

**Université du Québec
INRS-Institut Armand-Frappier
Centre de recherche en santé humaine**

Identification de peptides spécifiques à ICAM-1

par

Anna-Karine Bélizaire

**Thèse présentée pour l'obtention
du grade de Philosophiae Doctor (Ph.D.)
en virologie et immunologie**

2004

À mes grands-parents que j'aurais aimé mieux connaître.

*À ceux qui les ont précédés, pour avoir montré tant de force et de courage,
je me sais privilégiée de compter parmi les perles issues d'une histoire si
tourmentée.*

À mes parents qui m'ont tant donné.

A nou tout ki genyen lamou nou kap koule nan venn mwen.

Remerciements

Je tiens à remercier mon directeur de recherche Yves St-Pierre pour m'avoir accueillie dans son laboratoire, ses nombreux conseils et mots d'encouragement tout au long de mon cheminement. Je tiens aussi à remercier les gens de la compagnie Supratek Pharma Inc., en particulier mon directeur Valery Y Alakhov pour m'avoir confié ce projet et ma superviseure Lioudmila Tchistiakova pour son soutien et sa gentillesse et avec qui les échanges scientifiques m'ont été d'une aide inestimable.

Je m'en voudrais de ne pas souligner la présence des gens qui ont rendu mon séjour en ces deux laboratoires plus agréable. Mayada, Seba, Audrey, Klodia, Nadia, Geneviève, Benoit et Patricia de Supratek, votre gentillesse ainsi que votre humour et votre spontanéité étaient des cures instantanées aux journées de résultats négatifs. Les gens du labo, présents et passés : Doris, Céline, Éric, Julie, Mélanie, Simon et Claire. Merci de votre attention aux réunions de laboratoire!

Je tiens aussi à dire merci à mes amis qui m'ont apporté des trésors qu'aucune requête Pubmed ne peut trouver, Pierre-Olivier, Monica, Anick, Dana et Suzanne.

Finalement je remercie ma famille Jacques, Jacqueline, Jacques-Emmanuel, Daphné, Marie-Yollande et Gilbert de même que les membres et amis des départements d'outre-mer! Je sais que votre joie de voir l'aboutissement de mes efforts est aussi grande que la mienne.

Table des Matières

| | |
|------------------------------------|-----|
| Remerciements..... | iii |
| Table des matières..... | iv |
| Liste des figures et tableaux..... | vii |
| Liste des abréviations..... | ix |
| Contribution des auteurs..... | x |
| Résumé général..... | xi |

CHAPITRE 1

| | |
|---|-----------|
| Revue de littérature..... | 1 |
| 1. Famille des <i>Intercellular Adhesion Molecules (ICAM)</i>..... | 2 |
| 1.1 Structure et expression d'ICAM-1..... | 4 |
| 1.1.1 ICAM-1 membranaire..... | 4 |
| 1.1.2 Souris ICAM-1 déficientes..... | 8 |
| 1.1.3 ICAM-1 soluble..... | 8 |
| 1.1.4 Expression et régulation..... | 10 |
| 1.2 Ligands d'ICAM-1..... | 12 |
| 1.2.1 Intégrines β_2 | 12 |
| 1.2.2 Fibrinogène..... | 14 |
| 1.2.3 Mucine-1..... | 15 |
| 1.2.4 Rhinovirus..... | 15 |
| 1.2.5 <i>Plasmodium Falciparum</i> | 16 |
| 1.3 Fonctions physiologiques..... | 16 |
| 1.3.1 Recrutement des leucocytes..... | 17 |
| 1.3.2 Présentation d'antigène..... | 20 |
| 1.3.3 Inflammation..... | 24 |
| 1.3.4 Rejet de greffe..... | 25 |
| 1.3.5 Cancer..... | 26 |
| 2. Thérapies Anti-ICAM-1..... | 28 |
| 2.1 Les oligonucléotides..... | 29 |
| 2.2 Les anticorps..... | 29 |

| | |
|--|----|
| 3. Ciblage Thérapeutique | 30 |
| 3.1 Caractéristique d'une adressine | 30 |
| 3.2 Ciblage vasculaire | 31 |
| 4. Banques de Peptides | 32 |
| 4.1 Banque combinatoires synthétiques | 33 |
| 4.2 « <i>Phage display</i> » | 33 |
| 4.2.1 Structure d'un phage et cycle viral du phage M13 | 34 |
| 4.2.2 Types de banques peptidiques | 39 |
| 4.2.3 Applications | 41 |
| 4.2.3.1 Caractérisation d'épitopes et mimotopes | 41 |
| 4.2.3.2 Identification de nouveaux ligands | 41 |
| 4.2.3.3 Découverte d'épitopes et de molécules thérapeutiques | 42 |
| 4.3 Méthodes de criblage..... | 43 |
| 4.3.1 Criblage <i>In vitro</i> | 44 |
| 4.3.2 Criblage <i>In vivo</i> | 45 |

CHAPITRE 2

Identification et caractérisation fonctionnelle d'une séquence

| | |
|--|----|
| spécifique à ICAM-1 murin | 48 |
| Résumé..... | 49 |
| Introduction..... | 52 |
| Matériel et Méthodes..... | 53 |
| Résultats..... | 56 |
| Discussion..... | 58 |
| Références..... | 61 |
| Tableau..... | 69 |
| Liste des figures..... | 70 |
| Figures..... | 71 |

CHAPITRE 3

| | |
|--|------------|
| Identification d'une séquence spécifique à ICAM-1 humain et caractérisation du potentiel inhibiteur de l'interaction ICAM-1/LFA-1 spécifique..... | 74 |
| Résumé..... | 76 |
| Introduction..... | 80 |
| Matériel et Méthodes..... | 82 |
| Résultats..... | 86 |
| Discussion..... | 88 |
| Références | 90 |
| Tableau..... | 93 |
| Listes des figures..... | 94 |
| Figures..... | 95 |
| | |
| Discussion Générale..... | 102 |
| Conclusion..... | 111 |
| Annexe 1..... | 112 |
| Annexe 2..... | 114 |
| Annexe 3..... | 116 |
| Annexe 4..... | 118 |
| Annexe 5..... | 123 |
| Annexe 6..... | 126 |
| Annexe 7..... | 129 |
| Annexe 8..... | 131 |
| Annexe 9..... | 133 |
| Annexe 10..... | 135 |
| Annexe 11..... | 137 |
| | |
| Références | 139 |

Liste des Figures et Tableaux

FIGURES

CHAPITRE 1

| | |
|---|----|
| Figure 1 : Diagramme d'ICAM-1 indiquant les sites de glycosylation et de liaison..... | 6 |
| Figure 2 : Résumé des différentes isoformes d'ICAM-1..... | 9 |
| Figure 3 : Principales molécules d'adhésion impliquées dans le recrutement des leucocytes..... | 18 |
| Figure 4 : Représentation schématique de la présentation d'antigène..... | 22 |
| Figure 5 : Représentation de la formation d'une synapse immunologique..... | 23 |
| Figure 6 : Mécanisme du rejet de greffe..... | 27 |
| Figure 7 : Structure du phage filamenteux M13..... | 36 |
| Figure 8 : Schéma simplifié de l'assemblage du phage M13..... | 38 |
| Figure 9 : Banques de phages peptidiques..... | 40 |

CHAPITRE 2

| | |
|--|----|
| Figure 1 : Elution on 4.1 from COS-7/ICAM-1 vs non-transfected COS-7..... | 71 |
| Figure 2 : Flow cytometric analysis of antibody inhibition by phage 4.1 on ICAM-1 transduced COS-7 cells..... | 72 |
| Figure 3 : Inhibition of antigen presentation by the 4.1 peptide sequence inserted at the N-terminal end of the β -galactosidase protein..... | 73 |

CHAPITRE 3

| | |
|--|-----|
| Figure 1 : Specificity of HIC peptide | 95 |
| Figure 2 : HICAM-1 expression on MCF-7 and MCF-7/ADR cell lines | 96 |
| Figure 3 : Binding of ICAM-1 specific peptide (HIC) and scrambled peptide to MCF-7 and MCF-7/ADR cell lines | 97 |
| Figure 4 : HIC fusion protein inhibits MLR reaction | 100 |

TABLEAUX

CHAPITRE 1

| | |
|--|----|
| Tableau 1 : Domaines 1 et 3 des membres de la familles des ICAMs (% identité en acides aminés)..... | 3 |
| Tableau 2 : Protéines structurales du phage M13 | 35 |

CHAPITRE 2

| | |
|---|----|
| Tableau 1 : Frequency distribution of phage sequences obtained after biopanning | 69 |
|---|----|

Chapitre 3

| | |
|---|----|
| Tableau 1 : Frequency distribution of phage sequences obtained after biopanning | 93 |
|---|----|

Liste des Abréviations

| | |
|--------------|---|
| ADN | Acide déoxyribonucléique |
| Ag | Antigène |
| ARN | Acide ribonucléique |
| CD | Cluster of differentiation |
| CMH | Complexe majeur d'histocompatibilité |
| CPA | Cellule présentatrice d'antigène |
| D | Domaine |
| FAK | Focal adhesion kinase |
| FR | Forme répliquative |
| HRV | Human rhinovirus |
| ICAM | Intercellular adhesion molecule |
| ICAM-1s | ICAM-1 soluble (ou sérique) |
| IFN γ | Interféron gamma |
| Ig | Immunoglobuline |
| KDa | Kilodalton |
| LAD | Leucocyte adhesion deficiency |
| LFA-1 | Leucocyte function associated Antigen-1 |
| MECLR | Mixed epidermal cell-T lymphocyte reaction |
| MLR | Réaction de lymphocytes mixtes |
| PECAM | Platelet endothelial cell adhesion Molecule |
| PMN | Cellule polymorphonucléée |
| PSGL-1 | P-selectin glycoprotein ligand-1 |
| TCR | T cell receptor |
| TNF α | Tumor necrosis factor alpha |

Contribution des auteurs

Ce projet a été réalisé dans un milieu industriel. J'ai effectué toutes les expériences de criblage et de liaison dans les laboratoires de Supratek Pharma Inc. sous la co-direction de Valery Alakhov et la supervision de Lioudmila Tchistiakova avec qui j'ai réalisé le criblage d'ICAM-1 murin. Les tests fonctionnels ont été réalisés dans le laboratoire de mon directeur de recherche Yves St-Pierre.

La synthèse du peptide 4.1 a été tentée au département de chimie de Supratek Pharma, puis par Synpep une compagnie spécialisée dans la synthèse de peptides. La synthèse des peptides SPHIC et SPHIR a été réalisée chez Supratek Pharma. L'assistante de recherche Klodia Colakian, avec la collaboration de Grzegorz Pietrzynski, a produit la totalité des lots de peptides utilisés dans ce projet, et à ce titre, leurs noms sont inclus dans le deuxième article soumis en mars 2004.

Résumé général

L'interaction d'ICAM-1 (Intercellular Adhesion Molecule-1) avec ses ligands LFA-1 et Mac-1 joue un rôle important dans les fonctions immunologiques de l'organisme, notamment lors du recrutement des leucocytes aux sites inflammatoires et lors de la présentation d'antigènes. L'ICAM-1 est considérée comme une molécule inductible et son expression est modulée de façon stricte au niveau transcriptionnel. Toutefois une expression anormalement élevée et constitutive d'ICAM-1 a été observée dans plusieurs pathologies de nature inflammatoire et cancéreuse. Sa surexpression à la surface de l'endothélium vasculaire à proximité de lésions, ainsi qu'à la surface de cellules tumorales, en fait une cible intéressante pour des agents inhibiteurs de même que pour des transporteurs d'agents thérapeutiques. De plus, l'élaboration de stratégies visant à inhiber la fonction d'ICAM-1 à des fins thérapeutiques est à considérer puisque des modèles expérimentaux murins ont démontré que l'inhibition fonctionnelle d'ICAM-1 a un effet protecteur contre le choc septique et la dissémination du lymphome.

Les premiers outils thérapeutiques étaient basés sur l'utilisation d'anticorps monoclonaux dans le but de bloquer l'activité d'ICAM-1. Cependant le potentiel immunogène de ces molécules et leur faible diffusion à travers les tumeurs ont obligé le développement de moyens alternatifs. En plus de pouvoir être conjuguée à des molécules actives, la molécule de ciblage idéale devrait être non immunogène et pouvoir facilement s'infiltrer dans les tissus de la lésion. Les peptides sont donc des candidats intéressants et les banques de phages exprimant des peptides représentent un bon moyen de sélectionner des molécules se liant à ICAM-1 puisque chaque particule contient le gène codant pour la séquence en acides aminés correspondante.

Afin de développer de nouvelles thérapies anti-ICAM-1 dans les modèles inflammatoires et cancéreux, nous avons divisé cette étude en deux volets. Premièrement, nous avons criblé une banque phagique sur ICAM-1 murin afin d'identifier un peptide se liant spécifiquement à cette molécule. Nous avons caractérisé la spécificité des phages exprimant ce peptide à l'aide de tests de liaison et de compétition avec deux anticorps ciblant des épitopes

distincts du domaine 1 d'ICAM-1. Nous avons ensuite utilisé cette séquence de liaison à ICAM-1 (4.1) conjuguée à la β -galactosidase pour produire une protéine de fusion (spmic4.1/bgal) dans le but de déterminer son potentiel comme transporteur moléculaire dans un modèle *in vitro* de présentation d'antigène. La conjugaison du peptide n'a pas affecté l'activité enzymatique de la β -galactosidase. De plus, la diminution ICAM-1-dépendante de la sécrétion d'IL-2 démontre que la séquence 4.1 a conservé sa spécificité. Au deuxième volet de ce projet, nous avons isolé des phages liant ICAM-1 humain par élution acide ou en utilisant l'anticorps anti-ICAM-1, HA58. Cet anticorps inhibe la réaction des lymphocytes mixtes. La séquence du peptide SPHIC identifiée par les deux approches est spécifique à ICAM-1 humain tel que démontré par des tests de liaison du peptide à la protéine purifiée et à des cellules cancéreuses exprimant différents niveaux d'ICAM-1 humain. Finalement, nous avons observé l'inhibition de la réaction de lymphocytes mixtes en présence de la protéine de fusion SPHIC/bgal.

Nos résultats démontrent la liaison des séquences-mères 4.1 et SPHIC et la capacité d'inhibition de l'activité ICAM-1 exercée par les molécules spmic/bgal et SPHIC/bgal dérivées. En conclusion, cette étude démontre le potentiel de modifier les propriétés d'agents thérapeutiques par l'amélioration de leur sélectivité dans le but de cibler des lésions où ICAM-1 est surexprimé.

CHAPITRE 1

Revue de littérature

1. Famille des *Intercellular Adhesion Molecules* (ICAM)

Les 5 membres (ICAM-1, -2, -3, -4 et -5) que contient cette famille font partie de la superfamille des immunoglobulines (Ig) dû à la structure de leur domaine extracellulaire, analogue à celle des Ig. Puisque ces travaux portent principalement sur ICAM-1 nous décrivons avec plus de détails cette molécule dans les sections à venir.

Les ICAM contiennent tous un domaine membranaire et un domaine cytoplasmique. Ils diffèrent dans la distribution de leur expression, leur nombre de domaines extracellulaires et la capacité de ceux-ci à se lier à différentes intégrines. Une séquence pentapeptidique nécessaire à la liaison des ICAM aux β_2 intégrines a été identifiée. Elle se retrouve sur chaque domaine capable de lier l'intégrine (Staunton *et al.*, 1990)

Les cellules endothéliales, les lymphocytes et les monocytes expriment constitutivement ICAM-2 (CD102). Sa présence fut suggérée suite à la capacité des leucocytes d'adhérer à l'endothélium malgré la présence d'anticorps anti-ICAM-1 (Dustin et Springer, 1988). Cette molécule se lie au *Leukocyte Function Associated Antigen* (LFA) -1 et contient 2 domaines extracellulaires homologues aux deux domaines N-terminaux d'ICAM-1 (Tableau 1; Staunton, Dustin et Springer, 1989). Contrairement à ICAM-1, son expression n'est pas modulée par des cytokines pro-inflammatoires.

ICAM-3 (CD50) se lie aussi à LFA-1 (Sadhu *et al.*, 1994) et contient 5 domaines extracellulaires. Tel qu'illustré au tableau 1, le domaine 2 d'ICAM-3 a une forte homologie de séquence avec le domaine 2 d'ICAM-1. Cette molécule, exprimée constitutivement par les leucocytes mononucléés et polymorphonucléés, serait impliquée dans les interactions leucocytes-leucocytes e.g. l'activation des lymphocytes B par les lymphocytes T auxiliaires (Montoya *et al.*, 2002). ICAM-3 se retrouve aussi dans l'épiderme exprimé par les cellules de Langerhans et participe à l'activation des lymphocytes T CD4⁺ (Acevedo *et al.*, 1993; Griffiths *et al.*, 1995). Son expression au niveau de l'endothélium a uniquement été démontrée lors

Tableau 1. Domaines 1 et 2 des membres de la famille des ICAMs (% identité en acides aminés)^a

| | ICAM-1 | ICAM-2 | ICAM-3 | ICAM-4 | ICAM-5 |
|--------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| ICAM-1 | | <i>34</i> | <i>77</i> | <i>26</i> | <i>64</i> |
| ICAM-2 | 34 | | <i>38</i> | <i>27</i> | <i>42</i> |
| ICAM-3 | 38 | 36 | | <i>27</i> | <i>64</i> |
| ICAM-4 | 30 | 30 | 30 | | <i>28</i> |
| ICAM-5 | 25 | 33 | 31 | 36 | |

^aDomaine 1, caractères gras; Domaine 2, italique

Adapté d'Hayflick, Kilgannon et Gallatin, 1998

de la néovascularisation associée à la croissance tumorale (Doussis-Anagnostopoulou *et al.*, 1993; Patey *et al.*, 1996). Cette molécule se lie aussi à l'intégrine $\alpha_4\beta_2$ (Van der Vieren *et al.*, 1995). La molécule ICAM-3 n'est pas exprimée chez les rongeurs (Yoshimura et Johnson, 1993).

La molécule ICAM-4 est un antigène sanguin aussi appelée glycoprotéine Landsteiner Weiner. Elle ne contient que deux domaines extracellulaires et possède une homologie ~30% avec les autres membres de cette famille. La liaison d'ICAM-4 aux intégrines LFA-1 et MAC-1 a été démontrée en conditions statiques d'adhésion (Bailly *et al.*, 1995).

ICAM-5 est le dernier membre de la famille ayant été identifié (Yoshihara *et al.*, 1994). Il est aussi appelé télencéphaline parce qu'il est exclusivement exprimé sur la membrane des neurones télencéphaliques (Yoshihara *et al.*, 1994). La molécule est constituée de neuf domaines extracellulaires. Les cinq premiers sont homologues aux cinq domaines extracellulaires d'ICAM-1 et -3. Les domaines six à huit semblent être issus de la duplication du domaine 5. Le domaine 9 semble apparenté aux immunoglobulines de type C plutôt qu'aux ICAM (Yoshihara *et al.*, 1994). Le domaine 1 contient le motif de liaison nécessaire à l'interaction ICAM-1/intégrine et des résultats ont démontré sa capacité à lier LFA-1 et Mac-1 (Mizuno *et al.*, 1997).

1.1 Structure et expression d'ICAM-1

ICAM-1 est retrouvé à travers l'organisme sous différentes formes. Ces différentes molécules d'ICAM-1 sont le résultat de deux événements, le clivage protéolytique et l'épissage alternatif de son ARN-messager. Dans cette section nous décrivons tout d'abord la forme commune membranaire d'ICAM-1, ensuite les conséquences de ces deux événements sur la structure de cette glycoprotéine complexe et terminerons par les facteurs modulant son expression.

1.1.1 ICAM-1 membranaire

L'« Intercellular Adhesion Molecule-1 » (ICAM-1, CD54) contient cinq domaines extracellulaires. Ces domaines contiennent des résidus de cystéines espacés d'environ 65 acides aminés

formant un pont disulfure et organisés en feuillets β antiparallèles, à l'exception du domaine 4 où un résidu de cystéine est remplacé par une leucine hydrophobe stabilisant le feuillet β (Staunton *et al.*, 1988). L'absence de pont disulfure au domaine 4 entraîne l'inclinaison de la molécule entre les domaines 3 et 4. Contrairement aux autres ligands d'intégrines, ICAM-1 ne contient aucune séquence RGD (Arginine-Glycine-Acide aspartique) liant le calcium, suggérant une conformation indépendante (Giranda, Chapman et Rossmann, 1990; Staunton *et al.*, 1990). La portion extracellulaire d'ICAM-1 est constituée de 453 a.a. différemment glycosylés en fonction de la cellule sur laquelle il est exprimé, faisant varier sa masse moléculaire de 80 à 110 kilodaltons (kDa) (Staunton *et al.*, 1988). Les sites de glycosylation se retrouvent sur les domaines 2,3 et 4 (D2, D3 et D4). Le domaine 2 abrite potentiellement 4 sites de glycosylation alors que D3 et D4 en abritent deux chacun (Figure 1; Dustin *et al.*, 1986; Simmons, Makgoba et Seed, 1988). La molécule contient aussi un domaine hydrophobe transmembranaire de 24 acides aminés et un domaine carboxy-terminal cytoplasmique de 28 résidus. ICAM-1 forme des homodimères à la surface cellulaire dont les sous-unités sont liées de façon non-covalente (Miller *et al.*, 1995; Reilly *et al.*, 1995).

La molécule ICAM-1 est le ligand de plusieurs molécules non pathogènes. Elle est le ligand principal de LFA-1(aussi appelé $\alpha_L\beta_2$, CD11a/CD18) exprimée à la surface des lymphocytes. De toutes les interactions avec ICAM-1, celle-ci est sans doute la mieux caractérisée à cause de son importance dans le maintien du contact avec les cellules présentatrices d'antigène (CPA) nécessaire à l'activation et à la prolifération des cellules T mais aussi dans l'adhésion ferme des leucocytes à l'endothélium vasculaire, étape essentielle qui précède leur transmigration vers le site d'inflammation. LFA-1 se lie au domaine 1 d'ICAM-1. Il a été démontré que les résidus E-34 et Q-73 de D1 sont nécessaires à la liaison d'ICAM-1 à LFA-1 purifié (Fisher *et al.*, 1997; Staunton *et al.*, 1990; Welply *et al.*, 1996). Toutefois, des mutations en ces deux sites ont permis de déterminer que la région Q-73 influence la liaison mais n'interagit pas directement avec LFA-1 contrairement à E-34 qui interagit avec le domaine I de la chaîne α de LFA-1 (Stanley et Hogg, 1998). Bien que la dimérisation d'ICAM-1 augmente

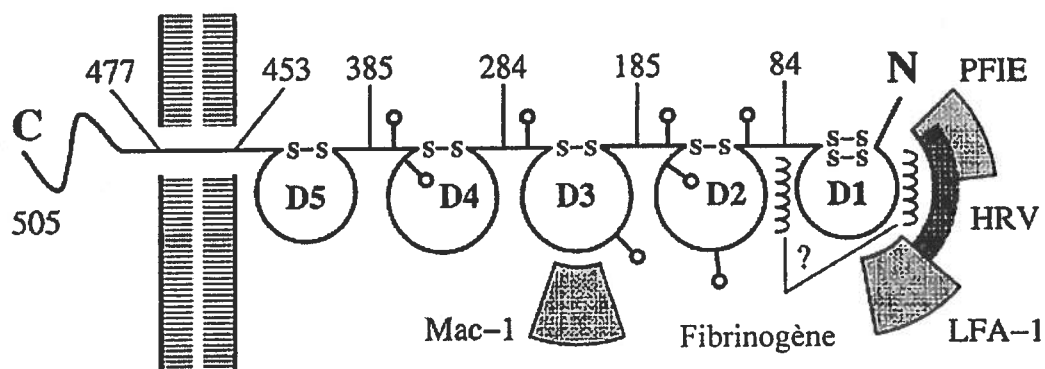


Figure 1 : Diagramme d'ICAM-1 indiquant les sites de glycosylation et de liaison

Légende :



Sites de glycosylation

Sites de liaison
approximatifs

- LFA-1
- HRV
- Fibrinogène
- Érythrocytes infectés par *Plasmodium falciparum* (PFIE).

Tiré de Bella *et al.*, 1998

l'efficacité de la liaison à LFA-1, la région E-34 de la sous-unité monomérique d'ICAM-1 humain constitue la surface complète de liaison de LFA-1 (Jun *et al.*, 2001).

Des anticorps ciblant le domaine 2 ont pu bloquer la liaison ICAM-1/LFA-1, suggérant l'implication de D2 dans cette interaction (Berendt *et al.*, 1992). L'étude des régions hydrophobes de ce domaine a démontré que la région H¹⁵²HG était importante dans le maintien de la configuration du site d'interaction localisé en D1 et favorise ainsi la liaison avec LFA-1 sans entrer en contact direct avec celui-ci (Stanley *et al.*, 2000). Ces résidus assurent la flexibilité interdomaine nécessaire à la liaison. Ce besoin de flexibilité a aussi été observé chez la molécule CD4 (Sanejouand, 1996). Toutefois, ICAM-1 est le seul ligand de LFA-1 à contenir une telle région.

Le domaine 3 de la molécule d'ICAM-1 contient le site de liaison de Mac-1 (Diamond *et al.*, 1990). La modification de la glycosylation de ce domaine affecte la liaison de Mac-1 à la molécule alors que la liaison de LFA-1 demeure inchangée. L'identification du site de liaison de Mac-1 rationalise la duplication en tandem observée dans la molécule i.e. la forte similarité du domaine 1 avec le domaine 3 et du domaine 2 avec le domaine 4 (Diamond *et al.*, 1991). La délétion des domaines 4 et 5 n'empêche pas la liaison de D3 à Mac-1.

Dans la forme membranaire d'ICAM-1, le domaine 5 est adjacent à la membrane cellulaire. Cette région semble médier la dimérisation de la molécule (Miller *et al.*, 1995; Reilly *et al.*, 1995). La région extracellulaire périmembranaire faciliterait l'orientation des domaines extracellulaires (Wang et Springer, 1998) et pourrait contenir des sites de clivage protéolytique (Budnik *et al.*, 1996; Champagne *et al.*, 1998; Lyons et Benveniste, 1998). Dernièrement, l'amplification chez la souris de cette région par PCR a révélé la présence de deux bandes suggérant la présence d'une nouvelle isoforme. Contrairement aux isoformes les plus étudiées qui sont le résultat de délétion de domaines entiers (van Den Engel *et al.*, 2000), celle-ci serait produite suite au clivage de l'exon VI codant le domaine 5 (Mizgerd, Spieker et Lupa, 2002) et est inductible par le LPS comme les autres formes membranaires. Le nouveau domaine 5 qui en

résulte n'a pas la structure typique d'un domaine d'Ig et les conséquences de cette modification restent à déterminer.

1.1.2 Souris ICAM-1 déficientes

Il existe deux lignées de souris ICAM-1 déficientes générées par recombinaison homologue du gène de résistance à la néomycine dans deux exons différents du gène ICAM-1. Dans la première lignée, le gène de résistance a été inséré dans l'exon 5 (Sligh *et al.*, 1993) et dans l'exon IV chez la seconde lignée (Xu *et al.*, 1994). Aucune lignée n'exprime la forme commune d'ICAM-1 (Figure 2). Les souris issues de ces deux lignées se développent normalement mais démontrent des anomalies au niveau de leur réponse inflammatoire. Notamment, en démontrant une résistance à l'injection d'une dose létale de LPS (Xu *et al.*, 1994) et une incapacité des cellules ICAM-1 déficientes à activer des cellules T dans la réaction de lymphocytes multiples (Sligh *et al.*, 1993). Des isoformes d'ICAM-1 solubles ont été rapportées chez les deux lignées (van Den Engel *et al.*, 2000).

1.1.3 ICAM-1 soluble

ICAM-1 est aussi retrouvé non associé à la membrane, circulant sous forme soluble (ICAM-1s; CD54s). Les valeurs sériques normales varient selon les publications de 100 à 500ng/ml (Banks *et al.*, 1993). Les résultats de cultures de cellules endothéliales suggèrent que l'expression membranaire de CD54 doit dépasser un seuil critique (Gomez-Scotto *et al.*, 2000; Hashimoto *et al.*, 1994) avant d'être libéré par clivage protéolytique (Budnick *et al.*, 1996). Appuyant cette hypothèse, des isoformes solubles d'ICAM-1 ne contenant pas le domaine transmembranaire ont été retrouvées dans des souris ICAM-1 déficientes alors que l'analyse par séquençage a révélé la présence de ce domaine dans tous les transcrits issus d'épissage alternatif (van Den Engel *et al.*, 2000). Le clivage pourrait permettre entre autres la rupture rapide des contacts intercellulaires ou donner à ICAM-1 la capacité d'agir comme médiateur à distance. L'addition d'iodoacétamide, un inhibiteur de protéase, inhibe la production de ICAM-1s de façon

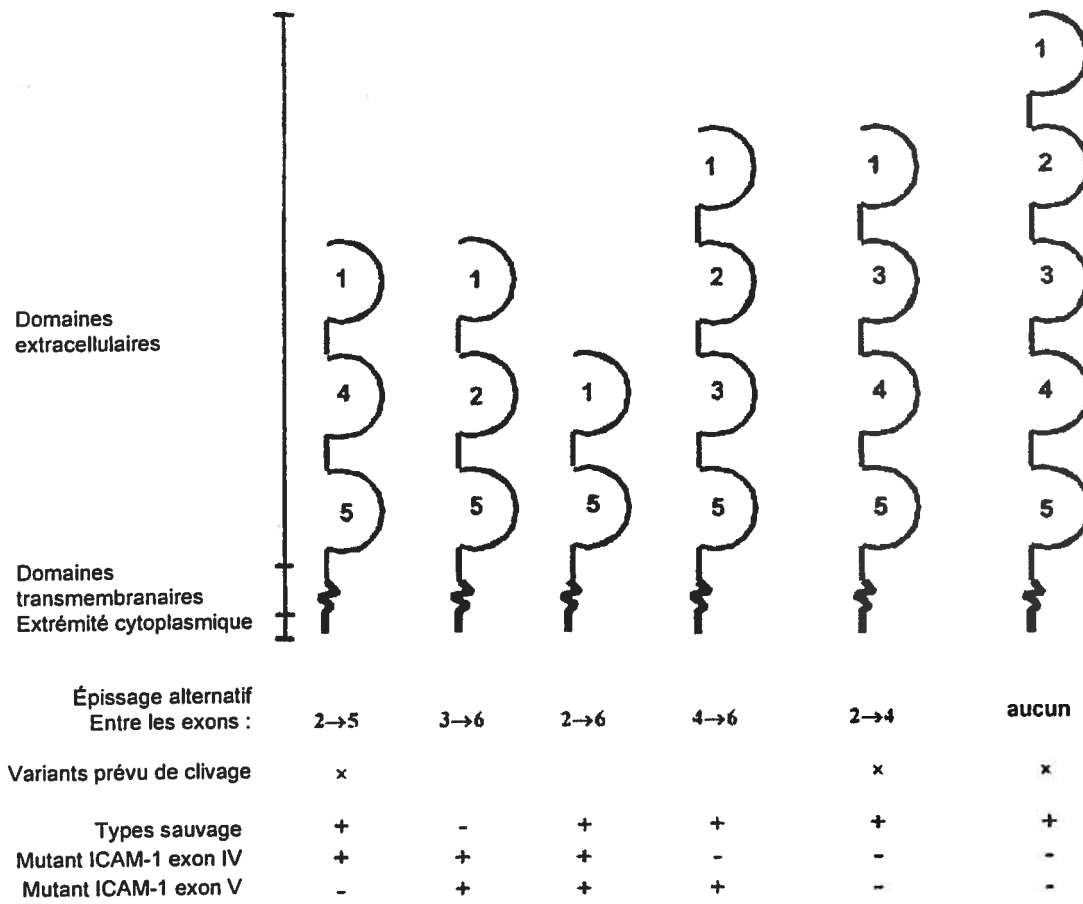


Figure 2 : Résumé des différentes isoformes d'ICAM-1

Tiré de van Den Engel *et al.*, 2000.

dose-dépendante par les kératinocytes humains en culture (Budnik *et al.*, 1996). Le site de clivage serait situé à proximité de la région transmembranaire appuyant la petite différence de poids entre les deux formes de la molécule monomérique (Budnik *et al.*, 1996). ICAM-1s contient uniquement les domaines extracellulaires de la forme membranaire correspondante. La molécule conserve donc sa capacité de liaison à LFA-1 et Mac-1. Toutefois des études avec ICAM-1s recombinant ont démontré que LFA-1 peut se lier au monomère d'ICAM-1s uniquement lorsqu'il est immobilisé (Cobb *et al.*, 1992; Welder, Lee et Takei, 1993). Des complexes moléculaires de 240, 430 et 500kd ont été détectés chez des individus sains (Seth, Raymond et Makgoba, 1991), suggérant qu'ICAM-1s s'associe avec lui-même ou avec une autre protéine (Rothlein *et al.*, 1991; Seth, Raymond et Makgoba, 1991). Le maintien de ces fonctions biologiques permettrait à certaines cellules malignes d'échapper au mécanisme d'immunosurveillance de l'organisme (Becker *et al.*, 1991; Maruo *et al.*, 2002). Cette hypothèse concorde avec les observations chez des individus atteints de pathologies à différents stades de sévérité. En effet, les taux d'ICAM-1s chez les patients ayant une maladie inflammatoire ou une tumeur bénigne sont significativement moins élevés comparativement aux patients ayant une tumeur maligne. De plus, parmi certains patients atteints d'un cancer, la présence de métastase corrèle avec une augmentation du taux d'ICAM-1s (Tsujiaki *et al.*, 1991). Cette corrélation a aussi été détectée dans diverses pathologies telles que des accidents cardiovasculaires et des inflammations aiguës. Des études longitudinales ont rapporté une relation entre la guérison du syndrome déficitaire multiple d'organe engendré par septicémie ou de choc septique et la diminution rapide de niveau d'ICAM-1s. Le maintien d'un taux élevé d'ICAM-1s était relié à un mauvais pronostic (Endo *et al.*, 1995).

1.1.4 Expression et régulation

Un large éventail de types cellulaires exprime ICAM-1. Des études immunohistochimiques ont révélé une expression de base à la surface de cellules endothéliales et épithéliales, des macrophages et des fibroblastes. Chez l'humain, ICAM-1 est aussi exprimé

par les cellules dendritiques du thymus, des ganglions lymphatiques, de l'intestin, de la peau, des reins et du foie (Dustin *et al.*, 1986). Par contre, d'autres types cellulaires comme les cellules épithéliales gastriques ainsi que l'endothélium des veines portes n'expriment pas ICAM-1 (Scheynius et Engstrand, 1991). ICAM-1 peut être régulé à la hausse par différents facteurs. Les cytokines proinflammatoires TNF α , IFN γ et IL-1 sont les plus importants inducteurs d'ICAM-1, tandis que les glucocorticoïdes sont les principaux agents inhibiteurs (van de Stolpe et van der Saag, 1996).

La régulation de l'expression d'ICAM-1 s'effectue majoritairement au niveau transcriptionnel (Stratowa et Audette, 1995). Elle implique le site Sp1 du promoteur, dont délétion induit une baisse significative d'activité du promoteur (van de Stolpe *et al.*, 1994). La région amplificatrice kB du promoteur est responsable de la réponse au TNF α , à l'IL-1, au lipopolysaccharide, et au TPA (12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate), constituant ainsi le plus important élément de régulation transcriptionnelle (Eck *et al.*, 1993; Ledebur et Parks, 1995; van de Stolpe *et al.*, 1994). Un site de régulation "AP-1-like" est impliqué dans l'induction d'ICAM-1 à travers une séquence commune pIRE (palindromic Interleukine Response Element) (Caldenhoven *et al.*, 1994; van de Stolpe *et al.*, 1994). L'acide rétinoïque peut réguler ICAM-1 à la hausse (Aoudjit *et al.*, 1995) ou à la baisse (Weber *et al.*, 1995). La régulation cellule-spécifique d'ICAM-1 implique des messagers secondaires tels la protéine kinase C α (Dean *et al.*, 1994), l'AMP cyclique (Bouillon *et al.*, 1992), le Ca $^{2+}$ (Renkonen *et al.*, 1990) et la phospholipase A $_2$ (Morisaki *et al.*, 1994).

Au niveau post-transcriptionnel, la régulation d'ICAM-1 s'effectue par épissage alternatif ou par clivage protéolytique. Les isoformes d'ICAM-1 observées chez les souris déficientes sont le résultat d'épissage de l'ARN-m aux jonctions intron-exon. Comme décrit précédemment, des isoformes membranaires ont été détectées chez la souris ICAM-1 déficiente. L'injection au LPS induit chez ces souris un profil d'expression différentiel en fonction de l'organe. Chez les souris ICAM-1 (exon-V) déficientes, les isoformes 2-6 et 4-6 sont plus exprimées dans le cœur et les poumons comparativement aux souris sauvages, tandis que l'isoforme 2-4 est exprimée à un

niveau équivalent (King *et al.*, 1995). Le clivage protéolytique libère ICAM-1 de la membrane, conduisant à une baisse d'expression cellulaire.

1.2 Ligands d'ICAM-1

ICAM-1 peut se lier à diverses molécules, certaines sont exprimées par l'organisme alors que d'autres sont des agents pathogènes.

1.2.1 Intégrines β_2

LFA-1 fait partie des molécules β_2 de la famille des intégrines et il est exprimé uniquement par les leucocytes sous forme d'un hétérodimère constitué d'une chaîne α_L (CD11a) et d'une chaîne β_2 (CD18) liées de façon non covalente à la surface des leucocytes. Son expression à la surface des leucocytes est constitutive. LFA-1 module un grand nombre d'interaction du système immunitaire. L'activation des leucocytes entraîne : leur extravasation, leur migration vers les tissus endommagés, la reconnaissance d'Ag à la surface des CPA, et la formation d'une synapse immunologique. La sous-unité α_L contient le principal site de liaison en son domaine I « Inserted » (Edwards *et al.*, 1998; Randi et Hogg, 1994) avec d'autres sites en ses domaines V, VI (Stanley *et al.*, 1994) et sur la sous-unité β_2 (Goodman et Bajt, 1996). LFA-1 peut se lier aux 5 différents ICAMs connus, ses principaux ligands sont ICAM-1, -2 et -3, malgré que son affinité pour ICAM-3 soit beaucoup plus faible.

Le domaine I est constitué de 200 a.a. Cette région est conservée dans la moitié des 18 sous-unités connues retrouvées chez les organismes vertébrés (Gahmberg, Tolvanen et Kotovuori, 1997). On retrouve dans cette région un site particulier nommé « metal ion-dependent adhesion site » ou MIDAS (Lee *et al.*, 1995), important dans l'échange de cations divalents. La sous-unité β contient deux domaines respectivement analogues au domaine I et au domaine MIDAS avec une structure tridimensionnelle similaire à la région I de la sous-unité α . L'extrémité N-terminale de la sous-unité α contient sept feuillets β (Springer, 1997). Chaque chaîne est une glycoprotéine formée d'un large domaine extracellulaire, d'un domaine transmembranaire et

d'une courte extension cytoplasmique (Humphries, 2000). Les deux chaînes sont liées par leur domaine extracellulaire. Le domaine I analogue s'associe à la sous-unité α à proximité de son domaine I (Puzon-McLaughlin, Kamata et Takada, 2000; Zang et Springer, 2001). L'importance de la région I et de son site MIDAS a été démontrée par de multiples approches. Celles-ci incluent l'utilisation d'Ac bloquants ciblant le domaine I, la délétion de la région I ou au contraire par l'activité fonctionnelle du domaine isolé (Leitinger et Hogg, 2000; Randi et Hogg, 1994), la mutation du domaine MIDAS (Kamata, Wright et Takada, 1995) et même du MIDAS analogue retrouvé sur la chaîne β (Goodman et Bajt, 1996) suggérant un rôle significatif des deux chaînes dans la liaison de LFA-1 aux différents ICAMs. Toutefois la contribution exacte de ces différentes régions, à savoir s'il y a interaction directe ou non avec le ligand, tout comme le processus d'activation de LFA-1 sont longtemps demeurés inconnus.

Deux mécanismes d'activation de LFA-1 ont été proposés. Le premier modèle suggère une augmentation d'affinité. Une telle augmentation a été démontrée pour d'autres intégrines, toutefois, ces mêmes études ont conclu qu'il était peu probable que cette variation d'affinité joue un rôle déterminant dans l'activation de LFA-1 (Shattil *et al.*, 1995). D'autres études sur la structure des intégrines ont observé un changement conformationnel suite à leur activation et que cette modification régule leur adhésion. La molécule est dite ouverte ou fermée ce qui correspond respectivement à sa conformation de haute ou de faible affinité (McDowall *et al.*, 1998; Shimaoka *et al.*, 2000; Stephens *et al.*, 1995). Des chercheurs ont démontré que ce changement conformationnel était aussi retrouvé chez LFA-1 (Huth *et al.*, 2000). Leurs observations ont permis d'élucider la contribution de la sous-unité β_2 en particulier du domaine I analogue, dans la régulation de la liaison ICAM-1/LFA-1. D'après leurs résultats, lorsque LFA-1 est verrouillé en sa conformation de haute affinité par des ponts disulfure la molécule devient réfractaire à l'activité bloquante d'Ac spécifiques à la sous-unité β_2 , suggérant que la régulation par β_2 est produite par association allostérique au domaine I de la sous-unité α_1 , région où se fait la liaison directe avec le ligand (Lu *et al.*, 2001). En conformation ouverte l'affinité ordinale de LFA-1 pour ses trois principaux ligands est ICAM-1 > ICAM-2 > ICAM-3. Le second modèle

d'activation de LFA-1 suggère une agglomération de l'intégrine à la surface cellulaire entraînant l'augmentation de l'avidité. Une étude comparant la liaison de lymphocytes exprimant différentes distributions cellulaires de LFA-1 a observé la liaison au ligand uniquement lorsque LFA-1 se retrouvait en amas, cette conformation nécessite un réarrangement du cytosquelette (van Kooyk *et al.*, 1991).

Le domaine 3 d'ICAM-1 contient le site de la liaison de Mac-1 (Diamond *et al.*, 1991), une intégrine de la famille des β_2 comme LFA-1. Mac-1 (aussi appelé CD11b/CD18, CR3, $\alpha\mu\beta_2$) est l'intégrine la plus abondante à la surface des neutrophiles. Mac-1 est impliquée dans l'adhésion des leucocytes à l'endothélium. Malgré les similarités de structure entre les chaînes CD11a et CD11b, les deux intégrines diffèrent dans leur expression, certaines de leurs fonctions et dans la nature de leur interaction avec ICAM-1.

L'augmentation de Mac-1 suite à une activation chimiotactique est plus rapide que LFA-1 grâce à la relocalisation de granules sécrétoires. Mac-1 est un important récepteur de cellules phagocytaires qui reconnaît le facteur du complément iC3b présent sur le pathogène opsonisé. La liaison Mac-1/ICAM-1 est plus sensible à la température, ainsi qu'à la force exercée par le flot sanguin «shear stress» (Diamond *et al.*, 1990). L'étude de l'importance relative de ces deux intégrines vis-à-vis les cellules endothéliales suggère que LFA-1 soit responsable de presque la totalité de l'influx de leucocytes en réponse au TNF- α (Ding *et al.*, 1999).

1.2.2 Fibrinogène

En plus de reconnaître des co-récepteurs associés à la membrane des cellules effectrices, ICAM-1 compte aussi des ligands solubles plasmiqes dont l'acide hyaluronique (McCourt *et al.*, 1994) et le fibrinogène (Languino *et al.*, 1993). Le fibrinogène soulève un intérêt particulier parce qu'il améliore l'adhésion des leucocytes à l'endothélium (Languino *et al.*, 1993). De plus, en agissant comme un pont il faciliterait l'extravasation des monocytes (Languino *et al.*, 1995; Sriramarao, Languino et Altieri, 1996). Cette protéine plasmique dimérique de 340 kDa circule dans le sang à une concentration de 2-3mg/ml (D'Souza *et al.*, 1996) et se lie au domaine

1 d'ICAM-1 en une région distincte du site d'interaction de LFA-1 (Figure 1) mais chevauchant la partie reconnue par les érythrocytes infectés par *Plasmodium falciparum* (Duperray *et al.*, 1997). D'après cette étude, la reconnaissance d'ICAM-1 potentialiserait l'adhérence LFA-1 ou Mac-1 dépendante pour palier aux forces de répulsions du glycocalyx.

1.2.3 Mucine-1

La liaison d'ICAM-1 avec mucine-1 est la moins bien caractérisée. La mucine-1 fait partie d'un groupe hétérogène de protéines hautement glycosylées ayant une structure filamenteuse à forte charge négative. Elle est principalement constituée de répétitions (20-125) en tandem de 20 acides aminés (Gendler *et al.*, 1990). Son expression aberrante par les cellules tumorales semble favoriser le détachement cellulaire et l'apparition de métastases. De plus, son rôle dans la perturbation du contact cellulaire (Makiguchi, Hinoda et Imai, 1996) les protégerait de la réponse anti-tumorale (Chan *et al.*, 1999; Hinoda *et al.*, 1998). Il a été proposé que l'interaction de mucine-1 avec le domaine 1 d'ICAM-1 soit responsable de l'inhibition de la liaison des cellules T cytotoxiques à leur cible (Kam *et al.*, 1998) et que cette même interaction est impliquée dans l'adhésion de cellules tumorales à l'épithélium, favorisant par conséquent la dissémination de foyers métastatiques (Hayashi *et al.*, 2001).

1.2.4 Rhinovirus

Il est intéressant de noter qu'ICAM-1 est l'unique membre connu de la famille des ICAMs ayant des ligands d'origine pathogène. Parmi ceux-ci on retrouve divers membres de la famille des *Picornaviridea* dont le groupe majeur (90% des sérotypes) des rhinovirus (Greve *et al.*, 1989; Staunton *et al.*, 1989) ainsi que plusieurs sérotypes des Coxsakievirus-A (Colonno, Callahan et Long, 1986; Shafren *et al.*, 1997). Toutes ces particules virales se lient au domaine 1 d'ICAM-1 en une région similaire (Figure 1) et engendrent des maladies bénignes des voies respiratoires supérieures. Alors qu'une infection par un rhinovirus provoque l'induction d'ICAM-1, favorisant le recrutement des leucocytes au site inflammatoire (Papi et Johnston, 1999), on ignore pour

l'instant si une telle induction est déclenchée lors d'une infection par le virus coxsakie. L'utilisation d'ICAM-1 soluble a démontré qu'ICAM-1 était responsable de la décapsulation de la particule virale chez les rhinovirus (Greve *et al.*, 1989; Hoover-Litty et Greve, 1993). Il a donc été proposé que la liaison à ICAM-1 provoque la déstabilisation de la capsid du rhinovirus, entraînant la translocation de l'ARN positif viral à l'intérieur de la cellule infectée (Rueckert, 1996).

1.2.5 *Plasmodium falciparum*

Un second ligand d'origine pathogène est l'Ag var de *Plasmodium falciparum* (Smith *et al.*, 1995). Le ligand est exprimé à la surface des érythrocytes infectés, occasionnant leur adhérence à l'endothélium microvasculaire. Ce phénomène appelé séquestration permet au parasite de restreindre son exposition au système d'immunosurveillance de l'hôte (Berendt *et al.*, 1992; Ockenhouse *et al.*, 1992). La cyto-adhérence des globules rouges mime le processus de recrutement des leucocytes (Ho *et al.*, 2000), hormis les molécules d'adhésion impliquées. L'arrêt des érythrocytes à la surface de l'endothélium se produit principalement par l'attachement de var à CD36 qui ne semble pas avoir de rôle dans l'adhésion des leucocytes à l'endothélium vasculaire. De plus, contrairement au recrutement des leucocytes, l'interaction de var avec le domaine 1 d'ICAM-1 ne suffit pas à engendrer une adhésion ferme mais agit plutôt sur le roulement accentuant par synergie l'interaction var/CD36 (Yipp *et al.*, 2000). L'extrémité N-terminale de D1 a été identifiée comme site de liaison avec les érythrocytes infectés (Figure 1) qui chevauche partiellement le site liaison de HRV (Berendt *et al.*, 1992).

1.3 Fonctions physiologiques

La molécule ICAM-1 joue un rôle important dans la médiation des contacts intercellulaires. Cette fonction est importante dans la génération d'une réponse immune mais peut aussi, à travers l'interaction des mêmes ligands être à l'origine de maladies inflammatoires et de certains cancers.

1.3.1 Recrutement des leucocytes

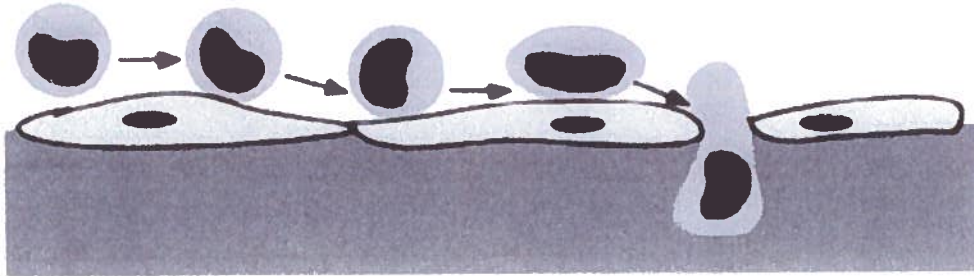
Afin de remplir leur rôle de cellule effectrice dans la réponse immune, les leucocytes doivent pouvoir quitter la circulation sanguine et migrer à travers les tissus de l'organisme. Le recrutement des leucocytes vers l'épithélium endommagé s'effectue en trois étapes et est modulé par plusieurs molécules d'adhésion (Figure 3). La première étape de capture et de roulement a pour but de ralentir les leucocytes le long de l'endothélium vasculaire et leur permettre de capter les signaux émis par les chimiokines. La capture est initialisée par la L-sélectine (CD62L) constitutivement exprimée à la surface des leucocytes (Kadono *et al.*, 2002). Pendant le roulement les interactions rapides d'adhésion et de détachement se font principalement via la liaison des sélectines L, E (CD62E) et P (CD62P). Le ligand de CD62L, GlyCAM, de même que les sélectines E et P sont exprimés sur l'endothélium activé. Ces deux sélectines interagissent avec des protéoglycans, tel que *P-selectin glycoprotein ligand-1* (PSGL) qui est localisé aux microvillus des leucocytes (Moore *et al.*, 1995), tout comme CD62L. Cette localisation favoriserait le contact à la paroi vasculaire (Picker *et al.*, 1991). Bien que cette étape soit majoritairement sous le contrôle des sélectines, un chevauchement avec les interactions intégrines/ICAM-1 a été observé. Des chercheurs ont rapporté une modulation de la vitesse de roulement par LFA-1 et MAC-1 (Dunne *et al.*, 2002). D'autres ont observé chez les souris ICAM-1 déficientes une augmentation significative de la vitesse de roulement des leucocytes durant l'inflammation qui se traduit par une diminution de leur extravasation (Steeber *et al.*, 1998; Steeber *et al.*, 1999)

Ainsi, ces différentes molécules d'adhésion semblent agir de concert dans le but d'optimiser le ralentissement et favoriser la détection de signaux tels les chimiokines (Baggiolini, 1998). Ceci déclenche la seconde étape, l'adhésion ferme des leucocytes par l'activation de LFA-1, en modifiant sa conformation pour celle de haute affinité envers ICAM-1 et ICAM-2 présents sur l'endothélium. L'expression d'ICAM-1 est modulée durant l'inflammation par les cytokines IFN γ et TNF α induites par les leucocytes activés. L'importance de l'interaction ICAM-1/LFA-1 dans l'adhésion ferme des leucocytes a été démontrée de diverses façons, par exemple : ICAM-1

1. Roulement

2. Adhésion

3. Extravasation



Sélectines
GlyCAM
PSGL



β_2 intégrines/ICAM



PECAM-1



Figure 3 : Principales molécules d'adhésion impliquées dans le recrutement des leucocytes

Adapté de Fabbri *et al.*, 1999.

soluble inhibe de l'adhésion au site de lésion d'ischémie-reperfusion chez la souris, par l'injection d'ICAM-1 soluble (Kusterer *et al.*, 1998); le nombre de neutrophiles adhérents augmente proportionnellement à la densité d'ICAM-1 à la surface de cellules (Kadono *et al.*, 2002), ou d'ICAM-1 recombinant immobilisé (Sigal *et al.*, 2000); l'injection d'anticorps anti-ICAM-1 empêche l'accumulation des leucocytes (Chin *et al.*, 1998). Il a aussi été démontré que l'incapacité des neutrophiles CD18 déficients à adhérer à l'endothélium engendre chez l'humain des infections bactériennes récurrentes (Etzioni, 1999). Ces patients atteints du syndrome LAD (*Leucocyte adhesion deficiency*) de type 1, présentent une mutation dans le gène codant la chaîne β_2 et une fonction anormale des intégrines LFA-1, MAC-1 et p150,95 (CD11c/CD18). Comme nous l'avons décrit précédemment LFA-1 et MAC-1 sont des ligands d'ICAM-1. Chez l'humain l'expression de ces deux intégrines est similaire. Toutefois, celle de MAC-1 peut rapidement augmenter par le transport de granules sécrétoires à la surface cellulaire. Les résultats d'expériences sur la contribution de MAC-1 comparativement à LFA-1 dans l'adhésion des leucocytes sont contradictoires. Certains chercheurs ont rapporté une plus grande contribution de LFA-1 en comparant l'adhésion dans des souris LFA-1 déficientes par rapport à des souris MAC-1 déficientes (Ding *et al.*, 1999). D'autres ont observé durant les 30 premières secondes de l'adhésion une contribution égale, puis une plus grande contribution de MAC-1 après 2 minutes (Neelameghal *et al.*, 1998).

La troisième étape, l'extravasation, est la moins bien connue. La participation du *Platelet/Endothelial Cell Adhesion Molecule-1* (PECAM-1; CD31) a été démontrée par des modèles *in vitro* et *in vivo* dans l'extravasation des cellules polymorphonuclées (PMN), des monocytes ainsi que des cellules NK (Muller *et al.*, 1993; Berman et Muller, 1995; Revue dans Muller *et al.*, 1995). L'expression de PECAM-1 est concentrée aux jonctions des cellules endothéliales, tandis que son expression est plus diffuse à travers la surface des plaquettes et de la plupart des leucocytes (Delisser *et al.*, 1994). Lors d'une réaction inflammatoire induite dans la cavité intrapéritonéale, la migration des leucocytes chez les souris déficientes en PECAM-1 par rapport aux souris normales est comparable. Toutefois ces cellules s'accumulent entre les

cellules endothéliales et la membrane basale (Duncan *et al.*, 1999). Ces résultats appuient un rôle de PECAM-1 dans la migration à travers la membrane basale et suggèrent la présence d'un mécanisme de migration transendothéliale indépendant de PECAM-1. L'interaction d'ICAM-1 avec les filaments d'actine cellulaire avait précédemment été observée (Vogetseder et Dierich, 1991) et certaines études suggéraient un rôle d'ICAM-1 dans l'infiltration des leucocytes lors d'inflammation au cerveau (Pryce *et al.*, 1997) et de la rétine (Greenwood, Wang et Calder, 1995). Depuis, diverses études d'engagement «cross-linking» ont été entreprises dans le but d'élucider la cascade de signalisation entrante «outside-in». L'ensemble de ces résultats a révélé que l'agglomération de CD54 à la surface cellulaire induite par l'engagement d'ICAM-1 entraîne la phosphorylation de résidus de tyrosines des protéines *Focal adhesion kinase* (FAK), paxilline et p130^{Cas} associées au cytosquelette et la redistribution des filaments d'actine (Adamson *et al.*, 1999). Le remaniement du cytosquelette est dépendant de la protéine Rho liant la Guanine triphosphate (Adamson *et al.*, 1999; Etienne *et al.*, 1998). L'importance du domaine cytoplasmique d'ICAM-1 a été démontrée dans un modèle *in vitro* de migration de neutrophiles à travers une couche unicellulaire de transfectants stables d'ICAM-1. L'adhésion n'a pas été affectée par la présence ou l'absence du domaine cytoplasmique tandis qu'une diminution significative de leur migration a été observée en absence du domaine cytoplasmique d'ICAM-1 (Sans, Delachanal et Duperray, 2001).

1.3.2 Présentation d'antigène

Théoriquement, l'interaction du TCR avec les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) conjugué au peptide pourrait initier la reconnaissance antigénique. En réalité ceci exigerait une trop grande quantité de complexe CMH-peptide et la reconnaissance serait beaucoup trop lente (Dustin *et al.*, 1996; Wulfing, Sjaastad et Davis, 1998). L'absence de ce signal de costimulation empêche l'expansion clonale des cellules T, ainsi que la production d'IL-2 et induit l'anergie ce qui les rend insensibles à une stimulation subséquente. La présentation d'antigène peut être potentialisée par différentes paires de molécules de

costimulation comme les récepteurs B7.1 et B7.2 exprimés à la surface de CPA qui interagissent avec CD28 et CTLA-4 respectivement (Greenfield, Nguyen et Kuchroo, 1998; Salomon et Bluestone, 2001). Le rôle de ces molécules dans l'activation de cellules T a été démontré (Watts et DeBenedette, 1999). Cependant, les souris transgéniques produisant des molécules CTLA4 bloquant B7, de même que les souris CD28 déficientes, peuvent monter une réponse immune. Ces souris peuvent générer l'expansion clonale de cellules T (Zimmermann *et al.*, 1997) et rejeter des allogreffes (Kawai *et al.*, 1996). Ces résultats appuient l'implication d'autres molécules, dont ICAM-1 (Figure 4). Depuis longtemps, il a été démontré que l'interaction LFA-1/ICAM-1 diminue la concentration d'antigène requise à la stimulation et une signalisation soutenue par le TCR (Dustin et Springer, 1989; Stewart et Hogg, 1996; van Kooyk et Figdor, 1997). Le processus est médié par l'association de la molécule à LFA-1 (Martz, 1987) afin de surmonter les forces de répulsion du glycocalyx (Cyster, Shotton et Williams, 1991) et permettre l'association du TCR au complexe CMH-peptide à une distance de 15nm (Garboczi *et al.*, 1996; Garcia *et al.*, 1996). La sensibilité du TCR à une faible quantité de CMH-peptide à la surface de CPA (Peterson *et al.*, 1999) en coordination avec les molécules d'adhésion, engendre la formation d'une synapse immunologique (Figure 5). L'engagement de ces molécules induit le remaniement du cytosquelette des CPA et des cellules T, et la ségrégation des molécules LFA-1/ICAM-1 vers l'extérieur de la synapse tandis que les complexes CMH-peptides en association avec le TCR migrent vers le centre de la synapse. Cette conformation finale nécessaire à l'activation des cellules T est stable plusieurs heures (Grakoui *et al.*, 1999; Iezzi *et al.*, 1999; Monks *et al.*, 1998). L'inhibition de l'interaction LFA-1/ICAM-1 (ou CD80/CD28) modifie la morphologie de la synapse et réduit l'aire de surface de même que la densité des complexes formés (Wetzell, McKeithan et Parker, 2002) et est associée à une diminution significative de la stimulation des cellules T. Bien que l'organisation géométrique des molécules en synapse immunologique semble bénéfique à l'amplification du stimulus, il n'est pas clair si elle est absolument nécessaire étant donné qu'il est possible à ICAM-1 de costimuler l'activation de cellules T CD8⁺ sans formation de synapse (Goldstein *et al.*, 2000). Toutefois les auteurs n'ont pas comparé avec la vitesse ou le degré de

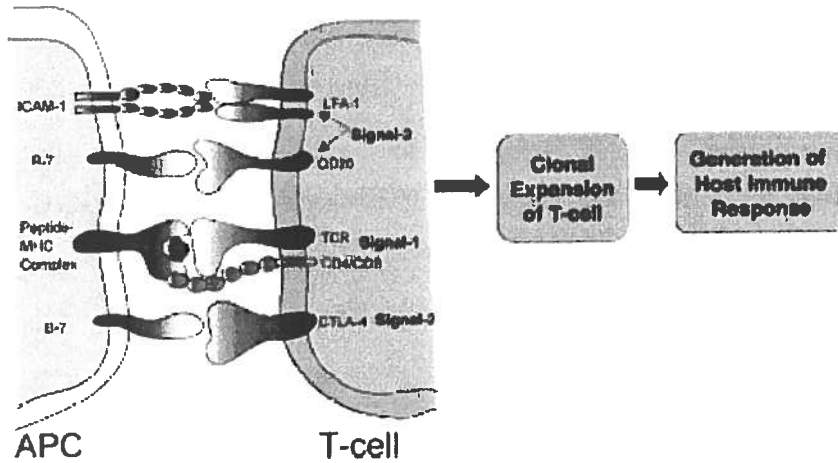


Figure 4 : Représentation schématique de la présentation d'antigène

Tiré de Anderson et Siahaan, 2003.

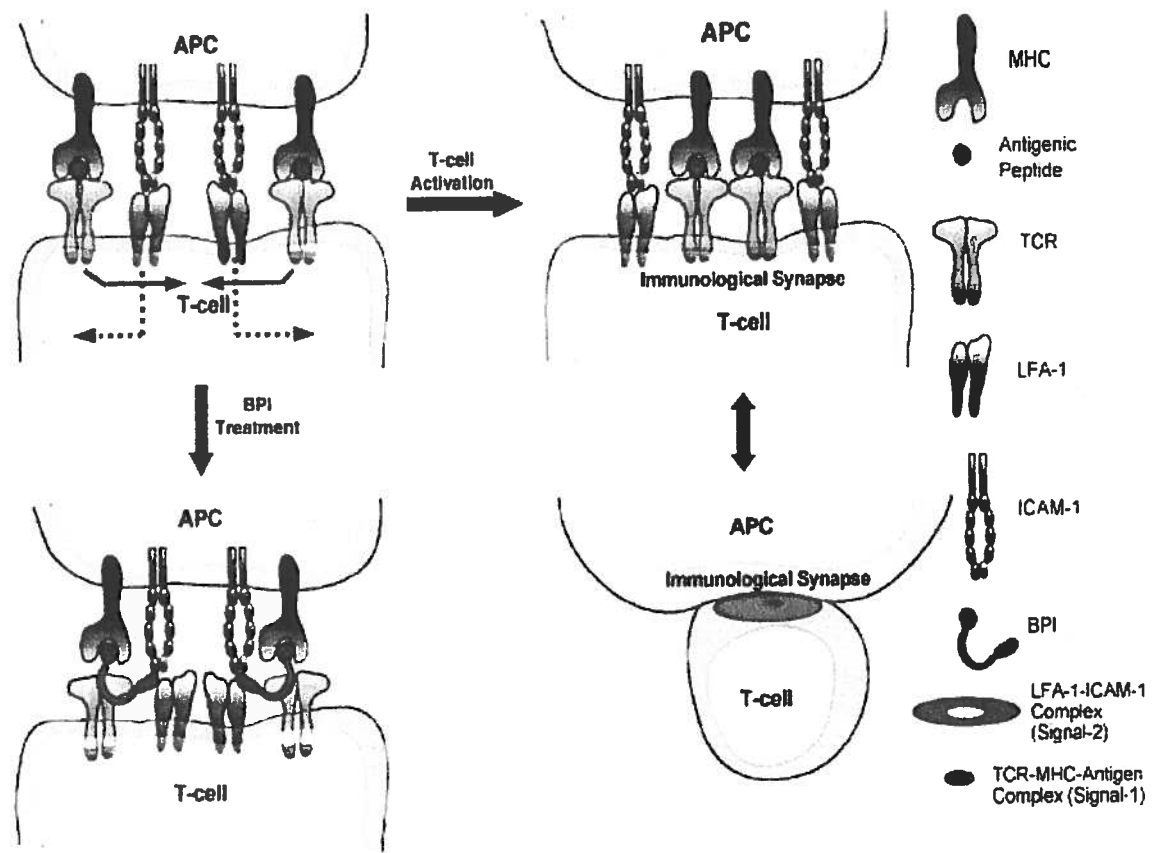


Figure 5 : Représentation de la formation d'une synapse Immunologique

Tiré de Anderson et Siahaan 2003

stimulation atteint s'il y avait eu une synapse.

1.3.3 Inflammation

La réaction inflammatoire a pour but d'isoler la région atteinte par un traumatisme ou une stimulation immunitaire et d'empêcher la dissémination de toxines ou d'agents antigéniques. Dans le contexte d'une réponse immune normale, l'inflammation a été mise au point par l'organisme afin de recruter les cellules effectrices de façon efficace pour se défendre. Elle est caractérisée par le recrutement des leucocytes décrit précédemment. Il arrive toutefois que cette réponse soit exacerbée au point de devenir néfaste.

L'interaction LFA-1/ICAM-1 facilite l'infiltration excessive des lymphocytes T occasionnant le psoriasis. Le test de *mixed epidermal cell-T lymphocyte reaction* (MECLR) autologue chez les patients atteints de psoriasis montre une forte stimulation autologue par les CPA malgré l'absence d'antigène exogène (Prezzi *et al.*, 1996; Schopf *et al.*, 1986). Le nombre de cellules épidermiques exprimant ICAM-1 issues de ces lésions est plus élevé comparativement aux cellules issues de tissus sains (Prens *et al.*, 1996). Des tests d'inhibition de MECLR autologue ont démontré l'implication d'ICAM-1 exprimé par les APC dans l'activation des cellules T.

ICAM-1 est aussi associé à plusieurs maladies respiratoires des voies supérieures (e.g. les rhinites) et inférieures (e.g. l'asthme). En comparant l'expression d'ICAM-1 dans les muqueuses des voies respiratoires supérieures il a été observé que la migration des leucocytes variait selon le type de rhinite diagnostiqué. Chez les rhinites non-allergiques, une augmentation des neutrophiles a été associée à une augmentation d'ICAM-1 au niveau de la sous-muqueuse, tandis qu'une augmentation de l'infiltration d'éosinophiles a été corrélée avec une surexpression épithéliale d'ICAM-1. Sa surexpression a été observée au niveau des cellules épithéliales et endothéliales et dans la majorité des biopsies bronchiques de patients asthmatiques (Bentley *et al.*, 1993; Manolitsas *et al.*, 1994; Montefort *et al.*, 1992). ICAM-1 soluble serait considéré comme un marqueur d'activation de l'endothélium puisque des niveaux plus élevés ont été rapportés dans des cas d'asthme stable (Riise *et al.*, 1995) et d'asthme exacerbé juvénile et chez l'adulte

(El-Sawy *et al.*, 1999; Montefort *et al.*, 1994). Suite à des résultats immunohistologiques, ICAM-1 membranaire a été proposé comme marqueur dans la détermination post-mortem du choc septique. ICAM-1 est fortement exprimé à travers l'endothélium microvasculaire des poumons et sur les macrophages et lymphocytes pulmonaires (Tsokos et Fehlauer, 2001).

L'arthrite rhumatoïde chronique (ARC) est caractérisée par une synovite chronique qui résulte en la destruction de l'articulation. Les médiateurs proinflammatoires augmentent l'expression d'ICAM-1 de façon transitoire. Toutefois, lors d'inflammation chronique comme pour l'ARC, son expression est prolongée (Koch *et al.*, 1991; Youssef *et al.*, 1996). La comparaison de traitements anti-inflammatoires a démontré une corrélation entre l'amélioration de l'état clinique et une diminution de l'expression d'ICAM-1 au niveau de la membrane et de la sous-membrane synoviale (Smith *et al.*, 2001).

Des expériences menées avec des souris déficientes en ICAM-1 ont aussi démontré son implication dans le processus inflammatoire. Dans le modèle expérimental de colite chronique induite par le dextran sulfate de sodium, une diminution significative de l'inflammation a été observée chez ces souris (Bendjelloul *et al.*, 2000). On retrouve chez les souris ICAM-1 déficientes une résistance au choc septique (Xu *et al.*, 1994), de même qu'une baisse de la réponse à l'hypersensibilité de contact et au test de réaction lymphocytaire mixte (Sligh *et al.*, 1993).

1.3.4 Rejet de greffe

La première transplantation d'organe allogénique chez l'humain a eu lieu le 15 avril 1963 chez un homme de race blanche, âgé de 58 ans, receveur d'un poumon (Hardy, 1999). Le rejet de greffe suite à ces interventions chirurgicales est le résultat d'une réponse immune dirigée contre les allogènes exprimés chez le donneur qui sont absents chez le receveur. L'histocompatibilité parfaite entre deux individus est en pratique impossible, cependant l'appariement des antigènes majeurs diminue la réponse immunologique et par conséquent le nombre de médicaments immunosuppresseurs à administrer au patient.

Le rejet est initié par les dommages issus de l'excision de l'organe à être transplanté qui induit une forte inflammation. Deux conséquences majeures sont directement liées à l'inflammation du greffon : 1) La migration de cellules dendritiques de l'organe transplanté aux tissus lymphoïdes environnant du receveur, où elles présentent à leur surface des alloantigènes du donneur et conditionnent les cellules T suivi de leur activation dans le greffon; et 2) l'induction de molécules d'adhésion sur l'endothélium vasculaire de l'organe, qui favorise l'infiltration de cellules effectrices circulantes dans le greffon, y compris les cellules T conditionnées (Figure. 6). Comme nous l'avons décrit précédemment dans les sections 1.3.2 et 1.3.1, ICAM-1 joue un rôle prépondérant dans ces deux paramètres de présentation d'antigène et de recrutement de cellules effectrices. Différentes études avec des anticorps monoclonaux et des oligonucléotides antisens ont confirmé l'importance d'ICAM-1 dans le rejet de greffe. L'administration combinée d'Ac anti-ICAM-1 et anti-LFA-1 améliore la survie à long terme d'allogreffe cardiaque et l'induction de tolérance spécifique (Isobe *et al.*, 1992). Récemment il a été observé que l'absence d'ICAM-1 dans l'allogreffe diminue le conditionnement de cellules T allogène-spécifiques sans affecter l'extravasation de cellules T conditionnées dans l'organe transplanté (Zhang, Kish et Fairchild, 2003).

1.3.5 Cancer

La perturbation des interactions normales cellules-cellules et le développement de nouvelles interactions intercellulaires sont des facteurs importants dans la formation de métastases

Une des premières molécules associées à la progression du mélanome fut caractérisée par un anticorps anti-ICAM-1 (Holzmann *et al.*, 1985; Johnson *et al.*, 1989). L'expression d'ICAM-1 est plus élevée dans les lésions malignes que bénignes de mélanomes et est aussi plus élevée dans les tumeurs à croissance verticale, ce dernier paramètre étant fortement associé au potentiel métastatique de la lésion et par conséquent avec le pronostic de la tumeur de stade 1 (Johnson *et al.*, 1989; Natali *et al.*, 1990; Natali *et al.*, 1997).

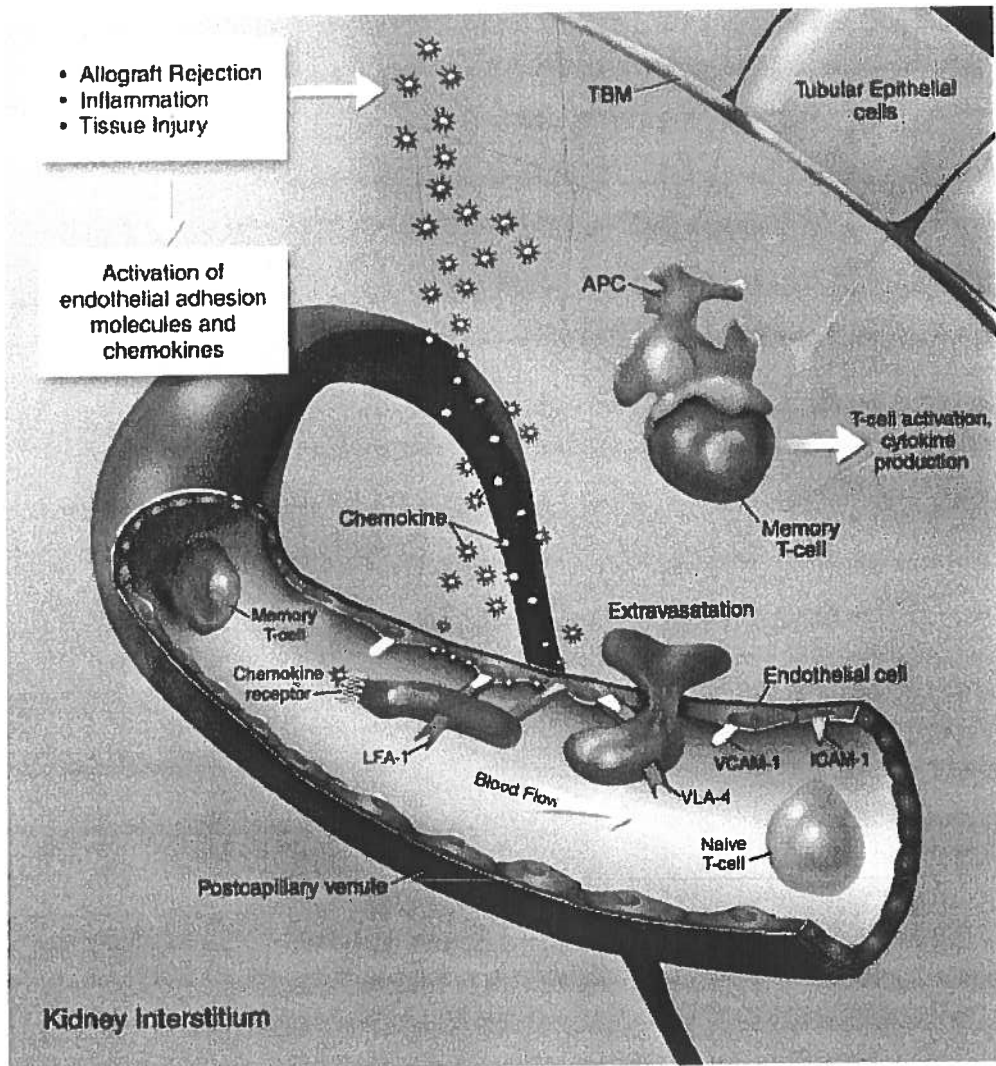


Figure 6 : Mécanisme du rejet de greffe

Tiré de Kamoun, 2001.

Le rôle d'ICAM-1 dans l'évolution de cancers demeure toutefois inconnu. Une augmentation d'ICAM-1 a été observée dans une variété de cancers dont celui du pancréas (Tempia-Caliera *et al.*, 2002), de la vessie (Campbell *et al.*, 1994), gastrique et du foie (Gulubova, 2002; Sun *et al.*, 1999). De plus ICAM-1 a été détecté par immunohistochimie non seulement à la surface de cellules tumorales mais aussi sur les cellules stromales, en particulier des fibroblastes à proximité de la tumeur (Tsujisaki *et al.*, 1991). En se basant sur le rôle d'ICAM-1 dans la physiologie normale, différentes études ont démontré son implication selon sa localisation. Sa présence sur l'endothélium vasculaire induite par des cytokines proinflammatoires peut favoriser l'attachement de cellules tumorales (Gangopadhyay, Lazure et Thomas, 1998; Lossinsky *et al.*, 1999). Son expression à la surface des cellules cancéreuses peut faciliter leur nidification par son interaction avec ses ligands présents dans la matrice extracellulaire (Duperray *et al.*, 1997). Ces mécanismes peuvent favoriser le potentiel métastatique de la tumeur (Gangopadhyay, Lazure et Thomas, 1998). Le relargage d'ICAM-1 membranaire le transformant en ICAM-1 soluble peut aussi contribuer au maintien de la tumeur en déjouant le système d'immunosurveillance de l'hôte. Cette hypothèse est appuyée par l'observation d'une infiltration de lymphocytes T moins importante dans les tumeurs exprimant faiblement ICAM-1 comparativement aux tumeurs ayant une forte expression d'ICAM-1 (Regidor *et al.*, 1998).

2. Thérapies Anti-ICAM-1

L'implication d'ICAM-1 dans une multitude de pathologies a suscité la recherche de stratégies thérapeutiques ciblant ICAM-1 particulièrement dans le domaine des maladies inflammatoires et de rejet de greffes (Dedrick, Bodary et Garovoy, 2003; Yusuf-Makagiansar *et al.*, 2002). Nous décrivons dans la seconde section de cette revue de littérature les principales catégories de molécules thérapeutiques développées.

2.1 Les oligonucléotides

Les oligonucléotides agissent en modulant l'expression d'ICAM-1. Cette modulation est le plus souvent post-transcriptionnelle avec l'usage d'oligonucléotides antisens liant une région spécifique de l'ARN-messager. De telles séquences inhibent l'induction d'ICAM-1 par le TNF α chez les cellules HUVEC et les cellules épithéliales du poumon (Bennett *et al.*, 1994; Chiang *et al.*, 1991). *In vivo*, l'antisens ISIS 3082 a empêché le rejet d'une allogreffe cardiaque chez la souris (Stepkowski *et al.*, 1994). Cette même séquence s'est montrée aussi efficace que l'anticorps anti-ICAM-1 murin, YN1, dans l'inhibition de l'infiltration de neutrophiles médiée par l'endotoxine d'*E. coli* dans un modèle de pneumonie. Cet anticorps inhibe l'interaction ICAM-1/LFA-1. D'autres séquences oligonucléotidiques agissent à un stade plus précoce. Il est aussi possible d'empêcher la transcription d'ICAM-1 par l'hybridation d'une séquence liant l'ADN pour former un triplex qui bloque la polymérisation de l'ARN-messager (Besch *et al.*, 2002). Dernièrement l'induction d'ICAM-1 par le TNF α dans des cellules sinusoïdales du foie a été inhibée par l'usage d'un appât pour NF-KB, une séquence double brin codant le site de liaison de NF- κ B (Shibuya *et al.*, 2002).

Malgré le potentiel thérapeutique de ces approches démontré au stade pré-clinique, les études cliniques rapportent des résultats uniquement pour l'antisens 2302 (alicaforsen). Aucune de ces études n'a démontré d'efficacité clinique de l'alicaforsen dans le traitement de la maladie de Crohn (Schreiber *et al.*, 2001; Yacyshyn *et al.*, 2002) ou de l'arthrite rhumatoïde (Maksymowych *et al.*, 2002) aux doses et durant l'intervalle de temps étudiés. Cependant dans chacune de ces études les résultats d'innocuité démontrent une bonne tolérance à l'administration intraveineuse répétée. Cette tolérance et le manque de données à des doses supérieures justifient selon les auteurs d'autres études avec cet antisens.

2.2 Les anticorps

L'immunothérapie anti-ICAM-1 vise à bloquer les effets induits par l'interaction d'ICAM-1 et ses ligands décrits dans les sections précédentes. Enlimolab est un des anticorps les plus

étudiés. Les résultats d'efficacité varient selon la maladie étudiée. Une étude a démontré une amélioration chez des patients souffrant d'arthrite rhumatoïde en phase précoce (Kavanaugh *et al.*, 1996). Toutefois, aucune efficacité par ce traitement n'a été rapportée suite à une transplantation rénale (Salmela *et al.*, 1999) ou pour le traitement d'ischémie suite à un infarctus (Investigators, 2001). D'ailleurs une détérioration de l'état clinique a été observée chez ces patients ischémiques. Cette détérioration est probablement due à la formation de complexes immuns, une lymphocytose ou l'activation incontrôlée des neutrophiles rapportées chez certains patients dans une étude précédente (Vuorte *et al.*, 1999).

3. Ciblage Thérapeutique

Nous avons décrit le rôle d'ICAM-1 dans diverses pathologies de même que différentes approches thérapeutiques développées pour inhiber ses effets. Dans le cadre de ce projet nous avons choisi d'utiliser ICAM-1 comme adresse moléculaire ou adressine dans le but d'augmenter l'efficacité d'un agent thérapeutique en favorisant son accumulation à proximité de la lésion à traiter.

3.1 Caractéristique d'une adressine

Pour être considérée comme une cible thérapeutique, la variation de l'expression d'une adressine doit être associée à une pathologie. Cette variation peut se manifester de différentes façons. Celle-ci peut être une expression aberrante spécifique, c'est le cas par exemple de l'antigène carcinoembryonnaire (Minami, Furui et Kanematsu, 2001), de VEGF (Takahashi *et al.*, 1995) et du récepteur CD20 exprimé à la surface de cellules B cancéreuses (Davis, Czerwinski et Levy, 1999; Hamilton *et al.*, 1991). Il peut aussi s'agir d'une expression modifiée d'antigène telle une mutation (Garcia de Palazzo, *et al.* 1993) ou d'une modification du patron de glycosylation (Hakomori, 1996).

3.2 Ciblage vasculaire

Étant donné la dépendance de la croissance et de la survie des tumeurs sur leur capacité à maintenir un réseau vasculaire adjacent (Folkman, 1995; Folkman et Shing, 1992), le ciblage vasculaire fut initialement proposé au début des années 1980 (Denekamp, 1982) comme moyen d'améliorer l'efficacité de traitements anti-tumoraux. Les ligands utilisés dans cette stratégie ciblent des molécules exprimées par des cellules endothéliales qui sont absentes sur un endothélium normal. L'avantage principal du ciblage vasculaire est la stabilité de ces cellules, non susceptibles aux mutations et, par conséquent, à la résistance habituellement observée lors de traitements ciblant les cellules tumorales.

Contrairement à l'approche anti-angiogénique qui vise à inhiber la formation de nouveaux vaisseaux, utilisé comme traitement anticancéreux, le ciblage vasculaire a pour but d'endommager les vaisseaux sanguins fournissant les éléments nutritifs à la tumeur. Ce blocage empêche sa croissance et entraîne la formation de nécrose. Les agents anti-vasculaires phosphate de combrestatine A4 disodique (CA4DP) et le N-acétyl-colchicol (ZD6126) agissent spécifiquement sur les vaisseaux nouvellement formés (Dark *et al.*, 1997; Davis *et al.*, 2002; Tozer *et al.*, 1999). L'administration *in vivo* de ces deux agents diminue de façon substantielle l'apport sanguin nécessaire à la survie de la tumeur, entraînant rapidement la nécrose en son centre, mais le maintien d'une capsule de cellules cancéreuses viables en sa périphérie (Chaplin, Pettit et Hill, 1999; Siemann et Rojiani, 2002). La localisation de ces cellules suggère qu'elles sont approvisionnées par l'endothélium normal demeuré intact (Siemann, Warrington et Horsman, 2000). Afin d'éliminer ces cellules qui peuvent faire progresser la maladie, le CA4DP et le ZD6126 ont été utilisés en combinaison avec la radiothérapie ou la chimiothérapie, notamment avec le cisplatine (Horsman et Murata, 2002; Siemann et Rojiani, 2002; Siemann, Warrington et Horsman, 2000), démontrant un taux de survie cellulaire fortement diminué et un meilleur contrôle de la maladie. Une alternative à cette combinaison thérapeutique pourrait comprendre le ciblage vers une molécule surexprimée sur l'endothélium central et/ou périphérique de la tumeur.

Le ligand d'intérêt pourrait être utilisé comme « radar » d'un agent thérapeutique (enzyme, cytokine, polymère...) ou posséder une activité biologique.

Dans le cadre de ce projet de doctorat, nous avons identifié un ligand ciblant ICAM-1. La hausse d'expression d'ICAM-1 associée d'une part à la progression de certains cancers et d'autre part au développement de maladies inflammatoires, ainsi que son rôle dans le rejet de greffe confèrent à cette glycoprotéine les caractéristiques d'une adressine.

4. Banques de Peptides

Jusqu'au milieu des années 80, l'identification des sites de liaison d'anticorps à une protéine était réalisée selon diverses stratégies: 1) la fragmentation de la protéine à l'aide de protéases, suivi de l'identification et du séquençage des fragments s'y liant; 2) la modification chimique de la protéine où le site liant l'Ac est protégé de la modification; 3) la synthèse de plusieurs courtes séquences peptidiques retrouvées dans la protéine complète afin de les tester individuellement; 4) le clonage des fragments de gène dans un vecteur d'expression tel λ gt11 pour tester la liaison d'anticorps polyclonaux ou monoclonaux aux protéines de fusion engendrées; 5) la caractérisation par résonance magnétique nucléaire ou cristallographie aux rayons X. Ces approches très laborieuses et limitées par le nombre de peptides ou de protéines de fusion pouvant être analysés ont suscité le développement de méthodes alternatives.

Les banques de peptides combinatoires synthétiques sont synthétisées chimiquement. Après une description de ce type de banque, nous verrons avec plus de détails les caractéristiques des banques de peptides phagiques «*peptide phage display*», telles que celle utilisée pour identifier les peptides spécifiques à ICAM-1 murin et humain dans ce projet de doctorat. Ce type de banque, dite biologique, est produite par l'insertion de séquences aléatoires dans l'ADN viral de phages filamenteux et synthétisée grâce à une souche bactérienne.

4.1 Banques combinatoires synthétiques

En modifiant la technique de synthèse de Merrifield (Merrifield et Stewart, 1965), Mario Geysen développa une méthode avec laquelle il est possible de synthétiser une centaine de variations d'un peptide sur des aiguilles de plastique plongées dans différents plateaux de 96 puits où s'effectuent la synthèse et l'analyse par ELISA (Geysen, Meloen et Barteling, 1984). Dans ces travaux, la modification d'un fragment peptidique issu d'une protéine connue fut utilisée pour déterminer la contribution de chaque acide aminé de la région protéique étudiée. À l'origine cette méthode ne visait que la caractérisation de sites de liaison d'anticorps. Toutefois cette approche démontra le potentiel de la synthèse simultanée de multiples peptides dans l'étude de composés chimiques et amena à l'avant-plan le domaine de la chimie combinatoire. Cette découverte fut déterminante au développement d'outils d'identification de nouvelles molécules chimiques. Depuis, plusieurs techniques de synthèse ont été développées et peuvent être regroupées selon deux approches principales.

La première approche est basée sur une plate-forme de séquences prédéterminées, et a été initiée par les travaux de Geysen. Les séquences synthétisées sont connues avant leur analyse. En substituant le support d'aiguille de plastique par d'autres média tels des sachets de polypropylène (Houghten, 1985) ou sur puces de verre (Fodor *et al.*, 1991), le nombre de synthèses simultanées est passé de 100 à 1000 peptides en une journée.

La seconde approche produit des banques de peptides aléatoires. Ceci permet la production d'un nombre beaucoup plus élevé de peptides ($2-3 \times 10^6$) (Houghten *et al.*, 1991; Lam *et al.*, 1991). La séquence de chacun de ces peptides et leur localisation sur le support ne sont pas connues *a priori* contrairement à l'approche précédente. Chaque site contient tout de même une séquence unique.

4.2 «Phage display»

Développée au milieu des années 80 par Georges P. Smith (1985), ce type de banque exploite la flexibilité de la capsid des phages filamenteux M13, fd ou f1, particulièrement la

protéine mineure de la capsid virale pIII. Son avantage le plus important est le lien physique entre le peptide exprimé à la surface du phage et sa séquence oligonucléotidique contenue à l'intérieur de la particule. Cette caractéristique permet son identification rapide par séquençage de la séquence oligonucléotidique. Les bactériophages M13, fd et f1 ont 98% d'homologie (Beck et Zink, 1981; Hill et Petersen, 1982; van Wezenbeek, Hulsebos et Schoenmakers, 1980). Ceux-ci ont une forme cylindrique, mesurent de 200-900nm de longueur avec un diamètre inférieur à 10nm et contiennent un génome d'ADN simple-brin (positif). À cause de leur grande similarité et de leur infection dépendante du plasmide F, ils sont communément appelés phages Ff. La description ci-dessous peut s'appliquer aux 3 types de phages. Toutefois nous mettrons l'emphase sur le phage M13 puisque nous avons utilisé ce type de banque dans notre projet.

4.2.1 Structure d'un phage et cycle viral du phage M13

Le bactériophage M13 est un virus spécifique à *Escherichia coli* (*E. coli*). Sa capsid est constituée d'une protéine majeure pVIII présente en milliers de copies formant le corps cylindrique et de 4 protéines mineures présentes en un nombre beaucoup plus restreint (Tableau 2). Les protéines mineures pIII et pVI sont situées à une extrémité, tandis que pVII et pIX sont localisées à l'autre extrémité de la protéine virale (Fig. 7). Même si des librairies ont été construites par la fusion d'insert à chacune des différentes protéines de la capsid virale, les protéines pIII et pVIII sont les mieux caractérisées, la structure des trois autres protéines mineures n'ayant pas été déterminée. Les cinq protéines de la capsid sont nécessaires à la stabilité de la particule virale. La protéine pIII est responsable de la reconnaissance de la cellule bactérienne et de l'infectiosité du virus. Elle contient trois domaines. Le domaine N-terminal initie la translocalisation de l'ADN à la bactérie tandis que le second domaine établit la reconnaissance par sa liaison au pilus F (Jakes *et al.*, 1988). Le domaine C-terminal interagit avec les protéines pVI et pVIII et est nécessaire à l'attachement de pIII à la capsid.

Suite au contact du second domaine de la protéine mineure pIII, le pilus F présent à la surface d'*E. coli* se dépolymérise entraînant son retrait et par conséquent, le rapprochement du

Tableau 2 : Protéines structurales du phage M13

| Protéine | Nombre d'acides aminés | Masse moléculaire | Copies par phage | Type de présentation |
|----------|------------------------|-------------------|------------------|----------------------|
| pIII | 406 | 42 500 | ~5 | N ou C |
| pVI | 112 | 12 300 | ~5 | C |
| pVII | 33 | 3 600 | ~5 | N |
| pVIII | 50 | 5 200 | ~2 700 | N ou C |
| pIX | 32 | 3 600 | ~5 | N |

Adapté de Sidhu, 2001.

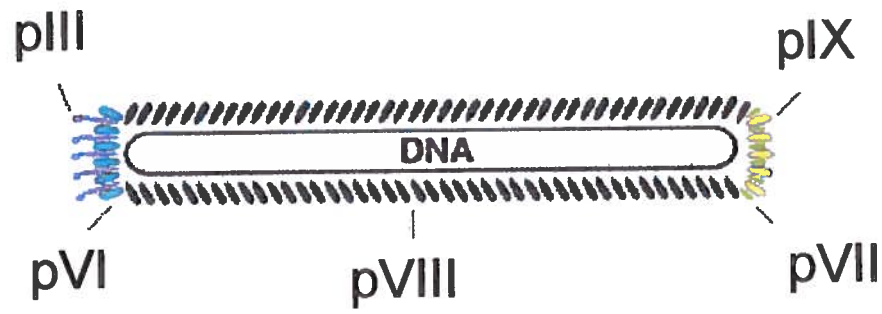


Figure 7 : Structure du phage filamenteux M13

Adapté de Sidhu, 2001

virus à son hôte et la pénétration du virus via la protéine pIII dans la bactérie (Ippen-Ihler, 1991). Lors de l'entrée du virus, la capsid se dissout dans l'enveloppe d'*E. coli* et l'ADN simple-brin se retrouve dans le cytoplasme. Le brin complémentaire est synthétisé par *E. coli* produisant la forme répliquative (FR) qui produit d'autres FR d'ADN en plus de servir d'amorce à la polymérisation d'ADN génomique simple-brin pour la progéniture virale par le mécanisme du cercle roulant. La transcription des protéines virales s'effectue aussi à partir de la forme de répliquative. Les protéines de la capsid décrites ci-haut et les protéines impliquées dans l'assemblage viral s'intègrent à la membrane cytoplasmique, leur extrémité N-terminale se retrouve dans le périplasme alors que l'extrémité C-terminale est dans le cytoplasme. Lorsque la protéine de liaison d'ADN, pV, atteint une concentration critique, elle forme des complexes pV-ADN qui séquestrent l'ADN simple-brin pour fins d'assemblage et inhibe la production de la forme de répliquative (Bauer et Smith, 1988). La formation de virus a lieu au niveau de l'enveloppe bactérienne dans les régions où la membrane cytoplasmique et la paroi sont en contact. En ces endroits sont regroupées les protéines d'assemblage qui se positionnent en pores membranaires et permettent simultanément l'assemblage et la sortie de M13 (Fig. 8). Les protéines pI et pXI forment quant à elles un pore en s'intégrant à la membrane cytoplasmique tandis que la protéine pIV est sécrétée à travers celle-ci pour s'imbriquer à la paroi bactérienne (Fig. 8). Lors de l'assemblage, les protéines structurales se retrouvent à proximité des pores. Le phage bourgeonne de la bactérie par l'extrémité exprimant les protéines pVII et pIX (Rapoza et Webster, 1995). Au fur et à mesure que l'ADN génomique s'engage à travers la machinerie d'assemblage, la protéine pV se sépare de l'ADN et est remplacée par les milliers de protéines pVIII durant l'élongation du phage vers l'extérieur. Cette étape, probablement catalysée par la région cytoplasmique de pI, est dépendante d'ATP (Russel, 1991).

Quand l'ADN est complètement acheminé à travers le pore membranaire, l'assemblage est terminé par l'ajout de pIII et pVI. Une seconde molécule d'ADN peut être encapsidée en l'absence de l'une ou l'autre de ces protéines créant un polyphage. La production de polyphages

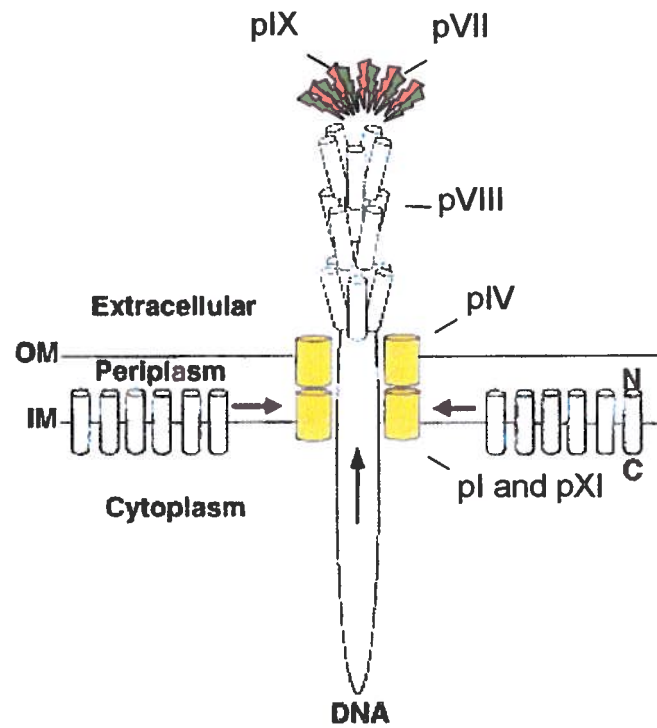


Figure 8 : Schéma simplifié de l'assemblage du phage M13

Adapté de Sidhu, 2001

instables lorsque la protéine pVI est absente suggère un rôle important de cette protéine dans le maintien de la structure du phage et dans la liaison de pIII à la particule virale. Comme tous les phages filamenteux, la production virale n'est pas lytique et plusieurs centaines de particules peuvent être sécrétées durant le cycle bactérien qui en est ralenti.

4.2.2 Types de banques peptidiques

La classification des banques peptidiques est déterminée selon le gène où est cloné l'insert (Revue par (Smith et Petrenko, 1997). Par exemple dans le cadre de ce projet, l'identification d'un peptide spécifique à ICAM-1 a été effectuée avec l'usage d'une banque de type 3. Par conséquent, chaque phage contient une copie du gène III dans lequel a été cloné un insert à séquence aléatoire (Fig. 9). Cette nomenclature s'applique aussi aux autres banques comme celle de type 6 ou 8. En théorie, le peptide correspondant sera exprimé sur chaque molécule pIII du virion. En réalité, l'activité protéolytique des enzymes bactériennes clive certaines des protéines de fusion faisant varier le nombre de copies de peptides exposés sur la capsid. D'autre part, le peptide sera présent uniquement si la protéine de fusion engendrée peut passer à travers le pore de l'appareil d'assemblage viral et si l'intégration à la capsid n'affecte pas la viabilité de la particule virale. La taille du peptide exprimé dans ce type de banque est restreint, particulièrement lorsque l'insert se situe au gène VIII (Kishchenko, Batliwala et Makowski, 1994). Étant donné le nombre de copies présent, ses propriétés physiques et biologiques risquent d'être grandement altérées. Afin de palier à ces contraintes, des banques hybrides ont été développées. Dans ces types de banques, la protéine de fusion est coexprimée avec toutes les protéines sauvages de la capsid (Fig. 9). Dans le cas d'une banque de type 88, chaque phage contient 2 gènes VIII codant pour 2 protéines différentes. L'une est la protéine sauvage, l'autre est la protéine fusionnée au peptide (Sligh *et al.*, 1993). Il en résulte une capsid «mosaïque» où la forme prédominante est la protéine sauvage. Une autre banque hybride est le type 8+8. Tout comme le type 88, deux gènes VIII différents (sauvage et protéine de fusion) sont présents. Cependant chacun est codé par des génomes différents. Le gène sans insert se

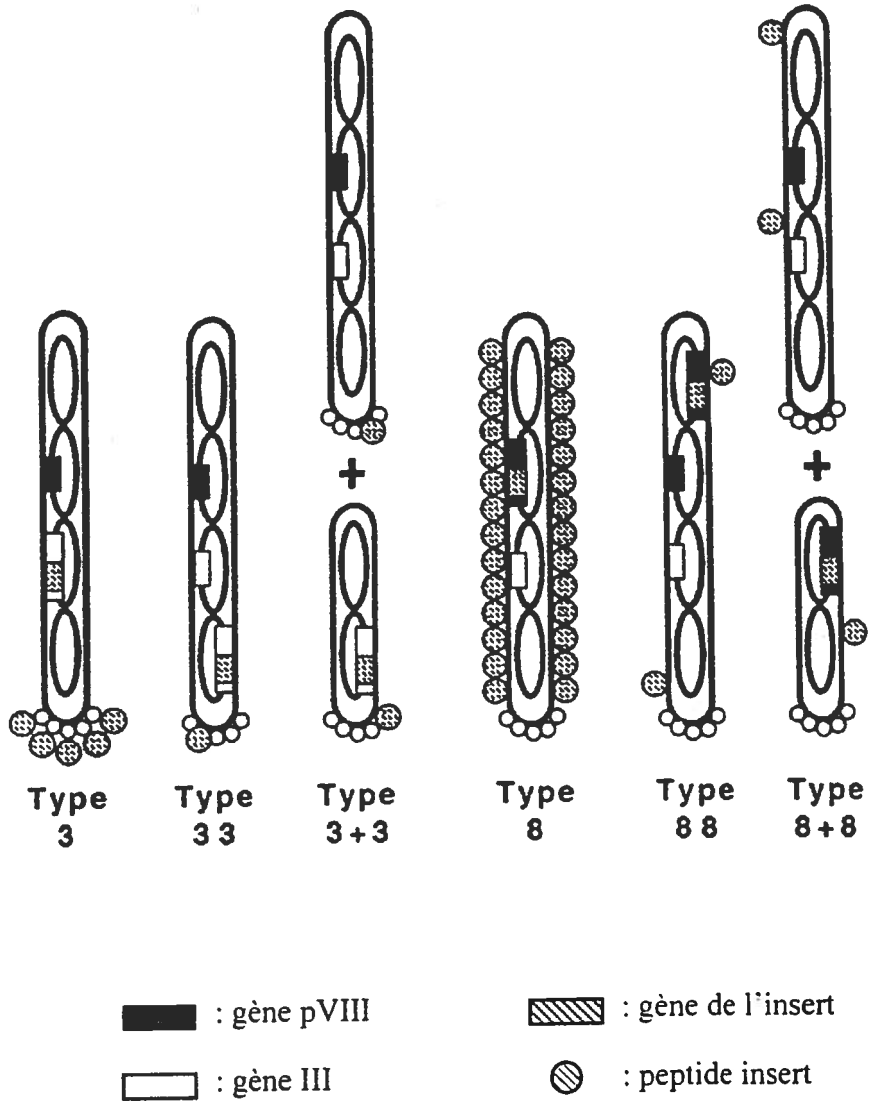


Figure 9 : Banques de phages peptidiques

Adapté de Smith et Petrenko, 1997

retrouve dans le phage dit auxiliaire, tandis que le gène de la protéine de fusion est cloné dans un vecteur particulier appelé phagemide. Tel un plasmide habituel, le phagemide contient le site d'origine de réplication, un gène de résistance et de clonage multiple. Il contient aussi l'origine de réplication du bactériophage. Toutes les fonctions de réplication et d'encapsidation sont fournies par le phage auxiliaire dont la réplication et l'encapsidation sont restreintes (Bass, Greene et Wells, 1990).

4.2.3 Applications

4.2.3.1 Caractérisation d'épitopes et mimotopes

L'utilisation de banques de peptides à la surface de phages n'est pas limitée à la découverte de nouvelles molécules ayant un potentiel thérapeutique. Cet outil peut, par exemple, être utilisé dans la caractérisation d'un site de liaison (Chen *et al.*, 1996; Grihalde *et al.*, 1995). La séquence des peptides sélectionnés pourra alors être comparée au ligand naturel. Lors de l'utilisation d'une banque phagique dont les peptides sont dérivés du ligand naturel, cette comparaison sera utile à déterminer les acides aminés nécessaires à la liaison de la cible. Si une banque phagique de peptides aléatoires est employée par exemple, il est possible que la séquence obtenue soit inattendue. Ceci peut aussi se produire lorsque le site de liaison du ligand naturel est discontinu. Geysen et collaborateur ont qualifié de mimotopes ces courtes séquences peptidiques qui se lient spécifiquement à un récepteur sans avoir d'identité de séquence en acides aminés avec l'épitope naturel (Geysen, Rodda et Mason, 1986a; Geysen, Rodda et Mason, 1986b). L'identification de mimotopes s'avère d'un grand intérêt dans un contexte pharmaceutique comme nous en discuterons un peu plus loin.

4.2.3.2 Identification de nouveaux ligands

La banque de peptides peut permettre d'identifier des molécules se liant à un récepteur dont le ligand naturel est inconnu. Des peptides spécifiques à la protéine S-100b (Ivanenko *et al.*, 1995) ont ainsi été identifiés. L'analyse du motif de 8 acides aminés a confirmé son homologie

avec la sous unité α d'*actin capping proteins* et a permis de démontrer l'interaction entre ces deux protéines. Ce genre d'application est rarement utilisé.

Dans la recherche de ligands d'ADN, aucune règle rationnelle similaire à l'appariement des acides aminés n'est applicable dans la recherche de protéine liant l'ADN. Des banques de séquences apparentées à un domaine de liaison d'ADN (e.g. doigt de zinc) d'une protéine connue est une approche plus prometteuse. Cette méthode a permis la liaison à de nouvelles séquences d'ADN (Alam, Maeda et Sasaki, 2000; Ivanenko *et al.*, 1995; Rebar, Greisman et Pabo, 1996; Wolfe, Ramm et Pabo, 2000).

4.2.3.3 Découverte d'épitopes et de molécules thérapeutiques

Les peptides isolés par criblage sur un anticorps d'une banque peptidique aléatoire, qui n'ont pas une séquence comparable au ligand de cet anticorps, sont des mimotopes antigéniques de l'épitope naturel de cet anticorps. Lorsque l'immunisation d'animaux naïfs peut générer des anticorps capables de réagir avec l'épitope naturel, ces peptides sont appelés des mimotopes immunogènes (Pasqualini, Koivunen et Ruoslahti, 1995; Prezzi *et al.*, 1996). À cause de la flexibilité des peptides, un mimotope peut adopter une conformation lors du criblage mais en adopter une autre lors de l'immunisation. D'autre part, le peptide en question peut ne pas être un «mimotope structurel». Ceci se traduit par une interaction avec l'anticorps différente à celle de l'épitope naturel (Weber, Pantoliano et Thompson, 1992). Les épitopes antigéniques ne sont pas tous de bons candidats immunogènes (Moe, Tan et Granoff, 1999). Les peptides possédant ces 2 propriétés de mimétisme sont à la base de la découverte d'épitopes utilisés dans le développement de trousse de diagnostic et de nouveaux vaccins.

Dans le domaine du diagnostic, ces peptides peuvent être utilisés comme sonde spécifique aux anticorps comme certaines protéines virales sont actuellement utilisées. Les peptides sont toutefois plus abordables et habituellement plus faciles à produire. Dû à leur taille, il est aussi possible de limiter la réaction à des sites plus spécifiques qui ont une importance

diagnostique et aussi diminuer les réactions croisées causées par des déterminants sans valeur diagnostique.

Lorsque l'utilisation du ligand naturel s'avère impossible à cause de sa toxicité et que sa forme atténuée ne stimule pas efficacement le système immunitaire, l'isolation de mimotopes immunogènes offre une nouvelle option dans l'arsenal de molécules candidates au développement de nouveaux vaccins (Hou et Gu, 2003). Cependant, d'après une récente étude, ces peptides habituellement sélectionnés à partir de banques de phages de peptides aléatoires seraient moins efficaces pour obtenir des molécules immunogènes comparativement à ceux identifiés à partir de bibliothèques dérivées de peptides naturels (Matthews, Davis et Smith, 2002).

À l'opposé des mimotopes immunogéniques qui génèrent des molécules thérapeutiques, certains peptides peuvent être isolés pour leur qualité bénéfique intrinsèque. Le criblage à partir d'une enzyme ou d'un récepteur moléculaire peut mener à l'isolation de peptides agonistes, antagonistes ou capables de bloquer la liaison de sa cible à son ligand naturel. La découverte de peptides qui interagissent avec l'ADN et capables de moduler l'expression d'un gène est un autre exemple (Rebar et Pabo, 1994; Wolfe, Ramm et Pabo, 2000). Les peptides identifiés par banque phagique peuvent avoir une séquence connue ou être des mimotopes. Dans tous les cas, les caractéristiques recherchées seront principalement : une haute affinité et sélectivité envers leur cible. Ces peptides pourront être utilisés comme agents de ciblage pour fins de diagnostique ou thérapeutique.

4.3 Méthodes de criblage

L'obtention d'un peptide d'intérêt s'effectue par des tours successifs de sélection de la banque phagique et des sous-banques dérivées. Chaque tour comprend en général 4 étapes: 1) la capture des phages via le peptide exprimé sur la capsid par un site déterminé (récepteur, cytokine, molécule d'adhésion, protéase, organe, tissus etc.); 2) l'élimination des clones non spécifiques ou de faible affinité à la cible choisie; 3) la récupération des clones spécifiques suivi de; 4) leur enrichissement avant de commencer le tour suivant. La répétition de ces quatre

étapes qui résulte en l'identification d'une ou plusieurs séquences spécifiques constitue le criblage.

Le premier tour de criblage est sans aucun doute le plus important car c'est durant celui-ci que se fait l'élimination de la majorité des clones phagiques de la banque initiale. Pour ne pas perdre de façon irrémédiable des clones spécifiques, il est nécessaire d'équilibrer la capture du peptide voulu à la méthode de récupération ou d'élution utilisé.

4.3.1 Criblage *in vitro*

Le site de capture peut être une protéine purifiée présentée à la surface d'un support solide. Celui-ci peut être de différente matière : plateau de polystyrène (Smith, 1985), billes de plastique (D'Mello et Howard, 2001) ou paramagnétiques (Alam, Maeda et Sasaki, 2000) ou encore des membranes de nitrocellulose (Dyson et Murray, 1995). La nature de la liaison au support solide peut aussi varier et se faire par une adsorption (Smith, 1985) ou une liaison covalente (Bass, Greene et Wells, 1990). Le site peut aussi être biotinylé et se lier à un support tapissé d'avidine ou de streptavidine (Parmley et Smith, 1988). Une fois la banque incubée avec la molécule cible, une série de lavages sont effectués pour éliminer les clones non liés ou de faible affinité. La récupération des clones s'effectue habituellement par élution. L'élution des phages capturés n'est pas nécessaire avant leur propagation dans une culture fraîche de bactéries (Lener, Benarous et Calogero, 1995). Cependant, puisque cette méthode de récupération offre un plus faible rendement, il est préférable de l'utiliser après le premier tour. Selon l'étape de sélection et la méthode de criblage utilisée, l'élution pourra varier. Lorsque le criblage se réalise *in vitro*, l'élution peut être non spécifique. L'élution non spécifique vise à déterminer la liaison peptide-récepteur en exploitant la résistance des phages aux tampons acides pouvant atteindre un pH de 2,2 (Smith, 1985) ainsi que des pH alcalins (Harrison *et al.*, 1996). D'autres chercheurs ont profité dans leur méthode de criblage de leur résistance aux protéases (McConnell *et al.*, 1996). L'élution peut aussi être spécifique dans le but de récupérer des phages qui interagissent avec une région particulière du récepteur. Ce genre d'élution se fait

habituellement avec un anticorps ou le ligand naturel du récepteur qui viendra rivaliser avec le phage pour le site récepteur. Elle a comme avantage de diminuer le bruit de fond produit par les phages se liant spécifiquement ou par réaction croisée à d'autres sites du modèle de présentation, e.g. contaminants, support solide ou un site non relevant de la molécule cible.

Une variation de l'approche *in vitro* consiste à incuber la banque de peptides avec des cellules exprimant le récepteur cible. Ce récepteur peut être une molécule endogène ou transfectée. Cette approche plus complexe, utilise un modèle de présentation plus hétérogène qu'une protéine purifiée.

4.3.2 Criblage *In vivo*

Cette approche est particulièrement utilisée dans le but de trouver des peptides spécifiques à une région restreinte de l'organisme. Les vaisseaux sanguins constituent une cible de choix dans la quête de molécules (thérapeutiques ou de ciblage) à cause de leur accessibilité aux médicaments administrés par voie intraveineuse. La migration préférentielle des cellules tumorales et de cellules effectrices immunitaires suggère la présence d'adresses moléculaires à travers le réseau vasculaire.

Il est important d'identifier des marqueurs moléculaires exprimés lors de pathologies ou présents dans certains organes. Une possibilité est l'isolation de cellules endothéliales. Toutefois, certains marqueurs présents *in vivo* à la surface de ces cellules sont absents une fois qu'elles sont mises en culture. La conformation des molécules peut aussi changer, c'est le cas du «tissue factor» qui est présent mais inaccessible dans les vaisseaux normaux, et le devient lors de dommages cellulaires ou l'activation des cellules endothéliales (Osterud et Bjorklid, 2001). Pour pallier à ces inconvénients et bénéficier de leur expression différentielle, le criblage de phage *in vivo* a été développé (Pasqualini et Ruoslahti, 1996). Cette démarche offre plusieurs avantages notamment la reconnaissance en conditions de flot sanguin. Étant donné que la récupération de phages s'effectue en prélevant les organes, cette méthode tend à sélectionner des ligands spécifiques à ceux-ci. Les peptides isolés par cette méthode sont spécifiques à l'espèce utilisée

et pourraient ne pas être compatibles avec d'autres modèles animaux ou chez l'humain (George, Lee et Pitzalis, 2003). De plus, certains marqueurs peuvent être différentiellement exprimés chez l'homme. Par exemple, l'antigène membranaire spécifique à la prostate est retrouvé à la surface de vaisseaux tumoraux chez l'humain mais non chez la souris où il est exprimé dans les vaisseaux normaux du cerveau et des reins (Arap *et al.*, 2002a). Pour des raisons pratiques et éthiques, le criblage *in vivo* chez l'homme est limité et n'a été rapporté qu'une seule fois (Arap *et al.*, 2002b). Une alternative a été proposée par l'utilisation de chimère animale. Des tissus humains sont alors greffés, chez la souris par exemple (George *et al.*, 2003). Grâce à cette méthode, des xénogreffes de vaisseaux sanguins ont pu réguler les molécules d'adhésion et mieux encore, moduler l'extravasation de leucocytes humains. Des clones spécifiques au tissu synovial humain ont été isolés démontrant le potentiel de cette approche dans la recherche de nouveaux agents thérapeutiques mieux adaptés aux tissus humains (George, Lee et Pitzalis, 2003).

L'identification de marqueurs moléculaires spécifiques, différentiellement exprimés dans ou à proximité de tissus atteints comparativement aux tissus sains, est une étape définitive dans le développement du ciblage thérapeutique. Des agents spécifiques à ces marqueurs pourraient jouer différents rôles selon le type d'interaction avec sa cible. Une liaison modulant l'activité de cette cible lui attribuerait des caractéristiques thérapeutiques. Cependant, il est possible que l'interaction n'entraîne aucun effet. Dans les deux cas, l'agent pourra être utilisé comme outil de ciblage et être conjugué à une autre molécule dans le but de diagnostiquer une lésion par imagerie moléculaire ou de la traiter s'il s'agit d'une molécule thérapeutique.

Nous avons parcouru durant cette revue un grand nombre d'exemples associant la surexpression d'ICAM-1 à une condition pathologique. L'implication d'ICAM-1 semble d'autant plus cruciale par la démonstration des effets bénéfiques issus de l'inhibition de ses fonctions. Cependant, peu de thérapies anti-ICAM-1 sont présentement à notre disposition. Ces stratégies sont actuellement au stade pré-clinique ou clinique et les échecs rencontrés dans certaines études poussent les chercheurs à trouver d'autres molécules candidates.

L'objectif général de ce projet de doctorat visait à développer de nouveaux ligands spécifiques à ICAM-1 pour fins de ciblage. Les objectifs spécifiques à atteindre étaient les suivants:

- 1) Identifier de nouveaux ligands se liant spécifiquement à ICAM-1 (murin et humain), à l'aide d'une banque de phages. Différentes stratégies de criblage ont été utilisées. Nous avons utilisé des cellules transfectées pour l'identification de phages exprimant une séquence se liant à ICAM-1 murin tandis que nous avons utilisé la protéine purifiée pour identifier ceux se liant à ICAM-1 humain.
- 2) Déterminer leur spécificité et leur propriété de liaison. Nous avons réalisé différents tests de liaison et/ou de compétition afin de confirmer la spécificité de la liaison ICAM-1/ligand.
- 3) Caractériser leur activité fonctionnelle. Nous avons examiné la capacité des ligands identifiés à inhiber la liaison d'ICAM-1 avec son ligand naturel LFA-1. Cette caractéristique étant importante dans la détermination de molécules mères utilisées dans des modèles de ciblage murin ou comme outil thérapeutique.

Les résultats du ligand spécifique à ICAM-1 murin sont rapportés dans le premier manuscrit, tandis que les résultats du ligand spécifique à ICAM-1 humain sont présentés dans le second en préparation.

CHAPITRE 2

**Identification et caractérisation fonctionnelle d'une séquence spécifique à
ICAM-1 murin**

Résumé

La molécule d'adhésion ICAM-1 est faiblement exprimée de façon constitutive sur les cellules endothéliales, sa forte expression endothéliale est associée à l'inflammation, au cancer et l'athérogénèse. Des cellules COS-7 transfectées par ICAM-1 murin (ICAM-1m) ont été utilisées comme cible pour le criblage d'une banque de phages peptidiques. Des clones furent sélectionnés avec un anticorps monoclonal spécifique à un épitope fonctionnel d'ICAM-1 et une nouvelle séquence liant la région extracellulaire d'ICAM-1 a été identifiée qui pourrait potentiellement être utilisée comme agent de ciblage. Nous avons aussi démontré que la spécificité du peptide demeurerait conservée suite à son incorporation en la région N-terminale d'une large protéine chimère. De plus, cette protéine chimère contenant la séquence spécifique à ICAM-1 murin inhibe l'adhésion médiée par ICAM-1 murin dans un contexte de présentation d'antigènes. En conclusion, ces résultats démontrent la possibilité de modifier la sélectivité d'agents thérapeutiques envers des molécules d'adhésion impliquées dans les interactions cellules-cellules.

**IDENTIFICATION OF A MURINE ICAM-1 SPECIFIC PEPTIDE BY SUBTRACTIVE
PHAGE LIBRARY SELECTION ON CELLS**

Anna-Karine Bélizaire¹, Lioudmila Tchistiakova,

Yves St-Pierre¹ and Valery Alakhov^{2,3}

¹Supratek Pharma Inc. Laval, QC, Canada, and

²INRS-Institut Armand-Frappier, University of Québec, Laval, QC, Canada, H7V 1B7 ;

Running title: ICAM-1-specific peptide

Key words: ICAM-1, peptide, phage display, antigen presentation,

Footnotes:

Y.S.P is a scholar of the Fonds de la Recherche en Santé du Québec (FRSQ). A.K.B. is supported by studentships from Le Fonds pour la formation de chercheurs et l'aide à la recherche (FCAR) and La Fondation Armand-Frappier.

³ To whom requests should be addressed, at Supratek Pharma, 215 Boul. Bouchard suite 1315 Dorval, Québec, Canada, H9S 1A9.

Biochem Biophys Res Commun. 2003. **309**: 625-30.

Abstract

The ICAM-1 adhesion molecule is expressed selectively at low levels on endothelial cells but is strongly upregulated in dysfunctional endothelial cells associated with inflammation, cancer, and atherogenesis. Using COS-7 cells transfected with murine ICAM-1 (mICAM-1) as a target receptor, a phage display library was screened. Clones were selected by elution with a mAb specific for a functional epitope of ICAM-1 and a novel peptide sequence binding to the extracellular domain of mICAM-1 was identified that can potentially be used as a targeting vector aimed at dysfunctional endothelium. We further showed that the targeting specificity of the peptide was retained following its incorporation at the N terminal end of a large chimeric protein. Moreover, this chimeric protein containing the mICAM-1-specific sequence was found to inhibit ICAM-1-mediated intercellular adhesion during antigen presentation. Taken together, these results demonstrate the potential for improving the cell-selectivity and properties of therapeutical agents toward targeting adhesion molecules involved in cell-cell interactions.

Introduction

The intercellular adhesion molecule (ICAM)-1 is an Ig-like cell adhesion molecule expressed by several cell types, including leukocytes and endothelial cells (EC). It can be induced in a cell-specific manner by several cytokines, for example, TNF- α , or IL-1. Among the known ligands of ICAM-1 are the membrane-bound integrin receptors LFA-1 and Mac-1 that are normally expressed on leukocytes [1,2], CD43 [3], the soluble molecule fibrinogen [4], and the matrix factor hyaluronan [5]. ICAM-1 on endothelium plays an important role in migration of activated leukocytes to sites of inflammation. ICAM-1 has significant homology to ICAM-2 and ICAM-3, two alternative receptors to LFA-1. In contrast to inducible ICAM-1, ICAM-2 is constitutively expressed on EC and lymphocytes, whereas ICAM-3 expression is predominantly found on circulating T cells [6,7,8].

In normal physiology ICAM-1 plays an important role as a costimulatory molecule in T cell activation. Antigen presenting cells express ICAM-1 in association with the MHC class II complex which is required to activate CD4 helper T-cells while in cell mediated cytotoxicity ICAM-1 is a costimulator in activation of non MHC restricted killer cells and of MHC class I restricted CD8 T-cells [9,10,11]. ICAM-1 has been related to a variety of pathologies ranging from infection by viral or parasitic pathogens to chronic inflammatory diseases, such as rheumatoid arthritis, asthma, psoriasis, transplant-rejection, and allergy. In addition, numerous experiments using blocking mAbs have indicated that ICAM-1 interactions were critical in tumor development [12,13]. The use of genetically engineered adhesion-deficient mice, has further provided clear evidence that ICAMs are involved in dissemination of tumor cells [14,15]. Various approaches aimed at inhibiting ICAM-1-expression and function such as antisense oligonucleotides or gene therapy have shown encouraging results, therapeutic interventions with mAb-based strategies continue to

be the most extensively studied. However, due to the insufficient relative efficacy/safety ratio of mAb-based therapies, especially seen after systemic administration and high immunogenic potential of these agents [16-18], alternative approaches are being sought. For example, small non-immunogenic molecules either in the form of peptides or non-peptide synthetic molecules would be a suitable alternative to circumvent the above obstacles [19].

In this paper we report a novel murine ICAM-1 specific peptide identified by using phage display technology. The ability of this sequence to interact with murine ICAM-1 was shown in the direct ICAM-1 binding experiments, as well as by its ability to compete with ICAM-1-specific mAb. The binding specificity of the peptide was retained following its incorporation at the N terminal end of a large chimeric protein, that was capable of specific inhibition of ICAM-1-mediated intercellular adhesion during antigen presentation.

Materials and Methods

Construction of the library: The library containing 16-amino acid peptide was constructed essentially as previously described, using fUSE5 as the phage vector [20]. This linear library consisted of 10^{10} independent recombinant phages recovered as tetracycline-resistant colonies. The majority of these phages (>90%) contained inserts as confirmed by sequencing of randomly selected clones.

Cell lines: CH27, a B cell lymphoma expressing I-A^k, and the autoreactive, I-A^k-specific C8.A3 T cell hybrid, have been described [21] and were kindly provided by Dr. Tania H. Watts (University of Toronto). Both cell lines were grown in RPMI 1640 (Life Technologies, Burlington, ON) supplemented with 10% (v/v) heat-inactivated FCS (Hyclone), 2 mM glutamine (Life

Technologies), antibiotics penicillin and streptomycin, and 2×10^{-5} M 2-ME (complete medium). COS-7 cells were obtained from the ATCC and were grown in complete DMEM.

Reagents and monoclonal antibodies: The anti-mouse ICAM-1 3E2 mAb [22] was purchased from BD-Pharmingen (San Diego, CA). The human IgG was purchased from Cappel Research Reagents (ICN Biomedicals). The YN1/1.7.4 hybridoma cell line secreting the mAb specific for murine ICAM-1 was obtained from the ATCC and mAbs purified from hybridoma culture supernatants by chromatography on protein G-Sepharose (Pharmacia Fine Chemicals, Piscataway, NJ) using standard protocols. The YN-1 mAb was biotinylated with D-biotin-N-hydroxy-succinimidyl ester purchased from Roche Diagnostics (Laval, QC) in carbonate buffer (pH8.0) and dialysis performed against PBS using standard protocol. The phycoerythrin-conjugated streptavidin conjugate (SA-PE) was purchased from Immunotech (Westbrook, ME). All other reagents were purchased from Sigma, unless otherwise indicated.

Transfection of COS-7 cells with ICAM-1 cDNA. To generate COS-7 cells expressing ICAM-1, the cDNA encoding the common form of ICAM-1 was subcloned in the pAPRM9 plasmid vector to generate the pICAM-1 plasmid [23] and transfected using Superfect according to instructions supplied by the manufacturer (Qiagen). Transfectants were characterized for their expression of ICAM-1 by flow cytometry using ICAM-1-specific 3E2 mAb, as previously described [24].

Panning to select ICAM-1-reactive Phage. ICAM-1-reactive phages were captured from the library by panning using ICAM-1-expressing COS-7. Briefly, 10^6 ICAM-1-expressing COS-7 cells were blocked 2h at room temperature with PBS supplemented with 3% (v/v) BSA (B-PBS) in an Eppendorf tube. Cells were washed with B-PBS and pelleted before adding 0.5 ml of B-PBS containing approximately 10^{11} phages and incubated with rotation for 4 hours at 4°C. Unbound phages were subsequently removed by washing ten times with B-PBS. ICAM-1-specific phages were obtained by elution with ICAM-1-specific YN1.7.4 mAb (50µg/mL). For this purpose, the

plates were incubated 2 hours with rotation at 4°C in the presence of the mAb and the resulting supernatant collected, amplified, and the enrichment cycle was repeated as above. In the last three rounds of panning, however, the phages (10^{10}) were first incubated with non-transfected COS-7 cells to increase specificity before proceeding to the panning with the ICAM-1-expressing cells. Individual phage were cloned, amplified and sequenced.

Construction, Expression and Purification of β -Galactosidase Fusion Proteins. A recombinant protein consisting of the mICAM-1-specific peptide inserted at the N-terminal end of the β -galactosidase and fused to an His tag sequence was generated (SPMIC/bgal) using the following oligonucleotides: 5'-pAA TTC AAA TTA ACT ATG TTT GAT GGG TTC AGC TTT CTG GCG TTC GAG GAC TTC GTT AGT TCG ATC GGA GGA GGA G-3' (sense) and 5'-pGA TCC TCC TCC GAT CGA ACT AAC GAA GTC CTC GAA CGC CAG AAA GCT GAA CCC ATC AAA CAT AGT TAA TTT G-3' (antisense). The underlined nucleotide sequence encodes the 4.1 peptide sequence and bold letters a three amino acid linker. These were inserted into a modified pQE16 vector (QIAGEN) that included a 6xHis tagged- β -galactosidase gene, and from which the DHFR encoding sequence had been removed. A fusion protein containing a peptide consisting of a scrambled amino acid sequence obtained from a human ICAM-1-specific peptide (SPHIR/bgal) was used as a control fusion protein and generated using the following oligonucleotides: 5'-pAA TTC AAA TTA ACT ATG CCC CGC AAG CCA TCC CGT GAG CCT CAT ACA CGA CAC GAC CGA CAT ACC CCA CAG GGA GGA GGA G-3' (sense), and 5'-pGA TCC TCC TCC TCC CTG TGG GGT ATG TCG GTC GTG TCG TGT ATG AGG CTC ACG GGA TGG CTT GCG GGG CAT AGT TAA TTT G-3' (antisense). DNA sequencing was carried out to ensure integrity of the constructs. *Escherichia coli* strain M15 bearing the plasmid encoding mic4.1-beta-gal fusion protein was grown in LB medium supplemented with 100 μ g/ml ampicillin and 25 μ g/ml kanamycin and induced with 1 mM isopropyl-1-thio-beta -D-galactopyranoside. The chimeric fusion protein was purified by affinity chromatography on a Ni-nitrilo-triacetic acid resin (Qiagen) according to the manufacturer's instructions. The concentration of the fusion proteins was determined using

DC Protein Assay (Bio-Rad, Mississauga, ON). Purity was confirmed by analyzing Coomassie blue stained SDS-PAGE gel with ImageQuant software version 5.0 (Amersham Biosciences, Piscataway NJ). The β -galactosidase activity was quantified with Luminescent β -galactosidase Reporter System 3 according to instructions supplied by the manufacturer (Clontech, Mississauga, ON) using Lumat LB9507 (Berthold Technologies, Oak Ridge, TN).

Flow cytometric analysis. Cells were washed twice with ice-cold PBS containing 1% (v/v) BSA and 0.01% (v/v) sodium azide (PBA) and then incubated for 20 min on ice with ICAM-1-specific biotin-labelled mAbs. After two washes in PBA, the cells were incubated again with a saturating concentration of PE-conjugated streptavidin (SA-PE) for 30 min on ice, washed twice with PBA and resuspended in 400 μ l of PBS containing 0.01% of sodium azide. Samples were kept at 4°C in the dark and analyzed using a Coulter XL-MCL (Coulter Electronics, Hialeah, FL). Between 5,000 and 10,000 cellular events were analyzed for each sample. In some assays, phages were incubated for 40 min with the indicated concentrations of phage before addition of the mCAM-1-specific biotinylated mAb. Controls included cells transfected with the empty vector; cells without antibodies or with control antibodies, as well as cells incubated with SA-PE alone.

Antigen presentation assay. A total of 10^5 C8.A3 T cells were added to 10^5 CH27 antigen-presenting cells that had been pre-incubated for 15 min at 37°C with the fusion proteins or with the indicated concentrations of mAbs. The supernatants were collected at 16-24 h and tested for the presence of IL-2 by ELISA using the Ready-set-go! IL-2 detection kit (eBioscience, San Diego, CA).

Results

Identification of the phage clones that bind murine ICAM-1. To assure a native presentation of the extracellular domains of ICAM-1 we have transfected COS-7 cells with plasmid inserted with cDNA encoding the common form of ICAM-1. The obtained ICAM-1 positive cell subline was

used for the screening of the phage library displaying linear peptides of 16 amino acids in length. In the first selection protocol, the library was allowed to bind to COS-7 cells that express murine ICAM-1 and bound phages were eluted using ICAM-1-specific YN-1 mAb, that has been shown to inhibit ICAM-1-mediated intercellular adhesion [25,26]. The phage population enriched by five rounds of selection on mICAM-1-expressing COS-7 cells was amplified and sequenced. A set of the identified sequences that are displayed in the selected clones are shown in the (Table I). Several clones contained the $X^1E/DX^3X^4SX^6X^7X^8X^9X^{10}DX^{12}$ motif, where the amino acid distribution at X^1 and X^{12} favoured aromatic amino acids, while X^3 , X^4 , X^6 to X^{10} seem to be random. Another selection protocol was carried out, during which the library was first subtracted on the non-transfected COS-7 cells in each of the four rounds of panning prior to exposing the library to ICAM-1-expressing cells. This protocol resulted in a single peptide sequence, that corresponded to the motif identified during the first protocol. Blast search analysis of identified sequences yielded no homology to either the nucleotide or amino acid sequences reported to bind to ICAM-1.

To test the specificity of interaction of the identified amino acid sequence, we measured the binding of the phage 4.1 to COS-7 cells expressing ICAM-1. The results showed that this phage bound only to ICAM-1-expressing COS-7 cells, but not to control cells that lacked ICAM-1 expression at their surface (Fig. 1) indicating that the 4.1 clone was specific for murine ICAM-1.

The specificity of the 4.1 sequence was further tested by antibody displacement assay using YN-1 and 3E2 mAbs. Although both mAbs are specific for mICAM-1 and have been shown to inhibit LFA-1-mediated adhesion [21,22,27], during which LFA-1 binds to the D1 domain of ICAM-1, these two mAbs bind to distinct yet overlapping epitopes (Y. St-Pierre, *unpublished observations*). Our results showed that when the 4.1 phage was used to compete with the binding of these mAbs to mICAM-1 expressing COS-7 cells, it was able to compete only with YN-1 on mICAM-1-

expressing COS-7 cells (Fig. 2). No significant inhibition of the YN-1 binding was observed with the control phage sequence (*data not shown*).

Functional reconstitution of the 4.1 amino acid sequence into a chimeric protein. In the next series of experiments, a recombinant chimeric protein produced by fusing the C-terminus of β -galactosidase gene and the 4.1 sequence coding oligonucleotide. The chimeric product was expressed and purified as described in the Materials and Methods section. A three amino acid (Gly-Gly-Gly) linker was also inserted between the 4.1 sequence and β -galactosidase to avoid steric hindrance between the two chimera components. Purity of the isolated fusion protein was evaluated by SDS-PAGE stained with Coomassie Blue and was higher than 90%. Activity of β -galactosidase remained practically unchanged in the fusion protein (1.51×10^6 RLU s⁻¹/ng of recombinant β -galactosidase compared to 1.17×10^6 RLU s⁻¹/ng of SPMIC/ β gal). To evaluate the functional properties of this chimeric construct, we tested its ability to inhibit the accessory function of ICAM-1 during the antigen presentation process by evaluating the IL-2 secretion by I-A^k-restricted C8.A3 T cell hybrids in response to contact with I-A^k-expressing, ICAM-1-positive, CH27 antigen-presenting cells. The activation of C8.A3 by CH27 is strongly ICAM-1/LFA-1-dependent, as shown by the ability of YN-1 mAb, but not isotypic control antibody, to inhibit IL-2 secretion (Fig. 3). Our results showed that addition of the recombinant fusion protein containing the ICAM-1-specific peptide significantly inhibited the secretion of IL-2 by the T cells. No such inhibition was observed with the control fusion protein SPHIR/ β gal containing non relevant peptide as described in the Material and Methods section, suggesting that the inhibitory effect of the 4.1 peptide containing fusion protein was sequence specific.

Discussion

Here, we describe a novel peptide sequence specific for murine ICAM-1 that was identified by screening a phage displayed peptide library against the ICAM-1 transfected COS-7 cells, we have shown that the peptide sequence retained its ability to block intercellular adhesion during antigen

presentation when inserted at the N-terminal end of a fusion protein. Although peptides that block the interaction between ICAM-1 and Mac-1 and between ICAM-1 and LFA-1 have been reported for the human adhesion molecules [28-32], peptide sequences that inhibit the interaction of murine ICAM-1 with LFA-1 have not previously been reported.

Binding of ICAM-1 to LFA-1 is crucial to inflammatory cell infiltration in diseases such as asthma, arthritis [33,34] and certain types of cancers [36,36]. This interaction has also been found to be involved in multiple sclerosis [37]. Furthermore, expression of ICAM-1 is induced in cells of allograft and is associated to the rejection process [38,39]. Considering the role of ICAM-1 in these pathological processes, the identification of molecules capable of inhibiting ICAM-1/LFA-1 binding has become significant.

Development of targeting molecules that can specifically direct therapeutic agents to a cell or tissue of interest may significantly improve performance of new and existing drugs. Furthermore, the possibility to incorporate targeting peptides into viral and non-viral gene therapy vectors; therapeutic proteins; polymer based drug delivery systems and liposomes would allow production of new and more specific products with increased safety profiles and increased therapeutic index [40-42]. Phage display technology has demonstrated to be a feasible approach for discovery of small tissue specific peptides [43,44]. This technology has been used before to identify sequences specific to human ICAM-1 using purified protein as a target during the selection process [28,45]. Sequence 4.1 was identified using subtraction of peptide display phage library. This approach has been previously used [46,47] and is helpful when screened target is not a purified recombinant protein, as was the case in this cellular system. The subtraction method described here, combined the specificity to a cell subpopulation [48] and the advantage of competitive elution with a known mAb [49], in our case mICAM-1 COS-7 cell transfectants and YN1 antibody respectively, was very productive and could be used to obtain specific sequences directed against functional epitopes found on other cell adhesion molecules. The 4.1 sequence represents the first specific peptide sequence for murine ICAM-1. This sequence does not

contain any significant homology to known sequence or motif. Such linear peptide can thus be used *in vivo* in mice models for testing of drug delivery agents to specific cell types expressing ICAM-1. The ability of this peptide to confer to β -galactosidase the ability to specifically inhibit ICAM-1-mediated adhesion suggest that the 4.1 peptide sequence is suitable for retargeting of a larger protein. Furthermore, since fusion of 4.1 sequence did not abolish β -galactosidase activity, in an alternate approach, conjugation to anti-cancer or anti-inflammatory drugs could significantly diminish side effects observed from systemic administration.

Acknowledgments

We wish to thank Olivier Robledo and Lioudmila Iourtchenko for their help and advice on the fusion construction.

REFERENCES

- [1] D.E. Staunton, S.D. Marlin, C. Stratowa, M.L. Dustin, T.A. Springer, Primary structure of ICAM-1 demonstrates interaction between members of the immunoglobulin and integrin supergene families. *Cell*. 52 (1988) 925-33.
- [2] M.S. Diamond, D.E. Staunton, A.R. de Fougères, S.A. Stacker, J. Garcia-Aguilar, M.L. Hibbs, T.A. Springer, ICAM-1 (CD54): a counter-receptor for Mac-1(CD11b/CD18). *J Cell Biol*. 111 (1990) 3129-3139.
- [3] Y. Rosenstein, J.K. Park, W.C. Hahn, F.S. Rosen, B.E. Bierer, S.J. Burakoff, CD43, a molecule defective in Wiskott-Aldrich syndrome, binds ICAM-1. *Nature*. 354 (1991) 233-235.
- [4] L.R. Languino, J. Plescia, A. Duperray, A.A. Brian, E.F. Plow, J.E. Geltosky, D.C. Altieri, Fibrinogen mediates leukocyte adhesion to vascular endothelium through an ICAM-1-dependent pathway. *Cell*. 73 (1993) 1423-1434.
- [5] P.A. McCourt, B. Ek, N. Forsberg, S. Gustafson, Intercellular adhesion molecule-1 is a cell surface receptor for hyaluronan. *J Biol Chem*. 269 (1994) 30081-30084.
- [6] M.L. Dustin, R. Rothlein, A.K. Bhan, C.A. Dinarello, T.A. Springer, Induction by IL 1 and interferon-gamma: tissue distribution, biochemistry, and function of a natural adherence molecule (ICAM-1). *J Immunol*. 137 (1986) 245-254.

- [7] P. Nortamo, R. Li, R. Rekonen, T. Timonen, J. Prieto, M. Patarroyo, C.G. Gahmberg, The expression of human intercellular adhesion molecule-2 is refractory to inflammatory cytokines. *Eur J Immunol.* 21 (1991) 2629-2632.
- [8] J.L. Cordell, K. Pulford, H. Rurley, M. Jones, K. Micklem, I.A. Doussis, X. Tyle, K. Mayne, K.C. Gatter, D.T. Mason, Cellular distribution of human leucocyte adhesion molecule ICAM-3. *J Clin Pathol.* 47 (1994) 143-147.
- [9] C. Dubey, M. Croft, S.L. Swain, Costimulatory requirements of naïve CD4+ T cells. ICAM-1 or B7-1 can costimulate naïve CD4 T cell activation but both are required for optimum response. *J Immunol.* 155 (1995) 45-57.
- [10] A.S. Chong, I.A. Boussy, X.L. Jang, M. Lamas, L.H. Graf Jr, CD54/ICAM-1 is a costimulator of NK cell-mediated cytotoxicity. *Cell Immunol.* 157 (1994) 92-105.
- [11] J.L. Gaglia, E.A. Freenfield, A. Mattoo, A.H. Sharpe, G.J. Feeman, V.K. Kuchroo, Intercellular adhesion molecule 1 is critical for activation of CD28-deficient cells. *J Immunol.* 165 (2000) 6091-608.
- [12] R. Harning, C. Myer, V.J. Merluzzi, Monoclonal antibodies to lymphocyte function-associated antigen-1 inhibit invasion of human lymphoma and metastasis of murine lymphoma. *Clin Exp Metastasis.* 11 (1993) 337-342.
- [13] M.A. Zahalka, E. Okon, D. Naor, Blocking lymphoma invasiveness with a monoclonal antibody directed against the beta-chain of the leukocyte adhesion molecule (CD18). *J Immunol.* 150 (1993) 4466-4477.

- [14] F. Aoudjit, E.F. Potworowski, T.A. Springer, Y. St-Pierre, Protection from lymphoma cell metastasis in ICAM-1 mutant mice: a posthoming event. *J Immunol.* 161 (1998) 2333-2338.
- [15] M. Lalancette, F. Aoudjit, E.F. Potworowski, Y. St-Pierre, Resistance of ICAM-1-deficient mice to metastasis overcome by increased aggressiveness of lymphoma cells. *Blood.* 95 (2000) 314-319.
- [16] P. Neumeister, M. Eibl, W. Zinke-Cerwenka, M. Scarpatetti, H. Sill, W. Linkesch, Hepatic veno-occlusive disease in two patients with relapsed acute myeloid leukemia treated with anti-CD33 calicheamicin (CMA-676) immunoconjugate. *Ann Hemat.* 80 (2001) 119-120.
- [17] E.S. Chung, M. Packer, K.H. Lo, A.A. Fasanmade, J.T. Willerson, Anti-TNF Therapy Against Congestive Heart Failure Investigators. Randomized, double-blind, placebo-controlled, pilot trial of infliximab, a chimeric monoclonal antibody to tumor necrosis factor-alpha, in patients with moderate-to-severe heart failure: results of the anti-TNF Therapy Against Congestive Heart Failure ATTACH) trial. *Circulation* 107 (2003) 3133-3140.
- [18] G.E. Thomas, J.M. Esteban, A. Raubitschek, J.Y. Wong, *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 1995 Feb 1;31(3):529-34. gamma-Interferon administration after ⁹⁰yttrium radiolabeled antibody therapy: survival and hematopoietic toxicity studies. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 31 (1995) 529-534.

- [19] O.H. Aina, T.C. Sroka, M.L. Chen, K.S. Lam, Therapeutic cancer targeting peptides. *Biopolymers* 66 (2002) 184-199. Review.
- [20] M. Popkov, I. Lussier, V. Medvedkine, P.O. Esteve, V. Alakhov, R. Mandeville, Multidrug-resistance drug-binding peptides generated by using a phage display library. *Eur J Biochem.* 251 (1998) 155-163.
- [21] Y. St Pierre, T.H. Watts, Characterization of the signaling function of MHC class II molecules during antigen presentation by B cells. *J Immunol.* 147 (1991) 2875-2882.
- [22] A. Scheynius, R.L. Camp, E. Pure, Reduced contact sensitivity reactions in mice treated with monoclonal antibodies to leukocyte function-associated molecule-1 and intercellular adhesion molecule-1. *J Immunol.* 150 (1993) 655-663.
- [23] B. Ochietti, P. Lemieux, A.V. Kabanov, S. Vinogradov, Y. St-Pierre, V. Alakhov, Inducing neutrophil recruitment in the liver of ICAM-1-deficient mice using polyethyleneimine grafted with Pluronic P123 as an organ-specific carrier for transgenic ICAM-1. *Gene Ther* 9 (2002) 939-945.
- [24] B. Champagne, P. Tremblay, A. Cantin, Y. St Pierre, Proteolytic cleavage of ICAM-1 by human neutrophil elastase. *J Immunol.* 161 (1998) 6398-63405.
- [25] F. Takei, Inhibition of mixed lymphocyte response by a rat monoclonal antibody to a novel murine lymphocyte activation antigen (MALA-2). *J Immunol.* 134 (1985) 1403-1407.

- [26] K.J. Horley, C. Carpenito, B. Baker, F. Takei, Molecular cloning of murine intercellular adhesion molecule (ICAM-1). *EMBO J.* 8 (1989) 2889-2896.
- [27] T. Kumasaka, W.M. Quinlan, N.A. Doyle, T.P. Condon, J. Sligh, F. Takei, A. Beaudet, C.F. Bennett, C.M. Doerschuk. Role of the intercellular adhesion molecule-1(ICAM-1) in endotoxin-induced pneumonia evaluated using ICAM-1 antisense oligonucleotides, anti-ICAM-1 monoclonal antibodies, and ICAM-1 mutant mice. *J Clin Invest.* 97 (1996) 2362-2369.
- [28] J.K. Welply, C.N. Steininger, M. Caparon, M.L. Michener, S.C. Howard, L.E. Pegg, D.M. Meyer, P.A. De Ciechi, C.S. Devine, G.F. Casperson, A peptide isolated by phage display binds to ICAM-1 and inhibits binding to LFA-1. *Proteins.* 26 (1996) 262-270.
- [29] Y. Feng, D. Chung, L. Garrard, G. McEnroe, D. Lim, J. Scardina, K. McFadden, A. Guzzetta, A. Lam, J. Abraham, D. Liu, G. Endemann, Peptides derived from the complementarity-determining regions of anti-Mac-1 antibodies block intercellular adhesion molecule-1 interaction with Mac-1. *J Biol Chem.* 273 (1998) 5625-5630.
- [30] R.N. Gursoy, T.J. Siahaan, Binding and internalization of an ICAM-1 peptide by the surface receptors of T cells. *J Pept Res.* 53 (1999) 414-421.
- [31] S.A. Tibbetts, D. Seetharama Jois, T.J. Siahaan, S.H. Benedict, M.A. Chan, Linear and cyclic LFA-1 and ICAM-1 peptides inhibit T cell adhesion and function. *Peptides* 21 (2000) 1161-1167.

- [32] M.E. Anderson, T.J. Siahaan, Targeting ICAM-1/LFA-1 interaction for controlling autoimmune diseases: designing peptide and small molecule inhibitors. [Review] *Peptides* 24 (2003) 487-501.
- [33] L.A. Stanciu, R. Djukanovic, The role of ICAM-1 on T-cells in the pathogenesis of asthma *Eur. Respir. J.* 11 (1998) 949-957.
- [34] M.M. Grunstein, H. Hakonarson, N. Maskeri, C. Kim, S. Chuang, Intrinsic ICAM-1/LFA-1 -activation mediates altered responsiveness of atopic asthmatic airway smooth muscle *Am J Physiol. Lung Cell Mol Physiol* 278 (2000) L1154-L1163.
- [35] Z. Jiang, B.A. Woda, L. Savas, A.E. Fraire, Expression of ICAM-1, VCAM-1, and LFA-1 in adenocarcinoma of the lung with observations on the expression of these adhesion molecules in non-neoplastic lung tissue. *Mod Pathol.* 11 (1998) 1189-1192.
- [36] S. Shimoyama, F. Gansauge, S. Gansauge, U. Widmaier, T. Oohara, H.G. Beger, Overexpression of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) in pancreatic adenocarcinoma in comparison with normal pancreas. *Pancreas.* 14 (1997) 181-186.
- [37] L. Bo, J.W. Peterson, S. Mork, P.A. Hoffman, W.M. Gallatin, R.M. Ransohoff, B.D. Trapp, Distribution of immunoglobulin superfamily members ICAM-1, -2, -3, and the beta 2 integrin LFA-1 in multiple sclerosis lesions. *J Neuropathol Exp Neurol.* 55 (1996) 1060-1072.
- [38] M. Kamoun, Cellular and molecular parameters in human renal allograft rejection. *Clin Biochem.* 34 (2001) 29-34. Review.

- [39] J. Wong, P. Kubes, Y. Zhang, Y. Li, S.J. Urbanski, C.F. Bennett, S.S. Lee, Role of ICAM-1 in chronic hepatic allograft rejection in the rat. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver. Physiol.* 283(2002) G196-G203.
- [40] S.A. Nicklin, S.J. White, S.J. Watkins, R.E. Hawkins, A.H. Baker, Selective targeting of gene transfer to vascular endothelial cells by use of peptides isolated by phage display. *Circulation* 102 (2000) 231-237.
- [41] S.A. Nicklin, D.J. Von Seggern, L.M. Work, D.C. Pek, A.F. Dominiczak, G.R. Nemerow, A.H. Baker, Ablating adenovirus type 5 fiber-CAR binding and HI loop insertion of the SIGYPLP peptide generate an endothelial cell-selective adenovirus. *Mol. Ther.* 4 (2001) 534-542.
- [42] S.J. White, S.A. Nicklin, T. Sawamura, A.H. Baker, Identification of peptides that target the endothelial cell-specific LOX-1 receptor. *Hypertension* 37 (2001) 449-455.
- [43] W. Arap, W. Haedicke, M. Bernasconi, R. Kain, D. Rajotte, S. Krajewski, H.M. Ellerby, D.E. Bredesen, R. Pasqualini, E. Ruoslahti, Targeting the prostate for destruction through a vascular address. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99 (2002) 1527-1531.
- [44] E Ruoslahti, D Rajotte An address system in the vasculature of normal tissues and tumors. *Annu Rev Immunol.* 18 (2000) 813-27. Review.
- [45] J.P. Shannon, M.V. Silva, D.C. Brown, R.S. Larson, Novel cyclic peptide inhibits intercellular adhesion molecule-1-mediated cell aggregation. *J. Pept. Res.* 58 (2001) 140-150.

- [46] X. Cai, A. Garen, Anti-melanoma antibodies from melanoma patients immunized with genetically modified autologous tumor cells: selection of specific antibodies from single-chain Fv fusion phage libraries. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 92 (1995) 6537-6541.
- [47] U.B. Rasmussen, V. Schreiber, H. Schultz, F. Mischler, K. Schughart, Tumor cell-targeting by phage displayed peptides . *Cancer Gene. Ther.* 9 (2002) 606-612.
- [48] J. de Kruif, L. Terstappen, E. Boel, T. Logtenberg, Rapid selection of cell subpopulation-specific human monoclonal antibodies from a synthetic phage antibody library. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 92 (1995) 3938-3942.
- [49] E.V. Meulemans, R. Slobbe, P. Wasterval, F.C. Ramaekers, G.J. van Eys, Selection of phage-displayed antibodies specific for a cytoskeletal antigen by competitive elution with a monoclonal antibody. *J Mol Biol* 244 (1994) 353-360.

Table I: Frequency distribution of phage sequences obtained after biopanning

| Clone | Insert peptide sequence | Frequency |
|---|--|-----------|
| <i>5 rounds of selection, (last 3 with presorbtion)</i> | | |
| 5.1; 5.6 | F <u>E</u> G F S F L A F E D F V S S I | 2 |
| 5.2; 5.7 | R D G W Y <u>E</u> S V S Y W G V I D W | 2 |
| 5.3 | G A <u>E</u> G I E V K Y W V D L G W V | 1 |
| 5.4 | F A G A A W H E R L G Y G H A T | 1 |
| 5.5 | P Y R I D A W A D V D E M V W M | 1 |
| 5.8 | I F V G A Y V V N | 1 |
| 5.9 | F <u>D</u> G F S F L A F E D F V S S I | 1 |
| 5.10 | I L G H T W Q A L G W L V T G R | 1 |
| <i>Modified selection with presorbtion, 4 rounds</i> | | |
| 4.1-4.10 | F <u>E</u> G F S F L A F E D F V S S I | 10 |

Figure legends:

Figure 1: Elution on 4.1 from COS-7/ICAM-1 vs non-transfected COS-7. An aliquot of 10^{10} phage containing the 4.1 sequence was incubated for 2 hours with ICAM-1-transfected or untransfected (control) COS-7 cells. After washing, bound phage were eluted with YN-1 antibody and phage-plated.

Figure 2: Flow cytometric analysis of antibody inhibition by phage 4.1 on ICAM-1 transduced COS-7 cells. ICAM-1 expressing cells (4×10^5 cells) were incubated with 10^9 - 10^{12} colony forming units (cfu) of phage 4.1. After washing, cells were incubated with either YN1 or 3E2 antibody, which recognize distinct yet overlapping epitopes on the first domain of ICAM-1. No significant inhibition was obtained using the control phage A1 (*data not shown*).

Figure 3. Inhibition of antigen presentation by the 4.1 peptide sequence inserted at the N-terminal end of the β -galactosidase protein. IL-2 production by I-A^k-specific autoreactive T cells (C8.A3) stimulated by ICAM-1-positive CH27 antigen presenting cells in presence of the fusion proteins containing the ICAM-1-specific 4.1 (SPMIC/bgal) or the control sequence (SPIHR/bgal). As a control, cells were incubated with either 10 μ g/ml of ICAM-1-specific mAb or the same concentration of a control IgG antibody. The results are representative of three independent experiments.

Figure 1

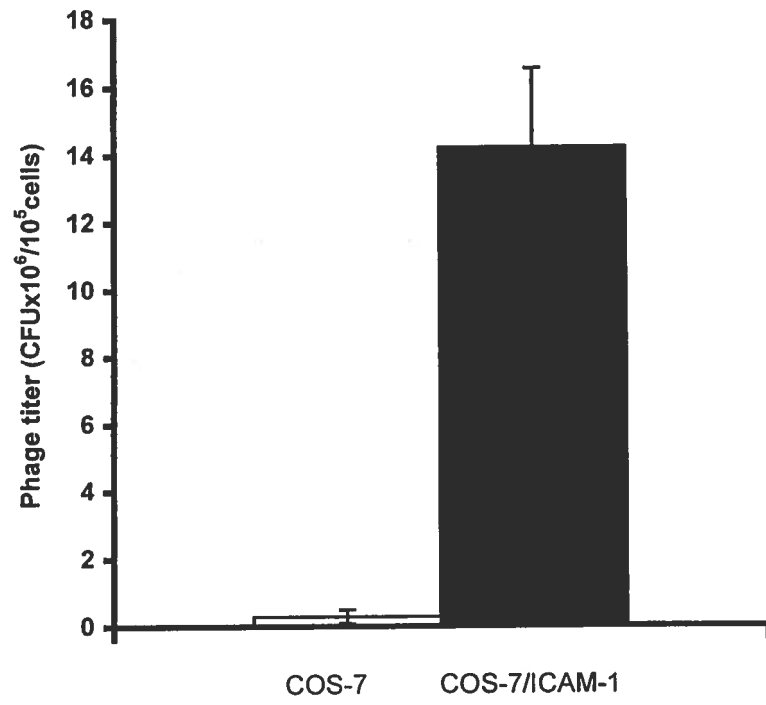


Figure 2

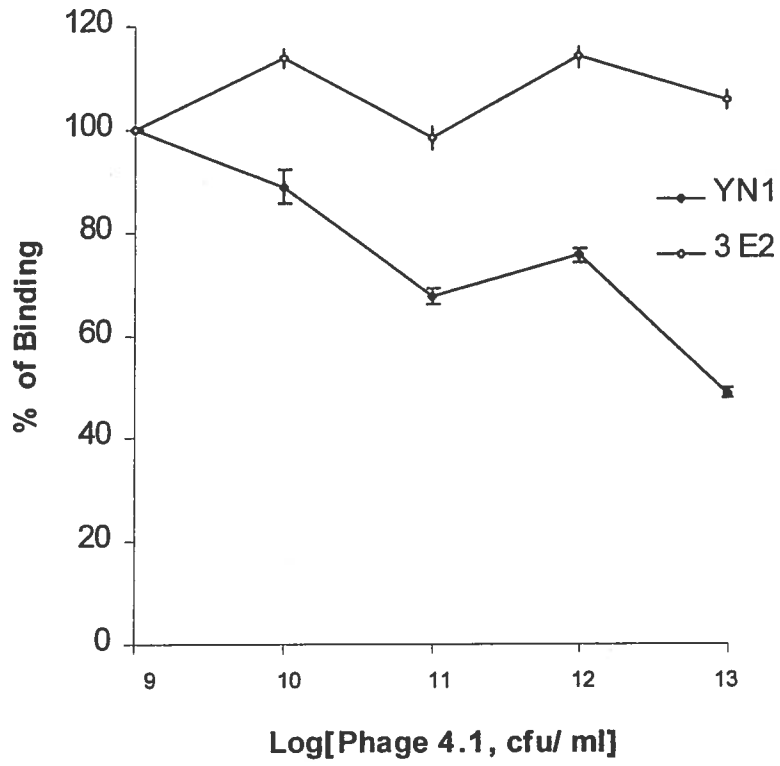
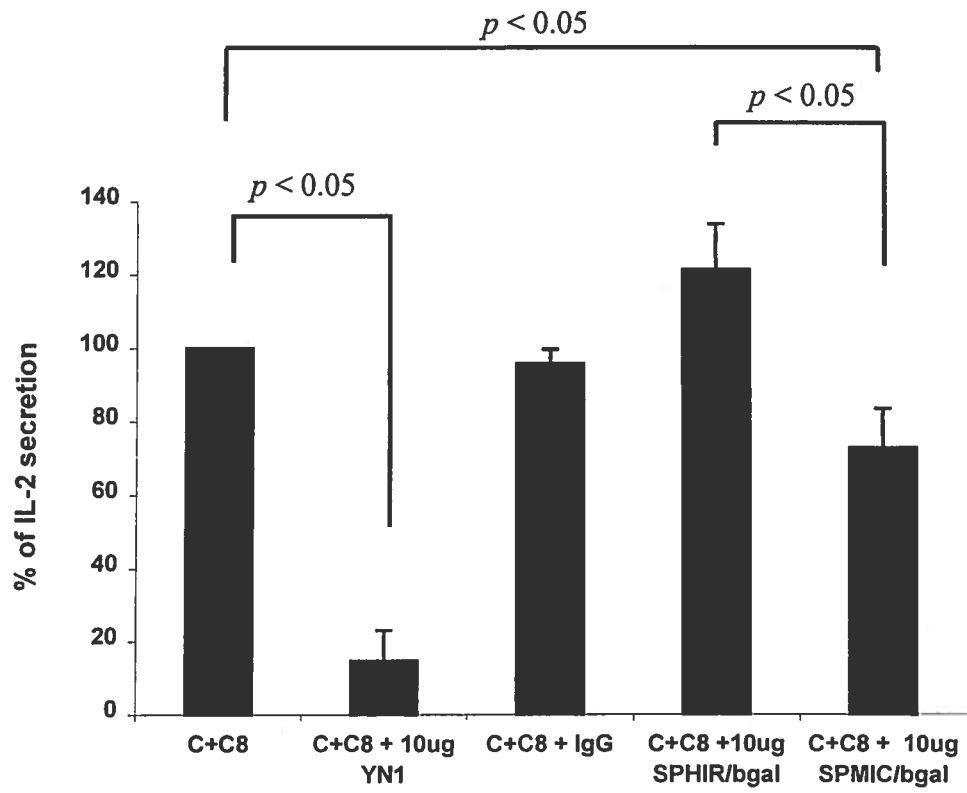


Figure 3



CHAPITRE 3

Identification d'une séquence spécifique à ICAM-1 humain et caractérisation du potentiel inhibiteur de l'interaction ICAM-1/LFA-1.

Au-delà de l'étude d'une séquence utile à la caractérisation de l'interaction d'ICAM-1 dans un modèle murin, l'identification d'une séquence ciblant ICAM-1 humain peut mener au développement de nouveaux outils pour le traitement de maladies impliquant ICAM-1.

Dans la seconde partie de ce projet de doctorat, nous avons identifié un ligand spécifique à ICAM-1 humain et testé son potentiel de ciblage. Pour démontrer l'activité fonctionnelle de la séquence identifiée, nous avons utilisé le modèle de cultures lymphocytaires mixtes où les interactions cellulaires via ICAM-1 sont connues pour jouer un rôle essentiel dans l'activation des lymphocytes T. Pour ce faire, les lymphocytes du sang périphériques sont prélevés chez deux donneurs et mis en culture afin de mesurer leur capacité à réagir contre une antigène du non-soi, i.e. alloréactif. Cette alloréactivité est déterminée par la mesure de l'index prolifératif des lymphocytes. Ce modèle est représentatif d'une situation de rejet de greffe et offre l'avantage de ne pas utiliser de cellules immortalisées.

Résumé

La molécule d'adhésion ICAM-1 est faiblement exprimé sur l'endothélium normal. La hausse de son expression observée pendant l'inflammation, le rejet de greffe et dans certaines cancer en fait un bon candidat pour le ciblage moléculaire. Une banque aléatoire de peptides phagiques a été criblé sur ICAM-1 humain recombinant (hICAM-1) immobilisé sur une surface solide. Les phages liés ont été élués non spécifiquement par élution acide ou en combinaison avec l'anticorps monoclonal anti-ICAM-1 HA58. Cet anticorps inhibe la réaction de lymphocytes mixtes (MLR). Une séquence prédominante SPHIC4.1 a été synthétisée et sa capacité de liaison testée sur les lignées parentales de carcinome mammaire MCF-7 (ICAM-1 faible) et la lignée résistante à la doxorubicine MCF-7/ADR (ICAM-1 élevé). SPHIC4.1 a démontré une spécificité de liaison aux deux lignées dépendante de la température et au temps. Le peptide SPHIR qui est constitué de la séquence brouillée de SPHIC n'a démontré aucune interaction envers ces deux lignées, suggérant que la liaison de SPHIC4.1 est particulière à sa séquence. De plus comme l'anticorps HA58, le peptide SPHIC4.1 conjugué à la b-galactosidase sous forme de protéine de fusion utilisé sans un test in vitro de présentation d'antigène a pu inhiber la réaction MLR. Ces résultats démontrent le potentiel de ce peptide à rediriger des molécules thérapeutique vers ICAM-1 aux sites inflammatoires et des tumeurs ayant pour effet de diminuer les effets secondaires observé lors de leur administration systémique.

**PHAGE DISPLAY LIBRARY GENERATED NOVEL HUMAN ICAM-1 SPECIFIC PEPTIDE THAT
INHIBITS ICAM-1/LFA-1 INTERACTION *IN VITRO***

Anna-Karine Bélizaire, Lioudmila Tchistiakova, Klodia Colakyan, Grzegorz Pietrzynski,

Yves St-Pierre and Valery Alakhov

Supratek Pharma Inc. Laval, Québec, Canada

Footnote:

Y.S.P is a scholar of the Fonds de la Recherche en Santé du Québec (FRSQ). A.K.B. is supported by studentships from Le Fonds pour la formation de chercheurs et l'aide à la recherche (FCAR) and La Fondation Armand-Frappier.

Running Title: Human ICAM-1-specific peptide

Corresponding Author: Valery Alakhov

Supratek Pharma, 215 Boul. Bouchard, suite 1315,

Dorval, Québec, Canada, H9S 1A9

Fax number : 514-422-9410

Valery.alakhov@supratek.com

Number of text pages: 14

Number of tables: 1

Number of figures: 4

Number of references: 28

Number of words in Abstract: 222

Number of words in Introduction: 517

Number of words in Discussion: 427

List of nonstandard abbreviations: FCS, foetal calf serum; HPLC, high performance liquid chromatography; ICAM-1, intercellular adhesion molecule-1; hICAM-1, human ICAM-1; MLR, mixed lymphocyte reaction; mAb; monoclonal antibody; RLUs, relative luminescence units.

Recommended section assignment: Inflammation & Immunopharmacology

Key words: ICAM-1, peptide, phage display, antigen presentation, targeting, fusion protein.

Abstract

The ICAM-1 adhesion molecule is expressed at low levels on endothelial cells but is strongly upregulated in dysfunctional endothelium during inflammation, cancer, and allograft rejection. Given the clinical significance of ICAM-1, the identification of specific ligands recognizing ICAM-1 is important for the development of therapies inhibiting ICAM-1 function or directed against tissues overexpressing this adhesion molecule. To identify new ICAM-1-specific ligands, a display library of random peptide phages was screened on immobilized soluble human ICAM-1 (hICAM-1). Bound phages were eluted by competitive elution with anti-hICAM-1 monoclonal antibody HA58, known to inhibit MLR, or non-specifically by acid elution. One sequence, HICab4.1, was predominant using antibody displacement. The peptide was synthesized (HIC) and tested for binding on human breast carcinoma cell line MCF-7(hICAM-1^{low}) and its drug resistant MCF-7/ADR (hICAM-1^{high}) derivative. We found that the HIC peptide demonstrated specific temperature and time dependent high binding with MCF-7/ADR cells, and low binding with MCF-7. A control peptide containing the scrambled SPHIR sequence did not show significant interaction with either cell line, suggesting that HIC binding was specific for ICAM-1. Furthermore, a fusion protein containing the HIC sequence fused to β -galactosidase was found to be capable of inhibiting the activation of lymphocytes during in vitro alloantigen recognition. Taken together, these results demonstrate the potential of this peptide for the targeting of drugs to ICAM-1 at inflammation and cancer sites.

Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) is a transmembrane glycoprotein, which belongs to the immunoglobulin (Ig) supergene family. It contains five extracellular Ig-like domains. A pentapeptide motif within domains 1 and 3 has been shown to be critical in binding to β_2 integrin heterodimers LFA-1 and MAC-1 respectively (Staunton et al., 1990, Sadhu et al., 1994). Overexpression of ICAM-1 in inflammation facilitates binding of the molecule to these two ligands causing firm adhesion of leukocytes to the vascular wall, preceding transmigration to adjacent tissue. While this sequence of events is essential in the normal immune response, its malfunction is at the basis of various inflammatory diseases. This is the case, for instance, in rheumatoid arthritis, where chronic inflammation and destruction of the joints is caused by ICAM-1-mediated infiltration of monocyte/macrophage cells, into joints (Burmester et al., 1997). Moreover, various infectious agents, such as rhinovirus, coxsackievirus, HIV and *Plasmodium falciparum* have also harnessed the adhesion properties of ICAM-1 for their propagation. In addition, enhanced expression of this molecule on the surface of malignant cells and endothelial cells suggests that ICAM-1 expression influences tumour progression and metastasis development (Johnson et al., 1989; Tempia-Caliera et al., 2002; Aoudjit et al., 1998), most likely through their ability to induce the expression of metastatic genes (Aoudjit et al., 1998b). As is the case of other vascular molecules, where over-expression has been linked to pathology, a number of investigations were aimed at inhibiting the function or expression of ICAM-1.

Strategies for overriding expression include the use of triplex forming oligonucleotide, or antisense molecules (Katz et al., 2000; Nedbal et al., 2002; Bonn, 1998, Besch et al., 2002). Abrogation of ICAM-1 function has been mostly accomplished with blocking monoclonal antibodies (Issekutz et al., 1999; Murciano et al., 2003). Alternatively, small peptides derived from LFA-1 or ICAM-1 sequence have been considered (Shannon et al., 2001; Yusuf-Makagiansar et al., 2001; Anderson and Siahaan, 2003). All these approaches aim to inhibit ICAM-1 binding to its ligand whatever its nature thereby impeding tissue damage observed in

graft rejection, inflammation such as asthma and rheumatoid arthritis, as well as tumor growth observed in certain cancers.

Use of small peptide molecules as targeting agents offer certain advantages compared to a whole protein or antibodies. Peptides are usually less immunogenic and their manipulation and storage is also easier. Most importantly, their small size could facilitate diffusion through targeted lesion (Jaafari et Foldvari, 2002). Peptide libraries displayed by phages offer a convenient technology for rapidly detecting short amino acid sequences binding to a presented ligand. Using this approach, we report here the identification of a novel peptide specific to human ICAM-1 (hICAM-1). Sequence specific binding of the synthetic peptide to ICAM-1 was confirmed using synthesized labeled peptide in a cell based assay with MCF-7 and MCF-7/ADR cells expressing low and high levels of hICAM-1 respectively. Mixed lymphocyte reaction (MLR) showed that a fusion protein, containing the HIC peptide fused to β -galactosidase but not to the purified peptide or to the β -galactosidase containing the scrambled sequence, inhibited ICAM-1 dependent recognition of alloantigens. These results establish the potential of HIC as a new therapeutic carrier.

Materials and Methods

Construction of the library. A random peptide library was constructed essentially as previously described, using fUSE5 as the phage vector (Popkov et al., 1998). This linear library consisted of 10^{10} independent recombinant phages recovered as tetracycline-resistant colonies. The majority of these phages (>90%) contained an insert, as shown by sequencing of randomly selected clones.

Cell lines. MCF-7 and their multi-drug resistant derivative MCF-7/ADR cell lines were kindly provided by Dr. Y. L. Lee (William Beaumont Hospital, Royal Oak, MI) and maintained in DMEM (Life Technologies, Burlington, ON) supplemented with 10% (v/v) heat-inactivated FCS and HEPES (Life technologies). For MCF-7/ADR, doxorubicin (Hande Tech USA, Houston, TX) was added to a final concentration of 1 μ g/ml. Cells were used when at 80% confluency.

Reagents and monoclonal antibodies. The recombinant human ICAM-1 (hICAM-1) and hICAM-1 extra-cellular domains fused to human IgG1Fc (hICAM-1/Fc) were purchased from R&D Systems (Minneapolis, MN). The biotinylated anti-human IgG Fc fragment monoclonal antibody was purchased from ICN (Irvine, CA). Murine anti-hICAM-1 monoclonal antibody (clone HA58), was purchased from BD Pharmingen (Mississauga, ON). Streptavidin-phycoerythrin (SA-PE) was purchased from Immunotech, (Westbrook, ME).

Phage library panning on hICAM-1. The procedure was carried out as previously described by Welpy and collaborators (1996). Briefly, hICAM-1 was immobilized at the bottom of 12-well plates following an overnight incubation at 4°C in 500 μ l of TS buffer (150mM NaCl/ 25mM Tris pH 8/ 2mM MgCl₂) containing recombinant hICAM-1 (32 μ g/ml). Non-specific binding sites were blocked by incubating for 8h at 4°C a solution of TS/2% milk. The wells were then washed three times with TBST (150mM NaCl/ 50mM Tris pH 7.5/ 0.05% Tween 20). Phages (10^{11}) were incubated 30 min at room temperature with rotation in 500 μ l TBST/2%BSA and then added to wells containing

immobilized hICAM-1. Following overnight incubation at 4°C, each well was washed 15 times with 3 ml of TBST and then rinsed 5 times with the same volume of TS buffer. In the first round, phages were recovered by acid elution with a buffer containing 0.1M glycine, 0.1%BSA pH 2.2. After a 10 min incubation, the eluate was immediately transferred into a microfuge tube containing 1M Tris. A sample was taken for titration and phages were amplified for the next round of panning. In the second round, 10¹⁰ phages were pre-blocked and incubated as previously described and were eluted with either 0.2 µg/ml of anti-hICAM-1 antibody in TS buffer/0.1% BSA for 2 h at room temperature, or by acid elution as described above. In subsequent rounds, phages eluted in the second round with antibodies were eluted again with antibody, while those that were recovered by acid elution were eluted with glycine. After the fourth and final round of panning, individual phages were amplified and sequenced.

Flow cytometric analysis. Cells were washed twice with ice-cold PBS containing 1% (v/v) BSA (PBA). To determine expression of ICAM-1 on MCF-7 and MCF-7/ADR, cells were incubated for 20 min on ice with ICAM-1-specific mAb. After two washes in PBA, the cells were incubated 20 min on ice with biotinylated anti-mouse IgG mAb. Cells were washed twice in PBA again before incubation with a saturating concentration of SA-PE for 30 min on ice, washed twice with PBA and re-suspended in 400 µl of PBS. To determine peptide binding, both cell lines were incubated with biotinylated peptides for indicated times, washed twice with PBA before incubation with SA-PE using the above conditions. Samples were kept at 4°C in the dark and analyzed using a Coulter XL-MCL (Coulter Electronics, Hialeah, FL). Between 5,000 and 10,000 cellular events were analyzed for each sample. Controls included cells without antibodies or conjugates with SA-PE, as well as cells incubated with SA-PE alone.

Peptide synthesis. Peptides were synthesized by Supratek Pharma Inc. using standard fluorenylmethoxycarbonyl (fmoc) chemistry. In some assays biotin or fluorescein was conjugated to

the N-terminus. The mass and purity of the peptides were confirmed by mass spectroscopy and high performance liquid chromatography (HPLC).

Construction, Expression and Purification of β -Galactosidase Fusion Proteins. A recombinant protein consisting of the hICAM-1-specific peptide inserted at the N-terminal end of the β -galactosidase and fused to an His tag sequence was generated (HIC/bgal) using the following oligonucleotides: 5'pAA TTC AAA TTA ACT ATG CAG AAG CGC CAC CGT CAT CCT CCA CGA ACA GAC ACC CGA TCC CCA CAT GAG CCC **GGA GGA GGA** G3' (sense) and 5'pGA TCC TCC TCC TCC GGG CTC ATG TGG GGA TCG GGT GTC TGT TCG TGG AGG ATG ACG GTG GCG CTT CTG CAT AGT TAA TTT G3' (anti-sense) (**Fig 2a**). The underlined nucleotide sequence encodes the 4.1 peptide sequence and bold letters a three amino acid linker. These were inserted into a modified pQE16 vector (QIAGEN, Mississauga, ON) that included a 6xHis tagged- β -galactosidase gene, and from which the DHFR encoding sequence had been removed. A fusion protein containing a peptide consisting of a scrambled amino acid sequence obtained from the human ICAM-1-specific peptide (Scrambled/bgal) was used as a control fusion protein and generated using the following oligonucleotides: 5'-pAA TTC AAA TTA ACT ATG CCC CGC AAG CCA TCC CGT GAG CCT CAT ACA CGA CAC GAC CGA CAT ACC CCA CAG **GGA GGA GGA** G-3' (sense), and 5'-pGA TCC TCC TCC TCC CTG TGG GGT ATG TCG GTC GTG TCG TGT ATG AGG CTC ACG GGA TGG CTT GCG GGG CAT AGT TAA TTT G-3' (anti-sense). DNA sequencing was carried out to ensure integrity of the constructs. *Escherichia coli* strain M15 bearing the plasmid encoding HIC/bgal or Scrambled/bgal fusion protein was grown in LB medium supplemented with 100 μ g/ml Ampicillin and 25 μ g/ml Kanamycin and induced with 1 mM isopropyl-1-thio-beta -D-galactopyranoside. The chimeric fusion protein was purified by affinity chromatography on a Ni-nitrilo-triacetic acid resin (Qiagen) according to the manufacturer's instructions. The concentration of the fusion proteins was determined using DC Protein Assay (Bio-Rad, Mississauga, ON) and purity confirmed by SDS-Page gel electrophoresis with Coomassie blue staining. β -galactosidase enzymatic activity was measured using the Luminescent β -galactosidase Reporter System 3 according to instructions supplied by the

manufacturer (Clontech, Mississauga, ON), using a Lumat LB9507 Luminometer (Berthold Technologies, Oak Ridge, TN).

Mixed Lymphocyte Reaction (MLR). Lymphocytes from healthy donors were isolated on a Ficoll-Paque gradient according to instructions supplied by the manufacturer. Lymphocytes from one donor were irradiated (2000 Rads) and resuspended in complete RPMI containing 10% (v/v) heat-inactivated FCS, HEPES and antibiotics. Irradiated cells (4×10^5) were incubated with antibody, peptide or fusion protein for 20 minutes in 96-well plates at 37°C and the same number of lymphocytes from a second donor was added. The MLR culture were incubated for 5 days and pulsed by adding 1 μ Ci of [3 H]-thymidine per well for 24h. Proliferation of responding lymphocytes was measured by thymidine incorporation using a cell harvester.

Results

Identification of human ICAM-1 specific sequence

Screening of phage library on soluble human ICAM-1 was carried out for a total of 4 rounds. In the first two rounds of both selections, phages bound to immobilized ICAM-1 were retrieved by acid elution. The eluate was then split into two parts. Both parts were again incubated with immobilized ICAM-1, one part was then eluted using acidic buffer, while the other part was eluted by using anti-human ICAM-1 monoclonal antibody HA58. This antibody binds to or near the functional epitope of ICAM-1, as shown by its ability to inhibit MLR reaction, as well as adherence of leukocyte to endothelial cell line (Bochner et al., 1991). Our results showed that all the isolated clones contained a single sequence motif, KRX³X⁴HisX⁶X⁷X⁸X⁹X¹⁰X¹¹/R, regardless of elution method used (Table I). However, while all the clones isolated from the acid elution fraction had a different amino acid sequence, most of the clones obtained by the antibody displacement harboured an identical sequence. Of the 15 clones isolated, 12 (sequences HIC1ab4.1, HIC1ab4.12, HIC1Ac4.4 and HIC1Ac4.20) contained two RXXH sites. Since the 18 amino acid sequence present in the phage clone HIC1ab4.1 –QKRHRHPPRTDTRSPHEP- had the highest frequency of distribution and was the only one selected by both methods of elution, we pursued our study with this sequence.

Both HICab4.1 (HIC) and the scrambled peptide were synthesized and labelled with fluorescein. Specificity of peptide binding to hICAM-1 was confirmed by measuring fluorescence from bound peptide to hICAM-1 (Figure 1). A synthetic scrambled sequence (-PRKPSREPHTRHDRHTPQ-) was used as a negative control.

Binding of HIC peptide to MCF7 and MCF7ADR cell sub lines

The breast cancer epithelial MCF-7 cells and their MCF-7/ADR derivatives expressing low or high levels of hICAM-1 (Fig. 2) were used to test the specific binding of the HIC peptide. Our results showed that the HIC peptide, but not the scrambled control, was capable of binding to MCF-7/ADR and, to a lesser extent, MCF-7 cells (Fig. 3A). The kinetic studies demonstrated that

the binding of the HIC peptide with MCF-7/ADR cells at 4°C reached a plateau after approximately 15 min (Fig. 3B). Furthermore, the interaction of the ICAM-1 specific peptide with both cell sublines was found to be temperature dependent (Fig.3C). Taken together, these results show differential and sequence specific binding of HIC peptide to ICAM-1^{low} and ICAM-1^{high} expressing cell lines.

A chimeric protein containing the HIC sequence inhibits MLR

To determine the capacity of peptide HIC to inhibit the accessory function of ICAM-1 during antigen presentation, we carried out an *in vitro* MLR test by using human allogeneic responder cells co-cultured with irradiated antigen presenting cells. Although we found a complete inhibition of MLR response using ICAM-1 specific antibody, no significant inhibition was observed with the purified HIC peptide, even at concentrations as high as 0.5mM (Figure 4A). Since enhanced affinity and improved pharmacokinetics have been reported upon conjugation of peptides to a larger molecule (Walsh et al., 2003), we generated a fusion protein containing HIC peptide sequence at the N-terminal end of the β -galactosidase. A three amino acid linker (Gly-Gly-Gly) was inserted between the peptide and the β -galactosidase protein to avoid steric hindrance between the two entities. The purity of the resulting chimeric protein was evaluated by SDS-PAGE stained with Coomassie Blue and was found to be higher than 90% (data not shown). The chimeric protein still retained its enzymatic activity (1.33×10^6 RLUs⁻¹/ng of recombinant β -galactosidase compared to 1.47×10^6 RLUs⁻¹/ng of HIC/bgal). Our results showed that this chimeric construct significantly inhibited T cell proliferation in MLR (Figure 4B). No such inhibition was observed with the control chimeric protein containing the scrambled peptide sequence conjugated to β -galactosidase.

Discussion

In the present work, we have identified a novel peptide sequence specific for hICAM-1. This sequence and its binding motif were isolated both by acid elution and through elution with a blocking anti-hICAM-1 mAb. Insertion of this amino acid sequence into a chimeric protein inhibited the accessory function of ICAM-1 in the context of antigen presentation without affecting the enzymatic activity of the enzyme.

The ICAM-1/LFA-1 interaction is critical in inflammatory diseases and in certain types of cancers (Shimoyama et al., 1997). Moreover, ICAM-1 is upregulated in allograft cells and is implicated in the rejection process (Kamoun, 2001). Considering the role of ICAM-1 in the etiology of various pathologies, therapies aiming to inhibit ICAM-1/LFA-1 binding may offer a solution to improving their outcome. Other peptides binding to adhesion molecules such as Mac-1, LFA-1 and ICAM-1 have been previously reported (Feng et al., 1998; Welply et al., 1996; Yusuf-Makagiansar et al., 2001; Shannon et al., 2001). Those directed against ICAM-1 have been identified using LFA-1 counter-receptor amino acid sequences and phage display. However neither sequence have the motif reported here even though we used a method previously described by Welply and collaborators (1996), suggesting that the type of library probably dictates the specificity obtained.

The ability of HIC to bind more strongly to MCF-7/ADR cells suggests that it may be effective as a therapeutic and/or diagnostic tool for the pathologies that are characteristic of ICAM-1 up-regulation. Over-expressed ICAM-1 in diseases such as hepatocellular cancer may serve as a biomolecular marker. Since ICAM-1 is not up-regulated in all cancers, identification of adhesion molecule in lesions could help develop specific therapies. Furthermore, ICAM-1 is not only expressed in cancer cells but also in activated endothelial cells of nearby blood vessels. Because tumor cells are prone to mutate in response to therapy (Hicklin et al 1999), some anti-tumor strategies have targeted tumor microenvironment (Niethammer et al., 2002). This may suggest that anti-cancer treatment targeting molecules on blood vessel, such as ICAM-1, may not only reduce toxicity of conjugated drug but also yield less drug-resistant tumors (Augustin 1998).

Although our results in MLR have shown that the HIC in the form of a free peptide is not effective in inhibiting ICAM-1 mediated intercellular adhesion, incorporation of the HIC sequence into a larger carrier molecule indicated that this sequence harbours significant inhibitory activity. Taken together our results show the potential of the HIC sequence for inhibiting ICAM-1 function. Since fusion of HIC sequence did not abolish β -galactosidase activity, conjugation to an anti-inflammatory or anti-cancer drug could increase drug performance without affecting its intrinsic properties.

REFERENCES

Anderson ME and Siahaan TJ (2003) Mechanism of binding and internalization of ICAM-1-derived cyclic peptides by LFA-1 on the surface of T cells: a potential method for targeted drug delivery. *Pharm Res* **20**:1523-1532.

Aoudjit F, Potworowski EF, Springer TA and St-Pierre Y (1998) Protection from lymphoma cell metastasis in ICAM-1 mutant mice: a posthoming event. *J Immunol* **161**:2333-2338.

Aoudjit F, Potworowski EF and St-Pierre Y (1998) Bi-directional induction of matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 during T lymphoma/endothelial cell contact: implication of ICAM-1. *J Immunol* **160**:2967-1973.

Augustin HG (1998) Antiangiogenic tumour therapy: will it work? *Trends Pharmacol Sci* **19**:216-222.

Besch R, Giovannangeli C, Kammerbauer C and Degitz K (2002) Specific inhibition of ICAM-1 expression mediated by gene targeting with Triplex-forming oligonucleotides. *J Biol Chem* **277**:32473-32479

Bochner BS, Luscinskas FW, Gimbrone MA Jr, Newman W, Sterbinsky SA, Derse-Anthony CP, Klunk D and Schleimer RP (1991) Adhesion of human basophils, eosinophils, and neutrophils to interleukin 1-activated human vascular endothelial cells: contributions of endothelial cell adhesion molecules. *J Exp Med*. **173**:1553-1557.

Bonn D (1998) Tackling the real culprits in Crohn's disease. *Lancet* **351**:1710.

Burmester GR, Stuhlmuller B, Keyszer G and Kinne RW (1997) Mononuclear phagocytes and rheumatoid synovitis. Mastermind or workhorse in arthritis? *Arthritis Rheum* **40**:5-18.

Feng Y, Chung D, Garrard L, McEnroe G, Lim D, Scardina J, McFadden K, Guzzetta A, Lam A, Abraham J, Liu D and Endemann G (1998) Peptides derived from the complementarity-determining regions of anti-Mac-1 antibodies block intercellular adhesion molecule-1 interaction with Mac-1. *J Biol Chem*. **273**:5625-5630.

Hicklin DJ, Marincola FM and Ferrone S (1999) HLA class I antigen downregulation in human cancers: T-cell immunotherapy revives an old story. *Mol Med Today* **5**:178-186.

Issekutz AC, Rowter D and Springer TA (1999) Role of ICAM-1 and ICAM-2 and alternate CD11/CD18 ligands in neutrophil transendothelial migration. *J Leukoc Biol* **65**:117-126.

Jaafari MR and Foldvari M (2002) Targeting of liposomes to melanoma cells with high levels of ICAM-1 expression through adhesive peptides from immunoglobulin domains. *J Pharm Sci* **91**:396-404.

Johnson JP, Stade BG, Holzmann B, Schwable W and Riethmuller G (1989) De novo expression of intercellular-adhesion molecule 1 in melanoma correlates with increased risk of metastasis. *Proc Natl Acad Sci USA* **86**: 641-644.

Kamoun M (2001) Cellular and molecular parameters in human renal allograft rejection. *Clin Biochem* **34**:29-34.

Katz SM, Bennett F, Stecker K, Clark JH, Pham T, Wang ME, Kahan BD and Stepkowski SM (2000) ICAM-1 antisense oligodeoxynucleotide improves islet allograft survival and function. *Cell Transplant* **9**:817-828

Murciano JC, Muro S, Koniaris L, Christofidou-Solomidou M, Harshaw DW, Albelda SM, Granger DN, Cines DB and Muzykantov VR (2003) ICAM-directed vascular immunotargeting of antithrombotic agents to the endothelial luminal surface. *Blood* **101**:3977-3984.

Nedbal W, Tomakidi P, Lehmann MJ, Dorfer C, Kohl A and Sczakiel G (2002) Antisense-mediated inhibition of ICAM-1 expression: a therapeutic strategy against inflammation of human periodontal tissue. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev* **12**:71-78

Niethammer AG, Xiang R, Becker JC, Wodrich H, Pertl U, Karsten G, Eliceiri BP and Reisfeld RA. (2002) A DNA vaccine against VEGF receptor 2 prevents effective angiogenesis and inhibits tumor growth. *Nat Med.* **8**:1369-1375.

Popkov M, Lussier I, Medvedkine V, Esteve PO, Alakhov V and Mandeville R (1998) Multidrug- resistance drug-binding peptides generated by using a phage display library. *Eur J Biochem* **251**:155-163.

Tempia-Caliera AA, Horvath LZ, Zimmermann A, Tihanyi TT, Korc M, Friess H and Büchler M: Adhesion molecules in human pancreatic cancer (2002) *Journal of Surgical Oncology* **79**: 93-100.

Sadhu C, Lipsky B, Erickson HP, Hayfick J, Dick KO, Gallatin WM and Staunton DE (1994) LFA-1 binding site in ICAM-3 contains a conserved motif and non-contiguous amino acids. *Cell adhes Commun* **2**:429-440.

Shannon JP, Silva MV, Brown DC and Larson RS (2001) Novel cyclic peptide inhibits intercellular adhesion molecule-1-mediated cell aggregation. *J Pept Res* **58**:140-150.

Shimoyama S, Gansauge F, Gansauge S, Widmaier U, Oohara T and Beger HG (1997) Overexpression of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) in pancreatic adenocarcinoma in comparison with normal pancreas. *Pancreas* **14**:181-186.

Staunton DE, Dustin ML, Erickson HP and Springer TA (1990) The arrangement of immunoglobulin like domains of ICAM-1 and the binding sites for LFA-1 and rhinovirus. *Cell* **61**:243-254.

Walsh S, Shah A and Mond J (2003) Improved pharmacokinetics and reduced antibody reactivity of lysostaphin conjugated to polyethylene glycol. *Antimicrob Agents Chemother* **47**:554-558.

Welply JK, Steininger CN, Caparon M, Michener ML, Howard SC, Pegg LE, Meyer DM, De Ciechi PA, Devine CS and Casperson GF (1996) A peptide isolated by phage display binds to ICAM-1 and inhibits binding to LFA-1. *Proteins* **26**:262-270.

Yusuf-Makagiansar H and Siahaan TJ (2001) Binding and internalization of an LFA-1-derived cyclic peptide by ICAM receptors on activated lymphocyte: a potential ligand for drug targeting to ICAM-1-expressing cells. *Pharm Res* **18**:329-335.

Yusuf-Makagiansar H, Makagiansar IT, Hu Y and Siahaan TJ (2001) Synergistic inhibitory activity of alpha- and beta-LFA-1 peptides on LFA-1/ICAM-1 interaction. *Peptides*. **22**:1955-1562.

Table 1: Frequency distribution of amino acid sequences identified after panning on soluble hICAM-1.

| Name | Sequence | Frequency* | | |
|------------|---|------------|----|----------|
| | | Ab | Ac | Σ |
| HIC1ab4.1 | Gln- <u>Lys-Arg</u> -His-Arg- <u>His</u> -Pro-Pro-Arg-Thr-Asp-Thr- <u>Arg</u> -Ser-Pro- <u>His</u> -Glu-Pro | 8 | 1 | 9 |
| HIC1ab4.12 | <u>Lys-Arg</u> -Val-Trp- <u>His</u> -Ser-Ser-Pro-Leu-Ser- <u>Arg</u> -His-His- <u>His</u> -Val-Ala-Val | 1 | 0 | 1 |
| HIC1Ac4.17 | Gln- <u>Lys-Arg</u> -His-Arg- <u>His</u> -Pro-Ser-Arg-Thr-Tyr-Thr- <u>Arg</u> -Ser-Pro-Leu-Glu-Pro | 0 | 1 | 1 |
| HIC1Ac4.4 | Ala-Gly-Ser-Gly- <u>Lys-Arg</u> -Val-Trp- <u>His</u> -Ser-Ser-Pro-Leu-Ser- <u>Arg</u> -His-His- <u>His</u> -Val-Ala-Val | 0 | 1 | 1 |
| HIC1Ac4.20 | Ala-Asp-Ser-Gly- <u>Lys-Arg</u> -Val-Trp- <u>His</u> -Ser-Ser-Pro-Leu-Ser- <u>Arg</u> -His-His- <u>His</u> -Val-Ala-Val | 0 | 1 | 1 |
| HIC1Ac4.13 | Ala-Asp-Ser-Gly- <u>Lys-Arg</u> -Val-Trp- <u>His</u> -Ser-Ser-Pro-Leu-Tyr- <u>Arg</u> -His-Ser-Gln-Val-Ala-Val | 0 | 1 | 1 |
| HIC1Ac4.7 | Ala-Asp-Ser-Gly- <u>Lys-Arg</u> -Val-Trp- <u>His</u> -Ser-Ser-Arg-Thr-Tyr- <u>Arg</u> -His-Ser-Gln-Val-Ala-Pro | 0 | 1 | 1 |

Frequency categorised by elution method at last round, ab: antibody elution, Ac: acid elution, Σ is total number of isolated clones. Sequence motif is illustrated by amino acids in underlined bold letters.

Figure legends:

Figure 1: Specificity of HIC peptide. Binding of HIC peptide is specific to immobilized human.

Figure 2: HICAM-1 expression on MCF-7 and MCF-7/ADR cell lines. Breast carcinoma cell line express lower level of hICAM-1 than doxorubicine resistant MCF-7/ADR cell line.

Figure 3: Binding of ICAM-1 specific peptide (HIC) and Scrambled peptide to MCF-7 and MCF-7/ADR cell lines. A: Binding of HIC peptide at 4°C to MCF-7/ADR ICAM-1^{high} is greater than to MCF-7/ICAM-1^{low} cell line and is concentration dependent. B: Kinetic of binding at 4°C. C: Binding of HIC peptide is temperature dependant. Scrambled peptide showed no binding to either cell line.

Figure 4: HIC fusion protein inhibits MLR reaction. A: HIC peptide did not affect MLR reaction. B: HIC peptide presented as a fusion protein inhibited T cell proliferation in a concentration dependant manner.

Figure 1

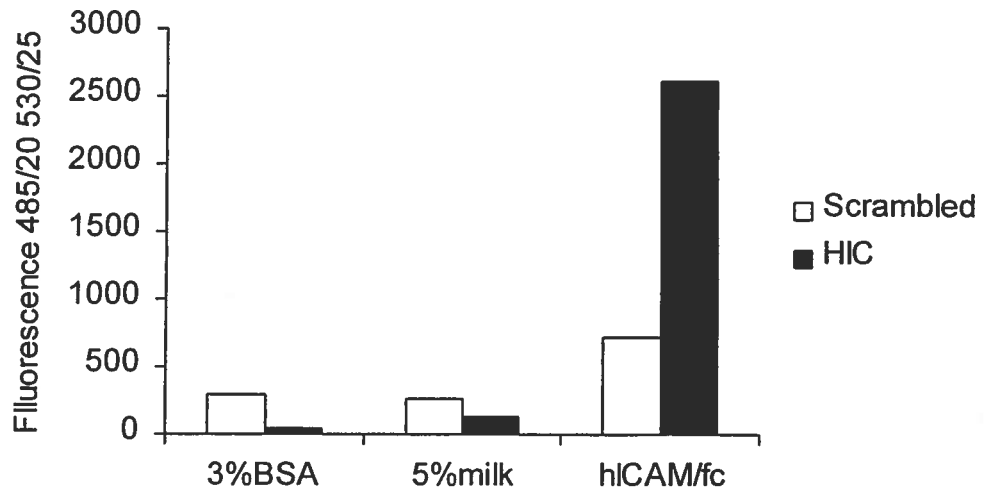


Figure 2

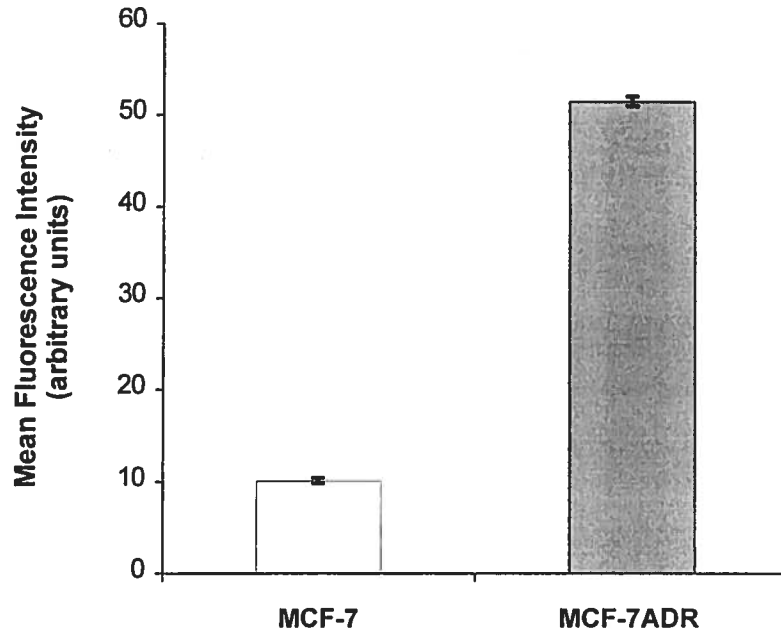


Figure 3A

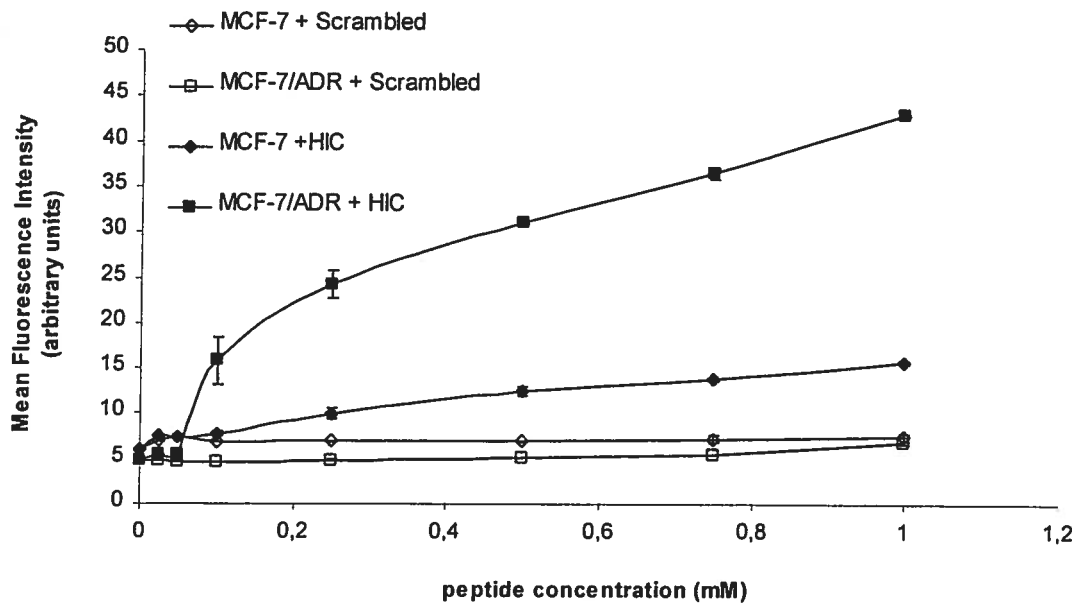


Figure 3B

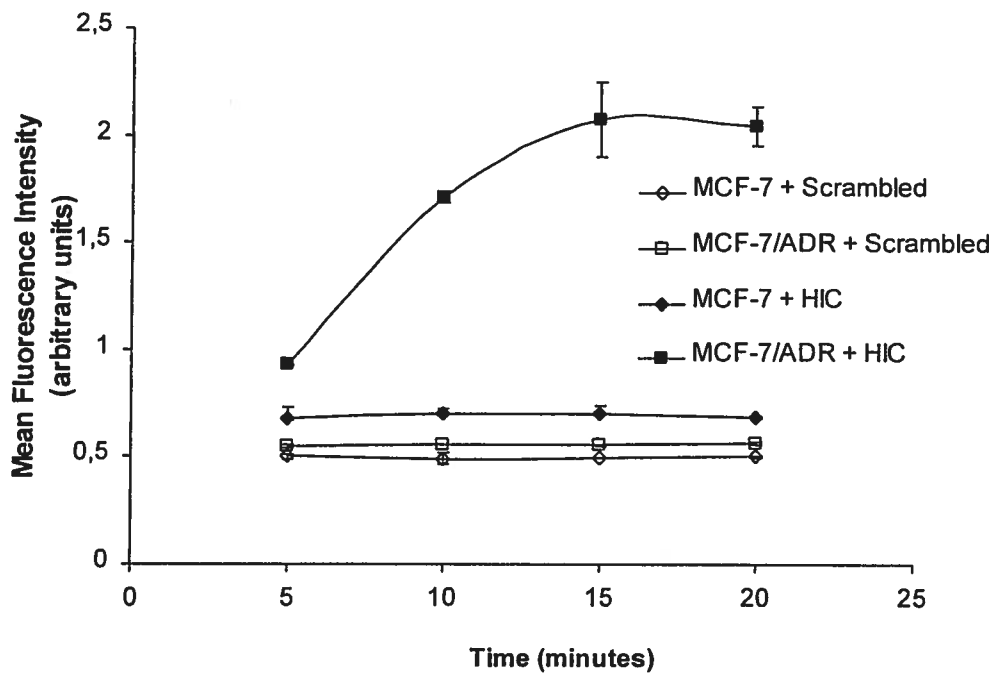


Figure 3C

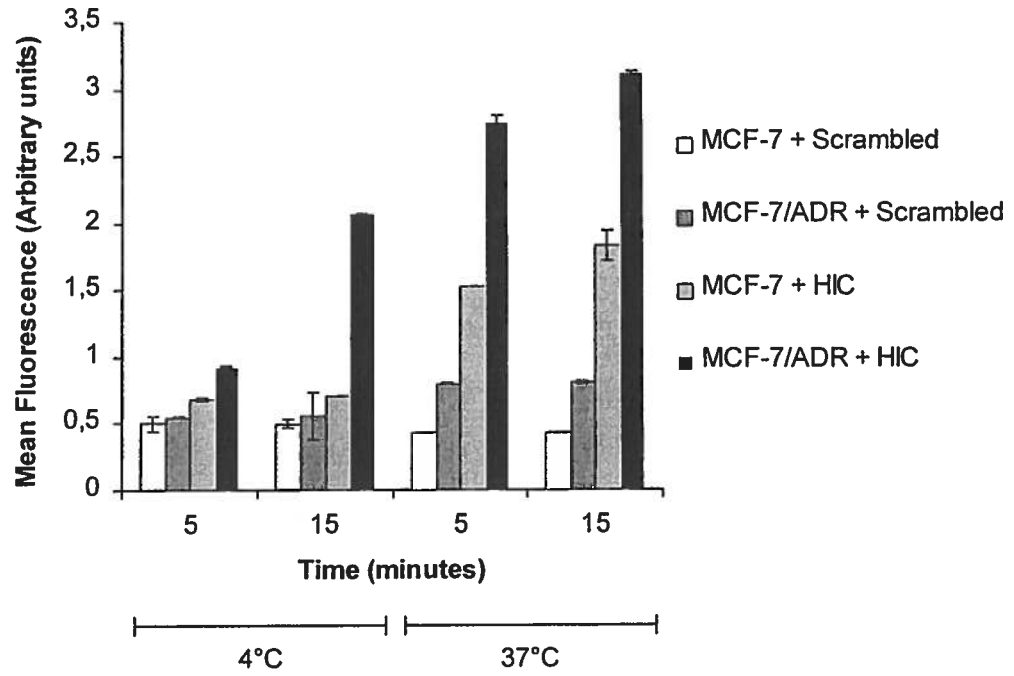


Figure 4A

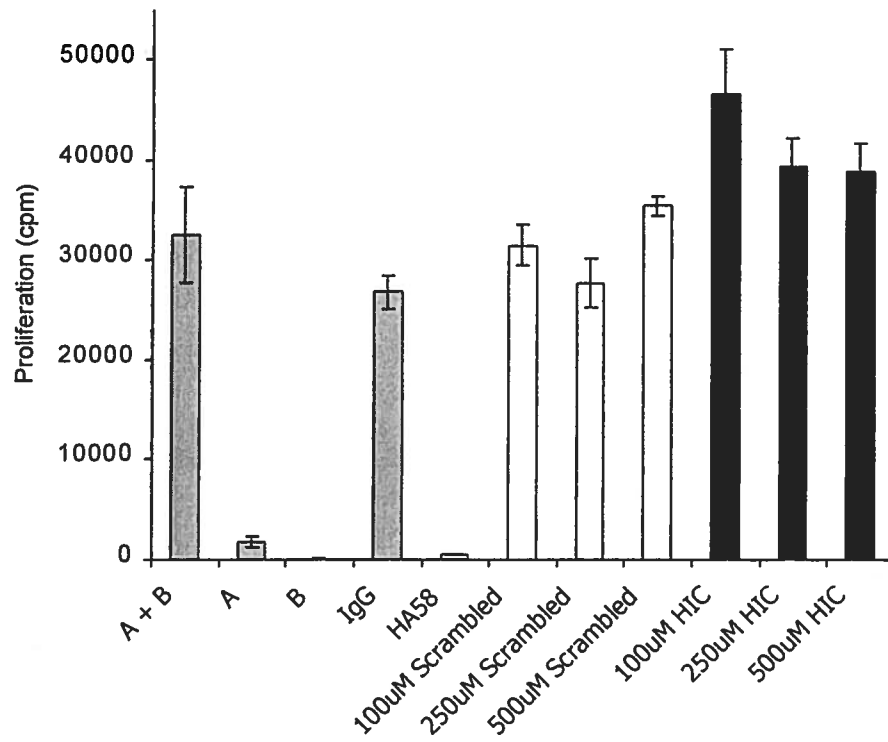
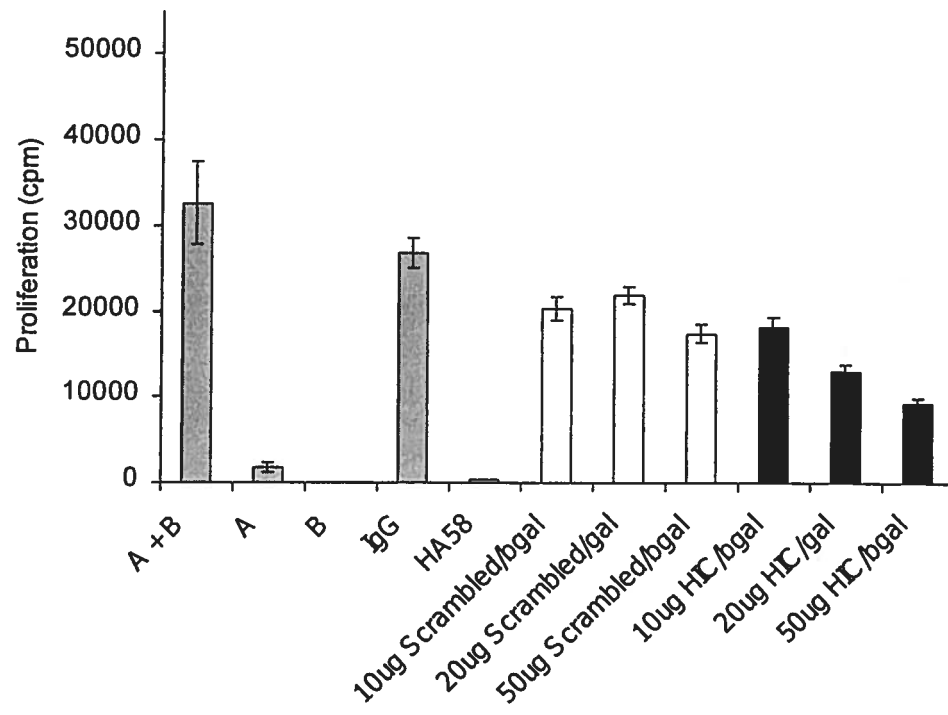


Figure 4B



Discussion générale

Un des problèmes fréquemment rencontrés lors du développement d'une nouvelle thérapie est la toxicité du médicament suite à son administration systémique. Les effets secondaires occasionnés sont souvent causés par leur accumulation dans des tissus sains, notamment dans le foie et les reins. L'identification d'adresses moléculaires induites en fonction du statut pathologique a ouvert la porte au développement de stratégies thérapeutiques mieux adaptées en fonction de la maladie ciblée. L'augmentation de l'expression de molécules d'adhésion à la surface cellulaire dans certains cancers, dans le rejet de greffe, et lors de diverses maladies inflammatoires en font des cibles de choix comme adressine. Dans le but d'exploiter cette caractéristique dans un contexte diagnostique ou thérapeutique, nous avons identifié et caractérisé des ligands peptidiques spécifiques à ICAM-1, une molécule d'adhésion impliquée dans diverses interactions cellulaires, notamment lors du recrutement des leucocytes aux sites inflammatoires et lors de la présentation des antigènes peptidiques aux lymphocytes T par les cellules présentatrices d'antigènes. Nous avons de plus déterminé leur potentiel comme molécule de ciblage en évaluant leur spécificité *in vitro* et en mesurant leur potentiel à inhiber les interactions cellulaires impliquant leur ligand naturel, notamment lorsque ces ligands peptidiques étaient intégrés dans des protéines de haute masse moléculaire. Finalement, nous avons également démontré que la technologie du «phage display» est une méthode pouvant significativement simplifier l'identification de nouveaux ligands. Durant ce projet de doctorat nous avons d'abord identifié pour la première fois, un peptide liant ICAM-1 murin et en second lieu, un peptide liant ICAM-1 humain. L'utilisation de ces séquences peptidiques sera déterminante dans l'élaboration de modèles murins visant à déterminer de nouvelles approches thérapeutiques ciblant ICAM-1 tout en permettant de développer parallèlement des outils diagnostiques chez l'humain.

Criblage

Deux stratégies de criblage basées sur l'utilisation de banque de phages ont été évaluées dans ce projet. Pour l'identification du peptide spécifique à ICAM-1 murin, nous avons utilisé une stratégie basée sur l'utilisation de cellules transfectées avec le gène codant pour ICAM-1 murin comme cible de criblage (Annexe 1). Dans le cas du peptide spécifique à ICAM-1 humain, nous avons criblé la banque de phages en utilisant une forme purifiée de la molécule ICAM-1 humaine immobilisée sur un support solide (Annexe 2). De prime abord, la première stratégie semblait plus représentative du contexte rencontré *in vivo*, tenant compte de la complexité de la molécule au niveau structurale. Par exemple, au niveau des modifications post-transcriptionnelles i.e. la glycosylation puisque celle-ci diffère entre différentes cellules eucaryotes (Bloom, Madanat et Ray, 1996). Dans bon nombre de cas, le criblage à partir de protéines purifiées s'effectue à partir de protéines recombinantes purifiées à partir de systèmes d'expressions procaryotes. De plus, l'utilisation de système cellulaire permet aux molécules d'adhésion d'adopter une conformation optimale, un facteur important à considérer dans plusieurs cas, entre autres dans celui d'ICAM-1, puisque la structure d'ICAM-1 forme un coude à 11nm de son extrémité N-terminale, entre D3 et D4 (Staunton et al., 1990). Cette approche a été utilisée pour la première fois lors de l'identification du récepteur de la mélanocortine exprimé à la surface de cellules d'insectes (Szardenings *et al.*, 1997). Afin d'optimiser ce système, nous avons ajouté une étape de soustraction au protocole qui s'est avérée utile lorsque la cible n'est pas une protéine recombinante purifiée (Cai et Garen, 1995). Cette présentation, que nous qualifierons d'hétérogène, jumelée à l'éluion spécifique, a permis d'augmenter la pression de sélection des clones spécifiques à ICAM-1 murin.

Pour l'identification du peptide spécifique à ICAM-1-humain, nous avons modifié une méthode décrite par Welply *et al.* (1996). L'immobilisation du récepteur sur support solide est la technique la plus souvent utilisée dans la littérature. Puisqu'il s'agissait cette fois d'un système homogène, nous n'avons pas eu recours à une étape de soustraction de phage, mais plutôt opté pour des modifications au niveau des conditions de blocage et de l'éluion. Ainsi, le profil

d'enrichissement (Annexe 3) a été diminué lors du 3^{ème} tour quand le tampon de blocage d'albumine a été substitué par du lait. Cette diminution peut signifier l'élimination de phages ayant une affinité croisée pour l'albumine utilisée pour les deux premiers tours ou une plus grande capacité bloquante du tampon à base de lait, favorisant l'élimination de clones de plus faible affinité pour ICAM-1. En résumé, les deux approches nous ont permis d'identifier avec succès deux ligands peptidiques spécifiques à la molécule d'adhésion cellulaire ICAM-1. La spécificité des épitopes, l'importance des changements post-traductionnels au niveau des épitopes cibles, de même que l'importance de la conformation dans la présentation des épitopes sont donc des facteurs à considérer dans le choix de la stratégie à adopter.

Synthèse de peptide

Malgré plusieurs essais par les compagnies Supratek Pharma Inc (Montréal, Québec) et SynPep (Dublin, Californie), la synthèse complète du peptide 4.1 spécifique à ICAM-1 murin n'a pas été possible. Le rapport de travaux effectués par Synpep, comprenant les résultats d'HPLC est présenté à l'Annexe 4, puisque chaque pic représente un peptide ayant un temps de rétention différent, les résultats indiquent que le rendement des multiples réactions d'élongation du peptide est faible. Si chacune des réactions d'élongation a un rendement très élevé et se déroule sans problème, on devrait s'attendre à une pureté supérieure à 90% une fois la synthèse terminée. Ainsi, si le rendement de chaque réaction d'élongation se situe à 99% (0,99), d'après l'équation suivante :

$$R = r^n \quad \text{où}$$

R = Rendement final,

r = Rendement d'une réaction d'élongation,

n = Nombre d'acides aminés que contient la séquence,

le rendement final de la synthèse d'un peptide de 18 acides aminés se situe à 83,45%. Chaque réaction d'élongation est constituée d'une première étape de déprotection d'acide aminé et d'une seconde étape d'ajout de résidu d'acide aminé. Différentes raisons peuvent être à l'origine du

problème. Durant la synthèse, il est possible que des changements de conformation du peptide surviennent, modifiant ou rendant inaccessible le site de liaison du résidu suivant. Ceci crée de nouvelles séquences qui contiennent des délétions. Il est également possible que des réactions secondaires se produisent, telles la transamidation de résidus acides. Une réaction d'alkylation peut également avoir eu lieu durant la dernière étape de déprotection et de clivage de la résine. Selon la compagnie Synpep, les difficultés rencontrées sont donc probablement dues à la nature de la séquence peptidique. L'identification des acides aminés responsables et des modifications par substitutions sont des alternatives que nous avons considérées. Toutefois, cette stratégie comporte un certain élément de risque, notamment en ce qui a trait à la modification des propriétés intrinsèques du peptide. Nous avons plutôt opté pour la construction d'une protéine de fusion, où la séquence spécifique identifiée par criblage de la banque a été fusionnée à la protéine β -galactosidase et le tout en insérant un triplet de glycine (G G G) afin d'éviter l'encombrement stérique entre ces deux composantes.

Dans le cas des peptides SPHIC (temps de rétention = 16,4 minutes) spécifique à ICAM-1 humain et de sa séquence contrôle brouillée SPHIR (temps de rétention = 14,7 minutes), la synthèse a pu être réalisée. Les résultats d'HPLC analytiques des peptides biotinylés contenant la séquence SPHIC et contrôle sont présentés aux Annexes 5 et 6 respectivement. La comparaison du profil du peptide à celui du niveau de base, permet de détecter la présence d'un pic majeur distinctif. Les fractions correspondant au peptide furent ensuite regroupées, lyophilisées et analysées par impact électronique-spectrométrie de masse (Annexe 7 et 8), permettant de confirmer la masse des peptides synthétisés.

La liaison du peptide SPHIC a d'abord été testée par fluorescence sur la protéine de fusion ICAM-1/IgG puis confirmée avec deux lignées de cellules tumorales humaines. Les résultats ont été conformes à nos attentes puisqu'une liaison différentielle entre la lignée MCF-7, qui exprime moins d'ICAM-1 à sa surface, a été observée en comparaison avec la lignée résistante à la doxorubicine. Nous avons également observé que la liaison du peptide SPHIC variait en fonction de la concentration du peptide, de la température et du temps. De plus,

l'absence de signal au-delà de l'autofluorescence dans les tests de liaison de la séquence contrôle SPHIR démontre la spécificité de la séquence SPHIC pour ICAM-1 humain. La variation significative de la liaison du peptide SPHIC observée est importante tant pour des fins de diagnostique que pour des fins thérapeutiques. L'imagerie cellulaire à l'aide d'autres marqueurs moléculaires, tels la phosphatidylsérine, a déjà été rapportée (Ran et Thorpe, 2002). En fait les diverses adressines retrouvées à la surface de l'endothélium vasculaire des cellules tumorales et des tissus des différentes lésions peuvent potentiellement être utilisées comme marqueur diagnostique en plus de cible thérapeutique, si l'outil de ciblage utilisé peut distinguer entre les différents niveaux d'expression cellulaire (Joyce et al., 2003).

Caractérisation fonctionnelle

Les anticorps anti-ICAM-1 utilisés pour l'identification de peptides spécifiques à ICAM-1 ont été choisis pour leur capacité à lier spécifiquement ICAM-1 et surtout pour leur fonction inhibitrice des interactions intercellulaires via LFA-1. Pour vérifier si notre objectif de départ avait été atteint, nous avons d'abord effectué des tests fonctionnels avec les clones phagiques 4.1. À cette fin, deux modèles ont été utilisés : 1) un modèle de présentation d'antigène aux lymphocytes T *in vitro*, où l'alloréactivité des cellules T (C8A3) envers les cellules B (CH27) médiée par la reconnaissance du CMH de classe II I-A^k est reconnue comme étant dépendante de l'interaction cellulaire via ICAM-1 (St-Pierre et Watts, 1991); et 2) un modèle *in vivo* où des souris ICAM-1-déficientes ont été injectées avec des cellules de lymphomes ICAM-1-déficientes ou surexprimant ICAM-1 suite à la transfection du gène ICAM-1 murin (De Noncourt *et al.*, 2001). Cette approche ne nous a pas permis de mettre en évidence une inhibition spécifique de la part du phage contenant la séquence 4.1 *in vitro*, et ce à diverses concentrations de phages utilisées. L'ajout de hautes concentrations de phages contenant la séquence ICAM-1-spécifique ou témoin a, de fait, engendré une inhibition importante de la présentation antigénique aussi importante que celle obtenue avec l'anticorps témoin anti-ICAM-1 (Annexe 9). L'inhibition directement proportionnelle à la concentration des deux phages suggère que la présence des phages sature

le système par encombrement stérique au niveau des molécules impliquées dans la présentation antigénique. Dans le modèle *in vivo*, la présence du flot sanguin peut minimiser cet effet. Cependant, les titres des phages prélevés dans différents tissus démontrent que les particules phagiques exprimant ou non 4.1 se sont disséminées de façon similaire à travers l'organisme, alors que l'on aurait pu s'attendre à une migration préférentielle au niveau des tumeurs formées par les cellules surexprimant la molécule d'adhésion ICAM-1 (Annexe 10). Bien qu'une réaction immune puisse être à l'origine de ces observations, certains indices vont à l'encontre de cette hypothèse. En effet, bien que la quantité injectée au même site (veine de la queue) lors d'expériences similaires est de 100 (Wu *et al.*, 2002) à 1000 fois (Yip, Smith et Ward, 2001) moins élevée que dans nos expériences, il est important de se rappeler que l'élément le plus important dans ce contexte est le type de banque utilisé. Il a été démontré que la banque de type VIII est plus immunogène qu'une banque de type III que nous avons utilisé dans ce projet (Greenwood, Willis et Pernham, 1991; Demangel, Lafaye et Mazie, 1996). De plus, en comparant différents vecteurs pour l'immunisation de souris par un peptide, des chercheurs ont décelé une bonne production d'Ac après trois immunisations avec une banque de type VIII alors qu'aucun Ac ne fut décelé suite au même nombre d'injection d'une banque de type III (Yip, Smith et Ward, 2001). En fait ces chercheurs ont observé une bonne réponse humorale importante qu'après cinq immunisations avec une banque de type III. Nous croyons plutôt que la pression de sélection additionnelle exercée par le flot sanguin et l'affinité de la séquence 4.1 sont des facteurs importants qui ne permettent pas d'observer une adhésion spécifique *in vivo*. De même il est également possible que malgré l'expression d'ICAM-1 murin par les cellules tumorales, la quantité d'ICAM-1 disponible à travers les vaisseaux sanguins demeure trop faible pour lier significativement les phages 4.1. Les résultats obtenus après la conversion des résultats de distribution en distribution normalisée au nombre de phages en circulation dans le plasma (Annexe 11) appuient cette dernière possibilité. Ces résultats, combinés aux problèmes de synthèse mentionnés plus haut et au besoin d'utiliser cette séquence pour modifier la spécificité cellulaire de composés thérapeutiques, nous ont persuadés de conjuguer la séquence 4.1 à une

autre molécule, soit la β -galactosidase. Cette alternative nous a permis d'observer une diminution significative de l'activation des cellules T en présence de la protéine de fusion spmic/bgal, traduite par une baisse d'IL-2 sécrétée. L'importance d'IL-2 dans la stimulation des cellules T menant au rejet de greffe est connue depuis longtemps (Palladino et al., 1984; Kirk et al., 1992). Son expression est associée à la détérioration des greffes cardiaque et hépatique. Les résultats obtenus sont d'un grand intérêt parce qu'ils indiquent que la séquence 4.1 peut maintenir sa capacité de liaison lorsque conjuguée à une autre entité que la particule phagique.

Nous avons aussi déterminé la capacité de la séquence SPHIC à inhiber la réponse MLR à l'aide de cellules provenant de donneurs sains. Cette fois, nous avons effectué les tests avec les peptides SPHIC et SPHIR, puis avec la séquence sous forme de protéine SPHIC/bgal et SPHIR/bgal. Nous avons obtenu des fluctuations dans les tests avec les peptides mais dans l'ensemble nous avons observé une inhibition significative de la prolifération des cellules réponses uniquement en présence de la protéine de fusion SPHIC/bgal (Chapitre 3). Étant donné l'importance de la conformation d'ICAM-1 pour la liaison avec LFA-1 (Wang et Springer, 1998), ces résultats opposés soulèvent la question de la conformation de la séquence SPHIC. Différentes stratégies peuvent être employées afin d'augmenter la possibilité que le peptide soit présenté en une conformation optimale. Parmi celles-ci, les plus communes sont l'ajout de résidus de proline de par et d'autre de la séquence (Kini et Evans, 1995) et la présentation du peptide sous forme de protéine de fusion (Yip, Smith et Ward, 2001). La meilleure activité biologique observée par la protéine de fusion SPHIC/b-gal est aussi probablement due à la réduction du nombre possible de conformation du peptide, assurant une meilleure interaction peptide/ICAM-1. Un autre facteur à considérer est la capacité de la β -galactosidase à former des tétramères (Hung et al., 2002; Gallagher et al., 1998; Jacobson, Zhang et DuBose, 1994). Il a déjà été démontré à l'aide de oligomères que la multivalence améliore l'efficacité de ciblage de peptides (Brokx, Bisland et Gariépy, 2002). Les oligomères sont des molécules composées d'embranchement de peptides autour d'un noyau de polylysine. Cette multivalence aurait pour effet d'engendrer des molécules présentant plus qu'un peptide comme lors de la présentation par

la capsid du phage et augmenterait l'avidité de la molécule. Ces résultats sont cohérents avec les études démontrant que l'oligomérisation d'ICAM-1 favorise son interaction avec LFA-1 (Miller *et al.*, 1995; Reilly *et al.*, 1995)

Dans un cas comme dans l'autre, la capacité d'inhibition des protéines de fusion démontre le potentiel de ces molécules à lier un composé aux cellules exprimant ICAM-1. Le maintien de l'activité de la β -galactosidase conjuguée est un atout important et indique que la conjugaison d'un autre composé ne modifierait pas de façon significative ses propriétés intrinsèques. Plusieurs applications sont envisageables. Dans le cadre d'une thérapie génique, la séquence pourrait être fusionnée à la capsid d'adénovirus, présentée à la surface de polymères ou de liposomes. Par exemple, pour prévenir un rejet de greffe ou lors d'une maladie inflammatoire, tel l'asthme, la séquence peptidique pourrait diriger le vecteur thérapeutique vers le site de surexpression d'ICAM-1 et diminuer l'interaction d'ICAM-1/LFA-1. L'antisens contenu dans le vecteur pourrait ensuite empêcher la persistance de la surexpression d'ICAM-1 et les effets immunologiques qui en découlent. La séquence pourrait aussi être conjuguée à différents agents chimiothérapeutiques tels la doxorubicine ou la vincristine. Des agents anti-inflammatoires pourraient aussi être utilisés. Par exemple, une protéine de fusion incorporant l'IL-10, une cytokine prolongeant la survie de greffe cardiaque (Hong *et al.*, 2002), pourrait être utilisée dans le but d'améliorer le pronostic de patients transplantés.

Toutefois certaines questions auront besoin d'être abordées. Face à l'échec des tentatives de synthèse du peptide 4.1, une alternative serait de l'insérer dans une autre protéine de fusion contenant un site de clivage (de l'entérokinase par exemple) afin de libérer le peptide. Par contre en se basant sur les résultats obtenus avec la séquence spécifique à ICAM-1 humain et sur la littérature, les protéines de fusion semblent offrir un net avantage comparativement à une solution de peptide seul. Les propriétés fonctionnelles du peptide 4.1 devront d'autre part être validées *in vivo*. Avant d'écarter complètement le modèle utilisé avec le phage 4.1 ces expériences pourront être réalisées avec la protéine recombinante spmic4.1/bgal, en utilisant la β -galactosidase comme gène rapporteur. Une autre option serait d'utiliser un modèle

inflammatoire chez des souris sauvages, comme par exemple l'induction du choc septique au LPS ou l'injection de LPS dans une poche d'air dorsale. Afin de déterminer si la multivalence des séquences SPHIC et 4.1 est essentielle à l'activité fonctionnelle observée, leur séquence devra être conjuguée à d'autres protéines fonctionnelles n'ayant pas la capacité de se polymériser. Les agents mentionnés ci-haut sont des candidats possibles.

Conclusion

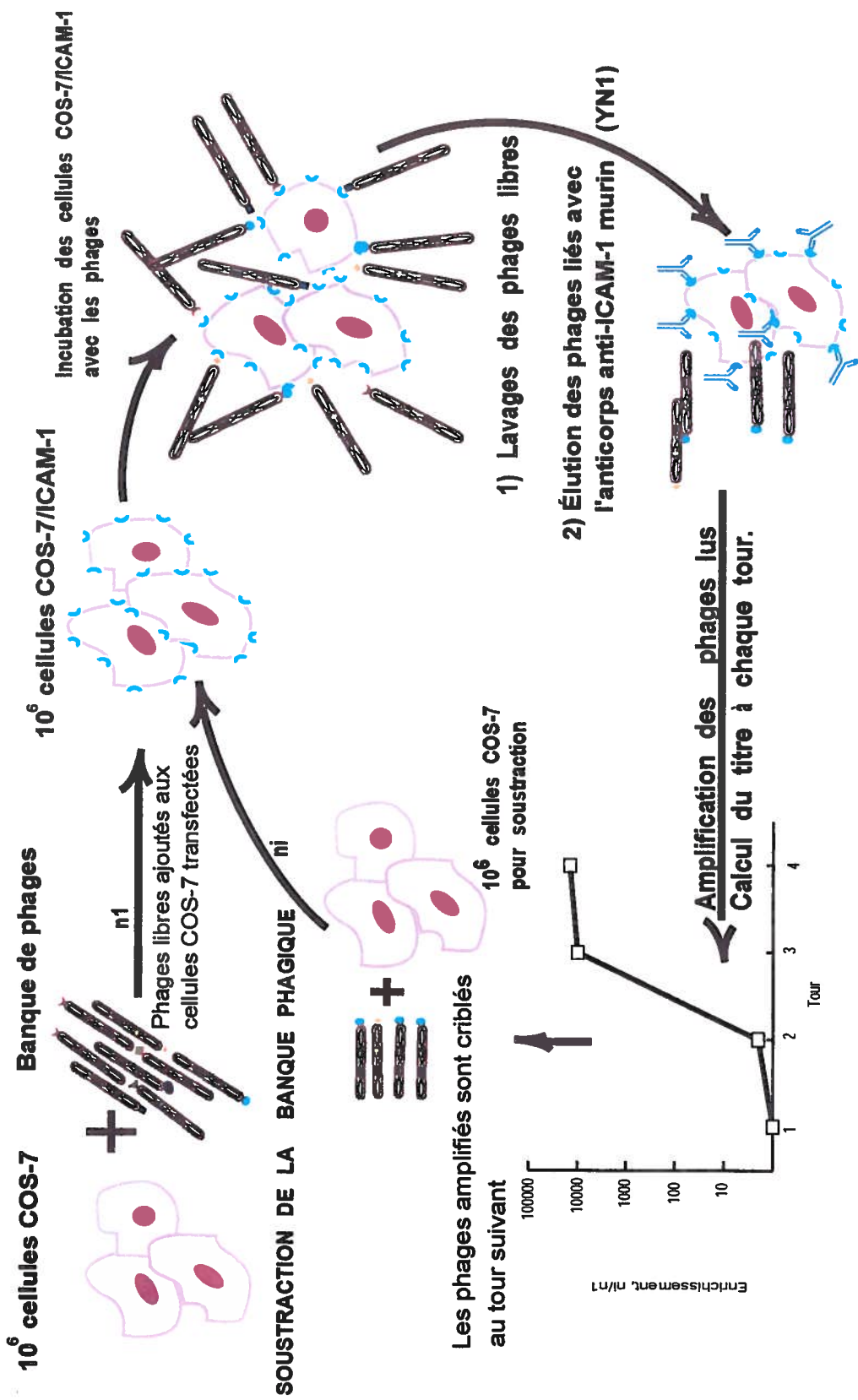
L'identification d'une kyrielle de marqueurs moléculaires est le pilier de la recherche des molécules de ciblage. Celles-ci peuvent être des peptides ou des anticorps. Jusqu'à présent leur plein potentiel n'a pas été exploité. Toutefois, certaines molécules peptidiques sont disponibles en clinique pour traiter les tumeurs pituitaires et gastro-intestinales (Froidevaux et Eberle, 2002), tandis que certains sont en différentes phases d'études cliniques. De plus, l'anticorps dirigé contre le récepteur HER-2, que l'on retrouve au niveau du cancer du sein, a été approuvé par la FDA (Torchilin et Lukyanov, 2003). Alors que ces molécules sont utilisées pour leurs qualités thérapeutiques, il est évident que leur utilité peut aussi contribuer à l'amélioration de médicaments commercialisés ou en développement sans spécificité cellulaire. Les vaisseaux sanguins sont la porte d'accès aux tissus adjacents endommagés et certaines des molécules qu'ils expriment sont directement liées à ces lésions. De plus, l'endothélium vasculaire à proximité des tumeurs est relativement facile d'accès, étant composé de cellules normales moins susceptibles aux mutations, phénomène associé à la résistance thérapeutique (Boehm et al., 1997). La surexpression endothéliale et tumorale de molécules d'adhésion telle qu'ICAM-1 dans diverses conditions pathologiques a motivé notre choix comme cible thérapeutique.

Les résultats de ce projet démontrent l'identification et la caractérisation de séquences peptidiques spécifiques d'une part à ICAM-1 murin, et d'autre part à ICAM-1 humain. La spécificité et les propriétés fonctionnelles observées sur des cellules exprimant différents niveaux d'ICAM-1, ainsi qu'avec des modèles de présentation d'antigène, en font de bons candidats pour des agents de ciblage.

Ces molécules-mères (4.1 et SPHIC) et leurs dérivés sous forme de conjugués ou de protéines de fusion seront utiles comme outils dans les études fondamentales et pré-cliniques utilisant les modèles murins de même que dans la confirmation de diagnostic ou comme outils thérapeutiques dans les pathologies impliquant ICAM-1.

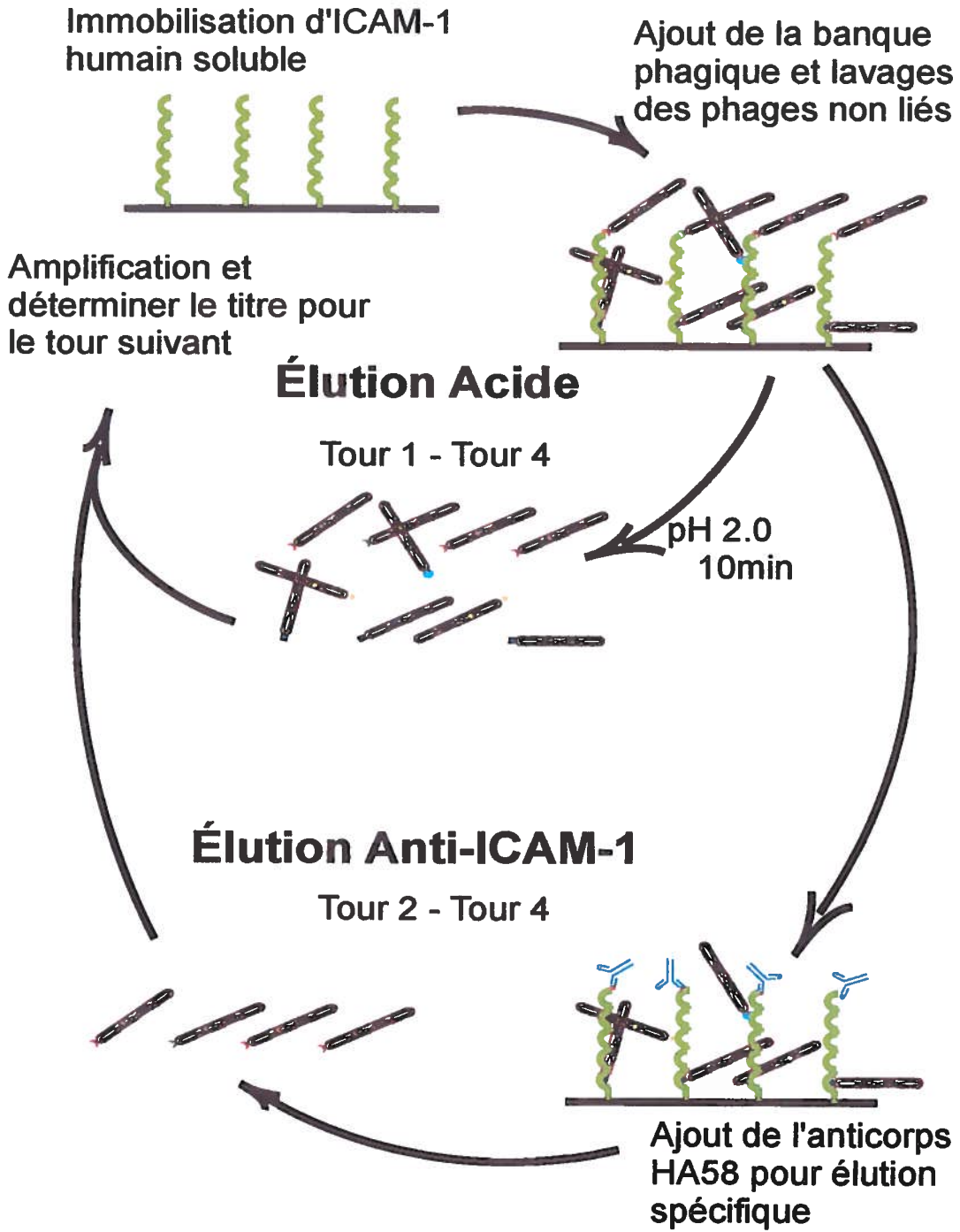
Annexe 1

Criblage d'ICAM-1 murin



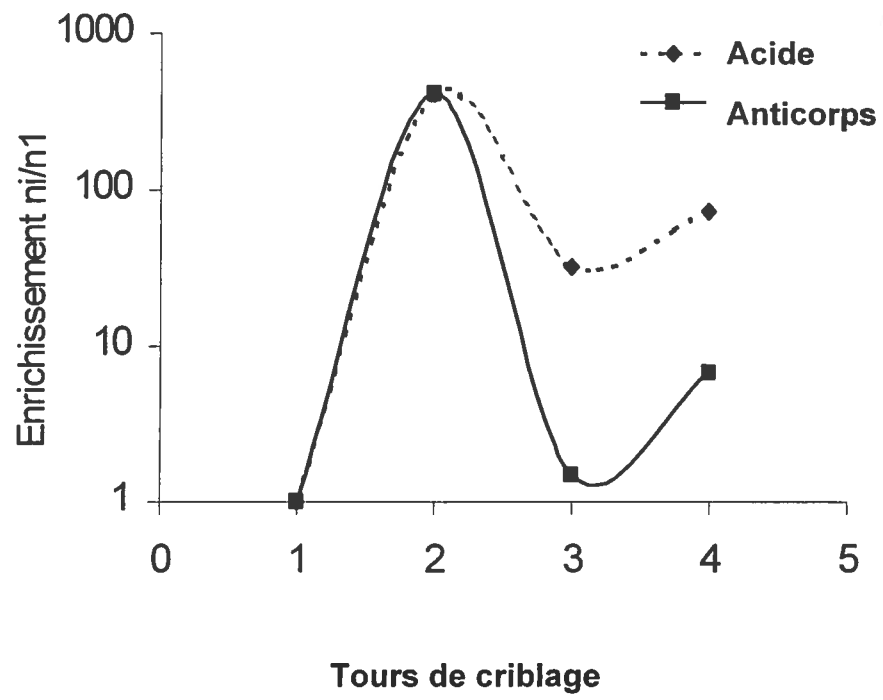
Annexe 2

Criblage d'ICAM-1 humain



Annexe 3

Enrichissement du criblage d'ICAM-1 humain



Annexe 4

HPLC du peptide 4.1



Date: 5/15/01

To: Supratek Pharma INC
Anna Belizaire
Phone: [1] 450-686-5502
Fax: 450-686-5504

From: SynPep
Jerry Chou/CT
Phone: 800-899-3436/925-803-9250
Fax: 800-899-6534/925-803-0786

Pages: 3

Subject: Difficult Peptide Status Report: 01-4-16-1-SUP

Dear Dr. Belizaire:

I like to keep you posted on the status of the following peptide that we are currently synthesizing for you.

Peptide No. 01-4-16-1-SUP in Quotation No: SUP-01-04-03-1-AR (sequence: Biotin-FEGFSFLAFEDFVSSI) has proven to be difficult to synthesize because of the nature of its particular sequence. Enclosed are HPLC chromatograms of crude peptide from our 1st, 2nd and 3rd synthesis.

SynPep will try to synthesize this peptide further without additional charge to you.

If you have any question, please feel free to contact me at your convenience.

Best regards!

Jerry Chou/CT
Sales Representative
SynPep Corporation
Phone: 800-899-3436/925-803-9250
Fax: 800-899-6534/925-803-0786
e-mail: jerry@synpep.com
web: www.synpep.com

Difficult Peptide Follow Up Report

Peptide name: 01-4-16-1-SUP Today's date: _____

Please advise your customer that SynPep is having difficulty producing this peptide for the following reasons listed below:

1. ✓ Problem due to difficult sequence
2. Problem due to difficult purification
3. Problem due to peptide aggregates
4. Problem due to multiple cystein residues causing polymerization of the peptide.
5. ✓ FAX HPLC Chromatogram of crude peptide from 1st, 2nd and 3rd synthesis
6. ✓ FAX analytical HPLC chromatogram of purified fractions from the 1st, 2nd and 3rd purification
7. Advise customer that SynPep suggests that they modify the peptide sequence in order to make it easier to produce.
8. Advise customer that SynPep would like to offer a credit for delivering a smaller quantity than promised in the quotation.
9. Advise customer that SynPep would like to offer a credit for delivering a lower purity than promised in the quotation.
10. Advise customer that SynPep is unable to complete this peptide and will cancel the order.
11. ✓ SynPep will try to synthesize and /or purify the peptide further without additional charge to the customer
12. SynPep will try to synthesize and /or purify the peptide further with additional charge to the customer
13. Advise the customer that the SynPep Technical Department will contact the customer.
14. Advise customer that the peptide decomposes by itself during the synthesis / purification.
15. Advise the customer that the peptide is hydroscopic
16. Advise the customer that the peptide polymerized after purification.
17. Advise customer that the peptide formed a proline-proline isomer after purification
18. Other: _____

Data provided by: _____
Dr. Chi Yang

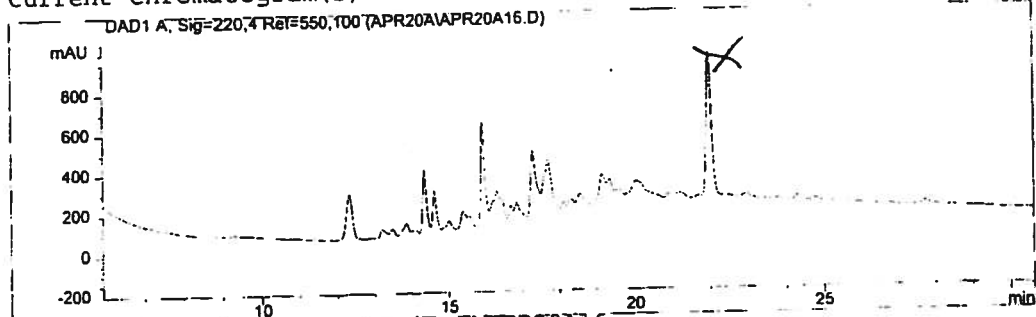
Anna Beljair

sup-01-04-03-1-AR. \$885

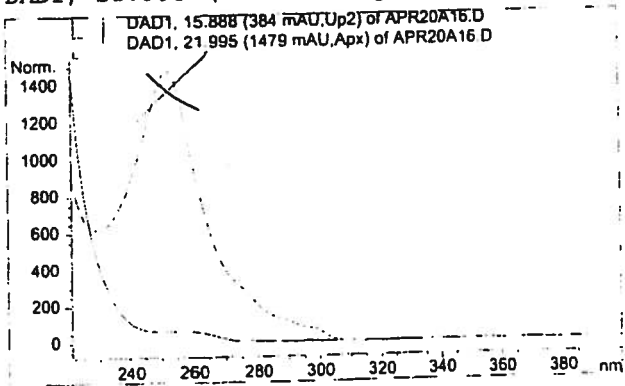
Print of all graphic windows

Snp 4161

Current Chromatogram(s)



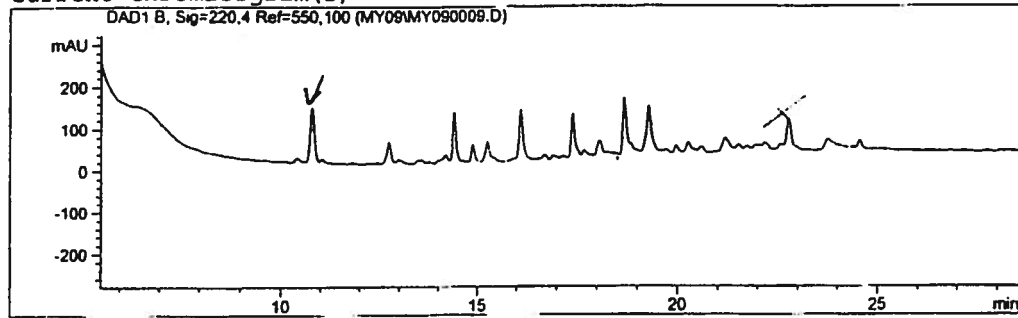
DAD1, 21.995 (1479 mAU, Apx) of APR20A16.



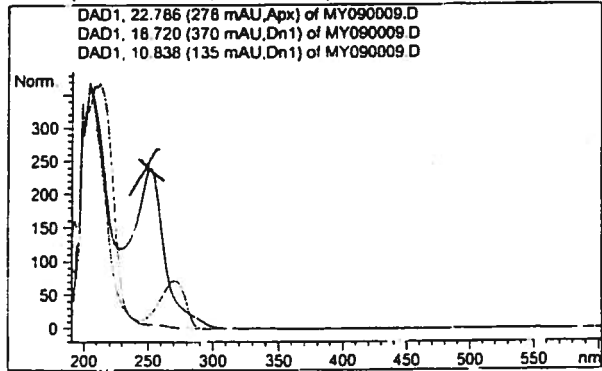
Print of all graphic windows

Sup 4161

Current Chromatogram(s)



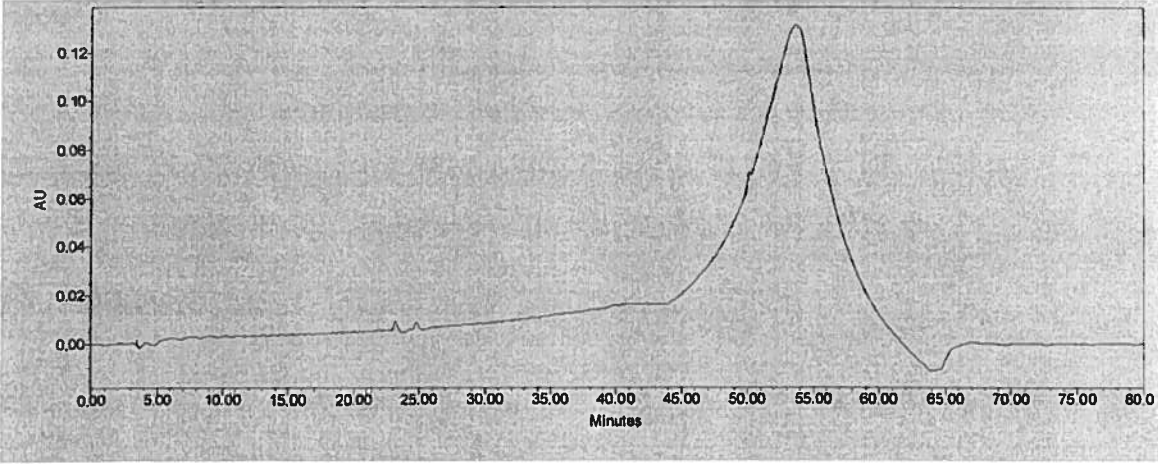
DAD1, 10.838 (135 mAU,Dn1) of MY090009.D



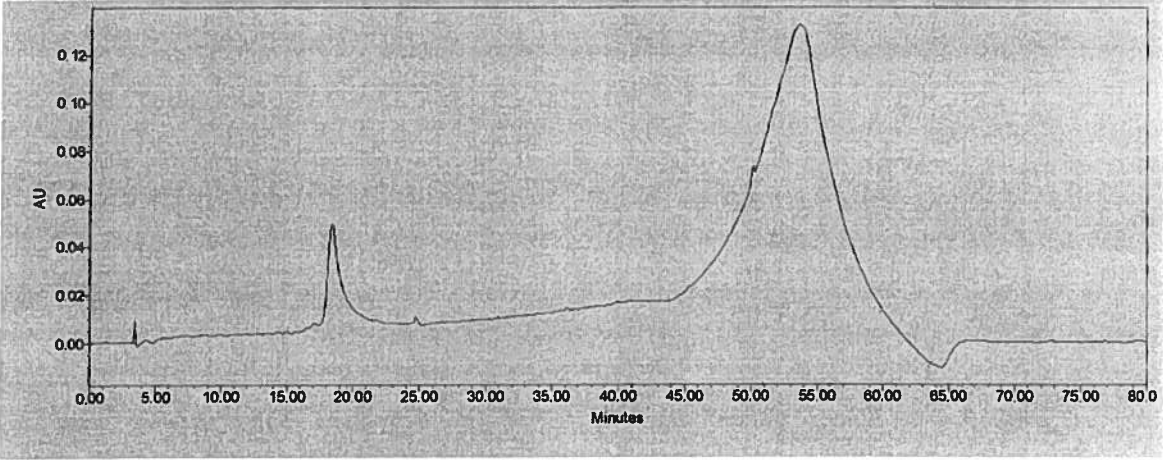
Annexe 5

Résultats et conditions d'HPLC du peptide SPHIC biotinylé

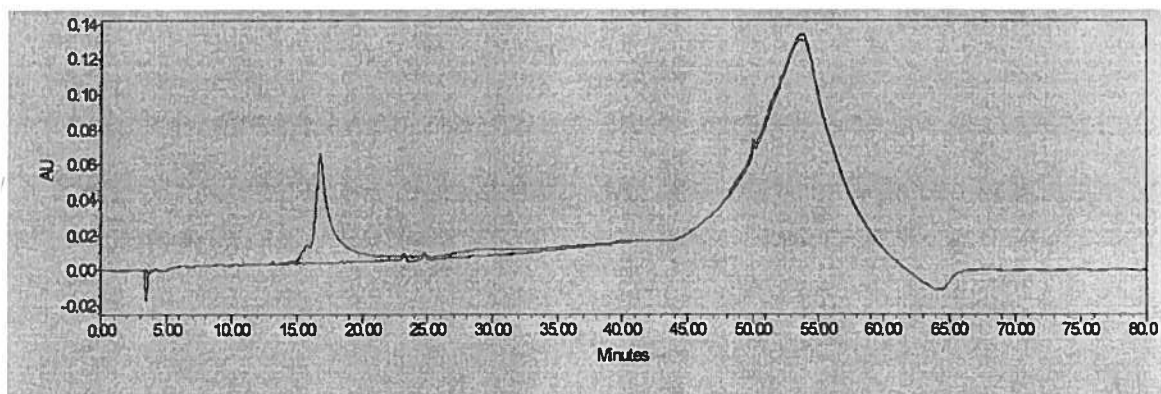
HPLC analytique : Eau



HPLC analytique : HIC biotinylé



Graphes d'HPLC analytique superposés : Eau et HIC biotinylé



Conditions d'HPLC analytique:

Colonne: Vydac 218TP54, size 4.6 x 250 mm, Phase: ODS 218TP, 5 micron

Solvants: Eau / 0,1% d'acide trifluoroacétique (TFA)
Acétonitrile / 0,1% TFA

Longueur d'onde de détection : 220nm

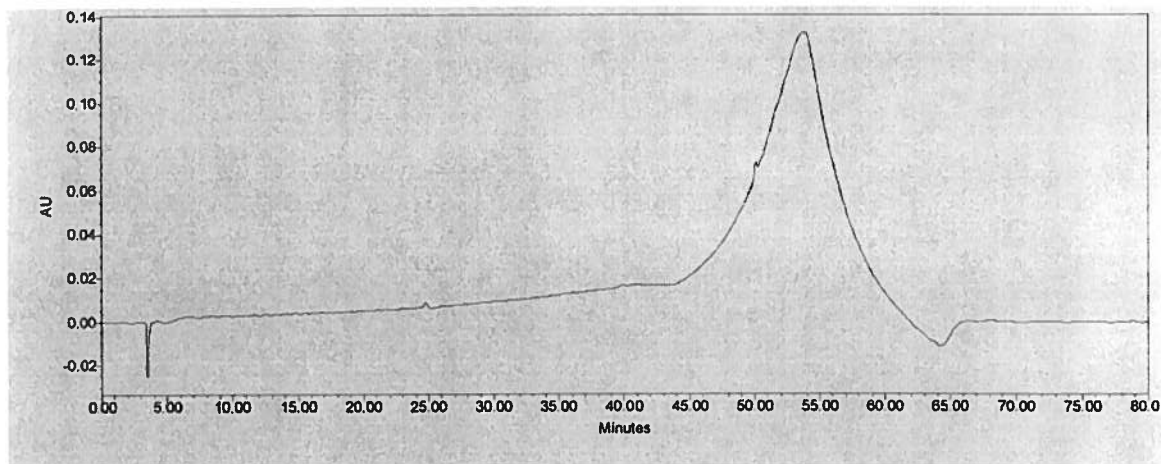
Gradient de concentration 10%-90% d'acétonitrile avec une variation de 1% par minute

Débit : 1ml/minute

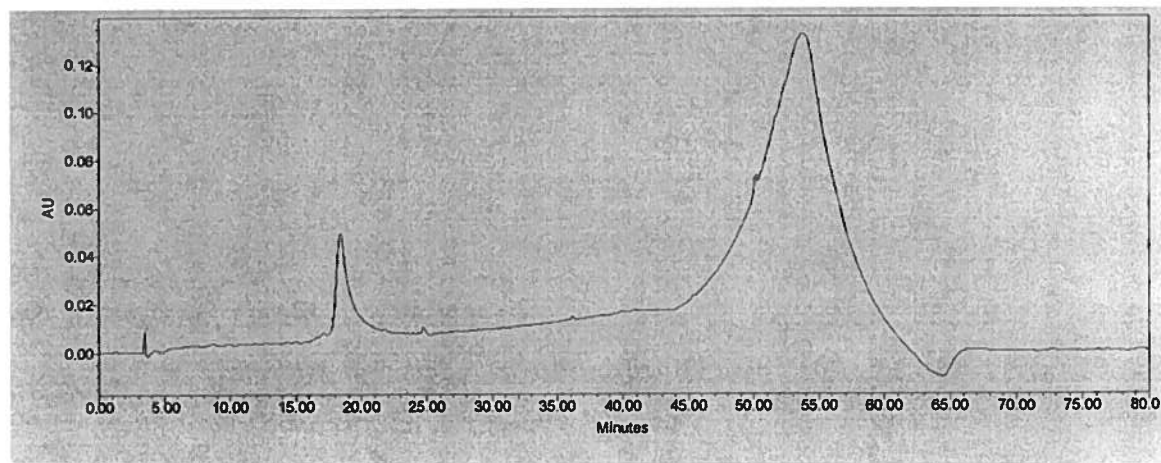
Annexe 6

Résultats et conditions d'HPLC du peptide contrôle biotinylé

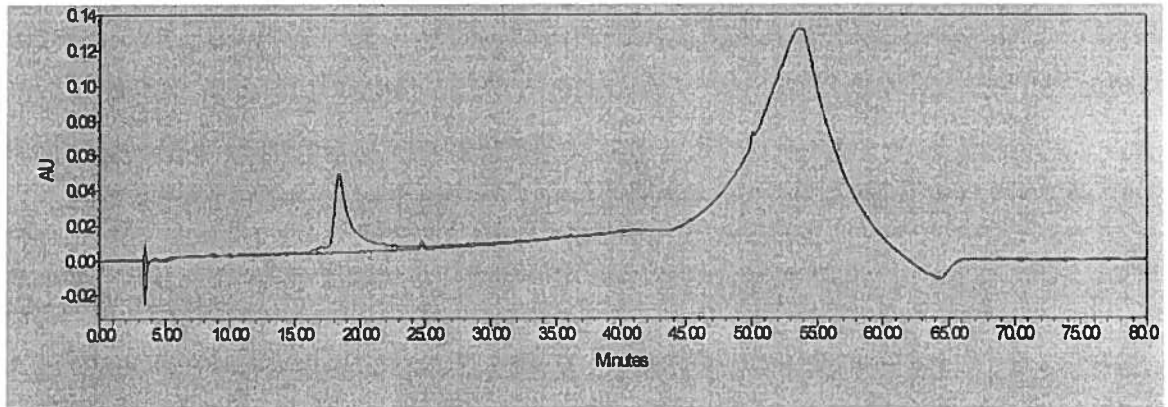
HPLC analytique : Eau



HPLC analytique : peptide contrôle biotinylé



Profils d'HPLC analytique superposés : Eau et peptide contrôle



Conditions d'HPLC analytique:

Colonne: Vydac 218TP54, size 4.6 x 250 mm, Phase: ODS 218TP, 5 micron

Solvants: Eau / 0,1% d'acide trifluoroacétique (TFA)
Acétonitrile / 0,1% TFA

Longueur d'onde de détection : 220nm

Gradient de concentration 10%-90% d'acétonitrile avec une variation de 1% par minute

Débit : 1ml/minute

Annexe 7

Résultats de spectroscopie de masse du peptide HIC biotinylé

ICAM0010G biotin collected pure

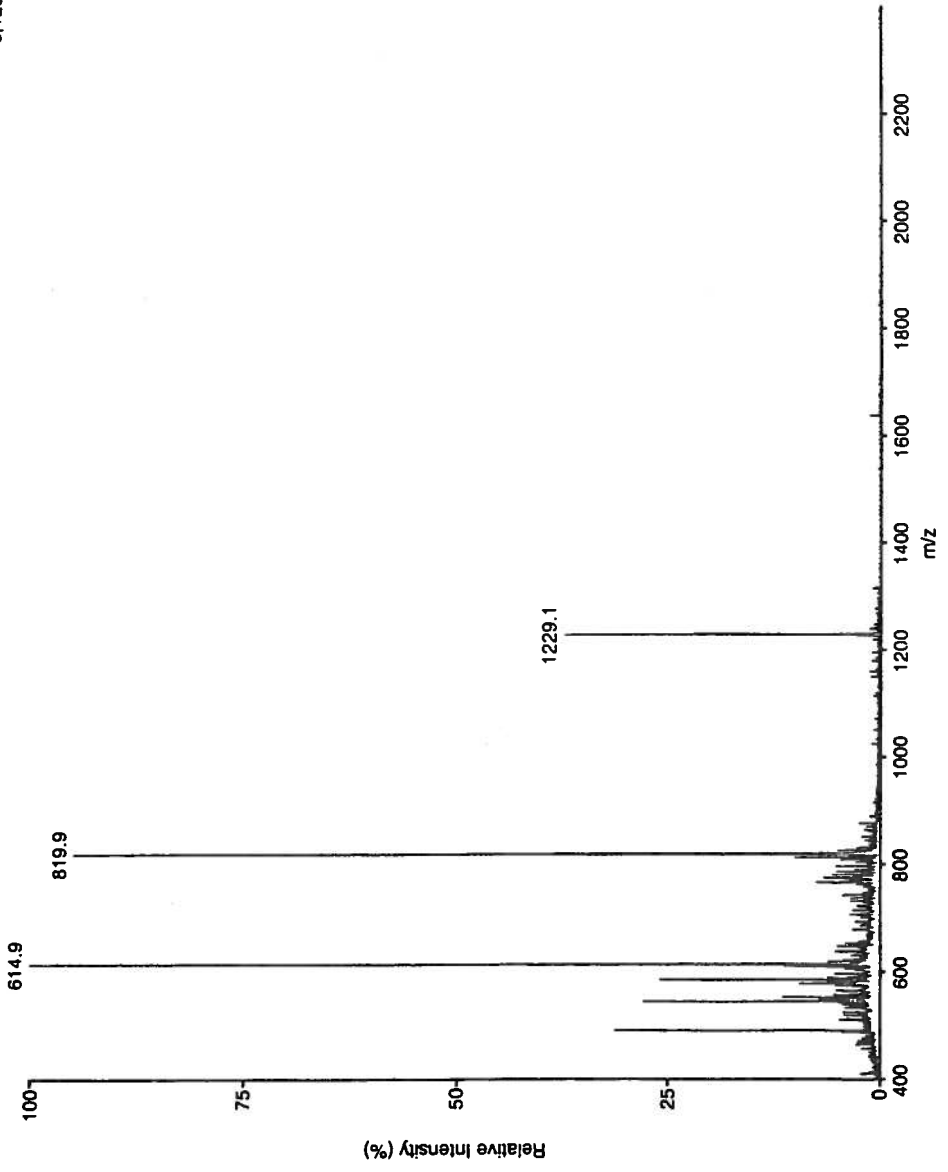
+Profile Q1SCAN

ICAM0010G biotin co - 2/05/29 - 10:06 AM

DI 0
ISV 5500
IN 650
OR 80
R0 30
M1 1000
RE1 122.8
DM1 0.090
R1 27.0
L7 -40
R2 -45
M3 1000
RE3 120
DM3 0
RX -10
R3 -70
L9 -250
FP -250
MU -3400
CC 10
CG Off
DIV -2.0
CGT 9.2
ISC 7.3

No Title
3 peaks

8,125,000



Annexe 8

Résultats de spectroscopie de masse du peptide contrôle biotinylé

ICAR010G collected fr.

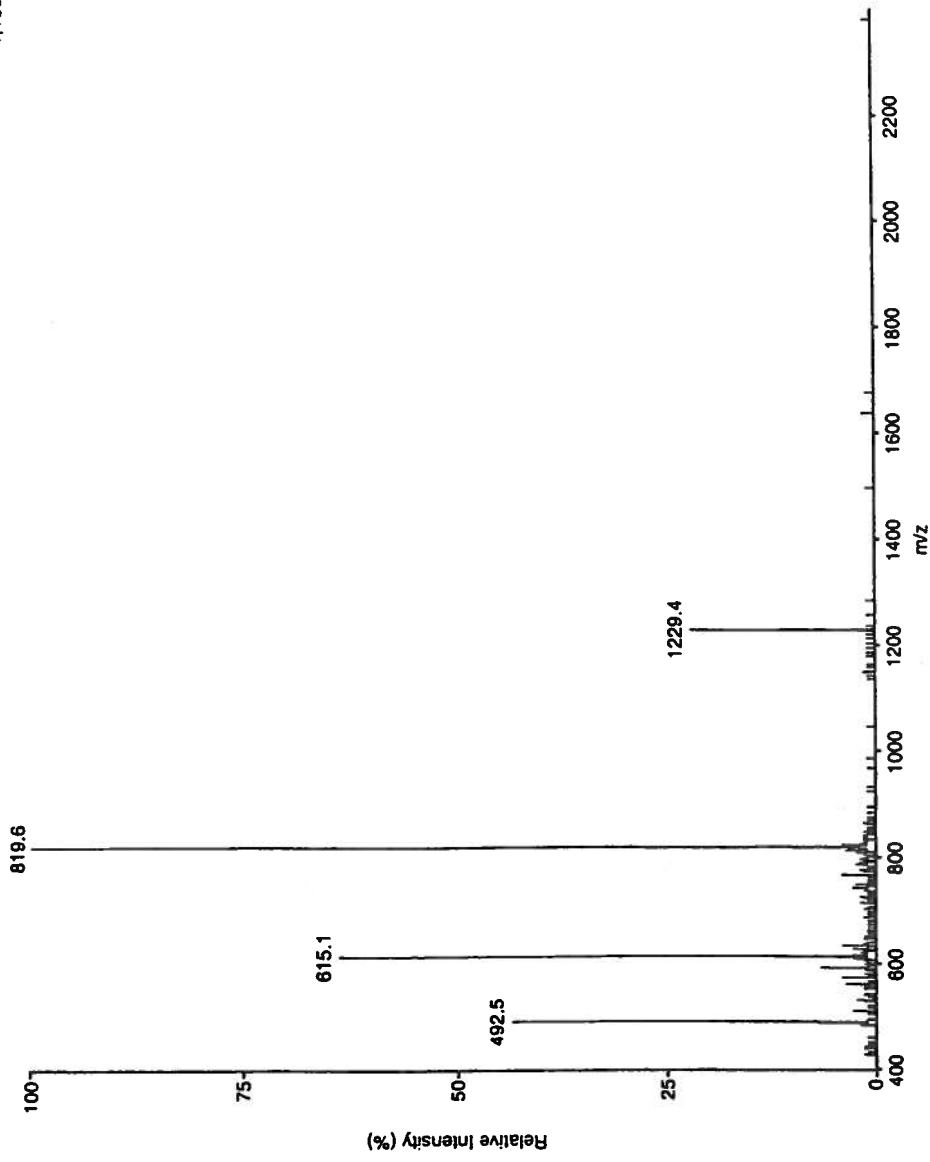
+Profile O1SCAN

ICAR010G collected - 2/04/23 - 12:32 PM

No Title
4 peaks

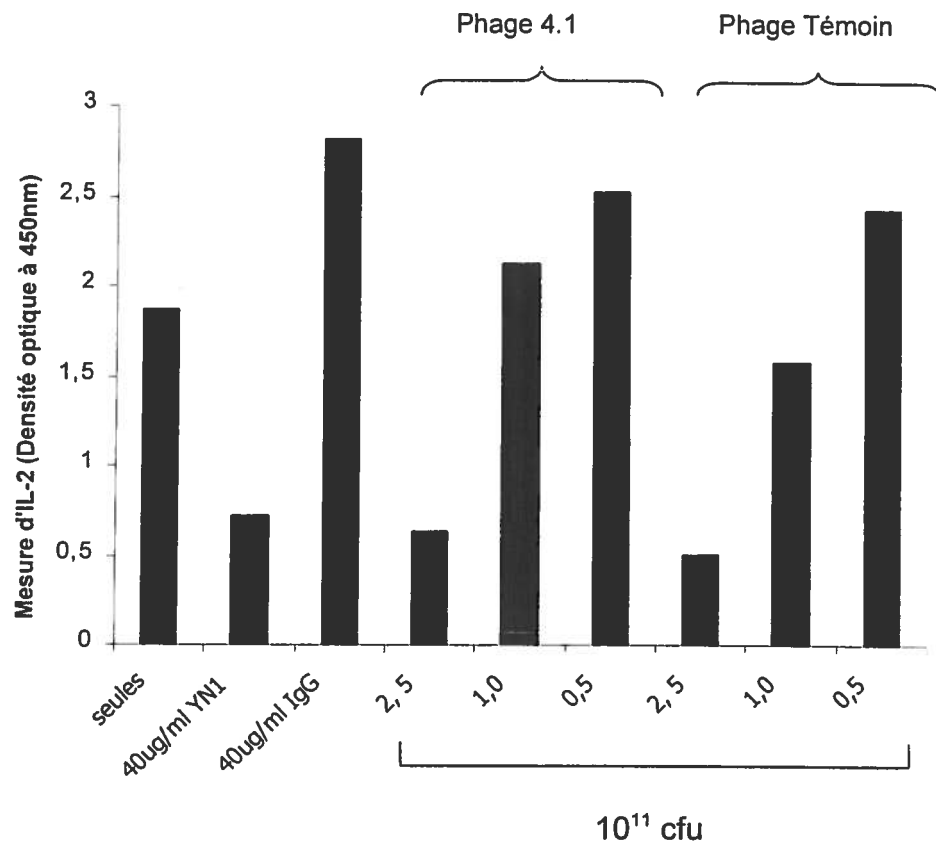
| | |
|-----|-------|
| DI | 0 |
| ISV | 5500 |
| IN | 650 |
| OR | 60 |
| RO | 30 |
| M1 | 1000 |
| RE1 | 122.8 |
| DM1 | 0.080 |
| R1 | 27.0 |
| L7 | -40 |
| R2 | -45 |
| M3 | 1000 |
| RE3 | 120 |
| DM3 | 0 |
| RX | -10 |
| R3 | -70 |
| L9 | -250 |
| FP | -250 |
| MU | -3400 |
| CC | 10 |
| CG | Off |
| DIV | 0.352 |
| CGT | 24.4 |
| ISC | 7.6 |

1,160,000



Annexe 9

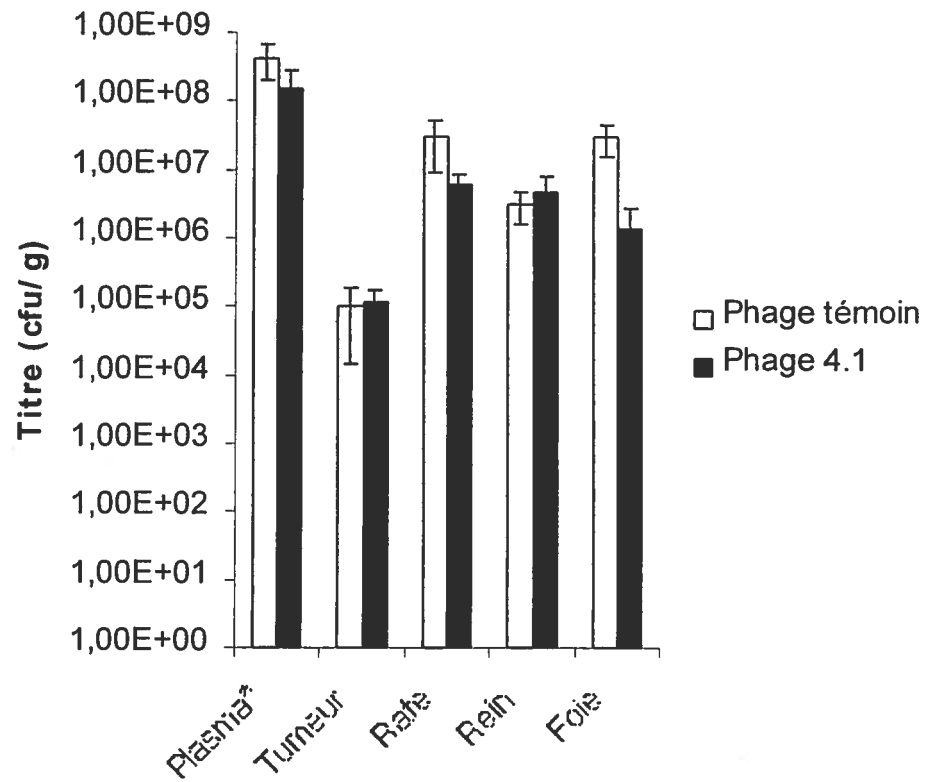
Test de présentation d'antigène avec phages 4.1 et phages témoins



Cfu : Colony forming units

Annexe 10

Distribution *in vivo* des phages témoins et des phages 4.1

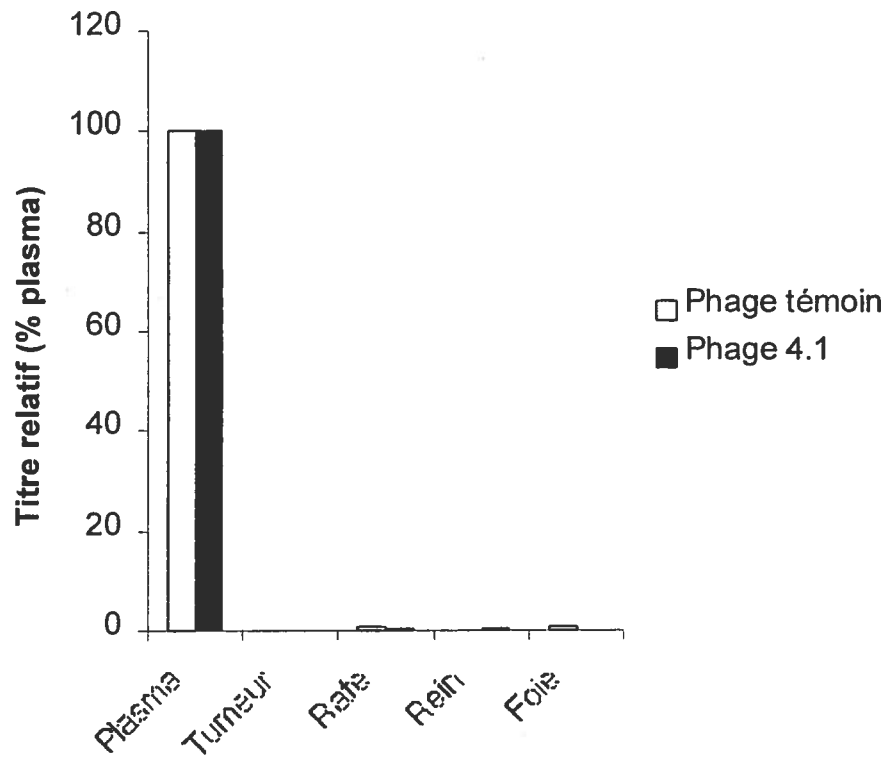


Distribution des phages 2h après injection chez des souris ayant une tumeur KOJ718 IC-1 #70. Phage témoin et phage 4.1 n=4.

* Titre en cfu/ml

Annexe 11

Distribution normalisé *in vivo* des phages témoins et des phages 4.1



Pourcentage de phages dans les différents tissus normalisé au nombre de phages dans le plasma. n=4

Références

Acevedo A, del Pozo MA, Arroyo AG, Sanchez-Mateos P, Gonzalez-Amaro R, Sanchez-Madrid F. 1993. Distribution of ICAM-3-bearing cells in normal human tissues. Expression of a novel counter-receptor for LFA-1 in epidermal Langerhans cells. *Am J Pathol* **143**, 774-783.

Adamson P, Etienne S, Couraud PO, Calder V, Greenwood J. 1999. Lymphocyte migration through brain endothelial cell monolayers involves signaling through endothelial ICAM-1 via a rho-dependent pathway. *J Immunol* **162**, 2964-2973.

Aina OH, Sroka TC, Chen ML, Lam KS. 2002. Therapeutic cancer targeting peptides. *Biopolymers* **66**, 184-199.

Alam MR, Maeda M, Sasaki S. 2000. DNA-binding peptides searched from the solid-phase combinatorial library with the use of the magnetic beads attaching the target duplex DNA. *Bioorg Med Chem* **8**, 465-473.

Anderson ME, Siahaan TJ. 2003a. Mechanism of binding and internalization of ICAM-1-derived cyclic peptides by LFA-1 on the surface of T cells: a potential method for targeted drug delivery. *Pharm Res* **20**, 1523-1532.

Anderson ME, Siahaan TJ. 2003b. Targeting ICAM-1/LFA-1 interaction for controlling autoimmune diseases: designing peptide and small molecule inhibitors. *Peptides* **24**, 487-501.

Aoudjit F, Brochu N, Morin N, Poulin G, Stratowa C, Audette M. 1995. Heterodimeric retinoic acid receptor-beta and retinoid X receptor-alpha complexes stimulate expression of the intercellular adhesion molecule-1 gene. *Cell Growth Differ* **6**, 515-521.

Aoudjit F, Potworowski EF, Springer TA, St-Pierre Y. 1998. Protection from lymphoma cell metastasis in ICAM-1 mutant mice: a posthoming event. *J Immunol* **161**, 2333-2338.

Aoudjit F, Potworowski EF, St-Pierre Y. 1998. Bi-directional induction of matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 during T lymphoma/endothelial cell contact: implication of ICAM-1. *J Immunol* **160**, 2967-2973.

Arap W, Haedicke W, et al. 2002a. Targeting the prostate for destruction through a vascular address. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 1527-1531.

Arap W, Kolonin MG, et al. 2002b. Steps toward mapping the human vasculature by phage display. *Nat Med* **8**, 121-127.

Augustin HG. 1998. Antiangiogenic tumour therapy: will it work? *Trends Pharmacol Sci* **19**, 216-222.

Baggiolini M. 1998. Chemokines and leukocyte traffic. *Nature* **392**, 565-568.

Bailly P, Tontti E, Hermand P, Cartron JP, Gahmberg CG. 1995. The red cell LW blood group protein is an intercellular adhesion molecule which binds to CD11/CD18 leukocyte integrins. *Eur J Immunol* **25**, 3316-3320.

Banks RE, Gearing AJ, Hemingway IK, Norfolk DR, Perren TJ, Selby PJ. 1993. Circulating intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1), E-selectin and vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) in human malignancies. *Br J Cancer* **68**, 122-124.

- Bass S, Greene R, Wells JA. 1990. Hormone phage: an enrichment method for variant proteins with altered binding properties. *Proteins* **8**, 309-314.
- Bauer M, Smith GP. 1988. Filamentous phage morphogenetic signal sequence and orientation of DNA in the virion and gene-V protein complex. *Virology* **167**, 166-175.
- Beck E, Zink B. 1981. Nucleotide sequence and genome organisation of filamentous bacteriophages *φ*1 and *φ*d. *Gene* **16**, 35-58.
- Becker JC, Dummer R, Hartmann AA, Burg G, Schmidt RE. 1991. Shedding of ICAM-1 from human melanoma cell lines induced by IFN-gamma and tumor necrosis factor-alpha. Functional consequences on cell-mediated cytotoxicity. *J Immunol* **147**, 4398-4401.
- Bella J, Kolatkar PR, Marlor CW, Greve JM, Rossmann MG. 1998. The structure of the two amino-terminal domains of human ICAM-1 suggests how it functions as a rhinovirus receptor and as an LFA-1 integrin ligand. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 4140-4145.
- Bendjelloul F, Maly P, Mandys V, Jirkovska M, Prokesova L, Tuckova L, Tlaskalova-Hogenova H. 2000. Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) deficiency protects mice against severe forms of experimentally induced colitis. *Clin Exp Immunol* **119**, 57-63.
- Bennett CF, Condon TP, Grimm S, Chan H, Chiang MY. 1994. Inhibition of endothelial cell adhesion molecule expression with antisense oligonucleotides. *J Immunol* **152**, 3530-3540.
- Bentley AM, Durham SR, Robinson DS, Menz G, Storz C, Cromwell O, Kay AB, Wardlaw AJ. 1993. Expression of endothelial and leukocyte adhesion molecules intercellular adhesion molecule-1, E-selectin, and vascular cell adhesion molecule-1 in the bronchial mucosa in steady-state and allergen-induced asthma. *J Allergy Clin Immunol* **92**, 857-868.
- Berendt AR, McDowall A, Craig AG, Bates PA, Sternberg MJ, Marsh K, Newbold CI, Hogg N. 1992. The binding site on ICAM-1 for Plasmodium falciparum-infected erythrocytes overlaps, but is distinct from, the LFA-1-binding site. *Cell* **68**, 71-81.
- Besch R, Giovannangeli C, Kammerbauer C, Degitz K. 2002. Specific inhibition of ICAM-1 expression mediated by gene targeting with Triplex-forming oligonucleotides. *J Biol Chem* **277**, 32473-32479.
- Bloom JW, Madanat MS, Ray MK. 1996. Cell line and site specific comparative analysis of the N-linked oligosaccharides on human ICAM-1des454-532 by electrospray ionization mass spectrometry. *Biochemistry* **35**, 1856-1864.
- Bo L, Peterson JW, Mork S, Hoffman PA, Gallatin WM, Ransohoff RM, Trapp BD. 1996. Distribution of immunoglobulin superfamily members ICAM-1, -2, -3, and the beta 2 integrin LFA-1 in multiple sclerosis lesions. *J Neuropathol Exp Neurol* **55**, 1060-1072.
- Bochner BS, Luscinskas FW, Gimbrone MA, Jr., Newman W, Sterbinsky SA, Derse-Anthony CP, Klunk D, Schleimer RP. 1991. Adhesion of human basophils, eosinophils, and neutrophils to interleukin 1-activated human vascular endothelial cells: contributions of endothelial cell adhesion molecules. *J Exp Med* **173**, 1553-1557.
- Boehm T, Folkman J, Browder T, O'Reilly MS. 1997. Antiangiogenic therapy of experimental cancer does not induce acquired drug resistance. *Nature* **390**, 404-407.

- Bonn D. 1998. Tackling the real culprits in Crohn's disease. *Lancet* **351**, 1710.
- Bouillon M, Fortier MA, Boulianne R, Audette M. 1992. Biphasic effect of cAMP-elevating agents on ICAM-1 expression stimulated by retinoic acid and interferon gamma. *Int J Cancer* **50**, 281-288.
- Brokx RD, Bisland SK, Garipey J. 2002. Designing peptide-based scaffolds as drug delivery vehicles. *J Control Release* **78**, 115-123.
- Budnik A, Grewe M, Gyufko K, Krutmann J. 1996. Analysis of the production of soluble ICAM-1 molecules by human cells. *Exp Hematol* **24**, 352-359.
- Burmester GR, Stuhlmuller B, Keyszer G, Kinne RW. 1997. Mononuclear phagocytes and rheumatoid synovitis. Mastermind or workhorse in arthritis? *Arthritis Rheum* **40**, 5-18.
- Cai X, Garen A. 1995. Anti-melanoma antibodies from melanoma patients immunized with genetically modified autologous tumor cells: selection of specific antibodies from single-chain Fv fusion phage libraries. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 6537-6541.
- Caldenhoven E, Coffey P, Yuan J, Van de Stolpe A, Horn F, Kruijjer W, Van der Saag PT. 1994. Stimulation of the human intercellular adhesion molecule-1 promoter by interleukin-6 and interferon-gamma involves binding of distinct factors to a palindromic response element. *J Biol Chem* **269**, 21146-21154.
- Campbell SC, Tanabe K, Alexander JP, Edinger M, Tubbs RR, Klein EA. 1994. Intercellular adhesion molecule-1 expression by bladder cancer cells: functional effects. *J Urol* **151**, 1385-1390.
- Champagne B, Tremblay P, Cantin A, St Pierre Y. 1998. Proteolytic cleavage of ICAM-1 by human neutrophil elastase. *J Immunol* **161**, 6398-6405.
- Chan AK, Lockhart DC, von Bernstorff W, Spanjaard RA, Joo HG, Eberlein TJ, Goedegebuure PS. 1999. Soluble MUC1 secreted by human epithelial cancer cells mediates immune suppression by blocking T-cell activation. *Int J Cancer* **82**, 721-726.
- Chaplin DJ, Pettit GR, Hill SA. 1999. Anti-vascular approaches to solid tumour therapy: evaluation of combretastatin A4 phosphate. *Anticancer Res* **19**, 189-195.
- Chen YC, Delbrook K, Dealwis C, Mimms L, Mushahwar IK, Mandeck W. 1996. Discontinuous epitopes of hepatitis B surface antigen derived from a filamentous phage peptide library. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 1997-2001.
- Chiang MY, Chan H, Zounes MA, Freier SM, Lima WF, Bennett CF. 1991. Antisense oligonucleotides inhibit intercellular adhesion molecule 1 expression by two distinct mechanisms. *J Biol Chem* **266**, 18162-18171.
- Chong AS, Boussy IA, Jiang XL, Lamas M, Graf LH, Jr. 1994. CD54/ICAM-1 is a costimulator of NK cell-mediated cytotoxicity. *Cell Immunol* **157**, 92-105.
- Chung ES, Packer M, Lo KH, Fasanmade AA, Willerson JT. 2003. Randomized, double-blind, placebo-controlled, pilot trial of infliximab, a chimeric monoclonal antibody to tumor necrosis factor-alpha, in patients with moderate-to-severe heart failure: results of the anti-TNF Therapy Against Congestive Heart Failure (ATTACH) trial. *Circulation* **107**, 3133-3140.

- Cobb RR, Dubins JS, Warner J, Molony L. 1992. Functional expression of soluble ICAM-1 by baculovirus-infected Sf9 cells. *Biochem Biophys Res Commun* **185**, 1022-1033.
- Colonno RJ, Callahan PL, Long WJ. 1986. Isolation of a monoclonal antibody that blocks attachment of the major group of human rhinoviruses. *J Virol* **57**, 7-12.
- Cordell JL, Pulford K, et al. 1994. Cellular distribution of human leucocyte adhesion molecule ICAM-3. *J Clin Pathol* **47**, 143-147.
- Cyster JG, Shotton DM, Williams AF. 1991. The dimensions of the T lymphocyte glycoprotein leukosialin and identification of linear protein epitopes that can be modified by glycosylation. *Embo J* **10**, 893-902.
- Dark GG, Hill SA, Prise VE, Tozer GM, Pettit GR, Chaplin DJ. 1997. Combretastatin A-4, an agent that displays potent and selective toxicity toward tumor vasculature. *Cancer Res* **57**, 1829-1834.
- Davis PD, Dougherty GJ, et al. 2002. ZD6126: a novel vascular-targeting agent that causes selective destruction of tumor vasculature. *Cancer Res* **62**, 7247-7253.
- Davis TA, Czerwinski DK, Levy R. 1999. Therapy of B-cell lymphoma with anti-CD20 antibodies can result in the loss of CD20 antigen expression. *Clin Cancer Res* **5**, 611-615.
- de Kruif J, Terstappen L, Boel E, Logtenberg T. 1995. Rapid selection of cell subpopulation-specific human monoclonal antibodies from a synthetic phage antibody library. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 3938-3942.
- De Noncourt P, Robledo O, Alain T, Kossakowska AE, Urbanski SJ, Potworowski EF, St-Pierre Y. 2001. Leukocyte elastase in murine and human non-Hodgkin lymphomas. *J Leukoc Biol* **70**, 585-591.
- Dean NM, McKay R, Condon TP, Bennett CF. 1994. Inhibition of protein kinase C-alpha expression in human A549 cells by antisense oligonucleotides inhibits induction of intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) mRNA by phorbol esters. *J Biol Chem* **269**, 16416-16424.
- Dedrick RL, Bodary S, Garovoy MR. 2003. Adhesion molecules as therapeutic targets for autoimmune diseases and transplant rejection. *Expert Opin Biol Ther* **3**, 85-95.
- Demangel C, Lafaye P, Mazie JC. 1996. Reproducing the immune response against the Plasmodium vivax merozoite surface protein 1 with mimotopes selected from a phage-displayed peptide library. *Mol Immunol* **33**, 909-916.
- Denekamp J. 1982. Endothelial cell proliferation as a novel approach to targeting tumour therapy. *Br J Cancer* **45**, 136-139.
- Diamond MS, Staunton DE, de Fougères AR, Stacker SA, Garcia-Aguilar J, Hibbs ML, Springer TA. 1990. ICAM-1 (CD54): a counter-receptor for Mac-1 (CD11b/CD18). *J Cell Biol* **111**, 3129-3139.
- Diamond MS, Staunton DE, Marlin SD, Springer TA. 1991. Binding of the integrin Mac-1 (CD11b/CD18) to the third immunoglobulin-like domain of ICAM-1 (CD54) and its regulation by glycosylation. *Cell* **65**, 961-971.

- Ding ZM, Babensee JE, et al. 1999. Relative contribution of LFA-1 and Mac-1 to neutrophil adhesion and migration. *J Immunol* **163**, 5029-5038.
- D'Mello F, Howard CR. 2001. An improved selection procedure for the screening of phage display peptide libraries. *J Immunol Methods* **247**, 191-203.
- Doussis-Anagnostopoulou I, Kaklamanis L, Cordell J, Jones M, Turley H, Pulford K, Simmons D, Mason D, Gatter K. 1993. ICAM-3 expression on endothelium in lymphoid malignancy. *Am J Pathol* **143**, 1040-1043.
- D'Souza SE, Byers-Ward VJ, Gardiner EE, Wang H, Sung SS. 1996. Identification of an active sequence within the first immunoglobulin domain of intercellular cell adhesion molecule-1 (ICAM-1) that interacts with fibrinogen. *J Biol Chem* **271**, 24270-24277.
- Dubey C, Croft M, Swain SL. 1995. Costimulatory requirements of naive CD4+ T cells. ICAM-1 or B7-1 can costimulate naive CD4 T cell activation but both are required for optimum response. *J Immunol* **155**, 45-57.
- Dunne JL, Ballantyne CM, Beaudet AL, Ley K. 2002. Control of leukocyte rolling velocity in TNF-alpha-induced inflammation by LFA-1 and Mac-1. *Blood* **99**, 336-341.
- Duperray A, Languino LR, Plescia J, McDowall A, Hogg N, Craig AG, Berendt AR, Altieri DC. 1997. Molecular identification of a novel fibrinogen binding site on the first domain of ICAM-1 regulating leukocyte-endothelium bridging. *J Biol Chem* **272**, 435-441.
- Dustin ML, Miller JM, Ranganath S, Vignali DA, Viner NJ, Nelson CA, Unanue ER. 1996. TCR-mediated adhesion of T cell hybridomas to planar bilayers containing purified MHC class II/peptide complexes and receptor shedding during detachment. *J Immunol* **157**, 2014-2021.
- Dustin ML, Rothlein R, Bhan AK, Dinarello CA, Springer TA. 1986. Induction by IL 1 and interferon-gamma: tissue distribution, biochemistry, and function of a natural adherence molecule (ICAM-1). *J Immunol* **137**, 245-254.
- Dustin ML, Springer TA. 1988. Lymphocyte function-associated antigen-1 (LFA-1) interaction with intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) is one of at least three mechanisms for lymphocyte adhesion to cultured endothelial cells. *J Cell Biol* **107**, 321-331.
- Dustin ML, Springer TA. 1989. T-cell receptor cross-linking transiently stimulates adhesiveness through LFA-1. *Nature* **341**, 619-624.
- Dyson MR, Murray K. 1995. Selection of peptide inhibitors of interactions involved in complex protein assemblies: association of the core and surface antigens of hepatitis B virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 2194-2198.
- Eck SL, Perkins ND, Carr DP, Nabel GJ. 1993. Inhibition of phorbol ester-induced cellular adhesion by competitive binding of NF-kappa B in vivo. *Mol Cell Biol* **13**, 6530-6536.
- Edwards CP, Fisher KL, Presta LG, Bodary SC. 1998. Mapping the intercellular adhesion molecule-1 and -2 binding site on the inserted domain of leukocyte function-associated antigen-1. *J Biol Chem* **273**, 28937-28944.
- El-Sawy IH, Badr-El-Din OM, El-Azzouni OE, Motawae HA. 1999. Soluble intercellular adhesion molecule-1 in sera of children with bronchial asthma exacerbation. *Int Arch Allergy Immunol* **119**, 126-132.

- Endo S, Inada K, *et al.* 1995. Levels of soluble adhesion molecules and cytokines in patients with septic multiple organ failure. *J Inflamm* **46**, 212-219.
- Etienne S, Adamson P, Greenwood J, Strosberg AD, Cazaubon S, Couraud PO. 1998. ICAM-1 signaling pathways associated with Rho activation in microvascular brain endothelial cells. *J Immunol* **161**, 5755-5761.
- Etzioni A. 1999. Loss of endothelial surface expression of E-selectin--a third LAD syndrome. *Blood* **94**, 3956.
- Fabbri M, Bianchi E, Fumagalli L, Pardi R. 1999. Regulation of lymphocyte traffic by adhesion molecules. *Inflamm Res* **48**, 239-246.
- Feng Y, Chung D, *et al.* 1998. Peptides derived from the complementarity-determining regions of anti-Mac-1 antibodies block intercellular adhesion molecule-1 interaction with Mac-1. *J Biol Chem* **273**, 5625-5630.
- Fisher KL, Lu J, Riddle L, Kim KJ, Presta LG, Bodary SC. 1997. Identification of the binding site in intercellular adhesion molecule 1 for its receptor, leukocyte function-associated antigen 1. *Mol Biol Cell* **8**, 501-515.
- Fodor SP, Read JL, Pirrung MC, Stryer L, Lu AT, Solas D. 1991. Light-directed, spatially addressable parallel chemical synthesis. *Science* **251**, 767-773.
- Folkman J. 1995. Seminars in Medicine of the Beth Israel Hospital, Boston. Clinical applications of research on angiogenesis. *N Engl J Med* **333**, 1757-1763.
- Folkman J, Shing Y. 1992. Angiogenesis. *J Biol Chem* **267**, 10931-10934.
- Froidevaux S, Eberle AN. 2002. Somatostatin analogs and radiopeptides in cancer therapy. *Biopolymers* **66**, 161-183.
- Gaglia JL, Greenfield EA, Mattoo A, Sharpe AH, Freeman GJ, Kuchroo VK. 2000. Intercellular adhesion molecule 1 is critical for activation of CD28-deficient T cells. *J Immunol* **165**, 6091-6098.
- Gahmberg CG, Tolvanen M, Kotovuori P. 1997. Leukocyte adhesion--structure and function of human leukocyte beta2-integrins and their cellular ligands. *Eur J Biochem* **245**, 215-232.
- Gallagher CN, Huber RE. 1998. Studies of the M15 beta-galactosidase complementation process. *J Protein Chem* **17**, 131-141.
- Gangopadhyay A, Lazure DA, Thomas P. 1998. Adhesion of colorectal carcinoma cells to the endothelium is mediated by cytokines from CEA stimulated Kupffer cells. *Clin Exp Metastasis* **16**, 703-712.
- Garboczi DN, Ghosh P, Utz U, Fan QR, Biddison WE, Wiley DC. 1996. Structure of the complex between human T-cell receptor, viral peptide and HLA-A2. *Nature* **384**, 134-141.
- Garcia KC, Degano M, Stanfield RL, Brunmark A, Jackson MR, Peterson PA, Teyton L, Wilson IA. 1996. An alphabeta T cell receptor structure at 2.5 A and its orientation in the TCR-MHC complex. *Science* **274**, 209-219.

- Gendler SJ, Lancaster CA, Taylor-Papadimitriou J, Duhig T, Peat N, Burchell J, Pemberton L, Lalani EN, Wilson D. 1990. Molecular cloning and expression of human tumor-associated polymorphic epithelial mucin. *J Biol Chem* **265**, 15286-15293.
- George AJ, Lee L, Pitzalis C. 2003. Isolating ligands specific for human vasculature using in vivo phage selection. *Trends Biotechnol* **21**, 199-203.
- Geysen HM, Meloen RH, Barteling SJ. 1984. Use of peptide synthesis to probe viral antigens for epitopes to a resolution of a single amino acid. *Proc Natl Acad Sci U S A* **81**, 3998-4002.
- Geysen HM, Rodda SJ, Mason TJ. 1986a. The delineation of peptides able to mimic assembled epitopes. *Ciba Found Symp* **119**, 130-149.
- Geysen HM, Rodda SJ, Mason TJ. 1986b. A priori delineation of a peptide which mimics a discontinuous antigenic determinant. *Mol Immunol* **23**, 709-715.
- Giranda VL, Chapman MS, Rossmann MG. 1990. Modeling of the human intercellular adhesion molecule-1, the human rhinovirus major group receptor. *Proteins* **7**, 227-233.
- Goldstein JS, Chen T, Gubina E, Pastor RW, Kozlowski S. 2000. ICAM-1 enhances MHC-peptide activation of CD8(+) T cells without an organized immunological synapse. *Eur J Immunol* **30**, 3266-3270.
- Gomez-Scotto E, Seigneur M, Renard M, Houbouyan-Reveillard LL, Boisseau MR. 2000. [Interest in variations in soluble ICAM-1 plasma levels. From physiology to clinical applications]. *J Mal Vasc* **25**, 156-165.
- Goodman TG, Bajt ML. 1996. Identifying the putative metal ion-dependent adhesion site in the beta2 (CD18) subunit required for alphaLbeta2 and alphaMbeta2 ligand interactions. *J Biol Chem* **271**, 23729-23736.
- Grakoui A, Bromley SK, Sumen C, Davis MM, Shaw AS, Allen PM, Dustin ML. 1999. The immunological synapse: a molecular machine controlling T cell activation. *Science* **285**, 221-227.
- Greenfield EA, Nguyen KA, Kuchroo VK. 1998. CD28/B7 costimulation: a review. *Crit Rev Immunol* **18**, 389-418.
- Greenwood J, Wang Y, Calder VL. 1995. Lymphocyte adhesion and transendothelial migration in the central nervous system: the role of LFA-1, ICAM-1, VLA-4 and VCAM-1. *off. Immunology* **86**, 408-415.
- Greenwood J, Willis AE, Perham RN. 1991. Multiple display of foreign peptides on a filamentous bacteriophage. Peptides from Plasmodium falciparum circumsporozoite protein as antigens. *J Mol Biol* **220**, 821-827.
- Greve JM, Davis G, Meyer AM, Forte CP, Yost SC, Marlor CW, Kamarck ME, McClelland A. 1989. The major human rhinovirus receptor is ICAM-1. *Cell* **56**, 839-847.
- Griffiths CE, Railan D, Gallatin WM, Cooper KD. 1995. The ICAM-3/LFA-1 interaction is critical for epidermal Langerhans cell alloantigen presentation to CD4+ T cells. *Br J Dermatol* **133**, 823-829.
- Grihalde ND, Chen YC, Golden A, Gubbins E, Mandecki W. 1995. Epitope mapping of anti-HIV and anti-HCV monoclonal antibodies and characterization of epitope mimics using a filamentous phage peptide library. *Gene* **166**, 187-195.

- Grunstein MM, Hakonarson H, Maskeri N, Kim C, Chuang S. 2000. Intrinsic ICAM-1/LFA-1 activation mediates altered responsiveness of atopic asthmatic airway smooth muscle. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **278**, L1154-1163.
- Gulubova MV. 2002. Expression of cell adhesion molecules, their ligands and tumour necrosis factor alpha in the liver of patients with metastatic gastrointestinal carcinomas. *Histochem J* **34**, 67-77.
- Gursoy RN, Siahaan TJ. 1999. Binding and internalization of an ICAM-1 peptide by the surface receptors of T cells. *J Pept Res* **53**, 414-421.
- Hakomori S. 1996. Tumor malignancy defined by aberrant glycosylation and sphingo(glyco)lipid metabolism. *Cancer Res* **56**, 5309-5318.
- Hamilton MS, Ball J, Bromidge E, Franklin IM. 1991. Surface antigen expression of human neoplastic plasma cells includes molecules associated with lymphocyte recirculation and adhesion. *Br J Haematol* **78**, 60-65.
- Hardy JD. 1999. The first lung transplant in man (1963) and the first heart transplant in man (1964). *Transplant Proc* **31**, 25-29.
- Harning R, Myers C, Merluzzi VJ. 1993. Monoclonal antibodies to lymphocyte function-associated antigen-1 inhibit invasion of human lymphoma and metastasis of murine lymphoma. *Clin Exp Metastasis* **11**, 337-342.
- Harrison JL, Williams SC, Winter G, Nissim A. 1996. Screening of phage antibody libraries. *Methods Enzymol* **267**, 83-109.
- Hashimoto M, Shingu M, Ezaki I, Nobunaga M, Minamihara M, Kato K, Sumioki H. 1994. Production of soluble ICAM-1 from human endothelial cells induced by IL-1 beta and TNF-alpha. *Inflammation* **18**, 163-173.
- Hayashi T, Takahashi T, Motoya S, Ishida T, Itoh F, Adachi M, Hinoda Y, Imai K. 2001. MUC1 mucin core protein binds to the domain 1 of ICAM-1. *Digestion* **63 Suppl 1**, 87-92.
- Hayflick JS, Kilgannon P, Gallatin WM. 1998. The intercellular adhesion molecule (ICAM) family of proteins. New members and novel functions. *Immunol Res* **17**, 313-327.
- Hicklin DJ, Marincola FM, Ferrone S. 1999. HLA class I antigen downregulation in human cancers: T-cell immunotherapy revives an old story. *Mol Med Today* **5**, 178-186.
- Hill DF, Petersen GB. 1982. Nucleotide sequence of bacteriophage f1 DNA. *J Virol* **44**, 32-46.
- Hinoda Y, Takahashi T, Hayashi T, Suwa T, Makiguchi Y, Itoh F, Adachi M, Imai K. 1998. Enhancement of reactivity of anti-MUC1 core protein antibody and killing activity of anti-MUC1 cytotoxic T cells by deglycosylation of target tissues or cells. *J Gastroenterol* **33**, 164-171.
- Ho M, Hickey MJ, Murray AG, Andonegui G, Kubes P. 2000. Visualization of Plasmodium falciparum-endothelium interactions in human microvasculature: mimicry of leukocyte recruitment. *J Exp Med* **192**, 1205-1211.

- Holzmann B, Johnson JP, Kaudewitz P, Riethmuller G. 1985. In situ analysis of antigens on malignant and benign cells of the melanocyte lineage. Differential expression of two surface molecules, gp75 and p89. *J Exp Med* **161**, 366-377.
- Hong YS, Laks H, Cui G, Chong T, Sen L. 2002. Localized immunosuppression in the cardiac allograft induced by a new liposome-mediated IL-10 gene therapy. *J Heart Lung Transplant* **21**, 1188-1200.
- Hoover-Litty H, Greve JM. 1993. Formation of rhinovirus-soluble ICAM-1 complexes and conformational changes in the virion. *J Virol* **67**, 390-397.
- Horley KJ, Carpenito C, Baker B, Takei F. 1989. Molecular cloning of murine intercellular adhesion molecule (ICAM-1). *Embo J* **8**, 2889-2896.
- Horsman MR, Murata R. 2002. Combination of vascular targeting agents with thermal or radiation therapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **54**, 1518-1523.
- Hou Y, Gu XX. 2003. Development of peptide mimotopes of lipooligosaccharide from nontypeable *Haemophilus influenzae* as vaccine candidates. *J Immunol* **170**, 4373-4379.
- Houghten RA. 1985. General method for the rapid solid-phase synthesis of large numbers of peptides: specificity of antigen-antibody interaction at the level of individual amino acids. *Proc Natl Acad Sci U S A* **82**, 5131-5135.
- Houghten RA, Pinilla C, Blondelle SE, Appel JR, Dooley CT, Cuervo JH. 1991. Generation and use of synthetic peptide combinatorial libraries for basic research and drug discovery. *Nature* **354**, 84-86.
- Humphries MJ. 2000. Integrin structure. *Biochem Soc Trans* **28**, 311-339.
- Hung MN, Lee BH. 2002. Purification and characterization of a recombinant beta-galactosidase with transgalactosylation activity from *Bifidobacterium infantis* HL96. *Appl Microbiol Biotechnol* **58**, 439-445.
- Huth JR, Olejniczak ET, Mendoza R, Liang H, Harris EA, Lupper ML, Jr., Wilson AE, Fesik SW, Staunton DE. 2000. NMR and mutagenesis evidence for an I domain allosteric site that regulates lymphocyte function-associated antigen 1 ligand binding. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 5231-5236.
- Iezzi G, Scotet E, Scheidegger D, Lanzavecchia A. 1999. The interplay between the duration of TCR and cytokine signaling determines T cell polarization. *Eur J Immunol* **29**, 4092-4101.
- Investigators EAST. 2001. Use of anti-ICAM-1 therapy in ischemic stroke: results of the Enlimomab Acute Stroke Trial. *Neurology* **57**, 1428-1434.
- Ippen-Ihler KeM, S (1991) Conjugation among enteric bacteria: Matin systems dependent on expression of pili. In 'Microbial cell-cell interactions'. (Ed. M Dworkin) pp. 35-69. (American Society for microbiology: Washington, DC)
- Isobe M, Yagita H, Okumura K, Ihara A. 1992. Specific acceptance of cardiac allograft after treatment with antibodies to ICAM-1 and LFA-1. *Science* **255**, 1125-1127.
- Issekutz AC, Rowter D, Springer TA. 1999. Role of ICAM-1 and ICAM-2 and alternate CD11/CD18 ligands in neutrophil transendothelial migration. *J Leukoc Biol* **65**, 117-126.

Ivanenko A, McKerny DD, Kenyon JL, Airey JA, Sutko JL. 1995. Embryonic chicken skeletal muscle cells fail to develop normal excitation-contraction coupling in the absence of the alpha ryanodine receptor. Implications for a two-ryanodine receptor system. *J Biol Chem* **270**, 4220-4223.

Jaafari MR, Foldvari M. 2002. Targeting of liposomes to human keratinocytes through adhesive peptides from immunoglobulin domains in the presence of IFN-gamma. *Drug Deliv* **9**, 1-9.

Jiang Z, Woda BA, Savas L, Fraire AE. 1998. Expression of ICAM-1, VCAM-1, and LFA-1 in adenocarcinoma of the lung with observations on the expression of these adhesion molecules in non-neoplastic lung tissue. *Mod Pathol* **11**, 1189-1192.

Johnson JP, Stade BG, Holzmann B, Schwable W, Riethmuller G. 1989. De novo expression of intercellular-adhesion molecule 1 in melanoma correlates with increased risk of metastasis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**, 641-644.

Joyce JA, Laakkonen P, Bernasconi M, Bergers G, Ruoslahti E, Hanahan D. 2003. Stage-specific vascular markers revealed by phage display in a mouse model of pancreatic islet tumorigenesis. *Cancer Cell* **4**, 393-403.

Jun CD, Shimaoka M, Carman CV, Takagi J, Springer TA. 2001. Dimerization and the effectiveness of ICAM-1 in mediating LFA-1-dependent adhesion. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 6830-6835.

Kadono T, Venturi GM, Steeber DA, Tedder TF. 2002. Leukocyte rolling velocities and migration are optimized by cooperative L-selectin and intercellular adhesion molecule-1 functions. *J Immunol* **169**, 4542-4550.

Kam JL, Regimbald LH, Hilgers JH, Hoffman P, Krantz MJ, Longenecker BM, Hugh JC. 1998. MUC1 synthetic peptide inhibition of intercellular adhesion molecule-1 and MUC1 binding requires six tandem repeats. *Cancer Res* **58**, 5577-5581.

Kamata T, Wright R, Takada Y. 1995. Critical threonine and aspartic acid residues within the I domains of beta 2 integrins for interactions with intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) and C3bi. *J Biol Chem* **270**, 12531-12535.

Kamoun M. 2001. Cellular and molecular parameters in human renal allograft rejection. *Clin Biochem* **34**, 29-34.

Katz SM, Bennett F, Stecker K, Clark JH, Pham T, Wang ME, Kahan BD, Stepkowski SM. 2000. ICAM-1 antisense oligodeoxynucleotide improves islet allograft survival and function. *Cell Transplant* **9**, 817-828.

Kavanaugh AF, Davis LS, Jain RI, Nichols LA, Norris SH, Lipsky PE. 1996. A phase I/II open label study of the safety and efficacy of an anti-ICAM-1 (intercellular adhesion molecule-1; CD54) monoclonal antibody in early rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* **23**, 1338-1344.

Kawai K, Shahinian A, Mak TW, Ohashi PS. 1996. Skin allograft rejection in CD28-deficient mice. *Transplantation* **61**, 352-355.

King PD, Sandberg ET, Selvakumar A, Fang P, Beaudet AL, Dupont B. 1995. Novel isoforms of murine intercellular adhesion molecule-1 generated by alternative RNA splicing. *J Immunol* **154**, 6080-6093.

- Kini RM, Evans HJ. 1995. A novel approach to the design of potent bioactive peptides by incorporation of proline brackets: antiplatelet effects of Arg-Gly-Asp peptides. *FEBS Lett* **375**, 15-17.
- Kirk AD, Ibrahim MA, Bollinger RR, Dawson DV, Finn OJ. 1992. Renal allograft-infiltrating lymphocytes. A prospective analysis of in vitro growth characteristics and clinical relevance. *Transplantation* **53**, 329-338.
- Kishchenko G, Batliwala H, Makowski L. 1994. Structure of a foreign peptide displayed on the surface of bacteriophage M13. *J Mol Biol* **241**, 208-213.
- Koch AE, Burrows JC, Haines GK, Carlos TM, Harlan JM, Leibovich SJ. 1991. Immunolocalization of endothelial and leukocyte adhesion molecules in human rheumatoid and osteoarthritic synovial tissues. *Lab Invest* **64**, 313-320.
- Kumasaka T, Quinlan WM, Doyle NA, Condon TP, Sligh J, Takei F, Beaudet A, Bennett CF, Doerschuk CM. 1996. Role of the intercellular adhesion molecule-1(ICAM-1) in endotoxin-induced pneumonia evaluated using ICAM-1 antisense oligonucleotides, anti-ICAM-1 monoclonal antibodies, and ICAM-1 mutant mice. *J Clin Invest* **97**, 2362-2369.
- Kusterer K, Bojunga J, Enghofer M, Heidenthal E, Usadel KH, Kolb H, Martin S. 1998. Soluble ICAM-1 reduces leukocyte adhesion to vascular endothelium in ischemia-reperfusion injury in mice. *Am J Physiol* **275**, G377-380.
- Lalancette M, Aoudjit F, Potworowski EF, St-Pierre Y. 2000. Resistance of ICAM-1-deficient mice to metastasis overcome by increased aggressiveness of lymphoma cells. *Blood* **95**, 314-319.
- Lam KS, Salmon SE, Hersh EM, Hruby VJ, Kazmierski WM, Knapp RJ. 1991. A new type of synthetic peptide library for identifying ligand-binding activity. *Nature* **354**, 82-84.
- Languino LR, Duperray A, Joganic KJ, Fornaro M, Thornton GB, Altieri DC. 1995. Regulation of leukocyte-endothelium interaction and leukocyte transendothelial migration by intercellular adhesion molecule 1-fibrinogen recognition. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 1505-1509.
- Languino LR, Plescia J, Duperray A, Brian AA, Plow EF, Geltosky JE, Altieri DC. 1993. Fibrinogen mediates leukocyte adhesion to vascular endothelium through an ICAM-1-dependent pathway. *Cell* **73**, 1423-1434.
- Ledebur HC, Parks TP. 1995. Transcriptional regulation of the intercellular adhesion molecule-1 gene by inflammatory cytokines in human endothelial cells. Essential roles of a variant NF-kappa B site and p65 homodimers. *J Biol Chem* **270**, 933-943.
- Lee JO, Rieu P, Arnaout MA, Liddington R. 1995. Crystal structure of the A domain from the alpha subunit of integrin CR3 (CD11b/CD18). *Cell* **80**, 631-638.
- Leitinger B, Hogg N. 2000. Effects of I domain deletion on the function of the beta2 integrin lymphocyte function-associated antigen-1. *Mol Biol Cell* **11**, 677-690.
- Lener D, Benarous R, Calogero RA. 1995. Use of a constrain phage displayed-peptide library for the isolation of peptides binding to HIV-1 nucleocapsid protein (NCp7). *FEBS Lett* **361**, 85-88.
- Lossinsky AS, Buttle KF, Pluta R, Mossakowski MJ, Wisniewski HM. 1999. Immunoultrastructural expression of intercellular adhesion molecule-1 in endothelial cell vesiculotubular structures and

- vesiculovacuolar organelles in blood-brain barrier development and injury. *Cell Tissue Res* **295**, 77-88.
- Lu C, Shimaoka M, Ferzly M, Oxvig C, Takagi J, Springer TA. 2001. An isolated, surface-expressed I domain of the integrin alphaLbeta2 is sufficient for strong adhesive function when locked in the open conformation with a disulfide bond. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 2387-2392.
- Lyons PD, Benveniste EN. 1998. Cleavage of membrane-associated ICAM-1 from astrocytes: involvement of a metalloprotease. *Glia* **22**, 103-112.
- Makiguchi Y, Hinoda Y, Imai K. 1996. Effect of MUC1 mucin, an anti-adhesion molecule, on tumor cell growth. *Jpn J Cancer Res* **87**, 505-511.
- Maksymowych WP, Blackburn WD, Jr., Tami JA, Shanahan WR, Jr. 2002. A randomized, placebo controlled trial of an antisense oligodeoxynucleotide to intercellular adhesion molecule-1 in the treatment of severe rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* **29**, 447-453.
- Manolitsas ND, Trigg CJ, McAulay AE, Wang JH, Jordan SE, D'Ardenne AJ, Davies RJ. 1994. The expression of intercellular adhesion molecule-1 and the beta 1-integrins in asthma. *Eur Respir J* **7**, 1439-1444.
- Martz E. 1987. LFA-1 and other accessory molecules functioning in adhesions of T and B lymphocytes. *Hum Immunol* **18**, 3-37.
- Maruo Y, Gochi A, Kaihara A, Shimamura H, Yamada T, Tanaka N, Orita K. 2002. ICAM-1 expression and the soluble ICAM-1 level for evaluating the metastatic potential of gastric cancer. *Int J Cancer* **100**, 486-490.
- Matthews LJ, Davis R, Smith GP. 2002. Immunogenically fit subunit vaccine components via epitope discovery from natural peptide libraries. *J Immunol* **169**, 837-846.
- McConnell SJ, Uveges AJ, Fowlkes DM, Spinella DG. 1996. Construction and screening of M13 phage libraries displaying long random peptides. *Mol Divers* **1**, 165-176.
- McCourt PA, Ek B, Forsberg N, Gustafson S. 1994. Intercellular adhesion molecule-1 is a cell surface receptor for hyaluronan. *J Biol Chem* **269**, 30081-30084.
- McDowall A, Leitinger B, Stanley P, Bates PA, Randi AM, Hogg N. 1998. The I domain of integrin leukocyte function-associated antigen-1 is involved in a conformational change leading to high affinity binding to ligand intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1). *J Biol Chem* **273**, 27396-27403.
- Merrifield RB, Stewart JM. 1965. Automated peptide synthesis. *Nature* **207**, 522-523.
- Meulemans EV, Slobbe R, Wasterval P, Ramaekers FC, van Eys GJ. 1994. Selection of phage-displayed antibodies specific for a cytoskeletal antigen by competitive elution with a monoclonal antibody. *J Mol Biol* **244**, 353-360.
- Miller J, Knorr R, Ferrone M, Houdei R, Carron CP, Dustin ML. 1995. Intercellular adhesion molecule-1 dimerization and its consequences for adhesion mediated by lymphocyte function associated-1. *J Exp Med* **182**, 1231-1241.
- Minami S, Furui J, Kanematsu T. 2001. Role of carcinoembryonic antigen in the progression of colon cancer cells that express carbohydrate antigen. *Cancer Res* **61**, 2732-2735.

- Mizgerd JP, Spieker MR, Lupa MM. 2002. Exon truncation by alternative splicing of murine ICAM-1. *Physiol Genomics* **12**, 47-51.
- Mizuno T, Yoshihara Y, Inazawa J, Kagamiyama H, Mori K. 1997. cDNA cloning and chromosomal localization of the human telencephalin and its distinctive interaction with lymphocyte function-associated antigen-1. *J Biol Chem* **272**, 1156-1163.
- Moe GR, Tan S, Granoff DM. 1999. Molecular mimetics of polysaccharide epitopes as vaccine candidates for prevention of *Neisseria meningitidis* serogroup B disease. *FEMS Immunol Med Microbiol* **26**, 209-226.
- Monks CR, Freiberg BA, Kupfer H, Sciaky N, Kupfer A. 1998. Three-dimensional segregation of supramolecular activation clusters in T cells. *Nature* **395**, 82-86.
- Montefort S, Lai CK, Kapahi P, Leung J, Lai KN, Chan HS, Haskard DO, Howarth PH, Holgate ST. 1994. Circulating adhesion molecules in asthma. *Am J Respir Crit Care Med* **149**, 1149-1152.
- Montefort S, Roche WR, *et al.* 1992. Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) and endothelial leucocyte adhesion molecule-1 (ELAM-1) expression in the bronchial mucosa of normal and asthmatic subjects. *Eur Respir J* **5**, 815-823.
- Montoya MC, Sancho D, *et al.* 2002. Role of ICAM-3 in the initial interaction of T lymphocytes and APCs. *Nat Immunol* **3**, 159-168.
- Moore KL, Patel KD, Bruehl RE, Li F, Johnson DA, Lichenstein HS, Cummings RD, Bainton DF, McEver RP. 1995. P-selectin glycoprotein ligand-1 mediates rolling of human neutrophils on P-selectin. *J Cell Biol* **128**, 661-671.
- Morisaki N, Takahashi K, Shiina R, Zenibayashi M, Otabe M, Yoshida S, Saito Y. 1994. Platelet-derived growth factor is a potent stimulator of expression of intercellular adhesion molecule-1 in human arterial smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun* **200**, 612-618.
- Murciano JC, Muro S, Koniaris L, Christofidou-Solomidou M, Harshaw DW, Albelda SM, Granger DN, Cines DB, Muzykantov VR. 2003. ICAM-directed vascular immunotargeting of antithrombotic agents to the endothelial luminal surface. *Blood* **101**, 3977-3984.
- Natali P, Nicotra MR, Cavaliere R, Bigotti A, Romano G, Temponi M, Ferrone S. 1990. Differential expression of intercellular adhesion molecule 1 in primary and metastatic melanoma lesions. *Cancer Res* **50**, 1271-1278.
- Natali PG, Hamby CV, Felding-Habermann B, Liang B, Nicotra MR, Di Filippo F, Giannarelli D, Temponi M, Ferrone S. 1997. Clinical significance of alpha(v)beta3 integrin and intercellular adhesion molecule-1 expression in cutaneous malignant melanoma lesions. *Cancer Res* **57**, 1554-1560.
- Nedbal W, Tomakidi P, Lehmann MJ, Dorfer C, Kohl A, Sczakiel G. 2002. Antisense-mediated inhibition of ICAM-1 expression: a therapeutic strategy against inflammation of human periodontal tissue. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev* **12**, 71-78.
- Neumeister P, Eibl M, Zinke-Cerwenka W, Scarpatetti M, Sill H, Linkesch W. 2001. Hepatic veno-occlusive disease in two patients with relapsed acute myeloid leukemia treated with anti-CD33 calicheamicin (CMA-676) immunoconjugate. *Ann Hematol* **80**, 119-120.

- Nicklin SA, Von Seggern DJ, Work LM, Pek DC, Dominiczak AF, Nemerow GR, Baker AH. 2001. Ablating adenovirus type 5 fiber-CAR binding and HI loop insertion of the SIGYPLP peptide generate an endothelial cell-selective adenovirus. *Mol Ther* **4**, 534-542.
- Nicklin SA, White SJ, Watkins SJ, Hawkins RE, Baker AH. 2000. Selective targeting of gene transfer to vascular endothelial cells by use of peptides isolated by phage display. *Circulation* **102**, 231-237.
- Niethammer AG, Xiang R, Becker JC, Wodrich H, Pertl U, Karsten G, Eliceiri BP, Reisfeld RA. 2002. A DNA vaccine against VEGF receptor 2 prevents effective angiogenesis and inhibits tumor growth. *Nat Med* **8**, 1369-1375.
- Nortamo P, Li R, Renkonen R, Timonen T, Prieto J, Patarroyo M, Gahmberg CG. 1991. The expression of human intercellular adhesion molecule-2 is refractory to inflammatory cytokines. *Eur J Immunol* **21**, 2629-2632.
- Ochietti B, Lemieux P, Kabanov AV, Vinogradov S, St-Pierre Y, Alakhov V. 2002. Inducing neutrophil recruitment in the liver of ICAM-1-deficient mice using polyethyleneimine grafted with Pluronic P123 as an organ-specific carrier for transgenic ICAM-1. *Gene Ther* **9**, 939-945.
- Ockenhouse CF, Betageri R, Springer TA, Staunton DE. 1992. Plasmodium falciparum-infected erythrocytes bind ICAM-1 at a site distinct from LFA-1, Mac-1, and human rhinovirus. *Cell* **68**, 63-69.
- Osterud B, Bjorklid E. 2001. The tissue factor pathway in disseminated intravascular coagulation. *Semin Thromb Hemost* **27**, 605-617.
- Palladino MA, Welte K, Carroll AM, Oettgen HF. 1984. Characterization of interleukin 2 (IL-2)-dependent cytotoxic T-cell clones. V. Transfer of resistance to allografts and tumor grafts requires exogenous IL-2. *Cell Immunol* **86**, 299-307.
- Papi A, Johnston SL. 1999. Rhinovirus infection induces expression of its own receptor intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) via increased NF-kappaB-mediated transcription. *J Biol Chem* **274**, 9707-9720.
- Parmley SF, Smith GP. 1988. Antibody-selectable filamentous fd phage vectors: affinity purification of target genes. *Gene* **73**, 305-318.
- Pasqualini R, Koivunen E, Ruoslahti E. 1995. A peptide isolated from phage display libraries is a structural and functional mimic of an RGD-binding site on integrins. *J Cell Biol* **130**, 1189-1196.
- Pasqualini R, Ruoslahti E. 1996. Organ targeting in vivo using phage display peptide libraries. *Nature* **380**, 364-366.
- Patey N, Vazeux R, Canioni D, Potter T, Gallatin WM, Brousse N. 1996. Intercellular adhesion molecule-3 on endothelial cells. Expression in tumors but not in inflammatory responses. *Am J Pathol* **148**, 465-472.
- Peterson DA, DiPaolo RJ, Kanagawa O, Unanue ER. 1999. Cutting edge: negative selection of immature thymocytes by a few peptide-MHC complexes: differential sensitivity of immature and mature T cells. *J Immunol* **162**, 3117-3120.

- Picker LJ, Warnock RA, Burns AR, Doerschuk CM, Berg EL, Butcher EC. 1991. The neutrophil selectin LECAM-1 presents carbohydrate ligands to the vascular selectins ELAM-1 and GMP-140. *Cell* **66**, 921-933.
- Popkov M, Lussier I, Medvedkine V, Esteve PO, Alakhov V, Mandeville R. 1998. Multidrug-resistance drug-binding peptides generated by using a phage display library. *Eur J Biochem* **251**, 155-163.
- Prens E, t Hooft-Benne K, Tank B, Van Damme J, van Joost T, Benner R. 1996. Adhesion molecules and IL-1 costimulate T lymphocytes in the autologous MECLR in psoriasis. *Arch Dermatol Res* **288**, 68-73.
- Prezzi C, Nuzzo M, Meola A, Delmastro P, Galfre G, Cortese R, Nicosia A, Monaci P. 1996. Selection of antigenic and immunogenic mimics of hepatitis C virus using sera from patients. *J Immunol* **156**, 4504-4513.
- Pryce G, Male D, Campbell I, Greenwood J. 1997. Factors controlling T-cell migration across rat cerebral endothelium in vitro. *J Neuroimmunol* **75**, 84-94.
- Puzon-McLaughlin W, Kamata T, Takada Y. 2000. Multiple discontinuous ligand-mimetic antibody binding sites define a ligand binding pocket in integrin alpha(IIb)beta(3). *J Biol Chem* **275**, 7795-7802.
- Ran S, Thorpe PE. 2002. Phosphatidylserine is a marker of tumor vasculature and a potential target for cancer imaging and therapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **54**, 1479-1484.
- Randi AM, Hogg N. 1994. I domain of beta 2 integrin lymphocyte function-associated antigen-1 contains a binding site for ligand intercellular adhesion molecule-1. *J Biol Chem* **269**, 12395-12398.
- Rapoza MP, Webster RE. 1995. The products of gene I and the overlapping in-frame gene XI are required for filamentous phage assembly. *J Mol Biol* **248**, 627-638.
- Rasmussen UB, Schreiber V, Schultz H, Mischler F, Schughart K. 2002. Tumor cell-targeting by phage-displayed peptides. *Cancer Gene Ther* **9**, 606-612.
- Rebar EJ, Greisman HA, Pabo CO. 1996. Phage display methods for selecting zinc finger proteins with novel DNA-binding specificities. *Methods Enzymol* **267**, 129-149.
- Rebar EJ, Pabo CO. 1994. Zinc finger phage: affinity selection of fingers with new DNA-binding specificities. *Science* **263**, 671-673.
- Regidor PA, Callies R, Regidor M, Schindler AE. 1998. Expression of the cell adhesion molecules ICAM-1 and VCAM-1 in the cytosol of breast cancer tissue, benign breast tissue and corresponding sera. *Eur J Gynaecol Oncol* **19**, 377-383.
- Reilly PL, Woska JR, Jr., Jeanfavre DD, McNally E, Rothlein R, Bormann BJ. 1995. The native structure of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) is a dimer. Correlation with binding to LFA-1. *J Immunol* **155**, 529-532.
- Renkonen R, Mennander A, Ustinov J, Mattila P. 1990. Activation of protein kinase C is crucial in the regulation of ICAM-1 expression on endothelial cells by interferon-gamma. *Int Immunol* **2**, 719-724.

- Riise GC, Larsson S, Lowhagen O, Andersson BA. 1995. Circulating leukocyte adhesion molecules in stable asthma and nonobstructive chronic bronchitis. *Allergy* **50**, 693-698.
- Rosenstein Y, Park JK, Hahn WC, Rosen FS, Bierer BE, Burakoff SJ. 1991. CD43, a molecule defective in Wiskott-Aldrich syndrome, binds ICAM-1. *Nature* **354**, 233-235.
- Rothlein R, Mainolfi EA, Czajkowski M, Marlin SD. 1991. A form of circulating ICAM-1 in human serum. *J Immunol* **147**, 3788-3793.
- Rueckert (1996) Picornaviridae: the viruses and their replication. In 'Fields Virology'. (Ed. B Fields, Knipe, DM, Howley, PM et al.,) pp. 1609-1654. (Lippincott-Raven: Philadelphia)
- Ruoslahti E, Rajotte D. 2000. An address system in the vasculature of normal tissues and tumors. *Annu Rev Immunol* **18**, 813-827.
- Russel M. 1991. Filamentous phage assembly. *Mol Microbiol* **5**, 1607-1613.
- Sadhu C, Lipsky B, Erickson HP, Hayflick J, Dick KO, Gallatin WM, Staunton DE. 1994. LFA-1 binding site in ICAM-3 contains a conserved motif and non-contiguous amino acids. *Cell Adhes Commun* **2**, 429-440.
- Salmela K, Wramner L, et al. 1999. A randomized multicenter trial of the anti-ICAM-1 monoclonal antibody (enlimomab) for the prevention of acute rejection and delayed onset of graft function in cadaveric renal transplantation: a report of the European Anti-ICAM-1 Renal Transplant Study Group. *Transplantation* **67**, 729-736.
- Salomon B, Bluestone JA. 2001. Complexities of CD28/B7: CTLA-4 costimulatory pathways in autoimmunity and transplantation. *Annu Rev Immunol* **19**, 225-252.
- Sanejouand YH. 1996. Normal-mode analysis suggests important flexibility between the two N-terminal domains of CD4 and supports the hypothesis of a conformational change in CD4 upon HIV binding. *Protein Eng* **9**, 671-677.
- Sans E, Delachanal E, Duperray A. 2001. Analysis of the roles of ICAM-1 in neutrophil transmigration using a reconstituted mammalian cell expression model: implication of ICAM-1 cytoplasmic domain and Rho-dependent signaling pathway. *J Immunol* **166**, 544-551.
- Scheynius A, Camp RL, Pure E. 1993. Reduced contact sensitivity reactions in mice treated with monoclonal antibodies to leukocyte function-associated molecule-1 and intercellular adhesion molecule-1. *J Immunol* **150**, 655-663.
- Scheynius A, Engstrand L. 1991. Gastric epithelial cells in Helicobacter pylori-associated gastritis express HLA-DR but not ICAM-1. *Scand J Immunol* **33**, 237-241.
- Schopf RE, Hoffmann A, Jung M, Morsches B, Bork K. 1986. Stimulation of T cells by autologous mononuclear leukocytes and epidermal cells in psoriasis. *Arch Dermatol Res* **279**, 89-94.
- Schreiber S, Nikolaus S, Malchow H, Kruis W, Lochs H, Raedler A, Hahn EG, Krummnerl T, Steinmann G. 2001. Absence of efficacy of subcutaneous antisense ICAM-1 treatment of chronic active Crohn's disease. *Gastroenterology* **120**, 1339-1346.
- Seth R, Raymond FD, Makgoba MW. 1991. Circulating ICAM-1 isoforms: diagnostic prospects for inflammatory and immune disorders. *Lancet* **338**, 83-84.

- Shafren DR, Dorahy DJ, Greive SJ, Burns GF, Barry RD. 1997. Mouse cells expressing human intercellular adhesion molecule-1 are susceptible to infection by coxsackievirus A21. *J Virol* **71**, 785-789.
- Shannon JP, Silva MV, Brown DC, Larson RS. 2001. Novel cyclic peptide inhibits intercellular adhesion molecule-1-mediated cell aggregation. *J Pept Res* **58**, 140-150.
- Shattil SJ, O'Toole T, Eigenthaler M, Thon V, Williams M, Babior BM, Ginsberg MH. 1995. Beta 3-endonexin, a novel polypeptide that interacts specifically with the cytoplasmic tail of the integrin beta 3 subunit. *J Cell Biol* **131**, 807-816.
- Shibuya T, Takei Y, Hirose M, Ikejima K, Enomoto N, Maruyama A, Sato N. 2002. A double-strand decoy DNA oligomer for NF-kappaB inhibits TNFalpha-induced ICAM-1 expression in sinusoidal endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* **298**, 10-16.
- Shimaoka M, Shifman JM, Jing H, Takagi J, Mayo SL, Springer TA. 2000. Computational design of an integrin I domain stabilized in the open high affinity conformation. *Nat Struct Biol* **7**, 674-678.
- Shimoyama S, Gansauge F, Gansauge S, Widmaier U, Oohara T, Beger HG. 1997. Overexpression of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) in pancreatic adenocarcinoma in comparison with normal pancreas. *Pancreas* **14**, 181-186.
- Sidhu SS. 2001. Engineering M13 for phage display. *Biomol Eng* **18**, 57-63.
- Siemann DW, Rojiani AM. 2002. Enhancement of radiation therapy by the novel vascular targeting agent ZD6126. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **53**, 164-171.
- Siemann DW, Warrington KH, Horsman MR. 2000. Targeting tumor blood vessels: an adjuvant strategy for radiation therapy. *Radiother Oncol* **57**, 5-12.
- Simmons D, Makgoba MW, Seed B. 1988. ICAM, an adhesion ligand of LFA-1, is homologous to the neural cell adhesion molecule NCAM. *Nature* **331**, 624-627.
- Sligh JE, Jr., Ballantyne CM, Rich SS, Hawkins HK, Smith CW, Bradley A, Beaudet AL. 1993. Inflammatory and immune responses are impaired in mice deficient in intercellular adhesion molecule 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 8529-8533.
- Smith GP. 1985. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science* **228**, 1315-1317.
- Smith GP, Petrenko VA. 1997. Phage Display. *Chem Rev* **97**, 391-410.
- Smith JD, Chitnis CE, Craig AG, Roberts DJ, Hudson-Taylor DE, Peterson DS, Pinches R, Newbold CI, Miller LH. 1995. Switches in expression of Plasmodium falciparum var genes correlate with changes in antigenic and cytoadherent phenotypes of infected erythrocytes. *Cell* **82**, 101-110.
- Smith MD, Slavotinek J, Au V, Weedon H, Parker A, Coleman M, Roberts-Thomson PJ, Ahern MJ. 2001. Successful treatment of rheumatoid arthritis is associated with a reduction in synovial membrane cytokines and cell adhesion molecule expression. *Rheumatology (Oxford)* **40**, 965-977.
- Springer TA. 1997. Folding of the N-terminal, ligand-binding region of integrin alpha-subunits into a beta-propeller domain. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 65-72.

- Sriramarao P, Languino LR, Altieri DC. 1996. Fibrinogen mediates leukocyte-endothelium bridging in vivo at low shear forces. *Blood* **88**, 3416-3423.
- St Pierre Y, Watts TH. 1991. Characterization of the signaling function of MHC class II molecules during antigen presentation by B cells. *J Immunol* **147**, 2875-2882.
- Stanciu LA, Djukanovic R. 1998. The role of ICAM-1 on T-cells in the pathogenesis of asthma. *Eur Respir J* **11**, 949-957.
- Stanley P, Bates PA, Harvey J, Bennett RI, Hogg N. 1994. Integrin LFA-1 alpha subunit contains an ICAM-1 binding site in domains V and VI. *Embo J* **13**, 1790-1798.
- Stanley P, Hogg N. 1998. The I domain of integrin LFA-1 interacts with ICAM-1 domain 1 at residue Glu-34 but not Gln-73. *J Biol Chem* **273**, 3358-3362.
- Stanley P, McDowall A, Bates PA, Brashaw J, Hogg N. 2000. The second domain of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) maintains the structural integrity of the leucocyte function-associated antigen-1 (LFA-1) ligand-binding site in the first domain. *Biochem J* **351**, 79-86.
- Staunton DE, Dustin ML, Erickson HP, Springer TA. 1990. The arrangement of the immunoglobulin-like domains of ICAM-1 and the binding sites for LFA-1 and rhinovirus. *Cell* **61**, 243-254.
- Staunton DE, Dustin ML, Springer TA. 1989. Functional cloning of ICAM-2, a cell adhesion ligand for LFA-1 homologous to ICAM-1. *Nature* **339**, 61-64.
- Staunton DE, Marlin SD, Stratowa C, Dustin ML, Springer TA. 1988. Primary structure of ICAM-1 demonstrates interaction between members of the immunoglobulin and integrin supergene families. *Cell* **52**, 925-933.
- Staunton DE, Merluzzi VJ, Rothlein R, Barton R, Marlin SD, Springer TA. 1989. A cell adhesion molecule, ICAM-1, is the major surface receptor for rhinoviruses. *Cell* **56**, 849-853.
- Steeber DA, Campbell MA, Basit A, Ley K, Tedder TF. 1998. Optimal selectin-mediated rolling of leukocytes during inflammation in vivo requires intercellular adhesion molecule-1 expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 7562-7567.
- Steeber DA, Tang ML, Green NE, Zhang XQ, Sloane JE, Tedder TF. 1999. Leukocyte entry into sites of inflammation requires overlapping interactions between the L-selectin and ICAM-1 pathways. *J Immunol* **163**, 2176-2186.
- Stephens P, Romer JT, Spitali M, Shock A, Ortlepp S, Figdor CG, Robinson MK. 1995. KIM127, an antibody that promotes adhesion, maps to a region of CD18 that includes cysteine-rich repeats. *Cell Adhes Commun* **3**, 375-384.
- Stepkowski SM, Tu Y, Condon TP, Bennett CF. 1994. Blocking of heart allograft rejection by intercellular adhesion molecule-1 antisense oligonucleotides alone or in combination with other immunosuppressive modalities. *J Immunol* **153**, 5336-5346.
- Stewart M, Hogg N. 1996. Regulation of leukocyte integrin function: affinity vs. avidity. *J Cell Biochem* **61**, 554-561.

- Stratowa C, Audette M. 1995. Transcriptional regulation of the human intercellular adhesion molecule-1 gene: a short overview. *Immunobiology* **193**, 293-304.
- Sun JJ, Zhou XD, Liu YK, Tang ZY, Feng JX, Zhou G, Xue Q, Chen J. 1999. Invasion and metastasis of liver cancer: expression of intercellular adhesion molecule 1. *J Cancer Res Clin Oncol* **125**, 28-34.
- Szardenings M, Tornroth S, Mutulis F, Muceniece R, Keinanen K, Kuusinen A, Wikberg JE. 1997. Phage display selection on whole cells yields a peptide specific for melanocortin receptor 1. *J Biol Chem* **272**, 27943-27948.
- Takahashi Y, Kitadai Y, Bucana CD, Cleary KR, Ellis LM. 1995. Expression of vascular endothelial growth factor and its receptor, KDR, correlates with vascularity, metastasis, and proliferation of human colon cancer. *Cancer Res* **55**, 3964-3968.
- Takei F. 1985. Inhibition of mixed lymphocyte response by a rat monoclonal antibody to a novel murine lymphocyte activation antigen (MALA-2). *J Immunol* **134**, 1403-1407.
- Tempia-Caliera AA, Horvath LZ, Zimmermann A, Tihanyi TT, Korc M, Friess H, Buchler MW. 2002. Adhesion molecules in human pancreatic cancer. *J Surg Oncol* **79**, 93-100.
- Thomas GE, Esteban JM, Raubitschek A, Wong JY. 1995. gamma-Interferon administration after 90yttrium radiolabeled antibody therapy: survival and hematopoietic toxicity studies. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **31**, 529-534.
- Tibbetts SA, Seetharama Jois D, Siahaan TJ, Benedict SH, Chan MA. 2000. Linear and cyclic LFA-1 and ICAM-1 peptides inhibit T cell adhesion and function. *Peptides* **21**, 1161-1167.
- Torchilin VP, Lukyanov AN. 2003. Peptide and protein drug delivery to and into tumors: challenges and solutions. *Drug Discov Today* **8**, 259-266.
- Tozer GM, Prise VE, Wilson J, Locke RJ, Vojnovic B, Stratford MR, Dennis MF, Chaplin DJ. 1999. Combretastatin A-4 phosphate as a tumor vascular-targeting agent: early effects in tumors and normal tissues. *Cancer Res* **59**, 1626-1634.
- Tsokos M, Fehlauer F. 2001. Post-mortem markers of sepsis: an immunohistochemical study using VLA-4 (CD49d/CD29) and ICAM-1 (CD54) for the detection of sepsis-induced lung injury. *Int J Legal Med* **114**, 291-294.
- Tsujiaki M, Imai K, et al. 1991. Detection of circulating intercellular adhesion molecule-1 antigen in malignant diseases. *Clin Exp Immunol* **85**, 3-8.
- van de Stolpe A, Caldenhoven E, Stade BG, Koenderman L, Raaijmakers JA, Johnson JP, van der Saag PT. 1994. 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate- and tumor necrosis factor alpha-mediated induction of intercellular adhesion molecule-1 is inhibited by dexamethasone. Functional analysis of the human intercellular adhesion molecular-1 promoter. *J Biol Chem* **269**, 6185-6192.
- van de Stolpe A, van der Saag PT. 1996. Intercellular adhesion molecule-1. *J Mol Med* **74**, 13-33.
- van Den Engel NK, Heidenthal E, Vinke A, Kolb H, Martin S. 2000. Circulating forms of intercellular adhesion molecule (ICAM)-1 in mice lacking membranous ICAM-1. *Blood* **95**, 1350-1355.

- Van der Vieren M, Le Trong H, Wood CL, Moore PF, St John T, Staunton DE, Gallatin WM. 1995. A novel leukointegrin, alpha d beta 2, binds preferentially to ICAM-3. *Immunity* **3**, 683-690.
- van Kooyk Y, Figdor CG. 1997. Signalling and adhesive properties of the integrin leucocyte function-associated antigen 1 (LFA-1). *Biochem Soc Trans* **25**, 515-520.
- van Kooyk Y, Weder P, Hogervorst F, Verhoeven AJ, van Seventer G, te Velde AA, Borst J, Keizer GD, Figdor CG. 1991. Activation of LFA-1 through a Ca²⁺(+)-dependent epitope stimulates lymphocyte adhesion. *J Cell Biol* **112**, 345-354.
- van Wezenbeek PM, Hulsebos TJ, Schoenmakers JG. 1980. Nucleotide sequence of the filamentous bacteriophage M13 DNA genome: comparison with phage fd. *Gene* **11**, 129-148.
- Vogetseder W, Dierich MP. 1991. Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1, CD 54) is associated with actin-filaments. *Immunobiology* **182**, 143-151.
- Vuorte J, Lindsberg PJ, Kaste M, Meri S, Jansson SE, Rothlein R, Repo H. 1999. Anti-ICAM-1 monoclonal antibody R6.5 (Enlimomab) promotes activation of neutrophils in whole blood. *J Immunol* **162**, 2353-2357.
- Walsh S, Shah A, Mond J. 2003. Improved pharmacokinetics and reduced antibody reactivity of lymostaphin conjugated to polyethylene glycol. *Antimicrob Agents Chemother* **47**, 554-558.
- Wang J, Springer TA. 1998. Structural specializations of immunoglobulin superfamily members for adhesion to integrins and viruses. *Immunol Rev* **163**, 197-215.
- Watts TH, DeBenedette MA. 1999. T cell co-stimulatory molecules other than CD28. *Curr Opin Immunol* **11**, 286-293.
- Weber C, Calzada-Wack JC, Goretzki M, Pietsch A, Johnson JP, Ziegler-Heitbrock HW. 1995. Retinoic acid inhibits basal and interferon-gamma-induced expression of intercellular adhesion molecule 1 in monocytic cells. *J Leukoc Biol* **57**, 401-406.
- Weber PC, Pantoliano MW, Thompson LD. 1992. Crystal structure and ligand-binding studies of a screened peptide complexed with streptavidin. *Biochemistry* **31**, 9350-9354.
- Welder CA, Lee DH, Takei F. 1993. Inhibition of cell adhesion by microspheres coated with recombinant soluble intercellular adhesion molecule-1. *J Immunol* **150**, 2203-2210.
- Welpley JK, Steininger CN, et al. 1996. A peptide isolated by phage display binds to ICAM-1 and inhibits binding to LFA-1. *Proteins* **26**, 262-270.
- Wetzel SA, McKeithan TW, Parker DC. 2002. Live-cell dynamics and the role of costimulation in immunological synapse formation. *J Immunol* **169**, 6092-6101.
- White SJ, Nicklin SA, Sawamura T, Baker AH. 2001. Identification of peptides that target the endothelial cell-specific LOX-1 receptor. *Hypertension* **37**, 449-455.
- Wolfe SA, Ramm EI, Pabo CO. 2000. Combining structure-based design with phage display to create new Cys(2)His(2) zinc finger dimers. *Structure Fold Des* **8**, 739-750.
- Wu Y, Wan Y, Bian J, Zhao J, Jia Z, Zhou L, Zhou W, Tan Y. 2002. Phage display particles expressing tumor-specific antigens induce preventive and therapeutic anti-tumor immunity in murine p815 model. *Int J Cancer* **98**, 748-753.

- Wulfing C, Sjaastad MD, Davis MM. 1998. Visualizing the dynamics of T cell activation: intracellular adhesion molecule 1 migrates rapidly to the T cell/B cell interface and acts to sustain calcium levels. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 6302-6307.
- Xu H, Gonzalo JA, St Pierre Y, Williams IR, Kupper TS, Cotran RS, Springer TA, Gutierrez-Ramos JC. 1994. Leukocytosis and resistance to septic shock in intercellular adhesion molecule 1-deficient mice. *J Exp Med* **180**, 95-109.
- Yacyshyn BR, Chey WY, et al. 2002. Double blind, placebo controlled trial of the remission inducing and steroid sparing properties of an ICAM-1 antisense oligodeoxynucleotide, alicaforsen (ISIS 2302), in active steroid dependent Crohn's disease. *Gut* **51**, 30-36.
- Yip YL, Smith G, Ward RL. 2001. Comparison of phage pIII, pVIII and GST as carrier proteins for peptide immunisation in Balb/c mice. *Immunol Lett* **79**, 197-202.
- Yipp BG, Anand S, Schollaardt T, Patel KD, Looareesuwan S, Ho M. 2000. Synergism of multiple adhesion molecules in mediating cytoadherence of Plasmodium falciparum-infected erythrocytes to microvascular endothelial cells under flow. *Blood* **96**, 2292-2298.
- Yoshihara Y, Oka S, Nemoto Y, Watanabe Y, Nagata S, Kagamiyama H, Mori K. 1994. An ICAM-related neuronal glycoprotein, telencephalin, with brain segment-specific expression. *Neuron* **12**, 541-553.
- Yoshimura T, Johnson DG. 1993. cDNA cloning and expression of guinea pig neutrophil attractant protein-1 (NAP-1). NAP-1 is highly conserved in guinea pig. *J Immunol* **151**, 6225-6236.
- Youssef PP, Triantafillou S, Parker A, Coleman M, Roberts-Thomson PJ, Ahern MJ, Smith MD. 1996. Effects of pulse methylprednisolone on cell adhesion molecules in the synovial membrane in rheumatoid arthritis. Reduced E-selectin and intercellular adhesion molecule 1 expression. *Arthritis Rheum* **39**, 1970-1979.
- Yusuf-Makagiansar H, Anderson ME, Yakovleva TV, Murray JS, Siahaan TJ. 2002. Inhibition of LFA-1/ICAM-1 and VLA-4/VCAM-1 as a therapeutic approach to inflammation and autoimmune diseases. *Med Res Rev* **22**, 146-167.
- Yusuf-Makagiansar H, Makagiansar IT, Hu Y, Siahaan TJ. 2001. Synergistic inhibitory activity of alpha- and beta-LFA-1 peptides on LFA-1/ICAM-1 interaction. *Peptides* **22**, 1955-1962.
- Yusuf-Makagiansar H, Siahaan TJ. 2001. Binding and internalization of an LFA-1-derived cyclic peptide by ICAM receptors on activated lymphocyte: a potential ligand for drug targeting to ICAM-1-expressing cells. *Pharm Res* **18**, 329-335.
- Zahalka MA, Okon E, Naor D. 1993. Blocking lymphoma invasiveness with a monoclonal antibody directed against the beta-chain of the leukocyte adhesion molecule (CD18). *J Immunol* **150**, 4466-4477.
- Zang Q, Springer TA. 2001. Amino acid residues in the PSI domain and cysteine-rich repeats of the integrin beta2 subunit that restrain activation of the integrin alpha(X)beta(2). *J Biol Chem* **276**, 6922-6929.
- Zhang QW, Kish DD, Fairchild RL. 2003. Absence of allograft icam-1 attenuates alloantigen-specific T cell priming, but not primed T cell trafficking into the graft, to mediate acute rejection. *J Immunol* **170**, 5530-5537.

Zimmermann C, Seiler P, Lane P, Zinkernagel RM. 1997. Antiviral immune responses in CTLA4 transgenic mice. *J Virol* **71**, 1802-1807.