

## **INFORMATION TO USERS**

**This manuscript has been reproduced from the microfilm master. UMI films the text directly from the original or copy submitted. Thus, some thesis and dissertation copies are in typewriter face, while others may be from any type of computer printer.**

**The quality of this reproduction is dependent upon the quality of the copy submitted. Broken or indistinct print, colored or poor quality illustrations and photographs, print bleedthrough, substandard margins, and improper alignment can adversely affect reproduction.**

**In the unlikely event that the author did not send UMI a complete manuscript and there are missing pages, these will be noted. Also, if unauthorized copyright material had to be removed, a note will indicate the deletion.**

**Oversize materials (e.g., maps, drawings, charts) are reproduced by sectioning the original, beginning at the upper left-hand corner and continuing from left to right in equal sections with small overlaps.**

**ProQuest Information and Learning  
300 North Zeeb Road, Ann Arbor, MI 48106-1346 USA  
800-521-0600**

**UMI<sup>®</sup>**

**UNIVERSITÉ DE SHERBROOKE**

**Modulation par l'INF- $\gamma$  de l'expression du  
récepteur de l'IL-2 chez les cellules  
épithéliales pulmonaires de type II :  
implication dans le processus apoptotique**

par

**MARCEL BRISEBOIS B.Sc.**

**Service d'immunologie**

**Mémoire présenté à la Faculté de médecine en vue de l'obtention du grade de  
Maître ès Sciences (M.Sc.) en Immunologie**

**Été 2000**



**National Library  
of Canada**

**Acquisitions and  
Bibliographic Services**

**395 Wellington Street  
Ottawa ON K1A 0N4  
Canada**

**Bibliothèque nationale  
du Canada**

**Acquisitions et  
services bibliographiques**

**395, rue Wellington  
Ottawa ON K1A 0N4  
Canada**

*Your file* *Votre référence*

*Our file* *Notre référence*

**The author has granted a non-exclusive licence allowing the National Library of Canada to reproduce, loan, distribute or sell copies of this thesis in microform, paper or electronic formats.**

**The author retains ownership of the copyright in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.**

**L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque nationale du Canada de reproduire, prêter, distribuer ou vendre des copies de cette thèse sous la forme de microfiche/film, de reproduction sur papier ou sur format électronique.**

**L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur qui protège cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.**

0-612-74320-9

**Canada**

## Résumé

L'apoptose des cellules épithéliales pulmonaires est un processus normal de l'homéostasie tissulaire. Cependant, lors d'agressions ou de dérèglements régulatoires, l'apoptose dépasse le rythme de renouvellement cellulaire et peut être responsable ou contribuer à diverses pathologies et défaillances de l'appareil pulmonaire comme la fibrose pulmonaire ou le syndrome de détresse respiratoire aiguë. Nos travaux visent à démontrer que des signaux de survie induits par une combinaison  $\text{INF-}\gamma/\text{IL-2}$  peuvent diminuer l'apoptose causée par un agent agresseur tel la bléomycine dans un modèle animal. Pour ce faire, nous démontrons par immunobuvardage et microscopie confocale que l' $\text{INF-}\gamma$  augmente l'expression de l' $\text{IL-2R}$  chez la cellule épithéliale pulmonaire primaire isolée et que cette augmentation d'expression est nécessaire à l'effet anti-apoptotique de l' $\text{IL-2}$  observé par des essais caspase 3 et TUNEL chez des cultures cellulaires primaires mises en présence de bléomycine. Nous démontrons qu'en bloquant l'activation et la participation des sérine/thréonine protéines kinases JNK1 et p38 MAP kinase, la combinaison  $\text{INF-}\gamma/\text{IL-2}$  bloque l'induction de l'activation de la caspase 3 par la bléomycine *in vivo*. Ces résultats suggèrent que la combinaison  $\text{INF-}\gamma/\text{IL-2}$  pourrait potentiellement inhiber ou retarder l'apparition de la fibrose pulmonaire induite par la bléomycine en bloquant l'activation des voies JNK et p38 MAP kinase à des étapes clés de l'initiation de la pathologie.

# Table des matières

	<b>Page</b>
Table des matières	I
Liste des illustrations	IV
Liste des abréviations	VII
Résumé	
<b>1. Introduction</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Cellules épithéliales pulmonaires</b>	<b>1</b>
<b>1.2 Apoptose</b>	<b>2</b>
<b>1.3 Signalisation apoptotique</b>	<b>3</b>
<b>1.4 Interleukine-2 et son récepteur</b>	<b>7</b>
<b>1.5 Signalisation intra-cellulaire de l'IL-2R</b>	<b>9</b>
<b>1.6 Signalisation anti-apoptotique de l'IL-2R</b>	<b>11</b>
<b>1.7 Interféron-gamma</b>	<b>12</b>
<b>1.8 Fibrose induite par la bléomycine</b>	<b>14</b>
<b>1.9 Sérine/thréonine protéines kinases et l'apoptose</b>	<b>17</b>

<b>2. Matériel et méthodes</b>	<b>23</b>
<b>2.1 Isolation des pneumocytes primaires</b>	<b>23</b>
<b>2.2 Modulation et immuno-détection de l'IL-2R<math>\gamma</math></b>	<b>25</b>
2.2.1 Immunobuvardages	25
2.2.2 Microscopie confocale	27
<b>2.3 Induction de l'apoptose in vitro</b>	<b>28</b>
2.3.1 Mesure de l'activité Caspase 3	29
2.3.2 Essai TUNEL	29
<b>2.4 Modèle animal</b>	<b>31</b>
2.4.1 Mesure de l'activité Caspase 3	32
2.4.2 Inclusion et coupes tissulaires	32
2.4.3 Marquage TUNEL	33
2.4.4 Immunobuvardages	34
<b>2. Résultats</b>	<b>36</b>
<b>3.1 Modulation du récepteur IL-2R<math>\gamma</math> par l'INF-<math>\gamma</math></b>	<b>36</b>
<b>3.2 Inhibition de l'apoptose cellulaire <i>in vitro</i></b>	<b>37</b>
<b>3.3 Inhibition de la caspase 3 <i>in vivo</i></b>	<b>44</b>
<b>3.4 Modulation de l'expression pulmonaire de Fas</b>	<b>48</b>

<b>3.5 Modulation de l'activité des Sérine/thréonine kinases <i>in vivo</i></b>	<b>48</b>
<b>3.6 Implication de la p38 MAPK dans l'activation de la caspase 3</b>	<b>50</b>
<b>4. Discussion et conclusions</b>	<b>52</b>
<b>Remerciements</b>	<b>66</b>
<b>Références</b>	<b>67</b>

## Liste des illustrations

<b>Figures</b>	<b>Page</b>
<b>Figure 1.</b> Signalisation intracellulaire du récepteur IL-2.	11
<b>Figure 2.</b> Schéma impliquant JNK-1 et/ou p38 MAPK dans la pathogénèse fibrotique induite par la bléomycine.	21
<b>Figure 3.</b> Implication de JNK-1 et/ou p38 MAPK dans la signalisation apoptotique du récepteur Fas.	22
<b>Figure 4.</b> Modulation de l'expression membranaire de l'IL-2R $\gamma$ chez les cellules épithéliales pulmonaires de type II par l'INF- $\gamma$ .	38
<b>Figure 5.</b> Modulation de l'expression membranaire de l'IL-2R $\gamma$ chez les cellules épithéliales pulmonaires de type II par l'INF- $\gamma$ .	39
<b>Figure 6.</b> Modulation de l'expression protéique de l'IL-2R $\beta$ chez les cellules épithéliales pulmonaires de type II par l'INF- $\gamma$ .	40

<b>Figures</b>	<b>Page</b>
<b>Figure 7.</b> Inhibition chez les cellules épithéliales pulmonaires de type II de l'activité caspase 3 induite par la bléomycine <i>in vitro</i> .	42
<b>Figure 8.</b> Inhibition chez les cellules épithéliales pulmonaires de type II de la fragmentation génomique induite par la bléomycine.	43
<b>Figure 9.</b> Décompte cellulaire des lavages broncho-alvéolaire du modèle animal.	45
<b>Figure 10.</b> Inhibition de l'activité caspase 3 pulmonaire induite par la bléomycine <i>in vivo</i> .	46
<b>Figure 11.</b> Essai TUNEL sur coupes histologiques pulmonaires.	47
<b>Figure 12.</b> Activation différentielles des protéines kinases JNK-1, p38 MAPK, ERK1, ERK2 et modulation du niveau d'expression du récepteur Fas.	49
<b>Figure 13.</b> Inhibition de l'activité caspase 3 par des inhibiteurs spécifiques de p38 MAPK et des MEKs.	51

**Figures****Page****Figure 14.****63**

**Shéma du mécanisme potentiel de la combinaison INF- $\gamma$ /IL-2 dans l'inhibition de l'apoptose des cellules épithéliales pulmonaires.**

## Abréviations

AP-1	Activator Protein 1
DD	Death Domain
DFF	DNA Fragmentation Factor
DTT	Di-Thio-Tréitol
EDTA	Acide Éthylène-Diamine Tétracétique
EGF	Epithelial Growth Factor
EGTA	Acide Ethylène-bis-Glycol Tétracétique
ERK	Extracellular signal-Related Kinase
FADD	Fas Associated Death Domain protein
FasL	Fas Ligand
FGF	Fibroblast Growth Factor
HEPES	Acide N-2-HydroxyÉthylPipérazine-N-2-ÉthaneSulfonique
IL-2	Interleukine 2
INF- $\gamma$	Interféron gamma
Jak	Janus kinase
JNK	c-Jun N-terminal protein Kinase
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinase
MEKK	MAPK and ERK Kinase Kinase
NGF	Nerve Growth Factor
PBS	Phosphate Buffer Saline
PKB	Sérine/thréonine Protéine Kinase B
PI 3-kinase	Phosphatidylinositol 3-kinase
PNII	Pneumocytes II
SAPK	Stress-Activated Protein Kinase
SDS	Dodécylsulfate de Sodium

<b>STAM</b>	<b>Signal Transducing Adaptor Molecule</b>
<b>Stat</b>	<b>Signal Transducer and Activator of Transcription</b>
<b>TGF<math>\beta</math></b>	<b>Transforming Growth Factor <math>\beta</math></b>
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	<b>Tumor Necrosis Factor</b>
<b>TRAIL</b>	<b>TNF-Related Apoptosis Inducing Ligand</b>
<b>TUNEL</b>	<b>Désoxynucleotidyl transferase UTP Nick End Labeling</b>
<b>Tris</b>	<b>Tris (hydroxyméthyl) aminoéthane</b>

# 1. Introduction

## 1.1 Les cellules épithéliales pulmonaires de type II

Les cellules épithéliales pulmonaires de type II, communément appelées pneumocytes II (PNII) ont plusieurs rôles à jouer pour le maintien de l'homéostasie du système pulmonaire et pour assurer la continuité des échanges gazeux essentiels: elles synthétisent et sécrètent le surfactant, participent à l'évacuation de l'H<sub>2</sub>O de l'espace alvéolaire et ont une contribution majeure dans la réparation de l'épithélium alvéolaire comme unités structurales d'assise (Castranova et al., 1988).

L'épithélium pulmonaire, par sa position anatomique, est très exposé aux agressions et aux conséquences de la réponse inflammatoire induite en riposte à l'agression. Vu le rôle primordial des pneumocytes de type II dans la fonction pulmonaire, il faut identifier des signaux favorisant la survie et la réparation épithéliale post-agression. Nous voulons démontrer que l'IL-2, via son récepteur exprimé par les cellules épithéliales pulmonaires de type II, peut potentiellement favoriser la réparation épithéliale par la modulation de la migration et/ou en retardant l'apoptose. Nous voulons également démontrer que l'INF- $\gamma$  augmente l'expression de la sous-unité  $\gamma$  du récepteur IL-2 et augmente ainsi la réponse fonctionnelle des PNII à l'IL-2. Parce qu'il possède différents récepteurs cytokiniques tels IL-1R, TNFR, TGF $\beta$ R I et II, INF $\gamma$ R (Panos, 1993) et la sous-unité fonctionnelle  $\gamma$  commune aux récepteurs IL-4R, IL-7R, IL-9R, IL-15R et IL-

2R (Lesur et al., 1997), on peut présumer que le pneumocyte de type II est une cible potentielle pour plusieurs cytokines. De plus, étant capables de produire plusieurs cytokines (TGF $\beta$  1-2-3, PDGF, IL-6, IL-2, IL-3, IL-1 $\beta$  et le TNF- $\alpha$ ), des chemokines (IL-8, MCP-1, MIP 1-2, RANTES) et certains médiateurs lipidiques comme le PAF ou PGE<sub>2</sub>, les pneumocytes de type II peuvent également agir sur différentes cellules immunes. Donc, par l'expression de différentes molécules, établies comme ayant un rôle à jouer lors de la réponse immunitaire, les PNII sont potentiellement capables de recevoir et d'envoyer différents messages aux cellules présentes dans son environnement à un moment donné pour une raison donnée.

## **1.2 Apoptose**

L'apoptose est un processus où la mort cellulaire est initiée et complétée selon une suite d'événements chronologiques ordonnés nécessitant l'activation et/ou la synthèse de protéines pour l'auto-destruction cellulaire. L'apoptose se distingue de la nécrose par ses changements morphologiques séquentiels et surtout par son dénouement. En effet, l'apoptose se terminera par une cytolysse douce où les fragments cellulaires appelés corps apoptotiques seront phagocytés par les cellules spécialisées ou même absorbés par les cellules avoisinantes selon un mécanisme recyclant qui s'imbrique parfaitement dans un schéma d'homéostasie stationnaire en prévenant les dommages aux cellules saines.

La nécrose, ne résultant pas d'une suite d'événements prévus et orchestrés, mènera pour sa part à un déversement du contenu antigénique et lysosomique cytoplasmique cellulaire au tissu touché, engendrant des dommages directs ou dus à la réponse inflammatoire initiée. On sait depuis près de cinquante ans que l'apoptose a un grand rôle à jouer dans le développement des organismes multi-cellulaires (Glucksmann, 1951), mais ce n'est qu'au début des années soixante-dix que l'importance de l'apoptose dans l'homéostasie d'un tissu normal a été reconnue (Kerr, 1971, Kerr et al., 1972). Après quelques temps où l'étude du phénomène fut laissée de côté, les mécanismes moléculaires de l'apoptose ont été soumis à d'intenses recherches lors de la dernière décennie (plus de 36000 publications traitant de près ou de loin de l'apoptose) où il est apparu évident que les voies de signalisation apoptotiques empruntées par les organismes uni- et multi-cellulaires étaient génétiquement conservées (Ameisen, 1996).

### **1.3 Voies de transduction du signal apoptotique**

Évidemment, la voie apoptotique utilisée dépendra de plusieurs paramètres comme le type cellulaire ou, encore plus important, le type de stimuli apoptotique appliqué. D'innombrables conditions apoptotiques ont été répertoriées jusqu'à maintenant, mais on peut quand même les rassembler en catégories de stimuli plus générales. Les hormones ou les facteurs de croissances tels l'EGF (epithelial growth factor) ou le FGF (fibroblast growth

factor) peuvent promouvoir la survie cellulaire sans pour autant stimuler la prolifération cellulaire (Boise et al., 1995), mais ces mêmes facteurs de croissance peuvent induire l'apoptose chez la même population où elle l'inhibait selon le degré de maturité et de différenciation cellulaire (Kim et al., 1995, Fox et al., 1996). La présence ou l'absence des facteurs de croissance ou hormones représente donc un large spectre de stimuli apoptotiques potentiels.

Il y a aussi des signaux apoptotiques plus directs comme ceux utilisant la signalisation via le récepteur de mort Fas (aussi appelé Apo-1 et CD95). Le récepteur Fas est un intermédiaire clé dans la délétion clonale périphérique des lymphocytes T (Adachi et al. 1996) et dans la signalisation apoptotique de plusieurs autres types cellulaires (Nagata et Goldstein, 1995, Nagata, 1996). Fas est une protéine membranaire de 45 Kd de la superfamille des récepteurs TNF (tumor necrosis factor) / NGF (nerve growth factor) exprimée chez le lymphocyte T activé, le lymphocyte B, mais également chez les cellules hépatiques, cardiaques et pulmonaires (Nagata et Goldstein, 1995). Son ligand, FasL, est une protéine membranaire de 40 Kd principalement exprimée chez les cellules T (Suda et al., 1995), mais qui peut se retrouver sous une forme soluble dans le sérum (Tanaka et al., 1996). Plusieurs études ont démontré que la liaison de FasL ou d'un anticorps anti-Fas sur le récepteur Fas induisait l'apoptose (Suda et al., 1993, Itoh et al., 1991). La signalisation en aval de la liaison de FasL à son récepteur sous la forme homotrimérique est la suivante: recrutement par le DD (death domain) de la molécule adaptatrice FADD (Fas Associated Death Domain protein) qui elle-même recrutera et activera la

caspase 8 et la cascade caspase subséquente (Fraser et Evans, 1996, Nagata, 1996). D'autres récepteurs de la superfamille TNF, comme le TRAIL (TNF-Related Apoptosis Inducing Ligand), ont des régions intra-cellulaires homologues au DD du récepteur Fas qui peuvent activer la signalisation apoptotique (Wiley et al., 1995).

L'environnement physique immédiat de la cellule et les interactions qu'elle a avec lui sont sources d'une multitude d'autres paramètres pouvant influencer son destin. Voici quelques-uns de ces facteurs capables de pression sur la survie et la mort de la cellule: les interactions avec la membrane basale via les molécules d'adhésion (Tsuji et Dubois, 1995, Ruoslahti et Reed, 1994), les interactions avec la matrice extra-cellulaire (Meredith et al., 1993), un changement dans les concentrations calciques intra-cellulaires (Shwartzmann et Cidlowski, 1993) et le pH intra-cellulaire (Gottlieb et al., 1996).

Les différents signaux reçus par la cellule vont ou seront influencés par le comité central décisionnel cellulaire, les homologues de la famille Bcl-2. Cette famille comporte des membres pro-apoptotiques, comme Bax et Bcl-x<sub>S</sub> (Reed, 1996) et des membres anti-apoptiques, tels Bcl-2 et Bcl-x<sub>L</sub> (Hockenbury, 1995). Ce serait un équilibre dynamique de ces protéines selon le ratio et les niveaux d'homo- et d'hétérodimérisation respective, qui déciderait de la régulation apoptotique (Oltvai et al., 1993). Les propriétés pro- et anti-apoptotiques exactes des homologues Bcl-2 sont encore mal connues. Cependant, certains ont donné des fonctions anti-oxydantes à Bcl-2 (Hockenbury et al., 1993) tandis que d'autres études démontrent que Bcl-2 empêcherait le relâchement d'une

protéase apoptotique (Susin et al., 1996) et celui du cytochrome c (Kluck et al., 1997, Yang et al., 1997) de la membrane mitochondriale, ce dernier étant un intermédiaire nécessaire à l'activation des caspases (Liu et al., 1996).

Une fois que le signal apoptotique est reçu et que la cellule a statué sur son sort, c'est la voie apoptotique effectrice qui prend la relève. Ce sont les caspases de la famille des cystéines protéases qui se chargent de l'exécution de l'ordre de mise à mort (Chinnaiyan et al., 1996, Armstrong et al., 1996, Smyth et al., 1996, Shimizu et al., 1996). Au moins 10 caspases ont été identifiées jusqu'à maintenant: la caspase 1 ou ICE (Cerreti et al., 1992), la caspase 2 ou Nedd 2 (Kumar et al., 1994), la caspase 3 ou CPP32 (Fernandes-Alnemri et al., 1994), la caspase 4 ou TX (Faucheu et al., 1995), la caspase 5 ou TY (Munday et al., 1995), la caspase 6 ou l'homologue mammifère de Ced-3 (Fernandes-Alnemri et al., 1995), la caspase 7 ou Mch3 (Fernandes-Alnemri et al., 1995), la caspase 8 ou MACH (Fernandes-Alnemri et al., 1996), la caspase 9 ou Mch6 (Duan et al., 1996) et la caspase 10 ou Mch4 (Fernandes-Alnemri et al., 1996). Toutes les caspases sont synthétisées sous forme d'un précurseur inactif et c'est un clivage spécifique suivi d'un assemblage hétérotétramérique qui donne une enzyme active. Dépendamment du signal apoptotique, les premières caspases activées changent. Cependant, parce qu'elles peuvent s'activer l'une et l'autre, une cascade caspase est vite mise sur pied. L'ordre hiérarchique de cette cascade dépend du signal apoptotique et est plus ou moins important. Le focus doit être mis sur la caspase 3 qui semble constituer le médiateur central de toute les voies apoptotiques car elle est capable d'activer les caspases 2, 6, 7 et 9 (Srinivasula

et al., 1996, Fernandes et al., 1995) en plus de servir de substrat aux caspases 1, 8, 9, 10 (Muzio et al., 1997, Fernandes et al., 1996, Enari et al., 1996). La caspase 3 est également capable d'activer le DFF (DNA Fragmentation Factor) qui lui induit la fragmentation génomique (Liu et al., 1997).

#### **1.4 Interleukine-2 (IL-2) et son récepteur (IL-2R)**

L'interleukine-2 (IL-2) est une glycoprotéine de 15 kDa produite principalement par le lymphocyte T CD4<sup>+</sup> de type Th1 durant l'activation antigénique. Les événements cellulaires induits chez le lymphocyte T par l'IL-2 sont nombreux et parfois paradoxaux. En effet, même si à l'origine l'IL-2 a été décrite comme un facteur de croissance des lymphocytes T (Smith, 1988), des expériences plus récentes faites sur des souris n'exprimant pas d'IL-2 ou les sous-unités  $\alpha/\beta$  ont démontré que l'IL-2 participait également aux mécanismes de délétion des cellules auto-réactives (Horak et al., 1995, Ma et al., 1995, Sadlack et al., 1995, Simpson et al., 1995, Willerford et al., 1995, Suzuki et al., 1995), vraisemblablement via la voie Fas (Kneitz et al., 1995). Le rôle de l'IL-2 dans le développement du système immunitaire n'est donc pas encore bien établi, mais ses fonctions de facteur de croissance et de facteur d'activation semblent être dominantes dans le système immunitaire mature. L'expression de ce récepteur n'est pas restreinte aux cellules T. En effet, plusieurs ont rapporté sa fonctionnalité chez d'autres cellules comme les lymphocytes B (Chen et al.,

1994), les macrophages (Hancock et al., 1987), les monocytes (Bosco et al., 1994) et les cellules NK (Robertson et Ritz, 1992). D'autres ont rapporté la présence du récepteur complet ou de la sous-unité  $\gamma$  commune à l'extérieur du système immunitaire, comme chez les cellules épithéliales rénales (Gerritsma et al., 1997), les hépatocytes ou chez des lignées cellulaires cancéreuses épithéliales et non-épithéliales qui montraient une modulation de leur prolifération en présence d'IL-2 in vitro (Plaisance et al., 1993, Saunders et al., 1993, Weidmann et al., 1992, Yasumura et al., 1994). La présence et la fonctionnalité du récepteur IL-2R chez les pneumocytes de type II fut confirmée dans notre laboratoire (Lesur et al., 1997).

Le récepteur de l'IL-2 (IL-2R) est constitué de trois sous-unités identifiées comme  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$  ou p55, p70 et p64 respectivement. La sous-unité  $\alpha$  est impliquée seulement dans la liaison du ligand (Wang et Smith, 1987) tandis que les sous-unités  $\beta$  et  $\gamma$  sont responsables de la signalisation intra-cellulaire (Hatakeyama et al., 1989, Nakamura et al., 1994, Nelson et al., 1994), c'est pourquoi nous nous concentrerons sur les sous-unités  $\beta$  et  $\gamma$ .

La sous-unité  $\beta$  comporte 525 acides aminés compartimentés en 284 acides aminés cytoplasmiques, 25 acides aminés trans-membranaires et 214 acides aminés extra-cellulaires. La région cytoplasmique possède trois régions distinctes: une région riche en sérine, une région acide et une région riche en proline. La région riche en sérine est importante pour la transmission du signal prolifératif et pour l'activation de la phosphatidylinositol 3 kinase tandis que la région acide recrute Lck (Merida et al., 1993). La régulation de l'expression

génique de IL-2R $\beta$  est contrôlée par l'activité de facteurs de transcription tels AP-1, AP-2, Ets-1 et Sp-1.

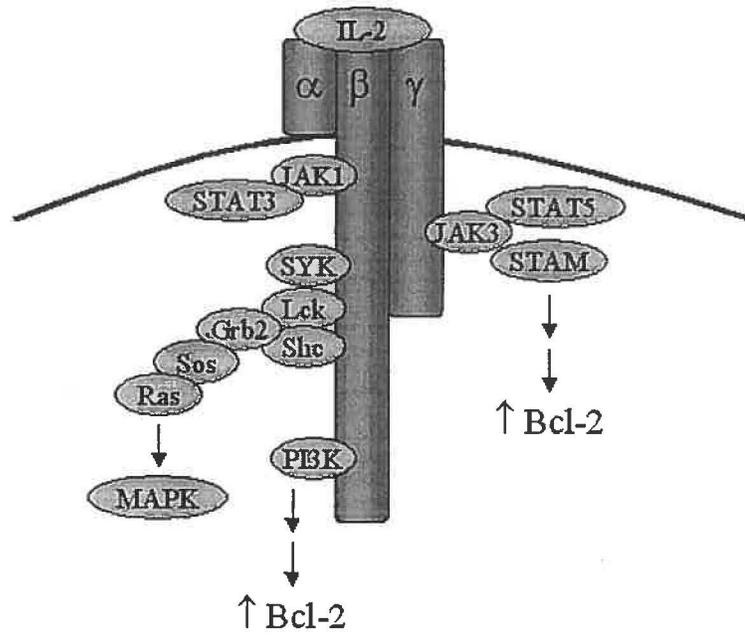
La sous-unité  $\gamma$  possède pour sa part 347 acides aminés dont 86 forment le domaine cytoplasmique, 29 forment le domaine trans-membranaire et 232 forment le domaine extra-cellulaire. Cette sous-unité est également partagée par les récepteurs IL-4, IL-7, IL-9 et IL-15 (Leonard et al., 1994, Boesteanu et al., 1997). L'IL-2R $\gamma$  est nécessaire pour la signalisation de l'IL-2 chez le lymphocyte T car des mutants de la chaîne  $\gamma$  perdent la capacité de proliférer en réponse à l'IL-2 (Arima et al., 1992, Zurawski et al., 1990). L'IL-2R $\gamma$  est aussi essentielle dans la régulation de l'homéostasie lymphoïde et dans plusieurs étapes du développement intra-thymique des lymphocytes T (Nakajima et al., 1997, He et al., 1997). La signalisation intra-cellulaire conduite par le complexe des sous-unités  $\beta\gamma$  comporte plusieurs voies potentielles de transduction de signal et plusieurs d'entre elles mènent à l'activation de gènes ou à l'induction directe de protéines anti-apoptotiques.

### **1.5 Signalisation intra-cellulaire de IL-2R**

Les voies de signalisation induites par l'IL-2 ont été établies chez le lymphocyte T, c'est pourquoi une autre cellule possédant le récepteur IL-2R n'a pas nécessairement des voies de signalisation IL-2 dépendantes identiques, n'ayant pas la même machinerie signalitique. Cependant, comme les grandes

lignes seront logiquement similaires (la plupart des cellules expriment un nombre impressionnant de molécules adaptatrices et signalitiques identiques), les voies de signalisation observées chez le lymphocytes peuvent servir de base pour d'autres systèmes (**figure 1**).

La voie Jak/Stat de l'IL-2R mène à l'activation rapide de gènes. Janus kinase1 (Jak1) and Janus kinase3 (Jak3) s'associent avec la région riche en sérine de l'IL-2R $\beta$  et la région c-terminale de l'IL-2R $\gamma$  respectivement (Miyazaki et al., 1994, Nelson et al., 1996). Suite au recrutement et à l'activation de Jak, il y aura activation de facteurs de transcription appelés Stat (Signal Transducer and Activator of Transcription) (Horvath et al., 1995, Stahl et al., 1995). L'IL-2 induit la phosphorylation des facteurs de transcription Stat3, Stat5a et Stat5b, leur permettant ainsi de dimériser pour traverser la membrane nucléaire et de s'associer aux séquences promotrices spécifiques GAS (Ihle et al., 1995, Darnell, 1997). Jak3 serait la seule molécule signalitique capable de s'associer directement avec l'IL-2R $\gamma$  et serait la kinase initiatrice de la cascade de phosphorylation où Jak1 ne servirait que d'amplificateur (Oakes et al., 1996, Kawahara et al., 1995). Il a été également observé que le recrutement de Jak2 était possible et que son domaine kinase serait capable de médier l'induction de Bcl-2 et de retarder l'apoptose (Sakai et Kraft, 1997). Une autre molécule, STAM (signal transducing adaptor molecule), s'associerait constitutivement à Jak3 et serait impliquée dans la croissance cellulaire et dans l'induction de c-myc après la stimulation du récepteur par l'IL-2 (Takeshita et al., 1996, Takeshita et al., 1997)



**Figure 1.** Signalisation intracellulaire du récepteur IL-2.

Deux autres protéines kinases, Lck et Syk (Minami et al., 1993), participent à la transduction du signal via leur interaction respective avec la région acide et la région riche en sérine de l'IL-2R $\beta$  et seraient impliquées dans la régulation de Ras (Gulbins et al., 1995), une petite protéine G participant à la voie des mitogen-activated protein kinases (MAP kinases).

L'IL-2 induit également l'activation de la phosphatidylinositol 3-kinase (PI 3-kinase) selon trois modèles d'activation différents: soit via les molécules adaptatrices IRS-1/IRS-2 recrutées et phosphorylées par Jak1 (Johston et al., 1995, Sharfe et Roifman, 1997), soit via l'interaction directe de la PI 3-kinase avec l'IL-2R $\beta$  (Truitt et al., 1994, Venkitaraman et Cowling, 1994) ou soit via une association indirecte avec les protéines Stat (Pfeffer et al., 1997). Peu importe le modèle retenu, l'activation de la PI3-kinase va mener au recrutement membranaire et à l'activation de la sérine/thréonine protéine kinase B (PKB) qui va elle-même activer la p70 S6 kinase (Reif et al., 1997).

## **1.6 Signalisation anti-apoptotique de l'IL-2R**

Peu importe le signal apoptotique reçu, la cellule devra vérifier si ses signaux de survie sont adéquats et si leur somme est suffisante pour contrer l'activation des caspases et le clivage d'éléments essentiels cellulaires. La signalisation du récepteur IL-2 peut lui fournir quelques-uns de ces signaux de survie. Le principal mécanisme anti-apoptotique induit par la signalisation de l'IL-

2R connu jusqu'à maintenant passerait par l'augmentation de l'expression de membres anti-apoptotiques des homologues Bcl-2, tels Bcl-2 lui-même et Bcl-x<sub>L</sub> (Miyazaki et al., 1995). Cette régulation d'expression de Bcl-2 et Bcl-x<sub>L</sub> passerait par la cascade d'activation PKB et p70 S6 kinase (Ahmed et al., 1997), mais cette régulation serait également possible via la sous-unité IL-2R<sub>γ</sub> (Mueller et al., 1996). La surexpression de Bcl-2 bloque l'apoptose en empêchant le relâchement du cytochrome c mitochondrial (Yang et al., 1997, Kluck et al., 1997) et pourrait également bloquer l'activation de la JNK (Rao et White, 1997). Une fois activée, la PKB serait également capable de phosphoryler et d'inactiver la protéine pro-apoptotique Bad qui contre les efforts anti-apoptotiques de Bcl-2 à la membrane mitochondriale (del Peso et al., 1997, Zha et al., 1996).

### **1.7 La signalisation induite par l'interféron-gamma (INF- $\gamma$ )**

L'INF- $\gamma$  est l'unique membre des interférons du groupe II et son récepteur est exprimé par presque tous les types cellulaires sauf les érythrocytes (Farrar et Shreiber, 1993). Sa signalisation précoce demande la participation de cinq protéines distinctes: les sous-unités INFGR1 et INFGR2 de son récepteur, Jak1, Jak2 et Stat1 (Schindler et Darnell, 1995, Bach et al., 1997). En absence d'INF- $\gamma$ , les sous-unités INFGR1 et INFGR2 ne sont pas associées mais leurs domaines intra-cellulaires sont spécifiquement liés à Jak1 et Jak2 respectivement (Bach et al., 1996, Kotenko et al., 1995, Sakatsume et al., 1995,

Kaplan et al., 1996). Sous forme d'homodimère, l'INF- $\gamma$  recrute deux sous-unités INFGR1 qui vont générer par restructuration des sites de liaison pour deux sous-unités INFGR2. La proximité des régions intra-cellulaires des différentes sous-unités va mener à l'activation, par auto- et trans-phosphorylation, des Jaks qu'elles transportent en débutant avec Jak2 (Fountoulakis et al., 1992, Greenlund et al., 1993, Walter et al., 1995). Une fois activées, les Jaks vont phosphoryler la sous-unité INFGR1 qui pourra recruter le facteur de transcription Stat1 qui sera par la suite phosphorylé à son tour pour son homodimérisation et sa translocation nucléaire (Greenlund et al., 1995, Heim et al., 1995, Shindler et al., 1992).

### **1.8 La fibrose induite par la bléomycine**

La bléomycine est une drogue chimiothérapeutique dont les effets secondaires significatifs aux poumons furent notés dès les premiers essais cliniques (Yagoda et al., 1972). Ces effets incluent la fibrose pulmonaire, ce qui en restreint son utilisation au niveau thérapeutique, mais qui en fait un modèle d'agression pulmonaire expérimentale de premier ordre. Les effets intracellulaires de la bléomycine, incluant la production de réactifs oxygénés (Adamson and Bowden, 1974) et l'induction de l'apoptose (Cooper et al., 1988), ont été observés chez les tissus normaux et malins. Le développement d'un modèle animal a permis d'établir les bases des mécanismes impliqués lors de la

fibrose pulmonaire malgré ses limitations (Ryu et al., 1998). L'élément clé de l'initiation de la fibrose pulmonaire est l'altération de l'épithélium pulmonaire au niveau de l'alvéole. Une fois l'alvéolite présente, il y a réorganisation de l'exsudat alvéolaire et incorporation de la fibroprolifération dans les parois alvéolaires. Des cycles répétés de la succession d'événements mentionnés ci-haut mèneront à un durcissement du parenchyme pulmonaire et à une perte de fonction de l'unité alvéolaire (Kuhn et al., 1989, Bitterman et Wendt, 1998).

Maintes études ont suggéré que le transforming growth factor  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) aurait un rôle à jouer dans le processus de fibrose pulmonaire induite par la bléomycine (Hoyt et Lazo, 1988, Westergren-Thorsson et al., 1993, Giri et al., 1993, Wang et al., 1999). Les niveaux pulmonaires de TGF- $\beta$  sont élevés après l'instillation intra-trachéale de bléomycine et suite au développement de la fibrose chez la souris (Hoyt et Lazo, 1988) ou le rat (Westergren-Thorsson et al., 1993). De plus, un anticorps anti-TGF- $\beta$  ou un récepteur antagoniste soluble de la cytokine atténue de façon significative l'accumulation de collagène induite par la bléomycine. Les principales sources de la production de TGF- $\beta$  induite par la bléomycine sont l'épithélium bronchique alvéolaire et les macrophages alvéolaires (Khalil et al., 1989). Certains effets du TGF- $\beta$  pourraient expliquer le déclenchement du cycle fibrotique: soit, son effet chimiotactique sur les fibroblastes et les neutrophiles (Postlethwaite et al., 1987, Hannigan et al., 1998) et sa capacité à induire l'apoptose des cellules épithéliales.

Une étude plus récente (Kuwano et al., 1999) a démontré l'importance du système Fas/FasL avec l'observation d'une réduction de la fibrose induite par la

bléomycine chez des souris déficientes pour Fas ou FasL comparativement à des souris de type sauvage. Ce même groupe a également démontré que le cross-linking du récepteur Fas par un anticorps anti-Fas était suffisant au déclenchement de l'apoptose cellulaire et de la fibrose (Hagimoto et al., 1997).

Il a également été démontré que les dommages à l'épithélium alvéolaire des souris exposées à la bléomycine étaient accompagnés de l'expression accrue de certaines protéines capables d'affecter la croissance et la prolifération cellulaire (Mishra et al., 2000). Ce groupe a démontré que l'exposition à la bléomycine augmentait de façon significative la concentration des protéines p53, une protéine induite par les dommages causés à l'ADN et p21<sup>WAF/PIC1</sup>, une protéine impliquée dans la réplication et la réparation génomique, notamment chez les cellules épithéliales de type II présentes dans les régions fibrotiques. De plus, la démonstration a été faite que la protéine p53 joue un rôle important dans l'agglomération du récepteur Fas en modifiant sa dynamique membranaire, permettant ainsi la signalisation apoptotique (Muller et al., 1997). Dans les cellules musculaires lisses, p53 favorise l'expression du récepteur Fas et sensibilise les cellules à l'apoptose induite par ce récepteur en assistant sa sortie du complexe Golgi (Bennet et al., 1998). Ce mécanisme de sensibilisation à l'apoptose pourrait également être effectif chez les cellules épithéliales pulmonaires étant donné qu'elles possèdent les deux protéines nécessaires, soit p53 et Fas. La production précoce de TGF- $\beta$  après instillation de bléomycine recruterait neutrophiles et fibroblastes, mais surtout, augmenterait l'expression de la protéine p53 qui faciliterait l'agglomération membranaire du récepteur Fas

**nécessaire à la sensibilisation des cellules épithéliales pulmonaires à l'apoptose, condition initiatrice des cycles fibrotiques.**

**L'analyse de ces études tend à démontrer que la protection contre la fibrose dépend directement de la réduction de l'apoptose chez les cellules épithéliales alvéolaires. Donc, si on réussit à bloquer un des événements lors de l'initiation de l'apoptose, on peut espérer voir une réduction significative de la fibrose induite par la bléomycine.**

### **1.9 Sérine/thréonine protéines kinases et l'apoptose**

**Les 10 dernières années de recherche sur l'apoptose ont permis d'identifier les composantes majeures du programme apoptotique et certains de leurs processus régulateurs. Même si l'apoptose est un phénomène cellulaire intrinsèque, elle demeure souvent sous la gouverne de facteurs extrinsèques comme les hormones de croissance, les récepteurs de surface et les différents stress extérieurs que la cellule peut affronter. Les effets des facteurs pro- ou anti-apoptotiques passent souvent par la modulation de l'état de phosphorylation d'éléments clés de la machinerie apoptotique. Les protéines kinases sont donc potentiellement impliquées autant dans les étapes précoces d'induction de l'apoptose que dans les étapes plus tardives de son exécution.**

**Les mitogen-activated protein kinases (MAPKs) forment un sous-groupe de la large famille des sérine/thréonine protéines kinases impliquées dans un**

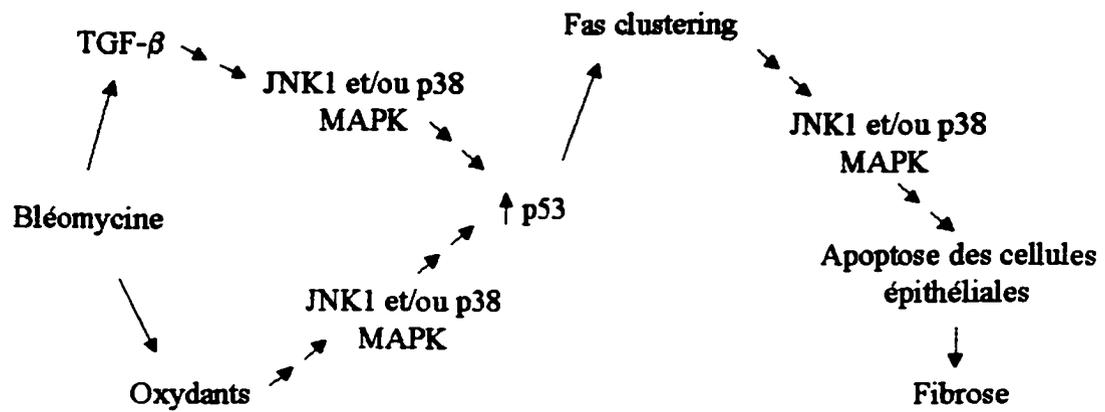
large spectre de réponses cellulaires incluant la prolifération, la différenciation et la survie cellulaire (Su et Karin, 1996). Ce sous-groupe inclus les p42/p44 extracellular signal-related kinases (ERK1 et ERK2) (Boulton et al., 1991), la c-Jun N-terminal protein kinase (JNK) appelée aussi la stress-activated protein kinase (SAPK) (Kyriakis et Woodgett, 1994) et la p38 MAP kinase (Han et al., 1994). Ces kinases constituent les étapes terminales de cascades signalitiques initiées par la liaison de facteurs de croissance/survie ou de récepteurs de mort (Widmann et al., 1999, Ichijo, 1999). En général, selon la littérature, l'activation de JNK ou de p38 MAP kinase est associée avec la promotion de l'apoptose tandis que l'activité des ERKs inhiberait l'apoptose (Xia et al., 1995, Buckley et al., 1999, Erhardt et al., 1999, Wang et al., 1998, Anderson et Tolkovsky, 1999).

L'effet de l'activation des ERKs se ferait sentir à plusieurs niveaux de la cascade signalitique apoptotique. Premièrement, les ERKs peuvent potentiellement inactiver par phosphorylation la caspase 9, une caspase capable d'activer la protéase clé caspase 3 après relâchement du cytochrome c mitochondrial. Même si la démonstration de la phosphorylation directe de la caspase 9 par les ERKs n'a pas encore été faite, il a déjà été démontré que leurs activités étaient directement reliées à l'inactivation de la caspase 9 par B-raf (Erhardt et al., 1999). Deuxièmement, l'homologue Bcl-2 pro-apoptotique Bad serait une seconde cible possible pour les ERKs (Sheid et Duronio, 1998). Bad est capable d'influencer l'intégrité membranaire mitochondriale et le relâchement du cytochrome c par son association avec Bcl-2 et Bcl-x<sub>L</sub>, association qui inhiberait leurs fonctions anti-apoptotiques respectives (Yang et

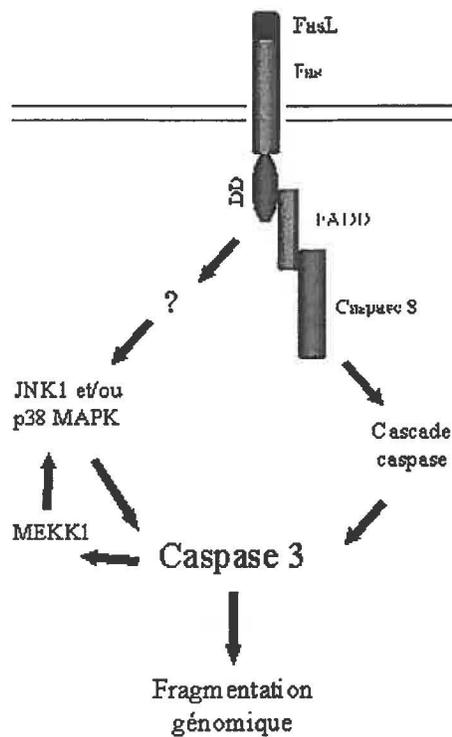
al., 1995). La phosphorylation de Bad sur la sérine 112 et la sérine 123 induit son association avec la protéine 14-3-3 et sa séquestration cytosolique (del Peso et al., 1997, Zha et al., 1996). Cette phosphorylation de Bad a été rapportée durant l'inhibition de l'apoptose de cellules hématopoïétiques par des cytokines et serait dépendante de l'activation de MEK, une kinase en amont des ERKs (Sheid et Duronio, 1998).

Les effets pro-apoptotiques, quoique certains, de l'activité de la JNK et la p38 kinase sont toutefois beaucoup moins détaillés et identifiés dans la chronologie des événements survenant lors de la mise en marche de la machinerie apoptotique. Toutefois, l'apoptose induite par la ligation de TRAIL (Herr et al., 1999), la ligation de FasL (Toyoshima et al., 1997), une hyperoxie (Buckley et al., 1999), l'oxide nitrique (No) (Jun et al., 1999), la cisplatine (Sanchez-Perez et al., 1998), un stress cellulaire (Nagata et Todokoro, 1999), la déplétion de facteurs de croissance (Xia et al., 1995), les rayons ultra-violetts (Franklin et al., 1998), certains agents chimiothérapeutiques (Seimiya et al., 1997) et les céramides (Jarvis et al., 1997) s'accompagnent toutes d'une augmentation de l'activité de JNK et p38 kinase. L'induction des voies JNK et p38 kinase est associée à l'activation de caspases effectrices, incluant la caspase 3 (Chaudary et al., 1999) même si les éléments intermédiaires ciblés par les kinases n'ont pas encore été identifiés (Ichijo, 1999). Une fois activée, la caspase 3 est elle-même capable d'amplifier la voie de signalisation JNK par le clivage et l'activation de MEKK1, une kinase en amont de JNK (Cardone et al., 1997). De plus, des inhibiteurs pharmacologiques spécifiques de JNK et de p38

kinase ont démontré une inhibition certaine de l'apoptose induite par un stress cellulaire (Frasch et al., 1998) et dans le même sens, des dominants négatifs de différentes composantes de la voie JNK peuvent bloquer l'apoptose induite par l'interaction Fas/FasL (Goillot et al., 1997). Il y a également un lien possible entre l'apoptose induite et l'expression de certains gènes régie par la signalisation des voies JNK et p38 kinase. Par exemple, lorsque l'on retire le facteur de croissance NGF d'une culture neuronale, il y a augmentation subséquente de l'expression membranaire de FasL résultant de l'activation de la voie JNK (Le-Niculescu et al., 1999). De plus, l'activité de la JNK est capable d'augmenter l'expression de p53 et d'augmenter l'apoptose p53 dépendante induite par le peroxyde (Buschmann et al., 2000). La **figure 2** inclut donc la participation à différents niveaux de la JNK et de la p38 MAP kinase dans les voies potentielles de la pathogénèse fibrotique tandis que la **figure 3** montre la participation de la JNK et/ou la p38 MAP kinase plus particulièrement dans le système Fas/FasL.



**Figure 2.** Schéma impliquant JNK-1 et/ou p38 MAPK dans la pathogénèse fibrotique induite par la bléomycine.



**Figure 3.** Implication de JNK-1 et/ou p38 MAPK dans la signalisation apoptotique du récepteur Fas.

## **2. Matériel et Méthodes**

### **2.1 Isolation de pneumocytes II primaires (Dobbs et al., 1986)**

Les cellules épithéliales de type II ont été isolées à partir de rats mâles Sprague Dawley (250-275g) anesthésiés avec une solution de kétamine/xylazine (87-13 mg / kilo) par injection intra-musculaire. La veine cave inférieure est sectionnée et la trachée canulée. On injecte ensuite 30 ml de solution II pH 7.2 (140mM NaCl, 5mM KCl, 2.5mM phosphate de sodium, 10mM HEPES, 2.0mM CaCl<sub>2</sub> et 1.3mM MgSO<sub>4</sub>) dans le ventricule droit cardiaque de façon à se débarrasser des cellules sanguines de la petite circulation via l'artère pulmonaire. Par la canule trachéale, les poumons sont lavés et rincés avec 60 ml de solution I pH 7.2 (140mM NaCl, 5mM KCl, 2.5mM phosphate de sodium, 10mM HEPES, 6mM glucose et 0.2mM EGTA), puis 30 ml de solution II. Les poumons sont ensuite gonflés avec 10 ml de solution II, la canule est bouchonnée et le bloc cœur-poumons est retiré de la cage thoracique. Une fois retirés, les poumons sont perfusés avec 40 ml d'une solution d'élastase (4 unités / ml de solution II) afin de favoriser le décollement de l'épithélium du tissu interstitiel. Ensuite, on sectionne et conserve que les lobes pulmonaires que l'on émince à l'aide de ciseaux. 5 ml de Dnase 1 pancréatique bovine (250µg / ml de solution II) seront ensuite ajoutés pour empêcher l'aggrégation cellulaire. Les morceaux pulmonaires seront agités à 37°C jusqu'à ce que 30 minutes à partir

de la perfusion de l'élastase se soient écoulées. La digestion enzymatique est ensuite stoppée par l'ajout de 5 ml de sérum foetal bovin 10%. La suspension cellulaire est filtrée sur trois épaisseurs de gaze, puis un filtre de nylon de 100µm. Les filtres sont lavés avec 30ml de solution II et les cellules sont récupérées dans un tube de 50ml contenant 10ml d'une solution de lectine *Bandeirea Simplicifolia* (5 mg/ml de solution II) qui sera incubé 30 minutes à 37°C pour favoriser l'agglomération des cellules contaminantes portant des récepteurs lectine (lymphocytes et macrophages). Suite à l'incubation, les cellules sont passées sur un filtre de nylon de 25µm, récupérées dans un autre tube de 50 ml, centrifugées à 4 x g pendant 6 minutes et puis resuspendues dans 10 ml de milieu RPMI sans sérum. Les pneumocytes II seront ensuite enrichis par une adhésion aux IgG des macrophages résiduels par leurs récepteurs Fc. Cette technique consiste à couvrir une boîte de pétri bactériologique avec 5ml d'une solution IgG de rat 0.5% diluée dans un tampon Tris 50mM pH 9.2 pendant 16 heures à 4°C, la rincer 3 fois avec 5 ml de PBS et deux fois avec 5 ml de RPMI incomplet puis à y déposer la suspension cellulaire (5 ml par boîte de pétri) pour une période de 30 minutes à 37°C. On récupère ensuite les cellules non-adhérées que l'on centrifuge 6 minutes à 4 x g et que l'on resuspend dans 10 ml de milieu RPMI 10% sérum bovin foetal, puis on incube la resuspension dans une boîte de pétri de culture pendant 15 minutes à 37°C pour se débarrasser des fibroblastes contaminants par adhérence différentielle. Finalement, on récupère la population de cellules non-adhérées constituées à 95% de cellules épithéliales pulmonaires de type II prêtes à être

mises en culture. La période d'adhérence avant de débiter les expériences est d'environ 48 heures. Le rendement obtenu est d'environ  $10 \times 10^6$  cellules par rat.

## **2.2 Modulation et immuno-détection de IL-2R $\gamma$**

Les pneumocytes de type II sont exposés ou non à l'INF- $\gamma$  (400U/ml de RPMI incomplet 0.1% BSA) pendant 16, 24 ou 48 heures et sont ensuite recueillis en même temps que les cellules contrôles cultivées pendant des temps correspondant dans du RPMI incomplet 0.1% BSA pour les analyses comparatives d'expression protéique effectuées par immunobuvardage.

Pour les analyses par microscopie confocale, les cellules sont exposées ou non à l'INF- $\gamma$  (400U/ml de RPMI incomplet 0.1% BSA) pendant 16 heures (temps d'exposition optimal déterminé par immunobuvardage).

### **2.2.1 Immunobuvardages**

Les cellules cultivées et traitées, pour chaque condition expérimentale dans des plaques de six puits (35 mm de surface par puit), sont grattées et lysées 30 minutes sur la glace dans un tampon de lyse (50mM Tris pH 7.4, 0.1% Triton®X-100, 1mM EDTA, 1mM EGTA, 0.1mg/ml aprotinine, 1mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>,

10mM NaF, 1mM EDTA, 1mM Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>, 1mM PMSF, cocktail anti-protéase 1X). Les lysats sont ensuite centrifugés à 13 000 RPM pour 10 minutes à 4°C pour récupérer les surnageants, dont les concentrations protéiques seront dosées selon la méthode de Ponceau (Pesce et Strande, 1973), qui seront aliquotés en aliquots de 25µg. Les échantillons protéiques totaux seront séparés selon leur poids moléculaire suite à une électrophorèse sur un gel 7.5% polyacrylamide 0.1% SDS à un courant constant de 60 mAmp pendant 2 heures puis transférés sur une membrane de PVDF pendant 1 heure 30 minutes à un voltage constant de 100V. Le blocage des interactions non-spécifiques s'est fait en trempant la membrane dans une solution de blocage TBS (10mM Tris, 100mM NaCl, pH 7.5) contenant 5% de lait déshydraté et 0.1% Tween 20 pendant 2 heures à température pièce. La membrane est ensuite incubée 12 heures à 4°C avec un anticorps anti-rat IL-2R<sub>γ</sub> ou anti-rat IL-2R<sub>β</sub> (les deux de chez Santa Cruz Biotechnology) produits chez le lapin dilués 1/1000 dans la solution de blocage. La membrane est ensuite lavée trois fois 10 minutes dans du TBS 0.1% Tween 20 puis incubée 2 heures à température pièce avec un anticorps anti-lapin conjugué à la peroxydase produit chez l'âne (NA934, Amersham Pharmacia Biotech). La membrane est encore une fois lavée à trois reprises pendant 10 minutes dans du TBS 0.1% Tween 20. Les bandes spécifiques sont ensuite révélées en utilisant l'ECL Western Blotting Detection Reagents selon les instructions du fabricant et sont finalement quantifiées en valeur relative en utilisant un programme d'analyse densitométrique (NIH image , version 1.61).

### **2.2.2 Microscopie confocale**

Les cellules épithéliales pulmonaires de type II isolées et mise en culture ont été examinées avec l'objectif 40X à immersion (Nikon) d'un microscope inversé (Nikon) couplé à un microscope confocal (NORAN Instrument Inc., Middleton, WI) équipé d'un laser au krypton/argon. Pour cet usage, les pneumocytes isolés ont été déposés dans les 4 puits de chaque lame de culture Labtech (Nalge Nunc International) et ont reçu les traitements mentionnés à la section 2.2. Les cellules furent fixées avec 4% paraformaldéhyde pendant 1 heure à température pièce, rincées 3 fois avec du PBS, puis les aldéhydes libres furent captés par un tampon PBS 50mM de NH<sub>4</sub>Cl. Les cellules furent rincées 3 fois avec du PBS et furent soumises à la perméabilisation et au blocage des sites non-spécifiques dans le tampon PTB (0.1% Triton®X-100, 5% BSA dans du PBS) pendant 30 minutes. Les cellules sont ensuite incubées avec un anticorps anti-rat IL-2R<sub>γ</sub> (2µg/ml) ou des IgG non-spécifiques (2µg/ml) produit chez le lapin dilués dans le tampon PTB. Après avoir lavé les cellules trois fois avec du PBS, celles-ci furent incubées 1 heure avec un anticorps anti-IgG de lapin produit chez la chèvre et conjugué avec de la FITC à une dilution de 1/200 dans du PTB. Les lames furent une dernière rincées dans du PBS et furent montées avec du glycérol pour leur examination au microscope. Pour chacune des conditions, 15 champs aléatoires ont été analysés avec un programme d'analyse d'image (Intervision 2D analysis, NORAN Instruments) et ce, pour trois isolation de cellules épithéliales pulmonaires distinctes. L'expression relative de

l'IL-2R $\gamma$  est représentée par le pourcentage de pixels contenu entre 20 et 255 d'une échelle d'intensité colorimétrique donnée dans un champs donné. La valeur 20 fut choisie arbitrairement comme la valeur représentant la fluorescence basale cellulaire.

### **2.3 Induction et mesure de l'apoptose cellulaire *in vitro***

L'apoptose des cellules épithéliales de type II est induite par 24 heures d'exposition à la bléomycine (50 $\mu$ g/ml dans du RPMI supplémenté de 0.1% BSA). Certaines cellules ont reçu 16 heures de pré-exposition à l'INF- $\gamma$  (400U/ml de RPMI complet), à l'IL-2 (60ng/ml de RPMI complet), ou à la combinaison des deux cytokines avant le traitement à la bléomycine. Dans les essais de fragmentation génomique, une condition expérimentale supplémentaire consiste en l'ajout d'un anticorps anti-IL-2R neutralisant (le NDS-61 à 3 $\mu$ g/ml) à la combinaison INF- $\gamma$ /IL-2.

Pour les essais d'apoptose induite par la bléomycine en présence de l'inhibiteur spécifique de la p38 MAPK (le SB203580) ou celui des MEKs (le PD-98059), les cellules épithéliales sont exposées 24 heures à la bléomycine (50 $\mu$ g/ml de RPMI incomplet 0.1% BSA) avec des concentrations croissantes de l'inhibiteur testé (5, 20, 40 et 50 $\mu$ M).

### **2.3.1 Mesure de l'activité Caspase 3**

Les cellules adhérentes et non-adhérentes ont été recueillies et centrifugées. Le culot cellulaire a été resuspendu et lysé dans 100µl de tampon de lyse (10mM Tris pH 7.5, 130mM NaCl, 1% Triton®X-100, 10mM NaPi, 10mM NaPPi, 5mM DTT) pendant 30 minutes sur la glace. Les échantillons sont ensuite centrifugés à 13000 rpm pour 10 minutes à 4°C et le surnageant est conservé pour l'essai enzymatique. 40µg de l'extrait protéique, dosé selon la méthode de Ponceau, est incubé avec 20µg du substrat fluorescent de la caspase 3 (Ac-DEVD-AFC) et 1ml de tampon de réaction (10mM HEPES pH 7.4, 2mM EDTA, 0.1% CHAPS, 5mM DTT) pour 2 heures à 37°C. La fluorescence maximum émise, selon un spectre d'émission de 400 à 600nm, de l'AFC lorsque soumis à une longueur d'onde d'excitation de 395nm est mesurée avec un spectrofluorimètre ( Hitachi F-2000). La fluorescence émise sera considérée comme proportionnelle à l'activité caspase 3.

### **2.3.2 Essai TUNEL**

L'essai terminal deoxynucleotidyltransferase-mediated dUTP nick end labeling (TUNEL) a été effectué sur des pneumocytes II, en culture dans des Labtech 4 puits, ayant reçu ou non le pré-traitement INF- $\gamma$  et/ou IL-2 pendant 16 heures avant d'être incubés 24 heures avec de la bléomycine. Les cellules sont

ensuite fixées avec 4% paraformaldéhyde pendant 1 heure température pièce puis incubées avec une solution de blocage des peroxydases endogènes (0.3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dans du méthanol) pour une autre heure à température pièce. Suite au blocage, les cellules sont perméabilisées 2 minutes sur glace avec 0.1% Triton®X-100 dilué avec PBS. Vient ensuite le marquage des fragments génomiques avec la terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) dans le tampon TdT contenant 2µM de fluorescéine 16-uridine triphosphate pendant 1 heure à 37°C. Après le marquage primaire, les cellules sont recouvertes avec 50µl d'un anticorps anti-fluorescéine conjugué à la peroxydase (converter-POD) pour 30 minutes à 37°C. Finalement, les cellules sont mises en présence d'un substrat colorimétrique de la peroxydase, soit 5mg de 3,3'-Diminobenzidine (DAB) dans 100 ml PBS avec 0.3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, avant de recevoir une contre-coloration nucléaire au 4',6-Diamino-2-Phénylindole (DAPI). Les cellules seront ensuite analysées par microscopie visible et à fluorescence. Une cellule sera considérée TUNEL positive si son noyau est peroxydase positif (dépôt brun) en lumière visible et DAPI négative sous lampe UV. Pour chaque condition en duplicata, un décompte cellulaire de 20 champs aléatoires (environ 1000 cellules) sera effectué et ce, par deux lecteurs différents lors de trois isolations cellulaires distinctes.

## **2.4 Modèle animal**

Nous avons utilisé 4 rats adultes (300-325 gr.) Spragues Dawley, anesthésiés avec une injection intra-musculaire de kétamine/xylazine (87-13 mg / kilo), par condition expérimentale. Il y avait 4 conditions expérimentales: soit PBS, soit bléomycine (1000U), soit  $\text{INF-}\gamma$  (2500U)/IL-2 (1500U) ou soit bléomycine et  $\text{INF-}\gamma$ /IL-2. Toutes les dilutions ont été faites dans du PBS pour un volume final de 300  $\mu\text{l}$ . Le transport aux poumons des molécules s'est fait par instillation intra-trachéale, c'est-à-dire par un dégagement chirurgical de la trachée suivi d'une injection de 300  $\mu\text{l}$  de solution dans la trachée et d'une suture de l'incision, le tout en conditions aseptiques minimales. Une fois réveillés suite à la chirurgie, les rats recevront nourriture et eau *ad libidum* jusqu'à leur sacrifice commun établi à 5 jours post-instillation. Lors du sacrifice, les rats sont encore une fois anesthésiés avec la solution de kétamine/xylazine (87-13 mg / kilo).

Pour chaque rat, nous avons ensuite effectué un lavage broncho-alvéolaire avec 10 ml de PBS injecté et recueilli via une canule intra-trachéale puis procédé à la perfusion de la circulation pulmonaire par l'injection de 30 ml de PBS au ventricule droit cardiaque. Suite à la perfusion, nous avons dégagé et rincé les poumons dans du PBS avant de le découper en morceaux d'environ 0.8cm<sup>2</sup>. Aléatoirement, deux morceaux par rats ont été sélectionnés pour recevoir les traitements d'inclusion paraffinique. Tous les autres morceaux ont été mis rapidement sur glace dans des tubes en verre de 10 ml pour devenir un

homogénat tissulaire suite au passage subséquent d'un Polytron. 500µl de l'homogénat tissulaire a été lysé avec 500µl du tampon de lyse 2X nécessaire à l'obtention des extraits protéiques pour les essais caspase 3 (20mM Tris pH 7.5, 260mM NaCl, 2% Triton®X-100, 20mM NaPi, 20mM NaPPi, 5mM DTT) et un autre 500µl de l'homogénat tissulaire a été lysé avec le tampon de lyse 2X nécessaire à l'obtention des extraits protéiques pour les immunobuvardages (100mM Tris pH 7.4, 0.2% Triton®X-100, 2mM EDTA, 2mM EGTA, 0.2mg/ml aprotinine, 2mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 20mM NaF, 2mM EDTA, 2mM Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>, 2mM PMSF, cocktail anti-protéase 2X).

#### **2.4.1 Mesure de l'activité Caspase 3**

40µg d'extrait protéique de chaque condition expérimentale obtenus selon la méthode décrite à la section 2.4 seront dosés pour l'activité Caspase 3 selon la méthode décrite à la section 2.3.1.

#### **2.4.2 Inclusion et coupes histologiques pulmonaires**

Les épitopes antigéniques des morceaux de poumons choisis ont été fixés dans une solution PBS contenant 4% de paraformaldéhyde-pendant 12 heures à 4°C et ont été graduellement déshydratés par des bains successifs de 30 minutes contenant les solutions suivantes: 75% EtOH, 85% EtOH, 95% EtOH,

95% EtOH, 100% EtOH et 100% EtOH. L'alcool est retiré des morceaux pulmonaires par deux bains de 30 minutes successifs contenant du toluène. Les morceaux de poumons sont ensuite incubés 12 heures dans un bain de paraffine chauffé à 55°C. On procède finalement à l'inclusion finale des morceaux pulmonaire dans des cubes de paraffine refroidie qui seront ultérieurement coupés avec un microtome en tranches de 5µm déposées sur des lames de verre.

#### **2.4.3 Marquage TUNEL**

Les essais TUNEL effectués sur les coupes histologiques pulmonaires débutent par la déparaffination partielle de ces coupes avec deux bains successifs au toluène de 5 minutes chacun suivis d'une réhydratation progressive des tissus par des bains successifs de 5 minutes avec les solutions suivantes: 100% EtOH, 100% EtOH, 95% EtOH, 85% EtOH, 70% EtOH, 50% EtOH et finalement PBS. Les étapes suivantes sont exactement les mêmes qu'effectuées avec les cellules en culture à la section 2.3.2, ormis la fixation à la paraformaldéhyde déjà incluse dans la préparation des coupes tissulaires.

#### **2.4.4 Immunobuvardages**

Les extraits protéiques pulmonaires totaux de chaque condition expérimentale obtenus à la section 2.4 seront soumis à une électrophorèse et à un transfert selon la méthode décrite à la section 2.2.1. Les temps d'incubation des anticorps primaires et secondaires ainsi que les étapes de révélation par chemiluminescence sont identiques à ceux utilisés à la section 2.2.1, seuls la nature et la dilution des anticorps primaires et secondaires différeront. L'anticorps anti-p-JNK1 produit chez la souris (G-7 sc-6254, Santa Cruz Biotechnology) nécessite une dilution 1/500 dans la solution de blocage TBS contenant 5% de lait déshydraté et 0.1% de Tween 20. L'anticorps anti-p-p38 MAPK produit chez la souris (D-8 sc-7973, Santa Cruz Biotechnology) nécessite également une dilution 1/500 dans la solution de blocage TBS contenant 5% de lait déshydraté et 0.1% de Tween 20. L'anticorps anti-p-ERK1/ERK2 produit chez la souris (Thr202/Tyr204 #91065, New England BioLabs Inc.) nécessite pour sa part une dilution 1/1000 dans la solution de blocage TBS contenant 5% de lait déshydraté et 0.1% de Tween 20. L'anticorps anti-Fas produit chez le lapin (M-20 sc-716, Santa Cruz Biotechnology) nécessite également une dilution 1/1000 dans la solution de blocage TBS contenant 5% de lait déshydraté et 0.1% de Tween 20. Un anticorps anti-IgG1 de souris lié à la peroxydase (NA931, Amersham Pharmacia Biotech) dilué 1/1000 dans la solution de blocage TBS contenant 5% de lait déshydraté et 0.1% de Tween 20 est utilisé avec les anticorps anti-p-JNK1 et anti-p-ERK1/ERK2. L'anticorps secondaire de l'anti-p-p38 MAPK est un anti-

**IgM de souris lié à la peroxydase (A8786, Sigma) dilué 1/2000 dans la solution de blocage TBS contenant 5% de lait déshydraté et 0.1% de Tween 20. Finalement, l'anticorps secondaire utilisé avec l'anti-Fas est un anti-IgG de lapin (NA934, Amersham Pharmacia Biotech) dilué 1/1000 dans la solution de blocage TBS contenant 5% de lait déshydraté et 0.1% de Tween 20.**

## 3. Résultats

### 3.1 Modulation du récepteur IL-2R $\gamma$ par l'INF $\gamma$

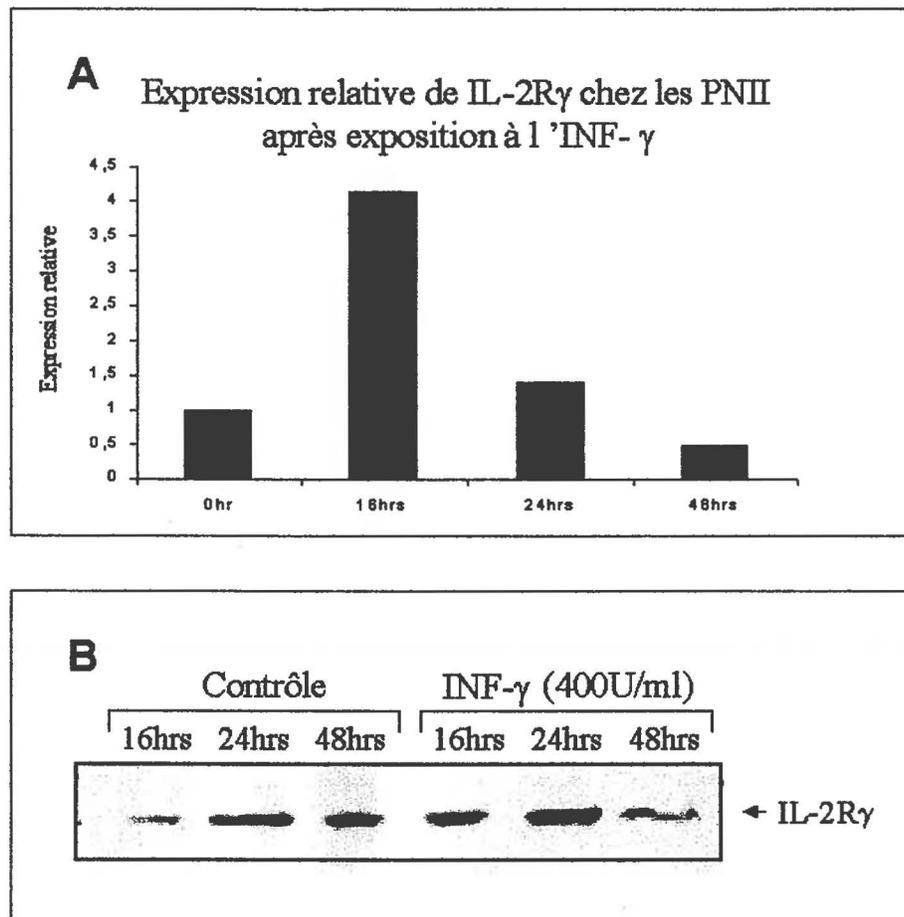
La présence de IL-2R $\beta\gamma$ , le complexe de transduction du signal, est capitale à la fonctionnalité du récepteur dans les cellules lymphoïdes (section 1.4 et 1.5). Notre laboratoire a déjà rapporté que l'INF $\gamma$  augmentait la transcription des sous-unités  $\beta$  et  $\gamma$  du récepteur IL-2R chez les cellules épithéliales pulmonaires (Lesur et al., 1997). De plus, des études de migration cellulaire démontrent que l'INF $\gamma$  est essentiel à la fonctionnalité du récepteur IL-2R chez les cellules épithéliales pulmonaires de type II (manuscrit en préparation). La préincubation des cellules avec l'INF $\gamma$  a permis d'observer une migration cellulaire IL-2 dépendante significative (environ 2/3 d'une migration EGF dépendante, une cytokine reconnue pour ses capacités chemoattractantes chez les cellules épithéliales) réversible par la neutralisation spécifique de l'IL-2R. Nous avons donc vérifié si l'INF $\gamma$  était capable de moduler l'expression protéique du complexe IL-2R $\beta\gamma$ .

Effectivement, l'INF $\gamma$  semble augmenter de 2.5 à 4 fois l'expression protéique de la sous-unité IL-2R $\gamma$  chez les cellules épithéliales pulmonaires de type II selon la méthode de quantification utilisée, tel que montré à la figure 4 et

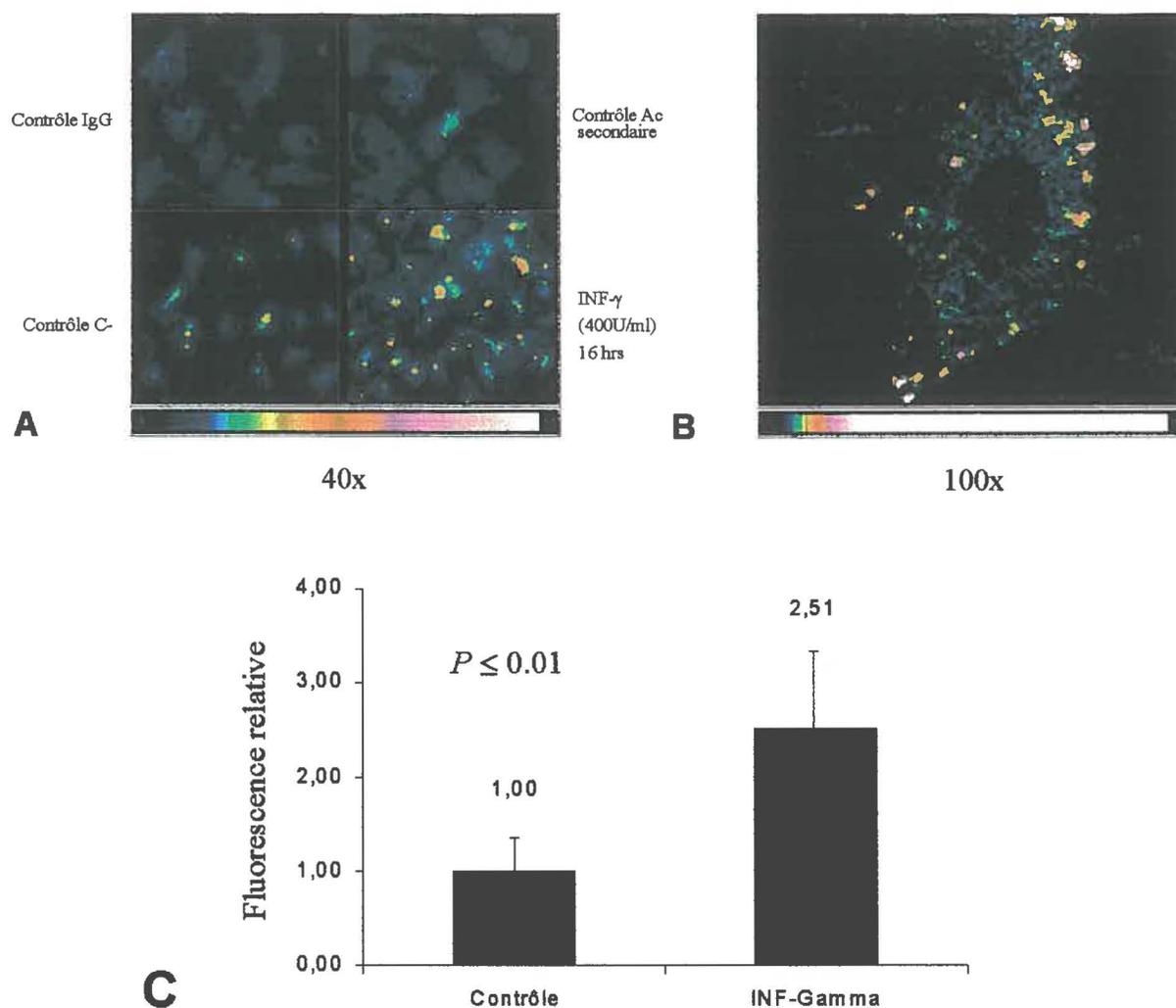
à la **figure 5**. Par contre, l'expression de la sous-unité IL-2R $\beta$  n'est pas modulée par l'INF- $\gamma$  au niveau de l'immunodétection (**figure 6**). Les immunobuvardages montrent une surexpression maximale de l'IL-2R $\gamma$  d'environ 4 fois le niveau basal après 16 heures de traitement à l'INF- $\gamma$ , tandis que les études d'immunofluorescence confirment l'induction de l'expression de l'IL-2R $\gamma$  par l'INF- $\gamma$ , mais montrent une augmentation plus modeste, soit d'environ 2.5 fois. Les études en microscopie confocale nous ont également permis de confirmer la présence membranaire de la sous-unité IL-2R $\gamma$ , présence nécessaire à la transduction du signal après liaison du ligand au récepteur.

### **3.2 Inhibition de l'apoptose cellulaire *in vitro***

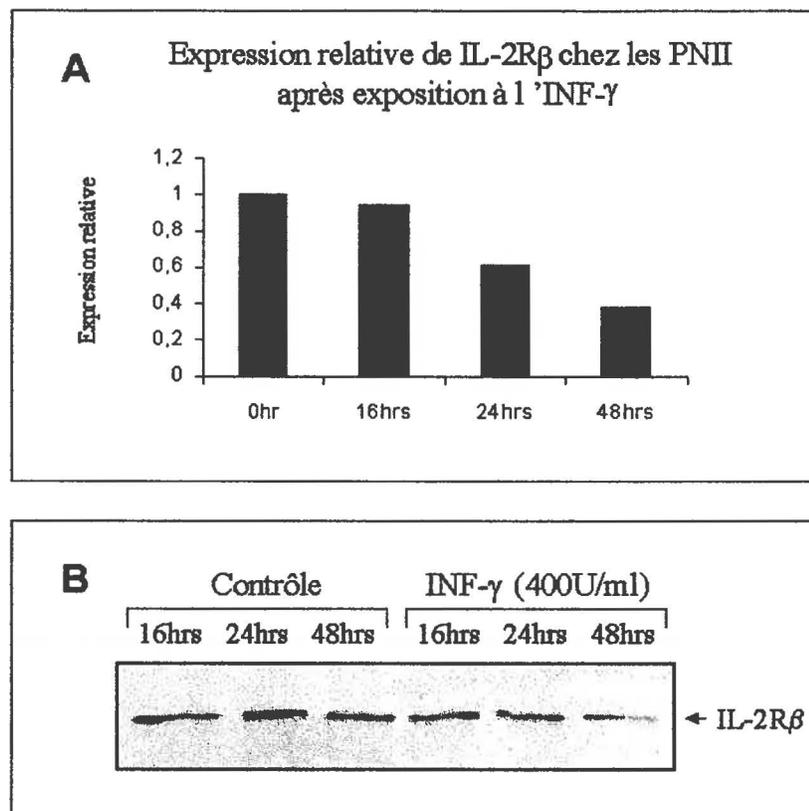
La démonstration que l'INF- $\gamma$  module l'expression de l'IL-2R $\gamma$  et l'établissement des conditions optimales de surexpression nous permettent de vérifier notre hypothèse, soit que l'IL-2 inhiberait l'apoptose induite chez l'épithélium pulmonaire. Premièrement, des études *in vitro* effectuées sur des pneumocytes de type II en culture démontrent que la combinaison INF- $\gamma$  et IL-2 est capable de prévenir partiellement l'apoptose induite par la bléomycine. En effet, l'activation de la protéase apoptotique pivot caspase 3, mesurée par le clivage d'un substrat spécifique, est réduite de presque 25% lorsque l'exposition à la bléomycine est précédée par l'incubation des cellules avec la combinaison INF- $\gamma$  et IL-2. Un pré-traitement avec l'INF- $\gamma$  seul ou l'IL-2 seul avant l'exposition



**Figure 4.** Modulation de l'expression de l'IL-2R $\gamma$  par les cellules épithéliales pulmonaires de type II lorsqu'exposées à l'INF- $\gamma$  (400U/ml) de 16 à 48 heures. Les cellules sont lysées, les extraits protéiques normalisés et chargés sur gel pour un immunobuvardage comme décrit dans la section méthodes (2.2.1) avec un anticorps anti-rat IL-2R $\gamma$ . Nous avons l'expression relative de la sous-unité IL-2R $\gamma$  selon le temps d'exposition en A, la valeur relative correspond au ratio des densité optique obtenu par l'analyse des bandes spécifiques montrées en B, des cellules exposées à l'INF- $\gamma$  sur celles exposées au milieu de culture seul et ce, pour des temps d'exposition similaires.



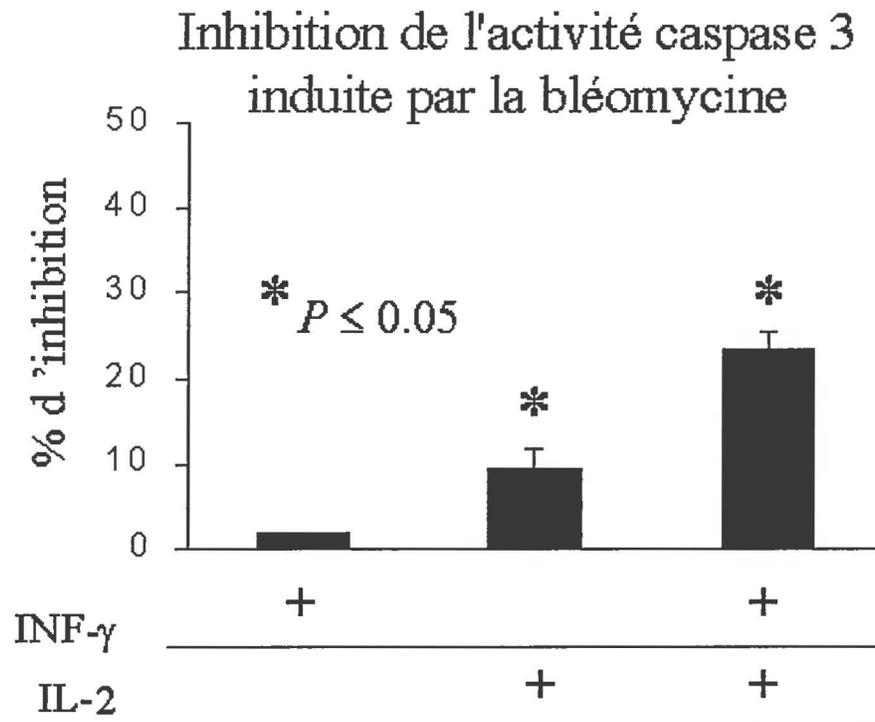
**Figure 5.** Modulation de l'expression de l'IL-2R $\gamma$  par les cellules épithéliales pulmonaires de type II lorsqu'exposées à l'INF- $\gamma$  (400U/ml) pendant 16 heures. Les cellules ayant reçu ou non de l'INF- $\gamma$  pour 16 heures sont marquées avec un anticorps spécifique de l'IL-2R $\gamma$  et un anticorps secondaire conjugué à la FITC comme montré en **A** et en **B**. La quantification du marquage spécifique (**C**) est effectuée par l'analyse d'images obtenues au microscope confocal tel que mentionné dans la section méthode (2.2.2).



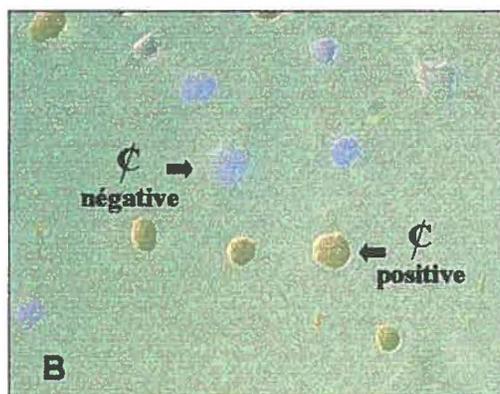
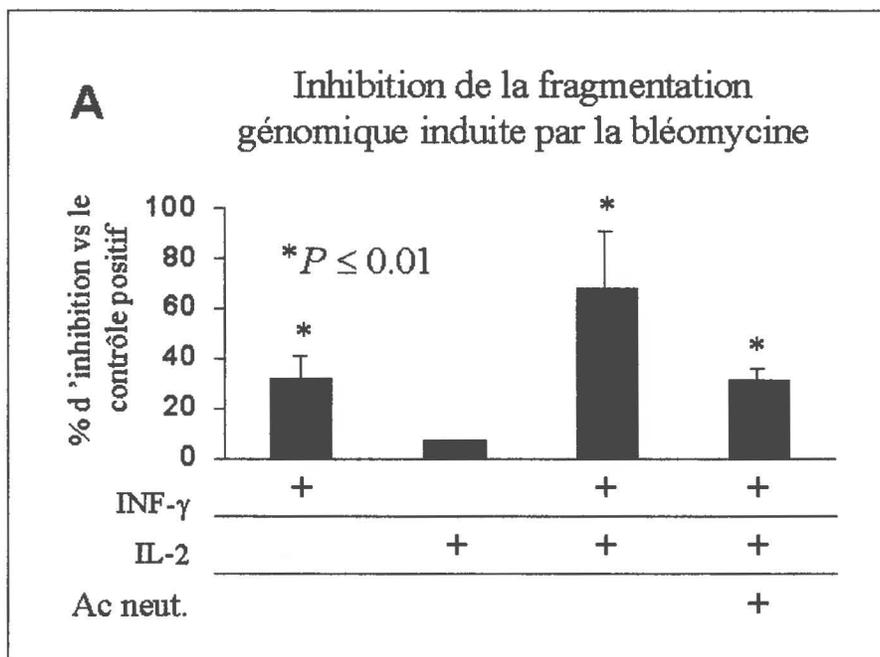
**Figure 6.** Modulation de l'expression de l'IL-2R $\beta$  par les cellules épithéliales pulmonaires de type II lorsqu'exposées à l'INF- $\gamma$  (400U/ml) de 16 à 48 heures. Les cellules sont lysées, les extraits protéiques normalisés et chargés sur gel pour un immunobuvardage comme décrit dans la section méthodes (2.2.1) avec un anticorps anti-rat IL-2R $\beta$ . Nous avons l'expression relative de la sous-unité IL-2R $\beta$  selon le temps d'exposition en **A**, la valeur relative correspond au ratio des densité optique obtenu par l'analyse des bandes spécifiques montrées en **B**, des cellules exposées à l'INF- $\gamma$  sur celles exposées au milieu de culture seul et ce, pour des temps d'exposition similaires.

des cellules à la bléomycine n'ont pas réduit significativement l'activation de la caspase 3 avec environ 2% et 10% d'inhibition respectivement (**figure 7**).

Nous avons confirmé l'effet anti-apoptotique de la combinaison  $\text{INF-}\gamma$  et IL-2 sur la fragmentation génomique des cellules épithéliales pulmonaires induite par la bléomycine en essai TUNEL, essai consistant à marquer les extrémités des fragments génomiques avec une peroxydase qui produira un dépôt brun dans les noyaux positifs suite au clivage du substrat DAB en présence de peroxyde (**figure 8**). L'inhibition de la fragmentation génomique est de  $68.33\% \pm 22.90$  lorsqu'il y eut pré-exposition à la combinaison  $\text{INF-}\gamma$  et IL-2 avant le traitement bléomycine, de  $32.99\% \pm 8.46$  avec l' $\text{INF-}\gamma$  seul en pré-exposition, de  $6.96\% \pm 0.39$  avec l'IL-2 seul en pré-exposition et finalement de  $31.38\% \pm 4.93$  avec la combinaison  $\text{INF-}\gamma$  et IL-2 en présence d'un anticorps neutralisant spécifique à la sous-unité  $\text{IL-2R}\alpha$ . L'effet combinatoire des deux cytokines est beaucoup plus marqué en essai TUNEL que celui rapporté sur l'activité de la caspase 3.



**Figure 7.** Inhibition de l'activité caspase 3 induite par la bléomycine chez les cellules épithéliales pulmonaires de type II. Toutes les cellules ont été exposées à la bléomycine (50 $\mu$ g/ml) avec ou sans pré-traitement de 16 heures à l'INF- $\gamma$  (400U/ml), IL-2 (60ng/ml) ou la combinaison des deux cytokines comme décrit dans la section méthodes (2.3). Les extraits protéiques normalisés ont été incubés avec un substrat de la caspase 3 (Ac-DEVD-AFC) qui relâche la fonction fluorescente AFC quantifiable au spectrofluorimètre lorsque clivée par l'enzyme. Les pourcentages d'inhibition présentés sont ceux de chaque condition expérimentale versus le contrôle positif bléomycine seule.



**Figure 8.** Inhibition de la fragmentation génomique induite par la bléomycine chez les cellules épithéliales pulmonaires de type II. Toutes les cellules ont été exposées à la bléomycine (50 $\mu$ g/ml) avec ou sans pré-traitement de 16 heures à l'INF- $\gamma$  (400U/ml), IL-2 (60ng/ml) ou la combinaison des deux cytokines avec ou sans la présence d'un anticorps anti-IL-2R neutralisant (NDS-61) comme décrit dans la section méthodes (2.3). Les pourcentages d'inhibition présentés en (A) sont ceux de chaque condition expérimentale versus le contrôle positif bléomycine seule. Les cellules sont traitées pour un essai TUNEL avec contre-coloration nucléaire DAPI comme décrit dans la section méthode (2.3.2). Une cellule est considérée TUNEL positive si elle possède un marquage nucléaire positif à la peroxydase et négatif pour le DAPI comme montré en (B).

### **3.3 Inhibition de la caspase 3 *in vivo***

Le pourcentage élevé d'éosinophiles et de neutrophiles dans le décompte cellulaire des lavages broncho-alvéolaires des rats ayant reçu de la bléomycine avec ou sans la combinaison INF- $\gamma$ /IL-2 (**figure 9**) nous confirme que tous les poumons de rats ont été exposés à la bléomycine. Nous avons vérifié si la combinaison INF- $\gamma$ /IL-2 était capable d'inhiber l'activation de la caspase 3 dans un modèle animal d'apoptose pulmonaire induite par la bléomycine (**figure 10**). L'instillation de bléomycine a induit environ 2.17 fois plus d'activité caspase 3 pulmonaire que l'instillation PBS contrôle après 5 jours. Pour sa part, l'instillation INF- $\gamma$ /IL-2 n'a pas modulé significativement l'activité caspase 3 par rapport à l'instillat PBS. Cependant, nous avons constaté que la combinaison cytokinique instillée en même temps que la bléomycine a un effet inhibiteur sur l'activité caspase 3 induite par la bléomycine, une inhibition très intéressante et significative d'environ  $76\% \pm 7.25$ .

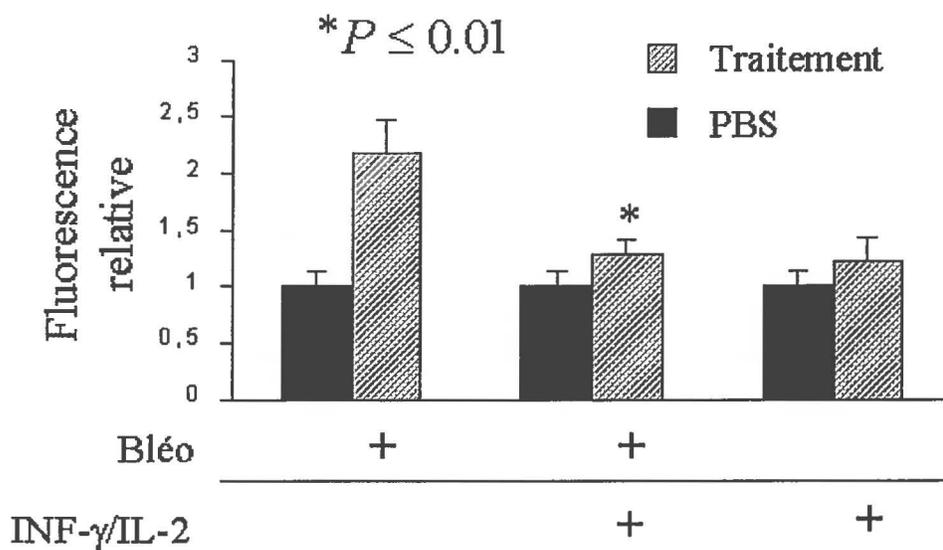
Des essais TUNEL conduits sur des coupes pulmonaires nous ont permis de visualiser qualitativement l'effet de la combinaison INF- $\gamma$ /IL-2 sur la fragmentation génomique induite par la bléomycine *in vivo* (**figure 11**). L'utilisation quantitative de cette méthode s'avèrerait inabordable, tant au niveau financier qu'au niveau de la charge de travail nécessaire au traitement des centaines de coupes tissulaires indispensables à la validation statistique des données.

	Cellules (million)		% Macrophages		% Lymphocytes	
	Moy.	E. Type	Moy.	E. Type	Moy.	E. Type
PBS	0,35	0,07	85,88	1,59	9,00	1,77
Bléo	1,75	0,35	47,88	6,54	5,50	4,60
INF- $\gamma$ /IL-2 + Bléo	2,40	0,14	31,25	2,12	14,75	0,35
INF- $\gamma$ /IL-2	0,75	0,21	79,38	13,61	9,38	3,36

	% Éosinophiles		% Neutrophiles	
	Moy.	E. Type	Moy.	E. Type
PBS	0,25	0,00	4,88	0,18
Bléo	19,25	2,83	27,38	0,88
INF- $\gamma$ /IL-2 + Bléo	16,13	6,19	36,50	6,01
INF- $\gamma$ /IL-2	1,63	1,24	9,63	9,02

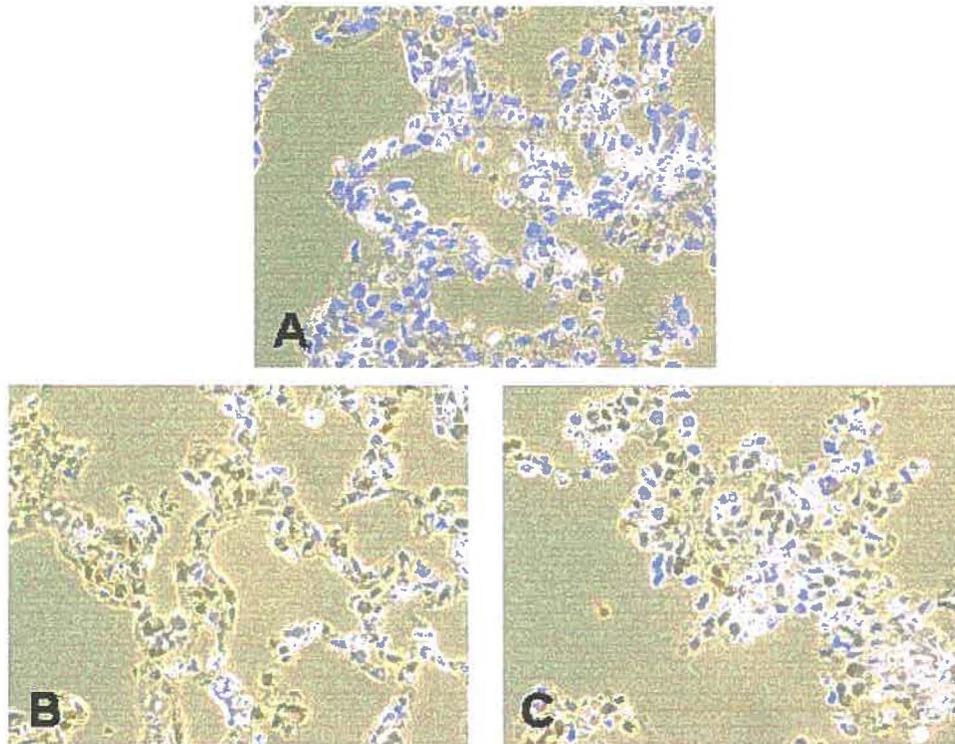
**Figure 9.** Décompte cellulaire des lavages broncho-alvéolaires pour chaque condition expérimentale du modèle animal

### Activité caspase 3 induite par la bléomycine in vivo



**Figure 10.** Mesure de l'activité caspase 3 pulmonaire induite par l'instillation de bléomycine aux poumons de rats mâles Sprague Dawley adultes. Quatre rats ont été instillés intra-trachéalement avec soit du PBS, soit la combinaison INF- $\gamma$  (2500U)/IL-2 (1500U), soit 1000U de bléomycine avec ou sans la combinaison INF- $\gamma$  (2500U)/IL-2 (1500U). Les rats ont été sacrifiés 5 jours post-instillation. Les extraits protéiques pulmonaires (voir section 2.4 des méthodes) normalisés ont été incubés avec un substrat de la caspase 3 (Ac-DEVD-AFC) qui relâche la fonction fluorescente AFC quantifiable au spectrofluorimètre lorsque clivée par l'enzyme. Les valeurs relatives de fluorescences sont exprimées par rapport à celles de rats contrôles n'ayant reçu que du PBS.

## Essai TUNEL sur coupes histologiques pulmonaires



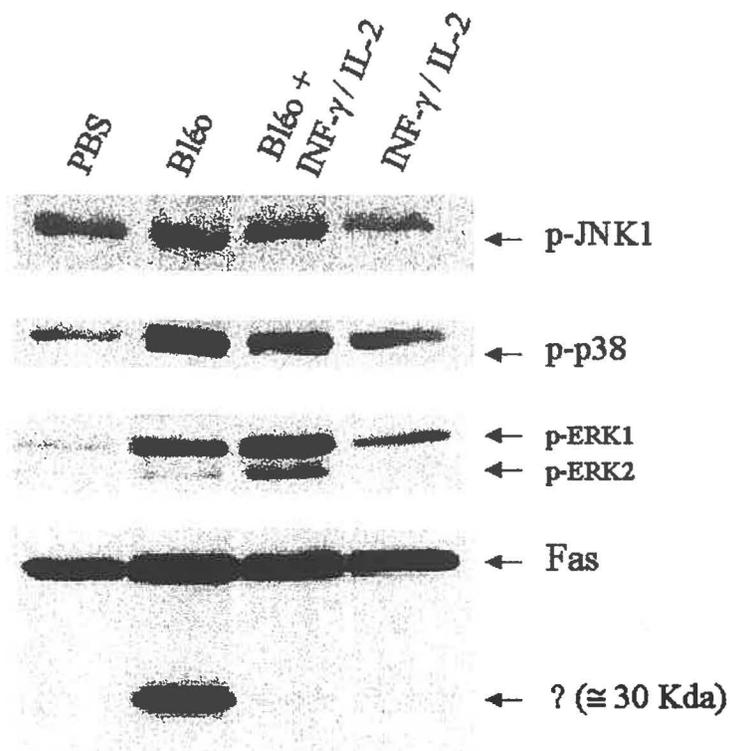
**Figure 11.** Essai TUNEL sur coupes de 5 $\mu$ M de poumons récupérés et emparaffinés 5 jours après les différentes instillations: soit avec PBS (A), soit avec bléomycine seule (B), soit avec bléomycine et la combinaison INF- $\gamma$ /IL-2 (C)

### **3.4 Modulation de l'expression pulmonaire de Fas**

Un immunobuvardage nous a permis de constater que la bléomycine augmente légèrement l'expression du récepteur Fas au niveau pulmonaire 5 jours post-instillation et que cette augmentation peut être partiellement bloquée par la présence de la combinaison INF- $\gamma$ /IL-2. On remarque également l'apparition d'une bande de nature inconnue ( $\cong$  30 Kda) dans les extraits protéiques pulmonaires de rats ayant reçu de la bléomycine, bande dont l'expression semble complètement bloquée par la présence de la combinaison INF- $\gamma$ /IL-2 et qui est absente des extraits de rats contrôles PBS (**figure12**).

### **3.5 Modulation de l'activité pulmonaire des Sérine/thréonine kinases *in vivo***

Les immunobuvardages reflétant les niveaux d'activation des protéines kinases JNK-1, p38 MAPK, ERK1 et ERK2 nous ont fourni des indices sur les mécanismes transductionnels impliqués lors de l'induction de l'apoptose par la bléomycine *in vivo* (**figure 12**). Il apparaît clairement que la bléomycine induit l'activation des voies JNK et p38 chez les rats, 5 jours post-instillation. La combinaison INF- $\gamma$ /IL-2 seule ne semble pas moduler ni JNK-1, ni p38 si l'on compare au rat contrôle PBS. Cependant, cette même combinaison bloque partiellement l'augmentation de l'activité de JNK-1 et p38 induite par la bléomycine. La phosphorylation de ERK1 et celle ERK2 semble augmentée par



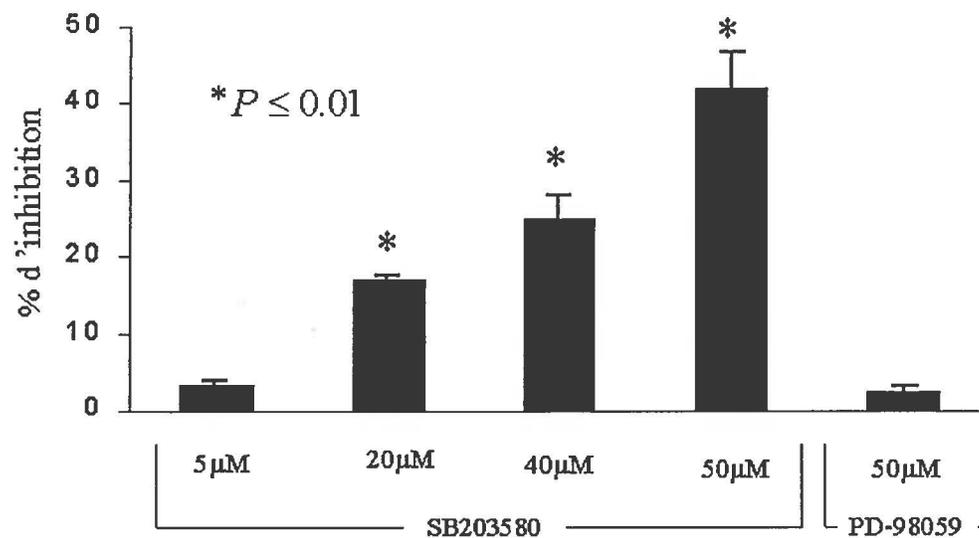
**Figure 12.** Immunobuvardages reflétant les niveaux d'activation des protéines kinases JNK-1, p38 MAPK, ERK1 et ERK2 et le niveau d'expression du récepteur Fas dans les poumons de rats instillés avec PBS, bléomycine seule, la combinaison INF- $\gamma$ /IL-2 ou bléomycine et la combinaison INF- $\gamma$ /IL-2. Les extraits protéiques pulmonaires normalisés ont été soumis à une électrophorèse en présence de SDS et transférés sur une membrane de nitrocellulose qui a été bloquée et incubée avec les différents anticorps spécifiques. L'extrait protéique pulmonaire d'un rat représentatif de chaque groupe à été utilisé pour tous les immunobuvardages de façon à donné un patron d'activation et d'expression relative valide.

la bléomycine seule, par la combinaison  $\text{INF-}\gamma/\text{IL-2}$  seule et par le traitement bléomycine plus la combinaison  $\text{INF-}\gamma/\text{IL-2}$  par rapport au contrôle PBS.

### **3.6 Implication de la p38 MAPK dans l'activation de la caspase 3**

Finalelement, un essai caspase 3 conduit en présence de bléomycine et d'un inhibiteur spécifique de la p38 MAPK ou des MEKs chez des cellules épithéliales pulmonaires en culture a démontré la participation de la p38 MAPK et la non-participation des MEKs dans le processus d'activation de la caspase 3 par la bléomycine in vitro, et ce de manière dose dépendante dans le cas de la p38 MAPK (figure 13).

Inhibition de l'activation de la Caspase 3 par des inhibiteurs spécifiques de p38 MAPK et des MEKs



**Figure 13.** Inhibition de l'activité caspase 3 induite par la bléomycine sur des pneumocytes II en culture par des inhibiteurs spécifiques de la p38 MAPK et des MEKs. Les cellules ont été incubées 24 heures avec bléomycine (50 μg/ml) et des concentrations croissantes d'inhibiteur de la p38 MAPK (le SB203580) ou avec bléomycine et des concentrations croissantes d'inhibiteurs des MEKs (le PD-98059) dont seule la plus élevée est montrée ici. Les extraits protéiques normalisés ont été incubés avec un substrat de la caspase 3 (Ac-DEVD-AFC) qui relâche la fonction fluorescente AFC quantifiable au spectrofluorimètre lorsque clivée par l'enzyme. Les pourcentages d'inhibition présentés sont ceux de chaque condition expérimentale versus le contrôle positif bléomycine seule.

## 4. Discussion

L'équilibre entre la migration/prolifération et l'apoptose cellulaire prend place dans la plupart des organes, confirmant la présence de mécanismes permettant l'homéostasie tissulaire à plus grande échelle. Il est clair que la régulation de cet équilibre est des plus critiques lors de phases réparatrices d'un épithélium post-agression. Dans le cas d'agression majeure au niveau de l'épithélium pulmonaire, trop souvent l'inflammation locale induite va pousser cet équilibre précaire vers l'apoptose, diminuant aussi les chances d'une réparation efficace et établissant les conditions initiales d'une fibrose pulmonaire. Nous voulions démontrer qu'il était possible d'empêcher partiellement ce déséquilibre vers l'apoptose par la signalisation du récepteur à l'IL-2 après avoir augmenté l'expression de sa sous-unité IL-2R $\gamma$  par l'INF- $\gamma$ .

La fibrose pulmonaire induite par la bléomycine est un modèle d'agression pulmonaire très utilisé dans la littérature, et c'est pourquoi nous avons choisi cet agent chimiothérapeutique autant pour des expériences *in vitro* qu'*in vivo*. De plus, selon la littérature, la bléomycine présente l'avantage d'engager le processus d'apoptose via l'interaction de Fas et FasL, un système relativement bien connu et accepté.

Nous avons choisi l'IL-2 comme inhibiteur potentiel de l'apoptose induite par la bléomycine pour plusieurs raisons. Premièrement, la présence de ce récepteur chez les cellules épithéliales pulmonaires de type II venait d'être démontrée au sein de notre laboratoire (Lesur et al., 1997). Deuxièmement, des

expériences de migrations cellulaires ont démontré une migration IL-2 dépendante des pneumocytes II isolés significative seulement après traitement à l'INF- $\gamma$  (manuscrit en préparation), expériences qui démontraient la fonctionnalité du récepteur et qui prôtaient à l'IL-2 un rôle favorisant la réparation épithéliale. Troisièmement, il y a la signalisation cytosolique très diversifiée du récepteur IL-2 qui permet l'expression et la régulation de différentes voies anti- et pro-apoptotiques (Gomez et al., 1998). Finalement, il a déjà été démontré que l'IL-15, une cytokine apparentée à l'IL-2 dont le récepteur partage les sous-unités bêta et gamma de l'IL-2R (Giri et al., 1994), était capable de prévenir l'apoptose massive des hépatocytes induite par l'interaction Fas/FasL (Bulfon-Paus et al., 1997) ainsi que l'apoptose induite par le TNF- $\alpha$  (Bulfon-Paus et al., 1999).

La mise en culture de cellules primaires nous permet d'établir les conditions expérimentales sur lesquelles notre modèle in vivo s'appuiera. L'isolation de cultures primaires a deux avantages majeurs sur les lignées cellulaires: la sauvegarde optimale du phénotype cellulaire recherché et l'absence de phénotype cancéreux ou d'artéfacts de transformation. De plus, l'isolement de cultures primaires permet de cibler un type cellulaire donné, chose difficilement réalisable dans un modèle in vivo. La technique d'isolement utilisée prends considération de la présence de plusieurs types cellulaires dans le poumon distal et utilise ces différences phénotypiques et morphologiques pour assurer le degré de pureté de la culture.

Une fois en culture, les cellules épithéliales pulmonaires de type II peuvent perdre, avec le temps et les conditions de culture, quelques-une de leurs

caractéristiques par un processus de dédifférenciation vers le type I (Yve et al., 1993, Brody et Williams, 1992, Dobbs, 1990, Dobbs et al., 1985, Mason et al., 1983, Mason et Dobbs, 1980 et Diglio et Kikkawa, 1977). Cependant, la grande majorité de leurs déterminants spécifiques seront conservés. Les cellules de type II isolées ont une apparence structurale similaire à celles de l'épithélium pulmonaire et contiennent les corps lamellaires servant de marqueurs morphologiques aux cellules de type II (Mason et al., 1977). La sécrétion de surfactant dans le milieu de culture sert de marqueur fonctionnel aux cellules. Il y a également des marqueurs de surfaces permettant de différencier les cellules de type I des cellules de type II selon leur capacité d'adhérence à différentes lectines (Dobbs et al., 1985, Brandt, 1982).

L'INF- $\gamma$  est depuis longtemps reporté comme une cytokine promotrice de l'expression du récepteur IL-2R chez le monocyte (Hermann et al., 1985) et le lymphocyte (Dubinett et al., 1985) notamment via le système JAK/STAT. Il a été démontré dans le laboratoire que l'INF- $\gamma$  augmentait les transcrits des trois sous-unités ( $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$ ) chez la cellule épithéliale pulmonaire de type II en culture (Lesur et al., 1997) et ici nous démontrons que L'INF- $\gamma$  augmente également l'expression protéique de l'IL-2R $\gamma$ , par immunobuvardage et microscopie confocale (figure 4 et figure 5). Nous n'avons pas utilisé la cytométrie de flux pour vérifier le niveau d'expression de l'IL-2R $\gamma$  car l'adhérence des cellules épithéliales en culture était telle qu'aucune des procédures standard de détachement cellulaire ne permettait de conserver l'intégrité épitopique membranaire nécessaire à un marquage antigénique spécifique. À la suite des

travaux effectués, nous ne pouvons établir de façon claire les mécanismes responsables de la perte d'expression protéique au niveau de l'IL-2R $\beta$  suite au traitement de plus de 24 heures à l'INF- $\gamma$  (figure 6). En effet, parce qu'une augmentation transcriptionnelle de la sous-unité  $\beta$  par l'INF- $\gamma$  a été rapportée (Lesur et al., 1997), l'effet observé ne peut être lié à des événements affectant la transcription génique, telle une baisse d'expression ou d'activité de facteurs transcriptionnels. On pourrait supposer que l'INF- $\gamma$  agit au niveau post-transcriptionnel (sur la stabilisation de l'ARNm, la traduction protéique, l'exportation membranaire ou le recyclage du récepteur par exemple), mais aucune données littéraires ne relie directement ou indirectement l'INF- $\gamma$  à de tels événements. Il faut noter que l'effet de l'INF- $\gamma$  sur l'expression de l'IL-2R $\beta$  chez le pneumocytes II est minime après 16 heures, durée utilisée pour tous les essais in vitro avec IL-2. L'augmentation de l'expression de l'IL-2R $\gamma$  par l'INF- $\gamma$  jusqu'à un seuil critique de fonctionnalité explique peut-être pourquoi les pneumocytes II en culture ne répondent à l'IL-2 en migration qu'après un traitement à l'INF- $\gamma$ .

La fibrose pulmonaire induite par la bléomycine, s'établissant à la suite de cycles répétés de réorganisations exudatives et de fibroproliférations cloisonales initiés par une apoptose majeure de l'épithélium alvéolaire, pourrait être freinée ou même prévenue si on arrivait à favoriser les signaux de survie cellulaire le temps que les mécanismes de réparation tissulaires prennent place. Nous avons donc vérifié si l'IL-2 seule ou en combinaison avec l'INF- $\gamma$  pourrait fournir ces signaux de survie à l'épithélium alvéolaire. Sur des pneumocytes II

primaires en culture, l'IL-2 seule inhibe de façon modeste mais significative l'activité caspase 3 induite par la bléomycine tandis que l'INF- $\gamma$  seul n'a pour sa part aucun effet inhibiteur significatif. Cet effet anti-apoptotique de l'IL-2 est plus que doublé suite à un pré-traitement des cellules isolées avec l'INF- $\gamma$  (figure 7). Comme pour la migration cellulaire IL-2 dépendante, la présence d'INF- $\gamma$  semble nécessaire pour observer l'effet de l'IL-2 sur l'activité caspase 3 induite par la bléomycine.

Les expériences de fragmentation génomique induite par la bléomycine (figure 8) nous ont permis de confirmer l'effet anti-apoptotique de la combinaison INF- $\gamma$ /IL-2 et que cet effet était majoritairement dû à l'IL-2, par l'utilisation d'un anticorps anti-IL-2R neutralisant et ce, même si l'IL-2 seule montrait encore une faible inhibition d'environ 10% non-statistiquement valide et que l'INF- $\gamma$  seul montrait pour sa part, une inhibition significative d'environ 33%. La fragmentation génomique induite par la bléomycine semblait donc plus sensible à la combinaison cytokinique et à l'INF- $\gamma$  seul que les essais caspase 3. Parce que la fragmentation génomique est une étape ultérieure et n'est pas exclusivement dépendante de l'activation de la caspase 3 (Lincz, 1998), il est possible que la combinaison INF- $\gamma$ /IL-2 agisse sur la signalisation apoptotique en aval et/ou en parallèle de la caspase 3 en plus de celle en amont tandis que l'INF- $\gamma$  seul agirait sur la signalisation apoptotique en aval et/ou en parallèle de la caspase 3 sans moduler celle en amont.

Forts de ces résultats, nous avons ensuite vérifié l'effet de la combinaison INF- $\gamma$ /IL-2 dans un modèle animal d'apoptose induite par la bléomycine. Nous

n'avons vérifié que les conditions optimales d'inhibition apoptotique obtenues *in vitro*, soit la combinaison INF- $\gamma$ /IL-2, mais à des doses massives étant donné les courtes demi-vies de ces cytokines *in vivo*. Comme l'analyse quantitative de la fragmentation génomique par TUNEL s'avérait inabordable, tant au niveau monétaire qu'au niveau de la charge de travail nécessaire au traitement des centaines de coupes tissulaires indispensables à la validation statistique des données, notre seule quantification apoptotique s'est effectuée par la mesure de l'activité de la caspase 3 d'extraits protéiques pulmonaires. Cependant, on peut voir à la **figure 11** le résultat qualitatif de la fragmentation génomique visualisé sur un épithélium pulmonaire ayant été exposé à la bléomycine avec ou sans la combinaison INF- $\gamma$ /IL-2. Nous n'avons pas déterminé si les pneumocytes de type II étaient spécifiquement affectés (en utilisant un anticorps anti-surfactant en double marquage par exemple), mais par observation de zones tissulaires où la quasi-totalité des cellules étaient apoptotiques nous pouvons supposer que tous les types cellulaires étaient touchés, les pneumocytes II y compris.

Étonnamment, l'inhibition apoptotique obtenue avec la combinaison INF- $\gamma$ /IL-2 chez le rat instillé à la bléomycine au niveau de l'activité caspase 3 (**figure 10**) est de beaucoup supérieure à celle observée *in vitro* (76% et 25% respectivement). Comme les essais *in vivo* sur l'activité caspase 3 se font avec des extraits totaux pulmonaires, il y a présence de nombreux types cellulaires autres que les pneumocytes de type II qui peuvent répondre (peut-être de façon plus marquée que les pneumocytes II) et participer aux événements induits par la combinaison INF- $\gamma$ /IL-2 instillée. La combinaison INF- $\gamma$ /IL-2 peut également

entraîner *in vivo* une modulation des cytokines pro-apoptotiques et/ou pro-fibrotiques secrétées par les autres types cellulaires environnant qui répondent à la bléomycine (ex: le TGF- $\beta$  produit par l'épithélium bronchique). Ceci est un effet potentiel que nous ne pouvons observer chez des pneumocytes II isolés. Le pourcentage élevé d'éosinophiles et de neutrophiles dans le décompte cellulaire des lavages broncho-alvéolaires des rats ayant reçu de la bléomycine avec ou sans la combinaison INF- $\gamma$ /IL-2 (**figure 9**) nous confirme que tous les poumons de rats ont été exposés à la bléomycine et que l'effet d'inhibition de la combinaison INF- $\gamma$ /IL-2 sur l'activité caspase 3 est bien réel et n'est pas dû à une erreur chirurgicale survenue lors de l'instillation intra-trachéale. Notez également que tous les rats, au moment du sacrifice, montraient une cicatrisation normale et absente d'infection au niveau de la suture.

Maintenant que nous avons démontré que la combinaison INF- $\gamma$ /IL-2 était capable de réduire considérablement l'activité caspase 3 pulmonaire induite par la bléomycine chez le rat, nous nous sommes intéressés à quelques mécanismes signalitiques potentiellement capables d'expliquer les résultats obtenus. Nous nous sommes intéressés en tout premier lieu à l'état d'activation de plusieurs sérine/thréonine kinases, plus particulièrement la JNK1, la p38 MAP kinase, ERK1 et ERK2. Comme mentionné en introduction, la modulation de ces voies signalitiques correspond souvent à la modulation de la signalisation apoptotique et une inter-relation certaine a été démontrée par plusieurs études (**section 1.9**). Étant donné la participation active du système Fas dans

**l'activation de la caspase 3 suite à l'instillation de bléomycine, nous avons également vérifié l'expression pulmonaire du récepteur Fas.**

**Comme l'activation de la JNK1 et de la p38 MAP kinase est généralement associée avec la promotion de l'apoptose via l'activation potentielle de la caspase 3, on s'attendait logiquement à ce que la bléomycine induise leur phosphorylation respective, les faisant passer d'un état passif à un état actif. Des immuno-buvardages des formes actives des kinases JNK1 et p38 MAP kinase, effectués sur des extraits protéiques pulmonaires totaux, ont révélé que la bléomycine semble induire l'activation des deux kinases, induction qui est pour la première fois démontrée. Plus intéressant encore, les poumons de rats ayant reçu la combinaison  $\text{INF-}\gamma/\text{IL-2}$  en plus de la bléomycine ont une diminution marquée au niveau de l'état d'activation de leurs deux kinases. Comme la combinaison  $\text{INF-}\gamma/\text{IL-2}$  instillée seule n'a pas diminué l'état de phosphorylation de base observé chez les rats instillés au PBS, on peut penser que la combinaison cytokinique va bloquer, par un mécanisme encore indéterminé, la signalisation d'activation induite par la bléomycine plutôt que d'induire la déphosphorylation et l'inactivation des kinases concernées. Pour démontrer que l'inhibition par la combinaison  $\text{INF-}\gamma/\text{IL-2}$  de l'activité caspase 3 induite par la bléomycine passe par le blocage de l'activation de JNK1 et p38 MAP kinase, il fallait démontrer que les activités de JNK1 et p38 MAP kinase étaient nécessaires à l'apoptose induite par la bléomycine. Pour ce faire, nous avons utilisé différentes concentrations d'un inhibiteur spécifique de la p38 MAP kinase (SB203580) sur des cellules épithéliales de type II primaires mises en présence**

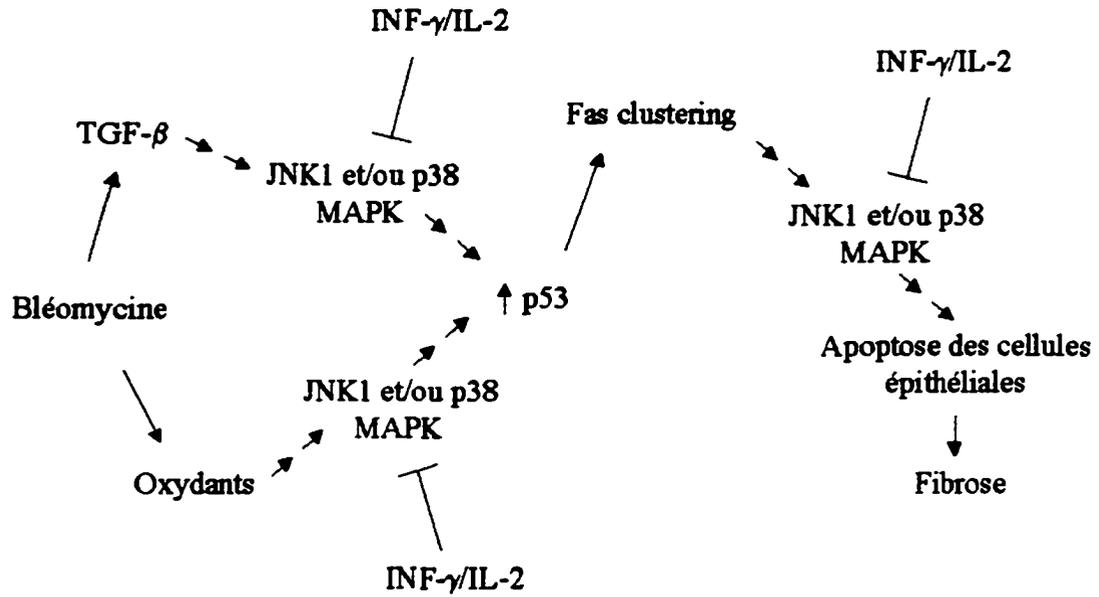
de bléomycine. Il s'est avéré qu'effectivement, l'induction de l'activité caspase 3 par la bléomycine *in vitro* dépend en partie de l'activité de la p38 MAP kinase (figure 13). Si nous avons pu vérifier la contribution de JNK1 (malheureusement, aucun inhibiteur spécifique de la JNK1 n'existe sur le marché), on peut hypothétiser que les résultats auraient été similaires si l'on se réfère à la littérature (section 1.9).

Lorsque phosphorylées et activées, les ERKs sont capables d'inhiber précocement l'induction de l'apoptose par différents mécanismes dans divers systèmes cellulaires (énumérés à la section 1.9) et l'on prévoyait une augmentation de leur activité chez les rats ayant reçu la combinaison  $\text{INF-}\gamma/\text{IL-2}$ . Cependant, ni ERK1 ni ERK2 ne semblent être des participants actifs dans l'inhibition de l'activité caspase 3 par la combinaison  $\text{INF-}\gamma/\text{IL-2}$  dans notre modèle animal, car même si les rats ayant reçu seulement les deux cytokines montrent une légère suractivation de ERK1, elle est de beaucoup inférieure aux suractivations observées chez les rats ayant reçu de la bléomycine avec ou sans  $\text{INF-}\gamma/\text{IL-2}$  où il y a également suractivation de ERK2. Il y avait deux possibilités: soit que les ERKs participent à une signalisation pro-apoptotique menant ultimement à l'activation de la caspase 3, soit que leur activation chez les rats ayant reçu de la bléomycine est réelle, mais n'est pas liée à l'activation de la caspase 3. La première hypothèse était contraire à la quasi-totalité de la littérature et était un peu gênante, tandis que la deuxième nous privait d'un argument pour comprendre comment la combinaison  $\text{INF-}\gamma/\text{IL-2}$  était capable d'inhiber l'activation de la caspase 3. C'est un inhibiteur spécifique des ERKs qui

nous a convaincu que finalement, les ERKs ne participaient pas à l'activation de la caspase 3 induite par la bléomycine contrairement à la p38 MAP kinase (**figure 13**). Il avait déjà été démontré dans la littérature que la voie des MAPK, incluant les ERKs, n'était pas impliquée dans l'apoptose médiée par Fas chez le lymphocyte T (Wilson et al., 1996).

Comme la participation du système Fas/FasL dans la fibrose pulmonaire a déjà été démontrée (voir **section 1.8**), nous avons vérifié si la bléomycine induisait une augmentation de l'expression du récepteur Fas et vérifié si la combinaison  $\text{INF-}\gamma/\text{IL-2}$  modulait cette augmentation. Même si les rats instillés à la bléomycine montrent une expression pulmonaire de Fas légèrement plus élevée que celle des rats contrôles et que cette augmentation est partiellement bloquée par la combinaison  $\text{INF-}\gamma/\text{IL-2}$ , on ne peut pas dire de façon certaine que la modulation de l'expression de Fas soit une étape critique tant au niveau de l'induction de l'apoptose par la bléomycine que dans les mécanismes d'inhibition par la combinaison  $\text{INF-}\gamma/\text{IL-2}$ . Les faibles variations d'expression obtenues comparativement aux rôles majeurs tenus par Fas dans la littérature (Kuwano et al., 1999) peuvent dire deux choses: soit que c'est la régulation de FasL qui est importante pour l'induction de l'apoptose et qui est modulable, soit que c'est le niveau de l'agglomération et l'état de la dynamique membranaire du récepteur Fas qui compte et qui peut être affecté par nos signaux pro- et anti-apoptotiques, possibilité démontrée par Muller et al., 1997. Les quelques essais effectués sur la modulation de l'expression de FasL au niveau du poumon par la bléomycine avec ou sans la combinaison  $\text{INF-}\gamma/\text{IL-2}$  se sont avérés très peu convaincants et

ne sont pas montrés ici car la validité de l'anticorps utilisé est mise en cause. De toute façon, les résultats les plus intéressants auraient été logiquement obtenus sur les lymphocytes recrutés et présents dans les lavages broncho-alvéolaires qui sont les plus susceptibles d'exprimer FasL et de stimuler l'apoptose de l'épithélium. Si on prend en considération que l'IL-2 et l'INF- $\gamma$  n'ont jamais été rapportés dans la vaste littérature lymphocytaire comme des inhibiteurs de l'expression de FasL, on peut présumer que l'effet de la combinaison INF- $\gamma$ /IL-2 ne passe pas par une inhibition de l'expression du ligand de Fas, mais peut-être bien par la modulation de la dynamique membranaire du récepteur nécessaire à sa signalisation ou sur une étape en aval de la stimulation du récepteur. Cette dynamique membranaire de Fas peut être influencée par la protéine p53 qui favorise l'expression du récepteur Fas et sensibilise les cellules à l'apoptose induite par ce récepteur en assistant sa sortie du complexe Golgi (Bennet et al., 1998). L'activité et l'expression de p53 étant induite par la JNK (Bushman et al., 2000), l'activation de la caspase 3 via la signalisation de Fas étant partiellement JNK1 et/ou p38 MAP kinase dépendante (Toyoshima et al., 1997), nous avons deux étapes mécanistiques qui expliquent l'effet de la combinaison INF- $\gamma$ /IL-2 sur l'activité caspase 3 pulmonaire via la baisse d'activité de JNK1 et p38 MAP kinase observée. La **figure 14** montre que la modulation à la baisse de l'activité JNK1 et p38 MAP kinase par la combinaison INF- $\gamma$ /IL-2 peut influencer la pathogénèse de la fibrose pulmonaire sur différents niveaux successifs et que les effets peuvent donc être additifs sur l'étape tardive qu'est l'activation de la caspase 3.



**Figure 14.** Schéma du mécanisme potentiel de la combinaison INF- $\gamma$ /IL-2 dans l'inhibition de l'apoptose des cellules épithéliales pulmonaires.

En conclusion, nos recherches ont permis de démontrer que l'INF- $\gamma$  augmente l'expression protéique de l'IL-2R chez les cellules épithéliales pulmonaires en culture après une exposition de 16 heures. Nous démontrons qu'une exposition de 16 heures à la combinaison INF- $\gamma$ /IL-2 inhibe l'activité caspase 3 et surtout la fragmentation génomique induite par la bléomycine chez les cellules épithéliales pulmonaires. Nous démontrons également que cette combinaison INF- $\gamma$ /IL-2 inhibe l'activation de la caspase 3, l'activation des protéines kinases JNK1 et p38 MAPK et la surexpression du récepteur Fas, trois phénomènes repertoriés dans un modèle animal d'instillation à la bléomycine. Finalement, nous démontrons que l'activité de la p38 MAPK est nécessaire à l'activation de la caspase 3 par la bléomycine *in vitro*, suggérant ainsi un mécanisme d'action potentiel pour la combinaison INF- $\gamma$ /IL-2. En effet, en bloquant l'activation et la participation des sérine/thréonine protéines kinases JNK1 et p38 MAP kinase, la combinaison INF- $\gamma$ /IL-2 bloquerait l'induction de l'activation de la caspase 3 et la fragmentation génomique par la bléomycine *in vitro* et *in vivo*. Ces résultats suggèrent que la combinaison INF- $\gamma$ /IL-2 pourrait potentiellement inhiber ou retarder l'apparition de la fibrose pulmonaire induite par la bléomycine en bloquant l'activation des voies JNK et p38 MAP kinase à des étapes clés de l'initiation de la pathologie.

Les résultats obtenus ouvrent la voie à des recherches plus pointues sur la signalisation inhibitrice de la combinaison INF- $\gamma$ /IL-2 sur l'activité caspase 3 induite. Tout d'abord, il faudrait vérifier l'implication réelle de la protéine p53 dans notre système. Il faudrait également vérifier le niveau de l'implication très

probable des homologues Bcl-2 dans le processus anti-apoptotique observé. Il serait également important de vérifier l'effet individuelle des cytokines IL-2 et  $\text{INF-}\gamma$  sur l'activité caspase 3 dans le modèle *in vivo* de fibrose induite car il a été répertorié que l' $\text{INF-}\gamma$  utilisé seul aurait une activité antifibrotique passant par la régulation négative du  $\text{TGF-}\beta$  (Gurujeyalakshmi et al., 1995). Finalement, il serait intéressant de vérifier si la modulation de l'activité caspase 3, et ultimement de l'apoptose, est suffisante pour constater un effet direct sur l'initiation de la fibrose pulmonaire induite par la bléomycine.

## **Remerciements**

**En premier lieu, je tiens à remercier mes deux directeurs de recherche, soit le Dr. Olivier Lesur et le Dr. Tamas Fülöp pour m'avoir appuyé tant au niveau scientifique que moral tout au long de ma maîtrise.**

**Je voudrais plus particulièrement remercier le Dr. Lesur pour m'avoir accueilli dans son laboratoire et avoir fourni les ressources nécessaires à l'élaboration du projet présenté ici.**

**Je terminerai avec un gros merci à Denis Lane pour sa précieuse aide technique et aussi un merci à tous les techniciens et stagiaires en pneumologie qui ont agrémenté de bonne humeur ces deux années.**

## Références

Adachi, M., Suematsu, S., Suda, T., Watanabe, D., Fukuyama, H., Ogasawara, J., Tanaka, T., Yoshida, N., Nagata, S. Enhanced and accelerated lymphoproliferation in fas-null mice. *Proc Natl Acad Sci USA*. **93**, 2131-2136 (1996).

Adamson, I., Bowden DH. The pathogenesis of bleomycin –induced pulmonary fibrosis in mice. *Am. J. Pathol.* **77**, 185-190 (1974).

Ahmed, N., Grimes, H., Bellacosa, A. Transduction of interleukin 2 antiapoptotic and proliferative signals via Akt protein kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **94**, 3627-3632 (1997).

Ameisen, JC. The origin of programmed cell death. *Science* **272**, 1278-1279 (1996).

Arima, N., Kamio, M., Imada, K., Hori, T., Hattori, T., Tsudo, M., Okuma, M., Uchiyama, T. Pseud high affinity interleukin-2 receptor lacks the third component that is essential for functional IL-2 binding and signaling. *J. Exp. Med.* **176**, 1265-1272 (1992).

Armstrong, RC., Aja, T., Xiang, J., Gaur, S., Krebs, JF., Hoang, K., Bai, X., Korsmeyer, SJ., Karanewski, DS., Fritz, LC., Tomaselli, KJ. Fas-induced activation of the cell death related protease CPP32 is inhibited by bcl-2 and by ICE family protease inhibitors. *J Biol Chem.* **271**, 16850-16855 (1996).

Bach, EA., Aguet, M., Schreiber, RD. The IFN gamma receptor: a paradigm for cytokine receptor signaling. *Annu. Rev. Immunol.* **15**, 563-591 (1997).

Bach, EA., Tanner, JW., Marsters, SA., Ashkenazi, A., Aguet, M. Ligand-induced assembly and activation of the gamma interferon receptor in intact cells. *Mol. Cell. Biol.* **16**, 3214-3221 (1996).

Bennett, M., Macdonald, K., Chan, SW., Luzio, JP., Simari, R., Weissberg, P. Cell surface trafficking of Fas : a rapid mechanism of p53 mediated apoptosis. *Science*. **282**, 290-293 (1998).

Boesteanu, A., Silva, AD., Nakajima, H., Leonard, WJ., Peschon, JJ., Joyce, S. Distinct roles for signals relayed through the common cytokine receptor gamma chain and interleukin 7 receptor alpha chain in natural T cell development. *J. Exp. Med.* **186**, 331-336 (1997).

Boise, L. H., Minn, A. J., June C. H., Lindsten, T., Thompson, C. B. Growth factors can enhance lymphocyte survival without committing the cell to undergo cell division. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **92**, 5491-5495 (1995).

Bosco, MC., Espinoza-Delgado, I., Schwabe, M., Gusella, GL., Longo, DL., Sugamura, K., Varesio, L. Regulation by interleukine-2 and interferon gamma of the receptor gamma chain gene expression in human monocytes. *Blood.* **15**, 2995-3002 (1994).

Boulton, TG., Nye, SH., Robbins, DJ., Ip, NY., Radziejewaka, E., Morgenbesser, SD., Dephno, RA., Panayotatos, N., Cpb, MH., Yancopoulos, GD. Erk's : a family of protein serine/threonine kinases that are activated and tyrosine phosphorylated in response to insulin and NGF. *Cell.* **65**, 663-375 (1991).

Brody, JS., Williams, MC. Pulmonary alveolar epithelial cell differentiation. *Annu. Rev. Physiol.* **54**, 351-371 (1992).

Buckley, S., Driscoll, B., Barsky, L., Weinberg, K., Anderson, K., Warburton, D. ERK activation protects against DNA damage and apoptosis in hyperoxic rat AEC2. *Am. J. Physiol.* **277**, 159-166 (1999).

Bulfone-Paus, S., Bulova, E., Pohl, T., Budagian, V., Durkop, H., Ruckert, R., Kunzendorf, U., Paus, R., Krause, H. Death deflected : Il-15 inhibits TNF-alpha-mediated apoptosis in fibroblasts by TRAF2 recruitment to the IL-15R alpha chain. *FASEB J.* **13**, 1575-1585 (1999).

Bulfone-Paus, S., Ungureanu, D., Pohl, T., Lindner, G., Paus, R., Ruckert, R., Krause, H., Kunzendorf, U. Interleukin 15 protects from lethal apoptosis in vivo. *Nature Med.* **3**, 1124-1128 (1997).

Cardone, MH., Salvesen, GS., Widmann, C., Johnson, G., Frish, SM. The regulation of anoikis : MEKK-1 activation requires cleavage by caspases. *Cell.* **90**, 315-323 (1997).

Castranova V, Rabovsky J, Tucker JH, Miles PR. The alveolar type II epithelial cell: a multifunctional pneumocyte. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **93**, 472-83 (1988)

Cerretti, DP., Kozlosky, CJ., Mosely, B., Nelson, N., Ness, KV., Grenstreet, CA., March, CJ., Kronheim, SR., Druck, T., Cannizaro, LA., Huebner, K., Black, RA. Molecular cloning of the interleukin-1 $\beta$  converting enzyme. *Science.* **256**, 97-100 (1992).

Chaudhary, PM., Eby, MT., Jasmin, A., Hood, L. Activation of c-Jun N terminal kinase/stress-activated protein kinase by overexpression of caspase 8 and its homologs. *J. Biol. Chem.* **274**, 19211-19219 (1999).

Chen J., Ma A., Young F., Alt FW. IL-2 receptor alpha chain expression during early B lymphocyte differentiation. *Int. Immunol.* **6**(8), 1265-1268 (1994).

Chinnaiyan, AM., Orth, K., O'Rourke, K., Duan, H., Poirier, GG., Dixit, VM. Molecular ordering of the cell death pathway : bcl-2 and bcl-x function upstream of the CED-3 like apoptotic proteases. *J Biol Chem.* **271**, 4573-4576 (1996).

Cooper, JA., Zitnik, DRJ., Mathay, RA. Mechanisms of drug-induced pulmonary disease. *Ann. Rev. Med.* **39**, 395-404 (1988).

Darnell, J. Stats and gene regulation. *Science.* **277**, 1630-1635 (1997).

Del Peso, L., Gonzalez-Garcia, M., Page, C. Interleukin 3 induced phosphorylation of BAD through the protein kinase Akt. *Science.* **278**, 687-689 (1997).

Diglio, CA., Kikkawa, Y. The type II epithelial cells of the lung. IV. Adaption and behavior of isolated type II cells in culture. *Lab Invest.* **37**, 622-631 (1977).

Dobbs, LG. Isolation and culture of alveolar type II cells. *Am. J. Physiol.* **258**, 134-147 (1990).

Dobbs, LG., Williams, MC., Brandt, AE. Changes in biochemical characteristics and pattern of lectin binding of alveolar type II cells with time in culture. *Biochim. Biophys. Acta.* **846**, 155-166 (1985).

Duan, H., Orth, K., Chinnaiyan, AM., Poirier, GG., Froelich, CJ., He, WW., Dixit, VM. ICE-LAP6, a novel member of the ICE/Ced-3 gene family, is activated by the cytotoxic T cell protease granzyme B. *J Biol Chem.* **271**, 16720-16724 (1996).

Enari, M., Talanian, RV., Wong, WW., Nagata, S. Sequential activation of ICE-like and CPP32-like protease during Fas-mediated apoptosis. *Nature.* **380**, 723-726 (1996).

Erhardt, P., Schremser, EJ., Cooper, GM. B-raf inhibits programmed cell death downstream of cytochrome c release from mitochondria by activating the MEK/ERK pathway. *Mol. Cell. Biol.* **19**, 308-315 (1999).

Farrar, MA., Schreiber, RD. The molecular cell biology of interferon-gamma and its receptor. *Annu. Rev. Immunol.* **11**, 571-611 (1993).

Faucheu, C., Diu, A., Chan, A., Blanchet, AM., Miossec, C, Herve, F., Collard-Dutilleul, V., Gu, Y., Aldape, RA., Lippke, JA., Rocher, C., Su, MSS., Livingston, DL., Hercend, T., Lalanne, JL. A novel human protease similar to the interleukin-

1 $\beta$  converting enzyme induces apoptosis in transfected cells. *EMBO J.* **14**, 1914-1922 (1995).

Fernandes-Alnemri, T., Armstrong, R., Krebs, J., Srinivasula, SM., Wang, L., Bullrich, F., Fritz, L., Trapani, JA., Tomaselli, KJ., Litwack, G., Yu, Z., Alnemri, ES. In vitro activation of CPP32 and Mch-3 by Mch-4, a novel human apoptotic cysteine protease containing two FADD-like domains. *Proc Natl Acad Sci USA.* **93**, 7464-7469 (1996).

Fernandes-Alnemri, T., Litwack, G., Alnemri, E. CPP32-a novel human apoptotic protein with homology to *Caenorhabditis elegans* cell death protein ced-3 and mammalian interleukin-1 $\beta$  converting enzyme. *J Biol Chem.* **269**, 30761-30764 (1994).

Fernandes-Alnemri, T., Litwack, G., Alnemri, E. Mch-2, a new member of the apoptotic Ced-3/ICE cysteine protease gen family. *Cancer Res.* **55**, 2737-2742 (1995).

Fernandes-Alnemri, T., Takahashi, A., Armstrong, R., Krebs, J., Fritz, L., Tomaselli, KJ., Wang, L., Yu, Z., Croce, CM., Earnshaw, WC., Litwack, G., Alnemri, ES. Mch-3, a novel human apoptotic cysteine protease related to CPP32. *Cancer Res.* **55**, 6045-6052 (1995).

Fountoulakis, M., Zulauf, M., Lustig, A., Garotta, G. Stoichiometry of interaction between interferon gamma and its receptor. *Eur. J. Biochem.* **208**, 781-787 (1992).

Fox, J. C., Shaneley, J. R. Antisense inhibition of basic fibroblast growth factor induces apoptosis in vascular smooth muscle cells. *J. Biol. Chem.* **271**, 12578-12584 (1996).

Franklin, CC., Srikanth, S., Fraft, AS. Conditional expression of mitogen activated protein kinase phosphatase-1 MKP-1, is cytoprotective against UV-induced apoptosis. *Proc. Natl. Acad, Sci. USA.* **95**, 3014-3019 (1998).

Frasch, SC., Nick, JA., Fadok, VA., Bratton , DL., Worthen, GS., Henson, PM. P38 MAPK dependent and independent pathways leading to apoptosis in human neutrophils. *J. Biol. Chem.* **273**, 8389-8397 (1998).

Fraser, A., Evan, G. A license to kill. *Cell.* **85**, 781-784 (1996).

Gerritsma, J. S. J., Gerritsen, A. F., Kooten, C. V., Van Es, L. A., Daha, M. R. Expression of the IL-2 receptor on human renal proximal tubular epithelial cells. *Journal of the American Society of Nephrology*, 1510-1516 (1997).

Giri, JG., Ahdieh, M., Eisenman, J., Shanbeck, K., Grabstein, K., Kumaki, S., Namen, A., Park, LS., Cosman, D., Anderson, D. Utilization of the beta and gamma chains of the IL-2 receptor by the novel cytokine IL-15. *EMBO J.* **13**, 2822-2830 (1994).

Glucksmann, A. Cell deaths in normal vertebrate ontogeny. *Biol. Rev. Cambridge Philos. Soc.* **26**, 59-86 (1951).

Goillot, E., Raingeaud, J., Ranger, A., Tepper, RI., Davis, RJ., Harlow, E. Mitogen activated protein kinase mediated Fas apoptotic signaling pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **94**, 3302-3307 (1997).

Gottlieb, RA., Nordberg, J., Skowronski, E., Babior, BM. Apoptosis induced in Jurkat cells by several agents is preceded by intracellular acidification. *Proc Natl Acad Sci USA.* **93**, 654-658 (1996).

Greenlund, AC., Morales, MO., Viviano, BL., Yan, H.,Krolewski, J., Schreiber, RD. Stat recruitment by tyrosine-phosphorylated cytokine receptors: an ordered reversible affinity-driven process. *Immunity.* **2**, 677-687 (1995).

Gulbins, E., Bissonnette, R., Mahboubi, A., Martin, S., Nishioka, W., Brunner, W., Baier, G., Byrd, C., Lang, F. Fas induced apoptosis is mediated via a ceramid-initiated Ras signaling pathway. *Immunity.* **2**, 341-351 (1995).

Gurujeyalakshmi, G., Giri, SN. Molecular mechanisms of antifibrotic effect of interferon gamma in bleomycin-mouse model of lung fibrosis: downregulation of TGF-beta and procollagen I and III gene expression. *Exp Lung Res.* **21**, 791-808 (1995).

Han, J., Bibbs, L.,Ulevitch, RJ. A MAP kinase targeted by endotoxin and hyperosmolarity in mammalian cells. *Science.* **265**, 808-811 (1994).

Hagimoto, N., Kuwano, K., Miyasaki, H., Kunitake, R., Fujita, M., Kawasaki, M., Kaneko, W., Har, N. Induction of apoptosis and pulmonary fibrosis in mice in response to ligation of Fas antigen. *Am. J. Respir. Cell. Biol.* **17**, 272-278 (1997).

Hancock, W. W., Muller, W. A., Cotran, R. S. Interlukin 2 receptors are expressed by alveolar macrophages during pulmonary sarcoidoses and are inducible by lymphokine treatment of normal human lung macrophages, blood monocytes, and monocyte cell lines. *Journal of Immunology* **138**, 185-191 (1987).

Hannigan, M., Zhan, L., Ai, Y., Huang, CK. The role of p38 MAPK in TGF-beta induced signal transduction in human neutrophils. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **246**, 55-58 (1998).

Hatakeyama, M., Mori, H., Doi, T., Taniguchi, T. A restricted cytoplasmic region of interleukin-2 receptor beta chain is essential for growth signal transduction but not for ligand binding and internalization. *Cell*. **59**, 837-845 (1989).

He, Y., Nakajima, H., Leonard, WJ., Adkins, B., Malek, TR. The common gamma chain of cytokine receptor regulates intrathymic T cell development at multiple stages. *J. Immunol.* **158**, 2592-2599 (1997).

Herr, I., Wilhelm, D., Meyer, E., Jremais, I., Angel, P., Debatin, KM. JNK/SAPK activity contributes to TRAIL induced apoptosis. *Cell*. **6**, 130-135 (1999).

Herrmann, F., Cannistra, SA., Levine, H., Griffin, J. Expression of interleukin-2 receptors and binding of interleukin-2 by gamma interferon induced human leukemic and normal monocytic cells. *J. Exp. Med.* **162**, 1111-1116 (1985).

Hockenbery, DM. Bcl-2, a novel regulator of cell death. *Bioessays*. **17**, 631-638 (1995).

Hockenbery, DM., Oltvai, ZN., Yin, XM., Millman, CN., Korsmeyer, SJ. Bcl-2 functions in an antioxidant pathway to prevent apoptosis. *Cell*. **75**, 241-251 (1993).

Horak, I., Lohler, J., Ma, A., Smith, K. A. Interleukin-2 deficient mice : a new model to study autoimmunity and self-tolerance. *Immunol. Rev.* **148**, 35-44 (1995).

Horvath, C. M., Wen, Z., Darnell, J. E. J. A STAT protein that determines DNA sequence recognition suggests a novel DNA-binding domain. *Genes Dev.* **9**, 984-994 (1995).

Hoyt, DG., Lazo, JS. Alterations in pulmonary mRNA encoding procollagens, fibronectin and transforming growth factor beta precede bleomycin -induced pulmonary fibrosis in mice. *J. Pharmacol. Exp.* **246**, 765-771 (1988).

Ichijo, H. From receptor to stress-activated MAP kinases. *Oncogene*. **18**, 6087-6093 (1999).

Ihle, J., Kerr, I. Jaks and Stats in signaling by the cytokine receptor superfamily. *Trends Genet.* **11**, 69-74 (1995).

Itoh, N., Yonehara, S., Ishii, A., Yonehara, M., Mizushima, SI., Sameshima, M., Hase, A., Seto, Y., Nagata, S. The polypeptide encoded by the cDNA for human cell surface antigen Fas can mediate apoptosis. *Cell*. **66**, 233-243 (1991).

Jarvis, WD., Fomari, FA., Auer, KL., Freemermann, AJ., Szabo, E., Birrer, MJ. Coordinate regulation of stress- and mitogen-activated protein kinases in the apoptotic actions of ceramide and sphingosine. *Mol. Pharmacol.* **52**, 935-947 (1997).

Johnson, H., Farrar, W. The role of gamma interferon like lymphokines in the expression of Il-2 receptors. *Cell. Immunol.* **24**, 93-108 (1983).

Jonston, J., Wang, LM., Hanson, F. Interleukine 2, 4, 7 and 15 stimulate tyrosine phosphorylation of insulin receptor substrate 1 and 2 in T cells. *J. Biol. Chem.* **270**, 28527-28530 (1995).

Jun, CD., Pae, HO., Kwak, HJ., Yoo, JC., Choi, BM., Oh, CD., Chun, JS., Paik, SG., Park, YH., Chung, HT. Modulation of nitric oxide-induced apoptotic death of HL-60 cells by protein kinase C and protein kinase A through mitogen activated protein kinases and CPP32-like protease pathway. *Cell. Immunol.* **194**, 36-46 (1999).

Kawahara, A., Minami, Y., Miyazaki, T., Ihle, J. N., Taniguchi, T. Critical role of the interleukin 2 (IL-2) receptor gamma-chain-associated Jak3 in the IL-2-induced c-fos and c-myc, but not bcl-2, gene induction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **92**, 8724-8728 (1995).

Kerr, J. F. R. Shrinkage necrosis: a distinct mode of cellular death. *J. Pathol.* **105**, 13-20 (1971).

Kerr, J. F. R., Wyllie, A. H., Currie, A. R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer* **239**, 239-257 (1972).

Khalil, N., Berezney, O., Sporn, M., Greenberg, AH. Macrophage production of transforming growth factor beta and fibroblast collagen synthesis in chronic pulmonary inflammation. *J. Exp. Med.* **170**, 727-737 (1989).

Kim, H. R. C., Upadhyay, S., Li, G., Palmer, K. C., Deuel, T. F. Platelet-derived growth factor induces apoptosis in growth-arrested murine fibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **92**, 9500-9504 (1995).

Kirken, R. A., Malabarba, M. G., Xu, J., DaSilva, L., Erwin, R. A., Liu, X., Hennighausen, L., Rui, H., Farrar, W. L. Two discrete regions of interleukin-2 (IL-2) receptor  $\beta$  independently mediate IL-2 activation of a PD98059/Rapamycin/Wortmannin-insensitive Stat5a/b serine kinase. *J. Biol. Chem.* **272**, 15459-15465 (1997).

Kluck, RM., Bossy-Wetzel, E., Green, DR., Newmeyer, DD. The release of cytochrome c from mitochondria : a primary site for bcl-2 regulation of apoptosis. *Science*. **275**, 1132-1136 (1997).

Kneitz, B., Herrmann, T., Yonehara, S., Shimpl, A. Normal clonal expansion but impaired Fas-mediated cell death and anergy induction in interleukin-2 deficient mice. *Eur. J. Immunol.* **25**, 2572-2577 (1995).

Kotenko, SV., Izotova, LS., Pollack, BP., Mariano, TM., Donnelly, RJ. Other kinases can substitute for Jak2 in signal transduction by interferon-gamma. *J. Biol. Chem.* **270**, 20915-20921 (1995).

Kumar, S., Kinoshita, M., Noda, M., Copeland, NG., Jenkins, NA. Induction of apoptosis by the mouse *Nedd2* gene, which encodes a protein similar to the product of the *Caenorhabditis elegans* cell death gene *ced-3* and the mammalian IL-1 $\beta$  converting enzyme. *Genes Dev.* **8**, 1613-1626 (1994).

Kuwano, K., Hagimoto, N., Kawasaki, M., Yatomi, T., Nakamura, N., Nagata, S., Suda, T., Kunitake, R., Maeyama, T., Miyasaki, H., Hara, N. Essential roles of the Fas-Fas ligand pathway in the development of pulmonary fibrosis. *J. Clin. Invest.* **104**, 13-19 (1999).

Kyriakis, J., Woodgett, JR. The stress-activated protein kinase subfamily of c-jun kinases. *Nature*. **369**, 156-160 (1994).

Le-Niculescu, H., Bonfoco, E., Kasuva, Y., Claret, FX., Green, DR., Karin, M. Withdrawal of survival factors results in activation of the JNK pathway in neuronal cells leading to Fas ligand induction and cell death. *Mol. Cell. Biol.* **19**, 751-763 (1999).

Leonard, WJ., Noguchi, M., Russell, SM. Sharing of a common gamma chain , gamma c, by the IL-2, IL-4, and IL-7 receptors : implications for X-linked severe combined immunodeficiency. *Adv. Exp. Med. Biol.* **365**, 225-235 (1994).

Lesur, O., Arsalane, K., Berard, J., Myhala Mukana, J.-P., Brum-Fernandes, A. J., Lane, D., Rola-Pleszczynski, M. Functional IL-2 receptors are expressed by rat lung type II epithelial cells. *The American Physiological Society*, L495-L503 (1997).

Lin, J. X., Mietz, J., Modi, W. S., John, S., Leonard, W. J. Cloning of human Stat5B. Reconstitution of interleukin-2-induced Stat5A and Stat5B DNA binding activity in COS-7 cells. *J. Biol. Chem.* **271**, 19738-10744 (1996).

Liu, X., Kim, CN., Yang, J., Jemmerson, R., Wang, X. Induction of apoptotic program in cell-free extracts : requirements for dATP and cytochrome c. *Cell*. **86**, 147-157 (1996).

Liu, X., Zou, H., Slaughter, C., Wang, X. DFF, a heterodimeric protein that functions downstream of caspase 3 to trigger DNA fragmentation during apoptosis. *Cell*. **89**, 175-184 (1997).

Ma, A., Datta, M., Margosian, E., Chen, J., Horak, I. T cells, but not B cells, are required for bowel inflammation in interleukin-2 deficient mice. *J. Exp. Med.* **182**, 1567-1572 (1995).

Mason, R.J., Dobbs, L.G. Synthesis of phosphatidylcholine and phosphatidylglycerol by alveolar type II cells in primary culture. *J. Biol. Chem.* **255**, 5101-5107 (1980).

Mason, R.J., Williams, M.C., Greenleaf, R.D., Clements, J.A. Isolation and properties of type II alveolar cells from rat lung. *Am. Rev. Respir. Dis.* **115**, 1015-1026 (1977).

Mason, R.J., Williams, M.C., Widdicombe, J.H. Fluid and electrolyte transport across monolayers of alveolar type II cells in vitro. *Am. Rev. Respir. Dis.* **127**, 24-28 (1983).

Meredith, J.E. Jr., Fazeli, B., Shwartz, M.A. The extracellular matrix as a cell survival factor. *Mol Biol Cell*. **4**, 953-961 (1993).

Merida, I., Williamson, P., Kuziel, W., Green, W. A., Gaulton, G. N. The serin rich cytoplasmic domain of the IL-2R beta chain is essential for IL-2 dependent tyrosine protein kinase and PI3 kinase. *J. Biol. Chem.* **268**, 6765-6779 (1993).

Minami, Y., Kono, T., Yamada, K., Kobayashi, N., Kawahara, A., Perlmutter, R.M., Taniguchi, T. Association of p56lck with IL-2 receptor beta chain is critical for the IL-2 induced activation of p56lck. *EMBO J.* **12**, 759-768 (1993).

Mishra, A., Doyle, N.A., Martin II, W.J. Bleomycin mediated pulmonary toxicity : evidence for a p53 mediated response. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* **22**, 543-549 (2000).

Miyazaki, T., Liu, Z.J., Kawahara, A. Three distinct IL-2 signalling pathways mediated by bcl-2, c-myc, and lck cooperate in hematopoietic cell proliferation. *Cell*. **81**, 223-231 (1995).

Mueller, D., Seiffert, S., Fang, W., and Behrens, T.W. Differential regulation of bcl-2 and bcl-x by CD3, CD28 and IL-2 receptor in cloned CD4+ helper T cells. A model for the long term survival of memory cells. *J. Immunol.* **156**, 1764-1771 (1996).

Mueller, D., Strand, S., Hug, H., Heinemann, EM., Walczak, H., Hofmann, WJ., Stremmel, W., Krammer, PH., Galle, PR. Drug induced apoptosis in hepatoma cells is mediated by the CD95 receptor/ligand system and involves activation of wild-type p53. *J. Clin. Invest.* **99**, 403-413 (1997).

Muzio, M., Salvesen, GS., Dixit, VM. FLICE induced apoptosis in a cell-free system : cleavage of caspase zymogens. *J Biol Chem.* **272**, 2952-2956 (1997).

Nagata, S. Apoptosis telling cells their time is up. *Curr Biol.* **6**, 1241-1243 (1996).

Nagata, S., Golstein, P. The fas death factor. *Science.* **267**, 1449-1456 (1995).

Nagata, Y., Todokoro, K. Requirement of activation of JNK and p38 for environmental stress-activated erythroid differentiation and apoptosis and a inhibition of ERK for apoptosis. *Blood.* **94**, 853-863 (1999).

Nakajima, H., Shores, E., Noguchi, M., Leonard, WJ. The common cytokine receptor gamma chain plays an essential role in regulating lymphoid homeostasis. *J. Exp. Med.* **185**, 189-196 (1997).

Nakamura, Y., Russell, S. M., Mess, S. A., Friedmann, M., Erdos, M., François, C., Jacques, Y., Adelstein, S., Leonard, W. J. Heterodimerization of the Il-2 receptor beta and gamma chain cytoplasmic domains is required for signaling. *Nature.* **369**, 330-333 (1994).

Nelson, B., Lord, J. D., Greenberg, P. D. A membrane-proximal region of the interleukine-2 receptor gamma chain sufficient for Jak kinase activation and induction of proliferation in T cells. *Mol. Cell. Biol.* **16**, 309-317 (1996).

Nelson, B., Lord, J. D., Greenberg, P. D. Cytoplasmic domain of the Il-2 receptor beta and gamma chains mediate the signal for T cell proliferation. *Nature.* **369**, 333-336 (1994).

Oakes, S., Candotti, F., Johnston, J. Signaling via IL-2 and IL-4 in Jak3 deficient severe combined immunodeficiency lymphocytes : Jak3 dependent and independent pathways. *Immunity.* **5**, 605-615 (1996).

Otvai, ZN., Millman, CL., Korsmeyer, SJ. Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, bax, that accerelates programmed cell death. *Cell.* **74**, 609-619 (1993).

Panos, RJ. Cytokines and alveolar type II cells. *Lung biology in health and disease.* **61**, 417-456 (1993).

Pesce, MA., Strande, CS. A new micromethod for determination of protein in cerebrospinal fluid and urine. *Clin. Chem.* **19**, 1265-1267 (1973).

Pfeffer, L., Mullersman, J., Pfeffer, S. STAT3 as an adaptor to couple phosphatidylinositol 3-kinase to the IFNRA1 chain of the type 1interferon receptor. *Science*. **276**, 1418-1420 (1997).

Plaisance, S., Rubinstein, E., Alileche, A., Han, D. S., Sahraoui, Y., Mingari, M. C., Bellomo, R., Rimoldi, D., Colombo, M. P., Jasmin, C., Carrel, S., Azzarone, B. Human melanoma cells express a functional interleukin-2 receptor. *Int. J. Cancer* **55**, 164-170 (1993).

Postlewaite, AE., Keski-Oja, J., Moses, HL., Kang, AH. Stimulation of the chemotactic migration of human fibroblast by transforming growth factor beta. *J. Exp. Med.* **165**, 251-256 (1987).

Rao, L., White, E. Bcl-2 and the ICA family of apoptotic regulators : making a connection. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **7**, 52-58 (1997).

Reed, JC. Balancing cell life and death : bax, apoptosis and breast cancer. *J Clin Invest.* **97**, 2403-2404 (1996).

Reif, K., Burgering, B., Cantrell, D. Phosphatidylinositol 3-kinase links the interleukin 2 receptor to protein kinase B and p70 S6 kinase. *J. Biol. Chem.* **272**, 14426-14433 (1997).

Ruoslathi, E., Reed, JC. Anchorage dependence, integrin and apoptosis. *Cell.* **77**, 477-478 (1994).

Ryu,JH., Colby, TV., Hartman, TE. Idiopathic pulmonary fibrosis : current concepts. *Mayo Clin. Proc.* **73**, 1085-1101 (1998).

Sadlack, B., Lohler, J., Schorle, H., Klebb, G., Haber, H., Sickel, E., Noelle, R. J., Horak, I. Generalized autoimmune disease in interkeukine-2 deficient mice is triggered by an uncontrolled activation and proliferation of CD4+ T cells. *Eur. J. Immunol.* **25**, 3053-3059 (1995).

Sakai, I., Kraft, A. S. The kinase domain of Jak2 mediated induction of Bcl-2 and delays cell death in hematopoietic cells. *J. Biol. Chem.* **272**, 12350-12358 (1997).

Sanchez-Perez, I., Murguia, JR., Perona, R. Cisplatin induces a persistant activation of JNK that is related to cell death. *Oncogene.* **16**, 533-540 (1998).

Saunders, N. A., Smith, R.J., Jetten, A. M. Differential responsiveness of human bronchial epithelial cells, lung carcinoma cells, and bronchial fibroblasts to interferon- $\gamma$  in vitro. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **11**, 147-152 (1994).

Scheid, M., Duronio, V. Dissociation of cytokine induced phosphorylation of Bad and activation of PKB/akt : involment of MEK upstream of Bad phosphorylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **95**, 7439-7444 (1998).

Schwartzman, RA., Cidlowski, JA. Apoptosis : The bichemistry and molecular biology of programmed cell death. *Endocr Rev.* **14**, 133-151 (1993).

Seimiya, H., Mshima, T., Toho, M., Tsuruo, T. c-Jun NH2-terminal Kinase mediated activation of interleukin-1beta converting enzyme /CED-3-like protease during anticancer drug induced apoptosis. *J. Biol. Chem.* **272**, 4631-4636 (1997).

Sharfe, N., Roifman, CM. Differential association of phosphatidylinositol 3-kinase with insulin receptor substrate 1 and 2 in human thymocytes in reponse to IL-7. *J. Immunol.* **159**, 1107-1114 (1997).

Shimizu, S., Eguchi, Y., Kamiike, W., Matsuda, H., Tsujimoto, Y. Bcl-2 expression prevents activation of the ICE protease cascade. *Oncogene.* **12**, 2251-2257 (1996).

Schindler, C., Damell, JE Jr. Transcriptional responses to polypeptide ligands: the JAK-STAT pathway. *Annu. Rev. Biochem.* **64**, 621-651 (1995).

Simpson, S. J., Mizoguchi, E., Allen, D., Bhan, A. K., Terhost, C. Evidence that CD4+, but not CD8+, T cells are responsible for murine interleukin-2 deficient colitis. *Eur. J. Immunol.* **25**, 2618-2625 (1995).

Smith, K. A. Interleukin-2 : inception, impact and implications. *Science.* **240**, 1169-1176 (1988).

Smyth, MJ., Perry, DK., Zhang, J., Poirier, GG., Hannun, YA., Obeid, LM. PrICE : a downstream target for ceramide-induced apoptosis and for the inhibitory action of bcl-2. *Biochem J.* **316**, 25-28 (1996).

Srinivasula, SM., Fernandes, AT., Zangrilli, J. Ced-3/interleukine-1 beta converting enzyme-like homolog Mch-6 and the laminin-cleaving enzyme Mch-2alpha are substrates for the apoptotic mediator CPP32. *J Biol Chem.* **271**, 27099-27106 (1996).

Stahl, N., Farruggella, T. J., Boulton, T. G., Zhong, Z., Damell, J. E., Yankopoulos, G. D. Choice of STATs and other substrates specified by modular tyrosine-based motifs in cytokine receptor. *Science* **267**, 1349-1353 (1995).

Su, B., Karin, M. Mitogen activated protein kinase cascades and regulation of gene expression. *Curr. Opin Immunol.* **8**, 402-411 (1996).

Suda, T., Okasaki, T., Naito, Y., Yokota, T., Arai, N., Ozaki, S., Nakao, K., Nagata, S. Expression of fas ligand in T-cell lineage. *J Immunol.* **154**, 3806-3813 (1995).

Suda, T., Takahashi, T., Golstein, P., Nagata, S. Molecular cloning and expression of the fas ligand : a novel member of the tumor necrosis factor family. *Cell.* **75**, 1169-1178 (1993).

Susin, SA., Zamzami, N., Castedo, M., Hirsch, T., Marchetti, P., Macho, A., Daugas, E., Geusken, M., Kroemer, G. Bcl-2 inhibits the mitochondrial release of an apoptogenic protease. *J Exp Med.* **184**, 1331-1341 (1996).

Suzuki, H., Kundig, T., Furlonger, C., Wakeham, A., Timms, E., Matsuyama, T., Shmits, R., Simard, J., Ohashi, P., Griesser, H., Taniguchi, T., Paige, C. J., Mak, T. W. Deregulated T cell activation and autoimmunity in mice lacking interleukin-2 receptor beta. *Science.* **268**, 1472-1476 (1995).

Takeshita, T., Arita, T., Asao, H., Tanaka, N., Higuchi, M., Kuroda, H., Kaneko, K., Munakata, H., Endo, Y., Fujita, T., Sugamura, K. Cloning of a novel signal-transducing adaptor molecule containing an SH3 domain and ITAM. *Biochem. Biophys. Res. Commun* **225**, 1035-1039 (1996).

Takeshita, T., Arita, T., Higuchi, M., Asao, H., Endo, K., Kuroda, H., Tanaka, N., Murata, K., Ishii, N., Sugamura, K. STAM signal transducing adaptor molecule, is associated with Janus kinases and involved in signaling for cell growth and c-myc induction. *Immunity* **6**, 449-457 (1997).

Tanaka, M., Suda, T., Haze, K., Nakamura, N., Sato, K., Kimura, F., Mtoyoshi, K., Mizuki, M., Tagawa, S., Ohga, S., Hatake, K., Drummond, A., Nagata, S. Fas ligand and human serum. *Nature Med.* **2**, 317-322 (1996).

Toyoshima, F., Moriguchi, T., Nishida, E. Fas induces cytoplasmic apoptotic response and activation of MKK7-JNK/SAPK and MKK6-p38 pathways independent of CPP32-like proteases. *J. Cell. Biol.* **139**, 1005-1015 (1997).

Truitt, KE., Mills, GB., Truck, CW. SH2 dependent association of phosphatidylinositol 3-kinase 85 kDa regulatory subunit with the interleukin 2 receptor beta chain. *J. Biol. Chem.* **269**, 5937-5943 (1994).

Tsuji, M., DuBois, RN. Alterations in cellular adhesion and apoptosis in epithelial cells overexpressing prostaglandin endoperoxide synthase 2. *Cell.* **83**, 493-501 (1995).

Venkitaraman, AR., Cowling, RJ. Interleukin 7 induces the association of phosphatidylinositol 3 kinase with the alpha chain of the interleukin 7 receptor. *Eur. J. Immunol.* **24**, 2168-2174 (1994).

Wang, H. and Smith, K. A. The interleukin-2 receptor. Functional consequences of its bimolecular structure. *J. Exp. Med.* **166**, 1055-1069 (1987).

Wang, Q., Wang, Y., Hyde, DM., Gotwals, PJ., Kotelianski, E., Ryan, ST., Giri, SN. Reduction of bleomycin-induced lung fibrosis by transforming growth factor beta soluble receptor in hamsters. *Thorax.* **54**, 805-812 (1999).

Weidmann, E., Sacchi, M., Plaisance, S., Heo, D. S., Yasumura, S., Lin, W.-C., Johnson, J. T., Herberman, R. B., Azzarone, B., Whiteside, T. L. Receptors for interleukin 2 on human squamous cell carcinoma cell lines and tumor in situ. *Cancer Res.* **52**, 5963-5970 (1992).

Widmann, C., Gibson, S., Jarpe, MD., Johnson, GL. Mitogen activated protein kinase : conservation of a three kinase module from yeast to human. *Physiol. Rev.* **79**, 143-180 (1999).

Wiley, SR., Shooley, K., Smolak, PJ., Din, WS., Iluang, CP., Nicholl, JK., Sutherland, JR., Smith, TD., Rauch, C., Smith, CA., Goodwin, RG. Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis. *Immunity.* **3**, 673-682 (1995).

Xia, Z., Dickens, M., Raingeaud, J., Davis, RJ., Greenberg, ME. Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinase on apoptosis. *Science.* **270**, 1326-1331 (1995).

Yagoda, A., Mukherji, B., Young, C., Etcubanas, C., Lamonte, C., Smith, JR., Tan, CT., Krakoff, IH. Bleomycin : an antitumor antibiotic : clinical experience in 274 patients. *Ann. Intern. Med.* **77**, 861-865 (1972).

Yang, J., Liu, X., Bhalla, K., Kim, CN., Ibrado, AM., Cai, J., Peng, TI., Jones, DP., Wang, X. Prevention of apoptosis by bcl-2 : release of cytochrome c from mitochondria blocked. *Science.* **275**, 1128-1132 (1997).

Yang, E., Zha, J., Jockel, J., Boise, LH., Thompson, CB., Korsmeyer, SJ. Bad, a heterodimeric partner for bcl-xL and bcl-2, displaces Bax and promotes cell death. *Cell.* **80**, 285-291 (1995).

Yasumura, S., Lin, W.-C., Weidmann, E., Hebda, P., Whiteside, T. L. Expression of interleukin-2 receptors on human carcinoma cell lines and tumor growth inhibition by interleukin-2. *Int. J. Cancer* **59**, 225-234 (1994).

Yue, G., Hu, P., Oh, Y., Jilling, T., Shoemaker, RL., Benos, DJ., Cragoe, EJ Jr., Matalon, S. Culture-induced alterations in alveolar type II cell Na<sup>+</sup> conductance. *Am. J. Physiol.* **265**, 630-640 (1993)

Zha, J., Harada, H., Yang, E. Serine phosphorylation of death agonist BAD in response to survival factor result in binding to 14-3-3 not Bcl-XL. *Cell.* **87**, 619-628 (1996).

Zurawski, SM., Imier, JL., Zurawski, G. Partial agonist/antagonist mouse interleukin-2 proteins indicate that a third component of the receptor complex functions in signal transduction. *EMBO J.* **9**, 3899-3905 (1990).