

يارب ساعدنا وقرب الحكمة لعقلنا وخلي الحب والسعادة تجمع شملنا

Oh Dieu! Aide-nous en apportant de la sagesse à notre raison
et laisse l'amour et la joie nous réunir.

Natasha Atlas

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC

THÈSE PRÉSENTÉE À L'INRS-INSTITUT ARMAND-FRAPPIER
COMME EXIGENCE PARTIELLE DU DOCTORAT EN
VIROLOGIE-IMMUNOLOGIE

PAR

BENOIT OCHIETTI

NOUVELLE APPROCHE DE THÉRAPIE GÉNIQUE
CIBLANT L'EXPRESSION D'ICAM-1

Jury :	François Denis	Président du jury
	Yves St-Pierre	Directeur de recherche
	Valery Alakhov	Co-directeur de recherche
	Manuel Caruso	Examineur externe
	Gérard Prud'homme	Examineur externe

INRS-INSTITUT ARMAND-FRAPPIER

AUTOMNE 2002

TABLE DES MATIÈRES

TABLE DES MATIÈRES	ii
LISTE DES TABLEAUX.....	v
LISTE DES FIGURES	vi
LISTE DES ABBRÉVIATIONS	viii
SOMMAIRE	ix
INTRODUCTION	1
CHAPITRE 1	
Revue de littérature	6
1 ICAM-1	7
1.1 Caractéristiques physiques.....	7
1.2 Le gène.....	9
1.3 Régulation de l'expression	9
1.3.1 Au niveau du promoteur.....	9
1.3.2 Au niveau post-transcriptionnel	10
1.3.2.1 Épissage alternatif.....	10
1.3.3 Au niveau post-traductionnel	12
1.3.3.1 Glycosylation	12
1.3.3.2 ICAM-1 soluble	12
1.4 Ligands d'ICAM-1	13
1.4.1 LFA-1	13
1.4.2 MAC-1	14
1.4.3 Autres ligands d'ICAM-1.....	15
1.5 Signalisation	15
1.6 Rôle et fonction.....	16
1.6.1 Recrutement des leucocytes	17
Le modèle du roulement en 3 étapes.....	17
1.6.2 Présentation d'antigène	18
1.6.3 Autres rôles d'ICAM-1	19
1.7 ICAM-1 et cancer	19
1.8 Modèles d'études in vivo.....	21
1.9 Autres ICAMs.....	21
1.10 Thérapie anti-ICAM-1	22
1.10.1 Rejet de greffe	23
1.10.1.1 Généralités	23
1.10.1.2 ICAM-1 et rejet de greffe.....	24
1.10.2 ICAM-1 et autres maladies inflammatoires	25
1.10.3 ICAM-1 et cancer (néoplasie).....	25
1.11 Limitation des anticorps	26
2 Thérapie génique.....	26
2.1 Généralités	26
2.2 ICAM-1 et thérapie génique.....	27
2.2.1 Antisens et rejet de greffe.....	27

2.2.2 Antisens et autres maladies inflammatoires	28
2.2.3 Antisens et cancer.....	28
2.2.4 Vecteur d'expression et cancer/immunothérapie	29
2.3 Limitation des thérapies géniques actuelles	29
2.3.1 Antisens.....	30
2.3.2 Expression	31
2.4 Transporteurs d'ADN	31
2.4.1 Transporteurs viraux	32
2.4.2 Transporteurs non-viraux	32
2.5 Études cliniques.....	33
2.5.1 Maladies génétiques	33
2.5.2 Maladies néoplasiques.....	34
2.6 Copolymères en bloc	35
2.6.1 Historique	35
2.6.2 Structure	36
2.6.3 Polymère ionomérique en bloc.....	36
2.6.3.1 Le bloc A.....	37
2.6.3.1 Le bloc A.....	38
2.6.3.2 Le bloc B.....	40
Contributions	43
CHAPITRE 2	
Altered Organ Accumulation of Oligonucleotides Using Polyethyleneimine Grafted with Poly(ethylene oxide) or Pluronic as Carriers	44
RÉSUMÉ ET CONTRIBUTIONS	45
CHAPITRE 3	
Inhibition of ICAM-1 Expression in Kidneys using Polyethyleneimine Grafted with PEG as a Targeting Carrier.....	56
RÉSUMÉ ET CONTRIBUTIONS	57
CHAPITRE 4	
Inducing Neutrophil Recruitment in the Liver of ICAM-1-deficient Mice using Polyethyleneimine Grafted with Pluronic 123 as an Organ Specific Carrier for Transgenic ICAM-1	91
RÉSUMÉ ET CONTRIBUTIONS	92
CHAPITRE 5	
Isoforms of ICAM-1 in Liver is Responsible for the Sensibility of ICAM-1-deficient Mice to LPS-induced Septic Shock	100

RÉSUMÉ ET CONTRIBUTIONS	101
DISCUSSION GÉNÉRALE et CONCLUSION	117
REMERCIEMENTS	126
RÉFÉRENCES	127
ANNEXE 1	151
ANNEXE 2	154

LISTE DES TABLEAUX

	Pages
CHAPITRE 1	
Tableau 1 Structures des blocs A des copolymères ionomériques.	39
Tableau 2 Structures des blocs B des copolymères ionomériques	41
CHAPITRE 2	
Table 1 Characteristics of synthesized cationic copolymers	50
Table 2 Properties of the complexes between cationic copolymers and ODNs ..	50
CHAPITRE 3	
Table 1 Area Under the Curve (AUC) Values in Organ and Plasma.....	87
CHAPITRE 5	
Table 1 Expected molecular weights of PCR products using murine ICAM-1- specific sets of primers.....	113
Table 2 Mortality following i.p. injection of LPS (50 mg/kg) in mice.....	114

LISTE DES FIGURES

	Pages
CHAPITRE 1	
Figure 1	8
Structure du gène d'ICAM-1 chez les souris C57BL/6, Tm1Bay et JCGR.....	
Figure 2	11
Isoformes d'ICAM-1	
Figure 3	37
Copolymères en bloc.....	
CHAPITRE 2	
Figure 1	51
Cellular uptake of FITC-labeled phosphorothioate ODNs	
Figure 2	52
Biodistribution and pharmacokinetics of a radio-labeled 20-mer phosphorothioate ODN in mice	
Figure 3	52
Biodistribution and pharmacokinetics of a FITC-labeled phosphorothioate ODN in mice	
Figure 4	53
Biodistribution in liver tissue of FITC-ODN alone or formulated with P85-g-PEI(2K)	
CHAPITRE 3	
Figure 1	88
Biodistribution and pharmacokinetics of radio-labeled phosphorothioate oligonucleotides in mice.	
Figure 2	89
RT-PCR analysis of ICAM-1 expression	
Figure 3	90
Immunohistochemical analysis of ICAM-1 in kidney.....	
CHAPITRE 4	
Figure 1	95
RT-PCR analysis of ICAM-1 expression	
Figure 2	96
Immunohistochemical analysis of ICAM-1 expression (left panels) and Ly-6G positive cells (right panels) in the liver	

CHAPITRE 5

Figure 1	RT-PCR analysis of ICAM-1 isoforms expression in LPS-injected mice.....	115
Figure 2	Immunohistochemical analysis of ICAM-1 expression and Ly-6G positive cells in the liver of LPS-injected mice	116

ANNEXE 1

Figure 1	Résultats du criblage <i>in vitro</i> des polymères ionomériques en bloc pour l'inhibition de l'expression d'ICAM-1	152
Figure 2	Résultats du criblage <i>in vitro</i> des polymères ionomériques en bloc pour l'expression d'ICAM-1.....	153

LISTE DES ABBRÉVIATIONS

ADN	acide désoxyribonucléique
ARNm	acide ribonucléique messenger
AUC	<i>Area Under the Curve</i>
CMH	complexe majeur d'histocompatibilité
ICAM-1	<i>Intercellular Adhesion Molecule 1</i>
IFN- γ	interferon γ
IL	interleukine
I.P.	intra-péritonéal
I.V.	intra-veineux
Kb	kilobase
kDa	kiloDalton
LFA-1	<i>Lymphocytes Function-associated Molecule-1</i>
LPS	lipopolysaccharide
ODN	oligodéoxynucléotide
PEI	polyéthylèneimine
PEG, PEO	polyéthylèneglycol, polyéthylèneoxide
PL	polylysine
POP	polyoxypropylène
PS	polyspermine
PCR	Réaction en Chaîne de Polymérase
RT-PCR	Réaction de transcription inverse suivie d'une PCR
TNF- α	Facteur de nécrose tumorale-alpha

SOMMAIRE

ICAM-1 joue un rôle crucial dans le recrutement leucocytaire lors des processus inflammatoires et dans le processus de la présentation d'antigène. ICAM-1 représente donc une cible thérapeutique de choix dans la lutte contre plusieurs maladies inflammatoires et néoplasiques. Les premiers outils thérapeutiques étaient basés sur l'utilisation d'anticorps monoclonaux dans le but de bloquer l'activité d'ICAM-1. Cependant l'échec des thérapies à base d'anticorps force le développement de moyens alternatifs dans le but de contrôler l'activité d'ICAM-1.

La thérapie génique permettrait de moduler l'expression ou l'inhibition de l'expression d'ICAM-1 dans un organe ou compartiment biologique ciblé. Actuellement, les transporteurs d'ADN, à base de virus ou de liposomes, considérés dans les essais cliniques, n'ont pas encore permis d'obtenir des résultats positifs, ce qui est notamment dû aux limitations intrinsèques de ces technologies : toxicité, agrégations, réactions immunitaires, etc.

Cette situation pousse l'industrie à tenter de développer de nouveaux outils, aussi bien dans l'amélioration des molécules d'antisens que dans le design de nouvelles stratégies de formulation transporteurs-ADN. Ces nouveaux types de transporteurs devront être peu toxiques, permettre une biodistribution de l'ADN vers un organe ciblé, être simples à synthétiser et de façon économique.

Ainsi, Supratek Pharma inc. a développé un nouveau concept de transporteurs qui permettraient la formation de complexes stables et solubles en milieu aqueux. Ces transporteurs sont basés sur l'attachement de plusieurs blocs possédant des propriétés physicochimiques désirées. La présente étude avait pour buts d'étudier ces transporteurs, les copolymères ionomériques en bloc, pour le transport de molécules d'ADN *in vitro* et *in vivo*, et de les valider dans des modèles touchant l'expression d'ICAM-1 chez la souris. Les résultats ont démontré que les polymères ionomériques en bloc permettaient une transfection d'oligonucléotides dans des cellules *in vitro* et leur accumulation dans différents organes *in vivo*. L'un de ceux-ci, le PI2080 (PEO(8K)-g-PEI(2K)), a permis une transfection des cellules *in vitro* à un niveau égal ou supérieur à la lipofectine, un transporteur commercial. Suivant l'injection i.v. dans les souris, ce complexe s'est accumulé préférentiellement dans les reins. De plus, un oligonucléotide antisens anti-ICAM-1 a conservé son activité inhibitrice dans cet organe en bloquant l'expression

d'ICAM-1 suivant une injection i.p. de LPS. Un autre polymère, le P85PEI (P85-g-PEI(2K)), bien qu'ayant une activité de transfection plus faible que la lipofectine *in vitro*, a permis l'accumulation d'un oligonucléotide dans le foie tout en évitant presque complètement les reins. Dans le cas du transport de plasmide, le P123PEI complexé à un vecteur d'expression codant pour ICAM-1, a permis une expression d'ICAM-1 dans le foie de souris ICAM-1 déficiente. De plus, cette expression a déclenché le recrutement de neutrophiles dans le foie. Cette observation peut être intéressante à exploiter en permettant le recrutement de cellules effectrices dans un organe ciblé.

Une autre partie du projet a porté sur l'étude des isoformes d'ICAM-1 et leur activité possible chez des souris injectées au LPS. Les résultats ont démontré l'absence d'isoformes dans le foie des souris C57BL/6 et des ICAM-1-déficientes JCGR injectées au LPS, mais la présence des isoformes 4-6 et 3-6 d'ICAM-1 dans le cas des souris ICAM-1-déficientes Tm1Bay. Une infiltration de neutrophiles a également été observée dans ces dernières, ainsi qu'une sensibilité au choc septique induit par le LPS. Ces résultats suggèrent une activité possible des isoformes d'ICAM-1 dans des processus biologiques.

En conclusion, les résultats de ces études ont démontré le potentiel des polymères ionomériques en bloc pour le transport d'ADN *in vivo* et d'en altérer la biodistribution. Le ciblage de l'activité d'ICAM-1 par thérapie génique est possible en utilisant ce type de transporteur. Finalement, les isoformes d'ICAM-1 peuvent avoir une activité biologique et dont leurs fonctions restent à démontrer. Ils permettraient probablement des voies alternatives d'activation et de recrutement cellulaire.

INTRODUCTION

ICAM-1 (*Intercellular Adhesion Molecule-1*) est une glycoprotéine transmembranaire faisant partie de la superfamille des immunoglobulines. Elle est exprimée sur la plupart des leucocytes et les endothéliums (Dustin *et al.*, 1986). Cette molécule d'adhésion joue un rôle crucial dans le recrutement leucocytaire lors des processus inflammatoires et dans le processus de la présentation d'antigène. Ainsi, pour des fins thérapeutiques, le blocage de la fonction d'ICAM-1 peut être bénéfique pour une multitude de situations telles que le rejet de greffe, les maladies auto-immunes, l'asthme, etc.

Bien que la validité d'une thérapie anti-ICAM-1 à base d'anticorps ait été démontrée dans de nombreux modèles animaux, leur efficacité et leur sécurité d'utilisation restent encore à prouver. En effet, les résultats d'essais cliniques impliquant un anticorps anti-ICAM-1 pour retarder le rejet de greffes ou pour soigner l'arthrite se sont avérés peu concluants (Kavanaugh *et al.*, 1996; Salmela *et al.*, 1999).

Une alternative aux anticorps est l'utilisation d'une thérapie génique qui consiste à modifier l'expression d'un gène ciblé dans le but d'altérer le phénotype cellulaire. Elle permettrait l'expression d'un gène normalement absent dans un tissu donné, de remplacer un gène défectueux, ou bien de diminuer ou de supprimer l'expression d'un gène présent. Une des conditions principales pour appliquer une stratégie thérapeutique anti-ICAM-1 revient donc à l'utilisation d'un système capable de restreindre l'expression d'ICAM-1 dans l'organe ciblé, greffé ou cancéreux. Plusieurs stratégies de transporteurs ont été développées pour permettre l'introduction de molécules d'ADN dans la cellule. Ces méthodes peuvent être arbitrairement séparées en deux groupes de transporteurs: viraux et non-viraux. Cependant, des caractéristiques néfastes qui leur sont associées, réactions inflammatoires, recombinaison génomique, instabilité ou cytotoxicité, limitent leur utilisation clinique. Ces facteurs expliquent en grande partie l'échec des essais cliniques en thérapie génique tenus à ce jour. Il devient donc nécessaire de développer de nouvelles stratégies de transporteurs d'ADN pour atteindre le plein potentiel de la thérapie génique.

La présente étude a pour buts d'étudier les copolymères ionomériques en bloc pour le transport de molécules d'ADN *in vitro*, et de les développer dans des modèles touchant l'expression d'ICAM-1 chez la souris.

Les objectifs spécifiques à atteindre au cours de mon doctorat étaient les suivants :

- 1) Identifier un ou des polymères ionomériques en bloc capables de servir de transporteurs d'ADN afin d'améliorer l'entrée d'ADN dans les cellules mais également d'altérer la biodistribution de l'ADN *in vivo*. Cette première étape de criblage a été effectuée en mesurant l'entrée d'un oligonucléotide marqué au FITC dans des cellules COS-7. La biodistribution *in vivo* de certains complexes ADN-polymères a également été caractérisée chez la souris.
- 2) Évaluer la capacité d'inhibition *in vivo* d'un antisens anti-ICAM-1 complexé à un des polymères ionomériques sélectionnés. Les polymères ont d'abord été testés pour leur capacité à transporter un antisens anti-ICAM-1 dans la lignée endothéliale murine b-end.3 et de permettre l'inhibition de l'expression. Pour les études *in vivo*, des souris C57/BL6 pré-traitées au LPS ont été injectées avec une formulation d'antisens complexé ou non au polymère. L'expression d'ICAM-1 a été évaluée dans les principaux organes.
- 3) Identifier un ou des polymères ionomériques en bloc capables de servir de transporteurs de plasmide. Pour évaluer l'efficacité de transfection des transporteurs, un plasmide portant le gène *ICAM-1* murin a été utilisé dans la transfection de cellules COS-7. Pour les études *in vivo*, le plasmide a été injecté à un groupe de souris déficientes en ICAM-1 afin d'évaluer la distribution de l'expression du transgène.

Un dernier volet de notre étude a porté sur la distribution de l'expression et la fonctionnalité des isoformes d'ICAM-1 chez la souris. En effet, l'ARN messager d'ICAM-1 peut subir un épissage alternatif conduisant à l'expression d'isoformes faisant suite à la délétion d'un ou des domaines d'ICAM-1 (King *et al.*, 1995). Le contrôle de leur expression ainsi que leurs rôles possibles *in vivo* n'ont pas été caractérisés. Cependant, les caractéristiques de ces isoformes peuvent être exploitées dans le cadre d'une thérapie visant ICAM-1 en spécifiant le type d'interaction en fonction de la réponse

cellulaire désirée. Une partie du projet a donc porté sur la caractérisation de l'expression des isoformes d'ICAM-1 afin d'en évaluer leur potentiel thérapeutique dans une éventuelle thérapie génique.

Un quatrième objectif à atteindre s'est ajouté concernant les isoformes d'ICAM-1 :

- 4) Caractériser l'expression des isoformes d'ICAM-1 dans les organes de souris normales et déficientes en ICAM-1. L'étude a porté sur leur capacité à recruter les leucocytes dans un modèle d'inflammation et leur implication dans le choc septique.

Les travaux réalisés dans ce projet de doctorat sont présentés sous la forme de quatre articles scientifiques en préparation, soumis ou acceptés et de deux annexes. Ces chapitres sont précédés d'une revue de littérature portant sur ICAM-1 et son implication dans des modèles de thérapie génique, ainsi que la présentation des copolymères ionomériques en bloc. Le chapitre 2 est une publication portant sur les résultats de l'étude comparative de deux copolymères en bloc dans le transport d'oligonucléotides chez la souris, démontrant que le changement de la balance hydrophilique/lipophile du copolymère peut altérer la biodistribution et le comportement du complexe *in vivo*. Le chapitre 3 présente les résultats de pharmacocinétique et de biodistribution d'un oligonucléotide complexé ou non avec un copolymère en bloc. Ce complexe a été testé pour son activité fonctionnelle dans l'inhibition de l'expression d'ICAM-1 dans certains organes. Le chapitre 4 présente les résultats d'expression d'ICAM-1 dans les organes cibles en utilisant le polymère sélectionné pour le transport de plasmide. Cette expression a aussi conduit à une réponse fonctionnelle impliquant les neutrophiles. Finalement, le chapitre 5 porte sur la caractérisation des isoformes d'ICAM-1 et leur implication dans la sensibilité au choc septique induit par le LPS bactérien chez les souris déficientes en ICAM-1. L'annexe 1 présente la méthodologie utilisée et les résultats de criblages des polymères ionomériques pour le transport d'oligonucléotides et de plasmides dans des modèles *in vitro*. Finalement, l'annexe 2 consiste en deux publications, la première présente une revue des résultats portant sur l'utilisation des copolymères ionomériques en bloc et la technologie des nanogels; alors que la seconde incorpore certains résultats

présentés au chapitre 5. Chaque chapitre de publications est précédé d'un résumé illustrant les résultats obtenus, ainsi qu'une description de la contribution des co-auteurs à la réalisation du papier. Finalement, une discussion générale portant sur l'ensemble des travaux accomplis est présentée et servira à mettre en perspective les résultats présentés dans cette thèse.

CHAPITRE 1

REVUE DE LITTÉRATURE

1 ICAM-1

1.1 Caractéristiques physiques

ICAM-1 (*Intercellular Adhesion Molecule-1*) est une glycoprotéine transmembranaire faisant partie de la superfamille des immunoglobulines. Sa structure protéique membranaire est composée d'une simple chaîne de 505 acides aminés (a.a.) répartis en une portion de cinq domaines extracellulaires pour un total de 453 a.a., d'une portion transmembranaire de 24 a.a. et d'une queue cytoplasmique de 28 a.a. (Dustin *et al.*, 1986; Simmons *et al.*, 1988; Staunton *et al.*, 1988). Chaque domaine, excepté le domaine 4, est formé par la présence d'un pont bi-sulfure donnant une structure globulaire à ces domaines. Le domaine 4, quant à lui, serait stabilisé par la présence d'une leucine, un a.a. hydrophobe. L'analyse par microscopie électronique de la protéine d'ICAM-1 révèle une structure en bâtonnet de 16-19 nm partiellement pliée (90°) entre les domaines 3 et 4 (Staunton *et al.*, 1990), le coude étant dû à une série de prolines au point de la charnière qui induirait cet angle au niveau de la protéine.

ICAM-1 est une protéine glycosylée par la présence de huit sites consensus de glycosylation répartis sur les domaines 2, 3 et 4 (Bloom *et al.*, 1996). Sa masse moléculaire se situe entre 80 et 114 kDa dépendant de son degré de glycosylation et du type cellulaire (Dustin *et al.*, 1986). La déglycosylation complète de la protéine résulte en une protéine de 60 kDa.

La structure native de ICAM-1 à la surface cellulaire existerait sous forme de monomère ou dimère (Reilly *et al.*, 1995). Les domaines 1 et 2 seraient impliqués dans la dimérisation d'ICAM-1 (Casasnovas *et al.*, 1998). Le monomère d'ICAM-1 est par contre suffisant pour la liaison à LFA-1, sa dimérisation n'augmenterait pas son affinité de liaison, telle que proposée par Miller et coll. (1995), mais favoriserait plutôt son orientation (Jun *et al.*, 2001).

ICAM-1 a une distribution polarisée sur la membrane et il a été démontré que la portion transmembranaire est associée à la protéine α -actinine du cytosquelette (Carpén *et al.*, 1992), ce qui lui permet une redistribution membranaire vers le point de contact

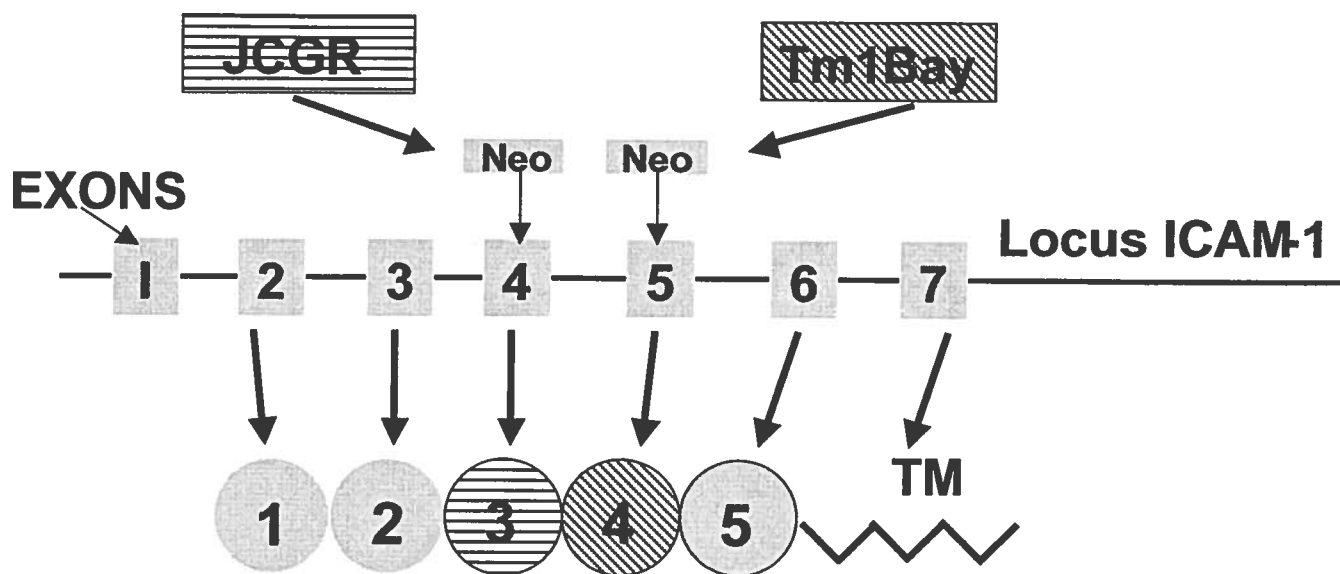


FIGURE 1 : Structure du gène d'ICAM-1 chez les souris C57BL/6, Tm1Bay et JCGR.

Le gène ICAM-1 est constitué de sept exons codant pour le peptide signal, les cinq domaines extracellulaires et la portion transmembranaire d'ICAM-1. La souris TM1Bay a été produite en insérant le gène de résistance *Neo* dans l'exon 5 codant pour le domaine 4 d'ICAM-1, alors que dans le cas de la souris JCGR, l'insertion a été effectuée dans l'exon 4 codant pour le domaine 3.

cellule-cellule ou cellule-matrice extracellulaire (Dougherty *et al.*, 1988; Dustin *et al.*, 1992; Vignola *et al.*, 1994).

1.2 Le gène

Le gène d'ICAM-1, d'environ sept kb, est composé de sept exons entrecoupés par six introns où chaque domaine immunoglobuline est codé par un exon distinct (Voraberger *et al.*, 1991). La comparaison des séquences du cDNA entre ICAM-1 humain (Staunton *et al.*, 1988), murin (Siu *et al.*, 1989, Horley *et al.*, 1989), de chien (Manning *et al.*, 1995) et de rat (Kita *et al.*, 1992) révèle une identité de séquence de 50 à 65% entre ces espèces.

1.3 Régulation de l'expression

ICAM-1 est exprimée sur la plupart des leucocytes et les endothéliums. Des études immunohistochimiques ont démontré une expression basale d'ICAM-1 sur les cellules endothéliales et épithéliales, les macrophages, les cellules fibroblastiques ainsi que sur les cellules dendritiques thymiques, les ganglions lymphatiques, l'intestin, la peau, les reins et le foie (Dustin *et al.*, 1986). Certains types cellulaires, comme l'endothélium des veines portales et des artères hépatiques, ainsi que les cellules épithéliales gastriques n'expriment pas ICAM-1 (Dustin *et al.*, 1986; Scheynius et Engstrand, 1991). L'expression d'ICAM-1 peut être modulée par plusieurs cytokines, dont TNF- α , IFN- γ et l'IL-1 qui sont les inducteurs les plus importants de l'expression d'ICAM-1, alors que les glucocorticoïdes sont les principaux agents inhibiteurs (revue par van de Stolpe et van der Saag, 1996).

1.3.1 Au niveau du promoteur

La régulation de l'expression se fait principalement au niveau de la transcription. La régulation transcriptionnelle d'ICAM-1 humain est revue en détail par Stratowa et

Audette (1995). Brièvement, le promoteur du gène d'ICAM-1 contient un site Sp1, qui est probablement responsable de la régulation de l'expression constitutive. Une séquence régulatrice AP1 joue un rôle dans la transcription impliquant le TPA (*12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate*) et le TNF- α , alors que la régulation de l'expression par l'IL-6 et l'IFN- γ se ferait par l'entremise de la séquence partagée pIRE (*palindromic Interleukin Response Element*). Le promoteur d'ICAM-1 possède également des séquences amplificatrices NF-kB impliquées dans la réponse au TPA, TNF- α , IL-1 et au LPS, représentant ainsi le plus important élément dans la régulation de l'expression d'ICAM-1 (revue dans van de Stolpe et van der Saag, 1996). L'acide rétinoïque peut réguler l'expression d'ICAM-1 à la hausse (Cilenti *et al.*, 1995; Aoudjit *et al.*, 1995) ou à la baisse (Weber *et al.*, 1995) par la présence d'une séquence RAR (*Retinoic Acid Response element*) dans le promoteur. La régulation de l'expression d'ICAM-1 se fait aussi de façon cellule-spécifique et implique des seconds messagers intracellulaires tels que les PKC (Dean *et al.*, 1994), l'AMPc (Pober *et al.*, 1993), le Ca²⁺ (Renkonen *et al.*, 1990), et la phospholipase A2 (Morisaki *et al.*, 1994).

1.3.2 Au niveau post-transcriptionnel

1.3.2.1 Épissage alternatif

L'épissage des ARNm se fait aux jonctions des séquences intron-exon et peut conduire à la formation d'isoformes d'ICAM-1 ayant un ou des domaines épissés. Ainsi, les isoformes 4-6, 3-6, 2-6, 2-5 et 2-4 ont été détectés chez la souris C57BL/6, l'isoforme 3-6 correspondant par exemple à la liaison de l'exon 3 (domaine 2) à l'exon 6 (domaine 5). En utilisant un anticorps monoclonal anti-ICAM-1, l'expression d'isoformes a été détectée dans les souris ICAM-1-exon-5-déficiente par immunohistochimie sur des coupes de plusieurs organes dont le thymus et le poumon (King *et al.*, 1995). Cependant, un motif différentiel d'expression des isoformes semble être présent entre la souris normale et la souris ICAM-1-exon-5-déficiente. En effet, suivant la stimulation au LPS, les isoformes 2-6 et 4-6 sont exprimés à un plus fort niveau dans le cœur et les poumons de la souris ICAM-1-déficiente, alors que l'isoforme 2-4 est exprimé à un niveau

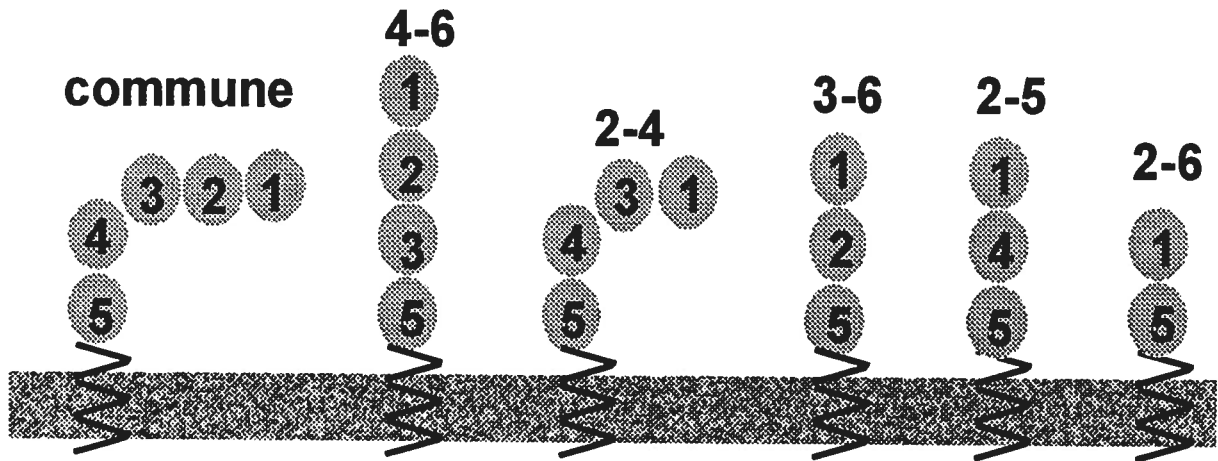


FIGURE 2 : Isoformes d'ICAM-1.

Représentation schématique de la forme commune d'ICAM-1 et de ces isoformes détectés chez les souris C57BL/6 et/ou TM1Bay (King *et al.*, 1995). Le nom donné à l'isoforme correspond aux deux exons dont les séquences sont attachées à la suite de l'épissage de l'ARN messenger. Les isoformes contenant le domaine 4 sont absents chez la souris Tm1Bay alors que ceux contenant le domaine 3 devraient être absents de la souris JCGR.

équivalent (King *et al.*, Ji, 1995). Dans des conditions similaires, les isoformes d'ICAM-1 n'ont pas été détectés dans la souris ICAM-1-exon-4-déficiente.

Bien que le domaine 1 soit présent sur tous les isoformes détectés, leur efficacité de liaison à LFA-1 est variable en fonction de la présence ou non du domaine 2 d'ICAM-1 qui serait impliqué dans une bonne présentation de l'épitope du domaine 1 à l'intégrine (Stanley *et al.*, 2000). La fonction des isoformes *in vivo* n'a pas été caractérisée mais pourrait jouer un rôle dans un recrutement différentiel des leucocytes, notamment par la présence ou l'absence du domaine 3 responsable de la liaison à MAC-1, ou lors des contacts intercellulaires où l'avidité de liaison d'ICAM-1 avec son ligand peut être influencée par la distance entre les deux cellules.

1.3.3 Au niveau post-traductionnel

1.3.3.1 Glycosylation

ICAM-1 subit des modifications post-traductionnelles au niveau de sa glycosylation et qui varie en fonction du type cellulaire, suggérant ainsi une régulation de l'affinité de liaison (Dustin *et al.*, 1986). La glycosylation modifie notamment la liaison d'ICAM-1 avec les neutrophiles (Niu *et al.*, 1994; Sellak *et al.*, 1994) en réduisant l'accès à l'épitope du domaine 3 nécessaire à la liaison d'ICAM-1 à MAC-1 (Diamond *et al.*, 1991).

1.3.3.2 ICAM-1 soluble

Un taux plus élevé que la normale d'ICAM-1 soluble a été relié à plusieurs maladies inflammatoires et néoplasiques (revues par Gearing et Newman., 1993, et Gomez-Scotto *et al.*, 2000). Par exemple, lors d'un choc septique induit par une endotoxine bactérienne chez la souris, une augmentation d'ICAM-1 soluble est observée dans le sérum et la bile (Jaeschke *et al.*, 1996), alors que le taux d'ICAM-1 soluble est corrélé à l'agressivité du mélanome (Kageshita *et al.*, 1993). Son origine moléculaire reste néanmoins inconnue. Cependant, deux mécanismes non-exclusifs sont souvent évoqués pour expliquer leur présence dans le plasma : 1) le clivage protéolytique

d'ICAM-1 membranaires (Budnik *et al.*, 1996) et dont l'élastase serait une des protéases impliquées (Champagne *et al.*, 1998), et 2) un épissage alternatif de l'ARN messenger d'ICAM-1 ne possédant pas de domaine transmembranaire tel qu'isolé chez l'humain (Wakatsuki *et al.*, 1995). Certains isoformes d'ICAM-1, soit 2-5, 2-6 et 3-6, ont été détectés sous une forme circulante dans les souris ICAM-1-exon-4-déficiente traitées au LPS et dont les ARNm contenaient la partie codant pour la portion transmembranaire (Van den Engel *et al.*, 2000). Ce clivage pourrait être un mécanisme permettant la déadhesion rapide d'ICAM-1 à la surface de la cellule mais pourrait également servir de médiateurs à distance induits par la circulation de l'ICAM-1 soluble. Par contre, la régulation d'ICAM-1 soluble semble suivre un mécanisme différent entre la souris normale et la souris ICAM-1-déficiente (Komatsu *et al.*, 1997).

1.4 Ligands d'ICAM-1

1.4.1 LFA-1

LFA-1 (*Lymphocytes Function-associated Antigen 1*) (CD11a/CD18) est un membre de la famille des intégrines exprimé par les lymphocytes et plus faiblement par les monocytes et neutrophiles. Elle est un ligand commun pour ICAM-1, ICAM-2 (Staunton *et al.*, 1989), ICAM-3 (de Fougérolles et Springer, 1992), ICAM-4 (Bailly *et al.*, 1995) et ICAM-5 (Tian *et al.*, 1997). Bien que la présence du domaine 2 d'ICAM-1 soit importante pour la liaison de LFA-1 à ICAM-1 (Stanley *et al.*, 2000), LFA-1 se lie au domaine 1 en N-terminal d'ICAM-1 (Staunton *et al.*, 1990) et d'ICAM-2 (Diamond *et al.*, 1990) suivant l'interaction avec le domaine 1 de sa chaîne $\alpha 1$ (Huang et Springer, 1995). Cette adhésion est régulée au niveau du site allostérique du domaine I (*IDAS*) dépendante des ions et dont les mutations à ce site affecte principalement les signaux d'activations cytoplasmiques (Lupher *et al.*, 2001). LFA-1 médie l'adhésion des leucocytes et leur recrutement à la surface de l'endothélium (Haskard *et al.*, 1986; Dustin et Springer, 1988), stabilise la liaison des lymphocytes T cytotoxiques à la cellule cible (Davignon *et al.*, 1981), induit la prolifération cellulaire des cellules T au repos (Van Seventer *et al.*,

1990) et donne un signal de co-activation aux cellules NK (Chong *et al.*, 1994; Krensky *et al.*, 1983). LFA-1 est exprimée sous forme inactive (ayant une faible affinité pour ses ligands) à la surface des leucocytes non activés. Cette inactivité est cruciale pour maintenir l'homéostasie puisqu'un état constitutivement actif entraînerait l'agrégation des leucocytes circulants. L'état de haute avidité de LFA-1 est induit de façon transitoire notamment par l'activation du complexe TCR/CD3 ou par le PMA (*phorbol 12-myristate 13-acetate*) (Dustin et Springer, 1989). Ce changement d'affinité se ferait à la suite d'un changement conformationnel des chaînes $\alpha 1$ et $\beta 2$ de LFA-1 suivant l'activation du leucocyte, ou bien à la formation d'un amas de molécules de LFA-1 (modèle élaboré par Stewart et Hogg, 1996). Cependant, la première hypothèse serait plus probable puisque la fixation en position ouverte de LFA-1 est suffisante pour sa liaison avec ICAM-1 (Shimaoka *et al.*, 2001). Une concentration importante de Mg^{2+} est capable d'induire l'état de haute affinité des récepteurs LFA-1 (Stewart *et al.*, 1996).

1.4.2 MAC-1

MAC-1 (CD11b/CD18) est une intégrine exprimée principalement à la surface des cellules myéloïdes et des cellules NK (Kishimoto *et al.*, 1989). MAC-1 se lie au domaine 3 d'ICAM-1 avec une avidité plus faible que LFA-1 (Diamond *et al.*, 1990). Il a été suggéré que la liaison MAC-1 sur ICAM-1 serait régulée par le degré de glycosylation du domaine 3 d'ICAM-1 (Diamond *et al.*, 1991). Ses principales fonctions sont l'adhésion des cellules myéloïdes à l'endothélium (Harlan *et al.*, 1985; Lo *et al.*, 1989) et l'agrégation homotypique des neutrophiles (Anderson *et al.*, 1986). MAC-1 est également un récepteur important des cellules phagocytaires en reconnaissant le fragment du complément iC3b (Beller *et al.*, 1982). En effet, la déglycosylation induite par la mutation des sites N240DS et N269QS du domaine 3 d'ICAM-1 augmente l'affinité de liaison à MAC-1 (Diamond *et al.*, 1991). MAC-1 ne pourrait pas se lier à ICAM-2 (Diamond *et al.*, 1990), mais une étude plus récente a démontré le contraire en observant la liaison entre des molécules de MAC-1 et d'ICAM-2 purifiées (Xie *et al.*, 1995). Finalement, MAC-1 peut également lier le fibrinogène, un composant de la matrice extracellulaire (Altieri *et al.*, 1988).

LFA-1 et MAC-1 sont impliquées dans le recrutement des neutrophiles aux sites inflammatoires (Luscinskas *et al.*, 1991), mais LFA-1 serait plus importante dans l'adhésion ferme du neutrophile à la cellule endothélium, alors que MAC-1 serait plus importante dans la migration transendothéliale, incluant la régulation des interactions adhésives du neutrophile lors de son déplacement à travers l'espace interstitiel (Ding *et al.*, 1999). Plus récemment, l'implication de l'interaction ICAM-1 à MAC-1 a été établie dans l'infiltration des neutrophiles lors de la reperfusion d'une greffe du foie (Kobayashi *et al.*, 2001).

1.4.3 Autres ligands d'ICAM-1

CD43 (sialophorine), exprimée pas les leucocytes et les plaquettes peut également lier ICAM-1 (Rosenstein *et al.*, 1991) mais son implication dans l'adhésion intercellulaire n'a pas encore été caractérisée. ICAM-1 est aussi le récepteur du groupe majeur des rhinovirus via un épitope sur domaine 1 (Greve *et al.*, 1989, Staunton *et al.*, 1990), ainsi qu'aux érythrocytes infectés au *Plasmodium falciparum* (Berendt *et al.*, 1989). ICAM-1 sert aussi de récepteur au fibrinogène soluble (Languino *et al.*, 1993) et à l'hyaluronane, un facteur de la matrice extracellulaire (McCourt *et al.*, 1994).

1.5 Signalisation

De nombreuses études ont démontré qu'ICAM-1 possède une activité « *outside-in* », c'est-à-dire capable d'induire des signaux d'activation intracellulaires. La liaison d'ICAM-1 sur les lymphocytes T induit la phosphorylation de tyrosines de la cdc2 kinase, un membre de la famille des kinases cycline-dépendantes (Chirathaworn *et al.*, 1995). La liaison d'ICAM-1 à la surface des lymphocytes B (lignée de lymphome A20) induit une augmentation de l'expression de complexes majeurs d'histocompatibilité (CMH) de type 2 et la phosphorylation de plusieurs protéines cellulaires dont la kinase p53/p56^{lyn} de la famille Src, la protéine Raf-1, et des protéines kinases activées par des mitogènes (*mitogen-activated protein kinases*) (Holland et Owens, 1997). Sur une lignée de

lymphome B de Burkitt, MTLM4, la liaison des IgM membranaires et d'ICAM-1 interfèrent avec la libération de calcium des compartiments intracellulaires (van Horssen *et al.*, 1995). La liaison d'ICAM-1 a inhibé l'expression de cytokines (IFN- γ , TNF- α et IL-1) de lymphocytes activés (Geissler *et al.*, 1990) et a induit une flambée oxydative dans des monocytes (Rothlein *et al.*, 1994). En utilisant des lignées endothéliales cervicales de rat, RBE4 et GP8, il a été démontré que la liaison d'ICAM-1 induit la mobilisation de calcium qui, via les PKC, médie la phosphorylation des protéines associées à l'actine et induit un réarrangement du cytosquelette (Etienne-Manneville *et al.*, 2000). La phosphorylation de la cortactine, une protéine associée au cytosquelette, a également été observée dans un modèle similaire (Durieu-Trautmann *et al.*, 1994). Finalement, en utilisant des astrocytes de rat en culture, la liaison d'ICAM-1 induit la sécrétion de TNF- α et la phosphorylation du facteur de transcription dépendante de l'AMP cyclique (*transcription factor cAMP response element-binding protein*) (Etienne-Manneville *et al.*, 1999).

1.6 Rôle et fonction

Le rôle et l'importance des molécules d'adhésion dans la défense immunitaire sont illustrés chez les patients souffrant de rares anomalies génétiques appelées LAD (*Leukocyte Adhesion Deficiency*) (Kishimoto *et al.*, 1987), et plus particulièrement LAD de type 1 où des mutations présentes dans le gène codant pour $\beta 2$ (CD18) empêchent une fonction normale des intégrines telles que LFA-1 (CD11a/CD18), MAC-1 (CD11b/CD18), et p150,95 (CD11c/CD18). L'incapacité des neutrophiles déficients à adhérer à l'endothélium et à migrer à travers les tissus rend le patient susceptible à des infections bactériennes récurrentes souvent associées à une leucocytose marquée. Les syndromes associés aux maladies de LAD chez l'humain sont présentés en détail par Etzioni (1999). Les études sur des souris, dans lesquelles le gène codant pour le CD18 a été désactivé, ont démontré une incidence d'infections bactériennes plus élevée que la normale, une absence d'émigration des neutrophiles au niveau de la peau, ainsi qu'une neutrophilie sévère (Mizgerd *et al.*, 1997; Scharffetter-Kochanek *et al.*, 1998).

1.6.1 Recrutement des leucocytes

Le modèle du roulement en 3 étapes

ICAM-1 est directement impliquée dans le recrutement des leucocytes au niveau de l'endothélium. Les étapes et les signaux impliqués dans le recrutement des leucocytes, initialement proposés par Butcher (1991) et Springer (1994), ont été mises à jour à de multiples reprises et dont voici un résumé des étapes majeures avec les médiateurs principaux.

Durant l'étape initiale, appelée aussi étape du roulement, les leucocytes circulants font le premier contact avec les cellules endothéliales au site d'inflammation par l'entremise des sélectines et de leurs ligands. La L-sélectine, exprimée par les neutrophiles et les plaquettes, ainsi que les P- et E-sélectines présentes à la surface des cellules endothéliales sont impliquées dans cette étape. Les médiateurs pro-inflammatoires, incluant $\text{TNF-}\alpha$, IL-1, $\text{IFN-}\gamma$, l'histamine, la thrombine ainsi que des intermédiaires réactifs oxygénés contrôlent l'expression de ces sélectines et de leurs ligands. L'adhésion médiée par les sélectines est faible et, ajoutée à la force hydrodynamique du flux sanguin, amène le roulement du leucocyte sur la surface de l'endothélium. Le roulement induit l'activation des leucocytes par des médiateurs inflammatoires tels que SDF-1 et IL-8 exprimées par les cellules endothéliales, et la sécrétion d'agents chemoattracteurs tels que PAF (*Platelet Activating Factor*) et MIP- α (*Monocyte Inflammatory Protein α*). La transmigration des éosinophiles implique les chemoattracteurs RANTES, MCP-3 et C5a. Cette activation conduit à un changement conformationnel (changement d'avidité) des intégrines β 2, notamment LFA-1 et MAC-1, ce qui conduit à l'attachement ferme des leucocytes à l'endothélium via les molécules d'adhésion. L'expression de VCAM-1 et d'ICAM-1 sur l'endothélium se trouve augmentée par les mêmes cytokines qui stimulent l'expression des sélectines et des intégrines. Étant donné que la plupart des lymphocytes n'expriment pas de sélectines ni les ligands de E-sélectine, le roulement des lymphocytes sur l'endothélium impliquerait la liaison entre VCAM-1 et l'intégrine VLA-4. Bien que LFA-1 et MAC-1 semblent être présentes en quantité similaire à la surface des neutrophiles, le nombre de molécules

MAC-1 peut rapidement être augmenté à la surface cellulaire par le transport des granules sécrétoires. Au cours des 30 premières secondes, LFA-1 et MAC-1 contribueraient d'une façon équitable à l'adhésion des neutrophiles à la surface des cellules endothéliales, alors qu'après deux minutes, cette adhésion est entièrement dépendante de MAC-1 (Neelamegham *et al.*, 1998). En outre, en utilisant des souris déficientes en intégrines $\beta 2$, il a été démontré que l'interaction de LFA-1 semble être dominante, bien qu'une participation des deux intégrines dans la transmigration des neutrophiles soit nécessaire (Ding *et al.*, 1999). La présence de LFA-1 est néanmoins suffisante pour la migration des neutrophiles dans les souris déficientes en MAC-1 (Lu *et al.*, 1997). Lors de la transmigration du leucocyte vers le site inflammatoire, les portions extracellulaires de L-, E- et P-sélectines ainsi qu'ICAM-1 seraient sécrétées ou clivées par des protéases cytoplasmiques, permettant ainsi la migration du leucocyte à travers le tissu. Ces molécules clivées se retrouvent à l'état soluble dans la circulation sanguine (Bird *et al.*, 1997; Brown, 1997). La transmigration du leucocyte à travers la matrice extracellulaire est médiée par PECAM (*Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule*), l' $\alpha V\beta 3$ et d'autres protéines associées aux intégrines et capables de liaisons homophiliques (revue par Parent et Eichacker, 1999), ainsi qu'à la sécrétion de métalloprotéases responsables de la digestion de la matrice extracellulaire (Dejana *et al.*, 1996; Brown *et al.*, 1997; Aoudjit *et al.*, 1998).

1.6.2 Présentation d'antigène

Le rôle crucial d'ICAM-1 dans la présentation d'antigène a été démontré en utilisant des cellules déficientes en ICAM-1 (Dang *et al.*, 1990). Les cellules présentatrices d'antigène, telles que les macrophages et certains lymphocytes B, expriment ICAM-1 en association avec le CMH de classe II afin d'activer les lymphocytes T auxiliaires (Damle *et al.*, 1992). En effet, il a été démontré que la liaison d'ICAM-1 avec LFA-1 permet de renforcer l'interaction des lymphocytes T avec les cellules présentatrice d'antigène (APC), en plus d'activer les lymphocytes B dépendantes des cellules T, ainsi que de favoriser la destruction des cellules cibles par les cellules NK, les neutrophiles et les cellules T cytotoxiques de façon antigène-spécifique (Kuhlman *et*

al., 1991; Van Seventer *et al.*, 1991; Nickoloff *et al.*, 1993; Tohma *et al.*, 1991). ICAM-1 participe également à l'activation non-dépendante du CMH des lymphocytes T cytotoxiques (Makgoba *et al.*, 1988). La transfection à des cellules non présentatrices d'antigène, telles que des fibroblastes, des gènes codant pour le CMH et ICAM-1 est suffisante pour instaurer les fonctions de présentation d'antigène et d'activation du lymphocyte (Altmann *et al.*, 1989).

1.6.3 Autres rôles d'ICAM-1

Les cellules de l'immunité, dont les macrophages et les lymphocytes B et T expriment tous ICAM-1 et l'activation des leucocytes et des cellules endothéliales induit sa sur-expression. La présence d'ICAM-1 à la surface des monocytes serait impliquée dans l'adhésion homotypique et leur migration transendothéliale (Steidl *et al.*, 2000). Sa présence n'a pourtant aucun effet pour les lymphocytes T lors de la transmigration de ceux-ci.

1.7 ICAM-1 et cancer

L'expression d'ICAM-1 par les cellules péri-tumorales favoriserait le recrutement des cellules effectrices pour l'élimination des cellules cancéreuses, alors que son expression par les cellules tumorales favoriserait la présentation d'antigène. De ce fait, une sous-expression d'ICAM-1 par la cellule tumorale serait un mécanisme échappatoire au système immunitaire en défavorisant leur interaction intercellulaire lors de la présentation d'antigène. De nombreuses études ont en effet démontré une corrélation inverse entre le niveau d'expression d'ICAM-1 à la surface de la cellule tumorale et l'agressivité d'une tumeur. Par exemple, un faible niveau d'expression d'ICAM-1 dans différents type de leucémies sévères (leucémie myéloïde aiguë, leucémie lymphocytaire chronique) a été observé, ce qui peut être associé à leur faible sensibilité aux cellules cytotoxiques (Padros *et al.*, 1992; Raspadori *et al.*, 1993). Par ailleurs, un haut niveau d'ICAM-1 par les cellules de lymphomes de type B semble être généralement associé à un phénotype plus différencié et moins agressif. En effet, un haut taux d'ICAM-1 est

associé à un lymphome B folliculaire de faible développement, alors qu'ICAM-1 est exprimée faiblement dans un lymphome B non-Hodgkin diffus, associé à une infiltration dans la moelle osseuse ou en périphérie (Nozawa *et al.*, 1993; Stauder *et al.*, 1989).

Paradoxalement, la présence d'un haut niveau d'ICAM-1 par les cellules tumorales serait corrélée avec un phénotype plus agressif. Par exemple, le niveau d'expression d'ICAM-1 est proportionnel au potentiel métastatique du mélanome (Jonhson *et al.*, 1989), la cellule tumorale échapperait au système immunitaire en clivant ICAM-1 de sa surface (Altomonte *et al.*, 1993). Ce clivage défavoriserait la liaison des cellules tumorales aux cellules T cytotoxiques et NK, empêchant ainsi leur lyse restreinte ou non au complexe majeur d'histocompatibilité (Becker *et al.*, 1993; Becker *et al.*, 1991). Également, Ahsmann et collaborateurs (1992) ont observé que le niveau d'expression de LFA-1 à la surface des cellules myéloïdes malines semble être corrélé avec un plus haut taux de croissance, ce qui suggère que l'interaction ICAM-1/LFA-1 soit impliquée dans leur prolifération.

Dans d'autres types de tumeurs, l'absence d'expression d'ICAM-1 par les cellules péritumorales empêcherait les métastases de croître dans les organes normalement favorables à leur croissance. En effet, il a été observé que les souris ICAM-1 déficientes sont résistantes à la dissémination d'un lymphome T (Aoudjit *et al.*, 1998). L'utilisation d'un anticorps anti-LFA-1 a en effet bloqué l'invasion et la diffusion métastatique de cellules de lymphome humaines et murines respectivement (Harning *et al.*, 1993). Ce phénomène n'impliquerait pas une réponse immunitaire cytotoxique puisque l'absence d'ICAM-1 sur l'endothélium ne permettrait pas le recrutement des cellules NK et des lymphocytes cytotoxiques au site de nidification des métastases. Par contre, ICAM-1 serait impliquée dans la croissance du lymphome T en périphérie (St-Pierre *et al.*, 1999) et son pouvoir métastatique se manifesterait après l'extravasation, probablement en induisant des signaux de croissance cellulaire ou en favorisant sa nidification suite à la sécrétion de métalloprotéases de la matrice (Aoudjit *et al.*, 1998).

1.8 Modèles d'études in vivo

Deux souches de souris déficientes en ICAM-1 ont été produites, la première par une insertion du gène *Neo* dans l'exon 4 d'ICAM-1, désactivant ainsi le domaine 3 de la protéine (Xu *et al.*, 1994), alors que dans la seconde souche, l'insertion a été effectuée dans l'exon 5 (domaine 4) (Sligh *et al.*, 1994). Ces deux souches sont caractérisées par un taux plus élevé de neutrophiles et de lymphocytes circulants, une défectuosité dans la fonction de présentation d'antigène des lors des réactions lymphocytaires mixtes, ainsi qu'une plus faible réponse à l'hypersensibilité retardée. Cependant, ces deux souches de souris présentent des différences notoires dans leurs réponses inflammatoires. Plus spécifiquement, les souris ICAM-1-exon-4-déficientes présentent une résistance au choc septique induit par le LPS bactérien, et qui est corrélée avec une absence d'infiltration leucocytaire dans le foie (Xu *et al.*, 1994). Chez les souris ICAM-1-exon-5-déficientes, quant à elles, une baisse anormale dans la transmigration de neutrophiles est observée dans le cas d'une péritonite chimiquement induite (Sligh *et al.*, 1994).

Ces phénotypes démontrent bien l'importance d'ICAM-1 dans le recrutement et l'extravasation des leucocytes, son rôle dans la présentation d'antigène, et suggère un rôle crucial dans les processus de nombreuses pathologies inflammatoires.

1.9 Autres ICAMs

ICAM-2 (CD102) possède deux domaines immunoglobulines (Staunton *et al.*, 1989) et peut lier LFA-1 (Springer, 1990) et MAC-1 (Xie *et al.*, 1995). Elle est exprimée de façon constitutive par les cellules endothéliales (Nortamo *et al.*, 1991), les plaquettes et certains lymphocytes (Diacovo *et al.*, 1994; Dustin *et al.*, 1989), mais contrairement à ICAM-1, son expression ne peut être uprégulée (Nortamo *et al.*, 1991). ICAM-2 peut induire le signal de co-activation pour la prolifération des lymphocytes T médiée par le TCR (Damle *et al.*, 1992). Son expression jouerait un rôle dans la recirculation des lymphocytes au repos (de Fougerolles *et al.*, 1991) et dans l'initiation de la réponse immunitaire en recrutant les leucocytes avant l'augmentation d'ICAM-1 à la surface des cellules.

Retrouvée uniquement chez l'humain, ICAM-3 (CD50) est exprimée à un haut niveau par les lymphocytes, granulocytes et les monocytes au repos alors que son expression est absente des endothéliums. Elle est formée de 5 domaines immunoglobulines (Fawcett *et al.*, 1992) et peut lier LFA-1 (de Fougerolles et Springer, 1992), quoique avec une affinité inférieure à ICAM-1 (de Fougerolles *et al.*, 1994). La liaison sur ICAM-3 peut induire des signaux intracellulaires entraînant un changement dans le niveau calcique et la phosphorylation de tyrosines (Arroyo *et al.*, 1994; Campareno *et al.*, 1994; Juan *et al.*, 1994; Skubitz *et al.*, 1995). ICAM-3 peut aussi lier l'intégrine CD11d/CD18, exprimée principalement à la surface de certains sous-types de cellules monocytaires (van der Vieren *et al.*, 1995). CD11d/CD18 a une plus haute affinité pour ICAM-3 par rapport à ICAM-1.

ICAM-4, aussi appelée glycoprotéine sanguine du groupe Landsteiner-Wiener (*LW blood group glycoprotein*), est exprimée exclusivement à la surface des globules rouges (Bailly *et al.*, 1994). ICAM-4, comme ICAM-2, est formée de 2 domaines immunoglobulines extracellulaires et peut lier LFA-1 et MAC-1 (Bailly *et al.*, 1995; Hermand *et al.*, 2000). Ces interactions pourraient être impliquées dans l'élimination rapide des globules rouges par les macrophages spléniques ou lors de la maturation érythroïde (Bailly *et al.*, 1995; Van der Vieren *et al.*, 1995).

ICAM-5 (télencéphaline) est présente à la surface des neurones télencéphaliques de mammifères (Yoshihara *et al.*, 1994). ICAM-5 est composée de neuf domaines immunoglobulines et peut lier LFA-1 (Tian *et al.*, 1997; Tian *et al.*, 2000). L'activation de LFA-1 ne serait pas nécessaire pour sa liaison avec ICAM-5 (Mizuno *et al.*, 1997). Elle jouerait un rôle important dans les interactions intercellulaires impliquant des intégrines dans le système nerveux central (Tian *et al.*, 1997).

1.10 Thérapie anti-ICAM-1

Comme il a été décrit dans les sections précédentes, ICAM-1 joue un rôle crucial dans le recrutement leucocytaire lors des processus inflammatoires et lors de la présentation d'antigène. Ainsi, pour des fins thérapeutiques, le blocage de la fonction

d'ICAM-1 peut être bénéfique pour une multitude de situations pathologiques telles que le rejet de greffe, les maladies auto-immunes, l'asthme, etc.

1.10.1 Rejet de greffe

1.10.1.1 Généralités

La transplantation est le traitement de choix pour les patients souffrant de troubles fonctionnels qui touche un organe. L'insuffisance rénale, l'hépatite, le diabète ou les maladies coronariennes sont parmi les complications les plus fréquentes pouvant être traitées par une greffe de l'organe respectivement déficient. En date de 1998, 416 000 transplantations de reins, 46 300 transplantations de cœur et 62 500 transplantations de foie ont été effectuées à travers le monde, démontrant l'importance de cette procédure dans le but d'améliorer la survie et la qualité de vie des patients (Bushell et Wood, 1999). Cependant, sauf dans quelques rares cas, l'organe transplanté sera tôt ou tard rejeté par l'hôte.

Ce phénomène de rejet peut être expliqué par deux facteurs principaux. Premièrement, l'organe subit des dommages tissulaires durant la période de l'ischémie et lors de sa reperfusion. La période de l'ischémie, qui correspond au temps entre le prélèvement de l'organe du donneur et sa transplantation, induit une réaction inflammatoire caractérisée par l'expression de plusieurs molécules d'adhésion dont ICAM-1, et qui entraîne l'infiltration leucocytaire dans l'organe greffé (Farhood *et al.*, 1995; Bonventre, 1993). Cette infiltration induit des dommages cellulaires et tissulaires souvent irréversibles, diminuant ainsi le fonctionnement de l'organe et son espérance de vie (Monden *et al.*, 1995; Post et Messmer, 1996).

Deuxièmement, la différence entre les complexes majeurs d'histocompatibilité entre le donneur et le receveur induit la destruction de la greffe par le système immunitaire de l'hôte qui le traite comme un corps étranger. En effet, lorsqu'un lymphocyte T de receveur reconnaît une molécule différente du CMH à la surface du tissu de la greffe, une réaction immunitaire destructrice contre la greffe s'en suit. Le risque de rejet est réduit en greffant un organe d'un donneur ayant un CMH similaire au receveur,

mais ce risque est toujours là puisque la présence d'un CMH identique entre deux personnes est presque impossible.

Pour empêcher le rejet de la greffe par le système immunitaire de l'hôte, le patient devra consommer un cocktail d'agents immunosuppresseurs pour le restant de sa vie. Ces agents, composés de drogues comme la cyclosporine A ou la méthylprédnisolone, ou d'anticorps anti-lymphocytaires, atténuent la réponse immunitaire et empêchent le rejet aiguë de la greffe (revus par Denton *et al.*, 1999). Cependant, les agents immunosuppresseurs sont non spécifiques dans le sens où ils ne font pas la distinction entre une réaction immunitaire bénéfique, par exemple contre une infection parasitaire, et destructrice lors du rejet de greffe. Par conséquent, l'état d'immunosuppression du patient ouvre la porte aux infections opportunistes virales (virus Epstein-Barr, cytomégalovirus) ainsi qu'à l'apparition de cancer (lymphome non-Hodgkinien, sarcome de Kaposi) qui peuvent maintenant échapper à la surveillance immunitaire (revues par Sheil, 1998). Finalement, malgré l'utilisation de cocktails immunosuppresseurs de plus en plus puissants, le taux de survie des greffes n'atteint que 30 ou 40 % après 10 ans.

1.10.1.2 ICAM-1 et rejet de greffe

La possibilité de prolonger la survie de la greffe en bloquant la fonction d'ICAM-1 par un anticorps a été testée dans de nombreux modèles animaux. La validité de cette approche est notamment appuyée par le fait qu'un organe provenant d'une souris ICAM-1 déficiente est protégée contre les dommages liés à l'ischémie (Kelly *et al.*, 1996; Wang *et al.*, 1998). L'effet inhibiteur de l'anticorps dans le développement d'une réaction immunitaire peut s'effectuer de deux façons, soit en bloquant l'interaction intercellulaire entre la cellule présentatrice d'antigène et les cellules T ou NK, soit en bloquant le recrutement cellulaire au site de la lésion inflammatoire. C'est ainsi qu'un anticorps anti-ICAM-1 a permis de réduire les dommages liés à l'ischémie et à la reperfusion de greffes hépatiques chez le rat (Marubayashi *et al.*, 1999; Nakano *et al.*, 1998). Une telle protection a aussi été observée dans la greffe d'îlots pancréatiques après injection d'un anticorps anti-ICAM-1 (Poritz *et al.*, 1998) ou en conjonction avec un anticorps anti-LFA-1 (Arai *et al.*, 1999; Herold *et al.*, 1994). Cette même stratégie de deux anticorps a protégé les transplants rénaux contre les dommages liés à l'ischémie chez le rat (Kelly

et al., 1994) et le singe (Flavin *et al.*, 1991). Finalement, le prétraitement d'îlots pancréatiques humains avec un anticorps anti-ICAM-1 a permis de prolonger leur survie suivant la transplantation xénogénique chez la souris (Zeng *et al.*, 1994).

1.10.2 ICAM-1 et autres maladies inflammatoires

D'autres pathologies inflammatoires utilisant un anticorps anti-ICAM-1 ont été investiguées chez les animaux, par exemple dans l'inhibition de l'encéphalomyélite autoimmune expérimentale chez le rat (Archelos *et al.*, 1993). L'anticorps a réduit l'infiltration leucocytaire dans le système nerveux central, protégeant de la sorte l'animal contre les pathologies associées à l'encéphalomyélite. Un tel anticorps couplé à un anticorps anti-LFA-1 a permis d'empêcher la formation d'une glomérulonéphrite autoimmune dans un modèle chez le rat (Nishikawa *et al.*, 1993).

Une augmentation de l'expression d'ICAM-1 a été observée chez des patients souffrant d'arthrite rhumatoïde (Aoki *et al.*, 1993). L'implication d'ICAM-1 dans le développement de l'arthrite est appuyé par le fait que les souris ICAM-1 déficientes sont moins susceptibles à l'arthrite induite par le collagène (Bullard *et al.*, 1996). De ce fait, un anticorps anti-ICAM-1 a bloqué le développement de l'arthrite dans un modèle de rat (Ligo *et al.*, 1991).

1.10.3 ICAM-1 et cancer (néoplasie)

Une expression normale d'ICAM-1 est généralement favorable à l'élimination des cellules tumorales par le système immunitaire. Cela explique l'absence d'études portant sur le contrôle de lésions néoplasiques par un anticorps anti-ICAM-1, exception faite du myélome. Les cellules myéloïdes cancéreuses expriment ICAM-1 et LFA-1, contrairement aux cellules normales qui n'expriment généralement qu'ICAM-1 (Ahsmann *et al.*, 1992). Un anticorps anti-ICAM-1 a inhibé la croissance des cellules myéloïdes ARH-77 humaines implantées dans des souris SCID, probablement en bloquant l'interaction intercellulaire responsable de l'induction de signaux de prolifération (Huang *et al.*, 1995).

1.11 Limitation des anticorps

Bien que la possibilité d'une thérapie anti-ICAM-1 à base d'anticorps ait été démontrée dans de nombreux modèles animaux, leur efficacité et leur sécurité d'utilisation restent encore à prouver. Les anticorps proprement dits peuvent déclencher des effets secondaires en induisant par exemple une activation cellulaire non désirée ou en interférant avec la fonction normale de la protéine (Schachner, 1993; Schuch *et al.*, 1989; Kornberg *et al.*, 1991). En ce qui concerne l'utilisation d'un anticorps anti-ICAM-1 dans des essais cliniques, les résultats sont peu encourageants. En effet, l'anticorps anti-ICAM-1 R6.5 (Enlimomab), se fixant au domaine 2 d'ICAM-1 humain, a été testé pour le traitement de l'arthrite rhumatoïde (Kavanaugh *et al.*, 1994), mais des effets adverses, tels que la formation de complexes immuns, une lymphocytose et une activation incontrôlée des neutrophiles ont été observés chez certains patients (Vuorte *et al.*, 1999). De plus, une amélioration clinique n'a été observée que chez quelques uns de ceux-ci (Kavanaugh *et al.*, 1996; Kavanaugh *et al.*, 1997). Finalement, les résultats préliminaires ont démontré que ce même anticorps n'a pas permis d'améliorer la survie de greffes de rein et de foie chez des patients greffés (Haug *et al.*, 1993; Salmela *et al.*, 1999).

Face à l'échec probable des thérapies anti-ICAM-1 à base d'anticorps, et afin de contourner les limitations évidentes qui leur sont associées, des alternatives stratégiques doivent être développées. L'une d'elle, la thérapie génique, propose de réguler la fonction d'un gène en s'impliquant directement au niveau de son expression.

2 Thérapie génique

2.1 Généralités

La thérapie génique consiste à modifier l'expression d'un gène ciblé dans le but d'altérer un phénotype cellulaire. Elle permettrait donc l'expression d'un gène normalement absent dans un tissu donné, de remplacer un gène défectueux, ou bien de diminuer ou de supprimer l'expression d'un gène présent. Les cibles géniques sont très nombreuses et touchent une multitude de maladies et de pathologies (revues dans Crooke,

1998). L'avancement dans le domaine de la biologie moléculaire a mené aux développements d'outils maintenant utilisés en thérapie génique, soit les vecteurs d'expression, ou plasmides, contenant le gène d'intérêt sous le contrôle d'un promoteur constitutif ou spécifique à un tissu ou cellule. Pour l'inhibition de l'expression d'un gène, un oligonucléotide antisens est conçu pour s'hybrider à un brin d'ADN particulier, bloquant ainsi la transcription ou la traduction du gène. Finalement, la découverte de l'activité catalytique des ribozymes est un moyen alternatif de bloquer l'expression d'un gène ciblé en clivant l'ARN messenger particulier (Kumar et Ellington, 1995).

Zamecnik et Stephenson ont été les premiers, en 1978, à proposer l'utilisation d'oligonucléotides synthétiques pour des fins thérapeutiques (Zamecnik et Stephenson, 1978). Un antisens est un oligonucléotide généralement de 10 à 25 bases dont le principe d'inhibition est basé sur l'hybridation spécifique par ponts hydrogènes (principe de Watson-Crick) entre les bases de la séquence d'ADN et l'oligonucléotide antisens. Les mécanismes d'inhibition des antisens incluent notamment la dégradation de l'ARNm par la RNase H, l'inhibition de la formation du spliceosome en masquant les sites d'épissages, et l'inhibition de la traduction par la formation d'une structure triple-hélice (revus dans Crooke, 1993). Les antisens pénètrent dans la cellule principalement par endocytose, conduisant à une localisation des oligonucléotides dans les endosomes (Beltinger *et al.*, 1995).

2.2 ICAM-1 et thérapie génique

2.2.1 Antisens et rejet de greffe

Il a été démontré que le blocage de la fonction d'ICAM-1 par un mécanisme antisens peut être bénéfique lors des transplantations d'organes. Par exemple, dans des modèles impliquant les greffes chez le rat, l'inhibition de l'expression d'ICAM-1 à l'aide d'un antisens a permis de réduire les dommages reliés à la reperfusion et à l'ischémie de greffes cardiaques (Feeley *et al.*, 1999; Feeley *et al.*, 2000) et rénaux (Haller *et al.*, 1996; Chen *et al.*, 1999), ainsi que de retarder le rejet de greffe du cœur (Strepkowski *et al.*,

1997; Poston *et al.*, 1999), des poumons (Toda *et al.*, 2000) et des reins (Dragun *et al.*, 1998). Des résultats similaires ont été obtenus chez la souris, notamment pour les reins (Dragun *et al.*, 1999) et le cœur (Strepkowski *et al.*, 1994). Le traitement jumelé d'antisens anti-ICAM-1 avec un anticorps anti-LFA-1 a permis d'induire une tolérance envers la greffe cardiaque chez la souris (Strepkowski *et al.*, 1994).

2.2.2 Antisens et autres maladies inflammatoires

L'expression d'ICAM-1 a déjà été ciblée par des antisens dans d'autres modèles inflammatoires. Par exemple, un antisens anti-ICAM-1 murin, ISIS 3082, a retardé l'apparition des symptômes reliés à la colite induite par le dextran sulfate de sodium, en empêchant l'infiltration des leucocytes dans le colon de l'animal (Bennet *et al.*, 1997). Ce même antisens a inhibé l'uprégulation d'ICAM-1 induite par le LPS de *Escherichia coli* au niveau des poumons, et réduit l'infiltration des neutrophiles dans l'espace alvéolaire (Kumasaka *et al.*, 1996).

Chez l'humain, un antisens anti-ICAM-1, ISIS-3023 a été testé pour le traitement de la maladie de Crohn (Yacyshyn *et al.*, 1998). Cet antisens est également à l'essai pour la colite ulcéreuse et le psoriasis (ISIS, <http://www.isip.com>). Bien que le traitement avec l'antisens fut généralement bien toléré, l'absence d'amélioration significative des symptômes cliniques chez les patients traités avait forcé l'abandon temporaire des essais cliniques. Ces essais ont néanmoins repris plus récemment en utilisant des doses plus élevées (ISIS, <http://www.isip.com>).

2.2.3 Antisens et cancer

La tumorigénicité du mélanome étant généralement associée avec un haut niveau d'expression d'ICAM-1, la réduction de l'expression de cette dernière à l'aide d'un oligonucléotide antisens a diminué de façon significative l'habileté métastatique de cellules mélanomateuses humaines C8161, MeWo et A375 préalablement stimulées au TNF- α (Miele *et al.*, 1994).

2.2.4 Vecteur d'expression et cancer/immunothérapie

En règle générale, la sur-expression d'ICAM-1 améliore la réponse anti-tumorale en favorisant le recrutement des cellules leucocytaires au site néoplasique, ou en favorisant la présentation d'antigène entre la cellule cancéreuse et les lymphocytes ou cellules NK effectrices. Plusieurs études *in vivo* sur des modèles animaux ont porté sur l'induction du potentiel anti-métastatique du système immunitaire par la surexpression d'ICAM-1 à la surface des cellules tumorales. Par exemple, la transfection des cellules gliales cancéreuses avec les gènes codant pour ICAM-1 et B7.1 (CD80) a permis de prolonger significativement le temps de survie des souris traitées (Joki *et al.*, 1999). Des résultats similaires ont été obtenus avec la surexpression d'ICAM-1 dans des cellules de gliomes murins implantées de façon sous-cutanée, et non pas suivant leur implantation dans le cerveau (Kikuchi *et al.*, 1999). La surexpression d'ICAM-1 par des lignées de carcinome hépatocellulaire de rat ou colorectale humaine implantées chez le rat a induit une réponse anti-tumorale et abrogé leur tumorigénicité (D'angelica *et al.*, 1999), une telle baisse de tumorigénicité a aussi été observée dans le cas d'un fibrosarcome murin (Sartor *et al.*, 1995). Finalement, l'expression xénogénique d'ICAM-1 humaine par des lignées tumorales de rat JM-1 (lymphoblastome B) et SST-2 (carcinome mammaire) a induit une réponse anti-tumorale dépendante des lymphocytes T cytotoxiques contre celles-ci et induit une protection à long terme contre les cellules tumorales non-modifiées (Wei *et al.*, 1996).

2.3 Limitation des thérapies géniques actuelles

Les molécules d'ADN sont éliminées très rapidement de la circulation sanguine, se complexent facilement avec les protéines sériques, et ont un temps de demi-vie plasmatique de quelques minutes seulement (Lew *et al.*, 1995). En outre, les caractéristiques physico-chimiques de l'ADN défavorisent son entrée dans les cellules. En effet, la charge négative des chaînes polynucléotidiques, par la présence des groupes phosphates, empêchent la molécule d'ADN de traverser facilement la membrane cellulaire réfractaire au transport de molécules chargées de grandes tailles. Finalement,

l'accumulation de l'ADN dans plusieurs organes non ciblés entraîne l'apparition d'effets non spécifiques, en plus d'un besoin d'une dose plus élevée pour obtenir l'effet thérapeutique désiré. D'autres limitations touchent plus spécifiquement le traitement aux oligonucléotides ou bien à la diffusion efficace d'un vecteur d'expression.

2.3.1 Antisens

Chaque base nucléotidique de l'oligonucléotide peut être liée entre elles par différents types de liens chimiques, la forme native de l'ADN étant le lien phosphodiester. Bien que les oligonucléotides phosphodiesters possèdent une affinité optimale avec le brin complémentaire de l'ARN messenger ciblé, leur potentiel thérapeutique est limité par leur sensibilité aux endonucléases sériques et cellulaires. Ainsi, pour augmenter la résistance des oligonucléotides, des antisens modifiés chimiquement ont été développés, principalement en altérant le lien phosphodiester du squelette phosphate de l'oligonucléotide. La première génération de ces modifications est basée sur le remplacement d'un oxygène du groupe phosphate par un atome de soufre (Frey et Sammons, 1985), ou par un groupe méthylphosphonate (Miller *et al.*, 1985). Ces antisens ont démontré une meilleure résistance aux endonucléases et une meilleure pénétration dans les cellules (Eder *et al.*, 1991). En contrepartie, ils ont également une avidité plus faible pour l'ARN messenger, ont une spécificité moindre pour la séquence cible, et démontrent une plus grande affinité pour les protéines (Krieg et Stein., 1995). D'autres modifications ont donc été effectuées aux bases et aux riboses pour tenter d'améliorer la stabilité tout en conservant leur spécificité (revues par Uhlmann et Peyman, 1990; De Mesmaeker *et al.*, 1995).

Pour qu'une stratégie antisens anti-ICAM-1 fonctionne, l'oligonucléotide doit être capable de se rendre intact et en quantité suffisante au site ciblé pour avoir un effet thérapeutique. Dans le cas de ISIS-3023 testé entre autre pour le traitement de la maladie de Crohn, l'échec des premiers essais cliniques s'explique en partie par le fait que seulement une infime partie (moins de 5%) de la dose injectée se rend aux intestins, le reste étant filtré principalement par les reins et le foie. Une plus forte dose permettrait

d'obtenir un effet thérapeutique mais les risques de toxicité limiteront le montant d'oligonucléotides utilisable et la durée du traitement.

2.3.2 Expression

Bien que l'injection de l'ADN directement dans la masse tumorale est souvent possible, cette approche est peu pratique, particulièrement lorsque l'organe est de grande taille, ce qui nécessiterait des injections multiples pour obtenir un traitement efficace. De plus, les types de tumeurs qui ne peuvent être enlevés chirurgicalement sont difficilement accessibles pour l'injection. Le traitement systémique est souvent nécessaire puisque la présence d'une tumeur primaire peut impliquer la diffusion de métastases dans l'organisme. Finalement, ce type d'approche n'est pas possible dans le cas de néoplasies diffuses, comme la leucémie ou le lymphome dans les ganglions.

Les modèles d'étude présentés précédemment et basés sur la sur-expression d'ICAM-1 démontrent la validité de la stratégie consistant à favoriser la présentation d'antigène des cellules tumorales. Cependant, toutes ces études étaient basées sur la modification *ex vivo* des cellules tumorales précédant leur implantation et non pas sur l'expression d'ICAM-1 de façon ciblée à la surface des cellules tumorales déjà implantées. La condition pour l'applicabilité thérapeutique de cette stratégie revient donc à l'utilisation d'un système capable de cibler l'expression d'ICAM-1 dans les cellules cancéreuses déjà implantées dans l'organisme.

L'utilisation d'un transporteur d'ADN permettrait d'éliminer une partie des problèmes associés aux stratégies actuelles pour le développement d'une thérapie génique

2.4 Transporteurs d'ADN

En examinant l'ensemble des facteurs limitant l'efficacité d'une thérapie à base d'ADN, un transporteur d'ADN doit remplir au moins trois rôles principaux et distincts : 1) protéger les molécules d'ADN, plasmides ou antisens oligonucléotidiques, contre la dégradation très rapide par les nucléases sériques et cellulaires; 2) permettre un certain ciblage de la molécule d'ADN vers l'organe désiré; et 3) permettre à la molécule d'ADN

de traverser les membranes cytoplasmique, endosomale et nucléaire et ce, afin de remplir son rôle.

2.4.1 Transporteurs viraux

Les transporteurs viraux utilisent les propriétés naturelles d'un virus à pénétrer efficacement la cellule ciblée et à lyser les endosomes, permettant ainsi au génome viral d'atteindre le noyau et de s'exprimer (Cotten *et al.*, 1992). Une partie du génome viral, généralement codante pour des protéines impliquées dans la réplication, est ainsi remplacée par le gène d'intérêt. Principalement à base d'adénovirus et de rétrovirus (Gitman *et al.*, 1985; Gilboa, 1986), d'autres virus, tels que les virus de l'herpes (Nilaver *et al.*, 1995) et les baculovirus (Hofmann *et al.*, 1995) ont aussi été investigués pour le transport d'ADN.

Toutefois, les vecteurs viraux font faces à de sérieuses limitations. Notamment, l'intérêt thérapeutique des adénovirus est limitée par les risques de réactions inflammatoires indésirables causées par les particules virales, ainsi que leur faible capacité génomique qui est restreinte par la grosseur de la capsid virale (Simon *et al.*, 1993; Dewey *et al.*, 1999; Floeth *et al.*, 2001). Les rétrovirus, quant à eux, sont très efficaces *in vitro* mais leur utilisation *in vivo* est limitée par les risques associés à leur recombinaison possible avec des virus endogènes (révertants), aux effets oncogéniques, ainsi qu'à leur tropisme naturel difficilement modifiable (Temin, 1990; Boris-Lawrie et Temin, 1994). Finalement, ces systèmes ne peuvent être administrés d'une façon répétée, les particules virales étant reconnues par le système immunitaire et rapidement éliminées suivant la deuxième injection (Yei *et al.*, 1994).

2.4.2 Transporteurs non-viraux

Les liposomes (Liu *et al.*, 1996; Gao et Huang, 1991; Hofland *et al.*, 1996), les polymères cationiques (Kabanov *et al.*, 1989; Boussif *et al.*, 1995; Haensler et Szoka, 1993; Cherg et al., 1996; Behr *et al.*, 1989), les dendrimères (Kukowska-Latallo *et al.*, 1995) et les polybrènes (Aubin *et al.*, 1988) sont différents types de transporteurs non-

viraux. Ces transporteurs offrent une très grande variété de structures et de propriétés physico-chimiques.

Cependant, les transporteurs non-viraux actuels sont confrontés à plusieurs obstacles limitant leur efficacité ou leur utilisation à grande échelle. En effet, les techniques basées sur la lipofection sont très prometteuses mais sont limitées par des problèmes de cytotoxicité et de solubilité (Farhood *et al.*, 1992; Li et Huang, 1997; Liu *et al.*, 1997). En outre, les complexes liposomiques sont instables et, suite à leur injection intraveineuse, s'accumulent dans les poumons (Liu *et al.*, 1995), limitant par le fait même leur champ d'application thérapeutique. Les complexes d'ADN à base de polycations, tels que le polyéthylèneimine (PEI) et la spermidine, une fois complexés à l'ADN tendent à précipiter, manifestent une certaine cytotoxicité (Boussif *et al.*, 1995) et, comme les liposomes, peuvent causer des embolies pulmonaires (Ogris *et al.*, 1998). Quant aux transporteurs basés sur le polylysine (Wagner *et al.*, 1990; Wu et Wu, 1987), leur efficacité est fortement affectée par leur incapacité à s'échapper des endosomes (Pouton *et al.*, 1998).

2.5 Études cliniques

L'utilisation de transporteurs d'ADN a ouvert la porte au développement de thérapies géniques qui se manifeste par plus d'une centaine d'études cliniques qui sont présentement en cours et utilisant des liposomes ou des virus comme transporteurs d'ADN.

2.5.1 Maladies génétiques

Ces essais cliniques visent des maladies génétiques telles que la déficience en adénosine déaminase responsable d'une immunodéficience combinée sévère (SCID) (Onodera *et al.*, 1998) ou la maladie de Gaucher (Dunbar *et al.*, 1998). D'autres essais cliniques portent sur le traitement de la fibrose kystique en traitant le patient avec un vecteur d'expression codant pour la *Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator* (CFTR) et administré par voie nasale ou via l'épithélium pulmonaire

(adénovirus: Crystal *et al.*, 1994; Zabner *et al.*, 1993; Knowles *et al.*, 1998; liposomes cationiques: Caplen *et al.*, 1995; Gill *et al.*, 1997).

2.5.2 Maladies néoplasiques

Certaines maladies néoplasiques, telles que la leucémie, le myélome et le mélanome, sont aussi visées (revues dans Marcel and Grausz, 1997). Ces essais impliquent l'injection intratumorale du vecteur d'ADN portant le gène *HLA-B7* à des patients souffrant de mélanome (Nabel *et al.*, 1996), d'adénocarcinome du colon (Rubin *et al.*, 1997) ou de rein (Rini *et al.*, 1999), ou les gènes *p53* (Schuler *et al.*, 2001) ou de l'*interféron-β* dans le traitement du gliome (Eck *et al.*, 2001). Certaines néoplasies, telles que le glioblastome (Sandmair *et al.*, 2000; rétrovirus, Klatzmann *et al.*, 1998; Adénovirus, Dewey *et al.*, 1999) ou le mélanome (Klatzmann, 1996), sont également traitées en injectant des rétrovirus codant pour le gène de la Tyrosine Kinase de l'Herpes Simplex type 1 (TK HSV-1) en utilisant l'approche des gènes suicides. Cette enzyme convertit la genciclovir en composé toxique dans les cellules en division exprimant la TK.

Bien que la correction fonctionnelle génique soit incomplète et ne toucherait qu'une partie des patients traités, les résultats sont encore à l'état préliminaire. Des résultats encourageants ont notamment été obtenus dans le traitement de l'hémophilie (Kay *et al.*, 2000) ou de l'immunodéficience combinée sévère (Cavazzana-Calvo *et al.*, 2000). Dans les cas de néoplasie, le taux de rémission complète ou partielle des patients traités se situe au-dessous de 10%. Il est généralement accepté que les limitations des stratégies actuelles soient dues à la faible efficacité des transporteurs à cibler l'ADN dans le compartiment désiré, ainsi qu'à l'application limitée de l'injection locale et non pas systémique des complexes transporteurs-ADN.

Le développement de nouveaux types de transporteurs est donc nécessaire afin d'améliorer l'efficacité des thérapies géniques et d'en exploiter leur potentiel. Cependant, en plus des trois rôles principaux des transporteurs déjà présentés, soit : 1) de protéger les molécules d'ADN contre la dégradation, 2) de permettre un certain ciblage thérapeutique,

et 3) de permettre à l'ADN de traverser les membranes biologiques, de nouveaux éléments doivent s'ajouter à la définition d'un transporteur d'ADN idéal. Ce transporteur doit être non toxique et non-immunogénique, il doit former un complexe stable avec l'ADN, et doit être simple à préparer et à faible coût. Une approche intéressante pour développer un tel transporteur est l'utilisation de complexes interpolyélectrolites en bloc dont la solubilité, les dimensions et la charge nette peuvent être modifiées en fonction des besoins propres à chaque agent thérapeutique. Le ciblage du complexe vers l'organe désiré se fera en exploitant les propriétés physico-chimiques propres aux composantes du complexe sans l'ajout d'unités de ciblage indépendantes.

2.6 Copolymères en bloc

2.6.1 Historique

Les premières études basées sur les conjugués de copolymères en bloc datent du début des années 80 par le groupe du Dr Ringsdorf (Pratten *et al.*, 1985; Bader *et al.*, 1984). Ces travaux étaient basés sur l'observation que la liaison d'un polymère soluble à une drogue hydrophobe augmentait la solubilité de celle-ci. Cependant, la quantité de polymères que l'on pouvait ajouter au mélange avant que le complexe polymère-drogue ne précipite était limitée. Ce chercheur a donc proposé l'utilisation d'une structure copolymérique composée d'un bloc hydrophobe lié de façon covalente à la drogue, et d'un second bloc amphiphile, c'est-à-dire non-chargé mais soluble dans l'eau. Le complexe obtenu avait une structure micellaire comprenant un « noyau » composé du bloc portant la drogue, et d'une « coquille » formée par une couronne de blocs hydrophobe. Une deuxième approche a par la suite été abordée en incorporant la drogue dans une micelle de façon non-covalente (Lasic, 1992).

2.6.2 Structure

Un copolymère en bloc peut être défini comme un conjugué contenant au moins deux segments de polymères différents. Dans sa forme la plus simple, un copolymère en bloc est formé par la liaison d'un bloc (unimère) A à un bloc B, donnant ainsi un format dibloc A-B. En utilisant ce même principe de nomenclature, des copolymères en bloc peuvent se faire au format tribloc A-B-A, ou multibloc A-B-A-B, etc. Lorsqu'un bloc B est greffé à plusieurs endroits sur un bloc A, le copolymère est défini $A(B)_n$, où n représente le nombre de bloc B greffé sur un unimère A. Des copolymères en bloc ayant une architecture complexe aux formats $C(AB)_n$, A_nB_m , etc, peuvent être décrits simplement. Une très grande variabilité de structures est ainsi obtenue dans l'assemblage de plusieurs composantes de structures et de fonctionnalités différentes; ces « blocs de construction » donnent un aspect universel à cette stratégie de transporteurs (Figure 3).

2.6.3 Polymère ionomérique en bloc

La formation de complexes polyélectrolytiques entre des acides nucléiques et un copolymère en bloc nécessite l'utilisation d'un bloc A comportant des charges ioniques positives pouvant interagir avec L'ADN. L'idée est donc venue de développer une nouvelle classe de transporteurs à base de polymère en bloc contenant un monomère ionique chargé, d'où le nom de polymères ionomérique en bloc. La formation d'un complexe micellaire est possible par la neutralisation électrostatique entre les charges positives du bloc polymère A avec les groupes phosphates de l'ADN, alors que la solubilité du complexe est maintenue par la formation d'une couronne de blocs B hydratés (Harada et Kataoka *et al.*, 1995 ; Kataoka *et al.*, 2001; Kabanov *et al.*, 1995). La solubilité de ces complexes dépend de la longueur de la chaîne des segments hydrophiliques non-ioniques du copolymère (Schmolka, 1977).

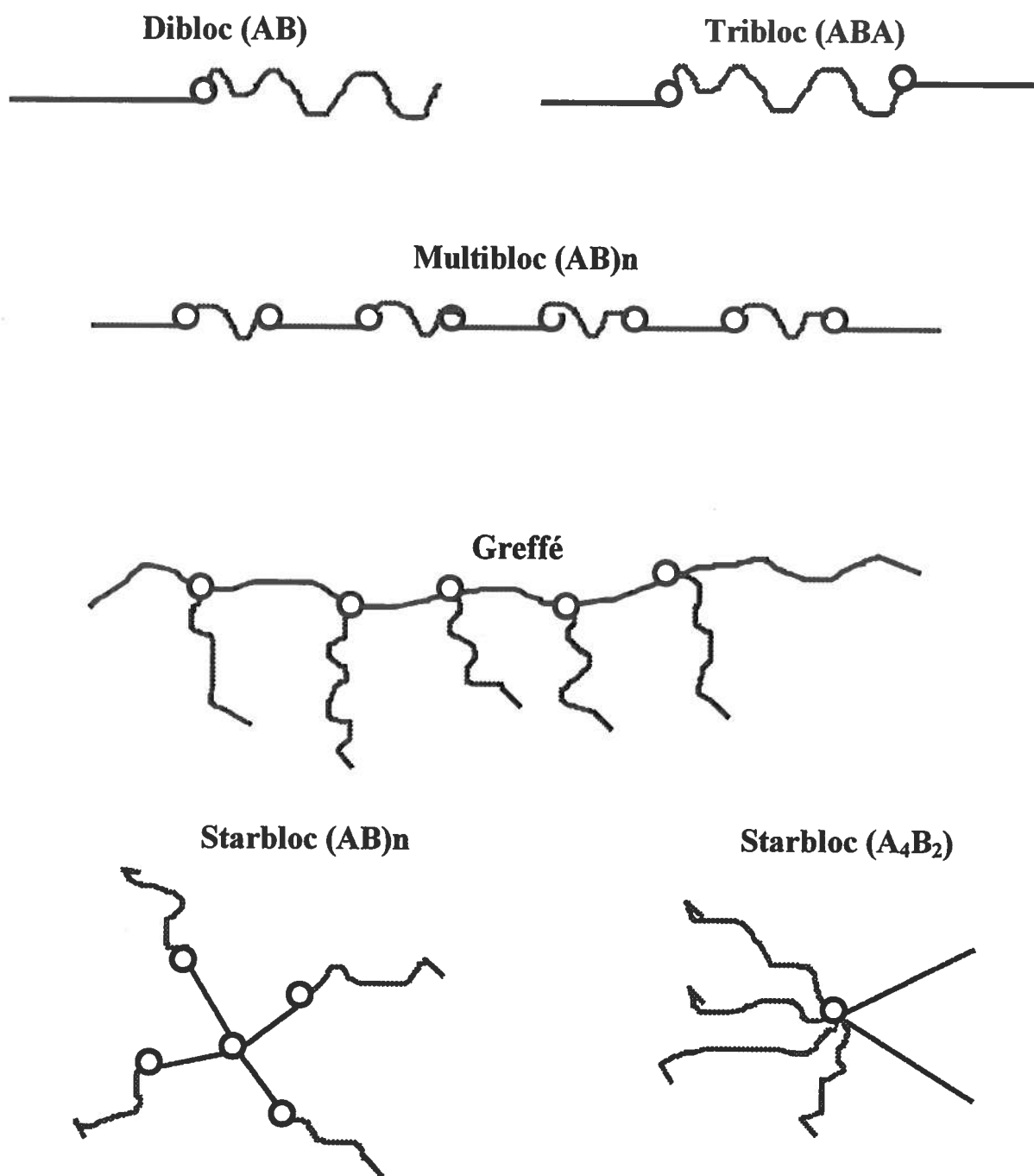


Figure 3 : Copolymères en bloc.

Représentation schématique de quelques configurations possibles des complexes ionomériques en bloc.

2.6.3.1 Le bloc A

Dans ce type de transporteurs, le bloc A est composé d'un polycation (polyéthylèneimine, polylysine, polyspermine, polyspermidine) qui, de par leur haute concentration en groupements électropositifs, se complexent avec l'ADN avec une très haute efficacité (Tableau 1). La spermine et la spermidine sont des polyamines naturels présents en grande quantité dans les noyaux eucaryotiques et sont utilisés lors de la condensation de l'ADN au niveau des chromosomes, alors que le polylysine et le polyéthylèneimine sont utilisés depuis longtemps en exploitant leur capacité à se complexer avec l'acide ribonucléique et à interagir avec la surface membranaire (Haynes *et al.*, 1970; Boussif *et al.*, 1995). Cependant, à la suite de la complète neutralisation des charges, ces complexes tendent à précipiter et à former des agrégats de tailles importantes (Kabanov *et al.*, 1995). Par conséquent, un second bloc est ajouté au premier pour maintenir le complexe en suspension et de taille inférieure à 100 nm, ce qui est nécessaire pour une libre circulation dans les capillaires sanguins.

Nom	Structure
Poly (triméthylammonioéthyl méthacrylate chlorure) (pTMAEM)	$* \left[\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \\ \text{C} \\ \\ \text{H}_2 \\ \\ \text{O} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{N}^+ \text{CH}_3 \\ \\ \text{CH}_3 \end{array} \right]_n *$ <p style="text-align: right; margin-right: 20px;">Cl⁻</p>
Polyéthylèneimine (PEI)	$* \left[\text{---CH}_2\text{---CH}_2\text{---N---} \right]_n *$
Polyspermine (PS)	$\left[\text{H}_2\text{N---CH}_2\text{---CH}_2\text{---CH}_2\text{---NH---CH}_2\text{---CH}_2\text{---CH}_2\text{---CH}_2\text{---NH---CH}_2\text{---CH}_2\text{---NH}_2 \right]_n$
Polyspermidine (PSD)	$\left[\text{H}_2\text{N---CH}_2\text{---CH}_2\text{---CH}_2\text{---NH---CH}_2\text{---CH}_2\text{---CH}_2\text{---NH}_2 \right]_n$
Polylysine (PL)	$* \left[\begin{array}{c} \text{NH}_2 \\ \\ \text{---CH}_2\text{---} \\ \\ \text{---CH---} \\ \\ \text{H} \end{array} \right]_n *$ <p style="text-align: center; margin-top: 10px;">---C(=O)---</p>

Tableau 1 : Structures des blocs A des copolymères ionomériques.

Certains composés chimiques couramment utilisés comme bloc A.

2.6.3.2 Le bloc B

Le bloc B amphiphile peut être de type PEG (Polyéthylène glycol, appelé aussi polyéthylèneoxide, PEO) dont la chaîne de carbone est de longueur variable selon les propriétés physico-chimiques recherchées (Tableau 2). L'habilité du segment polycationique à interagir avec l'ADN ne semble pas être affectée par la présence de blocs amphiphiles (PEO ou Pluronic). Ces blocs permettraient de maintenir le complexe monodispersé et soluble (Alakhov et Kabanov, 1998). De plus, il a été démontré que les molécules d'ADN subissent un compactage dans une solution concentrée de PEG (Yoshikawa, 1997). La capacité des complexes PEGylés à pénétrer dans le cytosol serait due à l'habilité de PEG de déhydrater la membrane cytoplasmique, déstabilisant celle-ci et causant ainsi une perméabilisation locale (Alakhov et Kabanov, 1998). Cependant, le mécanisme d'action de PEG dépendrait de la composition membranaires puisque l'augmentation de transfection n'a pas été observée dans certaines lignées cellulaires.

Le bloc B peut aussi être composé de Pluronic PEG-POP-PEG (polyéthylèneoxide-polyoxypropylène-polyéthylèneoxide), une classe de surfactants possédant une certaine activité biologique. Les composés Pluronic favorisent l'interaction avec les membranes biologique du complexe et augmentent l'accumulation des complexes ADN dans la cellule en facilitant leur internalisation dans les vésicules endocytiques, ou en intensifiant l'endocytose cellulaire (Astafieva *et al.*, 1996). Il a également été suggéré que les Pluronic, tel que le F68, auraient la propriété de réduire la résistance vasculaire se traduisant en une plus grande perméabilité des vaisseaux sanguins, mais aussi de diminuer la viscosité sanguine (Weetal et Bozichevich, 1967; Moore *et al.*, 1968; Grover *et al.*, 1973). Ces surfactants ont notamment été utilisés pour augmenter la solubilité et la disponibilité de composés insolubles, notamment des drogues anticancéreuses (Yokohama *et al.*, 1990), et il a été démontré que le Pluronic P85 augmente l'efficacité de transfection d'ADN, probablement en augmentant le taux d'endocytose ou en favorisant la formation des endosomes (Astafieva *et al.*, 1996).

Nom	Structure
Poly(éthylène oxide) (PEO ou PEG)	$* \left[\text{O} - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 \right]_n *$
Poly(propylène oxide) (POP)	$* \left[\text{O} - \text{CH}_2 - \text{CH}(\text{CH}_3) \right]_n *$
Poly 2-hydroxypropyl) methacrylamide pHPMA	$\text{HO} - \left[\text{CH}_2 - \text{CH}(\text{O}) - \text{CH}_2 - \text{N}(\text{H}) - \text{C}(=\text{O}) - \text{CH}(\text{C}(\text{CH}_3)=\text{CH}_2) \right]_n *$

Tableau 2 : Structures des blocs B des copolymères ionomériques.
Certains composés chimiques couramment utilisés comme bloc B.

Les complexes polylysines-PEG ont démontré leur potentiel à améliorer le transport intracellulaire d'oligonucléotides antisens et de les protéger contre la dégradation (Kabanov *et al.*, 1995; Kataoka *et al.*, 1996). Les complexes polyspermine-PEG ont été utilisés avec succès dans la transfection de neurones primaires (Mundigl *et al.*, 1998) et dans la rétine (Roy *et al.*, 1999). Les complexes pHPMA-pTMAEM-PEG (poly-N- (2-hydroxypropyl) methacrylamide-poly (*trimethylammonioethyl methacrylate chloride*)) (Wolfert *et al.*, 1996) et (pEVP (poly(N-ethyl-4-vinylpyridinium)) (Kabanov *et al.*, 1991) ont, quant à eux, démontré leur capacité à complexer des plasmides et à maintenir les complexes solubles et monodispersés. Les études *in vitro* et *in vivo* de certains complexes polyéthylèneimine-Pluronic ont été présentées par Nguyen *et al* (2000). Leurs principales caractéristiques sont de maintenir les complexes solubles dans une intervalle de 70 à 100 nm de diamètre, ont une efficacité de transfection élevée, et contrairement au PEI, permettent une distribution du complexe dans plusieurs organes tels que la rate, le cœur et le foie.

Contributions

L'utilisation de transporteurs d'ADN a ouvert la porte au développement de thérapies géniques qui se manifeste par plus d'une centaine d'études cliniques qui sont présentement en cours et utilisant des liposomes ou des virus comme transporteurs d'ADN. Cependant, des résultats thérapeutiques concluants tardent à se manifester étant la faible efficacité ou la toxicité notable de ces transporteurs. La recherche de nouvelles stratégies de transporteurs d'ADN est donc de mise.

La présente étude a pour buts d'identifier et de caractériser des polymères ionomériques en bloc capables de servir de transporteurs d'ADN afin d'améliorer l'entrée d'ADN dans les cellules mais également d'altérer la biodistribution de l'ADN *in vivo* (Chapitre 2). Par la suite, ces polymères ont été testés pour leur capacité à transporter un antisens anti-ICAM-1 dans la lignée endothéliale murine b-end.3 (Annexe 1); la biodistribution et l'activité de l'antisens combiné à l'un des polymères sélectionnés est également présenté au Chapitre 3. Ces transporteurs seront également testés pour la transfection de cellules COS-7 d'un plasmide portant le gène *ICAM-1* murin (Annexe 1) ainsi que la capacité d'un complexe polymère/plasmide ICAM-1 à induire le recrutement de neutrophiles dans le foie de souris (Chapitre 4).

Finalement, une partie de l'étude a porté sur la caractérisation des isoformes d'ICAM-1 afin d'en évaluer leur potentiel thérapeutique dans une éventuelle thérapie génique. Pour ce faire, leur expression dans les souris et leur capacité à recruter les leucocytes dans un modèle d'inflammation et leur implication dans le choc septique ont été évaluées (Chapitre 5). Ces résultats ont été en partie incorporés dans un manuscrit, Robledo et coll., soumis au *European Journal of Immunology*. Le manuscrit est présenté en annexe.

CHAPITRE2

Altered Organ Accumulation of Oligonucleotides Using Polyethyleneimine Grafted
with Poly(ethylene oxide) or Pluronic as Carriers

RÉSUMÉ

Changement de l'accumulation d'oligonucléotides dans les organes en utilisant comme transporteurs le polyéthylèneimine greffé au poly(oxide d'éthylène) ou au Pluronic.

Le ciblage passif est une stratégie simple basée sur l'utilisation des propriétés naturelles des transporteurs pour délivrer des molécules d'ADN aux compartiments désirés. Le polyéthylèneimine (PEI) est un système non-viral très efficace pour délivrer des plasmides et des oligonucléotides (ODN) *in vitro*. Cependant, l'administration systémique *in vivo* de complexes PEI/ADN fait face à de nombreux problèmes causés notamment par leur toxicité et par leur faible distribution dans les tissus ciblés. Cette étude porte sur l'évaluation des transporteurs à base de PEI greffés au poly(oxide d'éthylène) (PE0(8K)-g-(PEI(2K)) ou au copolymère amphiphile non-ionique Pluronic® P85 (P85-g-PEI(2K)), et testés pour l'administration systémique d'ODN. Suivant l'injection intraveineuse chez la souris, le complexe PE0(8K)-g-PEI(2K)/ODN s'est accumulé principalement dans les reins, alors que la formulation à base de P85-g-PEI(2K) s'est retrouvée presque exclusivement dans le foie. De plus, dans le cas des animaux injectés avec le complexe P85-g-PEI(2K)/ODN, une grande proportion de l'ODN s'est accumulée dans les hépatocytes, alors que seulement une faible partie s'est accumulée dans les lymphocytes et monocytes. Les résultats de cette étude suggèrent que la formulation d'ODN avec les transporteurs et P85-g-PEI(2K) permettent de rediriger les ODNs vers les reins et le foie respectivement. Cette variation dans la biodistribution tissulaire des ODN est due probablement à la différence de la balance hydrophilique/lipophile des chaînes polyéther qui sont greffées au PEI. Par conséquent, les transporteurs à base de PEI greffé avec des chaînes de polyéther représente une façon simple et efficace d'éviter l'accumulation des complexes dans les poumons, ce qui est normalement observée avec les complexes PEI, et de favoriser l'accumulation d'ODN dans un compartiment désiré sans à avoir recours à une sous-unité spécifique de ciblage.

Contribution des auteurs

Les études portant sur la biodistribution des complexes P85-g-PEI(2K) ont été effectuées en grande partie par Nadia Guérin de l'équipe du Dr Pierre Lemieux à Supratek. J'ai quant-à-moi effectué tous les travaux portant sur le PE0(8K)-g-PEI(2K), ainsi que la rédaction du manuscrit. Le Dr Vinogradov et le Dr Kabanov ont effectué la synthèse des polymères utilisés dans cette étude.

Manuscrit publié dans le *Journal of Drug Targeting*, mars 2002.

Cet article a dû être retiré en raison de restrictions liées au droit d'auteur.

Ochietti B, Guérin N, Vinogradov SV, St-Pierre Y, Lemieux P, Kabanov AV, Alakhov VY.
Altered organ accumulation of oligonucleotides using polyethyleneimine grafted with poly(ethylene oxide) or pluronic as carriers. *J Drug Target.* 2002 Mar;10(2):113-21. PubMed PMID: 12074538.

CHAPITRE 3

Inhibition of ICAM-1 Expression in Kidneys using Antisense Oligonucleotide formulated with Polyethyleneimine Grafted with PEG as a Targeting Carrier

RÉSUMÉ

Inhibition de l'expression d'ICAM-1 rénale en utilisant un oligonucléotide antisens formulé avec un polyéthylèneimine greffé au poly(oxide d'éthylène) comme transporteur ciblant les reins.

Pour caractériser la distribution d'un complexe PEI-PEG-ADN, un antisens phosphorothioate anti-ICAM-1 marqué au ^{35}S a été formulé avec le transporteur. La distribution a été évaluée dans les souris suivant l'injection i.v. du complexe. L'étude présente les résultats de biodistribution comparative d'un oligonucléotide (ODN) seul ou complexé avec le polymère PEO(8K)-g-PEI(2K). Les résultats ont démontré que le complexe PEO(8K)-g-PEI(2K) s'accumule préférentiellement dans les reins (augmentation de 4 fois), et à moindre mesure dans le foie et la rate (1.5 fois). De plus ce complexe a évité l'accumulation dans le tissu de l'estomac telle qu'observée dans le cas de l'ODN seul. L'antisens formulé avec le PEO(8K)-g-PEI(2K) a conservé son activité inhibitrice sur l'expression d'ICAM-1 induite par le LPS.

Contribution des auteurs

J'ai effectué tous les travaux décrits dans cette étude, ainsi que la préparation et la rédaction du manuscrit. Le Dr Vinogradov et le Dr Kabanov ont effectué la synthèse du polymère PEO(8K)-g-PEI(2K).

Manuscrit soumis pour publication au journal *Human Gene Therapy* (Août 2002).

TITLE PAGE

Inhibition of ICAM-1 Expression in Kidneys using Polyethyleneimine Grafted with PEG as a Targeting Carrier.

BENOIT OCHIETTI¹, SERGEI VINOGRADOV², ALEXANDER V
KABANOV², YVES ST-PIERRE¹, and VALERY YU ALAKHOV³

¹ Centre de recherche en santé humaine, INRS-Institut Armand-Frappier, Laval,
Quebec.

² University of Nebraska Medical Center, Department of Pharmaceutical Sciences,
Omaha, NE 68198-6025, USA.

³ To whom correspondence should be addressed at Supratek Pharma Inc., 531
Blvd. des Prairies, Bldg. 18, Laval, Quebec, Canada, H7V-1B7. Tel: 450-686-
5502. Fax: 450-686-5504.

Email : Valery.Alakhov@supratek.com

Running head

Inhibition of ICAM-1 expression in kidneys

ABSTRACT

The ability of a PEI-PEG carrier to specifically deliver a phosphorothioate antisense oligonucleotide (ODN) against ICAM-1 was demonstrated. Biodistribution of the PEI-PEG/ODN complex was evaluated in mice following i.v. injection of [³⁵S]-labeled ODN. ODN formulated with the PEI-PEG carrier shifted biodistribution toward kidneys (4-fold) and liver (1.5-fold) while avoiding accumulation in the stomach tissue. To test whether a formulated ODN against ICAM-1 would retain its biological activity, the level of ICAM-1 expression of LPS-injected mice was analyzed in targeted organs. RT-PCR and immunohistochemical analysis have shown that the ODN accumulated in kidneys, inhibited ICAM-1 expression in mice induced by LPS injection. No such inhibition of the expression was observed in the case of non-formulated ODN.

KEY WORDS.

Polyethyleneimine-grafted PEG; antisense; kidneys; ICAM-1; targeting.

Abbreviations:

AUC, Area Under the Curve; ICAM-1, Intercellular adhesion molecule 1; LPS, Lipopolysaccharide; ODN, Oligodeoxynucleotide; PEI-PEG, polyethyleneimine-polyethyleneglycol; PEO(8K)-g-PEI(2K), polyethyleneoxyde (8 kDa) grafted with polyethylenimine (2 kDa).

OVERVIEW SUMMARY

To characterize the targeting capability of a PEI-PEG carrier, a comparative biodistribution study was done between a [³⁵S]-labeled phosphorothioate oligonucleotide against ICAM-1 nonformulated or formulated with the carrier. Results of the study showed an enhanced accumulation and functional activity of the formulated oligonucleotide.

INTRODUCTION

Leukocyte infiltration is the major factor involved in the tissue destruction during the inflammation (Heemann *et al.*, 1996; Kamochi *et al.*, 1999). Leukocytes are locally recruited by interaction with adhesion molecules among which the key role belongs to Intercellular Adhesion Molecule-1 (ICAM-1) that is expressed on endothelium following pro-inflammatory cytokine expression. ICAM-1 is also an important mediator of T-cell adhesion and co-activation during antigen presentation (Dang *et al.*, 1990; Butcher, 1991), both processes playing a role in allograft rejection. An increase in ICAM-1 expression has been implicated in a variety of inflammatory disorders, such as IgA nephropathy (Mrowka *et al.*, 1999) and ischemic/reperfusion (I/R) injury (Briscoe *et al.*, 1992; Solez *et al.*, 1997), that are characterized by considerable leukocyte infiltration in kidney tissues (Bonventre, 1997).

It has been shown that in ICAM-1-deficient mice kidney transplants are protected against post-ischemic injuries (Kelly *et al.*, 1996). Consequently, ICAM-1 represents a major target for anti-inflammatory therapies for kidney pathologies. It has been shown that an antibody against ICAM-1 prevents I/R damage and improves kidney functions (Kelly *et al.*, 1994; Rabb *et al.*, 1995). However, non-specific binding of blocking antibodies to circulating leukocytes or to vascular endothelium limits their use because of potent anti-xenoantibody

immune response (Kuus-Reichel *et al.*, 1994) adding to the risk of unspecific leukocyte activation.

Gene therapy has been considered as a valuable alternative to other approaches aiming to block ICAM-1 gene expression. Antisense oligonucleotides against ICAM-1 have been used to prevent transplant rejection and I/R injuries, which significantly improved transplant conditions in various tissues (Stepkowski *et al.*, 1994) including kidneys, in which the inhibition of ICAM-1 expression alleviated the infiltration of inflammatory cells and reduced I/R injuries in kidney transplantation (Chen *et al.*, 1999; Stepkowski *et al.*, 1998). However, these approaches require multiple injections at a high dose that often generates significant toxicity and side-effects in non-targeted organs (Henry *et al.*, 1997). The therapeutic effect of antisense-based therapies could be improved by using a delivery system that would increase biodistribution and stability of oligonucleotides in the targeted area. A new type of cationic carriers was recently developed with a graft-copolymer architecture formed by the combination of a polycation, such as polyspermine (PSP) or polyethyleneimine (PEI), and a water-soluble non-anionic segment, such as polyethyleneglycol (PEG) (Vinogradov *et al.*, 1998; Mundigl *et al.*, 1998; Roy *et al.*, 1999).

In this study, we report the pharmacokinetic properties of a PEI-PEG-oligonucleotide complex and its ability to inhibit ICAM-1 expression in key organs using a phosphorothioate antisense oligonucleotide against ICAM-1.

MATERIALS AND METHODS

Animals

C57BL/6 and ICAM-1-deficient mice (*ICAM1^{Tm1Bay}*) were originally obtained from The Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME, USA) and used at 7 to 8 weeks of age. The animals were kept five per cage with an air filter cover under light (12 h light/dark cycle, light on at 06h00) and temperature ($22^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$)-controlled environment. All manipulations with the animals were performed under a sterilized laminar hood. The animals had *ad libitum* access to Purina mouse chow (Pro Lab PMH 4018, Trademark of Agway, Syracuse, NY, USA) and water. The animal studies were conducted according to the “Guidelines for Care and Use of Experimental Animals”.

PEO(8K)-*g*-PEI(2K) synthesis

PEO(8K)-*g*-PEI(2K) block copolymer was prepared as previously described (18). Briefly, PEG (MW 8000) obtained from Aldrich (St. Louis, MO, USA) was activated by modifying one terminal hydroxyl group using 4,4'-dimethoxytrityl (DMT) chloride (Aldrich). Activated PEG (10 g, 1.2 mmol) was reacted with 7.2 g (3.6 mmol) of PEI in 80 ml of methanol for 24 h at 25°C (Aldrich).

Oligonucleotide synthesis

The uniformly [³⁵S]-labeled phosphorothioate oligonucleotide (ODN) ([³⁵S]-ODN) was synthesized as previously described (Agrawal *et al.*, 1991). The unlabeled ODN was mixed with [³⁵S]-ODN (specific activity of 1 mCi/mg) in PBS to a final concentration of 3 mg/ml (specific activity of 20 μCi/mg). The ODN corresponding to the IP-3082 murine ICAM-1 antisense sequence (Stepkowski *et al.*, 1994) and its scrambled sequence ODN IPS-8997 were synthesised by Hybridon (Cambridge, MA, USA). The ODN sequences were: IPS-3082, TGC ATC CCC CAG GCC ACC AT and IPS-8997, TCG CAT CGA CCC GCC CAC TA.

Biodistribution of radiolabeled ODNs in mice

The [³⁵S]-ODN was formulated with PEO(8K)-*g*-PEI(2K) at a N:P ratio of 1:1, and the solution was adjusted to a final [³⁵S]-ODN concentration of 1 mg/ml in PBS. The choice of the N:P ratio of 1:1, i.e. the ratio of the concentration of total nitrogen atoms (N) of the polycation to that of the phosphate groups (P) of polynucleotide, was based on the results of the *in vitro* studies suggesting that both copolymer-based formulations exhibited relatively high cellular uptake and low cytotoxicity at this N:P ratio (data not shown). Complexes of ODNs with PEO(8K)-*g*-PEI(2K) were obtained by direct mixing of the solutions of both components to obtain the desired N:P ratios. Female C57BL/6 mice, 6-8 weeks

old (3 mice per group) were injected i.v. at a dose of 30 mg/kg body weight with [³⁵S]-ODN alone or with [³⁵S]-ODN/PEO(8K)-g-PEI(2K) complex. After anaesthesia by i.p. injection of ketamine/Xylazine, blood samples were taken at different time points (5 min, 15 min, 30 min, 1 h, 3 h, 12 h, 24 h and 48 h) from the heart, and then the plasma was obtained by centrifugation at 1000g for 1 min. Organs (kidneys, liver, heart, stomach, spleen and lungs) were collected at each time point, weighed and homogenized in 2 ml PBS with a Polytron apparatus. The homogenate (200 µl) or plasma (50 µl) were mixed with 8 ml of scintillation liquid ECOLYTE, and the radioactivity was counted in a β-counter. The amount of [³⁵S]-ODN contained per g of tissue or ml of plasma was calculated. The area under the curve (AUC) values for the first 48 h were determined using the trapezoidal rule.

Antisense experiments

C57BL/6 mice were injected with a single dose of 10 mg/kg of IPS-3082 alone or formulated with PEO(8K)-g-PEI(2K) at a N:P ratio of 1:1. Four hours later, LPS (*Escherichia coli*, Serotype 0111:B4; Sigma, St. Louis, MO, USA) (30 mg/kg) was injected i.p., and the level of ICAM-1 expression was evaluated by RT-PCR 16 h later. The liver and kidneys were collected for further immunochemistry analysis.

RT and PCR conditions for ICAM-1 analysis

Trizol reagent (Gibco BRL, Burlington, ON, Canada) was used to purify total RNA from liver or kidney tissues. Reverse-transcription (RT) reactions were carried out with 5 µg of total RNA using Superscript II reverse transcriptase (Gibco BRL) according to the manufacturer's instructions. PCR was carried out from 500 ng of cDNA using murine ICAM-1-specific primers that amplify a segment from exon 2 with the upstream primer E2S-5'-TTT GAG CTG AGC GAG ATC GGG-3' to exon 4 with the downstream primer E4AS-5'-CTC CCA GCT CCA GGT ATA TCC GAG-3'. As an internal control, a fragment of β-actin mRNA was amplified by upstream primer B1S-5'-CAT GGA TGA CGA TAT CGC TGC GC-3' and downstream primer B2AS-5'-GCT GTC GCC ACG CTC GGT CAG GAT C-3'. The PCR conditions to amplify ICAM-1 cDNA fragments were: 94°C, 1 min; 94°C, 1 min; 61°C, 1 min; 72°C, 1 min x 27 cycles; and 72°C, 3 min. The β-actin amplification was performed as described above, but with only 23 PCR cycles. The number of cycles was established to be in the logarithmic amplification phase, thus allowing comparative analysis of PCR amplifications. PCR fragments, 550 bp for E2S-E4AS and 575 bp for β-actin, were visualized by electrophoresis in 1.5% agarose gel and stained by ethidium bromide (1 µg/ml) for 10 min.

Immunohistochemistry analysis

To detect ICAM-1 protein expression, tissue sections of kidney were stained using monoclonal antibody (mAb) against ICAM-1 (clone YN1/1.7.4 from ATCC, Manassas, VA, USA). YN1 antibody was purified from hybridoma culture supernatants by chromatography on protein G-Sepharose (Pharmacia, Piscataway, NJ, USA) using standard protocol. Frozen sections of kidney (5 μm) were air-dried, briefly fixed in acetone at room temperature, and allowed to react in a humid chamber with YN1 mAb for 30 min, then rinsed with a PBS-Tween buffer (0,05% Tween 20). The sections were then allowed to react with peroxidase-conjugated anti-rat IgG+M (H+L) (Zymed, San Francisco, CA, USA) for 30 min, then rinsed in PBS-Tween. The reaction was revealed by 20 min incubation with the AEC (red) amino carbazole substrate kit (Zymed). After counterstaining with hematoxylin, the preparations were mounted in buffered glycerol and sealed.

RESULTS

Pharmacokinetics and biodistribution of PEO(8K)-*g*-PEI(2K)-formulated oligonucleotide in mouse.

A comparative pharmacokinetics and biodistribution study was performed to evaluate the behaviour of PEO(8K)-*g*-PEI(2K)-ODN complexes *in vivo*. For this purpose, [³⁵S]-labeled 20-mer ODN was injected in C57BL/6 mice, alone or formulated with PEO(8K)-*g*-PEI(2K). A dose of 10 mg/kg of the unlabeled ODN was injected, while the radioactive ODN was used as a tracer as described in Materials and Methods. The levels of the ODN were determined in plasma and major organs at various time points post-injection. The results demonstrated significant differences in pharmacokinetics and biodistribution of the free and formulated ODN (Figure 1). A delay in plasma clearance was observed in the PEO(8K)-*g*-PEI(2K)-ODN formulation, which translated in a 80% increase in the AUC value. The accumulation of the formulated ODN was observed in kidney in which it remained at a high level throughout the whole period of observation (48 h). The increased level of the formulated ODN was also observed in the liver and spleen, although at a much lesser degree compared to that in kidney. However, 24 h after the injection, the liver and spleen accumulation of the unformulated and formulated ODNs were similar. The accumulation in lungs and heart remained unchanged. Interestingly, a much lower accumulation of the formulated ODN was

observed in the stomach tissue, the organ previously reported to trap a significant portion of free ODN following i.v. injection (Agrawal *et al.*, 1996).

The relative order of the AUC for PEO(8K)-*g*-PEI(2K)-ODN complex was kidney > liver > spleen > lung > stomach > heart > brain (Table 1). In kidney, the level of accumulation of the formulated ODN was approximately 400% higher than that of the non-formulated ODN, while in the liver and spleen, the increases were 50% and 25%, respectively. An increase of 30% of the AUC was also observed in brain. Following the formulation of ODN, a 2-fold reduction is observed in AUC organ/AUC plasma ratios in lungs and heart and a 10-fold reduction in stomach, while a slight decrease is noted in both liver and spleen (Table 1). In contrast, a 2-fold increase of AUC organ/AUC plasma ratio is observed in the kidney.

Therefore, the results of the biodistribution study show that ODN formulation with PEO(8K)-*g*-PEI(2K) block-copolymer leads to higher accumulation of ODN in kidney and, at a lesser extent, in the liver, while bypassing the stomach filtering effect.

RT-PCR analysis of ICAM-1 expression in liver and kidney in LPS-injected mice treated with free and formulated ODN antisense against ICAM-1

The biological activity of the PEO(8K)-*g*-PEI(2K) formulated ODN was evaluated using IPS-3082, an oligonucleotide that has been previously reported to

block ICAM-1 expression in mice (Stepkowski *et al.*, 1994). C57 bl6 mice were pretreated with LPS to induce ICAM-1 expression in kidney and liver and then injected with either formulated or non-formulated IPS-3082, and ICAM-1 expression was evaluated by RT-PCR. To measure ICAM-1 expression, a set of PCR primers was designed to amplify a region between exon 2 and exon 5 of the ICAM-1 mRNA resulting in a PCR product of 550 bp. Both in kidney and liver, a low level of ICAM-1 expression was detected in the control (untreated) animals, it was significantly up-regulated after LPS injection (Figure 2). In the group treated with PEO(8K)-g-PEI(2K)-formulated IPS-3082, the ICAM-1 mRNA levels in kidney were reduced below that observed in the control group. PEO(8K)-g-PEI(2K)-formulated IPS-8997, a scrambled control sequence, also induced some inhibition in the mRNA levels but to a lesser degree compared to the antisense ODN. Most likely this is related to the previously described non-specific activity of phosphorothioate oligonucleotides (Stein and Cheng, 1993). Both IPS-3082 and IPS-8997 oligonucleotides in their unformulated forms did not affect the ICAM-1 mRNA levels in the kidney. The biodistribution studies showed that accumulation of ODN in the liver was also augmented when it was combined with PEO(8K)-g-PEI(2K) carrier. However, neither formulated IPS-3082 nor formulated IPS-8997 ODNs inhibited ICAM-1 mRNA expression in this organ. The non-formulated ODNs did not also change ICAM-1 levels in liver. Neither

antisense nor scrambled ODNs affected β -actin mRNA level in any of the studied organs.

These data have confirmed that PEO(8K)-*g*-PEI(2K) carrier increases accumulation of ODN in kidneys and provides IPS-3082 with the organ specific antisense activity.

Inhibition of ICAM-1 protein expression in kidneys by PEO(8K)-*g*-PEI(2K)/IPS-3082 formulation

To establish whether reduction of ICAM-1 mRNA level observed in mice injected with PEO(8K)-*g*-PEI(2K)-formulated antisense is indeed corroborated by a lower protein expression, the immunohistochemistry analysis was performed on frozen sections of kidneys using ICAM-1-specific YN1 monoclonal antibody (Takei, 1985). In kidney of normal C57BL/6 mice, the ICAM-1 protein expression is mostly located in the medulla and glomerulus, and is detectable on endothelial cells and proximal tubules (Figure 3). After stimulation by LPS, the expression of ICAM-1 was prominent in the glomerular vascular endothelial cells and markedly up-regulated on peritubular capillaries (Figure 3). The injection of PEO(8K)-*g*-PEI(2K)-formulated IPS-3082 reduced ICAM-1 expression to its basal level in the cortical region and on glomerular endothelial cells while the ICAM-1 level of expression was not inhibited in the medulla. The non-formulated IPS-3082 had no effect on the ICAM-1 level of expression in LPS-injected mice

(data not shown). No reduction of ICAM-1 expression was observed in liver of mice injected with unformulated or formulated antisense.

DISCUSSION

Unfavourable distribution and rapid degradation of intravenously injected antisense ODN require administration at high doses in order to achieve a specific biological response. The use of such high doses of ODN results, however, in significant adverse effects, such as mononuclear cell infiltrates in multiple organs, B-cell proliferation (Monteith *et al.*, 1997), splenomegaly, lymphoid hyperplasia, and mild liver or kidney dysfunction in animals (Henry *et al.*, 1997). The potency of these compounds can be enhanced, and their side-effects can be reduced by using a delivery system that would induce a more favourable pattern of biodistribution and increase the stability of the ODN in the body.

Intravenous injection of antisense ODN against ICAM-1 formulated with lipofectin, a commercially available liposome-based reagent has been shown to successfully inhibit ICAM-1 expression in kidney, thereby restoring renal functions as measured by a reduced glomerular filtration rate (Haller *et al.*, 1996). Multiple injections, however, are needed to achieve such inhibitory effect. Furthermore, ODN-lipofectin complexes are unstable and tend to aggregate, which make them toxic in lungs and can induce kidney damage (Bennett *et al.*, 1996).

In the present work, we have shown that block copolymer PEO(8K)-*g*-PEI(2K) could shift biodistribution of ODN significantly toward kidney. The hydrophilic-lipophilic balance of the PEO(8K)-*g*-PEI(2K)-ODN complexes

favours their accumulation in kidney, while avoiding typical accumulation in the stomach tissue, which is observed in the case of non-formulated ODN. This shift could be explained by the delay in blood clearance, which translates into a 80% AUC increase in plasma (Table 1). A 2-fold increase of the AUC organ/AUC plasma ratio is observed in the kidney, showing a favored redistribution of the complexe toward this organ. PEO(8K)-*g*-PEI(2K)-formulated ODN, as well as non-formulated ODN have demonstrated very low accumulation in lung, where no lesions were detected by histological evaluation. In contrast, the animals injected with PEI-ODN complexes or ODN formulated with lipofectin at the equivalent doses have shown high acute mortality due to severe lung microembolism, which made impossible the pharmacokinetic analysis of this composition (data not shown).

Metabolic degradation of DNA in endosomes is also a well-known drawback that considerably reduces the efficacy of these therapeutic agents. In this study, a well-characterized antisense ODN directed against murine ICAM-1 was used to ascertain the efficiency of the complex to deliver a functionally active compound. It is known that in the rat kidney, ODN are taken up primarily by proximal tubular cells with a much lower uptake by cells in other segments of the nephron (Carome *et al.*, 1997). The present study has shown that PEO(8K)-*g*-PEI(2K) allows accumulation of antisense ODN in the cortical regions of the kidney and inhibits ICAM-1 expression in glomerular and periglomerular

compartments. In contrast, the same dose of unformulated ODN had no effect on ICAM-1 expression in kidney of the LPS-injected mice. On the other hand, while some increase of ODN accumulation in the liver was observed, ICAM-1 mRNA levels in both non-formulated and formulated ODN-injected groups of animals were not affected in that organ, suggesting that the amount of ODN or its bioavailability were insufficient to produce biological effects. The sequence non-specific activity of phosphorothioate ODNs is a generally accepted fact (Stein and Chen, 1993). Therefore, the ICAM-1 inhibition observed using formulated IPS-8997 is consistent with previous observations. More studies are required using different ODN chemistry, such as methoxyethyl modification of phosphorothioate ODN, in order to further characterize the non-specific effect of IPS-8997 observed in our study (Chen *et al.*, 2001).

Our results have shown that the increased ODN accumulation in kidney obtained by using PEO(8K)-*g*-PEI(2K) carrier translates into a functional response to the antisense by efficient inhibition of the LPS-induced ICAM-1 expression. This carrier, being capable of delivery ODN into kidney could be also used for other therapeutic compounds, such as ribozymes, and new-generation oligonucleotides, such as methylated CpG ODN with reduced potential for immune stimulation (Henry *et al.*, 2000).

The results obtained in this study have demonstrated that grafting PEI with non-ionic polymers considerably increases bioavailability of the formulated ODN,

most likely due to the formation of colloid particles that are capable of avoiding the accumulation in lung. Furthermore, it has been shown that choosing non-ionic component of the carrier can program the biodistribution of the formulated ODN.

ACKNOWLEDGMENTS

The support from the National Science Foundation (BES-9907281) and Nebraska Research Initiative (Gene Therapy) is essential for the studies on non-viral gene delivery systems in UNMC. We gratefully acknowledge the technical assistance of Doris Legault. Dr St-Pierre is a scholar of the Fonds de la Recherche en Santé du Québec.

REFERENCE

AGRAWAL, S., and TEMSAMANI, J. (1996). Comparative pharmacokinetics of antisense oligonucleotides. In, *Methods in Molecular Medicine: Antisense Therapeutics*. S. Agrawal, eds. (Humana Press Inc., USA) pp. 247-270.

AGRAWAL, S., TEMSAMANI, J., and TANG, J.Y. (1991). Pharmacokinetics, biodistribution, and stability of oligodeoxynucleotide phosphorothioates in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **88**, 7595-7599.

BENNETT, C.F., ZUCKERMAN, J.E., KORNBRUST, D., SASMOR, H., LEEDS, J.M., and CROOKE, S.T. (1996). Pharmacokinetics in mice of a [3H]-labeled phosphorothioate oligonucleotide formulated in the presence and absence of a cationic lipid. *J Controll Rel.* **41**, 121-124.

BONVENTRE, J.V. (1993). Mechanisms of ischemic acute renal failure. *Kidney Int.* **43**, 1160-1178.

BRISCOE, D.M., POBER, J.S., HARMON, W.E., and COTRAN, R.S. (1992). Expression of vascular cell adhesion molecule-1 in human renal allografts. *J Am Soc Nephrol.* **3**, 1180-1185.

BUTCHER, E.C. (1991). Leukocyte-endothelial cell recognition: three (or more) steps to specificity and diversity. *Cell*. **67**, 1033-1066.

CAROME, M.A., KANG, Y.H., BOHEN, E.M., NICHOLSON D.E., CARR F.E., KIANDOLI, L.C., BRUMMEL, S.E., and YUAN, C.M. (1997). Distribution of the cellular uptake of phosphorothioate oligodeoxynucleotides in the rat kidney in vivo. *Nephron* **75**, 82-87.

CHEN, W., BENNETT, C.F., CONDON, T.P., STECKER, K., TIAN, L., KAHAN, B.D., and STEPKOWSKI, S.M. (2001). Methoxyethyl modification of phosphorothioate ICAM-1 antisense oligonucleotides improves prevention of ischemic/reperfusion injury. *Transplant Proc.* **33**, 854.

CHEN, W., BENNETT, C.F., WANG, M.E., DRAGUN, D., TIAN, L., STECKER, K., CLARK, J. H., KAHAN, B.D., and STEPKOWSKI, S.M. (1999). Perfusion of kidneys with unformulated "naked" intercellular adhesion molecule-1 antisense oligodeoxynucleotides prevents ischemic/reperfusion injury. *Transplantation* **68**, 880-887.

DANG, L.H., MICHALEK, M.T., TAKEI, F., BENACERAFF, B., and ROCK, K.L. (1990). Role of ICAM-1 in antigen presentation demonstrated by ICAM-1 defective mutants. *J Immunol.* **144**, 4082-4091.

HALLER, H., DRAGUN, D., MIETHKE, A., PARK, J. K., WEIS, A., LIPPOLDT, A., GROSS, V., and LUFT, F.C. (1996). Antisense oligonucleotides for ICAM-1 attenuate reperfusion injury and renal failure in the rat. *Kidney Int.* **50**, 473-480.

HEEMANN, U.W., AZUMA, H., TULLIUS, S.G., SCHMID, C., PHILIPP, T., and TILNEY, N.L. (1996). Infections and reduced functioning kidney mass induce chronic rejection in rat kidney allografts. *Clin Nephrol.* **46**, 34-38.

HENRY, S., STECKER, K. BROOKS, D., MONTEITH, D., CONKLIN, B., and BENNETT, C.F. (2000). Chemically modified oligonucleotides exhibit decreased immune stimulation in mice. *J Pharmacol Exp Ther.* **292**, 468-479.

HENRY, S.P., ZUCKERMAN, J.E., ROJKO, J., HALL, W.C., HARMAN, R.J., KITCHEN, D., and CROOKE, S.T. (1997). Toxicological properties of several novel oligonucleotide analogs in mice. *Anticancer Drug Des.* **12**, 1-14.

KAMOCHI, M., KAMOCHI, F., KIM, Y.B., SAWH, S., SANDERS, J.M., SAREMBOCK, I., GREEN, S., YOUNG, J.S., LEY, K., FU, S.M., and ROSE, C.E. (1999). P-selectin and ICAM-1 mediate endotoxin-induced neutrophil recruitment and injury to the lung and liver. *Am J Physiol.* **277**, 310-319.

KELLY, K.J., WILLIAMS, S. W.W., COLVIN, R.B., and BONVENTRE, J.V. (1994). Antibody to intercellular adhesion molecule 1 protects the kidney against ischemic injury. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **91**, 812-816.

KELLY, K.J., WILLIAMS, W.W., COLVIN, R.B., MEEHAN, S.M., SPRINGE, T.A., GUTIERREZ-RAMOS, J.C., and BONVENTRE, J.V. (1996). Intercellular adhesion molecule-1-deficient mice are protected against ischemic renal injury. *J Clin Invest.* **97**, 1056-1063.

KUUS-REICHEL, K., GRAUER, L.S., KARAVODIN, L.M., KNOTT, C., KRUSEMEIER, M., and KAY, N.E. (1994). Will immunogenicity limit the use, efficacy, and future development of therapeutic monoclonal antibodies? *Clin Diagn Lab Immunol.* **1**, 365-372.

MONTEITH, D.K., HENRY, S.P., HOWARD, R.B., FLOURNOY, S., LEVIN, A.A., BENNETT, C.F., and CROOKE, S.T. (1997). Immune stimulation--a class

effect of phosphorothioate oligodeoxynucleotides in rodents. *Anticancer Drug Des.* **12**, 421-432.

MROWKA, C., HEINTZ, B., and SIEBERTH, H.G. (1999). VCAM-1, ICAM-1, and E-selectin in IgA nephropathy and Schonlein-Henoch syndrome: differences between tissue expression and serum concentration. *Nephron* **81**, 256-263.

MUNDIGL, O., OCHOA, G.C., DAVID, C., SLEPNEV, V.I., KABANOV, A., and DE CAMILLI, P. (1998). Amphiphysin I antisense oligonucleotides inhibit neurite outgrowth in cultured hippocampal neurons. *J Neurosci.* **18**, 93-103.

RABB, H., MENDIOLA, C.C., SABA, S.R., DIETZ, J.R., SMITH, C.W., BONVENTRE, J.V., and RAMIREZ, G. (1995). Antibodies to ICAM-1 protect kidneys in severe ischemic reperfusion injury. *Biochem Biophys Res Commun.* **211**, 67-73.

ROY, S., ZHANG, K., ROTH, T., VINOGRADOV, S., KAO R.S., and KABANOV, A.V. (1999). Reduction of fibronectin expression by intravitreal administration of antisense oligonucleotides. *Nat Biotechnol.* **17**, 476-479.

SOLEZ, K., RACUSEN, L.C., ABDULKAREEM, F., KEMENY, E., VON WILLEBRAND, E., and TRUONG, L.D. (1997). Adhesion molecules and rejection of renal allografts. *Kidney Int.* **51**, 1476-1480.

STEIN, C.A., and CHENG, Y.C. (1993). Antisense oligonucleotides as therapeutic agents--is the bullet really magical? *Science* **261**, 1004-1012.

STEPKOWSKI, S.M., TU, Y., CONDON, T.P., and BENNETT, C.F. (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.

STEPKOWSKI, S.M., WANG, M.E., CONDON, T.P., CHENG-FLOURNOY, S., STECKER, K., GRAHAM, M., QU X., TIAN, L., CHEN, W., KAHAN, B.D., and BENNETT, C.F. (1998). Protection against allograft rejection with intercellular adhesion molecule-1 antisense oligodeoxynucleotides. *Transplantation* **66**, 699-707.

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.

TODA, K., KAYANO, K., KARIMOVA, A., NAKA, Y., FUJITA, T., MINAMOTO, K., WANG, C.Y., and PINSKY, D.J. (2000). Antisense intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) oligodeoxyribonucleotide delivered during organ preservation inhibits posttransplant ICAM-1 expression and reduces primary lung isograft failure. *Circ Res.* **86**, 166-174.

VINOGRADOV, S.V., BRONICH, T.K., and KABANOV, A.V. (1998). Self-assembly of polyamine-poly(ethylene glycol) copolymers with phosphorothioate oligonucleotides. *Bioconjug Chem.* **9**, 805-812.

TABLE AND FIGURE LEGENDS

Figure 1 Biodistribution and pharmacokinetics of radiolabeled phosphorothioate oligonucleotides in mice. Unformulated ODN mixture (cold + [³⁵S]-labeled ODN) (empty squares) or formulated with PEO(8K)-*g*-PEI(2K) (filled triangles) was injected in the tail vein of C57BL/6 (6-8-week-old) male mice at a dose of 10 mg/kg of oligonucleotide per mice. Serum and major organs were collected at different time periods after injection and assessed for radioactivity content. The values were converted to μg oligonucleotide/g of tissue (or ml of serum) \pm SEM (three mice per group).

Figure 2 RT-PCR analysis of ICAM-1 expression in kidney and liver. (a) RT-PCR analyses for ICAM-1 mRNA were performed on kidney sample using ICAM-1 set of primers. Kidney of control C57BL/6 mice expressed basal level of ICAM-1 mRNA (lane 1) and was upregulated after LPS injection (lane 2), as observed by the presence of a 550 bp PCR product. Both unformulated IPS-3082 and IPS-8997 did not reduce ICAM-1 mRNA level (lanes 3 and 4, respectively), while complete inhibition was observed 16 h post-injection with PEO(8K)-*g*-PEI(2K)-formulated IPS-3082 (lane 5) and partial one with formulated IPS-8997 (lane 6). β -actin amplification on each sample was carried out as a control (lower panel). (b) RT-PCR analyses on liver were performed 16 h post-injection. A weak basal expression of ICAM-1 mRNA (lane 1), which was up-regulated

following LPS injection (lane 2). Neither unformulated IPS-3082 (lane 3) and IPS-8997 (lane 4) nor PEO(8K)-*g*-PEI(2K)-formulation (lanes 5 and 6) affected ICAM-1 mRNA level in the liver. β -actin amplification is shown in the lower panel.

Figure 3 Immunohistochemical analysis of ICAM-1 in kidney. ICAM-1 expression was detected by staining sections with murine ICAM-1 YN1/1.7.4 monoclonal antibody. ICAM-1-expressing cells in normal C57BL/6 kidney were located on the medullar and glomerular regions (a). Upon LPS- injection, ICAM-1 expression was markedly up-regulated in peritubular sections and in glomeruli (arrows) (b). Injection of LPS-treated C57BL/6 mice with IPS-3082 antisense formulated with P123PEI resulted in near basal level expression of ICAM-1 throughout the tissue (c). Tissue sections were counterstained by hematoxylin. The results shown are representative of 3 independent stainings.

TABLE 1. Area Under the Curve (AUC) Values in Organ and Plasma

Organs	AUC ODN	AUC ODN- PEO(8k)-g-PEI(2k)	Ratio AUCs		Ratio AUC organ/AUC plasma	
			Nonformulated ^a	formulated ^a	Nonformulated	Formulated
<i>Kidney</i>	4437	16393	3.7		63.38	129.17
<i>Liver</i>	1379	2167	1.6		19.70	17.06
<i>Spleen</i>	402	485	1.2		5.74	3.82
<i>Lung</i>	279	259	0.9		3.99	2.04
<i>Stomach</i>	1377	228	0.2		19.67	1.80
<i>Heart</i>	154	151	0.9		2.20	1.19
<i>Brain</i>	6	8	1.3		0.08	0.06
<i>Plasma</i>	70 ^b	127 ^b	1.8		-	-

^a AUC units are in $\mu\text{g}^*\text{hour/g}$ tissue.^b AUC units are in $\mu\text{g}^*\text{hour/ml}$ plasma.

Figure 1

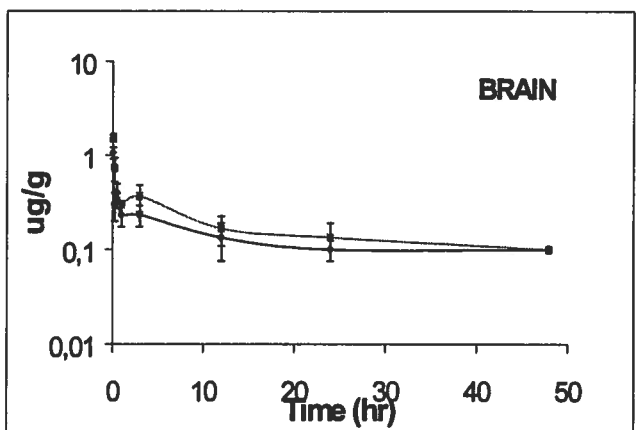
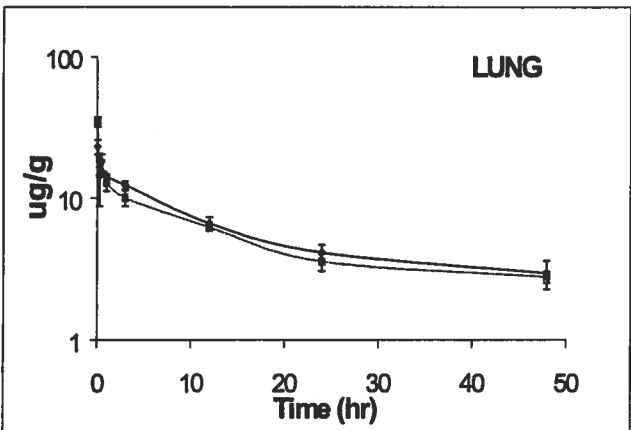
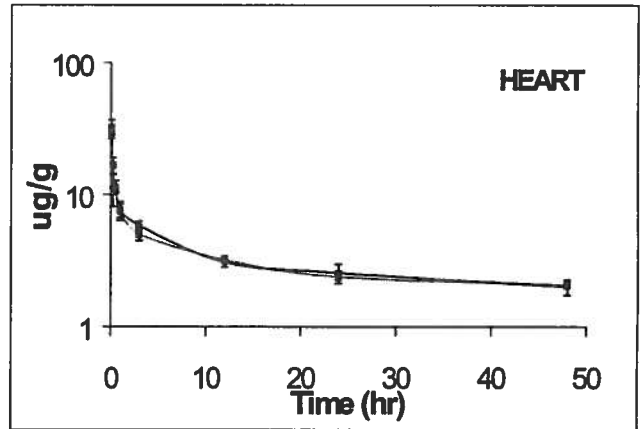
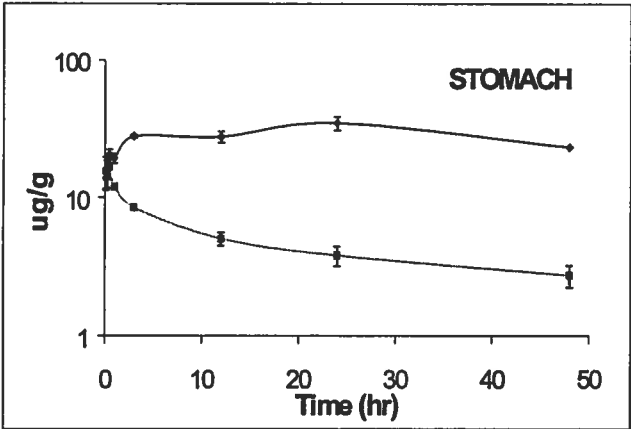
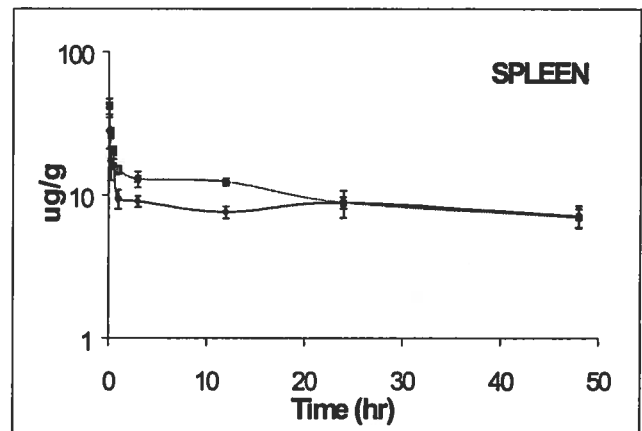
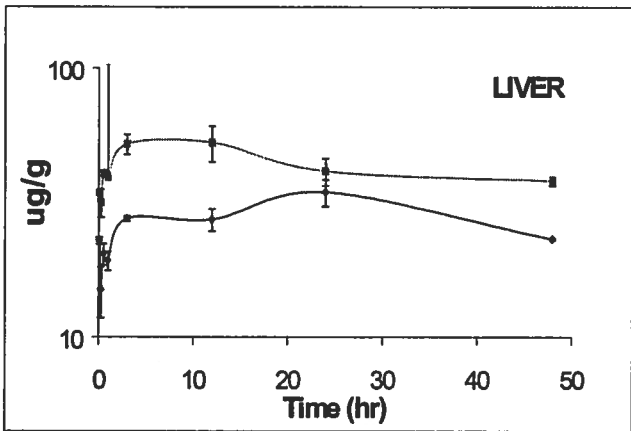
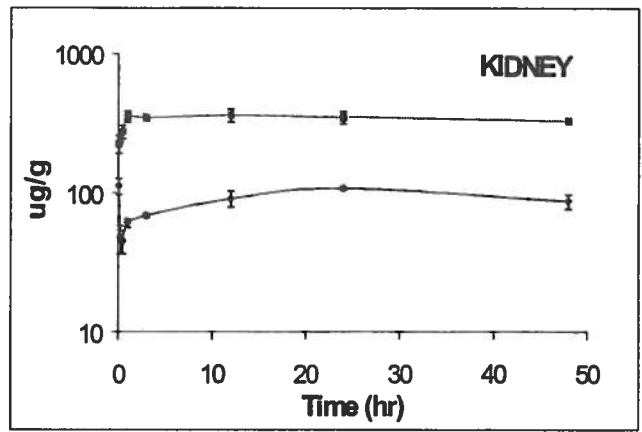
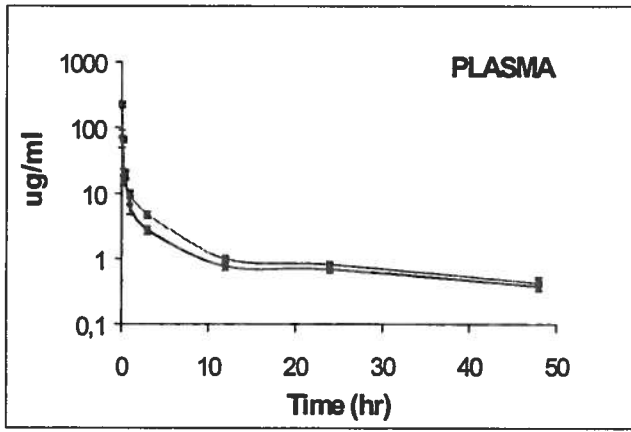
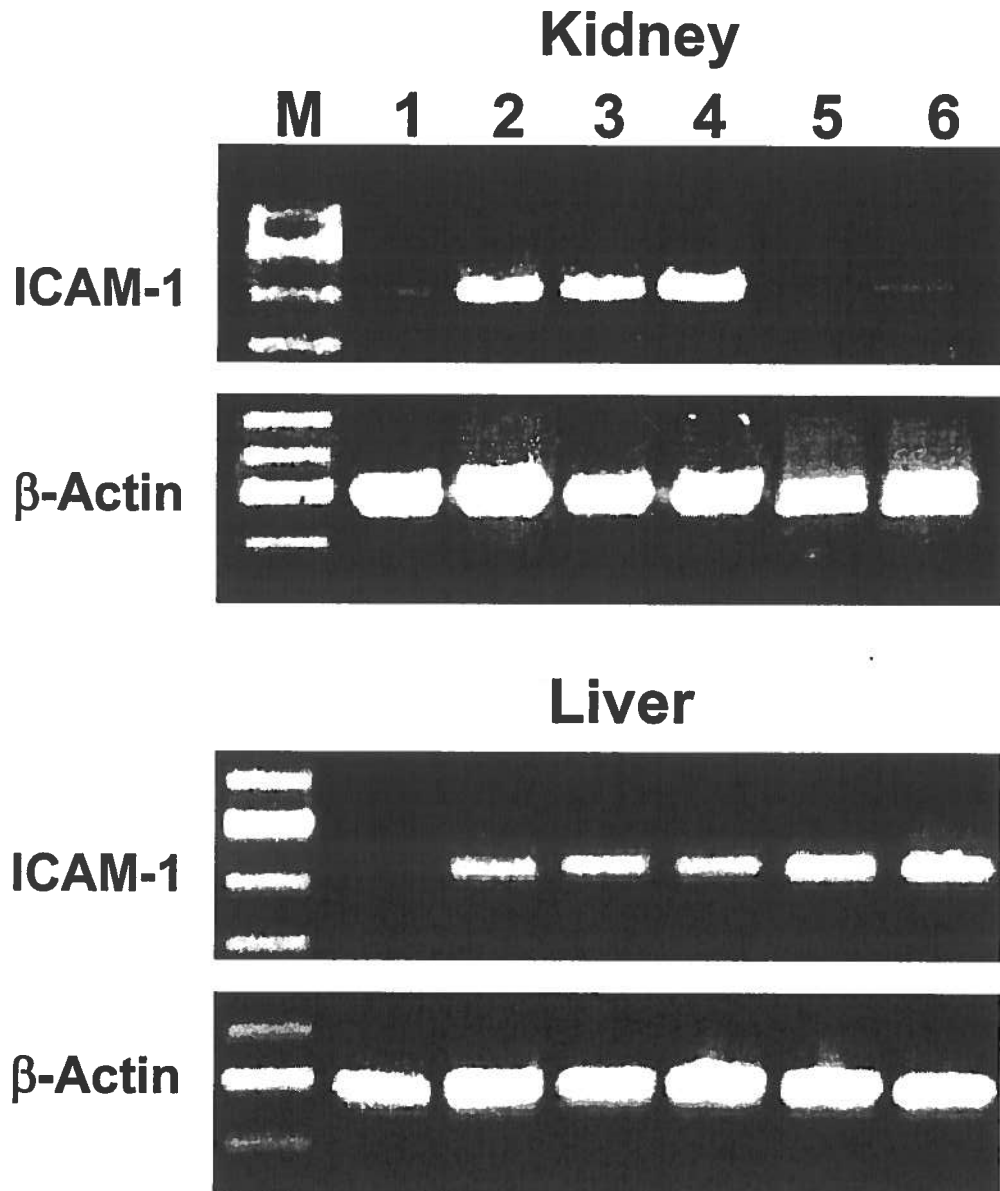
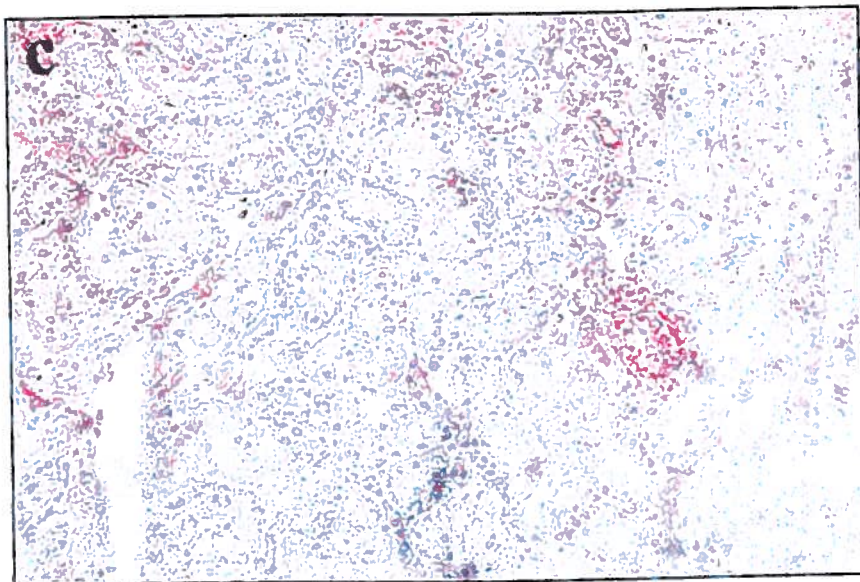
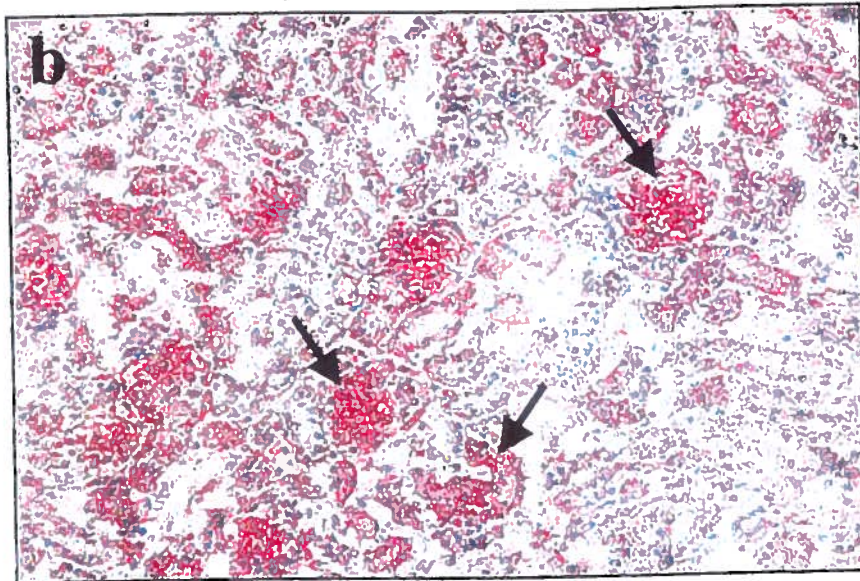
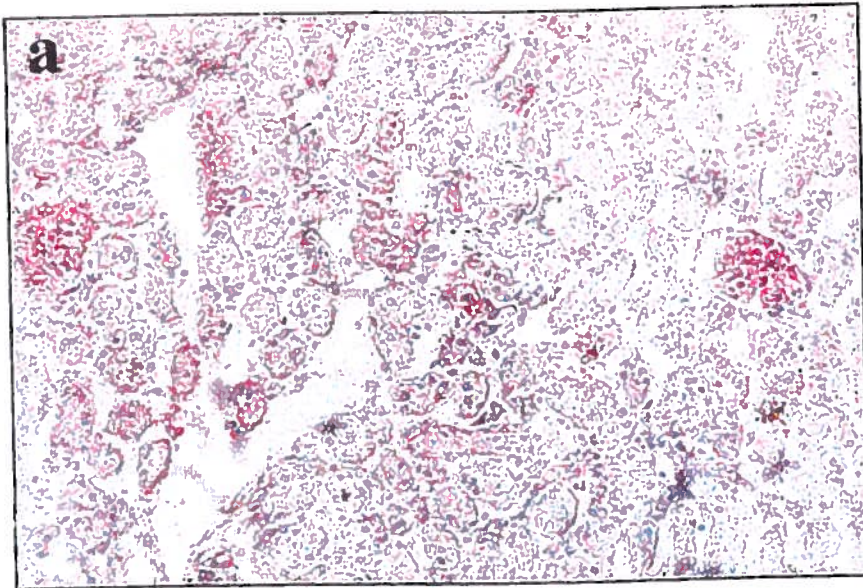


Figure 2





CHAPITRE4

Inducing Neutrophil Recruitment in the liver of ICAM-1-deficient Mice Using Polyethyleneimine Grafted with Pluronic 123 as an Organ Specific Carrier for Transgenic ICAM-1

Cet article a dû être retiré en raison de restrictions liées au droit d'auteur.

Ochietti B, Lemieux P, Kabanov AV, Vinogradov S, St-Pierre Y, Alakhov V. 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. 2002 Jul;9(14):939-45. PubMed PMID: 12085242.

RÉSUMÉ

Induction du recrutement de neutrophiles dans le foie de souris déficiente en ICAM-1 en utilisant le polyéthylèneimine greffé au Pluronic P123 comme transporteur spécifique d'organe du transgène ICAM-1

L'expression coordonnée des molécules d'adhésion et des chémokines à la surface de l'endothélium vasculaire est responsable du recrutement des cellules effectrices du système immunitaire au site ciblé. Une des façons d'attirer à un endroit particulier des leucocytes non-activés serait de surexprimer la ou les molécules d'adhésion qui sont responsables de leur recrutement. Nous avons démontré précédemment que le transporteur P123PEI formé de polyéthylèneimine (PEI) greffé avec le copolymère en bloc amphiphile non-ionique Pluronic P123 modifiait la biodistribution d'un plasmide vers le foie (Nguyen et al., 1999). Dans le présent travail, un plasmide codant pour ICAM-1 murin complexé avec le P123PEI a été injecté par voie intraveineuse dans des souris déficientes en ICAM-1. L'analyse de l'expression du transgène ICAM-1 par RT-PCR a révélé une expression dose-dépendante d'ICAM-1 dans le foie. De plus, cette expression d'ICAM-1 a induit l'invasion de neutrophiles dans le tissu hépatique, alors que ce phénomène n'a pas été observé dans le cas des souris injectées avec le plasmide seul ou avec un plasmide témoin formulé ou non. Ces résultats suggèrent que P123PEI permet une expression fonctionnelle d'un transgène dans le foie en évitant son accumulation dans les poumons suivant l'administration intraveineuse du complexe, et que l'expression d'ICAM-1 seule peut être utilisée pour favoriser une réponse immunitaire localement en recrutant les cellules effectrice de l'immunité.

Contribution des auteurs

J'ai effectué tous les travaux décrits dans cette publication, ainsi que sa rédaction. Le Dr Vinogradov et le Dr Kabanov ont effectué la synthèse du copolymère en bloc P123PEI utilisé dans cette étude. Manuscrit accepté pour publication dans le journal *Gene Therapy*, Juillet 2002.

CHAPITRE 5

Isoforms of ICAM-1 in Liver is Responsible for the Sensitivity of ICAM-1-deficient Mice to LPS-induced Septic Shock

RÉSUMÉ

La présence d'isoformes d'ICAM-1 dans le foie est responsable de la sensibilité au choc septique induit par le LPS des souris déficientes en ICAM-1.

L'ARNm d'ICAM-1 peut subir un épissage alternatif conduisant à l'expression d'isoformes. La fonction de ces isoformes *in vivo* n'a pas été caractérisée mais pourrait jouer un rôle dans un recrutement différentiel des leucocytes, notamment par la présence ou l'absence du domaine 3 responsable de la liaison à MAC-1, ou lors des contacts intercellulaires où l'affinité de liaison ICAM-1 avec son ligand peut être influencée par la distance entre les deux cellules.

Cette étude porte sur l'expression des isoformes d'ICAM-1 dans les souris ICAM-1 déficientes au niveau du foie et leur relation possible avec la sensibilité de ces souris au choc septique induit par le LPS. Les résultats ont démontré que le foie de souris normales et JCGR stimulées au LPS n'expriment pas de niveau détectable d'isoformes d'ICAM-1 alors que dans la souris Tm1Bay, l'isoforme 4-6 a été détectée. L'infiltration de neutrophiles a aussi été détectée dans le foie de ces souris, ainsi qu'une sensibilité au choc septique de celles-ci.

Contribution des auteurs

J'ai effectué tous les travaux décrits dans cette étude. Ces résultats ont été en partie incorporés dans un manuscrit, Robledo et coll., soumis au *European Journal of Immunology*. Le manuscrit est présenté en annexe.

Title page**The presence of ICAM-1 isoforms is responsible for the sensitivity to
LPS-induced septic shock of ICAM-1-deficient mice**

B Ochietti¹, VYu Alakhov² and Y St-Pierre¹

¹Centre de recherche en santé humaine, INRS-Institut Armand-Frappier, Laval, Quebec;
and ²Supratek Pharma Inc., Laval, Quebec, Canada

Running Title

ICAM-1 isoforms in liver

Correspondence: Yves St-Pierre, INRS-Institut Armand Frappier, 531 Blvd. des Prairies,
Bldg. 18, Laval, Quebec, Canada, H7V 1B7

Tel: 450-687-5010

Email : Yves_stpierre@inrs.iaf.quebec.ca

Introduction

Intercellular Adhesion Molecule-1 (ICAM-1) is a membrane-bound protein that plays an important role in transendothelial migration of leukocytes (Springer Cell 1994) and in antigen-specific activation of T-cells (Van Seventer JI 1990, Kuhlman JI 1991). The extracellular moiety of the common form of ICAM-1 consists of 5 immunoglobulin-like domains, the first and third domains of the molecules mediating adhesion to LFA-1 and MAC-1, respectively. Studies using blocking antibodies have demonstrated its key implication in many inflammatory and allograft pathologies (Cosimi JI 1990, Nishikawa JEM 1993, Ma Lefer C 1992, Rabb Mendolia BBRC 1995, Zhao Lafter JLB 1997, clinical: Haug T 1993, Kavanaugh AR 1994). Elevated systemic TNF- α and IL-1 levels provide a possible mechanism of upregulation of ICAM-1 in the postischemic tissue (Minami JN 1992, Coletti JCI 1990, Sakr T 1992). On a therapeutic level, it has been shown that antibodies against ICAM-1 protect against neutrophil-induced hepatic injury during ischemia-reperfusion by inhibiting transendothelial migration and adherence to parenchymal cells (Jaeschke SHOCK 1996). Furthermore, antibodies against ICAM-1, while having no effect on hepatic neutrophil infiltration during reperfusion (Farhood JLB 1995), protects neutrophil-dependent injury after hepatic ischemia/reperfusion, probably by inhibiting neutrophil transendothelial migration and adherence to parenchymal cells (Jaeschke SHOCK 1996) or by blocking post-transplant white blood cell accumulation (Rentsch JH 2000). Studies using ICAM-1 antibodies, however, cannot definitely establish the role of ICAM-1 in the pathologies as mAb cannot block all ligand interactions (Springer Nature 1990), can trigger secondary cellular responses and have nonspecific immunological effects (Schachner COCB 1993, Schuch Neuron, 1989, Kornberg PNAS

1991). An alternative approach that avoids these problems in interpretation of antibody studies involves the inactivation of the gene encoding ICAM-1.

The ICAM1^{Tm1Bay} (Tm1Bay) ICAM-1-deficient mice carrying a mutation in exon 5, which encodes the fourth domain, exhibit abnormalities in inflammatory response including impaired neutrophil emigration in chemically-induced peritonitis, defective as stimulators in the MLR and decreased contact hypersensitivity (Sligh, PNAS 1993). Studies using these mice have shown that ICAM-1 is required for inflammatory cell infiltration into the irradiated lung (Hallahan PNAS 1997) and that its expression mediates endotoxin-induced neutrophil recruitment and injury to the lung and liver (Kamochi AJPh, 1999). However, similar patterns of infiltration of mononuclear and granulocytic leukocytes were observed in cardiac allograft transplantation between normal and ICAM-1-deficient mice (Schowengerdt C 1995). Also, the number of allograft survivals did not differ significantly between control groups that express normal level of ICAM-1 and those groups using ICAM-1-deficient mutants as either donors or recipients (Schowengerdt C 1995). On the other hand, in ICAM-1-deficient mice carrying a mutation in exon 4 (JCGR strain), renal transplants are protected from ischemic injury (Kelly et al., JCI 1996). Taken together, those results show some discrepancies between antibodies and genetic ICAM-1-deficiency results.

Previous study on ICAM-1-exon 5 mutant mice reported the presence of alternatively spliced forms of ICAM-1 mRNA, which were detectable by immunohistochemistry in the thymic stroma and other tissues including lung (king JI, 1995). Alternatively spliced ICAM-1 mRNAs were detected in wild-type mice, and are upregulated in many organs following stimulation with LPS, although to a lesser level

than mutant mice. Circulating forms of these isoforms were also detected in both normal and ICAM-1-exon 4 mutant mice (Van den Engel et al., Blood 1999). Finally, analysis in the tissues and organs revealed a differential pattern of expression of the isoforms, suggesting a possible function of these isoforms in the immune system of intact animals. The question arise whether discrepancies between Ab results and genetically-engineered models of ICAM-1-deficient mice reflect experimental models or that ICAM-1 isoforms in ICAM-1-exon 5 mutant mice are functional and can recruit leukocytes. To validate this hypothesis, we have investigated the presence of ICAM-1 isoforms in LPS-treated mice, paying a particular attention t mutant forms containing the domain 3, which is responsible for the binding to MAC-1 expressed by neutrophils. We have also compared the resistance of ICAM-1-exon 5 mutant mice to septic shock to that of ICAM-1-exon 4 mutant mice and studied the ability of the ICAM-1 isoforms to mediate PMN infiltration.

RESULTS

Immunohistochemistry

Although ICAM-1-deficient mice do not express the common form of ICAM-1, they could still express aberrant mRNA products that could generate ICAM-1 isoforms, as shown by King *et al* (1995). To establish whether ICAM-1 isoforms could be detected in the liver, frozen sections of liver of mice were stained with an ICAM-1-specific YN1 monoclonal antibody (Figure 2). This antibody is expected to detect all isoforms as previous studies have mapped its binding site to domain 1 (Staunton Cell 1990). In the liver of normal C57BL/6 mice, ICAM-1 expression is mainly located on capillaries and in sinusoidal areas, its expression was up-regulated following LPS injection (Figure 1). No detectable expression of ICAM-1 was found in the liver of both ICAM-1-exon 4 and exon 5 non-stimulated mutant mice. Upon LPS injection, no ICAM-1 was detected in the liver of neither ICAM-1-exon 4 nor ICAM-1-exon 5 mutant mice. Another monoclonal antibody against murine ICAM-1, 3E2 was also tested on ICAM-1-deficient mice and failed to detect ICAM-1 expression.

Detection of ICAM-1 isoforms by RT-PCR in the liver of LPS-injected Tm1Bay mice

To increase the sensitivity for the detection of ICAM-1 isoforms, four sets of primers were designed to amplify different size of ICAM-1 mRNA transcripts. Four sets of PCR primers were designed, the first two sets amplifying the region between exon 2 (from the ATG codon and Xho1 site respectively) and exon 6 (domains 1 to 5), the third

one – the region between exon 3 and exon 6 (domains 2 to 5), and the fourth one amplifies the region between exon 4 and exon 6 (domains 3 to 5). The expected molecular weights of PCR products for different isoforms are presented on Table 1:

Using these sets of primers for RT-PCR analysis of liver of C57BL/6, expected PCR products corresponding to the common form of ICAM-1 mRNA were obtained in unstimulated mice and its expression was upregulated following LPS injection (Figure 2). Nucleotide sequence of the four PCR products was confirmed by sequencing reaction (data not shown). No PCR products corresponding to ICAM-1 isoforms were obtained with any sets of primers in the liver of both normal and LPS-injected C57BL/6 mice.

In the liver of LPS-injected Tm1Bay mice, alternatively spliced ICAM-1 mRNAs were detected by PCR reactions. The isoform 4-6 was detected by RT-PCR using the four sets of primers, giving PCR products of approximately 1100, 925, 500 and 250 bp respectively. The isoform 2-6 was also detected using both D1-D5 sets of primers where PCR products of around 525 and 325 bp were obtained (Figure 2). All PCR were sequenced and confirmed the splicing products joining the domain 1 to the domain 5 (isoform 2-6) and the domain 3 to the domain 5 (isoform 4-6) of ICAM-1 mRNA. Other isoforms were not present or their expressions were below the detection level of our RT-PCR reactions. High molecular weight PCR-products (>3 kb) were seldom detected and are likely genomic amplification of ICAM-1 gene. Using these primers, no detectable level of ICAM-1 isoforms was detected by RT-PCR in the liver of both C57BL/6 and LPS-injected JCGR mice.

In summary, RT-PCR analysis on ICAM-1 expression revealed the presence of both isoforms 2-6 and 4-6 of ICAM-1 in the liver of LPS-stimulated Tm1Bay mice,

whereas no isoforms were detected in the liver or both C57BL/6 and JCGR mice. While D1-D5 PCR amplifications of the isoform 2-6 appeared at a higher level than that of the isoform 4-6.

Septic shock

It was previously shown that, in contrast to normal mice, JCGR mice display resistance to septic shock induced by lethal dose of LPS. We investigated whether the presence of ICAM-1 isoforms in Tm1Bay mice could induce sensitivity to septic shock. It was suggested that septic shock is caused by important leukocyte infiltration in organs, which caused mortal tissue damages. To that end, groups of C57BL/6, Tm1Bay and JCGR mice were injected i.p. with lethal dose of LPS and the mortality rate was assessed. Table 2 showed that the majority of TM1Bay (10/13) and most of C57BL/6 (7/14) mice have died of the septic shock, within 48 hours post-injection. In contrast, as previously reported (Xu JEM 1994), all JCGR mice demonstrated symptoms of endotoxin shock such as shivering and lethargy but survived to the LPS injection (0/12). These results suggest that the presence of ICAM-1 isoforms in the liver of Tm1Bay mice, even is undetected by immunohistochemistry.

LPS induced neutrophil infiltration in the liver of LPS-injected Tm1Bay mice

Leukocyte recruitment in the liver and other organs is mediated by ICAM-1 through the interaction with MAC-1 and/or LFA-1. We investigated whether the presence of ICAM-1 isoforms in the liver of LPS-injected Tm1Bay mice could induce leukocyte infiltration in the liver, a organ implicated in septic shock pathologies. Polymorphonuclear cell infiltration was evaluated by staining liver sections with mAb against Ly-6G (Gr-1) antigen, a specific cellular marker for neutrophils in peripheral

organs. As shown in Figure 3, the liver sections of untreated C57BL/6, JCGR and Tm1Bay mice contained few single positive cells randomly distributed throughout the tissue. In contrast, 24 hours after injection of LPS, massive GR-1-positive cells invasion was observed in the liver of both Tm1Bay and C57BL/6 mice at a similar level. As previously reported, such PMN recruitment was not observed in the liver of LPS-injected JCGR mice (Figure 3).

Discussion

Here we report that LPS induced the expression of both 2-6 and 4-6 ICAM-1 isoforms in Tm1Bay mice, while no such induction was detectable in both normal and JCGR mice. However, their levels of expression are too weak to be detectable by immunohistochemistry analysis. It is also possible that, while the binding domain was mapped to the domain 1 of ICAM-1 for both antibodies used in the assays (YN1 and 3E2), the binding epitopes are less accessible in the domain-deleted isoforms. This is in agreement with the fact that, although all alternative isoforms of ICAM-1 theoretically retained the ability to bind to LFA-1 through the domain 1 (exon 2), one of those did not bind (2-5) and two others (2-4 and 2-6) have decreased binding with LFA-1 by the deletion of domain 2, which is necessary for efficient epitope presentation to its counter-receptor (Stanley et al., B, 2000).

Our results also demonstrated that, in contrast to JCGR mice, Tm1Bay mice display no resistance to septic shock. The remarkable resistance of the exon-4-deficient mice (JCGR) to septic shock induced by LPS has been attributed at least in part to the incapacity of PMN to adhere firmly to vascular endothelium (Xu JEM 1994). The sensitivity of Tm1Bay mice to endotoxin septic shock suggests an implication of ICAM-1 isoforms in the lethal effect of LPS. Indeed, in contrast to JCGR, LPS induced a detectable level of at least 2 isoforms, 2-6 and 4-6 in the liver of Tm1Bay mice. The ICAM-1 isoform 2-6 is capable of binding to LFA-1 but not MAC-1 because it has the third domain alternatively spliced. The isoform 4-6 contains both the D1 and the D3 domains and can, in contrast to 2-6 isoform, binds both major ICAM-1 ligands, LFA-1

and MAC-1. Isoform 2-6, including the isoforms 3-6 and 2-5, lost their ability to bind to MAC-1 by the deletion of the domain 3 portion of ICAM-1.

LPS induced the infiltration of PMN in the liver of both C56BL/6 and Tm1Bay, but not in JCGR mice. During this present investigation for ICAM-1 isoforms in liver of LPS-stimulated mutant mice, we observed marked neutrophil invasion in the liver of Tm1Bay similar to that observed in C56BL/6, but no such recruitment in the liver of JCGR. To explain this difference, one possible hypothesis is the presence of isoforms in Tm1Bay mice that permit GR-1-positive leukocyte recruitment in liver. Since no ICAM-1 isoforms were detected in the liver of JCGR mice injected with LPS, we hypothesized that the absence of isoforms in liver prevents fatal hepatic injury induced by PMN, suggesting a possible functionality of ICAM-1 isoforms during immunological response. Whether the expression of 4-6 alone confers susceptibility to septic shock by its ability to bind MAC-1 is most likely. However, studies have shown that neutrophil adhesion is modulated by both LFA-1 and MAC-1 with different efficiency (Ding JI 1999) or differ over the duration of chemotactic stimulation (Neelamegham Blood 1998). However, studies by Issekort raise the alternative that both of these isoforms may contribute to the susceptibility to septic shock. Indeed, our data showing massive infiltration of PMN in liver of Baylor but not JCGR, is consistent with the view that recruitment of PMN by ICAM-1 isoforms is sufficient to render these mice susceptible to septic shock.

Existence of 5 isoforms raised several questions, for instance, is the regulation of their expression is at the transcriptional level. A better understanding of the role of ICAM-1 isoforms and its tissue distribution is necessary. A distinct pattern of expression

by immunohistochemistry in Tm1Bay mice compared to wild-type animal was previously reported (King JI). The exon 4-6 spliced isoform was shown to be dominant in most tissues. In comparison, the exon 2-6 and 3-6 isoforms are only very weakly expressed in Tm1Bay mice, which could explain the apparent absence of tissue staining in mutant JCGR mice. Also, expression of alternative isoforms of ICAM-1 is likely restricted to specific cell and tissue type. Our results have shown that LPS induced expression of isoforms 2-6 and 4-6 in the liver. What are the molecular mechanism controlling the expression level and the tissue distribution remain to be elucidated.

Our data show upregulation of ICAM-1 isoforms following LPS injection in vivo are in fact consistent with those of Van den Engel who also showed that injection of LPS increased the concentration of circulating ICAM-1 isoforms in exon 4-deficient mice (JCGR) (Van den Engel B 2000). Although these data could be representative of an increase of proteolytic cleavage of ICAM-1 isoforms, our data support the hypothesis that this augmentation in the concentration most likely results from increased expression of the isoforms in these tissues. ICAM-1 isoforms are detected in many organs of Tm1Bay, such as lung and spleen; so further studies could be done to explain their implication in septic shock and possibly other inflammatory processes. Assessment of the role of ICAM-1 in hepatic diseases, most notably ischemia, might be useful in JCGR mice, which seems to completely lack expression of ICAM-1 isoforms. It was shown that antibody against ICAM-1 attenuated liver injury in ischemia-reperfusion transplant but had no significant effect on hepatic neutrophil infiltration during reperfusion (Farhood JLB 1995).

Table 1 Expected molecular weights of PCR products using murine ICAM-1-specific sets of primers

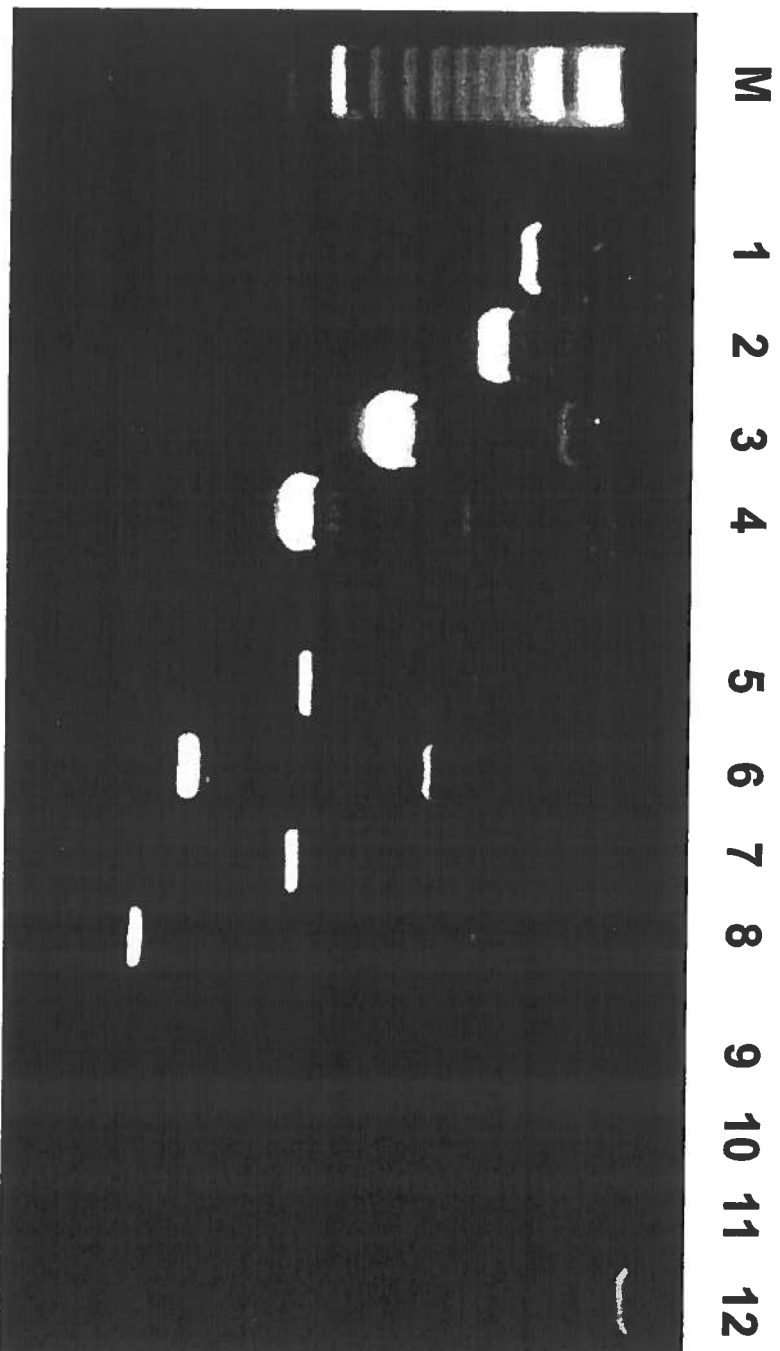
	D1(ATG)-D5±5	D1(XHO)-D5	D2-D5	D3-D5
Common	1380	1128	755	514
4-6	1122	928	497	256
2-4	1065	871	-	514
3-6	834	640	256	-
2-5	777	583	-	-
2-6	519	325	-	-

Table 2 Mortality following i.p injection of LPS (50 mg/kg) in mice

Mouse strain	C57BL6	Tm1Bay	JCGR
Mortality	7/14	10/13	0/12

RT-PCR of ICAM-1 expression in liver of LPS
Injected mice

C57BL/6 Tm1Bay JCGR



1-5-9: D1(atg)-D5

2-6-10 : D1(xho1)-D5

3-7-11 : D2-D5

3-8-12 : D3-D5

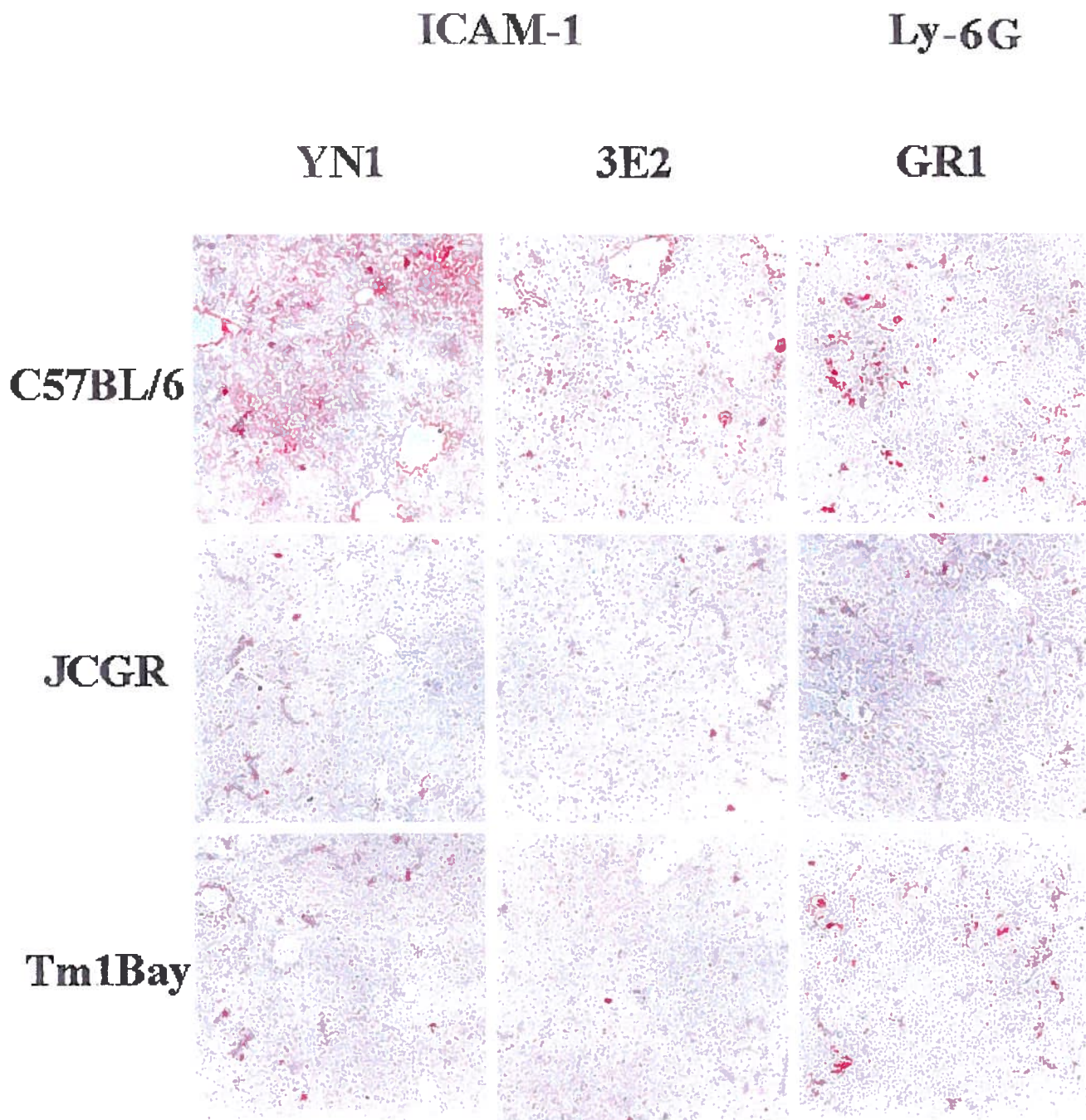


Figure 2: Immunohistochemical analysis of ICAM-1 expression and Ly-6G positive cells in the liver of LPS-injected mice.

**DISCUSSION GÉNÉRALE
ET
CONCLUSION**

Il est bien reconnu que l'échec des essais cliniques en thérapie génique à ce jour est dû à l'incapacité des stratégies utilisées à amener l'ADN en quantité suffisante à l'endroit ciblé. Les transporteurs d'ADN actuels, en effet, possèdent tous des facteurs qui limitent leur potentiel, le développement de nouvelles stratégies de transporteurs devient donc nécessaire. L'objectif premier des travaux effectués dans cette thèse a été de démontrer la validité de l'utilisation d'une stratégie de transport d'ADN basée sur les copolymères ionomériques en bloc. Dans des études antérieures à celles présentées dans cette thèse, ces transporteurs, à base de polyspermine et de PEG, avaient démontré leur potentiel dans le transport d'un oligonucléotide phosphodiester antisens pour l'inhibition de la réplication virale *in vitro* (Kabanov *et al.*, 1995). Ces mêmes transporteurs ont été testés dans la transfection d'oligonucléotides phosphorothioates mais sans succès. La première étape de mon doctorat a donc consisté en un criblage de nouvelles formulations des copolymères ionomériques en bloc afin d'identifier des candidats potentiels pour le transport d'ADN *in vitro*. L'efficacité de ces transporteurs est comparée à deux liposomes commerciaux, soit la lipofectine pour le transport des oligonucléotides, et la lipofectamine pour le transport de plasmide. Ces deux liposomes ont démontré une efficacité de transfection équivalente ou supérieure à tous les copolymères testés mais leur utilisation *in vivo* est impossible principalement à cause de leur instabilité et leur incapacité à éviter l'accumulation dans les poumons.

Criblage

Les copolymères en bloc testés sont regroupés en fonction du type de bloc ionique (bloc A), soit un polylysine (PL), polyspermine (PS) ou polyéthylèneimine (PEI). La méthode utilisée pour le criblage des polymères a permis d'identifier un groupe de transporteurs pour oligonucléotides. D'après les résultats obtenus, seuls les copolymères à base de PEI ont démontré une activité significative pour le transport d'oligonucléotides. Deux copolymères, soit le P85PEI et le PI2080, à base de polyéthylèneimine, ont été sélectionnés. Le PI2080 a été sélectionné d'après la méthode d'inhibition d'ICAM-1 (Annexe 1), alors que le P85PEI a été sélectionné par l'équipe du Dr Pierre Lemieux à

Supratek Pharma selon la méthode de transfection d'un oligonucléotide fluorescent. Leurs résultats ont également confirmé l'efficacité de PI2080 à transfecter un oligonucléotide. Ces deux polymères ont été utilisés pour les études de pharmacocinétique chez la souris (chapitre 2), alors que le PI2080 a été sujet à une caractérisation physicochimique plus poussée (Vinogradov, 1998). Pour des raisons de nomenclature propre aux copolymères, le polymère P85PEI a été renommé P85-g-PEI(2K), alors que le PI2080 est maintenant le PEO(8K)-g-PEI(2K). Les résultats présentés au chapitre 2 ont démontré que l'ajout au PEI d'une sous-unité ayant une balance hydrophilique/lipophile variable permettait de modifier le profil de biodistribution d'un oligonucléotide. En effet, le polymère PEO(8K)-g-PEI(2K) favorise l'accumulation d'oligonucléotide principalement dans les reins, alors que le P85-g-PEI(2K) permet l'accumulation dans le foie tout en évitant celle dans les reins.

Bien qu'aucune expérience n'a été faite pour expliquer la différence du tropisme entre le Pluronic et le PEG, nous pouvons émettre certaines hypothèses afin de l'expliquer. Tout d'abord, la différence dans la composition membranaire pourrait favoriser l'interaction du Pluronic aux membranes des cellules du foie, alors que les membranes rénales, optimisées pour le transport ionique, aurait une plus haute affinité pour le PEG hydrophile. Ensuite, il est intéressant de noter que le Pluronic, en s'accumulant dans la cellule, induirait une déplétion intracellulaire d'ATP en interférant avec certains processus métaboliques mitochondriaux (Batrakova *et al.*, 2001). Étant donné que de nombreux mécanismes de transport membranaires, dont l'endocytose et le système de transport de drogue Pgp, sont ATP-dépendantes, il est possible que le Pluronic ait une influence sur le transport de complexes PIB dans les différents tissus. D'autre part, on doit noter qu'aucune étude n'a été faite sur l'effet du PEG sur la déplétion d'ATP au d'autres mécanismes intracellulaires.

Les résultats sont intéressants à plusieurs niveaux. Premièrement, l'ajout d'un bloc hydrophile non chargé au transporteur permet d'augmenter le potentiel du PEI en évitant l'accumulation du complexe PEI-ADN dans les poumons. Deuxièmement, la nature du bloc ajouté influence le comportement et la biodistribution du complexe suivant l'injection intraveineuse de ce complexe. Finalement, dans un contexte industriel, le ciblage d'un complexe sans sous-unité spécifique à un ligand ou autre récepteur diminue

les coûts de fabrication et facilite leur préparation. Au niveau immunologique, l'absence de liaison à un récepteur spécifique diminue les risques de réponses intracellulaires non-désirées.

Il serait pertinent de pousser l'étude vers d'autres formulations afin de développer des systèmes de ciblage vers d'autres organes. Toutefois, l'étude présentée s'est limitée à la biodistribution d'oligonucléotides de petites tailles, il serait donc approprié de répéter les expériences avec des molécules d'ADN correspondant à la taille d'un gène complet ou d'un vecteur d'expression. Également, l'étude ne tient pas compte de l'impact du complexe polymère-ADN sur la dégradation de l'ADN par les DNases sériques et intracellulaires. La protection de l'ADN contre cette dégradation est un élément important dans l'obtention d'une thérapie génique efficace.

Inhibition d'ICAM-1 *in vivo*

Lors du criblage des transporteurs à oligonucléotides, le modèle d'inhibition d'ICAM-1 des cellules endothéliales b-End.3 décrit par Stepkowski et coll. (1994) permettait de tester à la fois le potentiel de transfection des transporteurs et leur capacité à permettre l'activité biologique des antisens. Par souci de simplicité pour le criblage des polymères, l'inhibition de l'expression d'ICAM-1 a été mesurée par cytométrie en flux et non pas par immunobuvardage de type Northern utilisé précédemment (Stepkowski *et al.*, 1994). Les études sur le polymère PEO(8K)-*g*-PEI(2K) se sont poursuivies dans un modèle d'inhibition de l'expression d'ICAM-1 chez la souris injectée au LPS. Le chapitre 3 présente les résultats qui ont démontré que l'antisens formulé avec PEO(8K)-*g*-PEI(2K) permettait une inhibition presque complète de l'expression d'ICAM-1 induite par le LPS dans les reins. Le faible retard dans l'élimination de l'oligonucléotide du plasma, qui s'est traduit par une augmentation de l'AUC de 80%, a vraisemblablement permis sa redistribution vers d'autres organes notamment vers le foie et la rate. Une augmentation dans l'accumulation d'ADN a aussi été observée dans le cerveau (30%) mais la quantité absolue demeure négligeable.

Nous avons observé une différence de taille entre les résultats *in vitro* d'inhibition d'ICAM-1 obtenus par cytométrie en flux et ceux obtenus par Stepkowski et coll. qui ont utilisé la technique d'immunobuvardage de type Northern pour évaluer le niveau d'expression d'ICAM-1. En effet, ces derniers n'ont pas observé d'inhibition d'ICAM-1 en utilisant l'oligonucléotide témoin IPS-8997 alors que dans des conditions similaires, nous avons observé une inhibition de l'expression allant jusqu'à 60% par cytométrie. Dans les études *in vitro*, l'analyse par immunobuvardage a été effectuée 4 heures après la stimulation des b-end.3 par des cytokines alors que nos analyses par cytométrie ont été effectuées à 16 heures post-stimulation. Il est donc possible que nous observions un effet cytotoxique de la lipofectine affectant la machinerie cellulaire et dont l'effet se manifeste après une certaine période d'incubation. Une différence de sensibilité entre les 2 techniques pourrait également expliquer ce désaccord.

Cette observation a également été corroborée par nos résultats obtenus *in vivo* dans lesquelles une forte inhibition d'ICAM-1 a été observée avec IPS-8997 dans les reins de souris traitées au LPS (Chapitre 3). Pour pouvoir comparer justement les résultats *in vitro* et *in vivo*, les analyses par RT-PCR auraient dû être faites lors des études *in vitro* sur les cellules endothéliales. Cependant, cela n'a pas été jugé nécessaire dans un contexte de criblage des polymères. C'est également pour cette même raison que les polymères n'ont pas été criblés avec la séquence témoin IPS-8997.

La séquence témoin IPS-8997 a également inhibé l'expression d'ICAM-1 de façon significative, probablement par un mécanisme séquence non-spécifique. L'utilisation de nouvelles générations d'oligonucléotides antisens serait nécessaire afin de caractériser davantage le phénomène observé, à savoir si l'effet inhibiteur est dû à l'utilisation d'oligonucléotide phosphorothioate, à une interférence du complexe PEO(8K)-g-PEI(2K)-oligonucléotide avec les processus intracellulaires ou membranaires de la cellule transfectée, ou bien est-ce l'ensemble de ces hypothèses. Cependant, les résultats demeurent encourageants, avec ce transporteur puisque, à pareille dose, l'antisens seul n'a eu aucun effet sur l'expression d'ICAM-1 dans les reins. De plus, Le complexe PEO(8K)-g-PEI(2K)-oligonucléotide s'est également avéré peu toxique (aucun effet secondaire notable à 5 mg/souris).

Récemment, une modification méthoxyéthyle de l'antisens phosphorothioate anti-ICAM-1 a permis d'améliorer la prévention des dommages reliés à l'ischémie et à la reperfusion de greffes (Chen *et al.*, 2001). Des oligonucléotides amino-oxyéthylés ont également démontré une très haute résistance aux nucléases tout en étant très efficace dans l'inhibition de l'expression de plusieurs gènes dont ICAM-1 (Prakash *et al.*, 2001). Ces types d'antisens seraient des candidats intéressants dans la poursuite éventuelle de ces travaux.

Expression d'ICAM-1

En considérant le potentiel des copolymères en bloc à altérer la biodistribution des complexes (Chapitre 2), les études suivantes ont porté sur le transport de plasmide *in vivo*. Puisque le comportement des polymères en bloc diffère en fonction de la taille de la molécule à encapsuler, deux criblages ont été nécessaires, soit un pour le transport d'oligonucléotide, et un deuxième pour le plasmide, étant de masse et de taille beaucoup plus importantes. Le résultat de ces 2 criblages est présenté en annexe 1. Lors du criblage des transporteurs de plasmide, les copolymères ont été testés *in vitro* pour la transfection d'un vecteur d'expression codant pour ICAM-1 murine. La lignée cellulaire COS-7 a été utilisée pour ne pas avoir d'interférence lors de la mesure de l'expression de l'ICAM-1 transgénique par l'expression d'ICAM-1 endogène. Le criblage a permis d'identifier un polymère, PE250/200, possédant une forte activité de transfection dans les cellules COS-7. Cependant, dans les analyses subséquentes, son activité *in vivo* s'est avérée négligeable. Le criblage que j'ai effectué s'est néanmoins avéré utile puisqu'il a permis d'orienter les travaux de synthèse des copolymères vers des transporteurs à base de polyéthylèneimine. Parallèlement à mes travaux de criblage, l'équipe du Dr Pierre Lemieux à Supratek Pharma a effectué des analyses *in vivo* en utilisant le gène rapporteur de la luciférase pour évaluer la biodistribution des complexes polymère-ADN. Leur travaux de criblages par la luciférase ont été présentés dans la publication de Nguyen *et al.*, (2000). Tenant compte de leurs résultats préliminaires, j'ai décidé d'utiliser le transporteur P123PEI, composé d'un bloc de polyéthylèneimine de 2 kDa attaché au

Pluronic P123, qui permettrait une accumulation importante d'ADN dans le foie chez la souris tout en étant peu toxique.

Afin de discriminer l'expression d'ICAM-1 transgénique de l'endogène, mon étude d'expression a été effectuée dans une souris déficiente en ICAM-1 (souche Tm1Bay). L'évaluation de l'expression d'ICAM-1 par immunohistochimie devenait également possible étant donné l'absence de la forme commune d'ICAM-1 endogène. Par contre, l'analyse par RT-PCR a demandé une reconception des amorces utilisées dans la réaction de PCR du chapitre 3. En effet, la paire d'amorces utilisée pour la détection de l'expression d'ICAM-1 dans l'étude avec les antisens amplifie un fragment de l'ARNm d'ICAM-1 du domaine 1 au domaine 3 (exon 2-exon 4) et qui est présent chez une des isoformes de la souris déficiente en ICAM-1. L'insertion *Neo* a été effectuée dans l'exon 5 du gène, ce qui permettrait la synthèse d'un brin d'ARN contenant au moins les deux premiers exons (Sligh *et al*, 1994). Ainsi, une nouvelle amorce antisens a été conçue pour s'hybrider sur le site d'insertion de la cassette *Neo* dans l'exon 5 du gène d'ICAM-1. Cette nouvelle paire d'amorces ne donne aucun produit de PCR dans la souris Tm1Bay mais peut le faire en présence d'un ARNm transgénique (Chapitre 4). C'est ainsi que, par RT-PCR, nous avons détecté une expression d'ICAM-1 transgénique dans le foie et plus faiblement dans les reins des souris injectées avec le complexe P123PEI-pICAM-1. Nous avons également observé que l'expression d'ICAM-1 dans le foie de ces souris a conduit à l'infiltration de neutrophiles, un phénomène faisant suite normalement à un processus inflammatoire complexe. En effet, le recrutement des neutrophiles au site inflammatoire nécessite l'expression ou l'activation de sélectines et intégrines, l'activation de l'endothélium et la sécrétion de chemoattracteurs. Le fait que MAC-1, contrairement à LFA-1, n'a pas besoin d'activation, pourrait expliquer le recrutement des neutrophiles au site de surexpression d'ICAM-1. Ce phénomène est dépendant de l'expression d'ICAM-1 puisque le complexe P123PEI-ADN témoin n'a pu déclencher cette infiltration.

ICAM-1 joue un rôle également crucial dans le processus de présentation d'antigène. Des nombreuses études ont démontré que l'augmentation d'ICAM-1 à la surface des cellules tumorales favorise leur reconnaissance et leur destruction par le système immunitaire. Les résultats de ces études ont démontré que la surexpression d'ICAM-1 dans le foie a été possible et a induit l'infiltration de neutrophiles sans la

nécessité d'une réaction inflammatoire, donc moins d'effets secondaires. Les études futures détermineront si ce système peut être utilisé pour augmenter la présentation d'antigène en surexprimant ICAM-1 par les cellules tumorales.

Isoformes d'ICAM-1

Les isoformes d'ICAM-1 pourraient jouer un rôle dans le recrutement différentiel des leucocytes, notamment par la présence ou l'absence du domaine 3 responsable de la liaison à MAC-1, ou bien lors des contacts intercellulaires où l'affinité de liaison ICAM-1 avec son ligand serait influencée par la distance entre les 2 cellules. Les résultats présentés au chapitre 5 suggèrent un rôle possible des isoformes d'ICAM-1 dans le recrutement leucocytaire. En effet, leur présence dans le foie des souris Tm1Bay semble expliquer l'infiltration de neutrophiles après injection de LPS, alors que l'absence de ces isoformes dans la souris JCGR marque également l'absence d'infiltration.

Dans le cadre d'une thérapie génique impliquant les isoformes d'ICAM-1, le recrutement leucocytaire peut être précisé en utilisant un vecteur d'expression codant pour un isoforme particulier. Par exemple, le recrutement de leucocytes LFA-1+ peut être réduite en utilisant un isoforme ne contenant pas de domaine 2 (isoformes 2-4, 2-5 et 2-6), alors que les cellules MAC-1+ peuvent être bloqués en utilisant un isoforme ne contenant pas le domaine 3 (isoformes 3-6, 2-5 et 2-6). Pour ce qui est de l'utilisation des isoformes pour prévenir le rejet de greffe, des résultats préliminaires ont démontré une capacité variable de ces isoformes à favoriser la présentation d'antigène au niveau des cellules tumorales (Robledo et coll., soumis au European Journal of Immunology. Le manuscrit est présenté en annexe).

CONCLUSION

Les résultats présentés dans l'annexe 1 devraient être jugés dans l'optique d'une évaluation qualitative de l'efficacité des copolymères. Cette approche est jugée pertinente étant donné la corrélation risquée entre les résultats *in vitro* et le comportement des complexes *in vivo*. Ce fait est notamment appuyé par l'absence d'activité du transporteur P250PEI200 *in vivo*, et ce, malgré une forte efficacité *in vitro*. Les polymères ionomériques en bloc peuvent altérer la biodistribution de molécules d'ADN *in vivo* permettant ainsi d'augmenter la spécificité d'une éventuelle thérapie génique tout en diminuant les effets secondaires. Contrairement aux autres stratégies de transporteurs, l'administration de complexes ionomériques de façon systémique (i.v.) est maintenant envisageable puisqu'ils évitent la filtration dans les capillaires pulmonaires. Finalement, ces transporteurs peuvent aussi bien être utilisés pour le transport d'oligonucléotides que de plasmides, démontrant ainsi une très grande versatilité d'utilisation.

À l'aide des polymères ionomériques en bloc, l'expression d'ICAM-1 peut être ciblée dans un organe choisie, afin de l'inhiber, avec un antisens, ou de l'augmenter en utilisant un vecteur d'expression. L'implication essentielle d'ICAM-1 dans les processus inflammatoires et de présentation d'antigène en fait une cible intéressante en thérapie génique. La possibilité d'utiliser les isoformes d'ICAM-1 pour spécifier le type d'intervention génique en fonction de la réponse voulue rend cette cible d'autant plus attrayante.

REMERCIEMENTS

Je voudrais remercier mon directeur de recherche, le Dr Yves St-Pierre, pour m'avoir accepté comme étudiant dans son laboratoire de recherche et pour m'avoir transmis sa passion pour les sciences. Je remercie également mon co-directeur de recherche, le Dr Valery Alakhov pour sa générosité et sa très grande disponibilité.

Je remercie également Doris Legault, notre mère à tous, Marcel Desrosiers (Mr XL) et pour leur aide technique précieuse et indispensable dans les moments de tous les jours et pour leur bonne humeur dans le laboratoire.

Je dois également remercier la Fondation Armand-Frappier pour son soutien financier, ainsi que la compagnie Supratek Pharma grâce à laquelle ce projet hyper-intéressant a pu se faire.

Pour finir, je voudrais remercier tous ceux qui ont contribué, de près ou de loin, à rendre cette expérience enrichissante. La bande du labo YSP: Pierre Tremblay, Fawzi Aoudjit, Dana Zmeuranu, Pierre-Olivier Estève, Céline Van Temsche, Éric Chicoine, Anna-Karine Bélizaire, Benoît Champagne, Anne Papaioannou, Olivier Robledo, Manon Girard, Pascal De Noncourt, Mélanie Demers, Julie Mercier. La bande à Supratek: Pierre Lemieux, Alexander Kabanov, Aliaa Abdul, Ludmila Tchistiakova, Nadia Guérin, Geneviève Paradis. Et les autres et non les moindres, mes bons amis Mikhail Popkov et Anick Chalifour.

Et sans oublier Seba Alabbas, ! جزاك الله خيرا !

Je me dois également de souligner les contributions tant au niveau technique qu'au niveau humain de notre chère amie Claire Beauchemin. Elle nous a quittés prématurément. Je souhaite que l'on se souvienne d'elle comme étant une personne de qualité. Claire, prends une bière à ma santé dans ton coin de paradis!!

RÉFÉRENCES

Ahsmann EJ, Lokhorst HM, Dekker AW, Bloem AC. Lymphocyte function-associated antigen-1 expression on plasma cells correlates with tumor growth in multiple myeloma. *Blood*. 1992 Apr 15;79(8):2068-75.

Alakhov VYU, Kabanov AV. Block copolymeric biotransport carriers as versatile vehicles for drug delivery. *Exp Opin Invest Drugs*. 1998 7(8):1453-73.

Altieri DC, Bader R, Mannucci PM, Edgington TS. Oligospecificity of the cellular adhesion receptor Mac-1 encompasses an inducible recognition specificity for fibrinogen. *J Cell Biol*. 1988 Nov;107(5):1893-900.

Altmann DM, Hogg N, Trowsdale J, Wilkinson D. Cotransfection of ICAM-1 and HLA-DR reconstitutes human antigen-presenting cell function in mouse L cells. *Nature*. 1989 Apr 6;338(6215):512-4.

Altomonte M, Gloghini A, Bertola G, Gasparollo A, Carbone A, Ferrone S, Maio M. Differential expression of cell adhesion molecules CD54/CD11a and CD58/CD2 by human melanoma cells and functional role in their interaction with cytotoxic cells. *Cancer Res*. 1993 Jul 15;53(14):3343-8.

Anderson DC, Miller LJ, Schmalstieg FC, Rothlein R, Springer TA. Contributions of the Mac-1 glycoprotein family to adherence-dependent granulocyte functions: structure-function assessments employing subunit-specific monoclonal antibodies. *J Immunol*. 1986 Jul 1;137(1):15-27.

Aoki S, Imai K, Yachi A. Soluble intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) antigen in patients with rheumatoid arthritis. *Scand J Immunol*. 1993 Nov;38(5):485-90.

Aoudjit F, Brochu N, Morin N, Poulin G, Stratowa C, Audette M. Heterodimeric retinoic acid receptor-beta and retinoid X receptor-alpha complexes stimulate expression of the intercellular adhesion molecule-1 gene. *Cell Growth Differ*. 1995 May;6(5):515-21.

Aoudjit F, Potworowski EF, St-Pierre Y. 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*. 1998 Mar 15;160(6):2967-73.

Aoudjit F, Potworowski EF, St-Pierre Y. The metastatic characteristics of murine lymphoma cell lines in vivo are manifested after target organ invasion. *Blood*. 1998 Jan 15;91(2):623-9.

Arai K, Sunamura M, Wada Y, Takahashi M, Kobari M, Kato K, Yagita H, Okumura K, Matsuno S. Preventing effect of anti-ICAM-1 and anti-LFA-1 monoclonal antibodies on murine islet allograft rejection. *Int J Pancreatol*. 1999 Aug;26(1):23-31.

Archelos JJ, Jung S, Maurer M, Schmied M, Lassmann H, Tamatani T, Miyasaka M, Toyka KV, Hartung HP. Inhibition of experimental autoimmune encephalomyelitis by an antibody to the intercellular adhesion molecule ICAM-1. *Ann Neurol.* 1993 Aug;34(2):145-54.

Arroyo AG, Campanero MR, Sanchez-Mateos P, Zapata JM, Ursa MA, del Pozo MA, Sanchez-Madrid F. Induction of tyrosine phosphorylation during ICAM-3 and LFA-1-mediated intercellular adhesion, and its regulation by the CD45 tyrosine phosphatase. *J Cell Biol.* 1994 Sep;126(5):1277-86.

Astafieva I, Maksimova I, Lukanidin E, Alakhov V, Kabanov A. Enhancement of the polycation-mediated DNA uptake and cell transfection with Pluronic P85 block copolymer. *FEBS Lett.* 1996 Jul 8;389(3):278-80.

Aubin RJ, Weinfeld M, Paterson MC. Factors influencing efficiency and reproducibility of polybrene-assisted gene transfer. *Somat Cell Mol Genet.* 1988 Mar;14(2):155-67.

Bader H, Ringsdorf H et Schmidt B. [Water-soluble polymers in medicine]. *Die Angewandte Makromolekulare Chemie.* 1984 123/124:457-85.

Bailly P, Hermand P, Callebaut I, Sonneborn HH, Khamlichi S, Mornon JP, Cartron JP. The LW blood group glycoprotein is homologous to intercellular adhesion molecules. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994 Jun 7;91(12):5306-10.

Bailly P, Tontti E, Hermand P, Cartron JP, Gahmberg CG. The red cell LW blood group protein is an intercellular adhesion molecule which binds to CD11/CD18 leukocyte integrins. *Eur J Immunol.* 1995 Dec;25(12):3316-20.

Batrakova EV, Li S, Elmquist WF, Miller DW, Alakhov VY, Kabanov AV. Mechanism of sensitization of MDR cancer cells by Pluronic block copolymers: Selective energy depletion. *Br J Cancer.* 2001 Dec 14;85(12):1987-97.

Becker JC, Dummer R, Hartmann AA, Burg G, Schmidt RE. 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.* 1991 Dec 15;147(12):4398-401.

Becker JC, Termeer C, Schmidt RE, Brocker EB. Soluble intercellular adhesion molecule-1 inhibits MHC-restricted specific T cell/tumor interaction. *J Immunol.* 1993 Dec 15;151(12):7224-32.

Behr JP, Demeneix B, Loeffler JP, Perez-Mutul J. Efficient gene transfer into mammalian primary endocrine cells with lipopolyamine-coated DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1989 Sep;86(18):6982-6.

Beller DI, Springer TA, Schreiber RD. Anti-Mac-1 selectively inhibits the mouse and human type three complement receptor. *J Exp Med.* 1982 Oct 1;156(4):1000-9.

Beltinger C, Saragovi HU, Smith RM, LeSauteur L, Shah N, DeDionisio L, Christensen L, Raible A, Jarett L, Gewirtz AM. Binding, uptake, and intracellular trafficking of phosphorothioate-modified oligodeoxynucleotides. *J Clin Invest.* 1995 Apr;95(4):1814-23.

Bennett CF, Kornbrust D, Henry S, Stecker K, Howard R, Cooper S, Dutson S, Hall W, Jacoby HI. An ICAM-1 antisense oligonucleotide prevents and reverses dextran sulfate sodium-induced colitis in mice. *J Pharmacol Exp Ther.* 1997 Feb;280(2):988-1000.

Berendt AR, Simmons DL, Tansey J, Newbold CI, Marsh K. Intercellular adhesion molecule-1 is an endothelial cell adhesion receptor for *Plasmodium falciparum*. *Nature.* 1989 Sep 7;341(6237):57-9.

Bird MI, Foster MR, Priest R, Malhotra R. Selectins: physiological and pathophysiological roles. *Biochem Soc Trans.* 1997 Nov;25(4):1199-206.

Bloom JW, Madanat MS, Ray MK. Cell line and site specific comparative analysis of the N-linked oligosaccharides on human ICAM-1des454-532 by electrospray ionization mass spectrometry. *Biochemistry.* 1996 Feb 13;35(6):1856-64.

Bonventre JV. Mechanisms of ischemic acute renal failure. *Kidney Int.* 1993 May;43(5):1160-78.

Boussif O, Lezoualc'h F, Zanta MA, Mergny MD, Scherman D, Demeneix B, Behr JP. A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995 Aug 1;92(16):7297-301.

Boris-Lawrie K, Temin HM. The retroviral vector. Replication cycle and safety considerations for retrovirus-mediated gene therapy. *Ann N Y Acad Sci.* 1994 May 31;716:59-70.

Brown E. Neutrophil adhesion and the therapy of inflammation. *Semin Hematol.* 1997 Oct;34(4):319-26.

Bushell A, Wood KJ. Permanent survival of organ transplants without immunosuppression: Experimental approaches and possibilities for tolerance induction in clinical transplantation. *Expert Reviews in Molecular Medicine.* 1999 Oct 29:1-31.

Budnik A, Grewe M, Gyufko K, Krutmann J. Analysis of the production of soluble ICAM-1 molecules by human cells. *Exp Hematol.* 1996 Feb;24(2):352-9.

Bullard DC, Hurley LA, Lorenzo I, Sly LM, Beaudet AL, Staite ND. Reduced susceptibility to collagen-induced arthritis in mice deficient in intercellular adhesion molecule-1. *J Immunol.* 1996 Oct 1;157(7):3153-8.

Butcher EC. Leukocyte-endothelial cell recognition: three (or more) steps to specificity and diversity. *Cell*. 1991 Dec 20;67(6):1033-6.

Campanero MR, Sanchez-Mateos P, del Pozo MA, Sanchez-Madrid F. ICAM-3 regulates lymphocyte morphology and integrin-mediated T cell interaction with endothelial cell and extracellular matrix ligands. *J Cell Biol*. 1994 Nov;127(3):867-78.

Caplen NJ, Alton EW, Middleton PG, Dorin JR, Stevenson BJ, Gao X, Durham SR, Jeffery PK, Hodson ME, Coutelle C, Huang L, Porteous DJ, Williamson R, Geddes DM. Liposome-mediated CFTR gene transfer to the nasal epithelium of patients with cystic fibrosis. *Nat Med*. 1995 Jan;1(1):39-46.

Carpen O, Pallai P, Staunton DE, Springer TA. Association of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) with actin-containing cytoskeleton and alpha-actinin. *J Cell Biol*. 1992 Sep;118(5):1223-34.

Casasnovas JM, Stehle T, Liu JH, Wang JH, Springer TA. A dimeric crystal structure for the N-terminal two domains of intercellular adhesion molecule-1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998 Apr 14;95(8):4134-9.

Cavazzana-Calvo M, Hacein-Bey S, de Saint Basile G, Gross F, Yvon E, Nusbaum P, Selz F, Hue C, Certain S, Casanova JL, Bouso P, Deist FL, Fischer A. Gene therapy of human severe combined immunodeficiency (SCID)-X1 disease. *Science*. 2000 Apr 28;288(5466):669-72.

Champagne B, Tremblay P, Cantin A, St Pierre Y. Proteolytic cleavage of ICAM-1 by human neutrophil elastase. *J Immunol*. 1998 Dec 1;161(11):6398-405.

Chen W, Bennett CF, Condon TP, Stecker K, Tian L, Kahan BD, Stepkowski SM. Methoxyethyl modification of phosphorothioate ICAM-1 antisense oligonucleotides improves prevention of ischemic/reperfusion injury. *Transplant Proc*. 2001 Feb-Mar;33(1-2):854.

Chen W, Bennett CF, Wang ME, Dragun D, Tian L, Stecker K, Clark JH, Kahan BD, Stepkowski SM. Perfusion of kidneys with unformulated "naked" intercellular adhesion molecule-1 antisense oligodeoxynucleotides prevents ischemic/reperfusion injury. *Transplantation*. 1999 Sep 27;68(6):880-7.

Cherng JY, van de Wetering P, Talsma H, Crommelin DJ, Hennink WE. Effect of size and serum proteins on transfection efficiency of poly ((2-dimethylamino)ethyl methacrylate)-plasmid nanoparticles. *Pharm Res*. 1996 Jul;13(7):1038-42.

Chirathaworn C, Tibbetts SA, Chan MA, Benedict SH. Cross-linking of ICAM-1 on T cells induces transient tyrosine phosphorylation and inactivation of cdc2 kinase. *J Immunol*. 1995 Dec 15;155(12):5479-82.

Chong AS, Boussy IA, Jiang XL, Lamas M, Graf LH Jr. CD54/ICAM-1 is a costimulator of NK cell-mediated cytotoxicity. *Cell Immunol.* 1994 Aug;157(1):92-105.

Cilenti L, Toniato E, Ruggiero P, Fusco C, Farina AR, Tiberio A, Hayday AC, Gulino A, Frati L, Martinotti S. Transcriptional modulation of the human intercellular adhesion molecule gene I (ICAM-1) by retinoic acid in melanoma cells. *Exp Cell Res.* 1995 May;218(1):263-70.

Cotten M, Wagner E, Zatloukal K, Phillips S, Curiel DT, Birnstiel ML. High-efficiency receptor-mediated delivery of small and large (48 kilobase gene constructs using the endosome-disruption activity of defective or chemically inactivated adenovirus particles. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992 Jul 1;89(13):6094-8.

Crooke ST. An overview of progress in antisense therapeutics. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* 1998 Apr;8(2):115-22.

Crooke ST. Progress toward oligonucleotide therapeutics: pharmacodynamic properties. *FASEB J.* 1993 Apr 1;7(6):533-9.

Crystal RG, McElvaney NG, Rosenfeld MA, Chu CS, Mastrangeli A, Hay JG, Brody SL, Jaffe HA, Eissa NT, Danel C. Administration of an adenovirus containing the human CFTR cDNA to the respiratory tract of individuals with cystic fibrosis. *Nat Genet.* 1994 Sep;8(1):42-51.

Damle NK, Klussman K, Linsley PS, Aruffo A. Differential costimulatory effects of adhesion molecules B7, ICAM-1, LFA-3, and VCAM-1 on resting and antigen-primed CD4+ T lymphocytes. *J Immunol.* 1992 Apr 1;148(7):1985-92.

Dang LH, Michalek MT, Takei F, Benaceraff B, Rock KL. Role of ICAM-1 in antigen presentation demonstrated by ICAM-1 defective mutants. *J Immunol.* 1990 Jun 1;144(11):4082-91.

D'Angelica M, Tung C, Allen P, Halterman M, Delman K, Delohery T, Klimstra D, Brownlee M, Federoff H, Fong Y. Herpes simplex virus (HSV)-mediated ICAM-1 gene transfer abrogates tumorigenicity and induces anti-tumor immunity. *Mol Med.* 1999 Sep;5(9):606-16.

Davignon D, Martz E, Reynolds T, Kurzinger K, Springer TA. Lymphocyte function-associated antigen 1 (LFA-1): a surface antigen distinct from Lyt-2,3 that participates in T lymphocyte-mediated killing. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1981 Jul;78(7):4535-9.

Dean NM, McKay R, Condon TP, Bennett CF. 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.* 1994 Jun 10;269(23):16416-24.

de Fougerolles AR, Qin X, Springer TA. Characterization of the function of intercellular adhesion molecule (ICAM)-3 and comparison with ICAM-1 and ICAM-2 in immune responses. *J Exp Med*. 1994 Feb 1;179(2):619-29.

de Fougerolles AR, Springer TA. Intercellular adhesion molecule 3, a third adhesion counter-receptor for lymphocyte function-associated molecule 1 on resting lymphocytes. *J Exp Med*. 1992 Jan 1;175(1):185-90.

de Fougerolles AR, Stacker SA, Schwarting R, Springer TA. Characterization of ICAM-2 and evidence for a third counter-receptor for LFA-1. *J Exp Med*. 1991 Jul 1;174(1):253-67.

Dejana E, Zanetti A, Del Maschio A. Adhesive proteins at endothelial cell-to-cell junctions and leukocyte extravasation. *Haemostasis*. 1996 Oct;26 Suppl 4:210-9.

De Mesmaeker A, Haner R, Martin P, Moser HE. Antisense Oligonucleotides. *Acc Chem Res*. 1995, 28, 366-374.

Denton MD, Magee CC, Sayegh MH. Immunosuppressive strategies in transplantation. *Lancet*. 1999 Mar 27;353(9158):1083-91.

Dewey RA, Morrissey G, Cowsill CM, Stone D, Bolognani F, Dodd NJ, Southgate TD, Klatzmann D, Lassmann H, Castro MG, Lowenstein PR. Chronic brain inflammation and persistent herpes simplex virus 1 thymidine kinase expression in survivors of syngeneic glioma treated by adenovirus-mediated gene therapy: implications for clinical trials. *Nat Med*. 1999 Nov;5(11):1256-63.

Diacovo TG, deFougerolles AR, Bainton DF, Springer TA. A functional integrin ligand on the surface of platelets: intercellular adhesion molecule-2. *J Clin Invest*. 1994 Sep;94(3):1243-51.

Diamond MS, Staunton DE, de Fougerolles AR, Stacker SA, Garcia-Aguilar J, Hibbs ML, Springer TA. ICAM-1 (CD54): a counter-receptor for Mac-1 (CD11b/CD18). *J Cell Biol*. 1990 Dec;111(6 Pt 2):3129-39.

Diamond MS, Staunton DE, Marlin SD, Springer TA. Binding of the integrin Mac-1 (CD11b/CD18) to the third immunoglobulin-like domain of ICAM-1 (CD54) and its regulation by glycosylation. *Cell*. 1991 Jun 14;65(6):961-71.

Ding ZM, Babensee JE, Simon SI, Lu H, Perrard JL, Bullard DC, Dai XY, Bromley SK, Dustin ML, Entman ML, Smith CW, Ballantyne CM. Relative contribution of LFA-1 and Mac-1 to neutrophil adhesion and migration. *J Immunol*. 1999 Nov 1;163(9):5029-38.

Dougherty GJ, Murdoch S, Hogg N. The function of human intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) in the generation of an immune response. *Eur J Immunol*. 1988 Jan;18(1):35-9.

Dragun D, Tullius SG, Park JK, Maasch C, Lukitsch I, Lippoldt A, Gross V, Luft FC, Haller H. ICAM-1 antisense oligodesoxynucleotides prevent reperfusion injury and enhance immediate graft function in renal transplantation. *Kidney Int.* 1998 Aug;54(2):590-602.

Dunbar CE, Kohn DB, Schiffmann R, Barton NW, Nolte JA, Esplin JA, Pensiero M, Long Z, Lockey C, Emmons RV, Csik S, Leitman S, Krebs CB, Carter C, Brady RO, Karlsson S. Retroviral transfer of the glucocerebrosidase gene into CD34+ cells from patients with Gaucher disease: in vivo detection of transduced cells without myeloablation. *Hum Gene Ther.* 1998 Nov 20;9(17):2629-40.

Durieu-Trautmann O, Chaverot N, Cazaubon S, Strosberg AD, Couraud PO. Intercellular adhesion molecule 1 activation induces tyrosine phosphorylation of the cytoskeleton-associated protein cortactin in brain microvessel endothelial cells. *J Biol Chem.* 1994 Apr 29;269(17):12536-40.

Dustin ML, Carpen O, Springer TA. Regulation of locomotion and cell-cell contact area by the LFA-1 and ICAM-1 adhesion receptors. *J Immunol.* 1992 May 1;148(9):2654-63.

Dustin ML, Garcia-Aguilar J, Hibbs ML, Larson RS, Stacker SA, Staunton DE, Wardlaw AJ, Springer TA. Structure and regulation of the leukocyte adhesion receptor LFA-1 and its counterreceptors, ICAM-1 and ICAM-2. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 1989;54 Pt 2:753-65.

Dustin ML, Rothlein R, Bhan AK, Dinarello CA, Springer TA. Induction by IL 1 and interferon-gamma: tissue distribution, biochemistry, and function of a natural adherence molecule (ICAM-1). *J Immunol.* 1986 Jul 1;137(1):245-54.

Dustin ML, Springer TA. 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.* 1988 Jul;107(1):321-31.

Dustin ML, Springer TA. T-cell receptor cross-linking transiently stimulates adhesiveness through LFA-1. *Nature.* 1989 Oct 19;341(6243):619-24.

Eck SL, Alavi JB, Judy K, Phillips P, Alavi A, Hackney D, Cross P, Hughes J, Gao G, Wilson JM, Propert K. Treatment of recurrent or progressive malignant glioma with a recombinant adenovirus expressing human interferon-beta (H5.010CMVhIFN-beta): a phase I trial. *Hum Gene Ther.* 2001 Jan 1;12(1):97-113.

Eder PS, DeVine RJ, Dagle JM, Walder JA. Substrate specificity and kinetics of degradation of antisense oligonucleotides by a 3' exonuclease in plasma. *Antisense Res Dev.* 1991 Summer;1(2):141-51.

Etienne-Manneville S, Chaverot N, Strosberg AD, Couraud PO. ICAM-1-coupled signaling pathways in astrocytes converge to cyclic AMP response element-binding protein phosphorylation and TNF-alpha secretion. *J Immunol.* 1999 Jul 15;163(2):668-74.

Etienne-Manneville S, Manneville JB, Adamson P, Wilbourn B, Greenwood J, Couraud PO. ICAM-1-coupled cytoskeletal rearrangements and transendothelial lymphocyte migration involve intracellular calcium signaling in brain endothelial cell lines. *J Immunol*. 2000 Sep 15;165(6):3375-83.

Etzioni A. Loss of endothelial surface expression of E-selectin--a third LAD syndrome. *Blood*. 1999 Dec 1;94(11):3956.

Farhood A, McGuire GM, Manning AM, Miyasaka M, Smith CW, Jaeschke H. Intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) expression and its role in neutrophil-induced ischemia-reperfusion injury in rat liver. *J Leukoc Biol*. 1995 Mar;57(3):368-74.

Farhood H, Bottega R, Epanand RM, Huang L. Effect of cationic cholesterol derivatives on gene transfer and protein kinase C activity. *Biochim Biophys Acta*. 1992 Nov 9;1111(2):239-46.

Fawcett J, Holness CL, Needham LA, Turley H, Gatter KC, Mason DY, Simmons DL. Molecular cloning of ICAM-3, a third ligand for LFA-1, constitutively expressed on resting leukocytes. *Nature*. 1992 Dec 3;360(6403):481-4.

Feeley BT, Park AK, Alexopoulos S, Hoyt EG, Ennen MP, Poston RS Jr, Robbins RC. Pressure delivery of AS-ICAM-1 ODN with LFA-1 mAb reduces reperfusion injury in cardiac allografts. *Ann Thorac Surg*. 1999 Jul;68(1):119-24.

Feeley BT, Poston RS, Park AK, Ennen MP, Hoyt EG, Vriens PW, Robbins RC. Optimization of ex vivo pressure mediated delivery of antisense oligodeoxynucleotides to ICAM-1 reduces reperfusion injury in rat cardiac allografts. *Transplantation*. 2000 Mar 27;69(6):1067-74.

Flavin T, Ivens K, Rothlein R, Faanes R, Clayberger C, Billingham M, Starnes VA. Monoclonal antibodies against intercellular adhesion molecule 1 prolong cardiac allograft survival in cynomolgus monkeys. *Transplant Proc*. 1991 Feb;23(1 Pt 1):533-4.

Floeth FW, Shand N, Bojar H, Prisack HB, Felsberg J, Neuen-Jacob E, Aulich A, Burger KJ, Bock WJ, Weber F. Local inflammation and devascularization--in vivo mechanisms of the "bystander effect" in VPC-mediated HSV-Tk/GCV gene therapy for human malignant glioma. *Cancer Gene Ther*. 2001 Nov;8(11):843-51.

Frey PA, Sammons RD. Bond order and charge localization in nucleoside phosphorothioates. *Science*. 1985 May 3;228(4699):541-5.

Gao X, Huang L. A novel cationic liposome reagent for efficient transfection of mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 1991 Aug 30;179(1):280-5.

Gearing AJ, Newman W. Circulating adhesion molecules in disease. *Immunol Today*. 1993 Oct;14(10):506-12.

Geissler D, Gaggl S, Most J, Greil R, Herold M, Dietrich M. A monoclonal antibody directed against the human intercellular adhesion molecule (ICAM-1) modulates the release of tumor necrosis factor-alpha, interferon-gamma and interleukin 1. *Eur J Immunol.* 1990 Dec;20(12):2591-6.

Gilboa E. Retrovirus vectors and their uses in molecular biology. *Bioessays.* 1986 Dec;5(6):252-7.

Gill DR, Southern KW, Mofford KA, Seddon T, Huang L, Sorgi F, Thomson A, MacVinish LJ, Ratcliff R, Bilton D, Lane DJ, Littlewood JM, Webb AK, Middleton PG, Colledge WH, Cuthbert AW, Evans MJ, Higgins CF, Hyde SC. A placebo-controlled study of liposome-mediated gene transfer to the nasal epithelium of patients with cystic fibrosis. *Gene Ther.* 1997 Mar;4(3):199-209.

Gitman AG, Graessmann A, Loyter A. Targeting of loaded Sendai virus envelopes by covalently attached insulin molecules to virus receptor-depleted cells: fusion-mediated microinjection of ricin A and simian virus 40 DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1985 Nov;82(21):7309-13.

Gomez-Scotto E, Seigneur M, Renard M, Houbouyan-Reveillard LL, Boisseau MR. [Interest in variations in soluble ICAM-1 plasma levels. From physiology to clinical applications]. *J Mal Vasc.* 2000 Jun;25(3):156-65.

Greve JM, Davis G, Meyer AM, Forte CP, Yost SC, Marlor CW, Kamarck ME, McClelland A. The major human rhinovirus receptor is ICAM-1. *Cell.* 1989 Mar 10;56(5):839-47.

Grover FL, Kahn RS, Heron MW, Paton BC. A nonionic surfactant and blood viscosity. Experimental observations. *Arch Surg.* 1973 Mar;106(3):307-10.

Haensler J, Szoka FC Jr. Polyamidoamine cascade polymers mediate efficient transfection of cells in culture. *Bioconjug Chem.* 1993 Sep-Oct;4(5):372-9.

Haller H, Dragun D, Miethke A, Park JK, Weis A, Lippoldt A, Gross V, Luft FC. Antisense oligonucleotides for ICAM-1 attenuate reperfusion injury and renal failure in the rat. *Kidney Int.* 1996 Aug;50(2):473-80.

Harada A, Kataoka K. Formation of polyion coplex micelles in a aqueous milieu from a pair of oppositely charged block copolymers with poly(ethyleneglycol) segments. *Macromolecules.* 1995; 28(15):5294-9.

Harlan JM, Killen PD, Senecal FM, Schwartz BR, Yee EK, Taylor RF, Beatty PG, Price TH, Ochs HD. The role of neutrophil membrane glycoprotein GP-150 in neutrophil adherence to endothelium in vitro. *Blood.* 1985 Jul;66(1):167-78.

- Harning R, Myers C, Merluzzi VJ. Monoclonal antibodies to lymphocyte function-associated antigen-1 inhibit invasion of human lymphoma and metastasis of murine lymphoma. *Clin Exp Metastasis*. 1993 Jul;11(4):337-42.
- Haskard D, Cavender D, Beatty P, Springer T, Ziff M. T lymphocyte adhesion to endothelial cells: mechanisms demonstrated by anti-LFA-1 monoclonal antibodies. *J Immunol*. 1986 Nov 1;137(9):2901-6.
- Haug CE, Colvin RB, Delmonico FL, Auchincloss H Jr, Tolkoff-Rubin N, Preffer FI, Rothlein R, Norris S, Scharschmidt L, Cosimi AB. A phase I trial of immunosuppression with anti-ICAM-1 (CD54) mAb in renal allograft recipients. *Transplantation*. 1993 Apr;55(4):766-72.
- Haynes M, Garrett RA, Gratzer WB. Structure of nucleic acid-poly base complexes. *Biochemistry*. 1970 Oct 27;9(22):4410-6.
- Hernand P, Huet M, Callebaut I, Gane P, Ihanus E, Gahmberg CG, Cartron JP, Bailly P. Binding sites of leukocyte beta 2 integrins (LFA-1, Mac-1) on the human ICAM-4/LW blood group protein. *J Biol Chem*. 2000 Aug 25;275(34):26002-10.
- Herold KC, Vezys V, Gage A, Montag AG. Prevention of autoimmune diabetes by treatment with anti-LFA-1 and anti-ICAM-1 monoclonal antibodies. *Cell Immunol*. 1994 Sep;157(2):489-500.
- Hofland HE, Shephard L, Sullivan SM. Formation of stable cationic lipid/DNA complexes for gene transfer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996 Jul 9;93(14):7305-9.
- Hofmann C, Sandig V, Jennings G, Rudolph M, Schlag P, Strauss M. Efficient gene transfer into human hepatocytes by baculovirus vectors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995 Oct 24;92(22):10099-103.
- Holland J, Owens T. Signaling through intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) in a B cell lymphoma line. The activation of Lyn tyrosine kinase and the mitogen-activated protein kinase pathway. *J Biol Chem*. 1997 Apr 4;272(14):9108-12.
- Horley KJ, Carpenito C, Baker B, Takei F. Molecular cloning of murine intercellular adhesion molecule (ICAM-1). *EMBO J*. 1989 Oct;8(10):2889-96.
- Huang C, Springer TA. A binding interface on the I domain of lymphocyte function-associated antigen-1 (LFA-1) required for specific interaction with intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1). *J Biol Chem*. 1995 Aug 11;270(32):19008-16.
- Huang YW, Richardson JA, Vitetta ES. Anti-CD54 (ICAM-1) has antitumor activity in SCID mice with human myeloma cells. *Cancer Res*. 1995 Feb 1;55(3):610-6.

Jaeschke H, Essani NA, Fisher MA, Vonderfecht SL, Farhood A, Smith CW. Release of soluble intercellular adhesion molecule 1 into bile and serum in murine endotoxin shock. *Hepatology*. 1996 Mar;23(3):530-6.

Johnson JP, Stade BG, Holzmann B, Schwable W, Riethmuller G. De novo expression of intercellular-adhesion molecule 1 in melanoma correlates with increased risk of metastasis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1989 Jan;86(2):641-4.

Joki T, Kikuchi T, Akasaki Y, Saitoh S, Abe T, Ohno T. Induction of effective antitumor immunity in a mouse brain tumor model using B7-1 (CD80) and intercellular adhesive molecule 1 (ICAM-1; CD54) transfection and recombinant interleukin 12. *Int J Cancer*. 1999 Aug 27;82(5):714-20.

Juan M, Vinas O, Pino-Otin MR, Places L, Martinez-Caceres E, Barcelo JJ, Miralles A, Vilella R, de la Fuente MA, Vives J, Yagüe J, Gayà A. CD50 (intercellular adhesion molecule 3) stimulation induces calcium mobilization and tyrosine phosphorylation through p59fyn and p56lck in Jurkat T cell line. *J Exp Med*. 1994 Jun 1;179(6):1747-56.

Jun CD, Shimaoka M, Carman CV, Takagi J, Springer TA. Dimerization and the effectiveness of ICAM-1 in mediating LFA-1-dependent adhesion. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001 Jun 5;98(12):6830-5.

Kabanov AV, Astafyeva IV, Chikindas ML, Rosenblat GF, Kiselev VI, Severin ES, Kabanov VA. DNA interpolyelectrolyte complexes as a tool for efficient cell transformation. *Biopolymers*. 1991 Oct 15;31(12):1437-43.

Kabanov AV, Kiselev VI, Chikindas ML, Astafyeva IV, Glukhov AI. [Increase in the transforming activity of plasmid DNA by means of its inclusion in the interpolyelectrolytic complex with a carbon-chain cation]. *Dokl Akad Nauk SSSR*. 1989 May-Jun;306(1):226-9.

Kabanov AV, Vinogradov SV, Suzdaltseva YG, Alakhov VYu. Water-soluble block polycations as carriers for oligonucleotide delivery. *Bioconjug Chem*. 1995 Nov-Dec;6(6):639-43.

Kageshita T, Yoshii A, Kimura T, Kuriya N, Ono T, Tsujisaki M, Imai K, Ferrone S. Clinical relevance of ICAM-1 expression in primary lesions and serum of patients with malignant melanoma. *Cancer Res*. 1993 Oct 15;53(20):4927-32.

Kataoka K, Harada A, Nagasaki Y. Block copolymer micelles for drug delivery: design, characterization and biological significance. *Adv Drug Deliv Rev*. 2001 Mar 23;47(1):113-31.

Kataoka K, Togawa H, Harada A, Yasugi K, Matsumoto T, Katayose S. Spontaneous formation of polyion complex micelles with narrow distribution from antisense oligonucleotide and cationic block copolymer in physiological saline. *Macromolecules*. 1996;29:8556-7.

Kavanaugh AF, Davis LS, Jain RI, Nichols LA, Norris SH, Lipsky PE. 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*. 1996 Aug;23(8):1338-44.

Kavanaugh AF, Davis LS, Nichols LA, Norris SH, Rothlein R, Scharschmidt LA, Lipsky PE. Treatment of refractory rheumatoid arthritis with a monoclonal antibody to intercellular adhesion molecule 1. *Arthritis Rheum*. 1994 Jul;37(7):992-9.

Kavanaugh AF, Schulze-Koops H, Davis LS, Lipsky PE. Repeat treatment of rheumatoid arthritis patients with a murine anti-intercellular adhesion molecule 1 monoclonal antibody. *Arthritis Rheum*. 1997 May;40(5):849-53.

Kay MA, Manno CS, Ragni MV, Larson PJ, Couto LB, McClelland A, Glader B, Chew AJ, Tai SJ, Herzog RW, Arruda V, Johnson F, Scallan C, Skarsgard E, Flake AW, High KA. Evidence for gene transfer and expression of factor IX in haemophilia B patients treated with an AAV vector. *Nat Genet*. 2000 Mar;24(3):257-61.

Kelly KJ, Williams WW Jr, Colvin RB, Meehan SM, Springer TA, Gutierrez-Ramos JC, Bonventre JV. Intercellular adhesion molecule-1-deficient mice are protected against ischemic renal injury. *J Clin Invest*. 1996 Feb 15;97(4):1056-63.

Kikuchi T, Joki T, Akasaki Y, Abe T, Ohno T. Induction of antitumor immunity using intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) transfection in mouse glioma cells. *Cancer Lett*. 1999 Aug 3;142(2):201-6.

King PD, Sandberg ET, Selvakumar A, Fang P, Beaudet AL, Dupont B. Novel isoforms of murine intercellular adhesion molecule-1 generated by alternative RNA splicing. *J Immunol*. 1995 Jun 1;154(11):6080-93.

Kishimoto TK, Hollander N, Roberts TM, Anderson DC, Springer TA. Heterogeneous mutations in the beta subunit common to the LFA-1, Mac-1, and p150,95 glycoproteins cause leukocyte adhesion deficiency. *Cell*. 1987 Jul 17;50(2):193-202.

Kishimoto TK, Larson RS, Corbi AL, Dustin ML, Staunton DE, Springer TA. The leukocyte integrins. *Adv Immunol*. 1989;46:149-82.

Kita Y, Takashi T, Iigo Y, Tamatani T, Miyasaka M, Horiuchi T. Sequence and expression of rat ICAM-1. *Biochim Biophys Acta*. 1992 May 7;1131(1):108-10.

Klatzmann D. Gene therapy for metastatic malignant melanoma: evaluation of tolerance to intratumoral injection of cells producing recombinant retroviruses carrying the herpes simplex virus type 1 thymidine kinase gene, to be followed by ganciclovir administration. *Hum Gene Ther*. 1996 Jan 20;7(2):255-67.

Klatzmann D, Valery CA, Bensimon G, Marro B, Boyer O, Mokhtari K, Diquet B, Salzmann JL, Philippon J. A phase I/II study of herpes simplex virus type 1 thymidine kinase "suicide" gene therapy for recurrent glioblastoma. Study Group on Gene Therapy for Glioblastoma. *Hum Gene Ther.* 1998 Nov 20;9(17):2595-604.

Knowles MR, Noone PG, Hohneker K, Johnson LG, Boucher RC, Efthimiou J, Crawford C, Brown R, Schwartzbach C, Pearlman R. A double-blind, placebo controlled, dose ranging study to evaluate the safety and biological efficacy of the lipid-DNA complex GR213487B in the nasal epithelium of adult patients with cystic fibrosis. *Hum Gene Ther.* 1998 Jan 20;9(2):249-69.

Kobayashi A, Imamura H, Isobe M, Matsuyama Y, Soeda J, Matsunaga K, Kawasaki S. Mac-1 (CD11b/CD18) and intercellular adhesion molecule-1 in ischemia-reperfusion injury of rat liver. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2001 Aug;281(2):G577-85.

Komatsu S, Flores S, Gerritsen ME, Anderson DC, Granger DN. Differential up-regulation of circulating soluble and endothelial cell intercellular adhesion molecule-1 in mice. *Am J Pathol.* 1997 Jul;151(1):205-14.

Kornberg LJ, Earp HS, Turner CE, Prockop C, Juliano RL. Signal transduction by integrins: increased protein tyrosine phosphorylation caused by clustering of beta 1 integrins. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991 Oct 1;88(19):8392-6.

Krensky AM, Sanchez-Madrid F, Robbins E, Nagy JA, Springer TA, Burakoff SJ. The functional significance, distribution, and structure of LFA-1, LFA-2, and LFA-3: cell surface antigens associated with CTL-target interactions. *J Immunol.* 1983 Aug;131(2):611-6.

Krieg AM, Stein CA. Phosphorothioate oligodeoxynucleotides: antisense or anti-protein? *Antisense Res Dev.* 1995;5(4):241.

Kuhlman P, Moy VT, Lollo BA, Brian AA. The accessory function of murine intercellular adhesion molecule-1 in T lymphocyte activation. Contributions of adhesion and co-activation. *J Immunol.* 1991 Mar 15;146(6):1773-82.

Kumar PK, Ellington AD. Artificial evolution and natural ribozymes. *FASEB J.* 1995 Sep;9(12):1183-95.

Kumasaka T, Quinlan WM, Doyle NA, Condon TP, Sligh J, Takei F, Beaudet AL, Bennett CF, Doerschuk CM. 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.* 1996 May 15;97(10):2362-9.

Languino LR, Plescia J, Duperray A, Brian AA, Plow EF, Geltosky JE, Altieri DC. Fibrinogen mediates leukocyte adhesion to vascular endothelium through an ICAM-1-dependent pathway. *Cell.* 1993 Jul 2;73(7):1423-34.

- Lasic DD. Mixed micelles in drug delivery. *Nature*. 1992 Jan 16;355(6357):279-80.
- Lew D, Parker SE, Latimer T, Abai AM, Kuwahara-Rundell A, Doh SG, Yang ZY, Laface D, Gromkowski SH, Nabel GJ, Manthorpe M, Norman J. Cancer gene therapy using plasmid DNA: pharmacokinetic study of DNA following injection in mice. *Hum Gene Ther*. 1995 May;6(5):553-64.
- Li S, Huang L. In vivo gene transfer via intravenous administration of cationic lipid-protamine-DNA (LPD) complexes. *Gene Ther*. 1997 Sep;4(9):891-900.
- Iigo Y, Takashi T, Tamatani T, Miyasaka M, Higashida T, Yagita H, Okumura K, Tsukada W. ICAM-1-dependent pathway is critically involved in the pathogenesis of adjuvant arthritis in rats. *J Immunol*. 1991 Dec 15;147(12):4167-71.
- Liu F, Qi H, Huang L, Liu D. Factors controlling the efficiency of cationic lipid-mediated transfection in vivo via intravenous administration. *Gene Ther*. 1997 Jun;4(6):517-23.
- Liu F, Yang J, Huang L, Liu D. New cationic lipid formulations for gene transfer. *Pharm Res*. 1996 Dec;13(12):1856-60.
- Liu Y, Liggitt D, Zhong W, Tu G, Gaensler K, Debs R. Cationic liposome-mediated intravenous gene delivery. *J Biol Chem*. 1995 Oct 20;270(42):24864-70.
- Lo SK, Van Seventer GA, Levin SM, Wright SD. Two leukocyte receptors (CD11a/CD18 and CD11b/CD18) mediate transient adhesion to endothelium by binding to different ligands. *J Immunol*. 1989 Nov 15;143(10):3325-9.
- Lu H, Smith CW, Perrard J, Bullard D, Tang L, Shappell SB, Entman ML, Beudet AL, Ballantyne CM. LFA-1 is sufficient in mediating neutrophil emigration in Mac-1-deficient mice. *J Clin Invest*. 1997 Mar 15;99(6):1340-50.
- Lupher ML Jr, Harris EA, Beals CR, Sui L, Liddington RC, Staunton DE. Cellular activation of leukocyte function-associated antigen-1 and its affinity are regulated at the i domain allosteric site. *J Immunol*. 2001 Aug 1;167(3):1431-9.
- Luscinskas FW, Cybulsky MI, Kiely JM, Peckins CS, Davis VM, Gimbrone MA Jr. Cytokine-activated human endothelial monolayers support enhanced neutrophil transmigration via a mechanism involving both endothelial-leukocyte adhesion molecule-1 and intercellular adhesion molecule-1. *J Immunol*. 1991 Mar 1;146(5):1617-25.
- Manning AM, Lu HF, Kukielka GL, Oliver MG, Ty T, Toman CA, Drong RF, Slightom JL, Ballantyne CM, Entman ML, Smith CW, Anderson DC. Cloning and comparative sequence analysis of the gene encoding canine intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1). *Gene*. 1995 Apr 24;156(2):291-5.
- Marcel T, Grausz JD. The TMC Worldwide Gene Therapy Enrollment Report, end 1996.

Hum Gene Ther. 1997 Apr 10;8(6):775-800.

Marubayashi S, Oshiro Y, Fukuma A, Okada K, Maeda T, Dohi K. Protective effect of monoclonal antibodies to adhesion molecules on rat liver ischemia-reperfusion injury. *Transplant Proc.* 1999 Feb-Mar;31(1-2):1054.

McCourt PA, Ek B, Forsberg N, Gustafson S. Intercellular adhesion molecule-1 is a cell surface receptor for hyaluronan. *J Biol Chem.* 1994 Dec 2;269(48):30081-4.

Miele ME, Bennett CF, Miller BE, Welch DR. Enhanced metastatic ability of TNF-alpha-treated malignant melanoma cells is reduced by intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1, CD54) antisense oligonucleotides. *Exp Cell Res.* 1994 Sep;214(1):231-41.

Miller J, Knorr R, Ferrone M, Houdei R, Carron CP, Dustin ML. Intercellular adhesion molecule-1 dimerization and its consequences for adhesion mediated by lymphocyte function associated-1. *J Exp Med.* 1995 Nov 1;182(5):1231-41.

Miller PS, Agris CH, Aurelian L, Blake KR, Murakami A, Reddy MP, Spitz SA, Ts'o PO. Control of ribonucleic acid function by oligonucleoside methylphosphonates. *Biochimie.* 1985 Jul-Aug;67(7-8):769-76.

Mizgerd JP, Kubo H, Kutkoski GJ, Bhagwan SD, Scharffetter-Kochanek K, Beaudet AL, Doerschuk CM. Neutrophil emigration in the skin, lungs, and peritoneum: different requirements for CD11/CD18 revealed by CD18-deficient mice. *J Exp Med.* 1997 Oct 20;186(8):1357-64.

Mizuno T, Yoshihara Y, Inazawa J, Kagamiyama H, Mori K. cDNA cloning and chromosomal localization of the human telencephalin and its distinctive interaction with lymphocyte function-associated antigen-1. *J Biol Chem.* 1997 Jan 10;272(2):1156-63.

Monden K, Arii S, Ishiguro S, Nakamura T, Fujita S, Mise M, Niwano M, Sasaoki T, Imamura M. Involvement of ICAM-1 expression on sinusoidal endothelial cell and neutrophil adherence in the reperfusion injury of cold-preserved livers. *Transplant Proc.* 1995 Feb;27(1):759-61.

Moore AR, Paton BC, Eiseman B. Reduction of splenic vascular resistance during perfusion by pluronic F68. *J Surg Res.* 1968 Dec;8(12):563-6.

Morisaki N, Takahashi K, Shiina R, Zenibayashi M, Otabe M, Yoshida S, Saito Y. 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.* 1994 Apr 15;200(1):612-8.

Mundigl O, Ochoa GC, David C, Slepnev VI, Kabanov A, De Camilli P. Amphiphysin I antisense oligonucleotides inhibit neurite outgrowth in cultured hippocampal neurons. *J Neurosci.* 1998 Jan 1;18(1):93-103.

Nabel GJ, Gordon D, Bishop DK, Nickoloff BJ, Yang ZY, Aruga A, Cameron MJ, Nabel EG, Chang AE. Immune response in human melanoma after transfer of an allogeneic class I major histocompatibility complex gene with DNA-liposome complexes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996 Dec 24;93(26):15388-93.

Nakano H, Nagasaki H, Yoshida K, Kigawa G, Fujiwara Y, Kitamura N, Kuzume M, Takeuchi S, Sasaki J, Shimura H, Yamaguchi M, Kumada K. N-acetylcysteine and anti-ICAM-1 monoclonal antibody reduce ischemia-reperfusion injury of the steatotic rat liver. *Transplant Proc*. 1998 Nov;30(7):3763.

Neelamegham S, Taylor AD, Burns AR, Smith CW, Simon SI. Hydrodynamic shear shows distinct roles for LFA-1 and Mac-1 in neutrophil adhesion to intercellular adhesion molecule-1. *Blood*. 1998 Sep 1;92(5):1626-38.

Nguyen HK, Lemieux P, Vinogradov SV, Gebhart CL, Guerin N, Paradis G, Bronich TK, Alakhov VY, Kabanov AV. Evaluation of polyether-polyethyleneimine graft copolymers as gene transfer agents. *Gene Ther*. 2000 Jan;7(2):126-38.

Nickoloff BJ, Mitra RS, Green J, Zheng XG, Shimizu Y, Thompson C, Turka LA. Accessory cell function of keratinocytes for superantigens. Dependence on lymphocyte function-associated antigen-1/intercellular adhesion molecule-1 interaction. *J Immunol*. 1993 Mar 15;150(6):2148-59.

Nilaver G, Muldoon LL, Kroll RA, Pagel MA, Breakefield XO, Davidson BL, Neuwelt EA. Delivery of herpesvirus and adenovirus to nude rat intracerebral tumors after osmotic blood-brain barrier disruption. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995 Oct 10;92(21):9829-33.

Nishikawa K, Guo YJ, Miyasaka M, Tamatani T, Collins AB, Sy MS, McCluskey RT, Andres G. Antibodies to intercellular adhesion molecule 1/lymphocyte function-associated antigen 1 prevent crescent formation in rat autoimmune glomerulonephritis. *J Exp Med*. 1993 Mar 1;177(3):667-77.

Niu XF, Smith CW, Kubes P. Intracellular oxidative stress induced by nitric oxide synthesis inhibition increases endothelial cell adhesion to neutrophils. *Circ Res*. 1994 Jun;74(6):1133-40.

Nortamo P, Li R, Renkonen R, Timonen T, Prieto J, Patarroyo M, Gahmberg CG. The expression of human intercellular adhesion molecule-2 is refractory to inflammatory cytokines. *Eur J Immunol*. 1991 Oct;21(10):2629-32.

Nozawa Y, Yamaguchi Y, Tominaga K, Hojo H, Abe M, Wakasa H. Expression of leukocyte adhesion molecules (ICAM-1/LFA-1) related to clinical behaviour in B cell lymphomas. *Hematol Oncol*. 1992 May-Aug;10(3-4):189-94.

Ogris M, Steinlein P, Kursa M, Mechtler K, Kircheis R, Wagner E. The size of DNA/transferrin-PEI complexes is an important factor for gene expression in cultured cells. *Gene Ther*. 1998 Oct;5(10):1425-33.

Onodera M, Ariga T, Kawamura N, Kobayashi I, Ohtsu M, Yamada M, Tame A, Furuta H, Okano M, Matsumoto S, Kotani H, McGarrity GJ, Blaese RM, Sakiyama Y. Successful peripheral T-lymphocyte-directed gene transfer for a patient with severe combined immune deficiency caused by adenosine deaminase deficiency. *Blood*. 1998 Jan 1;91(1):30-6.

Padros MR, Noli MI, Fainboim L. Expression of ICAM-1 (CD54) on normal and leukaemic B cells: implication for the mixed lymphocyte reaction. *Clin Exp Immunol*. 1992 May;88(2):329-34.

Parent C, Eichacker PQ. Neutrophil and endothelial cell interactions in sepsis. The role of adhesion molecules. *Infect Dis Clin North Am*. 1999 Jun;13(2):427-47.

Pober JS, Slowik MR, De Luca LG, Ritchie AJ. Elevated cyclic AMP inhibits endothelial cell synthesis and expression of TNF-induced endothelial leukocyte adhesion molecule-1, and vascular cell adhesion molecule-1, but not intercellular adhesion molecule-1. *J Immunol*. 1993 Jun 1;150(11):5114-23.

Poritz LS, Page MJ, Tilberg AF, Koltun WA. Amelioration of graft versus host disease with anti-ICAM-1 therapy. *J Surg Res*. 1998 Dec;80(2):280-6.

Post S, Messmer K. [The role of reperfusion damage]. *Chirurg*. 1996 Apr;67(4):318-23.

Poston RS, Mann MJ, Hoyt EG, Ennen M, Dzau VJ, Robbins RC. Antisense oligodeoxynucleotides prevent acute cardiac allograft rejection via a novel, nontoxic, highly efficient transfection method. *Transplantation*. 1999 Sep 27;68(6):825-32.

Pouton CW, Lucas P, Thomas BJ, Uduehi AN, Milroy DA, Moss SH. Polycation-DNA complexes for gene delivery: a comparison of the biopharmaceutical properties of cationic polypeptides and cationic lipids. *J Control Release*. 1998 Apr 30;53(1-3):289-99.

Prakash TP, Kawasaki AM, Johnston JF, Graham MJ, Condon TP, Manoharan M. Antisense properties of 2'-O-dimethylaminoxyethyl (2'-O-DMAOE) oligonucleotides. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*. 2001 Apr-Jul;20(4-7):829-32.

Pratten MK, Lloyd JB, Horpel G, Ringsdorf H. [Micelle-forming block copolymers : pinocytosis by macrophages and interaction with model membranes]. *Makromol Chem*, 186 (1985), 752.

Raspadori D, Lauria F, Ventura MA, Rondelli D, Tura S. Expression of adhesion molecules on acute leukemic blast cells and sensitivity to normal LAK activity. *Ann Hematol*. 1993 Nov;67(5):213-6.

Renkonen R, Mennander A, Ustinov J, Mattila P. Activation of protein kinase C is crucial in the regulation of ICAM-1 expression on endothelial cells by interferon-gamma. *Int Immunol*. 1990;2(8):719-24.

Rini BI, Selk LM, Vogelzang NJ. Phase I study of direct intralesional gene transfer of HLA-B7 into metastatic renal carcinoma lesions. *Clin Cancer Res.* 1999 Oct;5(10):2766-72.

Rosenstein Y, Park JK, Hahn WC, Rosen FS, Bierer BE, Burakoff SJ. CD43, a molecule defective in Wiskott-Aldrich syndrome, binds ICAM-1. *Nature.* 1991 Nov 21;354(6350):233-5.

Rothlein R, Kishimoto TK, Mainolfi E. Cross-linking of ICAM-1 induces co-signaling of an oxidative burst from mononuclear leukocytes. *J Immunol.* 1994 Mar 1;152(5):2488-95.

Roy S, Zhang K, Roth T, Vinogradov S, Kao RS, Kabanov A. Reduction of fibronectin expression by intravitreal administration of antisense oligonucleotides. *Nat Biotechnol.* 1999 May;17(5):476-9.

Rubin J, Galanis E, Pitot HC, Richardson RL, Burch PA, Charboneau JW, Reading CC, Lewis BD, Stahl S, Akporiaye ET, Harris DT. Phase I study of immunotherapy of hepatic metastases of colorectal carcinoma by direct gene transfer of an allogeneic histocompatibility antigen, HLA-B7. *Gene Ther.* 1997 May;4(5):419-25.

Salmela K, Wramner L, Ekberg H, Hauser I, Bentsdal O, Lins LE, Isoniemi H, Backman L, Persson N, Neumayer HH, Jorgensen PF, Spieker C, Hendry B, Nicholls A, Kirste G, Hasche G. 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.* 1999 Mar 15;67(5):729-36.

Sandmair AM, Loimas S, Puranen P, Immonen A, Kossila M, Puranen M, Hurskainen H, Tyynela K, Turunen M, Vanninen R, Lehtolainen P, Paljarvi L, Johansson R, Vapalahti M, Yla-Herttuala S. Thymidine kinase gene therapy for human malignant glioma, using replication-deficient retroviruses or adenoviruses. *Hum Gene Ther.* 2000 Nov 1;11(16):2197-205.

Sartor WM, Kyprianou N, Fabian DF, Lefor AT. Enhanced expression of ICAM-1 in a murine fibrosarcoma reduces tumor growth rate. *J Surg Res.* 1995 Jul;59(1):66-74.

Schachner M. The analysis of neural recognition molecules: benefits and vicissitudes of functional knock-outs using antibodies and gene ablation. *Curr Opin Cell Biol.* 1993 Oct;5(5):786-90.

Scharffetter-Kochanek K, Lu H, Norman K, van Nood N, Munoz F, Grabbe S, McArthur M, Lorenzo I, Kaplan S, Ley K, Smith CW, Montgomery CA, Rich S, Beaudet AL. Spontaneous skin ulceration and defective T cell function in CD18 null mice. *J Exp Med.* 1998 Jul 6;188(1):119-31.

Scheynius A, Engstrand L. Gastric epithelial cells in *Helicobacter pylori*-associated gastritis express HLA-DR but not ICAM-1. *Scand J Immunol*. 1991 Feb;33(2):237-41.

Schmolka IR. A review of block polymer surfactants. *J Am Oil Chem Soc*. 1977;54: 110.

Schuch U, Lohse MJ, Schachner M. Neural cell adhesion molecules influence second messenger systems. *Neuron*. 1989 Jul;3(1):13-20.

Schuler M, Herrmann R, De Greve JL, Stewart AK, Gatzemeier U, Stewart DJ, Laufman L, Gralla R, Kuball J, Buhl R, Heussel CP, Kommoss F, Perruchoud AP, Shepherd FA, Fritz MA, Horowitz JA, Huber C, Rochlitz C. Adenovirus-mediated wild-type p53 gene transfer in patients receiving chemotherapy for advanced non-small-cell lung cancer: results of a multicenter phase II study. *J Clin Oncol*. 2001 Mar 15;19(6):1750-8.

Sellak H, Franzini E, Hakim J, Pasquier C. Reactive oxygen species rapidly increase endothelial ICAM-1 ability to bind neutrophils without detectable upregulation. *Blood*. 1994 May 1;83(9):2669-77.

Sheil AG. Cancer in immune-suppressed organ transplant recipients: aetiology and evolution. *Transplant Proc*. 1998 Aug;30(5):2055-7.

Shimaoka M, Lu C, Palframan RT, von Andrian UH, McCormack A, Takagi J, Springer TA. Reversibly locking a protein fold in an active conformation with a disulfide bond: Integrin alpha L I domains with high affinity and antagonist activity in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001 May 22;98(11):6009-14.

Simmons D, Makgoba MW, Seed B. ICAM, an adhesion ligand of LFA-1, is homologous to the neural cell adhesion molecule NCAM. *Nature*. 1988 Feb 18;331(6157):624-7.

Simon RH, Engelhardt JF, Yang Y, Zepeda M, Weber-Pendleton S, Grossman M, Wilson JM. Adenovirus-mediated transfer of the CFTR gene to lung of nonhuman primates: toxicity study. *Hum Gene Ther*. 1993 Dec;4(6):771-80.

Siu G, Hedrick SM, Brian AA. Isolation of the murine intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) gene. ICAM-1 enhances antigen-specific T cell activation. *J Immunol*. 1989 Dec 1;143(11):3813-20.

Skubitz KM, Ahmed K, Campbell KD, Skubitz AP. CD50 (ICAM-3) is phosphorylated on tyrosine and is associated with tyrosine kinase activity in human neutrophils. *J Immunol*. 1995 Mar 15;154(6):2888-95.

Sligh JE Jr, Ballantyne CM, Rich SS, Hawkins HK, Smith CW, Bradley A, Beaudet AL. Inflammatory and immune responses are impaired in mice deficient in intercellular adhesion molecule 1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993 Sep 15;90(18):8529-33.

Springer TA. Adhesion receptors of the immune system. *Nature*. 1990 Aug 2;346(6283):425-34.

Springer TA. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell*. 1994 Jan 28;76(2):301-14.

Stanley P, McDowall A, Bates PA, Brashaw J, Hogg N. 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*. 2000 Oct 1;351(Pt 1):79-86.

Stauder R, Greil R, Schulz TF, Thaler J, Gattringer C, Radaskiewicz T, Dierich MP, Huber H. Expression of leucocyte function-associated antigen-1 and 7F7-antigen, an adhesion molecule related to intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) in non-Hodgkin lymphomas and leukaemias: possible influence on growth pattern and leukaemic behaviour. *Clin Exp Immunol*. 1989 Aug;77(2):234-8.

Staunton DE, Dustin ML, Erickson HP, Springer TA. The arrangement of the immunoglobulin-like domains of ICAM-1 and the binding sites for LFA-1 and rhinovirus. *Cell*. 1990 Apr 20;61(2):243-54.

Staunton DE, Dustin ML, Springer TA. Functional cloning of ICAM-2, a cell adhesion ligand for LFA-1 homologous to ICAM-1. *Nature*. 1989 May 4;339(6219):61-4.

Staunton DE, Marlin SD, Stratowa C, Dustin ML, Springer TA. Primary structure of ICAM-1 demonstrates interaction between members of the immunoglobulin and integrin supergene families. *Cell*. 1988 Mar 25;52(6):925-33.

Steidl U, Haas R, Kronenwett R. Intercellular adhesion molecular 1 on monocytes mediates adhesion as well as trans-endothelial migration and can be downregulated using antisense oligonucleotides. *Ann Hematol*. 2000 Aug;79(8):414-23.

Stewart M, Hogg N. Regulation of leukocyte integrin function: affinity vs. avidity. *J Cell Biochem*. 1996 Jun 15;61(4):554-61.

Stewart MP, Cabanas C, Hogg N. T cell adhesion to intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) is controlled by cell spreading and the activation of integrin LFA-1. *J Immunol*. 1996 Mar 1;156(5):1810-7.

St-Pierre Y, Aoudjit F, Lalancette M, Potworowski EF. Dissemination of T cell lymphoma to target organs: a post-homing event implicating ICAM-1 and matrix metalloproteinases. *Leuk Lymphoma*. 1999 Jun;34(1-2):53-61.

Stepkowski SM, Tu Y, Condon TP, Bennett CF. Blocking of heart allograft rejection by intercellular adhesion molecule-1 antisense oligonucleotides alone or in combination with other immunosuppressive modalities. *J Immunol*. 1994 Dec 1;153(11):5336-46.

Stepkowski SM, Wang ME, Amante A, Kalinin D, Qu X, Blasdel T, Condon T, Kahan BD, Bennett FC. Antisense ICAM-1 oligonucleotides block allograft rejection in rats. *Transplant Proc.* 1997 Feb-Mar;29(1-2):1285.

Stratowa C, Audette M. Transcriptional regulation of the human intercellular adhesion molecule-1 gene: a short overview. *Immunobiology.* 1995 Jul;193(2-4):293-304.

Temin HM. Safety considerations in somatic gene therapy of human disease with retrovirus vectors. *Hum Gene Ther.* 1990 Summer;1(2):111-23.

Tian L, Kilgannon P, Yoshihara Y, Mori K, Gallatin WM, Carpen O, Gahmberg CG. Binding of T lymphocytes to hippocampal neurons through ICAM-5 (telencephalin) and characterization of its interaction with the leukocyte integrin CD11a/CD18. *Eur J Immunol.* 2000 Mar;30(3):810-8.

Tian L, Yoshihara Y, Mizuno T, Mori K, Gahmberg CG. The neuronal glycoprotein telencephalin is a cellular ligand for the CD11a/CD18 leukocyte integrin. *J Immunol.* 1997 Jan 15;158(2):928-36.

Toda K, Kayano K, Karimova A, Naka Y, Fujita T, Minamoto K, Wang CY, Pinsky DJ. Antisense intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) oligodeoxyribonucleotide delivered during organ preservation inhibits posttransplant ICAM-1 expression and reduces primary lung isograft failure. *Circ Res.* 2000 Feb 4;86(2):166-74.

Tohma S, Hirohata S, Lipsky PE. The role of CD11a/CD18-CD54 interactions in human T cell-dependent B cell activation. *J Immunol.* 1991 Jan 15;146(2):492-9.

Uhlmann E, Peyman A. Antisense Oligonucleotides: A New Therapeutic Principle. *Chemical Reviews.* 1990 June;90(4):543-84.

van Den Engel NK, Heidenthal E, Vinke A, Kolb H, Martin S. Circulating forms of intercellular adhesion molecule (ICAM)-1 in mice lacking membranous ICAM-1. *Blood.* 2000 Feb 15;95(4):1350-5.

Van der Vieren M, Le Trong H, Wood CL, Moore PF, St John T, Staunton DE, Gallatin WM. A novel leukointegrin, alpha d beta 2, binds preferentially to ICAM-3. *Immunity.* 1995 Dec;3(6):683-90.

van de Stolpe A, van der Saag PT. Intercellular adhesion molecule-1. *J Mol Med.* 1996 Jan;74(1):13-33.

van Horssen M, Loman S, Rijkers GT, Boom SE, Bloem AC. Co-ligation of ICAM-1 (CD54) and membrane IgM negatively affects B cell receptor signaling. *Eur J Immunol.* 1995 Jan;25(1):154-8.

van Seventer GA, Newman W, Shimizu Y, Nutman TB, Tanaka Y, Horgan KJ, Gopal TV, Ennis E, O'Sullivan D, Grey H, Shaw S. Analysis of T cell stimulation by superantigen

plus major histocompatibility complex class II molecules or by CD3 monoclonal antibody: costimulation by purified adhesion ligands VCAM-1, ICAM-1, but not ELAM-1. *J Exp Med*. 1991 Oct 1;174(4):901-13.

Van Severter GA, Shimizu Y, Horgan KJ, Shaw S. The LFA-1 ligand ICAM-1 provides an important costimulatory signal for T cell receptor-mediated activation of resting T cells. *J Immunol*. 1990 Jun 15;144(12):4579-86.

Vignola AM, Chanez P, Campbell AM, Pinel AM, Bousquet J, Michel FB, Godard P. Quantification and localization of HLA-DR and intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) molecules on bronchial epithelial cells of asthmatics using confocal microscopy. *Clin Exp Immunol*. 1994 Apr;96(1):104-9.

Voraberger G, Schafer R, Stratowa C. Cloning of the human gene for intercellular adhesion molecule 1 and analysis of its 5'-regulatory region. Induction by cytokines and phorbol ester. *J Immunol*. 1991 Oct 15;147(8):2777-86.

Vuorte J, Lindsberg PJ, Kaste M, Meri S, Jansson SE, Rothlein R, Repo H. Anti-ICAM-1 monoclonal antibody R6.5 (Enlimomab) promotes activation of neutrophils in whole blood. *J Immunol*. 1999 Feb 15;162(4):2353-7.

Wagner E, Zenke M, Cotten M, Beug H, Birnstiel ML. Transferrin-polycation conjugates as carriers for DNA uptake into cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1990 May;87(9):3410-4.

Wakatsuki T, Kimura K, Kimura F, Shinomiya N, Ohtsubo M, Ishizawa M, Yamamoto M. A distinct mRNA encoding a soluble form of ICAM-1 molecule expressed in human tissues. *Cell Adhes Commun*. 1995 Nov;3(4):283-92.

Wang CY, Naka Y, Liao H, Oz MC, Springer TA, Gutierrez-Ramos JC, Pinsky DJ. Cardiac graft intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) and interleukin-1 expression mediate primary isograft failure and induction of ICAM-1 in organs remote from the site of transplantation. *Circ Res*. 1998 Apr 20;82(7):762-72.

Weber C, Calzada-Wack JC, Goretzki M, Pietsch A, Johnson JP, Ziegler-Heitbrock HW. Retinoic acid inhibits basal and interferon-gamma-induced expression of intercellular adhesion molecule 1 in monocytic cells. *J Leukoc Biol*. 1995 Mar;57(3):401-6.

Weetal HH, Bozichevich J. Effect of surfactants on antigen-antibody reactions. *Nature*. 215 (1967), 1479-80.

Wei K, Wilson JG, Jurgensen CH, Iannone MA, Wolberg G, Huber BE. Xenogeneic ICAM-1 gene transfer suppresses tumorigenicity and generates protective antitumor immunity. *Gene Ther*. 1996 Jun;3(6):531-41.

Wolfert MA, Schacht EH, Toncheva V, Ulbrich K, Nazarova O, Seymour LW. Characterization of vectors for gene therapy formed by self-assembly of DNA with synthetic block co-polymers. *Hum Gene Ther*. 1996 Nov 10;7(17):2123-33.

- Wu GY, Wu CH. Receptor-mediated in vitro gene transformation by a soluble DNA carrier system. *J Biol Chem.* 1987 Apr 5;262(10):4429-32.
- Xie J, Li R, Kotovuori P, Vermot-Desroches C, Wijdenes J, Arnaout MA, Nortamo P, Gahmberg CG. Intercellular adhesion molecule-2 (CD102) binds to the leukocyte integrin CD11b/CD18 through the A domain. *J Immunol.* 1995 Oct 1;155(7):3619-28.
- Xu H, Gonzalo JA, St Pierre Y, Williams IR, Kupper TS, Cotran RS, Springer TA, Gutierrez-Ramos JC. Leukocytosis and resistance to septic shock in intercellular adhesion molecule 1-deficient mice. *J Exp Med.* 1994 Jul 1;180(1):95-109.
- Yacyshyn BR, Bowen-Yacyshyn MB, Jewell L, Tami JA, Bennett CF, Kisner DL, Shanahan WR Jr. A placebo-controlled trial of ICAM-1 antisense oligonucleotide in the treatment of Crohn's disease. *Gastroenterology.* 1998 Jun;114(6):1133-42.
- Yei S, Mittereder N, Tang K, O'Sullivan C, Trapnell BC. Adenovirus-mediated gene transfer for cystic fibrosis: quantitative evaluation of repeated in vivo vector administration to the lung. *Gene Ther.* 1994 May;1(3):192-200.
- Yoshihara Y, Oka S, Nemoto Y, Watanabe Y, Nagata S, Kagamiyama H, Mori K. An ICAM-related neuronal glycoprotein, telencephalin, with brain segment-specific expression. *Neuron.* 1994 Mar;12(3):541-53.
- Yoshikawa Y. Morphological variation in folded duplex DNA chains. *Nucleic Acids Symp Ser.* 1997;(37):275-6.
- Zabner J, Couture LA, Gregory RJ, Graham SM, Smith AE, Welsh MJ. Adenovirus-mediated gene transfer transiently corrects the chloride transport defect in nasal epithelia of patients with cystic fibrosis. *Cell.* 1993 Oct 22;75(2):207-16.
- Zamecnik PC, Stephenson ML. Inhibition of Rous sarcoma virus replication and cell transformation by a specific oligodeoxynucleotide. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1978 Jan;75(1):280-4.
- Zeng Y, Torres MA, Thistlethwaite JR Jr, Montag A, Bluestone JA. Prolongation of human pancreatic islet xenografts by pretreatment of islets with anti-human ICAM-1 monoclonal antibody. *Transplant Proc.* 1994 Jun;26(3):1120.

ANNEXE 1

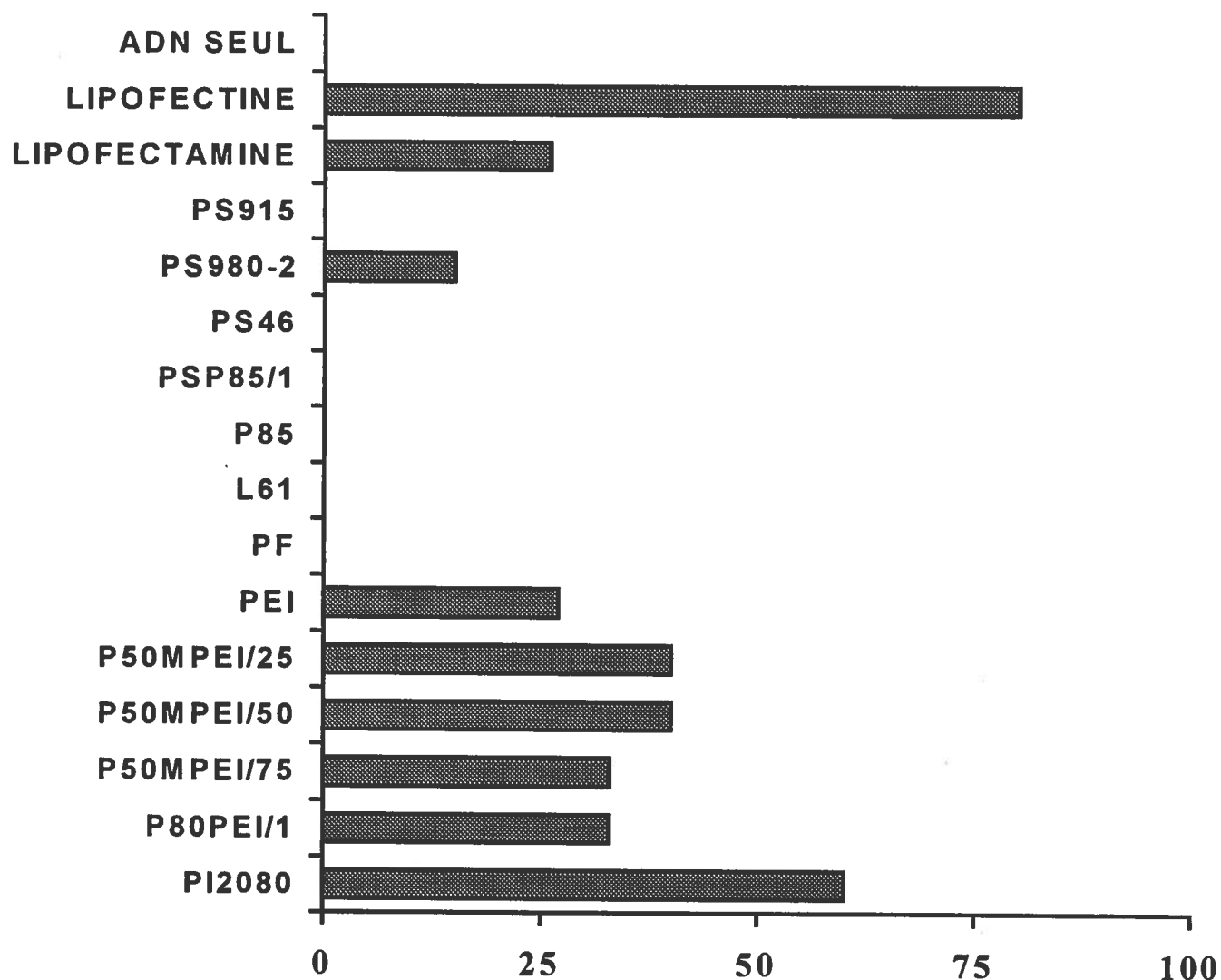


Figure 1: Résultats du criblage *in vitro* des polymères ionomériques en bloc pour l'inhibition de l'expression d'ICAM-1.

Méthodologie: Les cellules endothéliales murines b-End.3 ont été mises en culture dans des plateaux 12 puits en milieu RPMI complet. Les cellules sont incubées 4 heures dans une solution d'oligonucléotides IPS-3082 (3 $\mu\text{g/ml}$) avec ou sans transporteur. Les cellules sont lavées au PBS puis incubées 16 heures en présence d'INF- γ (25 U/ml). L'expression d'ICAM-1 a ensuite été évaluée par cytométrie en flux à l'aide de l'anticorps YN1 biotiné. Le pourcentage d'inhibition est calculé en fonction du niveau d'expression d'ICAM-1 des cellules stimulées à l' INF- γ mais non traitées avec les antisens.

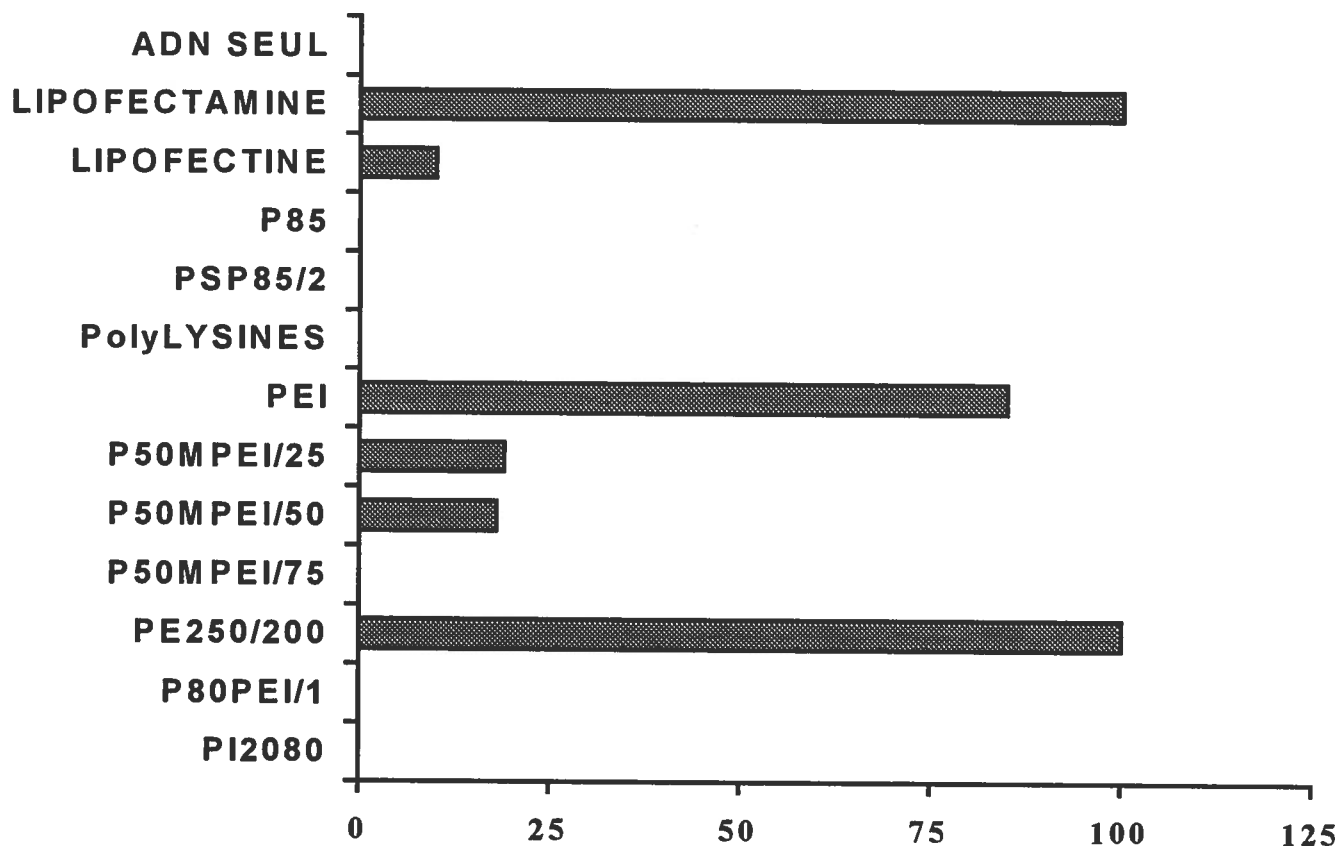


Figure 2: Résultats du criblage *in vitro* des polymères ionomériques en bloc pour l'expression d'ICAM-1.

Méthodologie: Les cellules simiennes COS-7 ont été mises en culture dans des plateaux 12 puits en milieu DMEM complet. Les cellules sont incubées 4 heures dans une solution de plamide pICAM-1 codant pour ICAM-1 murine (3 µg/ml) avec ou sans transporteur. Les cellules sont lavées au PBS puis incubées 16 heures en milieu DMEM frais. L'expression d'ICAM-1 a ensuite été évaluée par cytométrie en flux à l'aide de l'anticorps YN1 biotiné.

ANNEXE 2
PUBLICATIONS

Publications for benoito@yahoo.com

Yahoo! - My Yahoo! Options - Sign Out - Help



Reply Reply All Forward as attachment

Prev | Next | Publications

Delete - Choose Folder - Move

Mark as Unread

Flag This Message

Download Attachments
Printable View - Full HeadersFrom: "Valery Alakhov" <valery.alakhov@supratek.com> | [Block Address](#) | [Add to Address Book](#)

To: "Benoit Ochietti" <benoito@yahoo.com>

Subject: FW:

Date: Wed, 29 Aug 2001 12:59:07 -0400

-----Original Message-----

From: Len Seymour [mailto:l.seymour@bham.ac.uk]

Sent: Friday, August 10, 2001 1:14 PM

To: Valery.Alakhov@Supratek.comCc: RichardD@trials.bham.ac.uk

Subject:

Dear Valery

My sincere thanks for submitting your manuscript "Altered organ accumulation of oligonucleotides using polyethyleneimine grafted with poly(ethylene oxide) or pluronic as carriers", by Ochietta et al, to the special volume of the Journal of Drug Targeting that I am editing with Dr Manfred Ogris.

I am pleased to tell you that the article will be acceptable for publication in the Journal, subject to some minor revisions requested by one of the referees (attached). Please can you let me have your response to the referee's comments, and a revised manuscript, ideally sent by e mail to:

Dr. Richard B. G. Dales,
CRC Institute for Cancer Studies,
The University of Birmingham,
Edgbaston,
Birmingham B15 2TT.

e mail: RichardD@trials.bham.ac.uk

With many thanks and best personal wishes

Len Seymour

Attachment

[Rev_Ochietti_et_all1.doc](#)
Type .doc : Scanning recommended

[Scan With Norton Antivirus](#)
[Save to my Yahoo! Briefcase](#)
[Download File](#)
[View Attachment](#)

Publications for benoito@yahoo.com

Yahoo! - My Yahoo! Options - Sign Out - Help


[Mail](#) [Addresses](#) [Calendar](#) [Notepad](#)

Afraid to Answer Your Phone?
Reduce Your Debt and Get Creditors Off Your Back!



CLICK **DebtScape**
A non-profit credit counseling organization

[Reply](#) [Reply All](#) [Forward](#) [as attachment](#) ▼

[Prev](#) | [Next](#) | [Publications](#)
[Delete](#) [- Choose Folder -](#) ▼ [Move](#)
[Mark as Unread](#)
[Flag This Message](#)
[Download Attachments](#)
[Printable View - Full Headers](#)

Date: Thu, 14 Feb 2002 03:47:30 -0500

From: "Valery Alakhov" <valery.alakhov@supratek.com> | [Block Address](#) | [Add to Address Book](#)

Subject: FW: 2001GT002116R Decision Letter

To: "Benoit Ochietti" <benoito@yahoo.com>

CONGRATULATIONS!!!

Please do whatever is necessary to complete this story.

Regards,

Valery

-----Original Message-----

From: Genetherapy@nature.com [mailto:Genetherapy@nature.com]

Sent: Wednesday, February 13, 2002 2:28 PM

To: valery.alakhov@supratek.com

Subject: 2001GT002116R Decision Letter

Manuscript number: 2001GT002116R

Title: Inducing neutrophil recruitment in the liver of ICAM-1-deficient mice

using polyethyleneimine grafted with Pluronic Pl23 as an organ specific carrier for transgenic ICAM-1

Corresponding Author: Dr. Alakhov

I am delighted to tell you that your above mentioned manuscript has been accepted for publication in Gene Therapy.

Please see below a link to the copyright form for the Journal. If you have not already done so, please fax the completed copyright form for the attention of Denise Taylor to: +00 44 (0)1256 354 018.

or post to: - Denise Taylor, Gene Therapy, Nature Publishing Group, Houndmills, Basingstoke, Hampshire, RG21 6XS, UK

http://mts-gt.nature.com/letters/gt_copyright.pdf

When the copyright has been received, you will receive galley proofs directly from the publisher. Please review the proofs and return them promptly to the publisher.

Thank you for submitting this work to Gene Therapy.

Yours sincerely

Joseph Glorioso

PR Yves St-Pierre
Université du Québec
Institut National de la Recherche
scientifique
531, Bd des Prairies
LAVAL (QUEBEC) H7V 1B7
CANADA

**EUROPEAN JOURNAL OF
IMMUNOLOGY**

Date : 27/05/2002

Telephone 49-7615108449

Telefax 49-7615108451

Dear PR Yves St-Pierre,

Herewith I acknowledge receipt of your paper entitled « **ICAM-1 isoforms : specific activity and sensitivity to cleavage by leukocyte elastase and cathepsin G** »
Which is now being considered for publication. As soon as decision has been reached, you will be notified by the editor.

Yours sincerely,



124240109820

Human Gene Therapy

www.humangenetherapy.com

EDITORIAL OFFICE

W. French Anderson, M.D.
Editor-in-Chief
Keck School of Medicine
University of Southern California
1975 Zonal Ave., KAM 300
Los Angeles, CA 90033
(323) 442-GENE (4363)
FAX (323) 442-3618
email: hgt@genome2.hsc.usc.edu

August 16, 2002

[Sent via fax (450) 686-5504]

ASSOCIATE EDITORS

James M. Wilson, M.D., Ph.D.
Institute for Human Gene Therapy
University of Pennsylvania
Wistar Institute, Room 204
3601 Spruce Street
Philadelphia, PA 19104-4268
(215) 898-3000
FAX (215) 898-6588
email: wilsonjm@mail.med.upenn.edu

Valery Yu Alakhov, Ph.D.
Supratek Pharma Inc.
c/o: Institut Armand-Frappier
531 boulevard des Prairies, Building 18
Immunology Research Center
Laval, QC
CANADA H7V 1B7

Mark A. Kay, M.D., Ph.D.
Department of Pediatrics and Genetics
Stanford University School of Medicine
300 Pasteur Drive, Room G305
Stanford, CA 94305
(650) 498-6531
FAX (650) 498-6540

Dear Dr. Alakhov:

Thank you for submitting your manuscript entitled "Inhibition of ICAM-1 Expression in Kidneys using Polyethylcneiminc Grafted with PEG as a Targeting Carrier" (Manuscript #02-214S) to Human Gene Therapy. This will be sent to three reviewers and Dr. James Wilson, the editor-in-charge of your manuscript, will be back in touch with you in the near future.

EUROPEAN EDITOR

Claudio Bordignon, M.D.
Istituto Scientifico H.S. Raffaele
Gene Therapy Program
via Olgettina 60
20132 Milano, Italy
39-02-2643-4667
FAX 39-02-2643-4827
email: hgt@tigem.it

Sincerely yours,

ASSOCIATE EUROPEAN EDITOR

Jean Michel Heard, M.D., Ph.D.
Laboratoire Rétrovirus
et Transfert Génétique
Institut Pasteur
28 rue du Dr. Roux
Paris, 75000 France
33-1-45688246
FAX 33-1-45688940
email: jmheard@pasteur.fr

W. French Anderson

W. French Anderson, M.D.

ASSOCIATE ASIAN PACIFIC EDITOR

Shuichi Kaneko, M.D.
Cancer Gene Regulation
Kanazawa University
Graduate School of Medical Science
Takara-Machi 13-1
Kanazawa 920-8641 Japan
81-76-265-2231
FAX 81-76-234-4250
email: hgt.medf.m.kanazawa-u.ac.jp


Mary Ann Liebert, Inc. publishers

Cet article a dû être retiré en raison de restrictions liées au droit d'auteur.

J Drug Target. 2000;8(2):91-105.

Block and graft copolymers and NanoGel copolymer networks for DNA delivery into cell.

Lemieux P(1), Vinogradov SV, Gebhart CL, Guérin N, Paradis G, Nguyen HK, Ochiatti B, Suzdaltseva YG, Bartakova EV, Bronich TK, St-Pierre Y, Alakhov VY, Kabanov AV.

Author information:

(1)Supratek Pharma Inc, Armand-Frappier Institute, Laval, PQ, Canada.

Self-assembling complexes from nucleic acids and synthetic polymers are evaluated for plasmid and oligonucleotide (oligo) delivery. Polycations having linear, branched, dendritic, block- or graft copolymer architectures are used in these studies. All these molecules bind to nucleic acids due to formation of cooperative systems of salt bonds between the cationic groups of the polycation and phosphate groups of the DNA. To improve solubility of the DNA/polycation complexes, cationic block and graft copolymers containing segments from polycations and non-ionic soluble polymers, for example, poly(ethylene oxide) (PEO) were developed. Binding of these copolymers with short DNA chains, such as oligos, results in formation of species containing hydrophobic sites from neutralized DNA polycation complex and hydrophilic sites from PEO. These species spontaneously associate into polyion complex micelles with a hydrophobic core from neutralized polyions and a hydrophilic shell from PEO. Such complexes are very small (10-40 nm) and stable in solution despite complete neutralization of charge. They reveal significant activity with oligos in vitro and in vivo. Binding of cationic copolymers to plasmid DNA forms larger (70-200 nm) complexes, which are practically inactive in cell transfection studies. It is likely that PEO prevents binding of these complexes with the cell membranes ("stealth effect"). However attaching specific ligands to the PEO-corona can produce complexes, which are both stable in solution and bind to target cells. The most efficient complexes were obtained when PEO in the cationic copolymer was replaced with membrane-active PEO-b-poly(propylene oxide)-b-PEO molecules (Pluronic 123). Such complexes exhibited elevated levels of transgene expression in liver following systemic administration in mice. To increase stability of the complexes, NanoGel carriers were developed that represent small hydrogel particles synthesized by cross-linking of PEI with double end activated PEO using an emulsification/solvent evaporation technique. Oligos are immobilized by mixing with NanoGel suspension, which results in the formation of small particles (80 nm). Oligos incorporated in NanoGel are able to reach targets within the cell and suppress gene expression in a sequence-specific fashion. Further, loaded NanoGel particles cross-polarized monolayers of intestinal cells (Caco-2) suggesting potential usefulness of these systems for oral administration of oligos. In conclusion the approaches using polycations for gene delivery for the design of gene transfer complexes that exhibit a very broad range of physicochemical and biological properties, which is essential for design of a new generation of more effective non-viral gene delivery systems.

PMID: 10852341 [PubMed - indexed for MEDLINE]

ICAM-1 ISOFORMS : SPECIFIC ACTIVITY AND SENSITIVITY TO CLEAVAGE BY LEUKOCYTE ELASTASE AND CATHEPSIN G

Olivier Robledo*, Anne Papaioannou*, Benoit Ochietti*, Claire Beauchemin*, Doris Legault*, André Cantin[†], Philip D. King[‡], Claude Daniel*, Valery Yu Alakhov[‡], Edouard F. Potworowski*, and Yves St-Pierre*

* INRS-Institut Armand-Frappier, Université du Québec, and [†]Supratek Pharma
531 Boul. des-Prairies, Laval, Québec, Canada H7V 1B7

[†] Service de Pneumologie, Département de médecine,
Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Québec, Canada

[‡] T Cell Signal Transduction Laboratory, Hospital for Special Surgery,
Weill Medical College of Cornell University, 535 East 70th Street,
New York, NY 10021, USA.

Address correspondence and reprint requests to:

Dr. Yves St-Pierre
INRS-Institut Armand-Frappier
531 Boul. des-Prairies
Laval, Québec, Canada H7V 1B7
Phone: 514-686-5354
FAX: 514-686-5501
E-mail: yves.st-pierre@inrs-iaf.quebec.ca

Running title: Functional characterization of ICAM-1 isoforms.

Key Words : Adhesion Molecules, Neutrophils, Inflammation, Lung, Proteases

Number of Words: (including spaces): 37 441

Abstract.

The extracellular moiety of ICAM-1 consists of five Ig-like domains, the first and third domains of the molecules mediating adhesion to LFA-1 and MAC-1, respectively. Structural and biochemical analyses have shown that ICAM-1 is expressed as a homodimer at the cell surface. The ICAM-1 gene, however, can give rise to the expression in specific tissues of five alternative splice variants, giving rise to a mixed repertoire of isoforms containing two, three, or four Ig-like domains. We have investigated, in the present work, whether the rearrangement of the architecture of ICAM-1 affect its structural properties and function. We showed that, in contrast to the common form, all alternative isoforms of ICAM-1 were susceptible to cleavage by leukocyte elastase and cathepsin G. The 2-6 splice variant which barely protrudes above the glycocalyx, was highly susceptible to cleavage, establishing that the length of an isoform did not influence the susceptibility to proteolysis. When expressed at the cell surface, all, but one isoform previously shown to be incapable of binding to LFA-1 in its soluble form, had the capacity to act as accessory molecule during presentation of antigenic peptides to T cells. The molecular diversity provided by the skipping of entire Ig domains and the level of expression of the ICAM-1 isoforms on the APC significantly influenced their ability to potentiate the proliferation of T cells. Finally, we found that the expression of minor ICAM-1 isoforms encoding the third Ig-like domains was sufficient to sustain neutrophil infiltration in the liver and to confer exon-5-targeted ICAM-1-deficient mice susceptibility to LPS-induced septic shock. Together, our findings not only demonstrate that ICAM-1 isoforms are fully functional, but also support

the concept that alternative RNA splicing in the Ig superfamily may fulfill distinct roles during the development of the immune response.

Introduction.

Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) is a membrane glycoprotein of the immunoglobulin superfamily consisting of five extracellular Ig-like domains, a transmembrane domain, and a short cytoplasmic tail (1). ICAM-1 is constitutively expressed on leukocytes, endothelial, epithelial, and fibroblastic cells (2). ICAM-1 plays an important role in inflammatory process and immune responses. It functions as a major costimulatory molecule during antigen presentation to T cells, most notably in the context of antigenic peptides complexed to MHC class II molecules (3-6). Endothelial ICAM-1 promotes firm adhesion of leukocytes to vascular endothelium, allowing their migration to sites of inflammation (7).

The *icam-1* gene is composed of seven exons. Exon 1 encodes the signal sequence, exons 2 to 6 encode the Ig-like domains 1 to 5, respectively, and exon 7 encodes the transmembrane domain and the cytoplasmic tail (8, 9). The common form of ICAM-1 contains five extracellular Ig-like domains, a hydrophobic domain, and a short cytoplasmic domain (10). Each extracellular domain is encoded by a separate exon. The first and third Ig-like domains are responsible for binding to LFA-1 and Mac-1 respectively, both members of the $\beta 2$ family of leukocyte integrins (11, 12). On the surface, ICAM-1 has been shown to exist as a non-covalently-linked dimer and larger multimer (13, 14). Structural analyses of ICAM-1 by crystallography (15), electron microscopy (16, 17), and antibody binding (13, 14) suggest that specific structural features of the five Ig-like domains of ICAM-1, such as a D3-D4 bend, a specific D1 to

D2 orientation, which favors a hydrophobic dimerization interface in the first domain opposite of the ligand-binding site, and the implication of D5 and perhaps transmembrane domain (13, 14), results in the formation of a closed ring-like dimeric structure (18). The ability of the five-domain form of ICAM-1 to dimerize enhances its LFA-1 binding activity. Although ICAM-1 monomers are fully competent to bind LFA-1, it is likely that dimerization serves to properly orientate ICAM-1 and present it for binding to LFA-1 (19).

Generation of ICAM-1-deficient mouse models by genetic engineering, targeting either exon 4 or 5 (20, 21), which encode the third and fourth Ig-like extracellular domains respectively, led to the unexpected discovery of the existence of alternative isoforms of ICAM-1 generated by alternative splicing of exons encoding complete extracellular Ig domains (22). Thus, in addition to the mRNA encoding the “common form” of ICAM-1, which contains five Ig-like domains, mRNAs encoding five alternative isoforms have been cloned and characterized at the nucleotide level. All isoforms contain the first and fifth (membrane-proximal) extracellular Ig-like domains, but each contains a distinct repertoire of Ig-like domains. Several of the isoforms do not contain the D3-D4 junction. The length of the isoforms varies, the shortest of the isoforms expressing only domains 1 and 5. Although all the alternative ICAM-1 isoforms, except for the exon 2-5 isoform, have been shown to retain the ability to bind LFA-1 in their soluble form (22), the impact of such molecular diversity on the ability of ICAM-1 to bind LFA-1 when expressed at the cell surface remains, however, unknown. A similar diversity in structure and function, has also been observed in other adhesion molecules of the Ig superfamily of the adhesion molecules such as VCAM-1 and CD31

(23, 24). These receptors, just like ICAM-1 and its isoforms, have been shown to exist in a soluble form in circulation (25), although the proteases that are responsible for their cleavage remain poorly characterized. How the rearrangement of the architecture of cell adhesion molecules affects their susceptibility to proteolysis or their functions also remains unknown.

In the present work, we have characterized the functional properties of ICAM-1 isoforms when expressed at the cell surface. First, we first report that ICAM-1 isoforms are functional when expressed at the surface of antigen presenting cells. We found that the common form and, and to a lesser extent, the 2-4 isoform, which both contain the D3 and D4 domains previously shown to produce an almost 90-degree angle bend, were the most efficient in T cell activation. Secondly, we show that all alternative isoforms of ICAM-1 were much more susceptible to cleavage by leukocyte elastase and cathepsin G than the common form of ICAM-1. Even the 2-6 splice variant, which barely protrudes above the glycocalyx, was found to be highly susceptible to cleavage, suggesting that the juxtaposition of the domains rather than the length of a molecule, is a predominant factor in conferring Ig-like molecules susceptibility to proteolysis. Finally, we provide evidence that ICAM-1-isoforms are functional in vivo as the repertoire of minor isoforms expressed in exon-V-targeted ICAM-1-deficient mice was sufficient to support neutrophil infiltration in the liver and confer to these mice susceptibility to LPS-induced septic shock. At the level of the ICAM-1 mRNA, these results provide unique information as to the structure-function properties to ICAM-1 isoforms, suggesting that the complex pattern of splicing events observed within members of the family of adhesion molecules may act as a versatile mechanism to modulate intercellular adhesion.

Material and Methods.

Mice.

The 2.102 TCR-transgenic mouse (2.102tg) was generated and bred to RAG1-deficient mice as reported elsewhere (26). Colonies of the C57BL/6-ICAM-1-deficient mouse strains (C57BL/6^{tm1jcg} and C57BL/6^{tm1Bay}) carrying a deletional mutation in the fourth and fifth exons of the ICAM-1 gene respectively (20, 21) were bred in our animal facility. These mice do not express the common form of ICAM-1 but do express a limited repertoire of minor isoforms generated by alternative splicing. Breeding pairs were obtained from Jackson Laboratories (Bar Harbor, MA) and were age- and sex-matched with their wild type controls.. All mice used in this study were bred and housed in the pathogen-free animal facility in accordance with the guidelines of the Ethical Committee of the INRS-Institut Armand-Frappier.

Reagents and Abs

The Hb(64-76) peptide (amino acid sequence: GKKVITAFNEGLK) used in this study was synthesized and purified as previously described (27). Human leukocyte elastase (LE; E.C. 3.4.21.37) and neutrophil cathepsin G (E.C. 3.4.21.20) were obtained from Calbiochem (La Jolla, CA). Sputum samples of patients with cystic fibrosis containing high levels of human LE were also used as a source of human LE for some experiments. The samples were prepared as previously described (28). The LE-specific peptide inhibitor N-methoxysuccinyl-Ala-Ala-Pro-Val-chloromethyl ketone (MSAAPVCK) was

obtained from Sigma (St. Louis, MO). Purified human sICAM-1 was obtained from R&D Systems (Minneapolis, MN). The biotinylated anti-Ly6G (Gr-1), anti-CD4, and the phycoerythrin (PE)-conjugated 3E2 mAbs were purchased from BD-Pharmingen (San Diego, CA). The mouse G-5 anti-ICAM-1 mAb was obtained from Santa Cruz (Santa Cruz Biotechnology, CA). The human IgG was purchased from Cappel Research Reagents (ICN Biomedicals). The 14-4-4s mAb, specific for I-E^k α -chain, was obtained from the American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD) and purified from hybridoma culture supernatants by chromatography on protein G-Sepharose (Pharmacia Fine Chemicals, Piscataway, NJ) using standard protocols. The phycoerythrin- and peroxidase-conjugated streptavidin complexes were purchased from Immunotech (Westbrook, ME) and Roche (Laval, QC) receptively.

Cell lines.

The RT-4 was obtained from Dr. Ronald N. Germain (National Health Institute, Bethesda). The IKM-9 cell line, a stable transfectant of RT4 expressing the common form of ICAM-1, was kindly provided by Dr. Tania H. Watts (University of Toronto). The Hi-7 transfectants expressing the I-E^k class II molecules were obtained from Dr. Paul Allen (U. of Washington, St. Louis, MO). Both fibroblastic cell lines were grown as adherent monolayers 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) and passaged using 0.005% trypsin and 0.5 mM EDTA.

Generation of transfectants expressing each ICAM-1 isoform.

To generate stable transfectants, cDNA encoding the common form of ICAM-1 and the alternative isoforms (22) were subcloned in the S α /puro vector (kindly provided by Dr. François Denis, INRS-Institut Armand-Frappier), and transfected using lipofectamine according to instructions supplied by the manufacturer (Life Technologies). Integrity of cDNA inserts was confirmed by DNA sequencing. Stable transfectants were selected in complete RPMI with 10 % FCS and 10 μ g/ml of puromycin (Sigma), cloned by limiting dilutions, and characterized for their expression of ICAM-1 by flow cytometry using ICAM-1-specific 3E2 mAb.

Flow cytometric analysis.

Transfected cells expressing each ICAM-1 isoform were incubated with PE-conjugated 3E2 and/or biotinylated 14-4-4s mAbs for 20 mn at 4°C. Cells incubated with 14-4-4s mAb were then washed twice in staining buffer (PBA; PBS supplemented with 3% BSA and 0.01% sodium azide) and stained with SA-PE for 20 min at 4°C. All cells were then washed twice in staining buffer, resuspended in PBS containing 1% paraformaldehyde, and analyzed. Controls included cells transfected with the empty vector, cells without antibodies or with control antibodies, as well as cells incubated with SA-PE alone. Samples were kept at 4°C in the dark and analyzed using a Coulter XL-MCL flow cytometer (Coulter Electronics, Hialeah, FL).

Purification of CD4+.

To isolate CD4+ T cells from the spleen of 2.102tg mice, single cell suspensions were made, and CD4+ T lymphocytes were magnetically separated using a ferritin-conjugated anti-CD4 mAb according to instructions supplied by the manufacturer (Miltenyi Biotech, Auburn, CA). Cells not expressing CD4 were washed through with excess buffer, and cells retained within the column were eluted with buffer after removal of the column, washed, and resuspended in complete RPMI medium at a concentration of 2×10^6 cells/ml. Cells isolated in this manner were >95-98% CD4+ as determined by flow cytometric analysis.

Antigen presentation assay.

CD4⁺ splenic T cells from 2.102tg mice (10^5 cells per well) were incubated at 37°C with 1.5×10^4 irradiated Hi-7 transfectants, which were preloaded for 4 h with the indicated doses of peptide or antibodies in complete RPMI 1640 medium. After 72 h of incubation, 1 μ Ci per well of 3H-TdR (ICN Biomedicals) were added, and after an additional 18 h of culture at 37°C, the cells were harvested and the incorporated radioactivity was measured.

Cleavage of ICAM-1 by proteases or sputum samples.

Cells (5×10^5) were seeded in 96-well plates and incubated overnight at 37°C. Monolayers of cells were washed three times in serum-free RPMI. Proteases or sputum samples were then added to obtain the indicated final concentrations, and the cells incubated at 37°C for the indicated times. In experiments with protease inhibitors, sputum samples were incubated for 10 min at 37°C with LE-specific MSAAPVCK inhibitor (10 μ g/ml) before being added to cells. After incubation, enzymatic reaction was stopped by washing cells with RPMI medium containing 10% FCS. Cell surface expression of ICAM-1 was measured by flow-cytometric analysis as described above. Cleavage of ICAM-1 was measured in percentage by comparing the mean fluorescent intensity (MFI) of 5 000 HLE-treated cells with that of untreated cells ($(MFI_{\text{untreated}} - MFI_{\text{treated}})/MFI_{\text{untreated}} \times 100$). In some experiments, the supernatants were harvested, clarified by centrifugation, and kept at -70°C for ELISA testing of sICAM-1.

sICAM-1 enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

ELISA were performed on cell-free supernatants obtained from transfectants treated with proteases for the indicated times. The assays were carried out according to the manufacturers' instructions (Endogen, Boston, MA).

Analysis of proteolytic cleavage of sICAM-1

Purified human sICAM-1 (300 ng) was incubated at 37°C for the indicated times with HLE (1.5µg/ml) and cathepsin G (33mU./ml) in serum-free RPMI medium. Proteolysis of ICAM-1 was visualized by SDS-PAGE (12%). Proteins were electrophoretically transferred to nitrocellulose, blocked with a 6% BSA solution, and incubated for 2h at room temperature with the rabbit polyclonal IgG antibody specific for domain 1 of ICAM-1 (H-108; Santa Cruz). Binding of the primary antibody was detected using a horseradish peroxidase-conjugated goat anti-rabbit antiserum (ICN) and enhanced chemiluminescence on X-ray film.

Re-expression of ICAM-1 following HLE treatment.

RT-4 cells expressing the common form and the 3-6 isoform of ICAM-1 cells were seeded into six-well plates (5×10^5 /well) in serum-free medium and treated with the indicated concentrations of HLE for 2 h at 37 °C. The reaction was stopped by adding complete RPMI medium containing 10% FCS. Cells were then harvested by mild trypsin-treatment and seeded into 24 well dishes. After 4 h of culture, re-expression of ICAM-1 was measured by flow cytometry, comparing the mean fluorescent intensity (MFI) of 5,000 HLE-treated cells with that of untreated cells $(MFI_{untreated} - MFI_{treated}/MFI_{untreated}) \times 100$.

Septic shock

LPS from *Escherichia coli* serotype 0127:B7 was purchased from Sigma Chemical Co. Age- and sex-matched mice were injected intraperitoneally with 50 mg/kg LPS at day 0 and monitored for clinical signs of morbidity and survival at least twice daily for 7 days. Experiments were terminated on day 7, as required by the guidelines for animal experimentation.

Immunohistochemistry

Animals were killed by CO₂ asphyxiation, organs were immediately removed, frozen in dry ice, and stored at -70°C. Frozen sections were prepared according to standard procedures and stained with the biotinylated RB6-8C5 antibody, which reacts with Ly-6G, an antigen specifically expressed on the neutrophils in the periphery. The sections were then washed, and stained with streptavidin-peroxydase complexes using an aminoethyl carbazol substrate kit (Zymed Laboratories, San Francisco, CA) according to the manufacturer's instructions. The sections were counterstained with hematoxylin.

Results

Stable expression of the different isoforms of ICAM-1

In a previous study, we have shown that the common form of the membrane-bound ICAM-1 is susceptible to cleavage by human-leukocyte elastase (HLE) (28). To compare the susceptibility of the ICAM-1 isoforms to cleavage with that of the common form, we

transfected RT-4 fibroblasts with plasmids encoding each of the isoforms, including the common form of ICAM-1, and generated a series of stable transfectants. The structure of the five alternative isoforms: the 4-6 isoform (containing D1, D2, D3, and D5); 3-6 (D1, D2, and D5), 2-4 (D1, D3, D4, and D5); 2-5 (D1, D4, and D5), and the shortest isoform 2-6, which contains only domains D1 and D5 is shown (Figure 1). We tested their susceptibility to proteolysis by incubating the transfectants in serum-free RPMI medium with 5 µg/ml of recombinant HLE for the indicated times. Our results showed that although all alternative isoforms were sensitive to proteolysis by HLE, the 2-4 isoform, and to a lesser extent the 2-5 isoform, were the most susceptible to proteolysis by HLE (Figure 2A). In contrast, the common form of ICAM-1 was undoubtedly the most resistant. While most isoforms were cleaved by up to 75% after 2 h, the wild type was not cleaved by more than 15%. In fact, after only 15 minutes of HLE treatment, it was possible to detect cleavage in the majority of clones expressing the alternative isoforms while no detectable cleavage was observed in the case of clones expressing the common form of ICAM-1. A similar pattern of susceptibility was observed among the isoforms when cells were treated with increasing concentrations of HLE for one hour (Figure 2B). To rule out the possibility that the difference in susceptibility of cleavage between the wild-type ICAM-1 and its isoforms was due to the turnover/recycling rates of the ICAM-1 molecules, RT-4 cells expressing the common form of ICAM-1 and the susceptible 3-6 isoforms were treated with HLE, and tested for the re-expression of ICAM-1 at its surface after 4 h of culture at 37°C after removal of HLE from culture medium. We found that turnover/recycling rates of the common form was actually slower than that of the 3-6 isoform (Figure 2C).

Since not all the clones expressed similar levels of ICAM-1 at their surface, we next tested whether the density of ICAM-1 at cell surface could dictate the susceptibility to HLE. To test this possibility, we measured the cleavage of ICAM-1 isoforms by HLE using another series of transfectants. For this purpose, Hi-7 fibroblasts were transfected and stable transfectants and again stable transfectants expressing alternative isoforms of ICAM-1 at levels of expression that differed from those found on the surface of RT-4 transfectants were tested (Figure 3). We further compared the susceptibility to cleavage of two Hi-7 stable clones expressing different levels of each isoform. The clones were incubated with different doses of HLE (one, five, and 10 $\mu\text{g/ml}$) for one hour at 37°C, and the percentage of cleavage measured. We found that the level of expression of surface ICAM-1 did not influence the susceptibility of the isoforms to HLE. In fact, the most sensitive isoforms were 2-4 and 2-5, while the common form of ICAM-1 was again the most resistant to proteolytic cleavage.

Cleavage of ICAM-1 isoforms by sputum of CF patients

The sputum of CF patients contains high levels of HLE. Indeed, in a previous study, we demonstrated that such fluid samples contained a sufficient concentration of proteases to cleave the common form of ICAM-1 on the cell surface (28). Using an HLE-specific peptide inhibitor, MSAAPVCK, we further showed that this degradation was HLE-specific. Moreover, we found that the degree of proteolysis of ICAM-1 by HLE in the sputum of CF patients correlated closely with the severity of the disease. We thus tested the pattern of susceptibility of alternative isoforms using natural HLE from sputum of CF patients. Using a pool of sputum of CF patients, we first carried out a preliminary study

using the 4-6 transfectant with different dilutions of the sputum. We detected a dose-dependent cleavage of the 4-6 isoform following incubation in serum-free medium. We confirmed that this reduction of ICAM-1 expression was due to HLE using the HLE-specific blocking peptide (Figure 4A). A kinetic analysis using a 1/10 dilution of the sputum was then carried out on each RT-4 clone. We found that the cleavage of all ICAM-1 isoforms by the sputum was time-dependent and showed a similar pattern of susceptibility to that observed in experiments using recombinant HLE (Figure 4B). In all cases, the cleavage obtained using the sputum was mediated mostly by natural HLE, as shown by the ability of the HLE-blocking peptide to prevent cleavage (Figure 4C).

Identification of Cathepsin G as a novel protease that cleaves ICAM-1

Although the HLE-specific MSAAPVCK inhibitor abolished most of the cleavage, we consistently observed a residual MSAAPVCK-resistant cleavage of ICAM-1 in the sputum; but neither E64 (a cysteine protease inhibitor), nor pepstatin (an aspartate protease inhibitor) could inhibit the cleavage of ICAM-1 by the sputum (data not shown). Since cathepsin G had been identified in the sputum of CF patients (29, 30), we investigated whether this protease could also cleave ICAM-1 isoforms. Preliminary experiments with transfectants expressing the common form and the 2-4 isoform of ICAM-1 were thus carried out to determine the optimal incubation time and cathepsin G concentrations that could be used to compare the relative susceptibility of the isoforms to this protease. Our results showed that cathepsin G could efficiently cleave the 2-4 isoform in a time-dependent manner, as cleavage of this isoform was detectable within 30 minutes at a dose of 16.5 mU/ml (Figure 5A). The cleavage by cathepsin G was also

dose-dependent, as 84% of the 2-4 isoform could be cleaved using a higher dose of the protease (Figure 5B). When we tested the ability of cathepsin G to cleave all forms of ICAM-1, we found that the common form of ICAM-1 was resistant to cleavage by cathepsin G (Figure 5C), as was the case with HLE. In contrast, all alternative isoforms were sensitive to proteolysis by cathepsin G, although the pattern of susceptibility was somewhat different than that observed with HLE. Indeed, we consistently observed that the 2-4, 2-5 and 2-6 isoforms were more sensitive than the 4-6 and 3-6.

Cleavage of ICAM-1 by HLE and cathepsin G generates soluble forms of ICAM-1

Shedding by proteolysis of the membrane-bound form of ICAM-1 has been shown to be responsible for the release of soluble forms of ICAM-1 in the blood circulation (31, 32). In ICAM-1 in exon-4-targeted mutant mice, the most abundant circulating form of sICAM-1 is constituted of the 2-5 splice variant (33). This would suggest that this isoform is more sensitive to proteolysis while the other isoforms that could potentially be generated in these mutant mice, such as the 3-6 isoform, are likely to be resistant. The above results clearly argue against the first possibility. Alternatively, it is possible that other isoforms in these mice are not detectable by ELISA techniques, which may use antibodies specific for domains that have been alternatively skipped during alternative splicing of entire Ig-like domain(s). It is possible that cleavage of the 2-6 and 3-6 isoforms occurs, but that standard ELISA testing cannot detect it. To clarify this issue, we used some of our transfectants and tested the release of soluble forms of ICAM-1 following treatment with HLE and cathepsin G. Our results showed that soluble forms of the 4-6, 3-6, 2-5 isoforms, and that of the common form, were all detected by ELISA

(Figure 6). Interestingly, lower, but detectable levels of soluble forms of all ICAM-1 isoforms tested, including the common form, were also detected in supernatant of cells incubated in absence of proteases, suggesting that endogenous cleavage secreted proteases can also occur.

Biochemical analysis of ICAM-1 cleavage by cathepsin G and HLE

LE and cathepsin G have previously been reported to cleave, with distinctive capacity, other cell surface receptor of the Ig superfamily such as CD2, CD4, and CD8 (34). The question arose therefore whether both enzymes cleaved ICAM-1 using the same target site(s). To address this question, we compared the proteolytic fragments generated after cleavage by both enzymes using electrophoresis and Western blotting with a domain 1-specific antibody. We found that although both enzymes are known to have a distinct repertoire of physiological substrates, they generated a similar pattern of proteolytic ICAM-1 fragments, suggesting that they have common cleavage sites on ICAM-1 (Figure 7). Both enzymes were able to degrade ICAM-1 in small fragments of approximately 60 and 25-30 kDa. The presence of multiple bands located at approximately 25-30 kDa likely reflects the existence of proximal cleavage sites, or differences in the glycosylation status of ICAM-1.

Do ICAM-1-isoforms act as accessory molecules during antigen presentation ?

The molecular diversity at the mRNA level which generates ICAM-1 variants, also has considerable impact on the structure of ICAM-1, most notably on its quaternary structure, i.e. its ability to properly orientate itself and bind to LFA-1, a key molecule in

antigen presentation. To address the functional capacity of ICAM-1 isoforms, we used the Hi-7 transfectants expressing the common form of ICAM-1 and its isoforms as well as I-E^K and tested the ability of isoforms to act as accessory molecules during antigen presentation using Hb(64-76)-specific, I-E^k-restricted, LFA-1-expressing CD4⁺ T lymphocytes isolated from the spleen of 2.102tg transgenic mice (26). The presentation of the HB(64-76) peptide to 2.201tg T cells is ICAM-1-dependent, as shown by the ability of the common form of ICAM-1 to potentiate the proliferation of T cells in response to the antigenic peptide when expressed at the surface of the Hi-7 cells (Figure 8). Analysis of the cell surface expression of MHC class II type I-E^K showed that our clones expressed similar levels of this molecule. For each isoform, we chose a clone expressing a similar level of ICAM-1, and another clone expressing a higher level (except for 2-5 isoform which has previously shown to be incapable of binding to LFA-1 in its chimeric form) (22). To compare the ability of ICAM-1 isoforms to induce CD4⁺ proliferation, Hb(64-76) peptide was added at two concentrations in T cell-APC co-cultures. We found a variability in the efficiency of the different ICAM-1 isoforms in presentation of Hb(64-76) peptide to naïve CD4⁺ (Figure 9) In comparison with transfectants expressing type I-E^K without ICAM-1, none of the isoforms was more efficient than the common form of ICAM-1 to act as accessory molecules. All, but the 2-5 isoform, could increase the ability of CD4-positive T cells to proliferate in response to antigenic peptides. The 2-4 isoform was the most efficient isoforms in its ability to act as an accessory molecule, despite the fact the transfectants used expressed relatively low levels of the isoforms at its surface. Interestingly, this isoform is the only one that has an intact D3-D4 domain junction. The 4-6 isoforms, which contains four Ig-like domains

but lacks the D3-D4 junction, showed limited ability to act in antigen presentation. It is noteworthy that shorter isoforms were functional if they were expressed at very high levels on the cell surface. This was particularly well illustrated in the case of the shortest form of ICAM-1, the 2-6 isoform which contain only two Ig-like domains.

Are ICAM-1-isoforms functional in vivo ?

To determine whether isoforms are functional *in vivo*, we took advantage of the previous observation that exon-4-targeted ICAM-1-deficient mice are resistant to LPS-induced septic shock (20). We also took into consideration that exon 5-targeted ICAM-1-deficient mice express a residual level of a repertoire of putative Mac-1-binding ICAM-1-isoforms (22), which should render them as sensitive to LPS-induced septic shock as normal mice, since Mac-1-expressing neutrophils could bind to these isoforms and invade the liver of these mice. Groups of C57BL/6, C57BL/6^{Tm1Bay} and C57BL/6^{Tm1jegr} mice were injected i.p. with lethal dose of LPS and the mortality rate was assessed. Our results showed that the majority of C57BL/6^{Tm1Bay} (10/13) and most of normal C57BL/6 (7/14) mice died of septic shock within 48 hours of injection. As expected (20), C57BL/6^{Tm1jegr} mice survived to the LPS injection (0/12) although they showed symptoms of endotoxin shock such as shivering and lethargy. Staining of liver sections with a mAb to Ly-6G (Gr-1), a neutrophil marker, showed massive neutrophil invasion in normal and C57BL/6^{Tm1Bay} mice (Such recruitment of neutrophils was not observed in the liver of LPS-injected C57BL/6^{Tm1jegr} mice Figure 10). These results show that the repertoire of isoforms expressed in the liver of C57BL/6^{Tm1Bay} mice can sustain neutrophil infiltration and sufficient to confer susceptibility to septic shock.

Discussion

In the present work, we report that alternative spliced forms of ICAM-1 have distinctive functional features; they are more susceptible to proteolytic cleavage than the common form containing the five Ig-like domains; the expression of minor ICAM-1 isoforms encoding the third Ig-like domains can support neutrophil infiltration in the liver and are sufficient to confer susceptibility to LPS-induced septic shock; each isoform has a distinct capacity to act as accessory molecule during presentation of antigenic peptides to T cells.

Using transfectants expressing different levels of each of the isoforms, we further established that: 1) cleavage of ICAM-1 molecules was independent of their density at the cell surface and of the number of Ig-like domains, 2) ICAM-1 molecules show a similar pattern of susceptibility to both LE and cathepsin G, two major proteases found in neutrophils and sputum samples of CF patients, and 3) release of soluble forms of ICAM-1 from the membrane likely occurs via cleavage near the membrane-proximal domains of ICAM-1, as indicated by biochemical analysis and ELISA. These results indicate that alternative isoforms of ICAM-1 are physiologically distinct from the common form of ICAM-1, and that their high susceptibility to proteolysis may represent a new mechanism to rapidly and efficiently regulate the level of cell surface expression of ICAM-1 and LFA-1-mediated adhesion.

Our findings demonstrate that cleavage of membrane-bound ICAM-1 isoforms is not dependent on the presence of specific Ig-like domains. In contrast to what could have been expected, the length of the molecules does not influence their susceptibility to cleavage. Indeed, the shortest of the alternative isoforms, the 2-6 splice variant, which contains only two Ig domains that barely protrude above the glycocalyx, is highly sensitive to proteolysis. In fact, it is the longest of the ICAM-1 molecules, the common form, which is the most resistant to proteolysis. This leads to the hypothesis that the relative susceptibility of the different forms of ICAM-1 to proteolysis is dictated at least in part by their ability to dimerize or to form larger multimeric complexes. Indeed, the structural analysis of ICAM-1 suggested that formation of closed ring-like structure of ICAM-1 requires specific structural features, such as a D3-D4 bend and a specific D1 to D2 orientation that might be difficult to achieve by the deletion of D2, D3, and/or D4. Thus, the fact that the common form of ICAM-1 is cleaved by proteases might be explained by the fact that only a fraction of the common form of ICAM-1 is found as a dimer at the cell surface (11, 12). Alternatively, if dimerization requires only the D5, transmembrane and cytoplasmic domains, as recently suggested by Jun *et al.*, (19), the resistance of the common form would be consistent with its unique capacity to form a closed, ring-like structure. Conversion to an “opened”, “w-shaped” structure, following interaction with another ICAM-1 dimer, together with some hinge-like motions between domains 1 and 5, would then allow exposure of putative protease cleavage sites. Questions of the physiological relevance of ICAM-1 dimers have been raised by the recent indications that dimerization of ICAM-1, in contrast to what would have been expected from its capacity to present two LFA-1 binding sites, does not enhance

adhesiveness (35). Although alternative roles for dimerization of ICAM-1 most likely include its ability to properly present the binding epitope to LFA-1, we propose that the existence in ICAM-1 of such ring-like dimers may be used to protect ICAM-1-mediated cell-cell interactions from proteolysis during cell trafficking. Alternatively, rapid removal of ICAM-1 isoforms from the surface of antigen-presenting cells by proteolysis could be used as a means to modify the type of cytokines produced during T cell responses (36).

Since ICAM-1 molecules contain the first and fifth Ig-like domains while maintaining the structural integrity of the first domain, it is likely that the cleavage site is located near the membrane proximal domain of the molecules. Indeed, this view is supported by biochemical characteristics of the soluble forms of ICAM-1 previously found in serum of humans or animal models, as well as the ability of antibodies to bind to all domains of the soluble form of ICAM-1, (37). We found, however, that both LE and cathepsin G can further cleave ICAM-1 in smaller fragments of approximately 60 kDa and 25 kDa, both of which contain the first Ig-like domain. This is consistent with the previous observations that ELISA using antibodies specific for this domain detected higher levels of soluble forms than those using antibodies directed against domains 2 or 5 (37). Detected levels of the circulating forms of ICAM-1, which still retain a certain potential to bind to LFA-1, could thus be underestimated depending on the epitope of antibodies used for ELISA. In fact, assuming that alternative isoforms are expressed in a tissue-specific pattern, it will be important to develop new specific ELISAs to determine whether release of alternative isoforms in the circulation can be used as a rapid and

simple marker for injury in tissues expressing particular isoforms of ICAM-1 upon the release of proteases, most notably during neutrophil-mediated inflammatory processes. In some samples, however, such as sputum of CF patients, concentrations of proteases might be too high to measure any detectable levels of structurally-conserved soluble forms of ICAM-1 (28). One must, thus, exercise care in the use of ELISA for the quantitative measurements of soluble isoforms in biological samples as this approach is dependent on the proper recognition of specific epitopes, which would be severely compromised here by the facts that : 1) isoforms of ICAM-1 are generated from alternative splicing (thus containing between 2 and 5 Ig-like domains), 2) isoforms can theoretically be found in monomeric or multimeric forms in the supernatant; and 3) the Ig-like domains can form distinct inter-domains junctions, again affecting epitope recognition. In our study, we have solely used this assay to establish whether specific isoforms released upon cleavage by proteases can be detected by this assay.

The recent study by van Den Engel et al (33) has shown that the 2-5 splice variant is the predominant alternative soluble isoform found in the serum of exon-4-deficient mice. The authors suggested that the absence of the other soluble forms of splice variants could be due to their resistance to proteolytic cleavage, and that the protease responsible for cleavage has an Ig-domain specificity. Our results, however, clearly show that all alternative isoforms of ICAM-1 are susceptible to proteolytic cleavage. We propose rather that the dominance of an alternative isoform in the serum of mutant mice is most likely due to the level of expression of specific splice variants in specific tissues where cleavage occurs, which in turn likely depends on the physiological situation and the

disease condition, as the repertoire of isoforms is likely to be restricted to specific cell types, which is consistent with the idea that they have distinct biological functions (22). Indeed, the fact that some of these isoforms have spliced out their Mac-1-binding domains, and that they have increased susceptibility to proteolytic cleavage clearly distinguishes the alternative isoforms from the common form of ICAM-1. In the case of normal mice, the dominance of the common form of ICAM-1 in the serum is possibly due to the combined facts that the constitutive levels of expression of the isoforms are low and the absence of inflammatory disorders causing the release of leukocyte proteases. Studies on the mechanisms regulating the expressions of isoforms during inflammatory processes are required to clarify this issue.

It has been well established that secretion of extracellular proteases plays a key role in immune lung disorders by altering the host's immune response against opportunistic infectious agents (38). In cystic fibrosis, for instance, killing of opportunistic pathogens such as *Pseudomonas aeruginosa* is ineffective because high concentration of neutrophil-derived elastase is released in the extracellular space, thereby reducing phagocytosis of pathogens. We have also recently shown that virus infection of the lungs can lead to a transient increase in proteolytic activity that favors the establishment of opportunistic infections (39). Indeed, excess production of proteases can modulate the local immune response by cleaving a relatively large repertoire of molecules implicated in the development of the immune response, including ICAM-1 (28, 34, 40). Our present work suggests that the common form of ICAM-1 is expressed as a relatively protease-resistant multimeric complex capable of mediating stable cell-cell interaction in a protease-rich

environment while cell-cell interactions implicating minor isoforms would be highly unstable and of short duration in such environment. Furthermore, we have now identified two proteases which can cleave ICAM-1. Both enzymes show very distinct susceptibility to protease inhibitors. While LE is inhibited by the alpha-1 protease inhibitor, alpha2-macroglobulin, as well as smaller inhibitors such as elafin and secretory leukoprotease inhibitor, cathepsin G is mostly inhibited by alpha1-antichymotrypsin, a major acute phase reactant which is upregulated during inflammatory episodes to compensate for the excess of enzymes released from activated neutrophils (41). Thus, depending of the physiological situation, cathepsin G could represent a new alternative pathway that modulates the expression of ICAM-1 on the cell surface.

Our results showed that, apart the common form of ICAM-1, other isoforms were also capable of acting as accessory molecules in antigen presentation. The exception was the 2-5 isoform, consistent with the previous observation that this isoform does not bind LFA-1 (22). Among the transfectants, the 2-4 isoform was the most potent if we take into consideration that the level of expression required to fulfill its accessory function was the closest to that of the common form. Interestingly, the 2-4 isoform is the only one that has conserved the D3-D4 junction, previously shown to confer the common form with the ability to «bend» and properly orientate its LFA-1 binding site, in contrast with the other isoforms, which have a more rigid conformation and point directly away from the surface of the cell. This leads to the hypothesis that the relative efficiency of the different isoforms in T cells activation might be dictated at least in part by their ability to dimerize or to form larger multimeric complexes. The 4-6 isoform, which is very efficient

in binding LFA-1 (22) in its chimeric form, showed very limited efficiency in its ability to activate T cells when expressed at the surface of APC. A second useful observation was that the 2-6 isoform could still potentiate antigen presentation in spite its short structure. Using a clone expressing very high levels of this short isoform, we were able to establish that a short version of ICAM-1 containing only two Ig-like domain, thus without the capacity to bend or to protrude above the glycocalyx can be a very potent accessory molecule during antigen presentation, provided its expression level was very high. This observation is not only relevant in the context of ICAM-1 isoform, but also in the context of other Ig-like adhesion molecules expressed on APC, such as ICAM-2. ICAM-2 also binds LFA-1 through its first Ig-like domain, is constitutively expressed at high levels on APC, and contains, just like the 2-6 ICAM-1-isoform, only two Ig-like domain

Our results also demonstrated that, in contrast to JCGR mice, Tm1Bay mice displayed no resistance to septic shock. The susceptibility of Tm1Bay mice to endotoxin septic shock suggests an implication of ICAM-1 isoforms in the lethal effect of LPS. The remarkable resistance of the exon-4-deficient mice to septic shock induced by LPS has been attributed to the incapacity of neutrophil to bind vascular endothelium and infiltrate liver parenchyma (20). Indeed, our data showing massive infiltration of PMN in liver of Baylor but not JCGR, is consistent with the view that recruitment of neutrophils by ICAM-1 isoforms is sufficient to render these mice susceptible to septic shock. The ICAM-1 isoform 2-6 is capable of binding to LFA-1 but not MAC-1 because the third Ig-like domain has been alternatively spliced. The isoform 4-6 contains both the D1 and the

D3 domains and can, in contrast to 2-6 isoform, binds both LFA-1 and MAC-1. Isoform 2-6, including the isoforms 3-6 and 2-5, lost their ability to bind to MAC-1 by the deletion of the domain 3 portion of ICAM-1. Theoretically, the 2-6 and the 3-6 isoforms present in the exon-V mutant mice can also be expressed in the septic shock resistant Exon-IV mutant mice, suggesting that susceptibility to septic shock would be conferred by the presence of the 4-6 isoform. Using RT-PCR techniques, we have indeed detected at least 2 isoforms, 2-6 and 4-6 in the liver of Tm1Bay mice following LPS injection (data not shown). This possibility, supported by the previous observation that the 4-6 isoform is the dominant form expressed in most tissues (22), firmly establishes its functional capacity to support neutrophil invasion *in vivo*.

Together, our findings demonstrate that ICAM-1 isoforms are fully functional and support the concept that alternative RNA splicing in the Ig superfamily may fulfill specific roles related, for example, to their different ability to modulate T cells activation following antigen presentation, or to display a distinct susceptibility to neutrophil proteases that would directly affect their half-life on the cell-surface of an APC or on the vascular endothelium. while increasing the release of soluble forms in the blood circulation. Defining more precisely the mechanisms that regulate the expression and tissue distribution of the isoforms of ICAM-1 and other adhesion molecules should help to better understand the role of these splice variants during the development of the immune response.

Acknowledgments

This work was supported by a grant from the Canadian Institute for Health Research (Y.S.P. and E.F.P.). Y.S.P is a scholar of the Fonds de la Recherche en Santé du Québec.

References

1. Simmons, D., M. W. Makgoba, and B. Seed. 1988. ICAM, an adhesion ligand of LFA-1, is homologous to the neural cell adhesion molecule NCAM. *Nature* 331:624.
2. Dustin, M. L., R. Rothlein, A. K. Bhan, C. A. Dinarello, and T. A. Springer. 1986. Induction by IL 1 and interferon-gamma: tissue distribution, biochemistry, and function of a natural adherence molecule (ICAM-1). *J. Immunol.* 137:245.
3. Siu, G., S. M. Hedrick, and A. A. Brian. 1989. Isolation of the murine intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) gene. ICAM-1 enhances antigen-specific T cell activation. *J Immunol.* 143(11):3813-20.
4. Dang, L. H., M. T. Mickalek, F. Takei, B. Benaceraff, and K. L. Rock. 1990. Role of ICAM-1 in antigen presentation demonstrated by ICAM-1 defective mutants. *J Immunol.* 144(11):4082-91.
5. Van Severter G. A., Y. Shimizu, K. J. Horgan, and S. Shaw. 1990. The LFA-1 ligand ICAM-1 provides an important costimulatory signal for T cell receptor-mediated activation of resting T cells. *J Immunol.* 144(12):4579-86.
6. Kuhlman, P., V. T. Moy, B. A. Lollo, and A. Brian. 1991. The accessory function of murine intercellular adhesion molecule-1 in T lymphocyte activation. Contributions of adhesion and co-activation. *J Immunol.* 146(6):1773-82.
7. Springer, T. A. 1994. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell.* 76(2):301-14.
8. Voraberger, G., R. Schafer, and C. Stratowa. 1991. Cloning of the human gene for intercellular adhesion molecule-1 and analysis of its 5'-regulatory region. Induction by cytokines and phorbol ester. *J. Immunol.* 147:2777.
9. Ballantyne, C. M., J. E. Sligh, X. Y. Dai, and A. L. Beaudet. 1992. Characterization of the murine *ICAM-1* gene. *Genomics* 14:1076.
10. Simmons, D., M. W. Makgoba, and B. Seed. 1988. ICAM, an adhesion ligand of LFA-1, is homologous to the neural cell adhesion molecule NCAM. *Nature* 331:624.
11. Marlin, S. D., and T. A. Springer. 1987. Purified intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) is a ligand for lymphocyte function-associated antigen 1 (LFA-1). *Cell* 51:813.
12. Diamond, M. S., D. E. Staunton, A. R. de Fougères, S. A. Stacker, J. Garcia-Aguilar, M.L. Hibbs, and T.A. Springer. 1990. ICAM-1 (CD54): a counter-receptor for Mac-1 (CD11b/CD18). *J. Cell Biol.* 111:3129.

13. Miller, J., R. Knorr, M. Ferrone, R. Houdei, C. P. Carron, and M. L. Dustin. 1995. Intercellular adhesion molecule-1 dimerization and its consequences for adhesion mediated by lymphocyte function associated-1. *J. Exp. Med.* 182:1231.
14. Reilly, P. L., J. R. Woska, D. D. Jeanfavre, E. McNally, R. Rothlein, and B. J. Bormann. 1995. The native structure of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) is a dimer. Correlation with binding to LFA-1. *J. Immunol.* 155:529.
15. Casasnovas, J. M., T. Stehle, J. H. Liu, J. H. Wang, and T. A. Springer. 1998. A dimeric crystal structure for the N-terminal two domains of intercellular adhesion molecule-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95:4134.
16. Staunton, D. E., M. L. Dustin, H. P. Erickson, and T. A. Springer. 1990. The arrangement of the immunoglobulin-like domains of ICAM-1 and the binding sites for LFA-1 and rhinovirus. *Cell* 61:243.
17. Kirchhausen, T., D. E. Staunton, and T. A. Springer. 1993. Location of the domains of ICAM-1 by immunolabeling and single-molecule electron microscopy. *J. Leukoc. Biol.* 53:342.
18. Wang, J., and T. A. Springer. 1998. Structural specializations of immunoglobulin superfamily members for adhesion to integrins and viruses. *Immunol. Rev.* 163:197.
19. Jun, C. D., C. V. Carman, S. D. Redick, M. Shimaoka, H. P. Erickson, and T. A. Springer. 2001. Ultrastructure and function of dimeric, soluble intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1). *J. Biol. Chem.* 2001 Aug 3;276(31):29019-27.
20. Xu, H., J. A. Gonzalo, Y. St-Pierre, I. R. Williams, T. S. Kupper, R. S. Cotran, T. S. Springer, and J. C. Gutierrez-Ramos. 1994. Leukocytosis and resistance to septic shock in intercellular adhesion molecule 1-deficient mice. *J. Exp. Med.* 180:95.
21. Slich, J. E. Jr., C. M. Ballantyne, S. S. Rich, H. K. Hawkins, C. W. Smith, A. Bradley, and A. L. Beaudet. 1993. Inflammatory and immune responses are impaired in mice deficient in intercellular adhesion molecule 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90:8529.
22. King, P. D., E. T. Sandberg, A. Selvakumar, P. Fang, A. L. Beaudet, and B. Dupont. 1995. Novel isoforms of murine intercellular adhesion molecule-1 generated by alternative RNA splicing. *J. Immunol.* 154:6080.
23. Kinashi T, St Pierre Y, Springer TA. Expression of glycoposphatidylinositol-anchored and -non-anchored isoforms of vascular cell adhesion molecule 1 in murine stromal and endothelial cells. *Leukoc Biol.* 1995 Jan;57(1):168-73.
24. Yan HC, Baldwin HS, Sun J, Buck CA, Albelda SM, DeLisser HM. Alternative splicing of a specific cytoplasmic exon alters the binding characteristics of murine

- platelet/endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1). *J Biol Chem.* 1995 Oct 6;270(40):23672-80.
25. Krauss T, Kuhn W, Lakoma C, Augustin HG. Circulating endothelial cell adhesion molecules as diagnostic markers for the early identification of pregnant women at risk for development of preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol.* 1997 Aug;177(2):443-9.
 26. Grakoui, A., D. L. Donermeyer, O. Kanagawa, K. M. Murphy, and P. M. Allen. 1999. TCR-independent pathways mediate the effects of antigen dose and altered peptide ligands on Th cell polarization. *J. Immunol.* 162:1923-1930.
 27. Daniel, C., A. Grakoui, and P. M. Allen. 1998. Inhibition of an in vitro CD4+ T cell alloresponse using altered peptide ligands. *J. Immunol.* 160:3244-3250.
 28. Champagne, B., P. Tremblay, A. Cantin, and Y. St Pierre. 1998. Proteolytic cleavage of ICAM-1 by human neutrophil elastase. *J Immunol.* 161:6398.
 29. Goldstein W, Doring G. Lysosomal enzymes from polymorphonuclear leukocytes and proteinase inhibitors in patients with cystic fibrosis. *Am Rev Respir Dis.* 1986 Jul;134(1):49-56.
 30. Suter S, Schaad UB, Morgenthaler JJ, Chevallier I, Schnebli HP. Fibronectin-cleaving activity in bronchial secretions of patients with cystic fibrosis. *J Infect Dis.* 1988 Jul;158(1):89-100.
 31. Budnik A, Grewe M, Gyufko K, Krutmann J. Analysis of the production of soluble ICAM-1 molecules by human cells. *Exp Hematol.* 1996 Feb;24(2):352-9.
 32. Lyons PD, Benveniste EN. Cleavage of membrane-associated ICAM-1 from astrocytes: involvement of a metalloprotease. *Glia.* 1998 Feb;22(2):103-12.
 33. van Den Engel, N. K., E. Heidenthal, A. Vinke, H. Kolb, and S. Martin. 2000. Circulating forms of intercellular adhesion molecule (ICAM)-1 in mice lacking membranous ICAM-1. *Blood* 95:1350.
 34. Doring, G., F. Frank, C. Boudier, S. Herbert, B. Fleischer, and G. Bellon. 1995. Cleavage of lymphocyte surface antigens CD2, CD4, and CD8 by polymorphonuclear leukocyte elastase and cathepsin G in patients with cystic fibrosis. *J. Immunol.* 154:4842.
 35. Jun, C. D., M. Shimaoka, C. V. Carman, J. Takagi, and T. A. Springer. 2001. Dimerization and the effectiveness of ICAM-1 in mediating LFA-1-dependent adhesion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 98:6830.

36. Luksch, C. R., O. Winqvist, M. E. Ozaki, L. Karlsson, M. R. Jackson, P. A. Peterson, and S. R. Webb. 1999. Intercellular adhesion molecule-1 inhibits interleukin 4 production by naive T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 96:3023.
37. Roep, B. O., E. Heidenthal, R. R.de Vries, H. Kolb, and S. Martin. 1994. Soluble forms of intercellular adhesion molecule-1 in insulin-dependent diabetes mellitus. *Lancet.* 343:1590.
38. Greenberger, P. A. 1997. Immunologic aspects of lung diseases and cystic fibrosis. *JAMA.* 278:1924.
39. Girard, M., P. Cleroux, P. Tremblay, S. Dea, and Y. St-Pierre. 2001. Increased proteolytic activity and matrix metalloprotease expression in lungs during infection by porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J. Gen. Virol.* 82:1253.
40. Sharma, M. D., M. Leite de Moraes, F. Zavala, C. Pontoux, and M. Papiernik. 1998. Induction and inhibition of CD40-CD40 ligand interactions: a new strategy underlying host-virus relationships. *J. Immunol.* 161:5357.
41. Barrett, A. J., Rawlings, N. D., and Woessner, J. F. 1998. In *Handbook of Proteolytic Enzymes*. Academic Press, San Diego, CA.

Figure legends

Figure 1: The ICAM-1 isoforms. The structure is based on the nucleotide sequence of mRNAs described in the study of King et al. (22). The bend between D3 and D4 and the dimerization is predicted by electron microscopy and by studies at the biochemical and biophysical levels of ICAM-1, as recently discussed in details by Wang and Springer (18).

Figure 2: Cleavage of ICAM-1 isoforms by HLE. The RT-4 transfectants were incubated with a predetermined dose of HLE (5 µg/ml) for various times (A) or at the indicated concentrations of HLE for 60 min (B). Cleavage of alternative isoforms or the common form (WT; wild-type) of ICAM-1 was measured by flow cytometry as described in *Material and Methods*. Transfectants were selected for expression of ICAM-1 by flow cytometry using anti-ICAM-1 3E2 mAb. Levels of ICAM-1 expression are shown as mean fluorescent intensity (MFI). MFI on control transfectants (untransfected RT-4 cells or RT-4 cells transfected with the control vector) was less than 0.01. In (C), re-expression of ICAM-1 after cleavage with HLE. RT-4 cells transfected (WT and 3-6) were treated for 2 h with HLE (30 µg/ml). The cells were then washed three times to remove HLE, and re-incubated at 37°C in complete medium supplemented with 10% FCS. After 4 h, levels of ICAM-1 were measured by flow cytometry. Data are means ± S.D. from one representative experiment of triplicates (n=3)

Figure 3: Dose-dependent cleavage of ICAM-1 expressed on Hi-7 stable transfectants. Cells were treated with the indicated concentrations of HLE for 60 min. After treatment, cells were washed and stained with PE-labeled anti-ICAM-1 3E2 mAb, and ICAM-1 expression was measured by flow cytometry. Cleavage of alternative isoforms or the common form (WT; wild-type) of ICAM-1 was measured by flow cytometry as described in *Material and Methods*. Levels of ICAM-1 expression are shown as mean fluorescent intensity (MFI). MFI on control transfectants (untransfected Hi-7 cells or Hi-7 cells transfected with the control vector) was less than 0.01. Results are representative of two independent experiments.

Figure 4: Cleavage of alternative isoforms by sputum samples of CF patients. A. Dose-dependent cleavage of the 4-6 isoform. The RT-4 transfectant expressing the 4-6 isoform was incubated with different dilutions of the sputum sample (diluted in serum-free RPMI-medium, for 60 min at 37°C with or without the HLE-specific inhibitor MSAAPVCK. B. Cleavage of all isoforms by sputum samples. RT-4 transfectants were incubated for the indicated times with a suboptimal concentration (1:10 final dilution) of the sputum at 37°C. C. RT-4 transfectants were treated for 2 h with sputum samples from patients with CF (final dilution: 1/10) with (white bars) or without (black bars) the HLE-specific inhibitor MSAAPVCK. Data (n=2) are expressed the mean \pm SD (standard deviation). Cleavage of alternative isoforms or the common form (WT; wild-type) of ICAM-1 was measured by flow cytometry as described in *Material and Methods*. Results are representative of at least two independent experiments.

Figure 5: Cleavage of ICAM-1 and its splice variants by cathepsin G. A. Kinetic analysis of cleavage of the common form of ICAM-1 and the 2-4 isoform. RT-4 transfectants expressing the common form and the 2-4 isoform were incubated with cathepsin G (16.5 mU/ml) for the indicated period of time at 37°C. B. Dose-dependent cleavage of the common form of ICAM-1 and the 2-4 isoform. Both transfectants were incubated with the indicated concentrations of cathepsin G for 1 h at 37°C. C. Cleavage of all isoforms by cathepsin G. RT-4 transfectants were treated for 1 h with the indicated concentrations of cathepsin G. Two RT-4 transfectants expressing the common form of ICAM-1 (WT#9: MFI: 104, and WT#15: 3.4) were tested. Cleavage was measured by flow cytometry as described in *Material and Methods*. Results are representative of at least two independent experiments.

Figure 6: Release of soluble ICAM-1 upon treatment with HLE and cathepsin G. Transfectants were incubated at 37°C for 1 h in serum-free medium with HLE (10 μ g/ml) and cathepsin G (33mU/ml) and soluble ICAM-1 concentrations determined by commercial ELISA. Results are expressed as the absorbance set at 450 nm of the ELISA reader. Controls included cells incubated without proteases and RT-4 cells transfected with the vector alone (S α) untreated or treated with the proteases. Asterisks (*) indicate saturated readings by the ELISA reader. Results are representative of two independent experiments.

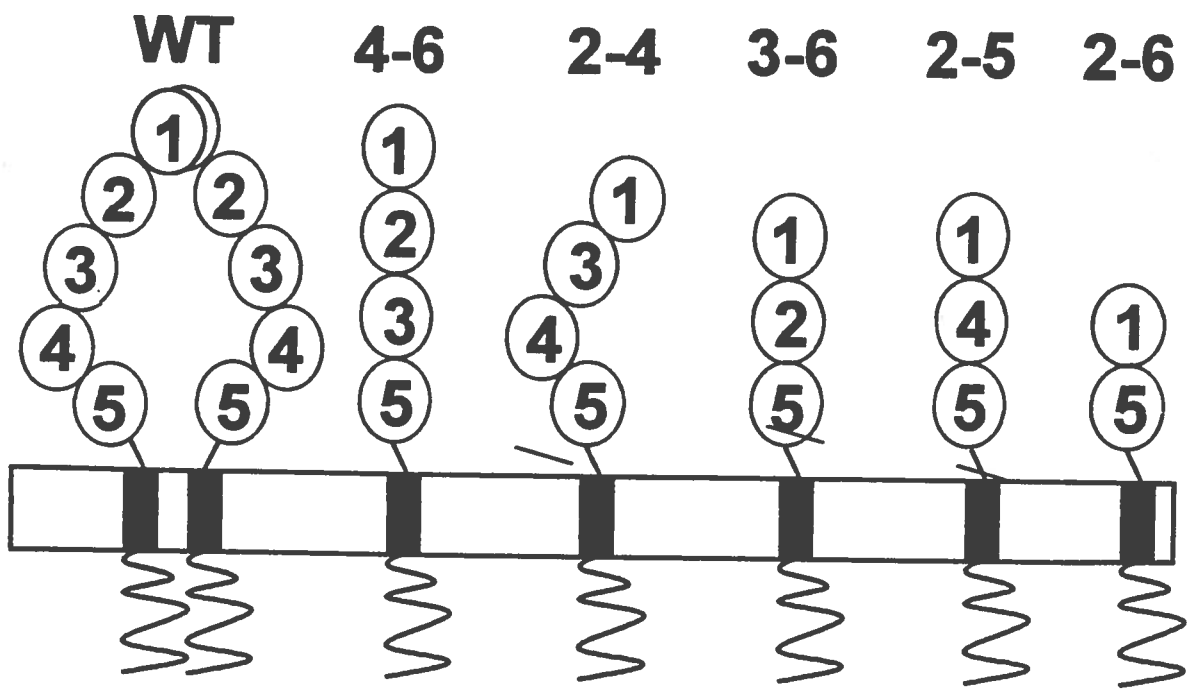
Figure 7: Cleavage of human soluble ICAM-1 by HLE and cathepsin G. Purified human sICAM-1 (300ng) was incubated for the indicated times (*upper gel*) or for 1 h

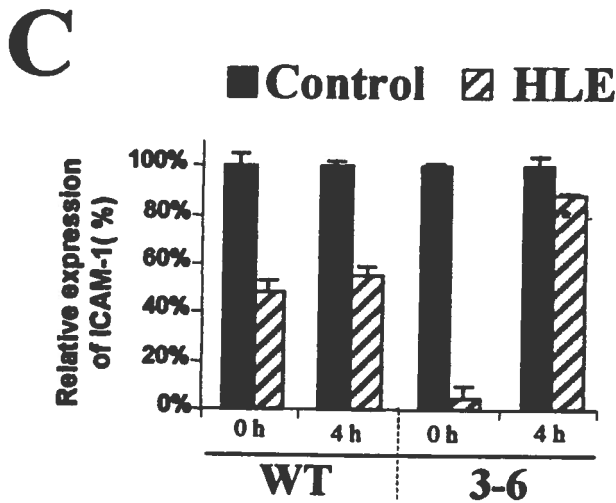
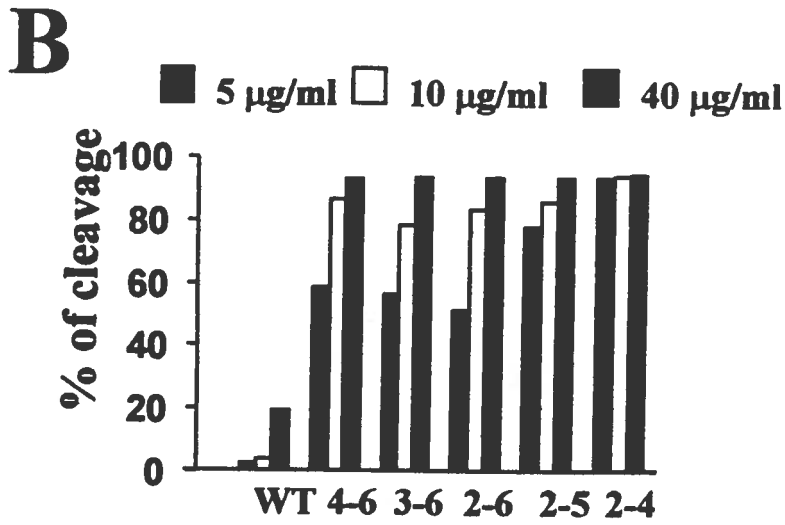
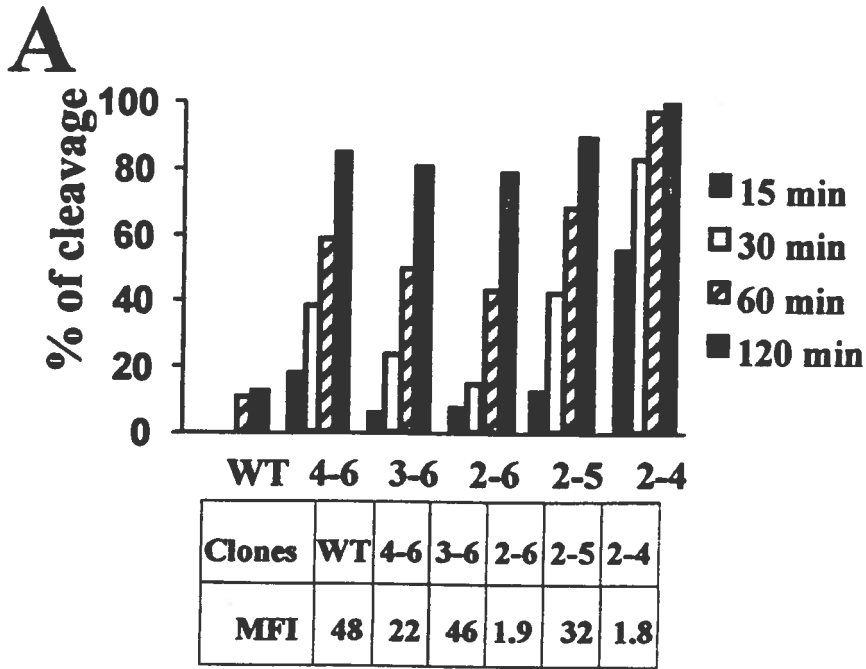
(lower gel) at 37°C with HLE and cathepsin G at the indicated doses. Proteolysis of ICAM-1 was determined by gel electrophoresis on SDS-PAGE (12 %). Domain 1-containing fragments were visualized by Western-blotting using specific antibodies. Molecular mass markers (kDa) are shown. Results are representative of three independent experiments.

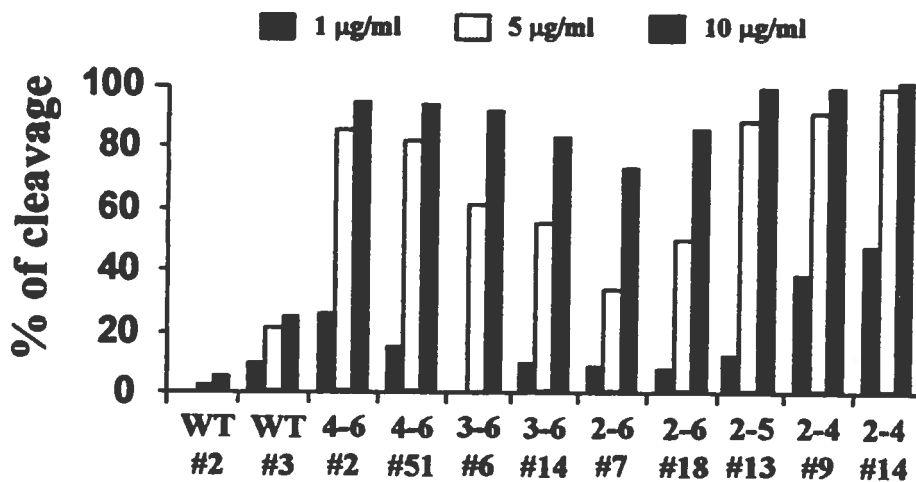
Figure 8: Proliferation of CD4-positive T cells from 2.102 transgenic mice is ICAM-1-dependent. T cells from 2.102 transgenic mice were purified and co-cultured with I-E^k-expressing fibroblasts transfected with the common form of ICAM-1 or control fibroblasts expressing only I-E^k in presence of different concentration of Hb(64-76) peptide with or without 3E2 mAb for 72h. ³[H]-thymidine incorporation was measured during the last 24h of the assay. Data are represented as means±S.D. from one representative experiment of triplicates (n=3).

Figure 9: Functional capacity of ICAM-1-isoform to act as accessory molecules in antigen presentation of antigenic peptides. A. Proliferation of CD4-positive splenic T cells from 2.102 transgenic mice during presentation of antigenic Hb(64-76) peptide by Hi-7 transfectants expressing ICAM-1 isoforms versus control cells transfected with pS α vector alone. ³[H]-thymidine incorporation was measured during the last 24h of the assay. Data are the means ± S.D. of triplicates and are representatives of four independent experiments. For each experiments, expression of MHC class II I-E^k and ICAM-1 levels of Hi-7 transfectants were monitored by flow cytometry. Mean fluorescence intensity (MFI) of each clone is indicated below the histogram.

Figure 10: Analysis of liver for neutrophil infiltration after induction of septic shock. Livers were collected from normal and exon-4- and exon-5-targeted ICAM-1-deficient mice 24 h after injection of LPS i.p., processed, and stained with anti-Ly6G mAb and hematoxylin. The presence of infiltrating Ly-6G-positive neutrophils as assessed by immunohistochemistry, appear red on sections. Original magnification, x100.

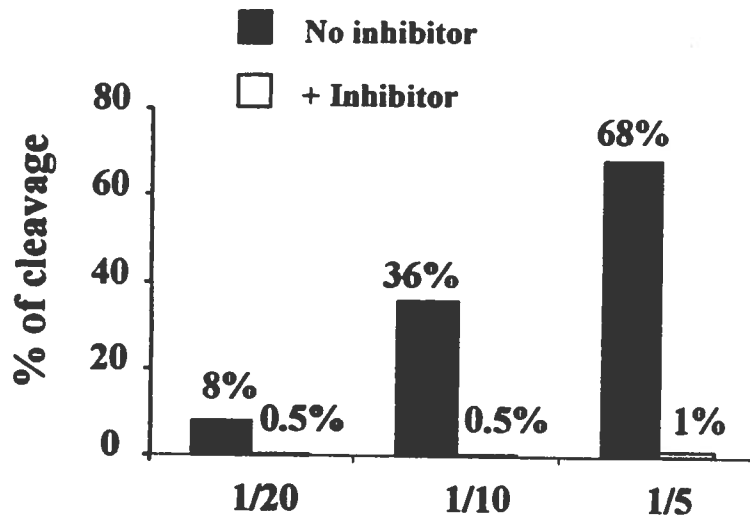




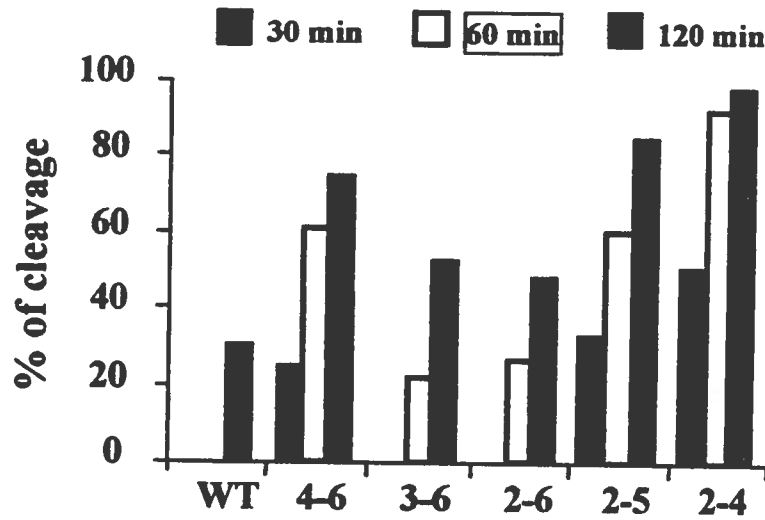


Clone	WT #2	WT #3	4-6 #2	4-6 #51	3-6 #6	3-6 #14	2-6 #7	2-6 #18	2-5 #13	2-4 #9	2-4 #14
MFI	89.2	1.2	60	2.2	1.1	4.9	292	4.6	3.1	9.7	2.1

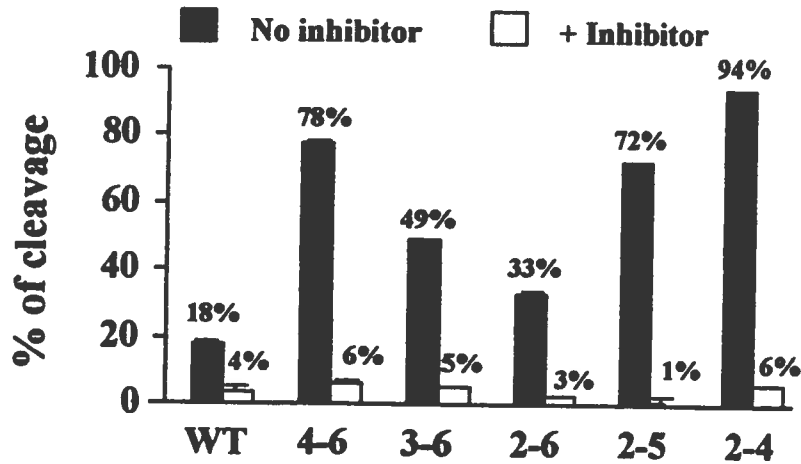
A.



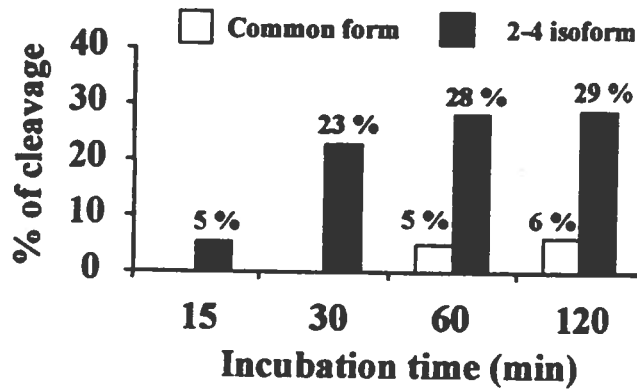
B.



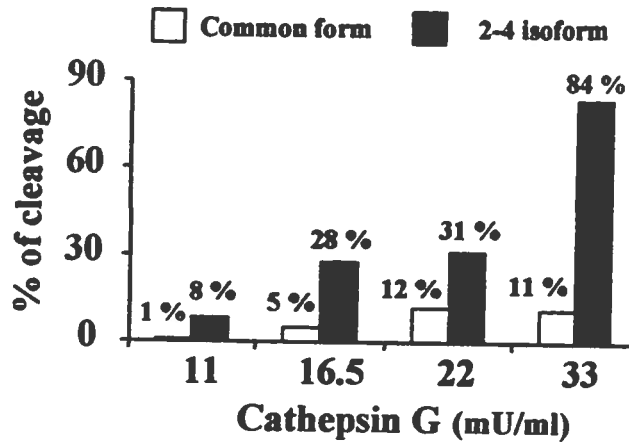
C.



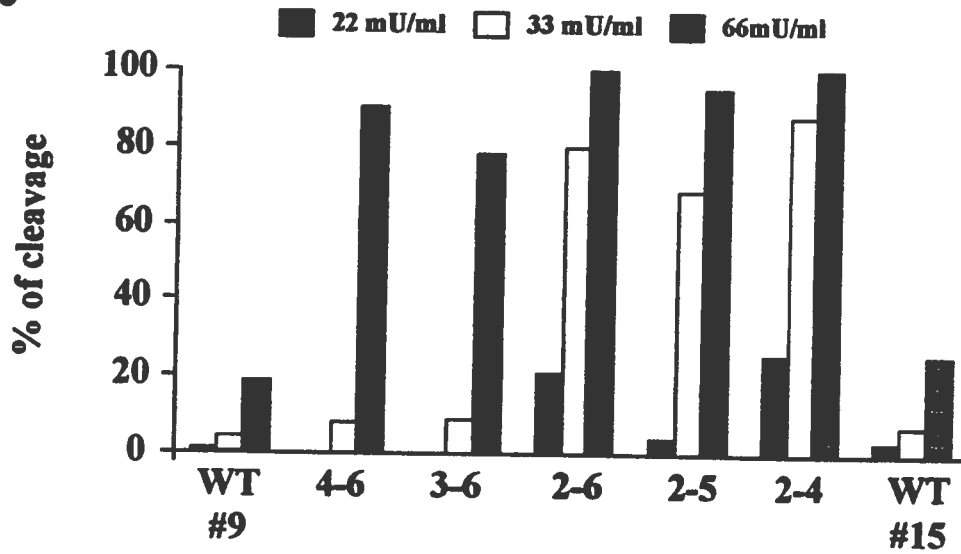
A.

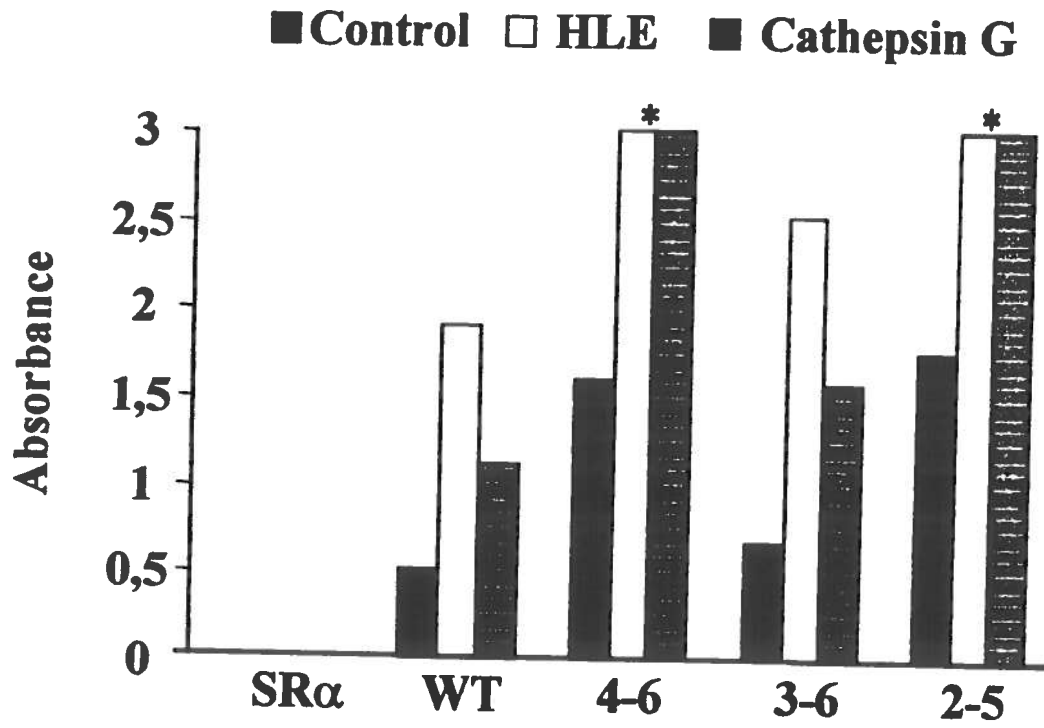


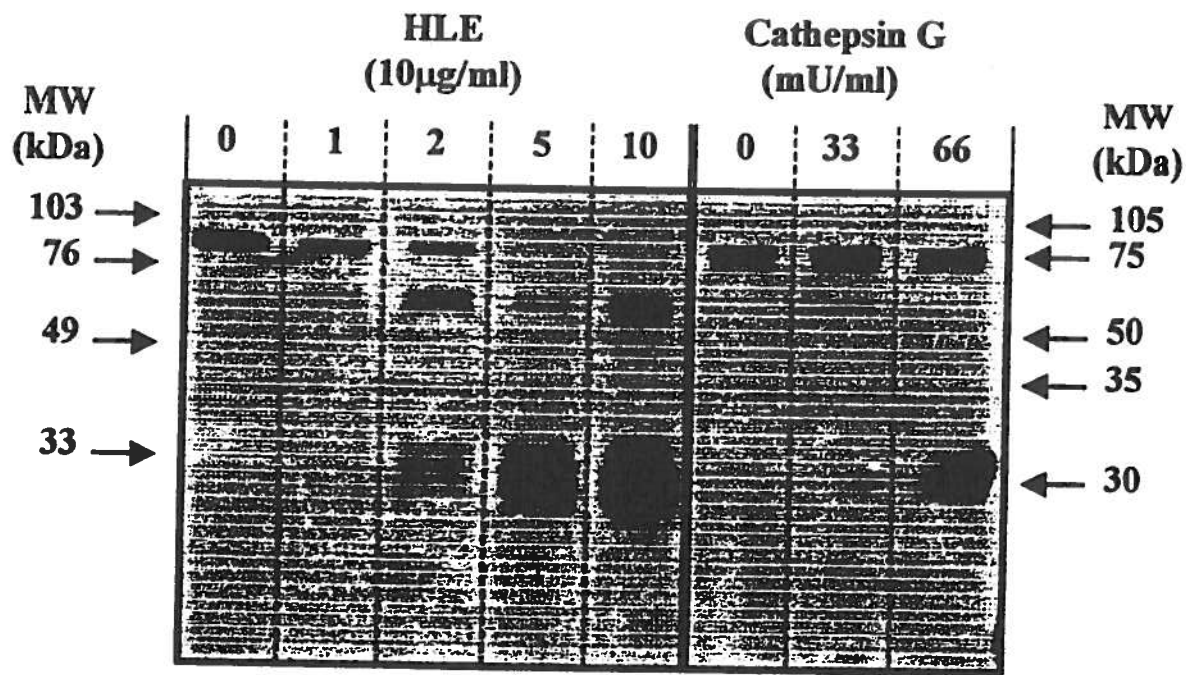
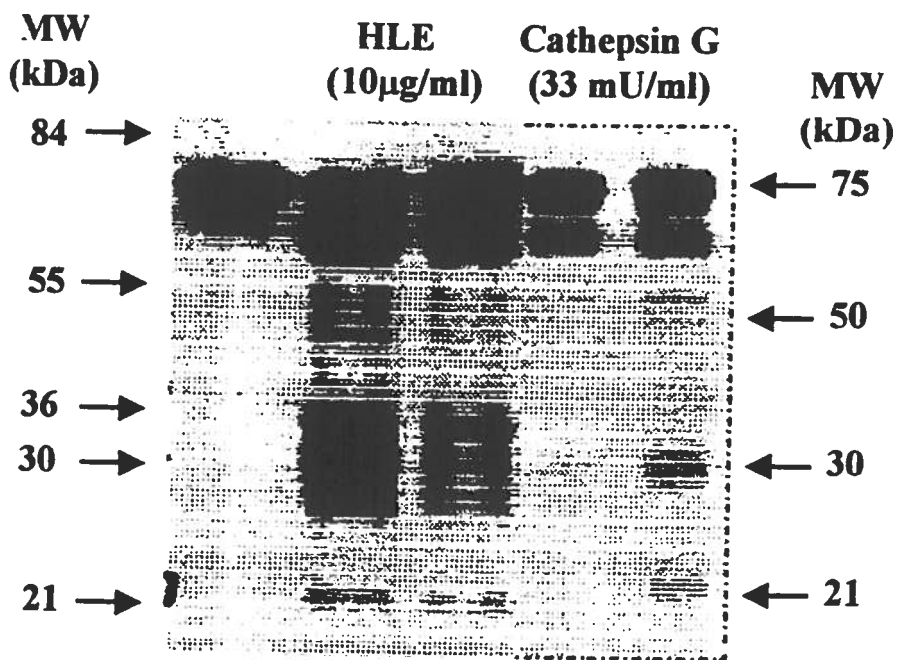
B.

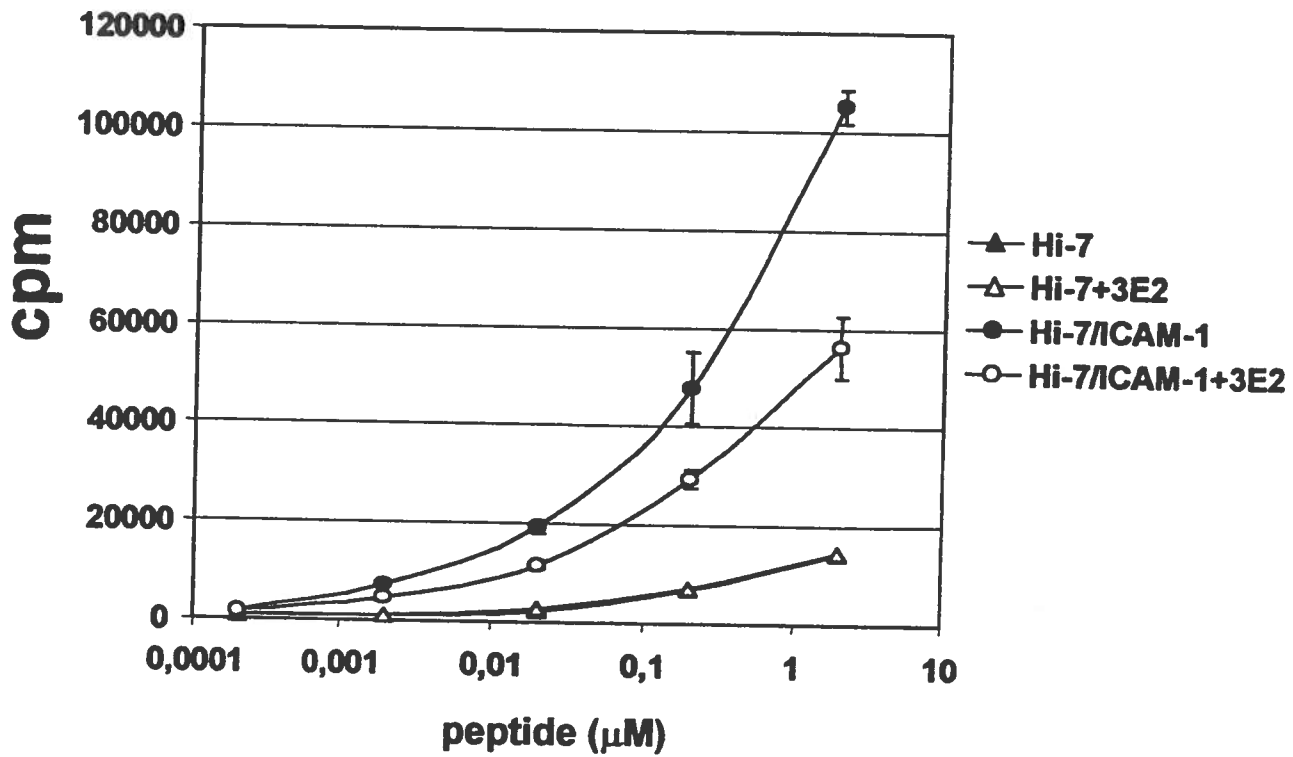


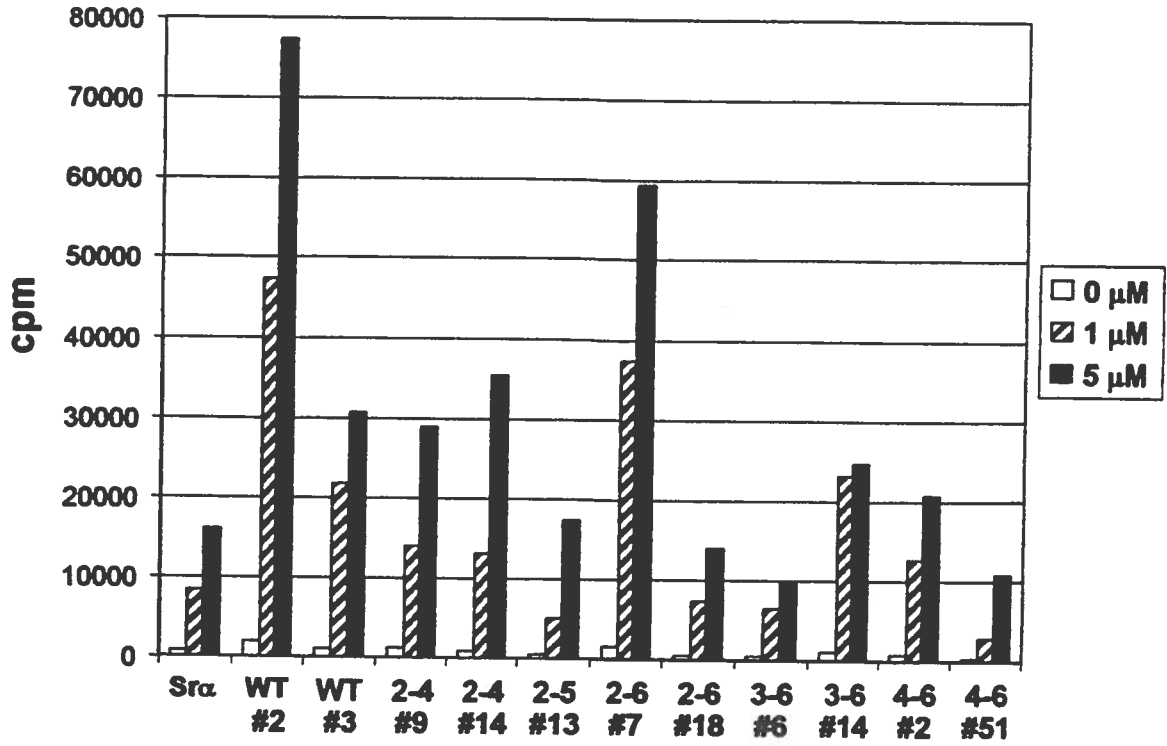
C.











Isoform:	Sra	WT	WT	2-4	2-4	2-5	2-6	2-6	3-6	3-6	4-6	4-6
Clones:		#2	#3	#9	#14	#13	#7	#18	#6	#14	#2	#51
I-E^k (MFI)	3.58	3.09	3.76	3.82	4.17	4.15	3.37	4.81	4.04	5.00	4.67	4.29
ICAM-1 (MFI)	nd	96.73	1.47	4.90	0.82	1.03	182.8	10.24	0.78	12.02	62.90	2.76

Figure 10

