Biol Chem Hoppe Seyler, vol. 367, no. 6, p. 523-526.
- LAURENT, T. C. et J. R. Fraser. 1992. «Hyaluronan». Faseb J, vol. 6, no. 7, p. 2397-2404.
- LECO, K. J., S. S. Apte, G. T. Taniguchi, S. P. Hawkes, R. Khokha, G. A. Schultz et D. R. Edwards. 1997. «Murine tissue inhibitor of metalloproteinases-4 (Timp-4): cDNA isolation and expression in adult mouse tissues». FEBS Lett, vol. 401, no. 2-3, p. 213-217.
- LEES, W. E., S. Kalinka, J. Meech, S. J. Capper, N. D. Cook et J. Kay. 1990. «Generation of human endothelin by cathepsin E». FEBS Lett, vol. 273, no. 1-2, p. 99-102.
- LEMERE, C. A., J. S. Munger, G. P. Shi, L. Natkin, C. Haass, H. A. Chapman et D. J. Selkoe. 1995. «The lysosomal cysteine protease, cathepsin S, is increased in Alzheimer's disease and Down syndrome brain. An immunocytochemical study». Am J Pathol, vol. 146, no. 4, p. 848-860.

- LEMJABBAR, H., P. Gosset, C. Lamblin, I. Tillie, D. Hartmann, B. Wallaert, A. B. Tonnel et C. Lafuma. 1999. «Contribution of 92 kDa gelatinase/type IV collagenase in bronchial inflammation during status asthmaticus». Am J Respir Crit Care Med, vol. 159, no. 4 Pt 1, p. 1298-1307.
- LENARCIC, B., A. Ritonja, B. Strukelj, B. Turk et V. Turk. 1997. «Equistatin, a new inhibitor of cysteine proteinases from *Actinia equina*, is structurally related to thyroglobulin type-1 domain». J Biol Chem, vol. 272, no. 21, p. 13899-13903.
- LEPPERT, D., E. Waubant, R. Galardy, N. W. Bunnett et S. L. Hauser. 1995. «T cell gelatinases mediate basement membrane transmigration in vitro». J Immunol, vol. 154, no. 9, p. 4379-4389.
- LINSENMAYER, T. F., J. M. Fitch et D. E. Birk. 1990. «Heterotypic collagen fibrils and stabilizing collagens. Controlling elements in corneal morphogenesis?». Ann N Y Acad Sci, vol. 580, p. 143-160.
- LIU, T. G. et E. J. Campbell. 1995. «Nonisotropic enzyme--inhibitor interactions: a novel nonoxidative mechanism for quantum proteolysis by human neutrophils». Biochemistry, vol. 34, no. 49, p. 16171-16177.
- LIU, Y. E., M. Wang, J. Greene, J. Su, S. Ullrich, H. Li, S. Sheng, P. Alexander, Q. A. Sang et Y. E. Shi. 1997. «Preparation and characterization of recombinant tissue inhibitor of metalloproteinase 4 (TIMP-4)». J Biol Chem, vol. 272, no. 33, p. 20479-20483.
- LLANO, E., A. M. Pendas, V. Knauper, T. Sorsa, T. Salo, E. Salido, G. Murphy, J. P. Simmer, J. D. Bartlett et C. Lopez-Otin. 1997. «Identification and structural and functional characterization of human enamelysin (MMP-20)». Biochemistry, vol. 36, no. 49, p. 15101-15108.
- LOHI, J., I. Harvima et J. Keski-Oja. 1992. «Pericellular substrates of human mast cell tryptase: 72,000 dalton gelatinase and fibronectin». J Cell Biochem, vol. 50, no. 4, p. 337-349.
- LUNDBLAD, R. L., H. S. Kingdon et K. G. Mann. 1976. «Thrombin». Methods Enzymol, vol. 45, p. 156-176.
- MALONE, J. D., S. L. Teitelbaum, G. L. Griffin, R. M. Senior et A. J. Kahn. 1982. «Recruitment of osteoclast precursors by purified bone matrix constituents». J Cell Biol, vol. 92, no. 1, p. 227-230.
- MANKOWSKI, J. L., D. L. Carter, J. P. Spelman, M. L. Nealen, K. R. Maughan, L. M. Kirstein, P. J. Didier, R. J. Adams, M. Murphey-Corb et M. C. Zink. 1998. «Pathogenesis of simian immunodeficiency virus pneumonia: an immunopathological response to virus». Am J Pathol, vol. 153, no. 4, p. 1123-1130.

MARBAIX, E., J. Donnez, P. J. Courtoy et Y. Eeckhout. 1992. «Progesterone regulates the activity of collagenase and related gelatinases A and B in human endometrial explants». Proc Natl Acad Sci U S A, vol. 89, no. 24, p. 11789-11793.

MARDASSI, H., R. Athanassious, S. Mounir et S. Dea. 1994a. «Porcine reproductive and respiratory syndrome virus: morphological, biochemical and serological characteristics of Quebec isolates associated with acute and chronic outbreaks of porcine reproductive and respiratory syndrome». Can J Vet Res, vol. 58, no. 1, p. 55-64.

MARDASSI, H., L. Wilson, S. Mounir et S. Dea. 1994b. «Detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus and efficient differentiation between Canadian and European strains by reverse transcription and PCR amplification». J Clin Microbiol, vol. 32, no. 9, p. 2197-2203.

MARDASSI, H., S. Mounir et S. Dea. 1994c. «Identification of major differences in the nucleocapsid protein genes of a Québec strain and European strains of porcine reproductive and respiratory syndrome virus.». J. Gen. Virol., vol. 75, p. 681-685.

MARDASSI, H., S. Mounir et S. Dea. 1995. «Molecular analysis of the ORFs 3 to 7 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus, Quebec reference strain». Arch Virol, vol. 140, no. 8, p. 1405-1418.

MARDASSI, H., B. Massie et S. Dea. 1996. «Intracellular synthesis, processing, and transport of proteins encoded by ORFs 5 to 7 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus». Virology, vol. 221, no. 1, p. 98-112.

MARDASSI, H., P. Gonin, C. A. Gagnon, B. Massie et S. Dea. 1998. «A subset of porcine reproductive and respiratory syndrome virus GP3 glycoprotein is released into the culture medium of cells as a non- virion-associated and membrane-free (soluble) form». J Virol, vol. 72, no. 8, p. 6298-6306.

MARIC, M. A., M. D. Taylor et J. S. Blum. 1994. «Endosomal aspartic proteinases are required for invariant-chain processing». Proc Natl Acad Sci U S A, vol. 91, no. 6, p. 2171-2175.

MARTIN, G. R. et R. Timpl. 1987. «Laminin and other basement membrane components». Annu Rev Cell Biol, vol. 3, p. 57-85.

MASON, R. W., D. A. Johnson, A. J. Barrett et H. A. Chapman. 1986. «Elastinolytic activity of human cathepsin L». Biochem J, vol. 233, no. 3, p. 925-927.

MCDONNELL, S., M. Morgan et C. Lynch. 1999. «Role of matrix metalloproteinases in normal and disease processes». Biochem Soc Trans, vol. 27, no. 4, p. 734-740.

MECHAM, R. 1999. Dans «Elastin». T. Kreis et R. Vale, (éd.). Guidebook to the extracellular matrix, anchor, and adhesion proteins. London: Oxford University Press, p. 380-408.

MELDRUM, K. C. 1992. Dans «Prevention & control of animal Diseases». A. Edwards, J. Harkness et A. Bush, (éd.). Animal Health 1991: Report of the Chief Veterinary Office. London: HMSO, p. 5-8.

MENG, X. J., P. S. Paul et P. G. Halbur. 1994. «Molecular cloning and nucleotide sequencing of the 3'-terminal genomic RNA of the porcine reproductive and respiratory syndrome virus.». J. Gen. Virol., vol. 75, p. 1795-1801.

MENG, X. J., P. S. Paul, P. G. Halbur et M. A. Lum. 1995. «Phylogenic analyses of the putative M (ORF6) and N (ORF7) genes of the porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV): implication for the existence of two genotypes of PRRSV in the USA and Europe.». Arch. Virol., vol. 140, p. 745-755.

MEULENBERG, J. J., M. M. Hulst, E. J. de Meijer, P. L. Moonen, A. den Besten, E. P. de Kluyver, G. Wensvoort et R. J. Moormann. 1993a. «Lelystad virus, the causative agent of porcine epidemic abortion and respiratory syndrome (PEARS), is related to LDV and EAV.». Virology, vol. 192, no. 1, p. 62-72.

MEULENBERG, J. J. M., E. J. De Meijer et R. J. M. Moormann. 1993b. «Subgenomic RNAs of Lelystad virus contain a conserved leader-body junction sequence.». J. Gen. Virol., vol. 74, p. 1697-1701.

MEULENBERG, J. J., R. J. Bende, J. M. Pol, G. Wensvoort et R. J. Moormann. 1995a. «Nucleocapsid protein N of Lelystad virus: expression by recombinant baculovirus, immunological properties, and suitability for detection of serum antibodies.». Clin Diagn Lab Immunol, vol. 2, no. 6, p. 652-656.

MEULENBERG, J. J. M., A. Petersen-den Besten, E. P. de Kluyver, R. J. M. Moormann, W. M. Schaaper et G. Wensvoort. 1995b. «Characterization of proteins encoded by ORFs 2 to 7 of Lelystad virus.». Virology, vol. 206, p. 155-163.

MEULENBERG, J. J. M. et A. Petersen-Den Besten. 1996. «Identification and characterization of a sixth structural protein of Lelystad virus: the glycoprotein GP2 encoded by ORF2 is incorporated in virus particle.». Virology, vol. 225, p. 44-51.

MEULENBERG, J. J. M., A. P. Van Nieuwstadd, A. Essen-Zandbergen et J. P. M. Langeveld. 1997. «Post-translational processing and identification of a neutralization domain of the GP4 protein encoded by ORF4 of Lelystad virus.». J. Virol., vol. 71, p. 6061-6067.

MEULENBERG, J. J. M., A. P. Van Nieuwstadd, A. Essen-Zandbergen, J. N. A. Bos-de Ruijter, J. P. M. Langeveld et R. H. Melen. 1998. «Localization and fine mapping of antigenic sites on the nucleocapsid protein of porcine reproductive and respiratory syndrome virus with monoclonal antibodies.». Virology, vol. 252, p. 106-114.

MISSÉ, D., P.O. Esteve, M., Vidal, M. Cerutti, Y. St-Pierre, H. Yssel, M. Parmentier, F. Veas. Soumis. «HIV-1 gp120 induces the MMP-9 cytopathogenic factor production by inhibition of the p38 MAP-kinase signalling pathway».

- MITCHELL, P. G., H. A. Magna, L. M. Reeves, L. L. Lopresti-Morrow, S. A. Yocum, P. J. Rosner, K. F. Geoghegan et J. E. Hambor. 1996. «Cloning, expression, and type II collagenolytic activity of matrix metalloproteinase-13 from human osteoarthritic cartilage». J Clin Invest, vol. 97, no. 3, p. 761-768.
- MOLITOR, T. W., E. M. Bautista et C. S. Choi. 1997. «Immunity to PRRSV: double-edged sword». Vet Microbiol, vol. 55, no. 1-4, p. 265-276.
- MORTENSEN, S. B., L. Sottrup-Jensen, H. F. Hansen, T. E. Petersen et S. Magnusson. 1981. «Primary and secondary cleavage sites in the bait region of alpha 2-macroglobulin». FEBS Lett, vol. 135, no. 2, p. 295-300.
- MULLER, D., B. Quantin, M. C. Gesnel, R. Millon-Collard, J. Abecassis et R. Breathnach. 1988. «The collagenase gene family in humans consists of at least four members». Biochem J, vol. 253, no. 1, p. 187-192.
- MUNGER, J. S., C. Haass, C. A. Lemere, G. P. Shi, W. S. Wong, D. B. Teplow, D. J. Selkoe et H. A. Chapman. 1995. «Lysosomal processing of amyloid precursor protein to A beta peptides: a distinct role for cathepsin S». Biochem J, vol. 311, no. Pt 1, p. 299-305.
- MURPHY, G. et F. Willenbrock. 1995. «Tissue inhibitors of matrix metalloendopeptidases». Methods Enzymol, vol. 248, p. 496-510.
- MURPHY, G., J. J. Reynolds, U. Bretz et M. Baggiolini. 1977. «Collagenase is a component of the specific granules of human neutrophil leucocytes». Biochem J, vol. 162, no. 1, p. 195-197.
- MURPHY, G., C. G. McAlpine, C. T. Poll et J. J. Reynolds. 1985. «Purification and characterization of a bone metalloproteinase that degrades gelatin and types IV and V collagen». Biochim Biophys Acta, vol. 831, no. 1, p. 49-58.
- MURPHY, G., J. A. Allan, F. Willenbrock, M. I. Cockett, J. P. O'Connell et A. J. Docherty. 1992. «The role of the C-terminal domain in collagenase and stromelysin specificity». J Biol Chem, vol. 267, no. 14, p. 9612-9618.
- MURPHY, G., J. P. Segain, M. O'Shea, M. Cockett, C. Ioannou, O. Lefebvre, P. Chambon et P. Basset. 1993. «The 28-kDa N-terminal domain of mouse stromelysin-3 has the general properties of a weak metalloproteinase». J Biol Chem, vol. 268, no. 21, p. 15435-15441.
- MURRAY, J., P. Sonnenberg, S. Shearer et P. Godfrey-Faussett. 2000. «Drug-resistant pulmonary tuberculosis in a cohort of southern African goldminers with a high prevalence of HIV infection». S Afr Med J, vol. 90, no. 4, p. 381-386.
- NADEL, J. A. 1991. «Role of enzymes from inflammatory cells on airway submucosal gland secretion». Respiration, vol. 58, no. Suppl 1, p. 3-5.

- NAGASE, H. 1995. «Human stromelysins 1 and 2». Methods Enzymol, vol. 248, p. 449-470.
- NAKANISHI, H., K. Tominaga, T. Amano, I. Hirotsu, T. Inoue et K. Yamamoto. 1994. «Age-related changes in activities and localizations of cathepsins D, E, B, and L in the rat brain tissues». Exp Neurol, vol. 126, no. 1, p. 119-128.
- NELSON, E. A., J. Christopher-Hennings, T. Drew, G. Wensvoort, J. E. Collins et D. A. Benfield. 1993. «Differentiation of U.S. and European isolates of porcine reproductive and respiratory syndrome virus by monoclonal antibodies». J Clin Microbiol, vol. 31, no. 12, p. 3184-3189.
- NETZEL-ARNETT, S., Q. X. Sang, W. G. Moore, M. Navre, H. Birkedal-Hansen et H. E. Van Wart. 1993. «Comparative sequence specificities of human 72- and 92-kDa gelatinases (type IV collagenases) and PUMP (matrilysin)». Biochemistry, vol. 32, no. 25, p. 6427-6432.
- NICHOLSON, R., G. Murphy et R. Breathnach. 1989. «Human and rat malignant-tumor-associated mRNAs encode stromelysin-like metalloproteinases». Biochemistry, vol. 28, no. 12, p. 5195-5203.
- NORGA, K., L. Paemen, S. Masure, C. Dillen, H. Heremans, A. Billiau, H. Carton, L. Cuzner, T. Olsson, J. Van Damme et et al. 1995. «Prevention of acute autoimmune encephalomyelitis and abrogation of relapses in murine models of multiple sclerosis by the protease inhibitor D-penicillamine». Inflamm Res, vol. 44, no. 12, p. 529-534.
- NORTHROP, J. H., M. Kunitz et R. M. Herriot. 1939. Crystalline enzymes. New York: Columbia University Press.
- O'CONNOR, C. M. et M. X. FitzGerald. 1994. «Matrix metalloproteases and lung disease». Thorax, vol. 49, no. 6, p. 602-609.
- OHNISHI, K., M. Takagi, Y. Kurokawa, S. Satomi et Y. T. Konttinen. 1998. «Matrix metalloproteinase-mediated extracellular matrix protein degradation in human pulmonary emphysema». Lab Invest, vol. 78, no. 9, p. 1077-1087.
- OHUCHI, E., K. Imai, Y. Fujii, H. Sato, M. Seiki et Y. Okada. 1997. «Membrane type 1 matrix metalloproteinase digests interstitial collagens and other extracellular matrix macromolecules». J Biol Chem, vol. 272, no. 4, p. 2446-2451.
- OIKARINEN, A., M. Kylmaniemi, H. Autio-Harmainen, P. Autio et T. Salo. 1993. «Demonstration of 72-kDa and 92-kDa forms of type IV collagenase in human skin: variable expression in various blistering diseases, induction during re-epithelialization, and decrease by topical glucocorticoids». J Invest Dermatol, vol. 101, no. 2, p. 205-210.
- OKADA, Y. et I. Nakanishi. 1989. «Activation of matrix metalloproteinase 3 (stromelysin) and matrix metalloproteinase 2 ('gelatinase') by human neutrophil elastase and cathepsin G». FEBS Lett, vol. 249, no. 2, p. 353-356.

OKADA, Y., K. Naka, K. Kawamura, T. Matsumoto, I. Nakanishi, N. Fujimoto, H. Sato et M. Seiki. 1995. «Localization of matrix metalloproteinase 9 (92-kilodalton gelatinase/type IV collagenase = gelatinase B) in osteoclasts: implications for bone resorption». Lab Invest, vol. 72, no. 3, p. 311-322.

OLEKSIEWICZ, M. B. et J. Nielsen. 1999. «Effect of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) on alveolar lung macrophage survival and function». Vet Microbiol, vol. 66, no. 1, p. 15-27.

OUARDANI, M., L. Wilson, R. Jetté, C. Montpetit et S. Dea. 1999. «Multiplex PCR for detection and typing of porcine circoviruses.». J. Clin. Microbiol., vol. 37, no. 12, p. 3917-3924.

OVERALL, C. M., J. L. Wrana et J. Sodek. 1991. «Transcriptional and post-transcriptional regulation of 72-kDa gelatinase/type IV collagenase by transforming growth factor-beta 1 in human fibroblasts. Comparisons with collagenase and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase gene expression». J Biol Chem, vol. 266, no. 21, p. 14064-14071.

PARRY, D. A. 1988. «The molecular and fibrillar structure of collagen and its relationship to the mechanical properties of connective tissue». Biophys Chem, vol. 29, no. 1-2, p. 195-209.

PEI, D. et S. J. Weiss. 1995. «Furin-dependent intracellular activation of the human stromelysin-3 zymogen». Nature, vol. 375, no. 6528, p. 244-247.

PEI, D. et S. J. Weiss. 1996. «Transmembrane-deletion mutants of the membrane-type matrix metalloproteinase-1 process progelatinase A and express intrinsic matrix-degrading activity». J Biol Chem, vol. 271, no. 15, p. 9135-9140.

PEI, D., G. Majmudar et S. J. Weiss. 1994. «Hydrolytic inactivation of a breast carcinoma cell-derived serpin by human stromelysin-3». J Biol Chem, vol. 269, no. 41, p. 25849-25855.

PIPOLY, D. J. et E. C. Crouch. 1987. «Degradation of native type IV procollagen by human neutrophil elastase. Implications for leukocyte-mediated degradation of basement membranes». Biochemistry, vol. 26, no. 18, p. 5748-5754.

PIRZADEH, B. et S. Dea. 1997. «Monoclonal antibodies to the ORF5 product of porcine reproductive and respiratory syndrome virus defined linear neutralizing determinants.». J. Gen. Virol., vol. 78, p. 1867-1873.

PIRZADEH, B. et S. Dea. 1998. «Immune responses in pigs vaccinated with plasmid DNA encoding ORF5 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus .». J. Gen. Virol., vol. 79, p. 989-999.

- PLAGEMANN, P. G. W. et V. Moening. 1992. «Lactate dehydrogenase-elevating virus, equine arteritis virus, and simian hemorrhagic fever virus: a new group of positive-strand RNA viruses.». Adv. Vir. Res., vol. 41, p. 99-192.
- PLAGEMANN, P. G. W. 1996. Dans «Lactate dehydrogenase-elevating virus and related viruses». B. N. Fields, P. M. Knipe et P. M. Howley, (éd.). Fields Virology. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers, p. 1105-1120.
- POL, J. M. et F. Wagenaar. 1992. «Morphogenesis of Lelystad virus in porcine alveolar macrophages». Am Asso Swine Pract Newsletter, vol. 4, p. 29-33.
- POL, J. M., J. E. van Dijk, G. Wensvoort et C. Terpstra. 1991. «Pathological, ultrastructural, and immunohistochemical changes caused by Lelystad virus in experimentally induced infections of mystery swine disease (synonym: porcine epidemic abortion and respiratory syndrome (PEARS))». Vet Q, vol. 13, no. 3, p. 137-143.
- POWELL, W. C. et L. M. Matrisian. 1996. Dans «Complex roles of matrix metalloproteinases in tumor progression». U. Gunthert et W. Birchmeier, (éd.). Attempts to Understand Metastasis Formation. I. Metastasis Related Molecules. Berlin: Springer-Verlag, p. 1-21.
- POWERS, J. C., T. Tanaka, J. W. Harper, Y. Minematsu, L. Barker, D. Lincoln, K. V. Crumley, J. E. Fraki, N. M. Schechter, G. G. Lazarus et et al. 1985. «Mammalian chymotrypsin-like enzymes. Comparative reactivities of rat mast cell proteases, human and dog skin chymases, and human cathepsin G with peptide 4-nitroanilide substrates and with peptide chloromethyl ketone and sulfonyl fluoride inhibitors». Biochemistry, vol. 24, no. 8, p. 2048-2058.
- PROOST, P., J. Van Damme et G. Opdenakker. 1993. «Leukocyte gelatinase B cleavage releases encephalitogens from human myelin basic protein». Biochem Biophys Res Commun, vol. 192, no. 3, p. 1175-1181.
- PYKE, C., E. Ralfkiaer, P. Huhtala, T. Hurskainen, K. Dano et K. Tryggvason. 1992. «Localization of messenger RNA for Mr 72,000 and 92,000 type IV collagenases in human skin cancers by in situ hybridization». Cancer Res, vol. 52, no. 5, p. 1336-1341.
- RAKOCZY, P. E., K. Mann, D. M. Cavaney, T. Robertson, J. Papadimitreou et I. J. Constable. 1994. «Detection and possible functions of a cysteine protease involved in digestion of rod outer segments by retinal pigment epithelial cells». Invest Ophthalmol Vis Sci, vol. 35, no. 12, p. 4100-4108.
- RANTAKOKKO, J., H. T. Aro, M. Savontaus et E. Vuorio. 1996. «Mouse cathepsin K: cDNA cloning and predominant expression of the gene in osteoclasts, and in some hypertrophying chondrocytes during mouse development». FEBS Lett, vol. 393, no. 2-3, p. 307-313.

REBOUL, P., J. P. Pelletier, G. Tardif, J. M. Cloutier et J. Martel-Pelletier. 1996. «The new collagenase, collagenase-3, is expressed and synthesized by human chondrocytes but not by synoviocytes. A role in osteoarthritis». J Clin Invest, vol. 97, no. 9, p. 2011-2019.

REDDY, V. Y., Q. Y. Zhang et S. J. Weiss. 1995. «Pericellular mobilization of the tissue-destructive cysteine proteinases, cathepsins B, L, and S, by human monocyte-derived macrophages». Proc Natl Acad Sci U S A, vol. 92, no. 9, p. 3849-3853.

REPONEN, P., C. Sahlberg, C. Munaut, I. Thesleff et K. Tryggvason. 1994. «High expression of 92-kDa type IV collagenase (gelatinase) in the osteoclast lineage during mouse development». Ann N Y Acad Sci, vol. 732, p. 472-475.

REPONEN, P., I. Leivo, C. Sahlberg, S. S. Apte, B. R. Olsen, I. Thesleff et K. Tryggvason. 1995. «92-kDa type IV collagenase and TIMP-3, but not 72-kDa type IV collagenase or TIMP-1 or TIMP-2, are highly expressed during mouse embryo implantation». Dev Dyn, vol. 202, no. 4, p. 388-396.

RICE, A. et M. J. Banda. 1995. «Neutrophil elastase processing of gelatinase A is mediated by extracellular matrix». Biochemistry, vol. 34, no. 28, p. 9249-9256.

RICOU, B., L. Nicod, S. Lacraz, H. G. Welgus, P. M. Suter et J. M. Dayer. 1996. «Matrix metalloproteinases and TIMP in acute respiratory distress syndrome». Am J Respir Crit Care Med, vol. 154, no. 2 Pt 1, p. 346-352.

RIESE, R. J., P. R. Wolf, D. Bromme, L. R. Natkin, J. A. Villadangos, H. L. Ploegh et H. A. Chapman. 1996. «Essential role for cathepsin S in MHC class II-associated invariant chain processing and peptide loading». Immunity, vol. 4, no. 4, p. 357-366.

ROCHEFORT, H. 1990. «Cathepsin D in breast cancer». Breast Cancer Res Treat, vol. 16, no. 1, p. 3-13.

ROSSOW, K. D., J. E. Collins, S. M. Goyal, E. A. Nelson, J. Christopher-Hennings et D. A. Benfield. 1995. «Pathogenesis of porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection in gnotobiotic pigs». Vet Pathol, vol. 32, no. 4, p. 361-373.

ROUGHLEY, P. J. et A. J. Barrett. 1977. «The degradation of cartilage proteoglycans by tissue proteinases. Proteoglycan structure and its susceptibility to proteolysis». Biochem J, vol. 167, no. 3, p. 629-637.

SAARIALHO-KERE, U. K., A. P. Pentland, H. Birkedal-Hansen, W. C. Parks et H. G. Welgus. 1994. «Distinct populations of basal keratinocytes express stromelysin-1 and stromelysin-2 in chronic wounds». J Clin Invest, vol. 94, no. 1, p. 79-88.

SAFTIG, P., M. Hetman, W. Schmahl, K. Weber, L. Heine, H. Mossmann, A. Koster, B. Hess, M. Evers, K. von Figura et al. 1995. «Mice deficient for the lysosomal proteinase cathepsin D exhibit progressive atrophy of the intestinal mucosa and profound destruction of lymphoid cells». Embo J, vol. 14, no. 15, p. 3599-3608.

SAKAI, H., T. Saku, Y. Kato et K. Yamamoto. 1989. «Quantitation and immunohistochemical localization of cathepsins E and D in rat tissues and blood cells». Biochim Biophys Acta, vol. 991, no. 2, p. 367-375.

SAMSOM, J. N., T. G. de Bruin, J. J. Voermans, J. J. Meulenberg, J. M. Pol et A. T. Bianchi. 2000. «Changes of leukocyte phenotype and function in the broncho-alveolar lavage fluid of pigs infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus: a role for CD8(+) cells». J Gen Virol, vol. 81 Pt 2, p. 497-505.

SANCHEZ-LOPEZ, R., C. M. Alexander, O. Behrendtsen, R. Breathnach et Z. Werb. 1993. «Role of zinc-binding- and hemopexin domain-encoded sequences in the substrate specificity of collagenase and stromelysin-2 as revealed by chimeric proteins». J Biol Chem, vol. 268, no. 10, p. 7238-7247.

SANDERS, V. M. et E. S. Vitetta. 1991. «B cell-associated LFA-1 and T cell-associated ICAM-1 transiently cluster in the area of contact between interacting cells». Cell Immunol, vol. 132, no. 1, p. 45-55.

SANG, Q. A. et D. A. Douglas. 1996. «Computational sequence analysis of matrix metalloproteinases». J Protein Chem, vol. 15, no. 2, p. 137-160.

SANG, Q. X., H. Birkedal-Hansen et H. E. Van Wart. 1995. «Proteolytic and non-proteolytic activation of human neutrophil progelatinase B». Biochim Biophys Acta, vol. 1251, no. 2, p. 99-108.

SAPOLSKY, A. I., D. S. Howell et J. F. Woessner, Jr. 1974. «Neutral proteases and cathepsin D in human articular cartilage». J Clin Invest, vol. 53, no. 4, p. 1044-1053.

SASAKI, M., H. K. Kleinman, H. Huber, R. Deutzmann et Y. Yamada. 1988. «Laminin, a multidomain protein. The A chain has a unique globular domain and homology with the basement membrane proteoglycan and the laminin B chains». J Biol Chem, vol. 263, no. 32, p. 16536-16544.

SATO, H., M. Kita et M. Seiki. 1993. «v-Src activates the expression of 92-kDa type IV collagenase gene through the AP-1 site and the GT box homologous to retinoblastoma control elements. A mechanism regulating gene expression independent of that by inflammatory cytokines». J Biol Chem, vol. 268, no. 31, p. 23460-23468.

SATO, H., T. Takino, Y. Okada, J. Cao, A. Shinagawa, E. Yamamoto et M. Seiki. 1994. «A matrix metalloproteinase expressed on the surface of invasive tumour cells». Nature, vol. 370, no. 6484, p. 61-65.

SCHECHTER, N. M., J. K. Choi, D. A. Slavin, D. T. Deresienski, S. Sayama, G. Dong, R. M. Lavker, D. Proud et G. S. Lazarus. 1986. «Identification of a chymotrypsin-like proteinase in human mast cells». J Immunol, vol. 137, no. 3, p. 962-970.

SCHREIBER, J. R. et D. A. Goldmann. 1986. Dans «Infections complicating cystic fibrosis». J. S. Remington et M. N. Schwartz, (éd.). Current clinical topics in infectious diseases. New York: McGraw Hill, p. 51-58.

SCHWARTZ, L. B., R. A. Lewis, D. Seldin et K. F. Austen. 1981. «Acid hydrolases and tryptase from secretory granules of dispersed human lung mast cells». J Immunol, vol. 126, no. 4, p. 1290-1294.

SELTZER, J. L., A. Z. Eisen, E. A. Bauer, N. P. Morris, R. W. Glanville et R. E. Burgeson. 1989. «Cleavage of type VII collagen by interstitial collagenase and type IV collagenase (gelatinase) derived from human skin». J Biol Chem, vol. 264, no. 7, p. 3822-3826.

SELTZER, J. L., K. T. Akers, H. Weingarten, G. A. Grant, D. W. McCourt et A. Z. Eisen. 1990. «Cleavage specificity of human skin type IV collagenase (gelatinase). Identification of cleavage sites in type I gelatin, with confirmation using synthetic peptides». J Biol Chem, vol. 265, no. 33, p. 20409-20413.

SENIOR, R. M., G. L. Griffin, C. J. Fliszar, S. D. Shapiro, G. I. Goldberg et H. G. Welgus. 1991. «Human 92- and 72-kilodalton type IV collagenases are elastases». J Biol Chem, vol. 266, no. 12, p. 7870-7875.

SHAOHENG, H., D. Marianna, A. Gaça et A. F. Walls. 1998. «A role for tryptase in the activation of human mast cells: modulation of histamine release by tryptase and inhibitors od tryptase». J Pharm Exp Ther, vol. 286, no. 1, p. 289-297.

SHAPIRO, S. D. 1994. «Elastolytic metalloproteinases produced by human mononuclear phagocytes. Potential roles in destructive lung disease». Am J Respir Crit Care Med, vol. 150, no. 6 Pt 2, p. S160-164.

SHAPIRO, S. D., G. L. Griffin, D. J. Gilbert, N. A. Jenkins, N. G. Copeland, H. G. Welgus, R. M. Senior et T. J. Ley. 1992. «Molecular cloning, chromosomal localization, and bacterial expression of a murine macrophage metalloelastase». J Biol Chem, vol. 267, no. 7, p. 4664-4671.

SHIBATA, I., M. Mori, K. Uruno, Y. Samegai et M. Okada. 1997. «In vivo replication of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in swine alveolar macrophages and change in the cell population in bronchoalveolar lavage fluid after infection». J Vet Med Sci, vol. 59, no. 7, p. 539-543.

SHIMIZU, M., S. Yamada, K. Kawashima, S. Ohashi, S. Shimizu et T. Ogawa. 1996. «Changes of lymphocyte subpopulations in pigs infected with porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus». Vet Immunol Immunopathol, vol. 50, no. 1-2, p. 19-27.

SHIN, J., E. M. Bautista, Y. B. Kang et T. W. Molitor. 1998. «Quantitation of porcine reproductive and respiratory syndrome virus RNA in semen by single-tube reverse transcription-nested polymerase chain reaction». J Virol Methods, vol. 72, no. 1, p. 67-79.

SHIPLEY, J. M., R. L. Wesselschmidt, D. K. Kobayashi, T. J. Ley et S. D. Shapiro. 1996. «Metalloelastase is required for macrophage-mediated proteolysis and matrix invasion in mice». Proc Natl Acad Sci U S A, vol. 93, no. 9, p. 3942-3946.

SHOO, M. K. 1989. «Experimental bovine pneumonic pasteurellosis: a review». Vet Rec, vol. 124, no. 6, p. 141-144.

SNIJDER, E. J. et J. J. Meulenberg. 1998. «The molecular biology of arteriviruses». J Gen Virol, vol. 79, no. Pt 5, p. 961-979.

SOLANO, G. I., E. Bautista, T. W. Molitor, J. Segales et C. Pijoan. 1998. «Effect of porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection on the clearance of *Haemophilus parasuis* by porcine alveolar macrophages». Can J Vet Res, vol. 62, no. 4, p. 251-256.

SOTTRUP-JENSEN, L. 1989. «Alpha-macroglobulins: structure, shape, and mechanism of proteinase complex formation». J Biol Chem, vol. 264, no. 20, p. 11539-11542.

SPECKS, U., A. Nerlich, T. V. Colby, I. Wiest et R. Timpl. 1995. «Increased expression of type VI collagen in lung fibrosis». Am J Respir Crit Care Med, vol. 151, no. 6, p. 1956-1964.

STARKEY, P. M. 1977. «The effect of human neutrophil elastase and cathepsin G on the collagen of cartilage, tendon, and cornea». Acta Biol Med Ger, vol. 36, no. 11-12, p. 1549-1554.

STARKEY, P. M. et A. J. Barrett. 1973. «Inhibition by alpha-macroglobulin and other serum proteins». Biochem J, vol. 131, no. 4, p. 823-831.

STEFFENSEN, B., U. M. Wallon et C. M. Overall. 1995. «Extracellular matrix binding properties of recombinant fibronectin type II-like modules of human 72-kDa gelatinase/type IV collagenase. High affinity binding to native type I collagen but not native type IV collagen». J Biol Chem, vol. 270, no. 19, p. 11555-11566.

STETLER-STEVENSON, W. G., H. C. Kruttsch et L. A. Liotta. 1989. «Tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP-2). A new member of the metalloproteinase inhibitor family». J Biol Chem, vol. 264, no. 29, p. 17374-17378.

STORZ, J., L. Stine, A. Liem et G. A. Anderson. 1996. «Coronavirus isolation from nasal swap samples in cattle with signs of respiratory tract disease after shipping». J Am Vet Med Assoc, vol. 208, no. 9, p. 1452-1455.

ST-PIERRE, Y., M. Desrosiers, P. Tremblay, P. O. Esteve et G. Opendakker. 1996. «Flow cytometric analysis of gelatinase B (MMP-9) activity using immobilized fluorescent substrate on microspheres». Cytometry, vol. 25, no. 4, p. 374-380.

STRONGIN, A. Y., I. Collier, G. Bannikov, B. L. Marmer, G. A. Grant et G. I. Goldberg. 1995. «Mechanism of cell surface activation of 72-kDa type IV collagenase. Isolation of

the activated form of the membrane metalloprotease». J Biol Chem, vol. 270, no. 10, p. 5331-5338.

SUAREZ, P., M. Diaz-Guerra, C. Prieto, M. Esteban, J. M. Castro, A. Nieto et J. Ortin. 1996. «Open reading frame 5 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus as a cause of virus-induced apoptosis». J Virol, vol. 70, no. 5, p. 2876-2882.

SUR, J. H., V. L. Cooper, J. A. Galeota, R. A. Hesse, A. R. Doster et F. A. Osorio. 1996. «In vivo detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus RNA by in situ hybridization at different times postinfection». J Clin Microbiol, vol. 34, no. 9, p. 2280-2286.

SUR, J. H., A. R. Doster, J. S. Christian, J. A. Galeota, R. W. Wills, J. J. Zimmerman et F. A. Osorio. 1997. «Porcine reproductive and respiratory syndrome virus replicates in testicular germ cells, alters spermatogenesis, and induces germ cell death by apoptosis». J Virol, vol. 71, no. 12, p. 9170-9179.

SUR, J. H., A. R. Doster et F. A. Osorio. 1998. «Apoptosis induced in vivo during acute infection by porcine reproductive and respiratory syndrome virus». Vet Pathol, vol. 35, no. 6, p. 506-514.

TAKAHASHI, H., T. Nukiwa, K. Yoshimura, C. D. Quick, D. J. States, M. D. Holmes, J. Whang-Peng, T. Knutsen et R. G. Crystal. 1988. «Structure of the human neutrophil elastase gene». J Biol Chem, vol. 263, no. 29, p. 14739-14747.

TERPSTRA, C., G. Wensvoort et J. M. Pol. 1991. «Experimental reproduction of porcine epidemic abortion and respiratory syndrome (mystery swine disease) by infection with Lelystad virus: Koch's postulates fulfilled». Vet Q, vol. 13, no. 3, p. 131-136.

TEZUKA, K., Y. Tezuka, A. Maejima, T. Sato, K. Nemoto, H. Kamioka, Y. Hakeda et M. Kumegawa. 1994. «Molecular cloning of a possible cysteine proteinase predominantly expressed in osteoclasts». J Biol Chem, vol. 269, no. 2, p. 1106-1109.

THACKER, E. L., P. G. Halbur, R. F. Ross, R. Thanawongnuwech et B. J. Thacker. 1999. «Mycoplasma hyopneumoniae potentiation of porcine reproductive and respiratory syndrome virus-induced pneumonia». J Clin Microbiol, vol. 37, no. 3, p. 620-627.

THOMAS, D. J., A. D. Richards et J. Kay. 1989. «Inhibition of aspartic proteinases by alpha 2-macroglobulin». Biochem J, vol. 259, no. 3, p. 905-907.

TOOLE, B. P. 1997. «Hyaluronan in morphogenesis». J Intern Med, vol. 242, no. 1, p. 35-40.

TOSI, M. F., H. Zakem et M. Berger. 1990. «Neutrophil elastase cleaves C3bi on opsonized pseudomonas as well as CR1 on neutrophils to create a functionally important opsonin receptor mismatch». J Clin Invest, vol. 86, no. 1, p. 300-308.

- TSCHESCHE, H., V. Knauper, S. Kramer, J. Michaelis, R. Oberhoff et H. Reinke. 1992. «Latent collagenase and gelatinase from human neutrophils and their activation». Matrix Suppl, vol. 1, p. 245-255.
- TURKINGTON, P. T. 1991. «Degradation of human factor X by human polymorphonuclear leucocyte cathepsin G and elastase». Haemostasis, vol. 21, no. 2, p. 111-116.
- TURNSEK, T., I. Kregar et D. Lebez. 1975. «Acid sulphhydryl protease from calf lymph nodes». Biochim Biophys Acta, vol. 403, no. 2, p. 514-520.
- UENO, E., H. Sakai, Y. Kato et K. Yamamoto. 1989. «Activation mechanism of erythrocyte cathepsin E. evidence for the occurrence of the membrane-associated active enzyme». J Biochem (Tokyo), vol. 105, no. 6, p. 878-882.
- VAN DER REST, M. et P. Bruckner. 1993. «Collagens: diversity at the molecular and supramolecular levels». Curr Opin Struct Biol, vol. 3, p. 430-436.
- VIGNOLA, A. M., L. Riccobono, A. Mirabella, M. Profita, P. Chanez, V. Bellia, G. Mautino, P. D'Accardi, J. Bousquet et G. Bonsignore. 1998. «Sputum metalloproteinase-9/tissue inhibitor of metalloproteinase-1 ratio correlates with airflow obstruction in asthma and chronic bronchitis». Am J Respir Crit Care Med, vol. 158, no. 6, p. 1945-1950.
- VIGNOLA, A. M., P. Chanez, G. Chiappara, A. Merendino, E. Zinnanti, J. Bousquet, V. Bellia et G. Bonsignore. 1996. «Release of transforming growth factor-beta (TGF-beta) and fibronectin by alveolar macrophages in airway diseases». Clin Exp Immunol, vol. 106, no. 1, p. 114-119.
- VOET, D. et J. G. Voet. 1995. Biochemistry. New York: J. Wiley & Sons.
- VOICU, I. L., A. Silim, M. Morin et M. A. Elazhary. 1994. «Interaction of porcine reproductive and respiratory syndrome virus with swine monocytes». Vet Rec, vol. 134, no. 16, p. 422-423.
- VUORIO, E. et B. de Crombrughe. 1990. «The family of collagen genes». Annu Rev Biochem, vol. 59, p. 837-872.
- WARD, R. V., R. M. Hembry, J. J. Reynolds et G. Murphy. 1991. «The purification of tissue inhibitor of metalloproteinases-2 from its 72 kDa progelatinase complex. Demonstration of the biochemical similarities of tissue inhibitor of metalloproteinases-2 and tissue inhibitor of metalloproteinases-1». Biochem J, vol. 278, no. Pt 1, p. 179-187.
- WEBB, E. C. 1993. «Enzyme nomenclature: a personal retrospective». Faseb J, vol. 7, no. 12, p. 1192-1194.

WEEKS, B. S. 1998. «The role of HIV-1 activated leukocyte adhesion mechanisms and matrix metalloproteinase secretion in AIDS pathogenesis (Review)». Int J Mol Med, vol. 1, no. 2, p. 361-366.

WEEKS, B. S., H. W. Schnaper, M. Handy, E. Holloway et H. K. Kleinman. 1993. «Human T lymphocytes synthesize the 92 kDa type IV collagenase (gelatinase B)». J Cell Physiol, vol. 157, no. 3, p. 644-649.

WEEKS, B. S., M. E. Klotman, E. Holloway, W. G. Stetler-Stevenson, H. K. Kleinman et P. E. Klotman. 1993. «HIV-1 infection stimulates T cell invasiveness and synthesis of the 92- kDa type IV collagenase». AIDS Res Hum Retroviruses, vol. 9, no. 6, p. 513-518.

WEISS, S. J. 1989. «Tissue destruction by neutrophils». N Engl J Med, vol. 320, no. 6, p. 365-376.

WELGUS, H. G., J. J. Jeffrey, G. P. Stricklin et A. Z. Eisen. 1982. «The gelatinolytic activity of human skin fibroblast collagenase». J Biol Chem, vol. 257, no. 19, p. 11534-11539.

WELGUS, H. G., G. A. Grant, J. C. Sacchettini, W. T. Roswit et J. J. Jeffrey. 1985. «The gelatinolytic activity of rat uterus collagenase». J Biol Chem, vol. 260, no. 25, p. 13601-13606.

WELGUS, H. G., E. J. Campbell, J. D. Cury, A. Z. Eisen, R. M. Senior, S. M. Wilhelm et G. I. Goldberg. 1990. «Neutral metalloproteinases produced by human mononuclear phagocytes. Enzyme profile, regulation, and expression during cellular development». J Clin Invest, vol. 86, no. 5, p. 1496-1502.

WENSVOORT, G., C. Terpstra, J. M. Pol, E. A. ter Laak, M. Bloemraad, E. P. de Kluyver, C. Kragten, L. van Buiten, A. den Besten, F. Wagenaar et et al. 1991. «Mystery swine disease in The Netherlands: the isolation of Lelystad virus». Vet Q, vol. 13, no. 3, p. 121-130.

WESTLEY, B. R. et F. E. May. 1999. «Prognostic value of cathepsin D in breast cancer». Br J Cancer, vol. 79, no. 2, p. 189-190.

WHITE, M. E. C. 1992. «The critical signs and symptoms of "blue-eared pig disease" (PRRS)». Pig Vet J, vol. 28, p. 62-68.

WILHELM, S. M., I. E. Collier, B. L. Marmer, A. Z. Eisen, G. A. Grant et G. I. Goldberg. 1989. «SV40-transformed human lung fibroblasts secrete a 92-kDa type IV collagenase which is identical to that secreted by normal human macrophages [published erratum appears in J Biol Chem 1990 Dec 25;265(36):22570]». J Biol Chem, vol. 264, no. 29, p. 17213-17221.

WILHELM, S. M., Z. H. Shao, T. J. Housley, P. K. Seperack, A. P. Baumann, Z. Gunja-Smith et J. F. Woessner, Jr. 1993. «Matrix metalloproteinase-3 (stromelysin-1).

Identification as the cartilage acid metalloprotease and effect of pH on catalytic properties and calcium affinity». J Biol Chem, vol. 268, no. 29, p. 21906-21913.

WILL, H., S. J. Atkinson, G. S. Butler, B. Smith et G. Murphy. 1996. «The soluble catalytic domain of membrane type 1 matrix metalloproteinase cleaves the propeptide of progelatinase A and initiates autoproteolytic activation. Regulation by TIMP-2 and TIMP-3». J Biol Chem, vol. 271, no. 29, p. 17119-17123.

WILSON, C. L. et L. M. Matrisian. 1996. «Matrilysin: an epithelial matrix metalloproteinase with potentially novel functions». Int J Biochem Cell Biol, vol. 28, no. 2, p. 123-136.

WILSON, C. L., K. J. Heppner, P. A. Labosky, B. L. Hogan et L. M. Matrisian. 1997. «Intestinal tumorigenesis is suppressed in mice lacking the metalloproteinase matrilysin». Proc Natl Acad Sci U S A, vol. 94, no. 4, p. 1402-1407.

WINDSOR, L. J., H. Grenett, B. Birkedal-Hansen, M. K. Bodden, J. A. Engler et H. Birkedal-Hansen. 1993. «Cell type-specific regulation of SL-1 and SL-2 genes. Induction of the SL-2 gene but not the SL-1 gene by human keratinocytes in response to cytokines and phorbol esters». J Biol Chem, vol. 268, no. 23, p. 17341-17347.

WITTY, J. P., S. A. Foster, G. P. Stricklin, L. M. Matrisian et P. H. Stern. 1996. «Parathyroid hormone-induced resorption in fetal rat limb bones is associated with production of the metalloproteinases collagenase and gelatinase B». J Bone Miner Res, vol. 11, no. 1, p. 72-78.

WOOTTON, S. K., E. A. Nelson et D. Yoo. 1998. «Antigenic structure of the nucleocapsid protein of porcine reproductive and respiratory syndrome virus». Clin Diagn Lab Immunol, vol. 5, no. 6, p. 773-779.

WRIGHT, P. E. 1997. Dans «Respiratory diseases». N. Nathanson, R. Ahmed, F. Gonzalez-Sraran, D. E. Griffin, K. V. Holmes, F. A. Murphy et H. L. Robinson, (éd.). Viral Pathogenesis. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers, p.

XIN, X. Q., B. Gunesequera et R. W. Mason. 1992. «The specificity and elastolytic activities of bovine cathepsins S and H». Arch Biochem Biophys, vol. 299, no. 2, p. 334-339.

YAMAZAKI, Y., K. Kubo, K. Fujimoto, Y. Matsuzawa, M. Sekiguchi et T. Honda. 2000. «Pulmonary function tests of Mycobacterium avium-intracellulare infection: correlation with bronchoalveolar lavage fluid findings». Respiration, vol. 67, no. 1, p. 46-51.

YAO, P. M., J. M. Buhler, M. P. d'Ortho, F. Lebagy, C. Delclaux, A. Harf et C. Lafuma. 1996. «Expression of matrix metalloproteinase gelatinases A and B by cultured epithelial cells from human bronchial explants». J Biol Chem, vol. 271, no. 26, p. 15580-15589.

YONEZAWA, S. et K. Nakamura. 1991. «Species-specific distribution of cathepsin E in mammalian blood cells». Biochim Biophys Acta, vol. 1073, no. 1, p. 155-160.

YURCHENCO, P. D. et G. C. Ruben. 1987. «Basement membrane structure in situ: evidence for lateral associations in the type IV collagen network». J Cell Biol, vol. 105, no. 6 Pt 1, p. 2559-2568.

YURCHENCO, P. D. et J. C. Schittny. 1990. «Molecular architecture of basement membranes». Faseb J, vol. 4, no. 6, p. 1577-1590.

ZEMAN, D. H. 1996. «Concurrent respiratory infections in 221 cases of PRRS virus pneumonia - 1992-1994». Swine Health Prod, vol. 4, p. 143-145.

ZHANG, X., J. Shin, T. W. Molitor, B. Schook et M. S. Rutherford. 1999. «Molecular responses of macrophages to porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection.». Virology, vol. 262, p. 152-162.

ANNEXE A:
PRÉ-EXPÉRIMENTATION

Introduction

Le coût des porcelets SPF et de leur hébergement en animalerie est très élevé, et il arrive que les infections par le VSRRP effectuées dans de telles conditions de salubrité, par rapport à une porcherie, ne produisent pas les symptômes typiques de cette infection. Nous avons donc procédé à une expérience préliminaire en utilisant un nombre minimal de porcelets (8) afin de déterminer les conditions optimales du modèle expérimental et mettre au point les différents paramètres d'évaluation de l'activité protéolytique. Plus spécifiquement, cette expérience préliminaire a permis de déterminer le titre viral et la meilleure méthode d'inoculation à utiliser afin d'obtenir une infection avec des symptômes se rapprochant le plus possible de ceux observés en porcherie. Lors de cette expérience, nous avons mesuré l'activité protéolytique nette et l'activité gélatinolytique contenue dans les lavages bronchoalvéolaires (BALs). Nous avons également tenté de déterminer, à l'aide d'inhibiteurs, le répertoire de protéases protéolytiquement actives. Cette annexe a été rédigée sous une forme abrégée étant donné que beaucoup d'éléments techniques et de discussion apparaissent déjà dans l'article ou dans les autres parties de ce mémoire.

Matériel et méthodes

Réactifs. L'aprotinin, la chymostatin, l'E-64, le leupeptin, la pepsine et la pepstatin-A ont été obtenus de chez Roche (Laval, QC, Canada). L' α 1-antitrypsine (α 1-AT), la chymotrypsine, l'EDTA- Na_2 , l'inhibiteur peptidique MSAAPVCK, et la papaïne ont été obtenus de chez Sigma (St. Louis, MO). L'élastase des leucocytes humaine (HLE) recombinante provient de chez Calbiochem (La Jolla, CA). La trypsine a été obtenue de BD Biosciences (Sparks, MD).

Infection virale. Les détails concernant l'identité et la préparation de la souche virale sont en tout point identiques à ceux décrits dans l'article. Les porcs ont été inoculés par voie oronasale alors qu'ils étaient sous sédation (acepromazine/ketamine). Les signes cliniques des porcs ont été notés à tous les jours pendant les deux semaines suivantes.

Lavages bronchoalvéolaires (BALs). Aux jours 3 et 7 post-infection, deux et trois porcelets respectivement ont été euthanasiés, leurs poumons récoltés aseptiquement pour la récolte des BALS, tel que décrits dans l'article.

Mesure de l'activité protéolytique et calcul des unités d'activité protéolytique. La mesure d'activité protéolytique a été effectuée, tel que décrit précédemment (p.66). Les données récoltées lors de la titration de l'activité protéolytique effectuée à l'aide de dilutions en série (1/5 à 1/3125) (v/v) des BALs ont d'abord été exprimées sous forme de pourcentage de dégradation, selon la formule suivante : **% de dégradation = 100 X (MFI_{microsphères} - MFI_{échantillon}) / MFI_{microsphères}**, où MFI = Intensité de fluorescence moyenne. Nous avons ensuite mis ces données sous forme de graphique logarithmique où l'abscisse représente le pourcentage de dégradation et l'ordonnée, le facteur de dilution de l'échantillon. Le nombre d'unités représente la valeur correspondant à 50% de dégradation pour chacun des échantillons. Finalement, nous avons calculé la moyenne des facteurs de dilution pour les porcs de chacun des jours post-infection.

Zymographie : L'analyse de la sécrétion des gélatinases A et B a été effectuée par zymographie avec le collagène dénaturé (gélatine) comme substrat, tel que décrit dans l'article.

Réactions d'inhibition. Lors de chaque expérience, un volume de 10 µl d'inhibiteur (concentré) ou de milieu RPMI sans sérum (pour les témoins) a d'abord été placé au fond des puits (plaque de 96 puits en polypropylène reposant sur la glace). Des aliquots de 80 µl de BAL, ou de milieu sans sérum contenant les enzymes témoins ont été ajoutés à l'inhibiteur. Les enzymes et les inhibiteurs ont été pré-incubés pendant 15 minutes à 37°C. L'activité protéolytique a ensuite été mesurée par FASC, tel que décrit dans l'article.

Résultats et Discussion

Activité protéolytique.

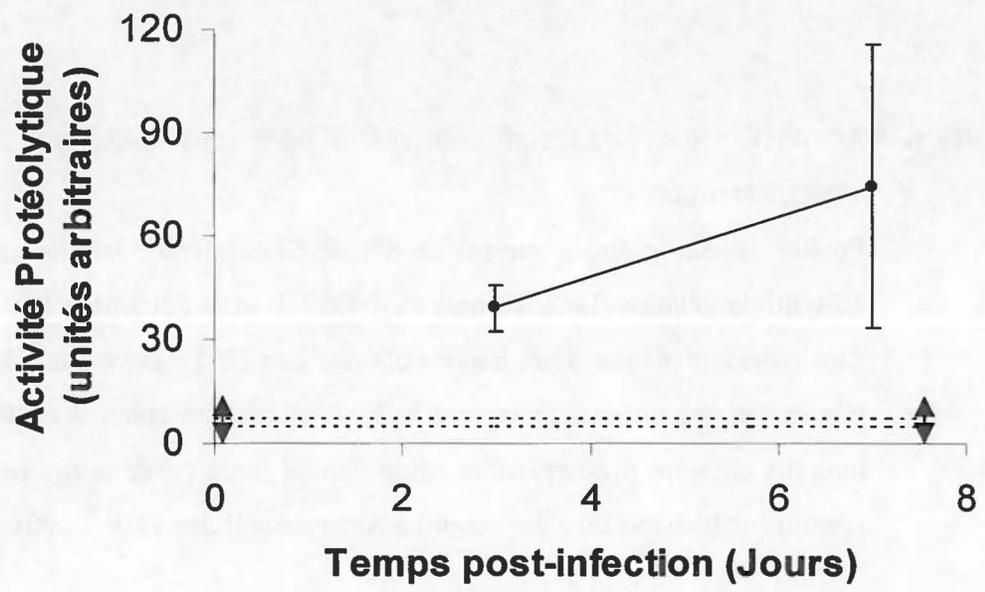
L'analyse des BALs des porcs infectés par le VSRRP a démontré une augmentation significative de l'activité protéolytique nette aux jours 3 et 7 post-infection chez les porcs infectés par le VSRRP par rapport aux porcs témoins (Figure 5). L'activité protéolytique nette chez les porcs non-infectés était minime (moins de 10 unités). Ces résultats étaient cohérents avec notre hypothèse de départ. La variation au jour 7 étant plus importante, les résultats ont démontré la nécessité d'augmenter, dans la mesure du possible, le nombre de porcelets à trois par points d'analyse, utilisant si possible un nombre constant de porcs pour chacun des jours post-infection. La différence obtenue entre les jours 3 et 7 semblent également indiquer une certaine variation avec le temps, démontrant la nécessité de mesurer l'activité protéolytique sur une plus longue période afin d'obtenir une représentation plus juste de l'évolution de celle-ci.

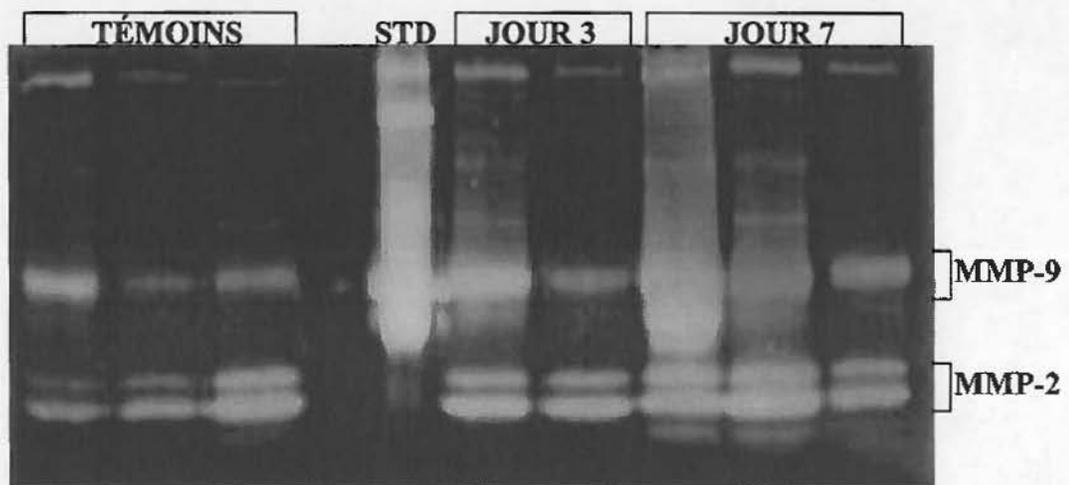
Activité gélatinolytique.

La zymographie a été effectuée telle que décrite dans l'article. Selon nos résultats, l'activité MMP-2 et MMP-9 au jour 7 p.i. semble plus importante chez les porcs infectés que chez les porcs témoins (figure 6). Dans ce cas-ci également, les résultats suggéraient qu'il fallait observer les porcs sur une plus longue période de temps.

Inhibition de l'activité protéolytique des BALs de la pré-expérimentation.

Pour inhiber les protéases à sérine, nous avons utilisé l'aprotinin et l' α_1 -AT à des concentrations finales de 20 $\mu\text{g/ml}$ et 1 $\mu\text{g/ml}$ respectivement, la trypsine bovine (1 $\mu\text{g/ml}$) étant utilisée comme témoin de l'effet d'inhibition. Ces concentrations avaient été déterminées lors d'expériences préliminaires dans le laboratoire du Dr. Yves St-Pierre à l'intérieur d'un projet visant à déterminer les caractéristiques du test FASC. Nous avons obtenu (Tableau 4) une inhibition de l'activité protéolytique nette de l'ordre de 20% avec l'aprotinin comparativement à une inhibition beaucoup plus faible avec l' α_1 -AT (moins de 10%). Nous avons donc préféré l'aprotinin à l' α_1 -AT pour les expériences faites avec les mélanges, puisqu'il arrive que le test FASC fonctionne moins bien avec certains inhibiteurs (observations personnelles).





**Tableau 4. Inhibition de l'activité protéolytique des
BALs de la pré-expérimentation**

Inhibiteurs	Témoins	Temps post-infection (jours)	
		3	7
Aprotinin	18%	18%	23%
α 1-AT	10%	0%	2%
Chymostatin	N.E.	23%	48%
E-64	1%	9%	3%
EDTA	5%	8%	10%
Leupeptin	3%	9%	1%
MSAAPVCK	5%	0%	3%
Pepstatin-A	N.E.	3%	N.E.
Mélanges			
ED-A-E	N.E.	0%	17%
ED-A- α 1	N.E.	4%	24%
ED-C-E	N.E.	4%	19%
ED-C-L	N.E.	13%	12%

Abréviations : ED = EDTA, A = aprotinin, α 1 = α 1-AT, C = chymostasin,
E = E-64, L = leupeptin et N.E. = non-effectué .

Toutes les valeurs sont des moyennes exprimées sous forme de pourcentage
d'inhibition et sont issues de plusieurs expériences indépendantes.

La chymostatin (100 µg/ml) est un inhibiteur plus spécifique des protéases à sérine apparenté à la chymotrypsine, l'enzyme témoin utilisée dans ce test (5 µg/ml). La chymostatin a généré une inhibition de l'activité protéolytique nette des BALs de l'ordre de 20 à 50%, indiquant que les BALs contiennent une grande proportion d'une protéase reliée à la famille des chymotrypsines, possiblement la chymase des mastocytes (voir revue de littérature). Toutefois, nous n'avons pas détecté d'augmentation marquée du nombre de mastocytes lors de l'analyse des coupes histologiques (observations personnelles). Bien que cet enzyme puisse être exprimé par d'autres types cellulaires, il est possible que l'action de cet inhibiteur ait un spectre d'inhibition plus large à celui attendu, ce qui est souvent le cas avec les inhibiteurs synthétiques.

Nous avons utilisé le peptide MSAAPVCK (10µM final) pour inhiber l'élastase des leucocytes, une protéase à sérine, en utilisant la HLE recombinante (2 µg/ml) comme enzyme témoin. L'inhibition obtenue avec cet inhibiteur (moins de 5%) était négligeable. Étant donné le peu de neutrophiles qui sont présents dans les poumons des porcs infectés par le VSRPP, ces résultats étaient prévisibles.

Le leupeptin (25 µg/ml) inhibe aussi les protéases à sérine, mais il peut en plus inhiber les protéases à cystéine ayant une spécificité apparentée à la trypsine. Les protéases à cystéine, dont l'enzyme type est la papaïne (1 µg/ml) sont quant à elles inhibées par l'E-64 (20 µg/ml). Ces deux inhibiteurs ont donné des pourcentage d'inhibition similaires et peu significatifs (de l'ordre de 10%). L'EDTA (100 mM) est un inhibiteur non-spécifique des métalloprotéases. Lui aussi a inhibé environ 10% de l'activité protéolytique.

Pour inhiber les protéases aspartiques comme la pepsine, ou certains types de cathepsines sécrétées par les neutrophiles, nous avons utilisé la pepstatin-A (500 ng/ml). L'effet de cet inhibiteur a été négligeable, consistant avec les résultats obtenus avec les inhibiteurs d'élastase.

Le mélange d'EDTA, de chymostatin et de leupeptin (ED-C-L) semblait être le plus efficace pour inhiber les BALs (Tableau 4 en bas), mais le pourcentage d'inhibition obtenu était moindre que celui obtenu avec la chymostatin seule. Aucun des mélanges n'a semblé donner les résultats escomptés (i.e. d'effets additifs) par rapport aux inhibiteurs seuls. Les résultats utilisant les inhibiteurs variaient beaucoup entre les échantillons et les

expériences étaient peu reproductibles (observations personnelles), indiquant que le répertoire de protéases était possiblement constitué de plusieurs types de protéases distinctes, ou qu'il pouvait possiblement varier dans le temps. Les expériences préliminaires indiquent toutefois que des méthodes alternatives, telles que des approches biochimiques de nature préparative et analytique, seront nécessaires pour mieux caractériser ce répertoire.

Conclusions

Cette expérience préliminaire nous a permis de mieux planifier l'expérience décrite dans notre article. Nous avons pu remarquer lors de cette étude préliminaire que les porcs présentaient fort peu des symptômes typiques de l'infection par le VSRRP (hyperthermie, essoufflement à l'effort, toux et lésions pulmonaires macroscopiques) (observations personnelles). Ainsi, lors de la planification de l'expérience qui a mené à l'article, nous avons choisi une méthode d'inoculation différente; l'utilisation d'un laryngoscope évitant que le porc avale une bonne quantité de la préparation virale, la dose absolue qui se retrouvait dans les poumons était donc plus grande. À la lumière des résultats obtenus, nous avons également déterminé qu'une période d'observation plus longue serait préférable, nous permettant ainsi d'obtenir une vision plus globale de la variation de l'activité protéolytique et gélatinolytique dans le temps. Pour la prochaine expérience (celle décrite dans l'article), nous avons décidé d'abandonner la caractérisation des BALs à l'aide d'inhibiteurs, et décidé de regarder les lésions microscopiques afin de mesurer plus efficacement les signes typiques de l'infection et tenter de faire un lien entre l'augmentation de l'activité protéolytique et l'apparition des lésions.

ANNEXE B:
LISTE DES PRÉSENTATIONS ET SÉANCES D'AFFICHE

- GIRARD, M., Cléroux, P., Tremblay, P., Dea, S., St-Pierre, Y. 2001. Présentation par affiche intitulée : "Pulmonary infection by the PRRS virus leads to a transient increase in the proteolytic activity and MMP secretion in bronchoalveolar fluids". Dans Program of the 6th International Symposium on Positive Strand RNA Viruses (Paris, 28 au 2 Juin 2001). Institut Pasteur, Paris, France.
- GIRARD, M., Cléroux, P., Tremblay, P., Dea, S., St-Pierre, Y. 2000. Présentation orale intitulée : "Increased proteolytic activity and MMP expression in lungs induced following infection with PRRS virus". Dans Program of the 81st Annual Meeting of the CRWAD (Conference of Research Workers in Animal Diseases) (Chicago, 12, 13 et 14 Novembre 2000). Chicago, Illinois, USA, abstract #137.
- GIRARD, M., Cléroux, P., Tremblay, P., Dea, S., St-Pierre, Y. 2000. Présentation orale intitulée "Implication des protéases dans les immunopathologies associées aux infections virales pulmonaires chez le porc". Dans Journées de Recherche et Colloque en production animales (Ste-Foy, 31 mai et 1^{er} juin 2000). Ste-Foy, Regroupement CPAQ-CPVQ-GÉAGRI et Université Laval, p.108.
- GIRARD, M., Cléroux, P., Tremblay, P., Dea, S., St-Pierre, Y. 2000. Présentation orale intitulée : "Nouveaux aspects de la réponse immune locale durant l'infection par le virus SRRP". Dans Programme général du 68^e Congrès de l'Acfas, Les sciences au XXI^e siècle (Montréal, du 15 au 19 mai 2000). Montréal, Université de Montréal, p.11. (Résumé disponible sur le site web de l'Acfas).
- GIRARD, M., Cléroux, P., Tremblay, P., Dea, S., St-Pierre, Y. 1999. Présentation par affiche intitulée : "Augmentation de l'activité protéolytique au niveau pulmonaire durant l'infection au virus SRRP". Dans Programme du 1^{er} Congrès Interne de l'INRS-Institut-Armand-Frappier (Magog-Orford, du 5 au 6 novembre 1999). Laval, INRS-Institut-Armand-Frappier, p.7