

Université de Montréal

Délivrance d'érythropoïétine canine par une glande synthétique
endocrine composée de cellules stromales de la moelle osseuse
autologues chez des chiens immunocompétents

par

François Fontaine

Département de pathologie et microbiologie

Faculté de médecine vétérinaire

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade
Maître ès sciences (M.Sc.)
en sciences vétérinaires
option pathologie

Décembre 2004

©François Fontaine, 2004



SF
607
U54
2005
v.016

AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé

Délivrance d'érythropoïétine canine par une glande synthétique
endocrine composée de cellules stromales de la moelle osseuse
autologues chez des chiens immunocompétents

présenté par

François Fontaine

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes

.....
Dre Marie Archambault, présidente-rapporteuse

.....
Dr Daniel Martineau, directeur de recherche

.....
Dr Jacques Galipeau, codirecteur

.....
Dr Marilyn Dunn, codirectrice

.....
Dr Lawrence Smith, membre du jury

**RÉSUMÉ EN FRANÇAIS
ET MOTS-CLÉS**

L'érythropoïétine (EPO) est largement utilisée dans le développement de différentes voies de thérapie génique. Il a été démontré récemment que des cellules stromales de la moelle osseuse (CSMO) murines modifiées par un rétrovecteur pouvaient excréter de façon systémique des niveaux thérapeutiques d'EPO chez la souris. Cependant, avant d'appliquer le traitement chez l'humain, il est nécessaire d'étudier le modèle chez de grands mammifères. L'objectif de ce travail était d'implanter des CSMO canines autologues produisant l'EPO canine chez des chiens immunocompétents. L'immunocaractérisation de ces CSMO canines a démontré que les cellules étaient 100% positives pour CD44, un marqueur de surface exprimé par les cellules mésenchymales. L'efficacité de transduction par les rétrovecteurs était de 73 à 92% tel qu'analysé par FACS, et la production *in vitro* de l'EPO canine mesurée par ELISA était de 1,5 à 9,3 U d'EPO/ 10^6 cellules/ 24 h. Les CSMO canines ingénierées ont été incorporées à du collagène bovin et l'organoïde résultant a été implanté s.-c. chez des souris immunodéficientes. L'hématocrite (Ht) de ces souris a augmenté significativement pendant 4 mois. Le nombre de CSMO implantées et le volume des implants ont été mis au point chez les chiens donneurs: 32 implants, contenant 4×10^6 CSMO chacun, ont été implantés chez 4 chiens. L'Ht des chiens a augmenté en moyenne de 28 % en 12 jours et ces niveaux élevés ont été soutenus durant 5 semaines. Ces résultats démontrent l'application possible de la thérapie cellulaire chez les grands mammifères, une étape cruciale vers l'application chez l'humain.

MOTS-CLÉS : anémie, cellules stromales de la moelle osseuse, chiens, érythropoïétine, rétrovecteurs, thérapie génique.

**RÉSUMÉ EN ANGLAIS
ET MOTS-CLÉS**

Erythropoietin (EPO) is widely used for the development of different treatments in gene therapy. It has been recently demonstrated that implantation of retrovirally modified murine bone marrow stromal cells (BMSC) can systemically deliver therapeutic levels of EPO in the mouse. However, before this approach is used in humans, a large mammal model is desirable. The purpose of this study was to implant autologous engineered canine BMSC to produce canine EPO in immunocompetent dogs. The immunocharacterisation of canine BMSCs showed that the cells are 100% positive for CD44, a surface antigen expressed by mesenchymal cells. Retrovector transduction efficiency was 73 to 92% as analysed by FACS, and the *in vitro* production of canine EPO was measured by ELISA as 1,5 to 9,3 U of EPO/ 10^6 cells/ 24 hrs. The canine EPO-engineered BMSCs were embedded in bovine collagen and the resulting organoid was implanted s.-c. in immunodeficient mice. The hematocrit (Ht) of these mice increased significantly and remained elevated for 4 months. The canine EPO-engineered BMSCs were embedded within the same matrix and implanted s.-c. in the respective donor dogs. The number of embedded BMSCs and volume of implants as follows: 32 implants containing 4×10^6 BMSCs each were implanted in 4 dogs. The hematocrit (Ht) of treated dogs rose an average of 28% in 12 days and remained significantly elevated for 5 weeks. These results demonstrate the feasibility of cellular therapy in large immunocompetent mammals, a crucial step toward its application in people.

KEY WORDS: anemia, bone marrow stromal cells, dogs, erythropoietin, gene therapy, retrovectors.

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ EN FRANÇAIS.....	i
RÉSUMÉ EN ANGLAIS.....	iii
TABLE DES MATIÈRES.....	v
LISTE DES TABLEAUX.....	vii
LISTE DES FIGURES.....	viii
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	ix
DÉDICACES.....	xi
REMERCIEMENTS.....	xii
I. INTRODUCTION.....	1
II. RECENSION DE LA LITTÉRATURE.....	3
1. THÉRAPIE GÉNIQUE ET CELLULAIRE.....	4
2. AGENTS THÉRAPEUTIQUES.....	5
2.1 ÉRYTHROPOÏÉTINE.....	5
2.2 FACTEURS VIII ET IX.....	11
3. VECTEURS VIRAUX.....	12
3.1 DÉFINITION.....	12
3.2 PROPRIÉTÉS.....	13
3.3 RÉTROVECTEURS.....	14
3.4 ADÉNOVECTEURS.....	17
3.5 ADÉNOVECTEURS ASSOCIÉS.....	18
3.6 HERPES SIMPLEX VIRUS.....	18

3.7 VECTEURS HYBRIDES.....	19
4. LIGNÉE D'ENCAPSIDATION DE RÉTROVECTEURS.....	20
5. CELLULES CIBLES.....	22
5.1 CELLULES STROMALES DE LA MOELLE OSSEUSE...	22
5.2 CELLULES HÉMATOPOÏÉTIQUES SOUCHES.....	25
5.3 FIBROBLASTES ET MYOBLASTES.....	27
6. VOIES D'ADMINISTRATION DE CELLULES EN THÉRAPIE GÉNÉRIQUE <i>EX VIVO</i>	27
6.1 CELLULES ADMINISTRÉES LOCALEMENT OU SYSTÉMIQUEMENT	27
6.2 CELLULES INCORPORÉES DANS UN SUPPORT SOLIDE ADMINISTRÉ LOCALEMENT.....	29
7. MODÈLES ANIMAUX.....	33
III. MATÉRIEL, MÉTHODES ET RÉSULTATS.....	37
Article 1 : François Fontaine ¹ , Arnaud Duval ¹ , Juan Hernandez ² , Nicoletta Eliopoulos ³ , James N. MacLeod ⁴ , Marilyn Dunn ² , Jacques Galipeau ³ , Daniel Martineau ¹	
Autologous canine bone marrow stromal cells engineered with the canine EPO gene and implanted <i>in vivo</i> produce and release systemically functional EPO over a prolonged period. (Soumis dans " <i>Human Gene Therapy</i> ")	
IV. DISCUSSION.....	67
V. CONCLUSION.....	77
VI. BIBLIOGRAPHIE.....	80
VII. ANNEXES.....	xiv

LISTE DES TABLEAUX

Annexes

Tableau I : Comptes des plaques de syncytia formées par les cellules XC.....xxx

LISTE DES FIGURES

Annexes

Figure 1: Cinétique de l'hématocrite du premier chien implanté avec les CSMO produisant l'EPO.....	xx
Figure 2: Section centrale de l'implant du premier chien implanté avec les CSMO produisant EPO.....	xxi
Figure 3: Formation de syncytium par les cellules XC.....	xxviii
Figure 4: Formation de plaques de syncytia par les cellules XC.....	xxix

Article

Figure 1. Characterisation of cultured canine marrow stromal cells.....	55
Figure 2. Transduction efficiency of canine BMSCs measured by flow cytometry analysis.....	56
Figure 3. Provector integration in transduced cBMSCs detected by Southern blot analysis.....	57
Figure 4. <i>In vitro</i> expression of canine Epo by transduced cBMSCs.....	58
Figure 5. Long-term monitoring of Ht in NOD-SCID mice.....	59
Figure 6. Long-term monitoring of Ht and serum levels of Epo in dogs.....	60
Figure 7. Collagen-based implant containing autologous cEPO-cBMSCs, 89 days after subcutaneous implantation.....	61
Figure 8. Absence of retroparticules in serum of implanted dogs.....	62

LISTE DES ABRÉVIATIONS

- AAV : adénovecteur associé
- ADN : acide désoxyribonucléique
- ADNc : acide désoxyribonucléique complémentaire
- Adv : adénovecteur
- ARN : acide ribonucléique
- ARNm : acide ribonucléique messenger
- CAR : "coxsackievirus-adenovirus receptor"
- CAT1 : "cationic amino acid transporter type 1"
- CHO : "chinese hamster ovarian"
- CMV : cytomegalovirus
- CSH : cellules souches hématopoïétiques
- CSMO : cellules stromales de la moelle osseuse
- e.g. : par exemple
- EGFP : "enhanced green fluorescent protein"
- ELISA : "enzyme-linked immunosorbent assay"
- EPO : érythropoïétine
- FACS : "fluorescence activated cell sorter"
- GRE : "glucocorticoid responsive element"
- HIF : "hypoxia inducible factor"
- Ht : hématocrite
- HPS : hématoxyline-phloxine-safran
- HRE : "hypoxia responsive element"
- HSV : "herpes simplex virus"
- i.e. : c'est-à-dire

i.-m. : intra-musculaire

IRES : "internal ribosomal entry site"

IU : "international units"

i.-v. : intra-veineux

kb : kilobase

kDa : kiloDalton

LTR : "long terminal repeat"

MACS : "magnetic cell separation"

MoMuLV : "Moloney murine leukemia virus"

NESP : "novel erythropoiesis-stimulating protein"

NIH 3T3 : "National Institutes of Health 3T3"

NOD-SCID : "non-obese diabetic-SCID"

pb : paire de bases

PCR : "polymerase chain reaction"

rhEPO : érythropoïétine recombinante humaine

RSV : "Rous sarcoma virus"

RT-PCR : "reverse transcriptase-PCR"

Rv : rétrovecteur

s.-c. : sous-cutané

SCID : "severe-combined immunodeficiency"

TNF α : "tumor necrosis factor alpha"

VIH : virus d'immunodéficience humaine

VSV-G : protéine G du virus de la stomatite vésiculeuse

À mes parents

À mon amour Caro

REMERCIEMENTS

Merci à tous ceux ayant contribué à la réussite de ce projet. Je tiens à exprimer plus particulièrement ma reconnaissance envers :

-Dr Daniel Martineau, directeur de mon projet de maîtrise, pour m'avoir soutenu tout le long du projet, pour la persévérance, la confiance, pour m'avoir permis de pousser mes limites et pour les discussions scientifiques passionnantes.

-Dr Jacques Galipeau, co-directeur de mon projet de maîtrise, pour les précieux conseils et l'expertise apportée à ce projet.

-Dr Marylin Dunn, co-directrice de mon projet de maîtrise, pour la réussite des essais cliniques et les encouragements.

-Dr Juan Hernandez, clinicien, pour les suivis cliniques et l'analyse des données.

-Dre Nicoletta Eliopoulos, Post-Doc chez Dr Galipeau, pour l'expérience essentielle à la réussite du projet, les discussions, conseils et les essais chez les souris.

-Arnaud Duval, étudiant du laboratoire, pour le soutien moral, culturel, technique, scientifique, culinaire, sportif et les expériences de PCR! Merci le Français.

-L'équipe du Dr Galipeau pour les conseils judicieux et les intéressantes réunions de laboratoire.

-Hélène Boucher, assistante de recherche et Dre Bianca Morel, étudiante du laboratoire, pour les discussions, l'appui technique et l'ambiance au laboratoire.

-Guy Beauchamp, qui est plus qu'essentiel pour les analyses statistiques.

-Noémie Gendron et Stan Sorin, stagiaires de recherche, pour votre patience, l'intérêt pour le projet et de m'avoir écouté parler.

-Les étudiants du CRRA : Alex, Tania, Joëlle, Simon, Sandra, Kristy et Véronique ou comment mettre un peu de soleil dans la vie étudiante des cycles supérieurs. Je ne vous oublie pas...j'ai des photos!

-Mes chums : JP, Goye, Hervé, OG, Manu, Chris et Timothé.

-Marco Langlois, technicien à la DGTIC, pour les affiches et les gossages de photos!

-Les moniteurs du Club-École Raminska. On se sent comme une famille...dire qu'on est payé à faire ça!

-Joao Junior Suzuki, étudiant au CRRA, pour m'avoir fait rejouer de la guitare et pour le show de Van Halen grattis. Thanks crazy man!

-Les chirurgiens français: Florent David, Thomas Bertholdy et Christophe Descamps

-Les membres du laboratoire du Dr Marcelo Gottshalk pour les emprunts de matériel, de cellules et de logiciels. Merci!

-Micheline St-Germain, secrétaire aux cycles supérieurs, pour l'encadrement et la compréhension.

-Micheline Sicotte, secrétaire au CRRA, pour la générosité sans borne et l'extrême gentillesse.

I. INTRODUCTION

L'anémie causée par une insuffisance rénale chronique, les traitements du cancer ou le HIV peut être traitée avec l'érythropoïétine recombinante humaine (rhEPO). Toutefois, les coûts engendrés par la production et purification massive de protéines recombinantes en laboratoire sont faramineux. L'EPO est ensuite devenu un candidat de choix à utiliser en thérapie génique. Nos collaborateurs ont démontré que des cellules stromales de la moelle osseuse (CSMO) modifiées par un rétrovecteur pouvaient excréter de façon systémique des niveaux thérapeutiques d'EPO chez la souris (40). Cependant, puisque les vecteurs, les conditions de transduction et les cellules utilisées ne sont valables que pour l'espèce murine, l'application immédiate chez les humains est trop risquée. En effet, les différences génétiques et d'environnement séparant les humains des rongeurs démontrent qu'il est impossible d'espérer des réponses similaires à un traitement dans les mêmes conditions. Toutefois, les grands mammifères possèdent de meilleures similitudes physiologiques et immunologiques à celles des humains.

Le présent projet a donc pour buts : [1] de mettre au point la culture des CSMO canines et d'en faire la caractérisation phénotypique; [2] de vérifier le potentiel de modification des CSMO canines par un rétrovecteur pour ensuite mesurer les niveaux d'EPO produits; [3] de démontrer la fonctionnalité *in vivo* de l'EPO sécrétée dans des modèles murins et canins en implantant les CSMO canines ingénierées incorporées dans une matrice biologique. Cette étude est l'une des premières à rapporter l'utilisation des CSMO comme plate-forme de délivrance systémique de protéines thérapeutiques chez des grands mammifères.

II. RECENSION DE LA LITTÉRATURE

1. Thérapie génique et cellulaire

La thérapie génique est une nouvelle voie de traitement qui a été définie comme étant le transfert d'information génétique synthétique nouvelle à une cellule ou un individu pour la production d'un agent thérapeutique bénéfique à l'individu (51). Cette protéine peut être une hormone, une enzyme ou une cytokine visant à moduler le système immunitaire. Une variante de la thérapie génique est la thérapie cellulaire. Elle consiste à administrer des cellules ingénierées en culture par des vecteurs viraux pour produire la protéine d'intérêt. Cette nouvelle approche thérapeutique vise à guérir des maladies génétiques causées par une anomalie monogénique et à traiter des maladies spontanées tels le cancer, les maladies cardiovasculaires et les maladies infectieuses.

Le matériel génétique thérapeutique peut être véhiculé de plusieurs façons. Il peut être sous forme nue, i.e. sous forme libre sans l'aide de vecteur. L'information génétique est dans ce cas administrée à l'aide d'un pistolet ("gene gun") (71, 118), sous forme de liposomes (116) ou bien transférée par électroporation (91, 136). Dans d'autres cas, les gènes sont insérés dans des vecteurs viraux modifiés. Ces derniers peuvent être administrés directement au patient ou bien utilisés pour modifier des cellules *in vitro* pour l'expression d'un gène d'intérêt. Le principal désavantage de l'injection directe de vecteurs viraux implique la persistance de matériel viral dans l'organisme. À tout moment, le vecteur peut retrouver sa nature sauvage répliquative par recombinaisons entre le vecteur et les provirus du génome ou bien son matériel peut servir à d'autres virus latents et générer des particules répliquatives. Le vecteur peut également être toxique ou posséder un potentiel immunogène. De plus, l'endroit

où se retrouve le vecteur est incontrôlé (10). La thérapie cellulaire solutionne cet inconvénient en minimisant les risques de transfert de matériel viral à l'hôte. En effet, les cellules sont modifiées génétiquement *in vitro*, sous des conditions soigneusement contrôlées, avant d'être implantées chez le patient. On peut donc s'assurer qu'elles ne produisent pas de virus avant leur implantation.

2. Agents thérapeutiques

Les maladies causées par un défaut monogénique sont traitées avec le gène de la protéine manquant comme le facteur IX pour l'hémophilie B ou l'érythropoïétine lors d'immunodéficience sévère et d'anémie. Le traitement du cancer se fait plutôt par immunothérapie où le système immunitaire est activé via des cytokines et des facteurs de croissance.

2.1 Érythropoïétine

L'érythropoïétine (EPO), une glycoprotéine de 30.4 kDa (100), est un facteur de croissance hématopoïétique produit par les cellules interstitielles péri-tubulaires du cortex rénal (62, 74). Une fois relâchée dans le sang, l'EPO stimule l'érythropoïèse qui consiste en la prolifération, la différenciation et la maturation des érythrocytes au niveau de la moelle osseuse en se liant spécifiquement aux récepteurs situés sur les précurseurs des globules rouges (62). L'EPO inhibe également l'apoptose des précurseurs érythroïdes et stimule la synthèse d'hémoglobine (74). Cette production de globules rouges s'effectue à un taux relativement bas pour le remplacement des cellules âgées mais est fortement activée lors de pertes sanguines ou lors d'une baisse d'oxygène disponible

(hypoxie). Dans ces conditions, la production d'EPO est 1000 fois plus élevée (36). Conséquemment, le nombre de globules rouges augmente considérablement et la capacité de transport d'oxygène s'améliore et l'organisme retrouve son homéostasie. Cette étroite régulation de l'expression s'orchestre au niveau de la transcription (ARNm). Plusieurs types de gènes sont modulés en réponse à l'oxygénation sanguine comme les facteurs de croissance angiogéniques, les transporteurs de glucose et les enzymes et facteurs de transcription impliqués dans l'adaptation à l'hypoxie (36). Ces gènes possèdent en 5' et 3' des éléments de régulation liant des facteurs de transcription et des molécules accessoires. L'"hypoxia inducible factor-1" (HIF-1) est le principal facteur de transcription impliqué dans l'activation de l'expression des gènes en condition hypoxique (129). Le HIF-1 est un hétérodimère composé de deux sous-unités : α et β . Bien que le HIF-1 β soit constitutivement exprimé, les niveaux de HIF-1 α sont étroitement contrôlés selon l'oxygène disponible. En normoxie, l'oxygène et le fer présents mènent à la dégradation du HIF-1 α par la voie ubiquitine-protéasome (102). Lors de l'hypoxie, sa dégradation est impossible et le HIF-1 α peut transloquer à travers la membrane nucléaire, se lier au HIF-1 β , et activer des gènes cibles spécifiques. Le HIF-1 se lie à l'"hypoxia responsive element" (HRE) situé en 3' à 100 pb du site de polyadénylation (130). En effet, la plupart des gènes répondant à l'hypoxie possèdent une région régulatrice en 3' essentielle à l'induction. HIF-1 interagit également avec les coactivateurs transcriptionnels p300/CBP qui possèdent une activité acétyl-transférase des histones permettant l'ouverture de la chromatine pour ainsi favoriser l'expression génique. Toutefois, le complexe p300/CBP-HIF-1 se lie

également aux facteurs de transcription classiques situés en 5' du gène. Ces observations ainsi que d'autres études sur l'induction hypoxique proposent que l'activation des gènes se fait via la formation d'un complexe multitranscriptionnel créant une boucle entre la région promotrice 5' et régulatrice 3' (103).

La proportion de globules rouges dans le sang est la façon la plus simple de déterminer l'état d'oxygénation d'un individu. Pour ce faire, un capillaire de verre rempli de sang est centrifugé pour compresser les globules rouges au fond et on mesure ensuite le pourcentage occupé par rapport au plasma. Cette valeur est appelée l'hématocrite (Ht) et peut être le reflet du niveau d'EPO métabolique lorsque les fonctions hématopoïétiques sont normales.

Une diminution d'EPO peut être une des causes de l'anémie, réduisant le nombre de globules rouges produits ainsi que le taux d'oxygène métabolique. L'anémie est souvent une complication majeure reliée à l'insuffisance rénale chronique, à plusieurs types de cancer (113) ou à des infections virales immunosuppressives (131) et ce autant chez l'humain que chez les chiens et les chats. Dans tous ces cas, l'apport d'oxygène aux tissus diminue, le débit cardiaque augmente et le système immunitaire ainsi que l'acuité mentale s'affaiblissent (70).

Depuis la production de la première rh-EPO équivalente à l'hormone naturelle par les cellules "chinese hamster ovarian" (CHO) (38), le traitement de l'anémie est possible par l'injection fréquente de l'hormone synthétique humaine disponible depuis 1986 (43). Plusieurs formes commerciales sont maintenant disponibles incluant l'epoietin alpha (Eprex) et beta qui varient l'une de l'autre par le taux de glycosylation mais qui ne diffèrent pas en efficacité clinique (117).

Darbepoietin, aussi connu comme "novel erythropoiesis-stimulating protein" (NESP) (83), est un nouvel analogue de rh-EPO beaucoup plus glycosylé que ses prédécesseurs, lui conférant une demi-vie plus longue et réduisant ainsi la dose et la fréquence des injections nécessaires (37).

Pour l'usage vétérinaire, le degré d'homologie entre l'EPO humaine et canine est de 81.3% et de 83.3% pour l'EPO féline (132). Cette identité partielle résulte en la possibilité de formation d'anticorps lorsque la forme recombinante humaine est administrée chez les animaux de compagnie. Dans ce cas, les anticorps peuvent également lier l'EPO endogène, menant à une anémie réfractaire généralement plus grave que l'anémie initiale (97). Certains cas d'hypoplasie érythroïde ont également été observés (27). Pour remédier à cette situation, les EPO recombinantes canine et féline ont été produites et testées en laboratoire mais ne sont pas disponibles commercialement (7, 97). Chez toutes les espèces, l'administration de l'hormone synthétique génère une nette amélioration clinique tels des gains de poids, d'appétit, d'énergie, d'entrain et des fonctions psychologiques améliorées (30, 43, 98). Malgré tout, les coûts de production de l'hormone synthétique sont faramineux et en augmentation constante. De plus, l'injection plusieurs fois par semaine rend le traitement fastidieux.

L'EPO a largement été utilisée en thérapie génique pour plusieurs raisons. Sa bioactivité est facilement mesurable par hématoците, la possibilité d'application pour traiter l'insuffisance rénale chronique, le cancer et les infections virales immunosuppressives est immédiate et le modèle est valable pour toute autre protéine thérapeutique délivrée de façon systémique. Le gène a premièrement été

véhiculé par des adénovecteurs (Adv) administrés par voie intra-veineuse (i.-v.) chez des rongeurs (32, 111). L'application directe chez les humains est cependant difficile dû au fort potentiel immunogène du vecteur et l'administration d'adénovecteurs a également causé la mort d'un jeune garçon en 1999 (120). L'utilisation clinique des Adv a depuis été mise de côté. Plusieurs études ont utilisé l'adénovecteur associé (AAV) administré par voie intra-musculaire (i.-m.) chez la souris (63, 67), le chat (11) et le babouin (139). Cependant, une diminution de l'expression est souvent observée puisque le transgène d'un AAV demeure majoritairement sous forme épisomale dans la cellule et peut être perdu à long terme. De plus, il y a possibilité de contamination par le vecteur auxiliaire.

La thérapie génique *ex vivo* (cellulaire) est beaucoup plus biosécuritaire parce qu'elle limite le transfert de matériel viral au patient. De plus, les cellules thérapeutiques sont généralement administrées sous la peau et sont retenues ensemble par un support solide, favorisant les échanges paracrins. Les premières études de délivrance d'EPO par une cellule autologue ont été réalisées à partir de cellules vasculaires de la couche musculaire de l'aorte chez les rongeurs (55, 89). Toutefois, les cellules de muscle lisse sont difficilement récoltées, limitant leur usage. Les cellules souches hématopoïétiques et mésenchymales sont par contre facilement obtenues par une simple ponction de la moelle osseuse et elles possèdent un fort potentiel de transduction par un rétrovecteur (39, 123). Des cellules mésenchymales murines et humaines, aussi appelées cellules stromales de la moelle osseuse (CSMO), rétrotransduites pour produire l'EPO et réimplantées chez la souris ont permis d'atteindre des valeurs d'hématocrite élevées et soutenues

pendant trois mois (28, 40). Dans ces études, les cellules stromales sont incorporées dans un support solide (dérivés de matrice extracellulaire produite par des cellules murines en culture) et ensuite administrées sous la peau, permettant le retrait de l'implant à la fin du traitement ou s'il y a complications.

Pour un traitement idéal, il est préférable que la production de l'agent thérapeutique se fasse de manière contrôlée, selon les besoins du patient. Cependant, les éléments de régulation en 5' et 3' du gène de l'EPO sont beaucoup trop longs pour s'insérer dans les vecteurs en plus du gène thérapeutique. De plus, les facteurs de transcriptions et les molécules accessoires nécessaires doivent être présents dans l'environnement cellulaire. À ce jour, d'autres éléments régulateurs plutôt artificiels ont été testés pour moduler l'expression de l'EPO. Des promoteurs inductibles chimiquement ont été utilisés chez des souris avec une expression de l'EPO contrôlée par l'administration de doxycycline (101, 110) ainsi que chez des primates par l'administration de rapamycine (135). L'expression de l'EPO a également été améliorée via l'insertion d'un élément de régulation post-transcriptionnel du virus de l'hépatite de la marmotte (WPRE) en 3' et de l'ajout d'une séquence Kozak en 5' (105). Toutefois, le seul élément de régulation répondant à l'hypoxie a été étudié à l'aide d'un AAV administré i-m chez des souris normales et anémiques. L'expression de l'EPO était sous le contrôle d'un élément de réponse à l'hypoxie Oxford Biomedica (OBHRE). Cette régulation a permis aux souris anémiques d'atteindre des niveaux d'hématocrite normaux tandis que celles ayant un promoteur CMV constitutif ont développé une polycythémie fatale (13, 14).

Il a été discuté plus haut de l'importance de l'identité parfaite de l'érythropoïétine exogène face à la forme endogène pour éviter la formation d'anticorps et développer une auto-anémie. Malgré cette considération, des primates ayant reçu l'EPO de macaque véhiculée par un AAV et injectée i.-m. ont développé des anticorps contre la forme endogène, induisant ainsi une anémie sévère (Ht < 10%) (47). Les séquences génétiques du transgène et de l'EPO endogène étant identiques, il est possible que le potentiel antigénique soit dû à une conformation différente ou à des modifications post-transcriptionnelles inadéquates. Cette formation d'anticorps a également été observée chez des humains souffrant de thalassémie recevant l'EPO recombinante humaine (126), probablement à cause de la forme non-glycosylée de la protéine synthétique. Il faut donc être très attentif à ce problème puisque le type de cellule employé pour produire la protéine semble être critique pour une synthèse adéquate sans formation d'anticorps.

2.2 Facteur VIII et IX

L'hémophilie A et B sont des maladies génétiques reliées au chromosome X causées par un défaut ou une absence des facteurs de coagulation VIII et IX respectivement. Il en résulte une incapacité du sang à coaguler. Bien que la forme recombinante des facteurs VIII et IX soit disponible, la thérapie génique est une voie thérapeutique beaucoup plus attirante pour les mêmes raisons que le traitement de l'anémie par l'érythropoïétine. Cependant, la bioactivité des facteurs VIII et IX dépend de plusieurs modifications post-traductionnelles précises, d'une conformation juste et de molécules accessoires (125). Par conséquent, les facteurs VIII et IX exogènes ne peuvent pas être produits par n'importe quel type cellulaire. Par

exemple, les cellules souches hématopoïétiques ne peuvent sécréter des niveaux thérapeutiques de facteur VIII *in vivo* (124). Les cellules idéales seraient les hépatocytes et des études tentent de développer des vecteurs spécifiques pour le foie selon le sérotype utilisé (46) ou bien des vecteurs ayant un promoteur spécifique pour un tissu donné. Les vecteurs viraux utilisés pour la délivrance de facteur VIII ou IX sont les adénovecteurs et les AAV administrés i.-v. ou i.-m. chez des souris hémophiles (6), des chiens hémophiles (128) et des primates (3, 46). Toutefois, même les dernières générations d'adénovecteurs restent partiellement immunogènes et la spécificité cellulaire des AAV reste encore à développer puisque des traces du vecteur peuvent être retrouvées dans tous les organes.

La thérapie génique *ex vivo* utilisant les cellules stromales de la moelle osseuse (CSMO) est le modèle le plus efficace et sécuritaire à ce jour pour le traitement de l'hémophilie A et B. En effet, les CSMO murines, canines, porcines et humaines peuvent produire des quantités thérapeutiques de facteurs VIII et IX fonctionnels lorsque transduites par un rétrovecteur (21, 22, 73). Cette voie de traitement est la plus prometteuse à ce jour pour le traitement de l'hémophilie chez l'humain.

3. Vecteurs viraux

3.1 Définition

Le cycle de vie d'un virus peut être divisé en deux phases distinctes : l'infection, où le matériel génétique viral est inséré à l'intérieur de la cellule et la réplication, qui consiste en la production de virus infectieux. Les vecteurs utilisés en

thérapie génique ne contiennent pas les gènes essentiels à leur réplication dans la cellule ingénierée et les chances de produire des particules infectieuses sont ainsi réduites. L'infection non-répliquative menant à l'introduction d'information génétique nouvelle dans la cellule cible se nomme la transduction. En thérapie cellulaire, la transduction est effectuée *in vitro*, augmentant ainsi le biosécurité de l'usage des vecteurs viraux puisqu'ils ne retournent pas directement au patient.

3.2 Propriétés

Un transfert efficace du matériel thérapeutique dans la cellule cible exige que le vecteur possède une molécule de surface permettant son adhésion à la surface de la membrane de la cellule cible. L'ingénierie génétique permet aujourd'hui de modifier ou changer la molécule de surface pour générer des vecteurs avec un tropisme d'infection bien défini tout en tenant compte que la toxicité des vecteurs pour les cellules cibles doit être faible. On appelle ce processus pseudotypage. En effet, il est possible de rendre un vecteur spécifique à une cellule ou un hôte cible selon les récepteurs qu'ils possèdent. Dans certains cas, cette modification permet de stabiliser la particule et peut également permettre de concentrer le vecteur comme dans le cas de la protéine G du virus de la stomatite vésiculaire (VSV-G) chez les rétrovecteurs (18, 121).

Pour certains modèles de thérapie, l'expression du gène d'intérêt doit être étroitement régulée selon le besoin. Le gène d'intérêt peut être contrôlé selon le promoteur utilisé de par sa nature constitutive ou inductible. Dans le premier cas, il n'y a aucun contrôle sur l'expression génique tandis qu'un promoteur inductible nécessite l'administration de drogue généralement par voie orale au moment désiré.

Par exemple, l'opéron tétracycline est un système largement employé et permet l'expression d'un gène lors de l'ajout de l'antibiotique dans la diète de l'animal (49, 101, 110). Des éléments de réponse à des molécules ou à des drogues sont également utilisés tels le HRE dans le cas de la régulation selon l'oxygène disponible (13) et le "glucocorticoid responsive element" (GRE) (61) chez des cellules eucaryotes. On retrouve également des promoteurs qui sont spécifiques pour un certain tissu; i.e. l'expression du gène n'est possible que dans un tissu donné (24, 76)

3.3 Rétrovecteurs (Rv)

Les rétrovirus sont des virus enveloppés par une double couche de lipides et dont la capsidie contient un homodimère d'ARN linéaire simple-brin d'environ 7 à 11 kb. L'infection débute par l'interaction entre l'enveloppe virale et les récepteurs de la membrane plasmique de la cellule. Cette étape mène à l'internalisation de la capsidie virale dans la cellule et l'ARN viral est libéré. L'ARN simple brin est ensuite rétro-transcrit en ADN double brin par la transcriptase inverse virale (RT). L'intégrase du virus reconnaît l'ADN viral double brin ainsi que des séquences spécifiques et s'ensuit l'intégration dans le génome cellulaire. Le génome rétroviral possède aux extrémités deux longues séquences répétées appelées "long terminal repeat" (LTR). Cette séquence agit en *cis* durant l'expression des gènes, l'encapsidation, la rétro-transcription et l'intégration dans le génome (65). Les rétrovirus simples possèdent les gènes *gag*, *pol* et *env* codant respectivement pour les protéines structurales, les enzymes polymérase et intégrase et les glycoprotéines de surface. L'internalisation de l'ARN viral à l'intérieur de la capsidie implique l'interaction entre les protéines virales Gag et une séquence d'encapsidation Ψ située en 5' du génome viral (51).

L'infection humaine par certains rétrovirus peut mener au cancer (e.g. oncoretrovirus) ou à l'immunodéficience due au virus d'immunodéficience humaine (VIH) (25).

Dans le cas des rétrovecteurs, les gènes viraux sont retirés et seuls restent les LTR et le signal d'encapsidation Ψ . Cette délétion laisse place à environ 8 kb d'ADN exogène. Cette séquence peut ensuite être transfectée dans une lignée cellulaire possédant les gènes viraux (*gag*, *pol* et *env*) sur deux constructions moléculaires distinctes, permettant ainsi la production de particules contenant uniquement l'ARN thérapeutique. Ce système augmente fortement le nombre de recombinaisons nécessaires pour générer des particules répliquatives. En plus du gène thérapeutique, les vecteurs rétroviraux possèdent généralement un gène marqueur permettant l'identification des cellules infectées. On utilise généralement une protéine fluorescente qui permet de vérifier l'efficacité de transduction en microscopie ou par cytométrie de flux. Il est également possible de sélectionner les cellules modifiées en incluant un gène de résistance à une drogue (2). Ce gène situé en aval du gène thérapeutique est séparé de celui-ci par un "internal ribosome entry site" (IRES), permettant aux deux gènes d'être sur le même ARNm. Cette construction, appelée bicistronique, procure une expression plus stable des deux gènes, permet d'introduire des gènes plus grands, donne un titre viral plus élevé et évite le problème d'interférence de promoteurs (51).

L'intégration du matériel génétique dans le génome cellulaire est une propriété très avantageuse des rétrovecteurs. Bien que l'intégration ne garantit pas l'expression stable du gène, elle assure la conservation du gène pour toute une population cellulaire clonale; ce qui est très attrayant pour la transduction des cellules

souches. Cependant, l'accès à la chromatine du complexe de pré-intégration des oncovecteurs n'est possible que lorsque la membrane nucléaire est dissoute. Cette étape se produit pendant la mitose et le rétrovecteur ne peut donc s'intégrer au génome que pour des cellules en division. En revanche, le complexe de pré-intégration d'un autre membre des retroviridae, le lentivirus, transloque à travers le nucléopore et peut donc infecter efficacement une cellule quiescente (109). Toutefois, malgré les récents avancements dans le développement des lentivecteurs pour une transduction efficace, leur usage est limité puisqu'ils sont dérivés du VIH et la création d'une infection menant à l'immunodéficience reste possible (15, 137).

Les Rv sont les candidats de choix pour la transduction des cellules souches destinées à être administrées chez des hôtes tels les rongeurs (40, 89) et les primates (31) parce que ces cellules ont un potentiel élevé de réplication. Chez les humains, des enfants souffrant du syndrome d'immunodéficience sévère (SCID) ont reçu des cellules souches hématopoïétiques (CSH) rétrotransduites pour produire la chaîne γ des immunoglobulines et le traitement s'est avéré très efficace (53). Toutefois, deux patients sur neuf ont développé une leucémie et les causes possibles sont traitées plus loin (Voir section 5.). Cet effet néfaste a remis en doute l'usage des Rv.

On tente tout de même de diminuer les risques d'activation de gènes causée par l'intégration du provirus en développant des Rv dont l'intégration est spécifique à un site donné en modifiant l'intégrase virale ou en incluant une séquence complémentaire à un locus particulier (19, 87).

3.4 Adénovecteurs (Adv)

Le génome des adénovirus (Ad) fait environ 36 kb d'ADN double-brin et encode 50 polypeptides viraux groupés de E1 à E4. Ils sont responsables de plusieurs maladies respiratoires et ont la caractéristique d'être fortement immunogènes. Une fois adhérent au récepteur CAR (coxsackievirus-adenovirus receptor), le virus entre dans la cellule par endocytose et l'endosome est ensuite lysé par des peptides viraux pour permettre au génome viral de pénétrer dans le noyau. Les Adv peuvent donc infecter des cellules qui ne sont pas en répllication. Une seule cellule peut produire 10 000 virions lors de la lyse induite par le virus (65).

Plusieurs générations d'adénovecteurs ont été produites en éliminant graduellement les gènes viraux (E1 à E4) et diminuant ainsi l'immunogénicité. La quantité de gène thérapeutique peut atteindre 32 kb, i.e. la plus longue séquence permise par quelque vecteur que ce soit. La complexité du génome adénoviral rend impossible la création d'une lignée d'encapsidation. On doit donc utiliser lors de la transduction un deuxième virus dont le matériel génétique est dépourvu du signal d'encapsidation. Il faut donc ensuite séparer le virus du vecteur et ce procédé est difficile à effectuer efficacement à grande échelle. Dans la cellule transduite, l'ADN de l'adénovecteur persiste dans le noyau sous forme épisomale et les cellules descendantes perdent rapidement le gène thérapeutique, ce qui nuit à la thérapie à long terme.

Malgré la faible toxicité observée chez les animaux de laboratoire (32), un essai clinique chez l'humain a causé la mort d'un jeune garçon en 1999, remettant

ainsi en question l'usage des Adv. De plus, l'application chez les humains est complexe puisque 95% de la population possède des anticorps neutralisant les sérotypes utilisés (2 et 5). Il est cependant possible d'effectuer un pseudotypage à l'aide d'Adv animaux. Malgré la grande capacité de matériel thérapeutique et la production de titres élevés ($>10^{13}$ particules/ml), l'adénovecteur ne semble pas être le candidat le plus sécuritaire à ce jour.

3.5 Adénovecteurs associés (AAV)

Les adénovirus associés sont des parvovirus humain dont l'infection productive dépend d'un virus auxiliaire, généralement un adénovirus. À titre de vecteur, leur capacité d'encapsulation d'environ 5 kb limite leur usage. Ils possèdent d'autres désavantages tels une contamination possible par le virus auxiliaire (adénovirus) et un transfert génique faible (120). Les AAV sont toutefois non-pathogènes, n'induisent aucune réponse inflammatoire et peuvent efficacement infecter des cellules en division ou dormantes (139).

L'usage des AAV en thérapie génique donne des résultats encourageants chez la souris (14, 101), les chats (11) et les primates (135, 139). Toutefois, seule l'injection systémique (i.-v. ou i.-m.) du vecteur est possible à ce jour, ce qui représente toujours un désavantage par rapport à la présence de vecteur auxiliaire contaminant.

3.6 Virus Herpes simplex (HSV)

L'herpes-virus simplex type 1 (HSV-1) possède un génome de 152 kb composé d'ADN linéaire double-brin contenant au moins 84 gènes dont la moitié ne sont pas requis pour la réplication *in vitro* (65). L'insertion de matériel génétique

allant jusqu'à 30 kb est donc possible à plusieurs endroits. Le vecteur est généré par la délétion des cinq gènes précoces essentiels aux fonctions lytiques du virus et à l'expression des protéines virales. De plus, la délétion de ces gènes diminue la cytotoxicité du vecteur. Le vecteur peut longtemps persister dans la cellule sous forme épisomale sans induire de réponse immunitaire. Le HSV est spécifique aux cellules du système nerveux et est efficacement utilisé pour le traitement de maladies neuronales affectant le système nerveux (81, 133). Toutefois, l'expression à long terme du transgène chez d'autres types de cellules n'est pas bonne. En plus, le HSV est peu utilisé en phase clinique dû à son fort potentiel inflammatoire (120) et la spécificité du virus est difficilement maîtrisée puisque les mécanismes d'attachement et d'entrée impliquent plusieurs glycoprotéines virales (65).

3.7 Vecteurs hybrides

Dans le but de générer le vecteur parfait, certains chercheurs tentent de combiner des composantes de vecteurs différents pour obtenir les avantages de chacun et de créer un vecteur hybride. La tentative la mieux réussie à ce jour est la combinaison entre les adénovirus et les adénovirus associés. On tente de réunir la spécificité pour le noyau et l'internalisation efficace des Adv avec la machinerie d'intégration spécifique au chromosome 19 des AAV (99). Dans ce cas, on éliminerait la contamination potentielle par le virus auxiliaire, l'intégration du provecteur permettrait une expression stable et de longue durée et cette intégration spécifique à certains sites éliminerait les chances d'activation d'oncogènes cellulaires. Toutefois, l'intégration spécifique à un locus particulier des AAV dépend de la protéine Rep et celle-ci est toxique *in vivo* (120). Il a également été proposé

qu'un adénovirus contenant un génome de rétrovecteur puisse s'intégrer en l'absence d'intégrase rétrovirale (138). Beaucoup d'autres hybrides sont en développement et auront leur place dans le monde de la thérapie génique.

4. Lignées d'encapsulation de rétrovecteurs

Une lignée d'encapsulation est une cellule fournissant l'information génétique nécessaire à la production du Rv. Ces gènes viraux ne possèdent pas le signal d'encapsulation ψ essentiel à leur internalisation dans la capsid virale. Seule la transfection du gène de l'agent thérapeutique muni du signal d'encapsulation permet la production de vecteurs contenant l'ARN thérapeutique. Toutefois, le développement d'une lignée d'encapsulation doit empêcher la formation de particules répliquatives par recombinaison. La possibilité de formation de virus sauvage est cependant très faible en séparant les gènes viraux sur plusieurs plasmides, augmentant ainsi le nombre de recombinaisons nécessaires pour générer des particules répliquatives. Les premières lignées d'encapsulation de Rv produisaient des dérivés du Moloney Murine leukemia virus (MoMLV), un vecteur écotropique ne pouvant infecter que les cellules de rongeurs (78). Une autre lignée de rétrovecteurs a donc été développée pour la transduction de cellules de grands mammifères et surtout humaines (79). Cette étude était un des premiers exemples de modification de l'enveloppe virale (pseudotypage) pour dicter le tropisme des rétroparticules générées. D'autres enveloppes ont ensuite été utilisées pour le pseudotypage de Rv pantropiques telles l'enveloppe du virus de leucémie du gibbon (GALV), l'enveloppe

du rétrovirus félin endogène (RD114) et la protéine G du virus de la stomatite vésiculaire (VSV-G) (58).

Les particules rétrovirales pseudotypées avec GALV sont produites par la lignée humaine 293T et possèdent une efficacité de transduction de cellules hématopoïétiques humaines de 84% (56). Toutefois, aucune technique ne permet de concentrer le vecteur à un titre élevé (58).

Les Rv pseudotypés avec l'enveloppe du virus RD114 démontrent des résultats très intéressants pour l'infection de cellules canines et de primates (48, 66). L'enveloppe de RD114 permet aux vecteurs de résister à l'inactivation par le complément du sérum humain et de plus, leur concentration par ultracentrifugation est facile. L'enveloppe RD114 possède un bel avenir chez les vecteurs rétroviraux.

Les Rv pseudotypés avec VSV-G sont produits par des cellules embryonnaires rénales humaines 293 (88). La lignée 293GPG possède les gènes *gag* et *pol* de MoLV intégrés de façon stable et génère des particules pseudotypées avec VSV-G à titre de protéine de l'enveloppe. Comme mentionné en 1.3.2, le pseudotypage avec VSV-G confère plusieurs avantages aux particules mais, contrairement à GALV et RD114, cette protéine est toxique pour les cellules et ces dernières forment ainsi des syncytia (fusion des membranes cytoplasmiques). L'expression de VSV-G est régulée dans les cellules encapsidatrices selon le système de l'opéron tétracycline, avec un transactivateur qui permet d'induire l'expression du gène d'intérêt au moment voulu en retirant la tétracycline du milieu de culture. Les gènes viraux (*gag*, *pol* et *env*) sont situés sur trois constructions différentes, augmentant fortement le nombre de recombinaisons nécessaires pour générer des particules répliquatives. La transfection

des 293GPG avec le gène thérapeutique muni du signal d'encapsidation ψ engendre la production de titres élevés ($\sim 10^6$ particules/ml) de rétrovecteurs contenant l'ARN thérapeutique.

5. Cellules utilisées pour la délivrance systémique de protéines thérapeutiques

5.1 Cellules stromales de la moelle osseuse (CSMO)

La population cellulaire idéale pour la thérapie cellulaire doit posséder des caractéristiques bien particulières pour faciliter la tâche en laboratoire et rendre le traitement pratique et moins coûteux. En effet, ces cellules doivent être prélevées facilement et en grand nombre, leur potentiel d'expansion en culture doit être élevé et elles doivent être modifiées efficacement par un vecteur donné. Les CSMO possèdent ces caractéristiques et sont largement utilisées en thérapie génique *ex vivo* comme plate-forme de délivrance de protéines thérapeutiques chez la souris (28, 39, 40), les chiens (21) et les primates (9, 31). Les CSMO s'obtiennent facilement et en grand nombre par une aspiration de moelle osseuse rouge, sont facilement transduites par un rétrovecteur et peuvent être réadministrées au donneur (12, 82). Cette transplantation autologue possible minimise les risques de rejet ou de réaction inflammatoire observés lors de transfusions cellulaires, de transplantations de tissu et d'administration de vecteurs viraux. Il a jusqu'à maintenant été démontré que les CSMO peuvent produire des niveaux thérapeutiques de plusieurs protéines telles l'EPO (28), le facteur IX (21, 40, 41) et l'interleukine 1 α (31).

Les CSMO participent au micro-environnement de la moelle osseuse essentiel aux cellules souches hématopoïétiques et autres précurseurs par production de

facteurs de croissance et des contacts inter-cellulaires. On retrouve une CSMO pour 10^5 cellules de la moelle osseuse (33). Les CSMO sont isolées des autres cellules de la moelle osseuse par centrifugation à travers un gradient de densité et sont définies par leur capacité d'adhérer au plastique et par leur forme fibroblastique lorsque cultivées *in vitro* (26). Selon les conditions de culture appropriées, elles forment des colonies dont chacune est issue d'une seule cellule précurseure. Les facteurs mitogéniques sont multiples et diffèrent d'une espèce à l'autre : "platelet-derived growth factor" (PDGF), "epidermal growth factor" (EGF), "acidic" et "basic fibroblast growth factor" (aFGF-bFGF), "transforming growth factor- β " (TGF- β) et "insulin growth factor-1" (IGF-1) (12). Les CSMO demeurent une population hétérogène tel que démontré par les grosseurs variables des colonies dues à des taux de croissance différents et également par les différentes morphologies observées allant de fibroblastes fusiformes à de grosses cellules étoilées (8, 42). Elles maintiennent cependant leur potentiel multipotent car elles ont la propriété de se différencier en ostéoblastes, en adipocytes, en chondrocytes, en myoblastes (123), en cellules vasculaires de muscle lisse (45) et en neurones (12) lorsqu'exposées aux stimuli appropriés et aussi lorsqu'elles sont administrées *in vivo* (35, 59). En effet, les CSMO possèdent une surprenante plasticité et elles peuvent être utilisées comme moyen de thérapie de maladies dégénératives ou comme moyen de reconstruction tissulaire lors de chirurgies ou de lésions chroniques (20, 94).

Bien qu'aucun antigène universel n'ait été identifié, plusieurs études ont trouvé des marqueurs spécifiques à des cellules souches de la moelle osseuse multipotentes selon des conditions de culture données. Les antigènes les plus

communs partagés par les CSMO murines, de primates et humaines sont SH2, SH3, CD29, CD44, CD106, Stro-1 et Sca-1 (31, 84, 92) tandis qu'on a trouvé les CSMO félines positives pour CD9 et CD44 (80). L'identification de ces marqueurs amène la possibilité de séparer les CSMO des autres cellules de la moelle osseuse à l'aide des anticorps appropriés couplés à des billes magnétiques (50). Malgré la pureté obtenue, cette technique demeure fastidieuse, coûteuse et représente un choc supplémentaire pour les cellules.

Le mécanisme de différenciation des CSMO est très controversé. Certains ont même suggéré que les CSMO se "différencient" seulement en fusionnant à des cellules pleinement différenciées. Bien que des études *in vitro* ont démontré que des cellules de la moelle osseuse en co-culture avec des cellules embryonnaires peuvent fusionner avec celles-ci et adopter un phénotype donné et que des cellules de la moelle osseuse implantées chez des souris fusionnent avec des cellules de l'hôte (119), rien n'indique que cette fusion est une propriété intrinsèque aux CSMO. De plus, des CSMO de rat implantées dans un embryon de poulet se différencient comme prévu sans évidence de fusion cellulaire avec les cellules embryonnaires aviaires (93).

De plus, il semble que les CSMO ont la capacité de se dédifférencier et de réacquérir leurs propriétés multipotentes ou bien d'engendrer un tout autre type cellulaire. Ce phénomène est jusqu'à maintenant spécifique aux CSMO et se nomme transdifférenciation (112). En effet, des laboratoires ont observé que les CSMO terminalement différenciées en ostéoblastes peuvent se transdifférencier en chondrocytes ou adipocytes lors du changement de milieu inducteur (112). Il semble donc s'agir d'un mécanisme réversible. Cependant, les preuves de concept pour

confirmer ce comportement sont très strictes. Premièrement, la différenciation doit être démontrée via des marqueurs spécifiques pour le tissu d'intérêt et la population cellulaire étudiée doit être clonale. Ensuite, l'augmentation et la diminution de l'expression de gènes spécifiques doivent être démontrées et le modèle expérimental doit être reproduit dans plus d'un laboratoire (127). En conclusion, les propriétés potentiellement phénoménales des CSMO démontrent leur importante implication dans l'avenir de la thérapie cellulaire.

5.2 Cellules hématopoïétiques souches (CSH)

Les cellules souches hématopoïétiques (CSH) sont aussi largement utilisées en thérapie cellulaire. Elles représentent environ 1-5% de la population cellulaire de la moelle osseuse adulte et sont les précurseurs de toutes les cellules hématopoïétiques du sang. Elles ont la capacité de se renouveler dans la moelle osseuse et en culture. Cependant, l'isolement d'un nombre adéquat de CSH pour usage thérapeutique nécessiterait plus d'un litre de moelle osseuse (94). Leur enrichissement est maintenant facilité par "magnetic cell separation" (MACS) à l'aide d'anticorps anti-CD34, un antigène de surface spécifique aux CSH (52). Cette technique représente toutefois un choc supplémentaire pour les cellules mais ne semble pas nuire à leur comportement. Des études chez les humains ont démontré l'efficacité clinique et le grand potentiel des CSH en thérapie génique *ex vivo* (1, 52). Une étude de traitement d'enfants atteints d'immunodéficience en France ont reçu des CSH rétrotransduites avec l'ADNc de la chaîne commune γ des récepteurs des interleukines 2, 4, 7 et 15. Ceci augmente le taux de réplication des CSH puisqu'elles peuvent répondre aux cytokines et peuvent ainsi rétablir le système immunitaire du patient. Cependant, une

forme de leucémie s'est développée chez 2 patients sur 9 trois ans après le traitement (53). Les deux enfants atteints ont reçu la plus forte dose de CSH autologues. Dans les deux cas, l'insertion du transgène a été trouvée dans le début de la région codante de LMO-2, un gène impliqué dans l'hématopoïèse et récemment lié à la leucémie (95). Les raisons exactes du développement de la leucémie ne sont pas claires puisqu'une seule insertion mutationnelle n'est pas suffisante pour induire une transformation maligne (54). Il faut se demander également si la nature du transgène a joué un rôle. Une étude chez la souris suggère que la chaîne γ coopère avec LMO-2 pour causer la leucémie (29). Le nombre de cellules implantées fait également partie du débat puisque les patients leucémiques ont reçu le plus grand nombre de CSH ingénérées. Ceci augmente le nombre de clones présents et élève le nombre possible de mutations insertionnelles. On suggère donc à l'avenir, lors de modification rétrovirale, de faire un tamisage des clones présents dans la population, et de déterminer le nombre et l'endroit des insertions avant l'implantation. La compréhension des propriétés d'insertion de certains vecteurs est une étape cruciale pour l'application sécuritaire des futures études cliniques en thérapie cellulaire. L'usage extensif des CSH et les complications engendrées ont permis de mettre en évidence les problèmes potentiels pouvant survenir en thérapie génique *ex vivo* (10, 72). Les mêmes complications surviendront lors de l'utilisation d'autres types de cellules et plus particulièrement de CSMO, similaires au CSH de par leur caractère multipotent et leur potentiel mitogénique élevé.

5.3 Fibroblastes et myoblastes

D'autres types de cellules sont employés en thérapie cellulaire pour la délivrance de protéines thérapeutiques mais sont pour la plupart pleinement différenciés, diminuant ainsi leur taux de division *in vitro*. Premièrement, les fibroblastes de la peau peuvent produire des quantités significatives de transgène. Cependant, parce que le nombre de ces cellules diminue avec l'âge, les personnes âgées ne pourraient bénéficier d'une implantation autologue. Seule l'implantation de cellules allogéniques serait possible et il faudrait utiliser une barrière immunoprotectrice pour limiter les risques de rejet (105). De plus, l'inactivation du transgène nouvellement introduit est bien connue chez les fibroblastes (90). Les myoblastes sont également largement utilisés (89, 104), mais possèdent les mêmes désavantages que les fibroblastes et se divisent encore plus lentement. Certains estiment toutefois que ceci prolonge leur survie une fois implantés chez des rongeurs (89, 134) mais encore faut-il les multiplier à un nombre considérable pour l'application chez les grands mammifères.

6. Voies d'administration des cellules en thérapie génique *ex vivo*

6.1 Cellules libres administrées localement ou systématiquement

La voie d'administration de cellules en thérapie cellulaire varie selon le besoin. En effet, en fonction de la maladie traitée, la délivrance de l'agent thérapeutique peut se faire dans la circulation ou à partir d'un organe en particulier. Le type cellulaire employé doit également être considéré puisque les cellules ont besoin d'un environnement favorisant leur viabilité.

Lors des premiers essais d'administration systémique de CSMO par voie i-v, les receveurs subissaient une ablation de la moelle osseuse par chimiothérapie ou par irradiation pour créer une niche disponible pour les cellules (4). Les CSMO pouvaient ensuite participer à la reconstitution des fonctions hématologiques. Ce genre de traitement n'est pas indiqué pour les patients non-cancéreux. Plusieurs études ont ensuite démontré que la création d'un tel espace pour les cellules n'était pas nécessaire de toute façon. Un processus de compétition aurait plutôt lieu entre les cellules implantées et les cellules endogènes, variant selon la dose administrée, et permettrait l'établissement des cellules à un endroit donné (96). De plus, les CSMO étant sélectionnées en culture par leur adhérence au plastique, leur présence dans la circulation sanguine complique l'atteinte d'un endroit adéquat pour leur survie. Malgré tout, les CSMO implantées i.-v. semblent pouvoir migrer et se loger préférentiellement dans la moelle osseuse et les os (33). Les cellules peuvent toutefois se retrouver dans plusieurs viscères tels la rate, les poumons et les reins (34). Cette dispersion incontrôlée peut engendrer des effets néfastes à long terme.

Une des premières utilisations de CSMO transduites en thérapie génique *ex vivo* utilisait le gène de résistance à la néomycine. Les CSMO étaient administrées chez des souris par voie intraveineuse et il y avait expression du gène jusqu'à 6 mois après l'implantation (5). Les CSMO ont ensuite été modifiées pour produire divers agents thérapeutiques après transplantation comme le complexe majeur d'histocompatibilité type II (60), l'interleukine 3 (86) ou le facteur IX (21).

Les CSH implantées lors du traitement des enfants-bulles souffrant de SCID ont été administrées systématiquement puisque l'objectif était de reconstituer une

population lymphocytaire fonctionnelle. Le traitement a été efficace malgré le développement de la leucémie (53).

Des récentes études ont développé un traitement de l'hémophilie A avec des CSMO produisant du facteur VIII implantées dans la rate chez des souris NOD-SCID (124). Une modification des éléments régulateurs du gène, dont les LTR du rétrovecteur, ont permis la détection du Facteur VIII jusqu'à 93 jours suivant l'implantation dans la rate.

Des myoblastes utilisés en thérapie cellulaire ont été administrés i.-v. dans la carotide sous forme libre. Cette intervention nécessite une anesthésie générale et les manipulations sont complexes et dangereuses (89). Cette étude demeure toutefois une des premières voies de délivrance d'EPO par thérapie génique chez des rats.

Le principal désavantage de l'administration de cellules libres en thérapie cellulaire reste l'impossibilité d'arrêter le traitement, comme en cas de complications par exemple. Des études d'implantation de CSMO transduites pour la production d'EPO comparant différentes routes d'administration chez la souris démontrent les avantages de grouper les cellules localement à l'aide d'un support solide (28, 40). Puisque la survie cellulaire s'en trouve généralement prolongée, la durée de l'effet biologique est aussi nettement améliorée.

6.2 Cellules incorporées dans un support solide administré localement

L'incorporation des cellules dans un support solide lors de thérapie génique *ex vivo* comporte plusieurs avantages et ce surtout lorsqu'elles servent de "biopompe" d'un agent thérapeutique. Les cellules contenues dans la matrice sont généralement implantées sous la peau, facilitant le retrait de celles-ci lors de la fin du traitement ou

s'il y a complications. La proximité des cellules permet également de favoriser les échanges paracrins et les contacts entre cellules dans le but de prolonger la survie cellulaire. De plus, ce mode d'administration permet la mise au point des paramètres d'implantation tels le nombre de cellules nécessaire, la grosseur des implants et leur localisation. En plus, la résection des implants permet l'étude de la viabilité cellulaire. La plupart des matrices naturelles utilisées chez les souris sont des composantes de la matrice extracellulaire tels le collagène, l'acide hyaluronique et l'hydroxapatite (28, 41). Il existe également commercialement des combinaisons de ces composées comme le Collagraft™ utilisé pour des CSMO humaines sécrétant le facteur IX (73). On recherche dans tous les cas un faible potentiel immunogène de la matrice et une bonne vascularisation *in vivo* pour faciliter le passage de la protéine dans la circulation tout en assurant une bonne oxygénation.

Le collagène bovin utilisé en chirurgie plastique est une autre matrice potentielle puisque sa biocompatibilité chez l'humain est bien connue (115). Une fois injecté localement, le collagène bovin se fait entourer par une capsule fibreuse. Cette capsule confère à l'implant plusieurs avantages : le potentiel d'immunoréactivité est diminué, les chances de migration de la matrice et des cellules insérées sont limitées et la persistance dans le temps est augmentée (75). Toutefois, cette capsule nuit à la vascularisation et à l'oxygénation de l'implant (115). Le collagène bovin est généralement couplé à du glutaraldéhyde qui a pour effet d'augmenter l'intégrité de la matrice, de réduire le potentiel immunogène et ainsi augmenter la persistance dans l'hôte. Cependant, il est possible que le glutaraldéhyde soit une des causes de la

pauvre vascularisation de l'implant (41) par le fait qu'il possède une certaine cytotoxicité et qu'il peut nuire à l'infiltration des cellules endothéliales.

Une réaction allergique envers le collagène bovin est toujours possible chez les humains (107). Des matrices de nature humaine ont donc été développées, appelées Autologen et Dermalogen, mais la réaction inflammatoire envers celles-ci est supérieure au collagène bovin (107). Il est possible que le système immunitaire interprète le collagène humain injecté comme du tissu meurtri.

Tout récemment, des polymères ont été synthétisés dans le but de produire une matrice artificielle ayant la propriété d'agir comme barrière immunoprotectrice pour les cellules implantées, évitant ainsi tout contact intercellulaire pouvant mener à la destruction des cellules par les lymphocytes T cytotoxiques. La semi-perméabilité de ces membranes permet le passage de l'agent thérapeutique, de l'oxygène et de cytokines. Ces matrices rendent l'implantation de cellules allogéniques et même xénogéniques possible et ce sans l'utilisation d'immunosuppresseurs, évitant ainsi la nécessité d'utiliser des cellules autologues. Ainsi, des fibres creuses de méthallylsulfonate polyacrylonitrite-sodium de 100 μm de diamètre avec une porosité de 80 kDa contenant des fibroblastes sécrétant l'EPO ont permis une élévation d'Ht pendant 4 mois chez des souris. Des cellules viables étaient présentes 6 mois après l'implantation (110). Une forte vascularisation en périphérie de la matrice a été observée et l'inflammation due à la matrice était minime. Une équipe de Suisse travaille depuis longtemps avec un autre type de fibres creuses. Elles sont faites de polyether sulfone, ont un diamètre allant de 350-524 μm et peuvent avoir une porosité très variable de 280-1000 kDa (100, 105). Bien que ces fibres soient plus grosses, les

premiers essais démontraient une forte nécrose centrale due à la forte densité cellulaire. Les molécules intracellulaires ainsi relâchées pouvaient traverser la membrane et induire une réponse immunitaire. Cette nécrose centrale a fortement été diminuée par l'ajout d'une matrice de polyvinyl alcool à l'intérieur de la fibre, réduisant ainsi la densité cellulaire (104, 106). Toutefois, une fibre de 1 cm de long ne peut contenir que 10^5 cellules pour une souris. Un humain, faisant 2000 à 4000 fois le poids d'une souris, devrait recevoir une fibre de 20 à 40 mètres de long.

Il existe des capsules commerciales (Theracyte) testées jusqu'à maintenant chez des rongeurs mais dont l'application chez l'humain semble plus facile puisqu'elles se vendent en plusieurs grandeurs. Elles sont composées d'une double couche de polytétrafluoroéthylène et possèdent des pores de 5 μm . La couche interne sert d'immunoisolation et la couche externe induit la néovascularisation (77). Ces capsules sont faiblement immunogènes, permettent l'implantation de cellules allogéniques et assurent une excellente viabilité des cellules tel que décrit pour des myoblastes et des CSMO sécrétant l'EPO (9, 134). Elles possèdent également un fort potentiel de vascularisation (122).

Une des stratégies pour augmenter la viabilité cellulaire vise à conditionner les cellules avant l'implantation, i.e. les habituer à l'environnement de la matrice caractérisé par des taux faibles d'oxygène, des variations de température et la quasi absence de nutriments. Toutefois, les derniers polymères utilisés peuvent permettre d'inclure des nutriments à l'intérieur des fibres creuses et la température peut être plus stable dans certains cas. Certaines études proposent également de cultiver les cellules d'intérêt sur la matrice pour faciliter le comportement cellule-matrice avant

l'implantation (64). Toutefois, cette stratégie est plutôt valable pour la régénération tissulaire à l'aide de cellules stromales plutôt que dans le contexte de glande endocrine synthétique.

7. Modèles animaux

La démonstration de l'efficacité *in vivo* de la thérapie génique se fait initialement chez les souris pour plusieurs raisons éthiques, pratiques et économiques. En thérapie génique, ceci implique que les vecteurs, les conditions de transduction et les cellules utilisées ne sont valables que pour l'espèce murine. Bien que les modèles murins peuvent démontrer les effets néfastes engendrés par le traitement, il est toutefois impossible de prétendre que les complications observées seront les mêmes chez l'humain puisqu'il y a trop de variables entre les espèces et les systèmes utilisés. Les complications pouvant survenir en thérapie cellulaire dépendent de la nature du transgène, du vecteur utilisé, du type cellulaire, de l'efficacité de transduction, du nombre de cellules implantées, du conditionnement des sujets, du type de support solide et du bagage génétique du receveur (72). De plus, l'efficacité de transfert génique est généralement meilleure chez les cellules murines que chez la plupart des cellules de grands mammifères (57). La sélection des cellules modifiées se fait parfois avec un gène de résistance mais ceci nécessite une prolifération *ex vivo* prolongée qui fait augmenter les risques de transformation cellulaire (16). Il a été démontré que les chances d'une telle transformation sont diminuées en minimisant la culture *ex vivo* (17).

Les lignées cellulaires de souris utilisées en thérapie génique ont également un fort potentiel de transformation cancéreuse puisqu'elles sont d'origine clonale et sont multipliées en culture depuis fort longtemps. Ces risques sont d'autant plus augmentés lorsque ces lignées sont modifiées par un rétrovecteur. Dans ce cas, le risque de tumorigénèse liée à une oncogénèse insertionnelle sur une période de six mois est de 1 sur 1496 (72). Dans le cas des études employant l'EPO, la cinétique de variation de l'Ht de la souris ne peut être la même que chez l'humain à cause de la différence de vie entre les globules rouges murins (~43 jours) et humains (~100 jours) (23). Toutefois, les globules rouges des grands mammifères comme le chien ou le mouton possèdent un cycle de vie similaire à celui des humains, faisant d'eux de meilleurs modèles d'étude.

Pour toutes ces raisons, la mise au point d'études expérimentales et pré-cliniques en thérapie génique est pour plusieurs beaucoup plus adéquate chez les grands mammifères pour l'application sécuritaire chez les humains. Les similitudes entre les grands mammifères et les humains au niveau de l'espérance de vie, du poids corporel, du comportement des cellules souches, de l'hématologie et de la réponse aux cytokines permettent de prédire des comportements semblables chez les espèces canines et humaines (58). En thérapie génique, l'efficacité de transfert génique dans les cellules est également similaire. Les grands mammifères souffrent aussi de maladies génétiques et spontanées ressemblant à celles des humains, rendant la thérapie possible en médecine vétérinaire. Un des aspects les plus importants concernant les modèles de grands mammifères est la possibilité d'un suivi à long terme lors d'essais cliniques puisque les complications liées à la transformation ou au

rejet des cellules surviennent plusieurs mois suivant le début du traitement. Les modèles de rongeurs ne permettent pas une étude à long terme dû à leur courte espérance de vie. En plus, puisque la thérapie cellulaire n'est à présent possible qu'en utilisant les cellules du donneur, il serait intéressant de déterminer si l'implantation allogénique serait envisageable en utilisant les cellules d'un donneur universel. Les grands mammifères permettraient l'étude de ce concept avec la possibilité d'améliorer l'immunogénicité face à des cellules de la même espèce (85).

La nécessité de mise au point des traitements chez les grands mammifères a pris toute son importance suite à l'incident de la leucémie développée chez des enfants ayant reçu des CSH rétrotransduites (52, 53). En fait, les études chez les rongeurs n'étaient pas suffisantes pour connaître les effets néfastes possibles à long terme puisque chez les enfants, la leucémie s'est développée trois ans après le traitement. De plus, il est impossible de savoir si cette transformation cellulaire a été favorisée dans ce traitement expérimental ou si cette intégration dans le même locus n'est qu'un hasard.

Des chercheurs travaillant chez les grands mammifères se sont réunis pour lancer un projet d'envergure d'implantation de CSH efficacement rétrotransduites chez des chiens et des primates pour évaluer les effets à long terme d'une mutation insertionnelle. Ainsi, 65 primates et 17 chiens ont reçu des CSH rétrotransduites avec les gènes GFP ou *neo* à des doses similaires à l'étude des enfants SCID (68). Malgré un nombre élevé de clones possédant plusieurs sites d'intégration, aucun effet secondaire n'a été observé sur une période moyenne de 3,5 ans. En plus, 400 sites d'intégration ont été identifiés : ils suivaient un patron aléatoire ou favorisaient les

régions transcriptionnellement actives. Toutes ces observations indiquent que le potentiel de transformation des cellules est plutôt relié à la nature du transgène ou bien à la maladie traitée (1 gène, 1 maladie). Ce concept encourage les applications futures de d'autres traitements chez des grands mammifères et les humains. De plus, l'expression stable du transgène a été détectée jusqu'à 6 ans chez des chiens et des primates (68), démontrant ainsi l'efficacité à long terme de la thérapie cellulaire.

III. MATÉRIEL, MÉTHODES ET RÉSULTATS

Autologous canine bone marrow stromal cells engineered with the canine EPO gene and implanted *in vivo* produce and release systemically functional EPO over a prolonged period.

KEY WORDS: gene therapy, erythropoietin, dogs, bone marrow stromal cells, retrovectors, anemia.

François Fontaine¹, Arnaud Duval¹, Juan Hernandez², Nicoletta Eliopoulos³, James N. MacLeod⁴, Marilyn Dunn², Jacques Galipeau³, Daniel Martineau¹

¹Dép. Microbiologie et Pathologie; ²Dép. Sciences cliniques, Faculté de Médecine Vétérinaire (FMV), Université de Montréal, Saint-Hyacinthe, PQ

³Lady Davis Institute, Montreal Jewish General Hospital, Montreal, PQ, Canada

⁴Baker Institute for Animal Health, Cornell University, Ithaca, NY, U.S.A.

Abstract

Erythropoietin (Epo) is widely used for the development of different approaches in gene therapy including the delivery of therapeutic proteins by autologous cells genetically engineered *ex vivo*. Bone marrow stromal cells (BMSC) can be engineered to produce considerable amounts of therapeutic proteins such as Epo. It has been recently demonstrated that retrovirally modified murine BMSCs implanted subcutaneously can systemically deliver pharmacological levels of Epo in the mouse for a sustained period. However, a proof of concept is necessary in a large mammal model before the application of this approach in human patients. The purpose of this work was to implant autologous canine BMSC retrovirally engineered to produce canine EPO in immunocompetent dogs. The immunocharacterisation of canine BMSCs showed that the cells are 100% CD44 positive. The transduction efficiency by retrovectors was 73 to 92% as analysed by FACS, and the *in vitro* production of canine EPO as measured by ELISA was 1.5 to 9.3 U of EPO/ 10^6 cells/ 24 hrs. The canine EPO-engineered BMSCs were embedded in bovine collagen, and the resulting organoid was implanted subcutaneously (sc) in NOD-SCID mice. Mean hematocrit (Ht) of treated mice increased significantly 66 % and remained elevated for over 4 months. The canine EPO-engineered BMSCs were embedded within the same matrix and implanted sc in the respective donor dogs. The number of embedded BMSCs and volume of implants were optimized: 32 implants containing 4×10^6 BMSCs each were implanted in each of 4 dogs. Mean Hts of treated dogs rose 28% in 12 days and remained elevated significantly for 5 weeks compared to control dogs. This clinical trial could be used for the treatment of domestic animals suffering from anemia related to chronic renal failure, viral infection or cancer. In addition, these results demonstrate the feasibility of cellular therapy in large immunocompetent mammals, a crucial step toward its application in people.

KEY WORDS: anemia, bone marrow stromal cells, dogs, erythropoietin, gene therapy, retrovectors.

Introduction

The implantation of autologous cells genetically engineered *ex vivo* is a promising approach for the systemic and continuous delivery of serum proteins such as factors VIII and IX whose severe deficiencies may result in life-threatening hemorrhage. The systemic delivery of erythropoietin (EPO) by engineered cells has been used as a model system for the delivery of such proteins because the pharmacological endpoint, increased hematocrit (Ht), is easily measured. Epo is also a therapeutic protein used in the treatment of chronic renal failure (CRF) and other diseases that lead to anemia. However, the intravenous infusion of recombinant human Epo (rhEpo) is expensive, may lead to the development of antibodies against exogenous and endogenous Epo, and requires weekly injections by specialized personnel (Casadevall *et al.* 2002). These drawbacks might be avoided by implanting autologous cells that produce and release Epo in pharmacological doses for prolonged periods.

The murine models used to develop new therapeutic approaches differ from human patients in many respects, notably by the small body mass, short lifespan, homogenous genetic background of rodents and the lack of spontaneous diseases resembling those of humans. In contrast, dogs resemble humans by their comparable body mass, relatively long life span, physiological features such as similar erythrocytes half life (100-115 days in dogs, 120 days in humans), heterogeneous genetic background and the occurrence of spontaneous diseases such as CRF (Cowgill *et al.* 1998; Christian *et al.* 2000). To infer to people the results obtained in rodents may cause accidental deaths that could be avoided by using a more realistic animal models such as dogs.

For cellular therapy to be applicable in the clinic, target cells must be easily accessible, collected in large numbers and expandable *in vitro*. Bone marrow stromal cells (BMSC), also termed mesenchymal stem cells, fulfill these criteria. Canine BMSCs (cBMSCs) have been partially characterized. Like human BMSCs, these are retrovirally transducible albeit with moderate efficiency (Cherington *et al.* 1998). cBMSCs retrovirally transduced with human factor IX (hFIX-cBMSCs) have

expressed and released systemically this protein for a relatively short time (12 days) when reimplanted in donor dogs (Cherington *et al.* 1998).

The implantation of genetically engineered cells may lead to serious problems such as transgene overexpression and tumorigenesis. Unfortunately, should these side effects occur or the treatment simply not be needed, the implantation of therapeutic cells by intravenous injection does not allow reversing the course of the treatment or cell retrieval. In contrast, the physical containment of engineered cells within a suitable matrix facilitates cell retrieval by surgical excision of the matrix.

We previously demonstrated in a rodent model that an FDA-approved matrix consisting of nonpyrogenic highly purified bovine type I (95%) and type III (5%) collagen suspended in phosphate buffered physiological saline is suitable to support viable Epo-transduced murine BMSCs (Eliopoulos *et al.* 2004), and that the pharmacological endpoint – increased Ht - lasts longer than when the engineered cells are implanted parenterally. The purpose of the current study was to extend these results to a large mammal model, much closer anatomically and physiologically to human patients. We demonstrate that retrovirally transduced cBMSCs, embedded in the same organic matrix can efficiently and express pharmacological levels of Epo in dogs in a stable manner for long periods. This preclinical research will serve as a foundation for future clinical trials of patients with Epo-responsive anemias or a deficiency in plasma proteins such as factors VIII and IX.

Materials and methods

Experimental animals

Six intact 9.5 to 12 kg, 14 to 18 month-old female beagle dogs were housed in facilities approved by the Canadian Council for Animal Care, and experimental procedures were approved by the Animal Care Committee of the Faculté de Médecine Vétérinaire of the University of Montreal.

cBMSCs isolation and preparation

Bone marrow was aspirated from the proximal humerus under general anesthesia. Animals were pre-medicated with an intra-muscular injection of

butorphanol (0.05 mg/kg, Wyeth, Guelph, Ontario, Canada) and acepromazine (0.05 mg/kg, Ayerst, Guelph, Ontario, Canada). General anesthesia was induced by intravenous injection of 4 mg/kg propofol (Rapinivet, Mallinckrodt Veterinary Inc, Ontario, Canada), followed by tracheal intubation and maintained with isoflurane. An 18-gauge bone marrow needle biopsy was used to aspirate aseptically 12 ml of bone marrow. The marrow was diluted 1:3 with D-PBS and layered over Ficoll-Paque Plus (Amersham Biosciences, Baie d'Urfe, Quebec, Canada) at a 1:1 Ficoll-marrow ratio. The samples were centrifuged at 400 X g for 30 min at room temperature. The interface layer containing the mononuclear cells and platelets was collected and spun at 300 g for 10 min and recovered in the cBMSC culture medium as reported (Emami *et al.* 1997): Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Wisent Technologies, St-Bruno, Quebec, Canada) supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS; Wisent Technologies), 1 ng/ml recombinant human acidic FGF (aFGF; R&D Systems Inc, Minneapolis, MN), 5 U/ml heparin (Sigma-Aldrich, Oakville, Ontario, Canada), 250 ng/ml amphotericin B, 50 U/ml penicillin and 50 µg/ml streptomycin (Pen/Strep; Wisent Technologies) and plated at a density of $5,6 \times 10^5$ cells/cm² into T75 flasks precoated with 1% bovine skin gelatin (Sigma Chemical Co., Oakville, Ontario, Canada). Further expansion of cBMSCs was carried out in 150-mm Petri dishes. The adherent cBMSCs were harvested with trypsin 0.05%, 0.53 mM EDTA (Wisent Technologies) and were passaged 1:2 to 1:4. BMSCs from 4 dogs were used for reimplantation in the respective donor dogs. BMSCs from two other dogs were used for implantation in NOD-SCID mice and for phenotyping cBMSCs.

Flow cytometry analysis of cBMSCs

Adherent cBMSCs were harvested from the culture flask with trypsin 0.05%-EDTA 0.53 mM (Wisent Technologies) and subsequently washed in phosphate-buffered saline (PBS) with 3% fetal bovine serum (FBS). The cells were stained (5×10^6 cells/ml) for 30 min on ice with the R-PE-conjugated antibodies specific for canine CD34 (hematopoietic cells) (Clone 1H6; BD Pharmingen, San Diego, CA), mouse CD44 (with cross-reactivity to dog CD44) (Clone IM7; BD Pharmingen),

canine CD45 (panleukocyte) (Clone YKIX716.13; Serotec Inc., Raleigh, NC) markers and the respective isotypes. For the detection of canine CD146, an unlabeled primary antibody was used (Clone PIH12, anti-human endothelial cells with cross reactivity with canine CD146; Chemicon International, Temecula, CA) and detected following an additional 30-min incubation with the secondary R-PE-conjugated mouse IgG_{1,κ} (Clone MOPC-31C; BD Pharmingen). Excess antibody was removed with a single wash of 3% PBS-FBS. The labelled cells (15,000 events) were analysed on a FACScan with the Cell Quest software program (Becton-Dickinson, San Jose, CA).

Plasmid constructs

The retroviral plasmid pAP2 includes a multiple cloning site upstream of an internal ribosomal entry site (IRES) and enhanced green fluorescence protein (EGFP) (Galipeau *et al.* 1999). The canine Epo (cEpo) cDNA, inserted in the mammalian expression vector pCI-neo (Promega, Madison, WI) was excised with *XhoI-XbaI* digestion and subsequently ligated with *XhoI*-digested pAP2 to generate the cEpo-IRES-EGFP retroviral plasmid (MacLeod *et al.* 1998).

Retroviral vector production and titer determination

The 293GPG packaging cell line (Ory *et al.* 1996) was stably cotransfected with 5 µg of cEpo-IRES-EGFP linearized with *ScaI* and with 0.5 µg of the pJ6ΩBleo resistance plasmid linearised with *PvuI*, utilizing lipofectamine and following manufacturer's instructions (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA). Transfected cells were selected with zeocin (100 µg/ml) (Invitrogen) therefore giving rise to a 293GPG polyclonal cell population encapsidating cEpo-IRES-EGFP retrovectors. Because the vesicular stomatitis virus-G protein (VSV-G) envelope expression is regulated by the tet on/off inducible system, the production of high titers of VSV-G pseudotyped cEpo-IRES-EGFP retroviral particles was obtained after removing tetracycline from the culture media. After a 72-hour incubation in tetracycline-free media, the supernatant was collected over the next four consecutive days. To assess titer, Madin Darby canine kidney (MDCK) cells were plated at 3.5 x

10^4 cells per well in two 6-well dishes. The next day, cells from a test well were trypsinized and counted. The medium of other wells was discarded and replaced with 1:1 to 1:200 serial dilutions of the retrovectors in a final volume of 1 ml of DMEM, 10% FBS with 6 $\mu\text{g/ml}$ Polybrene (Sigma-Aldrich) for a 24-hour incubation. The supernatant was then removed and replaced with complete medium. Flow cytometry analysis was performed 4 days later for EGFP fluorescence. Viral titers (cfu/ml) were calculated as previously reported (Eliopoulos *et al.* 2003).

cBMSCs transduction

Following a second passage, cBMSCs were plated at a density of 4.3×10^3 cells/cm². The next day, the cells were exposed to retrovectors for 6 hours (MOI = 60) supplemented with 6 $\mu\text{g/ml}$ Polybrene. The retrovectors were then removed and replaced with complete cBMSCs culture medium. The transduction was repeated the next day under identical conditions. Flow cytometry analysis was performed 5 days after initial transduction to ascertain retrovector expression and stable integration of provector as measured by GFP fluorescence.

Detection of retrovector integration

Genomic DNA of engineered cBMSCs and mock-transduced cBMSCs was extracted using the DNAeasy tissue kit (Qiagen, Mississauga, Ontario, Canada) and Southern blot analysis was performed as previously described (Eliopoulos *et al.* 2003). Briefly, 10 μg of genomic DNA was digested with 500 U of *EcoRV*, electrophoresed on 1% agarose and transferred to a Hybond-N nylon membrane (Amersham Biosciences). The 864-bp EGFP probe was prepared by digesting AP-2 with *NotI* and *KpnI* followed by gel purification and ³²P-radiolabelling with a Random Primed DNA labelling Kit (Roche Diagnostics, Laval, Quebec, Canada). The blot was exposed to a Kodak X-Omat film (Kodak, Rochester, NY).

Measurement of cEPO secretion

To detect the *in vitro* production of cEpo by the transduced cBMSCs (cEpo-cBMSCs), the medium was removed 7 days post-transduction and replaced with a

minimal volume of serum-free medium. The cells were incubated a further 24 hours and the supernatant was then collected and concentrated 40X using centrifugal filters (Amicon Ultra-4 PL-10, Millipore Corporation, Etobicoke, Ontario, Canada). Total proteins were measured using the Bio-Rad protein assay kit (Bio-Rad, Mississauga, Ontario, Canada), 30 µg of samples were electrophoresed on a 12% acrylamide SDS gel, transferred to a nitrocellulose membrane (Trans-Blot Transfer Medium, Bio-Rad), and cEpo was detected with rabbit polyclonal anti-rhEpo antibody (clone H-162, Santa Cruz Biotechnology Inc. Santa Cruz, CA) following incubation with secondary goat antirabbit-HRP-conjugated antibody (Bio-Rad, Mississauga, Ontario, Canada). Two hundred and forty IU of rhEpo (EprexTM, Janssen-Ortho Inc., Toronto, Ontario, Canada) were included as positive control. Visualisation was done via ECL reaction with appropriate substrates (SuperSignal West Pico, Pierce, Rockford, IL).

The determination of Epo concentrations from both cell supernatant and dog serum was carried out using an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) system for human Epo (Roche Diagnostics) following the manufacturer's recommendations.

Implantation of cEpo-cBMSC in mice and dogs

Five NOD-SCID mice received a subcutaneous implant consisting of 7×10^6 cEpo-cBMSCs, resuspended in 50 µl RPMI and embedded in 500 µl of FDA-approved ContigenTM (C.R. Bard, Inc., Covington, GA), a material consisting of bovine dermal 95% type I collagen and 5% type III crosslinked with glutaraldehyde. Control mice (n=4) received mock-transduced cBMSCs under the same conditions. The hematocrit (Ht) was measured by a standard microhematocrit procedure.

Four normal immunocompetent Beagle dogs received 1.30×10^8 autologous cEPO-cBMSCs divided in 32 implants (200 µl ContigenTM each) injected subcutaneously on both flanks with a 20-gauge needle. Hematocrit of four normal dogs was monitored as the control group. Blood samples were obtained from the jugular vein and Ht percentage was measured by standard microhematocrit procedure (at day 0, before premedication and anesthesia).

Histopathological examinations of implants

Two implants were excised from each dog between 75 days and 89 after implantation. The excised implants were sectioned into 5-um thick sections which were stained with hematoxylin-phloxine-saffron.

RT-PCR on serum

MoMLV particles, gift from Dr G. Lemay, University of Montreal, were propagated on NIH3T3 cells. Collected virus was titered using the rat XC cells syncytium assay as described (Klement et al , 1969). Rat XC cells were obtained from Dr. P. Jolicoeur, IRCM, Montreal. Total viral RNA from MoMLV-infected NIH3T3 supernatant and dog serum was isolated with the QIAamp viral RNA kit (Qiagen Inc., Mississauga, Ontario, Canada) as described by the manufacturer. All RNA samples were simultaneously reverse transcribed using SuperScript One-Step RT-PCR with Platinum Taq (Invitrogen, Burlington, Ontario) using the following *gag* primers: 5'-ACCTAGTCCACTATCGCCAGTT-3' and 5'-TCCTCCCTGTCTATCCTGTTTC-3' designed from the MoMLV genome (bp 1342 to 1832 from Genbank sequence number AF033811) to yield a 491-bp product.

Conditions for reverse transcriptase activity were 50°C for 10 min. Conditions for the PCR-amplification of *gag* were 94°C for 2 min followed by 35 cycles of 94°C for 15 s, 55°C for 30 s and 72°C for 1 min, with a 10-min final elongation at 72°C. Samples were separated on 1.2 % agarose/Tris-acetate-EDTA gel containing 400 µg/L of ethidium bromide. The gel was transferred to a Hybond-N nylon membrane (Amersham Biosciences) and processed as above. The *gag* probe used was the 491-bp PCR product generated as above and ³²P-radiolabelled with a Random Primed DNA labelling Kit (Roche Diagnostics). The blot was exposed to a Kodak X-Omat film (Kodak).

Clinical assessments

Physical examination including appetite, rectal temperature, evaluation of mucous membrane color, vulvar size and implantation sites were performed daily for the first week, then weekly until excision of the implants. Blood samples were

obtained from the jugular vein on days -5, 0, 4, 7, 15, 21, 28, 35, 42, 49, 56 and 63. Measurements of serum alanine aminotransferase, aspartate aminotransferase, bilirubin, glucose, urea, creatinine, total proteins, albumin, total calcium, phosphorus, potassium, sodium, chloride and bicarbonate levels were performed on an automated biochemistry analyzer (Synchron CX5, Beckman Coulter, Inc. Fullerton, CA) according to the manufacturer's recommendations. Hematological analysis was performed by quantifying platelets, white blood cells, red blood cells, hemoglobin, and mean corpuscular volume according to standard procedures in whole blood containing 10% EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid) using an automated blood counter (Cell-Dyn 3500, Abbott Diagnostics Division, Mountain View, CA). Total iron and Total Iron Binding Capacity (TIBC) were measured on days 0, 7, 14 and 63 using the ferrozine method with a Roche Hitachi 917 instrument (Roche Diagnostics). Specimens for vaginal cytology were obtained weekly with a moistened cotton-tip swab and stained with a modified Wright-Giemsa stain. Slides were examined for typical signs of estrus. Systolic arterial blood pressure was measured weekly after acclimatizing the dogs in a quiet room using the Doppler method on forelegs (Stepien *et al.* 2003).

Statistics

Percentage changes were evaluated by repeated-measures ANOVA with posthoc Dunnett's test. Comparison of treated versus control group was carried out with a repeated-measures linear model.

Results

Phenotype

The cells freshly aspirated from the bone marrow consisted of CD44 positive (53 %), CD45 positive (29 %) and CD34 positive (2 %) cells representing the marrow cell population (data not shown). CD146 positive cells were not detected. The number of CD44 positive cells, negative for the other markers examined, increased progressively to 100% until passage 4 (day 14) after which they made up the entire population at passage 6 (Fig. 1).

Transduction efficiency

The transduction efficiency of BMSCs isolated from all 5 dogs ranged from 73% to 92 % based on eGFP expression as analysed by FACS (Fig. 2). An MOI of 60 of VSV-G pseudotyped retrovector was sufficient to obtain such efficiency.

Stability of integration

The expected length of the inserted provector in the genomic DNA of transduced BMSCs was 3.5 kb. The presence of the 3.5 kb band was demonstrated at passage 6 after transduction as detected by Southern blot with a GFP probe (Fig. 3).

In vitro production of canine Epo

The cEpo released by the transduced cBMSCs was detected by Western blot for the 4 implanted dogs. The transduced cEpo-cBMSCs produced *in vitro* 1.5 to 9.3 U of Epo per 10^6 cells per 24 hours, as measured by ELISA before implantation. BMSCs of dog #4 produced and released approximately 5 times more Epo than the BMSCs of the other dogs as measured by ELISA (Fig. 4).

In vivo expression of canine Epo

The average Ht of mice receiving the cEpo-cBMSCs implants increased from 53% to 88%, representing an augmentation of 66% compared to basal levels (Fig. 5). The Ht of the treated mice remained significantly higher for 131 days ($P < 0.005$) after implantation compared to control groups (Fig. 5). Mean Hts of treated dogs rose 28% in 12 days and remained elevated significantly for 5 weeks compared to control dogs ($P < 0.005$) (Fig. 6A). The mean variation of Epo serum levels of treated dogs increased significantly over basal levels until day 7 ($P = 0.025$), and the increase approached statistical significance until day 14 ($P = 0.08$) (Fig. 6B). The levels decreased below preimplantation levels at day 28 (Fig. 6B).

Estrus cycle of female dogs

Based on vaginal cytology, dog #4 was detected in estrus on day 61. This finding was not associated with any significant change in hematocrit, total iron and TIBC (data not shown).

Histopathology

The periphery of all implants was infiltrated by a moderately dense population of lymphocytes mixed with variable proportions of macrophages, Langhans cells and eosinophils between 2.5 and 3 months after implantation (Fig. 7). A very thin layer (2-4 cells thick) of host derived collagen surrounded the implant and the inflammatory infiltrate. In all dogs, the cores of the implants were pale and poorly cellular, and were fragmented in 2 dogs.

Safety

Based on clinical examination and hematological and biochemical parameters, all dogs remained healthy during the experimental period. Anemia was not observed throughout the study (Fig. 6A). Serum biochemistry, white blood cell count and platelet count remained within normal limits except for phosphorus levels (data not shown). A mild hyperphosphatemia was observed from day 0 to day 49 in all 4 dogs but this was considered physiologic given that the age of the dogs (until 16 months) (Harper *et al.* 2003).

Absence of retroparticules in implanted dogs was demonstrated by Southern blot using a gag probe followed by an RT-PCR. The sensitivity of the RT-PCR assay described in Material and Methods was 0.02 infectious particles. The actual sensitivity of the assay was lower because infectious retroviruses produced *in vitro* are vastly outnumbered by non infectious retroviruses by a ratio of about 1:100 (Vogt 1997). Based on these observations and the diploidy of the retroviral genome, the sensitivity was approximately 4 copies of MoLV genome. Within these limits, no viral RNA could be detected in the serum of the 4 implanted dogs (Fig. 8).

Discussion

Phenotype

To our knowledge, this is the first characterization of cBMSCs specific cell-surface antigens. In long term culture, CD44 positive cells became predominant, and these cells were negative for cell-surface antigens specific for endothelial (CD146), hematopoietic (CD34) and leukocytic cells (CD45), as observed for the BMSCs of rat, mouse, cats and humans (Martin *et al.* 2002; Pittenger *et al.* 1999). This phenotype remained stable after retroviral transduction until immediately before implantation as verified by flow cytometry analysis at passages 4, 5 and 6 (data not shown).

Transduction efficiency

The transduction efficiency was higher than the 50% obtained by Cherington *et al.* (1998) with cBMSCs. This difference can be explained by the wider tropism of the retroparticles we used. Cherington *et al.* used the ecotropic packaging cell line GP+E-86 and the amphotropic packaging cell line GP+envAM12 while we used retroparticles pseudotyped with the VSV-G envelope, which confers wider tropism and increased stability to the pseudotyped retroparticles (Burns *et al.* 1993; Galipeau *et al.* 1999).

Transgene Stability

The presence of the expected 3.5 kb band shown by Southern blot analysis after *in vitro* expansion of BMSCs showed that stable integration of the therapeutic gene occurred in target cells and that no subsequent major rearrangements of the transgene took place in the transduced cells. The presence of the complete provector sequence ensure the expression of the full protein sequences and that most of the GFP positive cBMSCs are cEPO positive related to the bicistronic vector.

Production of EPO by cBMSCs in vitro

The amount of Epo produced by cBMSCs (1.3 μg to 7.9 μg of Epo per 10^6 per 24 hours) may have been underestimated because cEpo was measured by ELISA using a monoclonal antibody directed at human Epo and rhEPO as a standard. Most likely, canine specific reagents would have yielded higher values. These levels were higher than the levels of expression of human growth hormone (hGH) and hFIX obtained by Hurwitz *et al.* (1997) with cBMSCs transfected with plasmids coding for hGH (0.54 to 3.84 μg per 10^6 cells per 24 hours) and hFIX (0.5 μg per 10^6 cells per 24 hours). The *in vitro* production of Epo (1.3 to 7.9 μg per 10^6 cells per 24 hours), was very similar to the production levels of FIX obtained with retrovirally transduced cBMSCs (3.24 to 7.82 μg of canine FIX per 10^6 cells per 24 hours) (Cherington *et al.* 1998), most likely reflecting the higher efficiency of gene transfer provided by retrovectors.

Production of EPO by cBMSCs in vivo

BMSCs are not known to produce Epo and may not have the machinery necessary to produce and release properly glycosylated functional Epo. Thus, before carrying out long term monitoring of dogs, we first tested the cEpo-cBMSCs in NOD-SCID mice. The Ht rapidly increased and remained elevated more than 4 months after implantation, demonstrating that cEpo produced by the engineered cBMSCs was fully functional, and that the bovine collagen matrix supported the viability of canine BMSCs in numbers sufficient to produce and release pharmacological amounts of Epo in mice (Fig. 5).

We estimated the number of cBMSCs to be implanted (1.3×10^8 cEpo-cBMSCs) in dogs based on our previous work in mice (Eliopoulos *et al.* 2003, 2004). This number was sufficient to obtain a pharmacological effect for a sustained period. This number is roughly twice smaller as that (2.33 to 3.35×10^8 cBMSCs retrovirally transduced with hFIX) used by Cherington *et al.* (1998) to obtain plasma levels of human FIX (hFIX) detectable for 12 days after intravenous infusion. Thus cBMSCs embedded in a bovine collagen-based organoid can secrete and release systemically a therapeutic protein as efficiently as cBMSCs implanted parenterally.

The Ht of mice and dogs implanted with autologous BMSCs was increased for a shorter period of time than that in immunodeficient mice (Fig. 5, 6A). While NOD-SCID mice can not mount an immune response, all implants in dogs were infiltrated with various numbers of lymphocytes, macrophages and eosinophils. Thus, inflammation was most likely the major factor contributing to the shorter Epo secretion in dogs, probably by causing the death of implanted BMSCs.

The plasma half-life of Epo is 2-13 hours. Because the highest serum concentrations of Epo were measured between 7 and 14 days after implantation, it can be concluded that the increase in Epo was clearly due to *de novo* production of Epo by the implanted cells (Fig. 6B). This duration was similar to the 12-day periods during which hFIX-cBMSCs infused intravenously produced and released hFIX in dogs (Cherington *et al.* 1998). The decrease in serum levels of Epo below the preimplantation levels seen 28 days after implantation was probably the result of the normal physiological negative feedback mechanisms that regulate the expression of Epo (Fig. 6B) (Christian *et al.* 2000; Ebert *et al.* 1999; Jelkmann *et al.* 2001). The extension of the Ht increase well after the peak in serum concentrations of Epo results most likely from the long life span (100 days) of canine erythrocytes.

Although dog #4 EPO-engineered BMSCs produced and released much more Epo than the BMSCs of the other 3 dogs, its Ht did not increase either to higher values or for a longer duration (Fig. 4; data not shown). Since the transduction efficiency shown by the BMSCs of that dog was not different than that of the 3 other dogs, each transduced BMSC of dog #4 produced approximately 5 times more Epo than those of the other 3 dogs, which may have rendered transduced BMSCs more sensitive to the severe and abrupt environmental changes, such as hypoxia, temperature change, lack of growth factors and of other nutriment, which result from subcutaneous implantation. Normal interindividual variations between dogs regarding the biological response to Epo may also have played a role in this discrepancy.

Safety

In non-human primates, the transfer of Epo cDNA through adeno-associated viral vectors injected intra-muscularly caused severe anemia as an unexpected side effect. This resulted from the production of antibodies to both endogenous and exogenous Epo. The reason for these complications remained unclear (Gao *et al.* 2004). In contrast, no anemia was observed in our dogs up to almost 6 months after implantation, ruling out the production of significant amounts of Epo-specific antibodies and supporting the safety of the *ex vivo* gene transfer using a retroviral platform (Fig 6B).

Although recent advances in the design of retrovectors make unlikely the generation of replication competent retroviral particles, a remote possibility remains that packaging or target cells generate such particles through recombination with endogenous retroviral sequences. RT-PCR on the serum of treated dogs followed by Southern blot did not reveal the presence of retroviral RNA, which confirms the safety of this protocol, at least within the sensitivity limits of the technique we used (Fig. 8). This observation, along with the stability of the clinical parameters (other than the hematocrit), support the safety of this therapeutic approach

In summary, this study demonstrates the feasibility of systemically releasing a therapeutic protein in a large immunocompetent mammal by implanting an organoid made of autologous stromal cells embedded in an organic matrix already approved for medical usage in human patients. We showed that a cellular population highly enriched for canine BMSCs can be transduced using a pseudotyped retroviral platform (Fig. 2-3), expanded *in vitro* and embedded in an organic matrix to form an organoid which systemically produces and releases functional Epo over a prolonged period (Fig. 4-6). These results clearly demonstrate the feasibility of cellular therapy in a large mammal without immunoablation, a crucial step toward its application in people.

Acknowledgements

We sincerely thank Dr G. Lemay, Faculté de médecine, Microbiologie et immunologie, University of Montreal and Dr P. Jolicoeur, IRCM, Montreal, for the generous gift of MoLV viruses and XC cells, respectively. This work was supported by NSERC operating grant 138236-01 and VRQ project 2200-037.

Figure 1. Characterisation of cultured canine marrow stromal cells. Flow cytometric determination of cell-surface antigens for canine BMSCs untransduced and cEPO-EGFP modified at passage 6. cBMSC were stained with canine-specific monoclonal antibodies against CD44, CD34, CD45 and CD146 or control immunoglobulin G (IgG) antibodies. FACS analysis shows isotype control IgG profile (dotted line) versus specific antibody staining profile (thick line). The percentage of positive cells is listed in the corresponding histogram.

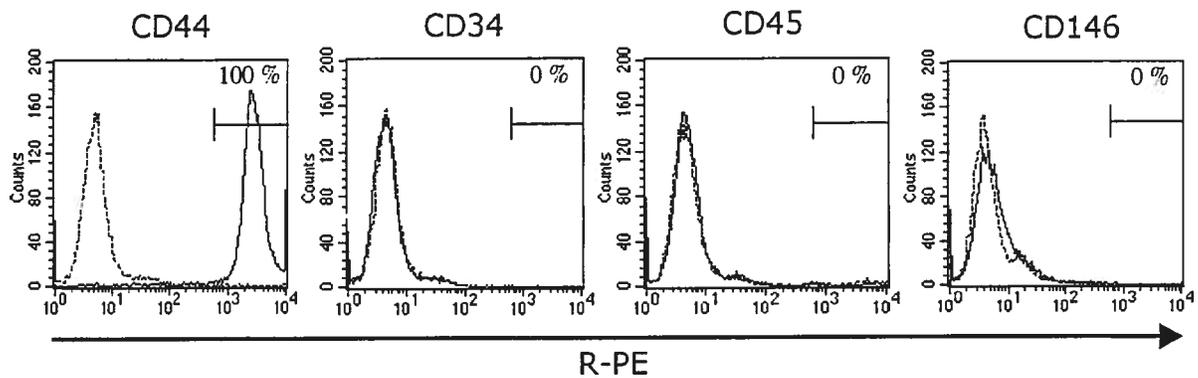


Figure 2. Transduction efficiency of canine BMSCs measured by flow cytometry analysis. Representative histogram of a Beagle dog whose Mock-transduced cBMSCs (dotted line) and cBMSCs were transduced by AP-2 retroparticles containing the cEpo and EGFP reporter genes (full line) (MOI = 60).

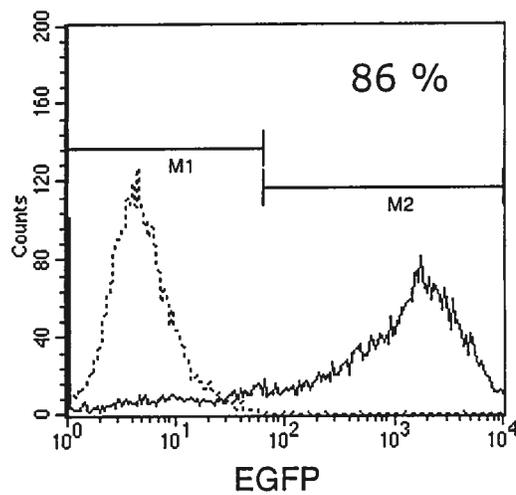


Figure 3. Provector integration in transduced cBMSCs detected by Southern blot analysis. (A) Map of expected sequence of the integrated provector. (B) Lanes 1-3: Control fragment of cEPO-IRES-eGFP 50 pg (lane 1), 10 pg (lane 2) and 1 pg (lane 3). Lanes 4-7: Genomic DNA of dog # 2 (lanes 4 and 5) and dog # 4 (lanes 6 and 7) of mock transduced cBMSCs (lanes 4 and 6), cBMSCs transduced with cEPO-IRES-eGFP retrovectors (lanes 5 and 7) digested with *EcoRV*, electrophoresed, blotted and hybridized with a ^{32}P -labeled EGFP probe.

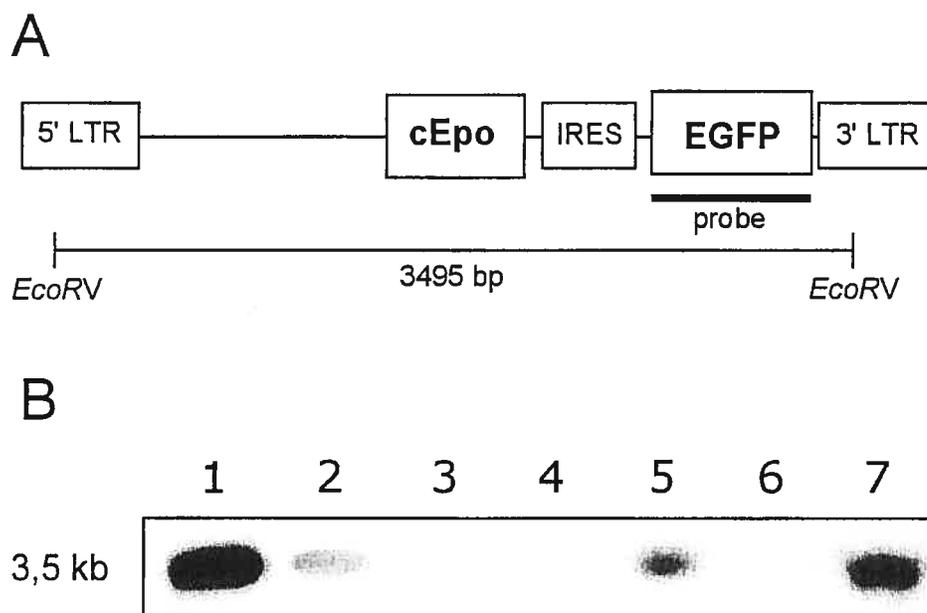
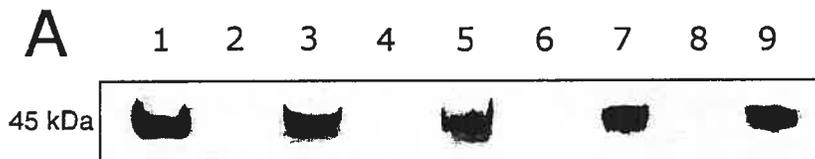


Figure 4. *In vitro* expression of canine Epo by transduced cBMSCs. (A) Proteins were separated on a SDS gel and detected with anti-Epo polyclonal antibody using the ECL system. Lane 1: 240 IU of recombinant human Epo standard (Eprex™, Janssen-Ortho Inc, North York, ON, Canada); lanes 2, 4, 6 and 8: 30 µg of medium concentrated 40 x from mock transduced cBMSCs cells of dogs #1, 2, 3 and 4 respectively; Lanes 3, 5, 7 and 9: 30 µg of medium concentrated 40 x from cEPO-IRES-EGFP transduced cBMSCs of dogs #1, 2, 3 and 4 respectively. (B) *In vitro* production of cEpo by transduced cBMSCs as quantified by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Each vertical line is delineated by two values, whose mean is represented by a dash.



B

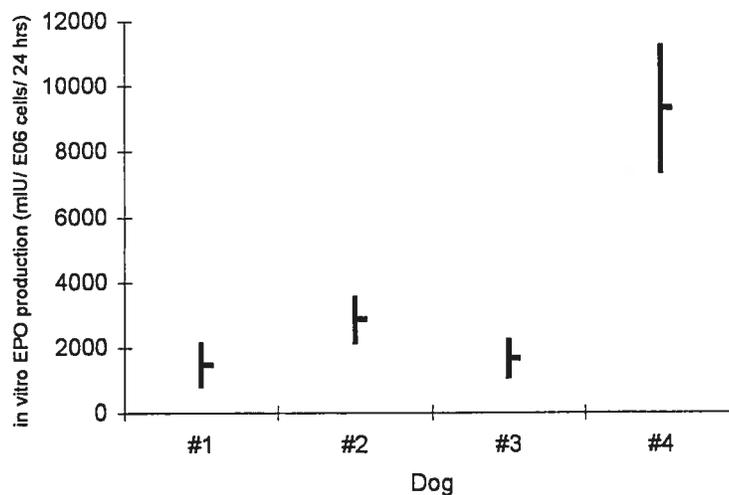


Figure 5. Long-term monitoring of Ht in NOD-SCID mice. Implanted mice received 7×10^6 canine BMSCs transduced with cEPO-IRES-EGFP and incorporated in 500 μ l of bovine collagen type I subcutaneously (n=5). Control NOD-SCID mice with mock-transduced canine BMSCs under the same conditions (n=4).

* : $P < 0.0005$, ** : $P < 0.005$.

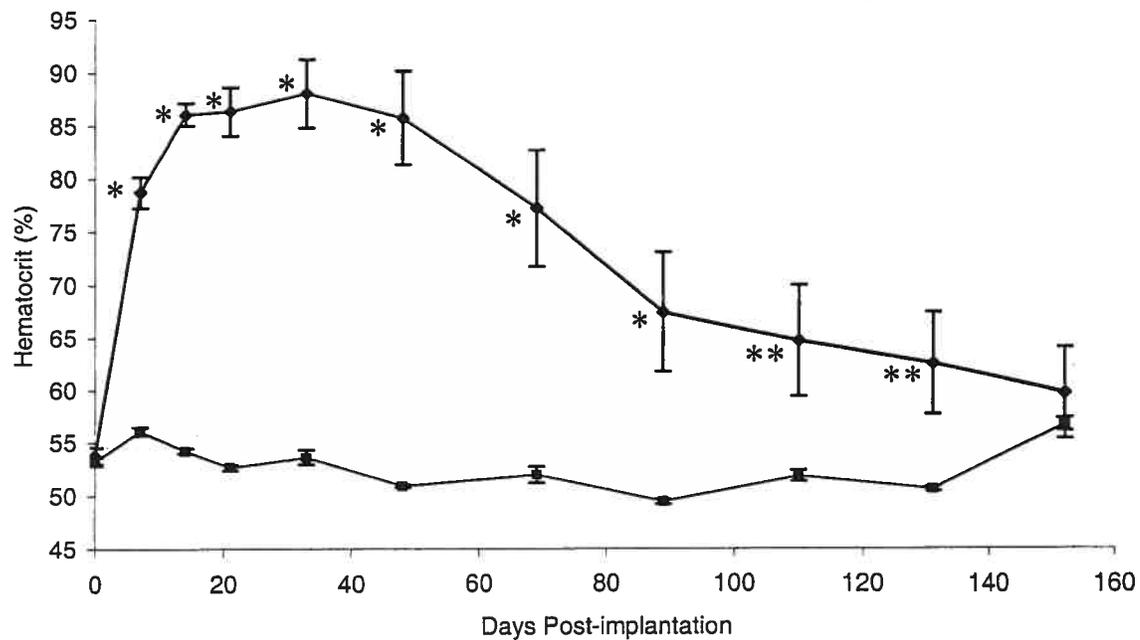


Figure 6. Long-term monitoring of hematocrit (Ht) and serum levels of Epo in dogs. (A) Long-term Ht follow up of dogs implanted with autologous BMSCs transduced with cEpo (●) and in normal dogs (○) (n=4). *: $P < 0.001$. (B) Mean variation of serum levels of Epo in implanted dogs. **: $P = 0.025$. ***: $P = 0.08$

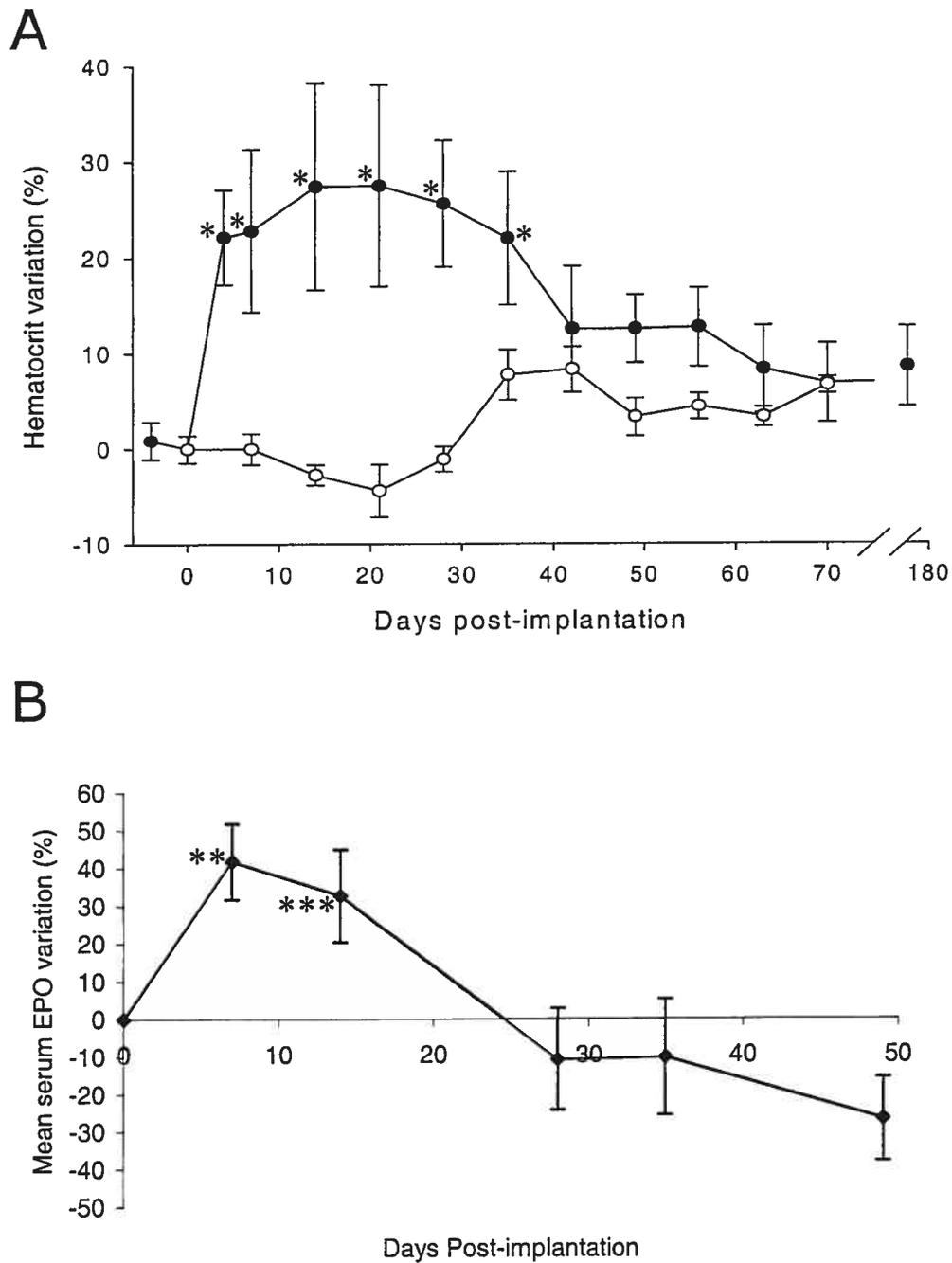
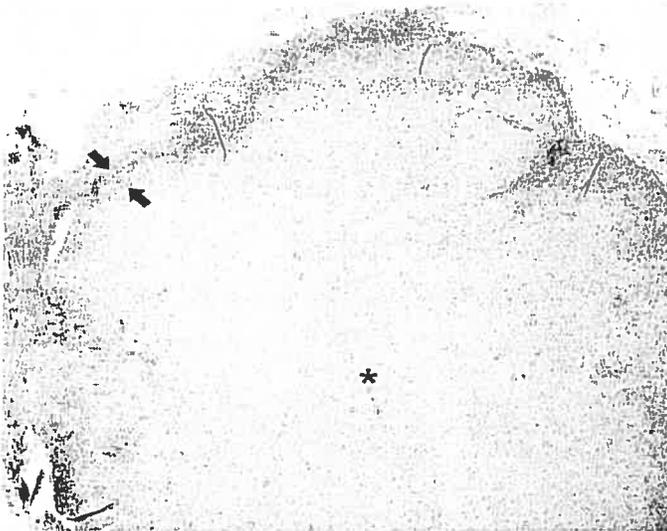


Figure 7. Collagen-based implant containing autologous cEPO-cBMSCs, 89 days after subcutaneous implantation. Dog # 4. (A) The core of the implant (*) is relatively acellular and the periphery is infiltrated by predominant lymphocytes (black arrows). Original magnification 40 X. (B) Higher magnification of (A). A moderate number of giant multinucleated cells (red arrows) separated predominantly by lymphocytes and a few eosinophils line the implant and are surrounded by a thin layer of host derived collagen (black arrows). Original magnification 200 X.

A



B



REFERENCES

1. BURNS J.C., FRIEDMANN T., DRIEVER W., BURRASCANO M., YEE J.K. (1993). Vesicular stomatitis virus G glycoprotein pseudotyped retroviral vectors: concentration to very high titer and efficient gene transfer into mammalian and nonmammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **90**, 8033-8037.
2. CASADEVALL N., NATAF J., VIRON B., KOLTA A., KILADJIAN J.J., MARTIN-DUPONT P., MICHAUD P., PAPO T., UGO V., TEYSSANDIER I., VARET B., MAYEUX P. (2002). Pure red-cell aplasia and antierythropoietin antibodies in patients treated with recombinant erythropoietin. *N. Engl. J. Med.* **346**, 469-475.
3. CHERINGTON V., CHIANG G.G., MCGRATH C.A., GAFFNEY A., GALANOPOULOS T., MERRILL W., BIZINKAUSKAS C.B., HANSEN M., SOBOLEWSKI J., LEVINE P.H., GREENBERGER J.S., HURWITZ D.R. (1998). Retroviral vector-modified bone marrow stromal cells secrete biologically active factor IX in vitro and transiently deliver therapeutic levels of human factor IX to the plasma of dogs after reinfusion. *Hum. Gene Ther.* **9**, 1397-1407
4. CHRISTIAN J.A. (2000). Red blood cell survival and destruction, p. 117-124. *In: Schalm's Veterinary Hematology*, 5th edition. Lippincott Williams & Wilkins. Philadelphia. 1344 pp.
5. COWGILL L.D., JAMES K.M., LEVY J.K., BROWNE J.K., MILLER A., LOBINGIER R.T., EGRIE J.C. (1998). Use of recombinant human erythropoietin for management of anemia in dogs and cats with renal failure. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **212**, 521-528.

6. EBERT B.L., BUNN H.F. (1999) Regulation of the erythropoietin gene. *Blood* **94**, 1864-1877.
7. ELIOPOULOS N., AL-KHALDI A., CROSATO M., LACHAPELLE K., GALIPEAU J. (2003). A neovascularized organoid derived from retrovirally engineered bone marrow stroma leads to prolonged in vivo systemic delivery of erythropoietin in nonmyeloablated, immunocompetent mice. *Gene Ther.* **10**, 478-489.
8. ELIOPOULOS N., LEJEUNE L., MARTINEAU D., GALIPEAU J. (2004). Human-compatible collagen matrix for prolonged and reversible systemic delivery of erythropoietin in mice from gene-modified marrow stromal cells. *Mol. Ther.* **10**, 741-748
9. EMAMI S., MERRILL W., CHERINGTON V., CHIANG G.G., KIRCHGESSER M., APPEL J.M., HANSEN M., LEVINE P.H., GREENBERGER J.S., HURWITZ D.R. (1997). Enhanced growth of canine bone marrow stromal cell cultures in the presence of acidic fibroblast growth factor and heparin. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.* **33**, 503-511.
10. GALIPEAU J., LI H., PAQUIN A., SICILIA F., KARPATI G., NALBANTOGLU J. (1999). Vesicular stomatitis virus G pseudotyped retrovector mediates effective in vivo suicide gene delivery in experimental brain cancer. *Cancer Res.* **59**, 2384-2394.
11. GAO G., LEBHERZ C., WEINER D.J., GRANT R., CALCEDO R., MCCULLOUGH B., BAGG A., ZHANG Y., WILSON J.M. (2004). Erythropoietin gene therapy leads to autoimmune anemia in macaques. *Blood* **103**, 3300-3302.

12. HARPR E.J., HACKETT R.M., WILKINSON J., HEATON P.R. (2003). Age-related variations in hematologic and plasma biochemical test results in Beagles and Labrador Retrievers. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **223**, 1436-1442.
13. HURWITZ D.R., KIRCHGESSER M., MERRILL W., GALANOPOULOS T., MCGRATH C.A., EMAMI S., HANSEN M., CHERINGTON V., APPEL J.M., BIZINKAUSKAS C.B., BRACKMANN H.H., LEVINE P.H., GREENBERGER J.S. (1997). Systemic delivery of human growth hormone or human factor IX in dogs by reintroduced genetically modified autologous bone marrow stromal cells. *Hum. Gene Ther.* **20**, 137-156.
14. JELKMANN W, HELLWIG-BURGEL T. (2001). Biology of erythropoietin. *Adv. Exp. Med. Biol.* **502**, 169-187.
15. KLEMENT V., ROWE W.P., HARTLEY J.W., PUGH W.E. (1969). Mixed culture cytopathogenicity: a new test for growth of murine leukemia viruses in tissue culture. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **63**, 753-758.
16. MACLEOD J.N., TETREAULT J.W., LORSCHY K.A., GU D.N. (1998). Expression and bioactivity of recombinant canine erythropoietin. *Am. J. Vet. Res.* **59**, 1144-1148.
17. MARTIN DR, COX NR, HATHCOCK TL, NIEMEYER GP, BAKER HJ. (2002). Isolation and characterization of multipotential mesenchymal stem cells from feline bone marrow. *Exp. Hematol.* **30**, 879-886.
18. ORY D.S., NEUGEBOREN B.A., MULLIGAN R.C. (1996). A stable human-derived packaging cell line for production of high titer retrovirus/vesicular stomatitis virus G pseudotypes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **93**, 11400-11406.

19. PITTENGER M.F., MACKAY A.M., BECK S.C., JAISWAL R.K., DOUGLAS R., MOSCA J.D., MOORMAN M.A., SIMONETTI D.W., CRAIG S., MARSHAK D.R. (1999). Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* **284**, 143-147.

20. RANDOLPH J.F., STOKOL T., SCARLETT J.M., MACLEOD J.N. (1999). Comparison of biological activity and safety of recombinant canine erythropoietin with that of recombinant human erythropoietin in clinically normal dogs. *Am. J. Vet. Res.* **60**, 636-642.

21. VOGT VM. (1997). Retroviral virions and genomes, p. 27-70. *In: Retroviruses*. Coffin JM, Hughes SH, Varmus HE (Eds). Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, N.Y. 843 p.

IV. DISCUSSION

Cette étude est l'une des premières utilisations des CSMO canines autologues comme plate-forme de délivrance de protéines thérapeutiques en thérapie génique. Les CSMO s'avèrent jusqu'à maintenant être le meilleur type cellulaire permettant l'implantation autologue puisqu'une seule ponction de moelle osseuse permet d'obtenir théoriquement jusqu'à 10^{13} cellules en culture, un nombre presque similaire au nombre total de cellules du corps humain (94). La capacité des CSMO murines à produire des niveaux considérables d'une protéine exogène *in vivo* avait déjà été démontrée (40). Dans cette dernière étude, l'EPO murine délivrée systématiquement par les CSMO implantées chez des souris a provoqué une très forte augmentation de l'Ht jusqu'à 3 mois après l'implantation. De plus, l'incorporation des cellules dans une matrice biologique a permis de prolonger l'effet biologique. Cependant, pour assurer une application sécuritaire chez l'humain, l'approche doit être préférentiellement démontrée chez un grand mammifère tel le chien. Toutefois, la diversité génétique des chiens étant beaucoup plus grande que celle des lignées de souris (69), on doit s'attendre à des réponses biologiques très variables d'un individu à l'autre.

Dans un premier temps, un plasmide contenant un clone de l'ADNc de l'EPO canine (fournie par Dr James MacLeod, Baker Institute) a été utilisé pour transfecter la lignée d'encapsulation 293GPG afin de générer des rétrovecteurs contenant l'ARN de l'EPO canine. Le titre des particules produites de 3×10^6 rétrovecteurs/mL était suffisamment élevé pour transduire efficacement les CSMO canines sans qu'une concentration par ultracentrifugation ne soit nécessaire.

Les conditions de culture développées par Emami *et al.* (42) ont permis l'expansion efficace des CSMO canines. Une ponction de 12 mL de moelle osseuse

de l'humérus nous a permis de récolter environ 10^8 CSMO. Les cellules initialement mises en culture ont adhéré au plastique pour former des colonies denses après 7 à 10 jours. Les cellules adhérentes avaient une forme allongée fibroblastique possiblement causée par le aFGF. Les cellules étaient ensuite récoltées par une trypsinisation classique et ont pu être expansionnées jusqu'à 9 passages sans diminution du taux de prolifération. La transduction des CSMO par les rétrovecteurs s'est faite au deuxième passage et les cellules ont ensuite été multipliées jusqu'à 6 passages pour atteindre le nombre de cellules nécessaire à l'implantation. À partir du passage 4, nous avons observé des cellules de forme étoilée et aplatie et dont le cytoplasme contient beaucoup de granules tel qu'observé par Emami *et al* (42). Les cellules étoilées et aplaties possèdent un potentiel mitogénique plus faible que les cellules fibroblastiques mais expriment les protéines exogènes tel que démontré par FACS et ELISA.

La caractérisation phénotypique par cytométrie de flux à l'aide d'anticorps reconnaissant les antigènes de surface a démontré la sélection et l'enrichissement des CSMO canines. Les cellules étaient positives à 100% pour le marqueur de cellules mésenchymales CD44 tel qu'observé chez les CSMO félines (80) et humaines (92). Les cellules ne possédaient aucun marqueur spécifique aux cellules endothéliales (CD146), souches hématopoïétiques (CD34) et PAN-leucocytaires (CD45). De plus, le phénotype demeurait inchangé après la transduction (données non-publiées).

Des évènements génétiques peuvent survenir durant l'intégration du provecteur dans l'ADN génomique et entraîner une altération de la séquence attendue par des délétions ou des mutations. Ceci peut changer le cadre de lecture et mener à la

production de protéines non-fonctionnelles. Le taux d'expression du transgène peut aussi tout simplement être réduit si le promoteur est absent ou trop éloigné. Il est dans ce cas important de prouver par analyse de "Southern" que le processus d'intégration n'a pas causé de réarrangements en prouvant que le provecteur intégré a la taille attendue. Une digestion enzymatique de l'ADN génomique des cellules transduites, dans les LTR du provecteur, suivie d'une hybridation avec une sonde radioactive reconnaissant le gène de EGFP permet d'observer le fragment du provecteur de taille attendue.

Avant de procéder à l'implantation des CSMO canines ingénierées pour produire l'EPO canine chez des chiens immunocompétents, la fonctionnalité de l'hormone produite devait être prouvée par un test *in vitro* ou *in vivo*. Nous avons donc dans un premier temps implanté les CSMO canines modifiées chez des souris immunodéficientes (NOD-SCID). L'Ht de ces souris a fortement augmenté et ces valeurs élevées ont été significativement soutenues jusqu'à 4 mois suivant l'implantation. L'élévation de l'Ht chez ces souris immunodéficientes signifie aussi que les modifications post-traductionnelles de l'EPO, telle la glycosylation, effectuées par les CSMO sont adéquates et l'EPO canine produite est donc fonctionnelle.

Le premier chien traité avec les CSMO produisant l'EPO canine incorporées dans le collagène bovin a reçu 480 millions de cellules réparties en 6 implants de 2 mL (Voir annexe I). Bien que l'Ht ait considérablement augmenté, nous avons fait la résection d'un implant pour évaluer la viabilité des cellules par leur morphologie. Bien que des cellules viables et une certaine vascularisation étaient observées à la

périphérie de l'implant, le centre ne contenait aucune cellule, aucun vaisseau sanguin et était fragmenté. La mort des cellules implantées a probablement été causée par les conditions hypoxiques régnant au centre au moment de l'implantation, puis plus tard à cause de l'absence de vascularisation. Pour améliorer cette situation, la taille des implants a subséquentement été diminuée pour augmenter la surface de contact des cellules avec les tissus de l'hôte, augmentant la pO_2 et facilitant l'accessibilité des cellules aux vaisseaux sanguins. Les chiens suivants ont reçu 130 millions de cellules distribuées en 32 implants de 200 μ L et une élévation significative de l'Ht a été obtenue et ce dès le quatrième jour après l'implantation. L'exérèse d'un de ces implants permet de constater la vascularisation formée sur la capsule de l'implant. L'optimisation des paramètres d'implantation a donc permis une délivrance systémique efficace de l'EPO, l'augmentation de la viabilité cellulaire et une vascularisation certaine.

Les niveaux d'EPO produits *in vitro* correspondent aux doses administrées chez les chiens et les humains souffrant d'anémie. En effet, un Beagle de 10 kg recevant 130 millions de CSMO produisant en moyenne 4 IU/ 10^6 cellules/24 h reçoit des cellules une dose d'environ 360 IU d'EPO/kg/semaine. Or, la dose thérapeutique d'EPO recombinante chez les chiens et les humains varie de 300-750 IU/kg/semaine (97, 108). Les conditions d'implantation que nous avons développées peuvent donc être immédiatement appliquées chez des chiens anémiques et pourraient convenir à un humain en extrapolant le nombre de CSMO reçues selon le poids du patient.

La sécurité du traitement a été démontrée de plusieurs façons. Bien que la thérapie cellulaire limite le transfert de matériel génétique viral chez l'hôte et que la

formation de particules répliquatives est minimisée, il est préférable de démontrer ces faits expérimentalement chez un grand mammifère avant l'application chez l'humain. L'étude du traitement des enfants SCID a d'ailleurs eu à prouver que la leucémie n'avait pas été causée par des rétrovirus capables de réplication en démontrant l'absence des gènes *pol* et *env* (53) par hybridation de type "Southern". Dans le présent projet, l'absence de telles particules a été démontrée par l'absence d'ARN viral codant pour le gène *gag* dans le sérum des chiens traités. L'ARN servant de témoin positif pour le gène *gag* provenait de particules MoLV produites en culture tel que décrit dans l'annexe II. Aucune trace du gène *gag* n'a été détectée dans l'ARN des chiens implantés en utilisant la méthode RT-PCR suivie d'une hybridation avec une sonde *gag*. Ceci démontre l'absence de particules rétrovirales en circulation. En plus, tous les paramètres cliniques obtenus durant le traitement se sont avérés normaux. Aucun effet indésirable n'a été provoqué par la délivrance d'EPO chez des chiens normaux à part, évidemment, l'augmentation d'Ht.

Le collagène bovin couplé au glutaraldéhyde a très bien été toléré par les patients canins. L'analyse histologique et clinique des implants montre l'absence d'infiltration immunitaire majeure qui aurait pu être causée par le matériel xenogénique tels le collagène bovin et la EGFP de méduse. Dans tous les cas, l'implant était recouvert par une capsule fibreuse, semblable à celle observée chez les humains ayant reçu la même matrice (75). Les risques d'inflammation doivent être minimisés dans ce genre de traitement pour empêcher le rejet de cellules implantées et puisque les cytokines impliquées telles l'interleukine-1, l'interleukine-6 et le

"tumor necrosis factor alpha" (TNF α) réduisent l'expression de l'EPO endogène (114). L'utilisation de cellules autologues limite les risques de rejet.

Il a récemment été rapporté qu'une anémie induite par la formation d'anticorps neutralisant l'EPO endogène est possible même lorsqu'on utilise de l'EPO allogénique. En effet, des primates ayant reçu des CSMO autologues produisant l'EPO de macaque ont développé une anémie aplasique secondaire probablement à cause de la formation d'anticorps anti-EPO (47). L'absence de cet effet secondaire sérieux dans notre étude a été prouvée par un hématicrite normal six mois après l'implantation.

Le dosage par ELISA de l'EPO sérique chez les chiens traités démontre une augmentation significative d'EPO causée par le traitement 7 jours suivant l'implantation. Cette concentration élevée correspond à l'augmentation des valeurs d'Ht. L'EPO produite par les cellules est délivrée dans l'organisme dès l'implantation. Ensuite, une fois que l'hormone atteint la moelle osseuse, elle se lie aux récepteurs d'EPO sur les précurseurs érythroïdes, stimule l'érythropoïèse en empêchant l'apoptose des cellules précurseuses des globules rouges et s'ensuit une augmentation de l'Ht. Cela indique que la concentration d'EPO circulante à 1 ou 2 jours suivant l'implantation doit être supérieure à la valeur moyenne obtenue 7 jours post-implantation puisque que la production d'EPO est maximale au moment de l'implantation et diminue par la suite. Un dosage de l'EPO circulante 1 ou 2 jours après l'implantation aurait donc été supérieur à 7 jours post-implantation. En plus, bien que l'EPO ait une demi-vie variant de 5 à 8 heures, la demi-vie des globules rouges est d'environ 100 jours. Ceci assure donc un effet prolongé du traitement

même si les cellules meurent rapidement une fois incorporées dans l'implant. Après le jour 7, les concentrations d'EPO plasmatique diminuent jusqu'au jour 49 pour tous les chiens. Plusieurs causes sont possibles. Premièrement, il faut tenir compte du fait que le test ne peut discriminer entre l'EPO endogène et exogène. Nous estimons tout d'abord que l'EPO exogène est relâchée en circulation dans la première semaine du traitement, causant une augmentation de l'Ht. Ensuite, la longue demi-vie des globules rouges assure des valeurs d'Ht élevées et soutenues pendant un certain temps. La rétroaction négative qu'entraîne l'EPO exogène provoque une inhibition de la production de l'EPO endogène par les reins puisque l'oxygénation des tissus est élevée. Les concentrations d'EPO circulante demeurent ainsi faibles jusqu'à la diminution de l'Ht.

Aucune corrélation entre les niveaux d'EPO produits *in vitro* et les valeurs d'Ht et d'EPO sérique n'a été observée chez les 4 chiens traités. En effet, les cellules produisant la plus forte quantité d'EPO n'ont pas provoqué l'augmentation de l'Ht la plus élevée. Plusieurs facteurs peuvent expliquer ce phénomène. Premièrement, le taux de mortalité cellulaire est variable d'un chien à l'autre et même d'une implantation à l'autre. Il se peut également que cette mort cellulaire soit sélective entre les cellules transduites et non-transduites. En effet, les CSMO les plus efficacement transduites consacrent beaucoup d'énergie à produire l'EPO exogène et d'autres fonctions cellulaires vitales peuvent ainsi être affectées (e.g. la réplication d'ADN, l'expression génique). Ces cellules peuvent également être plus sensibles que les cellules non-transduites aux variations de température, au manque de nutriments et aux conditions hypoxiques une fois incorporées dans le collagène et implantées

dans l'animal. Deuxièmement, la diversité génétique entre individus fait en sorte que l'intensité de la rétroaction négative varie selon le chien. En effet, les implants fournissant une dose supplémentaire d'EPO canine, la régulation de l'expression du gène de l'EPO endogène dans les reins et le foie sera donc différente d'un individu à l'autre.

Des stimuli autres que l'oxygénation des tissus peuvent diminuer l'expression de l'EPO endogène. Un Ht élevé augmente la viscosité du sang et conséquemment la pression artérielle. Ceci a pour effet de diminuer l'expression de l'EPO endogène et ce indépendamment du niveau d'oxygène (114).

Le même traitement appliqué chez des chiens anémiques suite à une insuffisance rénale chronique pourrait induire une plus forte augmentation de l'Ht puisque les cellules rénales produisant l'EPO sont absentes. La réponse biologique serait ainsi plus vigoureuse et prolongée puisque presque aucune régulation n'est possible. Malgré cette évidence théorique, une étude a comparé la réponse à l'EPO recombinante entre des humains normaux et des patients sur dialyse souffrant d'anémie associée à une insuffisance rénale chronique (44). Il s'est avéré n'y avoir aucune différence entre les sujets traités. Le nombre de réticulocytes, les niveaux de récepteurs de transferrine et la cinétique métabolique quantitative du fer ont augmenté au même taux. Il est possible que les patients urémiques répondent défavorablement au traitement à cause des dommages envers les cellules hématopoïétiques au niveau de la moelle osseuse et une diminution potentielle de la durée de vie des globules rouges. Cela suggère que l'augmentation de l'Ht de chiens anémiques suite à une

insuffisance rénale chronique traités selon les mêmes conditions ne serait pas plus élevée que chez les chiens normaux.

V. CONCLUSION

En conclusion, nous avons montré que la délivrance soutenue d'EPO par les CSMO s'applique au chien, un grand mammifère avec des traits physiologiques et génétiques semblables à ceux de l'humain. Les CSMO canines sont facilement isolées et multipliées en culture et sont efficacement transduites par un rétrovecteur pseudotypé avec VSV-G. Cette transduction mène à l'intégration du gène thérapeutique dans le génome de la cellule et assure une expression stable du gène d'intérêt. En conséquence, les CSMO canines rétrotransduites peuvent produire *in vitro* des niveaux considérables d'une protéine exogène et plus particulièrement l'EPO. Les cellules autologues ingénierées, une fois incorporées dans le collagène et implantées dans un animal sain, produisent l'EPO canine fonctionnelle en concentration soutenue et thérapeutique. La prochaine étape consistera à répéter le protocole expérimental chez des chiens spontanément anémiques suite à une insuffisance rénale chronique.

Au niveau génétique, le gène rapporteur de la EGFP de la méduse pourrait être retiré du vecteur puisque cette protéine est potentiellement immunogène et l'efficacité de transfert génique pourrait être évaluée par la quantification de la production de l'agent thérapeutique. Il serait également possible d'ajouter des éléments de régulation du gène de l'EPO selon l'oxygénation pour assurer une expression au besoin seulement.

Bien que le collagène bovin soit faiblement immunogène, l'utilisation d'autres matrices pourrait conférer plusieurs avantages. Il existe des fibres et des capsules de polymère qui permettent la diffusion des petites molécules tout en empêchant les contacts entre cellules implantées et les cellules immunitaires de l'hôte. De plus, la

mortalité cellulaire est également fortement diminuée et le nombre de cellules nécessaires à l'implantation est moindre. Il est donc possible d'envisager une implantation allogénique, i.e. d'utiliser les cellules d'un donneur universel sans qu'un prélèvement de moelle ne soit nécessaire chez chaque patient.

Ces considérations s'appliquent également à la délivrance systémique soutenue de toute autre protéine thérapeutique dans le traitement de maladies causées par un trouble monogénique tels l'hémophilie A et le diabète et ce autant chez les animaux de compagnie que chez les humains.

VI. BIBLIOGRAPHIE

1. Aiuti A, Slavin S, Aker M, Ficara F, Deola S, Mortellaro A, Morecki S, Andolfi G, Tabucchi A, Carlucci F, Marinello E, Cattaneo F, Vai S, Servida P, Miniero R, Roncarolo MG, Bordignon C. Correction of ADA-SCID by stem cell gene therapy combined with nonmyeloablative conditioning. *Science*. 2002;296(5577):2410-3.
2. Allay JA, Dennis JE, Haynesworth SE, Majumdar MK, Clapp DW, Shultz LD, Caplan AI, Gerson SL. LacZ and interleukin-3 expression *in vivo* after retroviral transduction of marrow-derived human osteogenic mesenchymal progenitors. *Hum Gene Ther*. 1997;8(12):1417-27.
3. Andrews JL, Shirley PS, Iverson WO, Sherer AD, Markovits JE, King L, Lyons RM, Kaleko M, Connelly S. Evaluation of the duration of human factor VIII expression in nonhuman primates after systemic delivery of an adenoviral vector. *Hum Gene Ther*. 2002;13(11):1331-6.
4. Anklesaria P, Kase K, Glowacki J, Holland CA, Sakakeeny MA, Wright JA, FitzGerald TJ, Lee CY, Greenberger JS. Engraftment of a clonal bone marrow stromal cell line *in vivo* stimulates hematopoietic recovery from total body irradiation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1987;84(21):7681-5.
5. Anklesaria P, FitzGerald TJ, Kase K, Ohara A, Greenberger JS. Improved hematopoiesis in anemic Sl/Sl mice by splenectomy and therapeutic

transplantation of a hematopoietic microenvironment. *Blood*. 1989;74(3):1144-51.

6. Balague C, Zhou J, Dai Y, Alemany R, Josephs SF, Andreason G, Hariharan M, Sethi E, Prokopenko E, Jan HY, Lou YC, Hubert-Leslie D, Ruiz L, Zhang WW. Sustained high-level expression of full-length human factor VIII and restoration of clotting activity in hemophilic mice using a minimal adenovirus vector. *Blood*. 2000;95(3):820-8.
7. Baldwin SL, Powell TD, Wonderling RS, Keiser KC, Morales T, Hunter S, McDermott M, Radecki SV, Milhausen MJ. Transient and stable transfection of Chinese hamster ovary cells with the recombinant feline erythropoietin gene and expression, purification, and biological activity of feline erythropoietin protein. *Am J Vet Res*. 2003;64(12):1465-71.
8. Banfi A, Muraglia A, Dozin B, Mastrogiacomo M, Cancedda R, Quarto R. Proliferation kinetics and differentiation potential of *ex vivo* expanded human bone marrow stromal cells: Implications for their use in cell therapy. *Exp Hematol*. 2000;28(6):707-15.
9. Bartholomew A, Patil S, Mackay A, Nelson M, Buyaner D, Hardy W, Mosca J, Sturgeon C, Siatskas M, Mahmud N, Ferrer K, Deans R, Moseley A, Hoffman R, Devine SM. Baboon mesenchymal stem cells can be genetically

- modified to secrete human erythropoietin *in vivo*. Hum Gene Ther. 2001;12(12):1527-41.
10. Baum C, Dullmann J, Li Z, Fehse B, Meyer J, Williams DA, von Kalle C. Side effects of retroviral gene transfer into hematopoietic stem cells. Blood. 2003;101(6):2099-114.
 11. Beall CJ, Phipps AJ, Mathes LE, Stromberg P, Johnson PR. Transfer of the feline erythropoietin gene to cats using a recombinant adeno-associated virus vector. Gene Ther. 2000 Mar;7(6):534-9.
 12. Bianco P, Riminucci M, Gronthos S, Robey PG. Bone marrow stromal stem cells: nature, biology, and potential applications. Stem Cells. 2001;19(3):180-92.
 13. Binley K, Askham Z, Martin L, Spearman H, Day D, Kingsman S, Naylor S. Hypoxia-mediated tumour targeting. Gene Ther. 2003;10(7):540-9.
 14. Binley K, Askham Z, Iqbal S, Spearman H, Martin L, de Alwis M, Thrasher AJ, Ali RR, Maxwell PH, Kingsman S, Naylor S. Long-term reversal of chronic anemia using a hypoxia-regulated erythropoietin gene therapy. Blood. 2002;100(7):2406-13.

15. Buchschacher GL Jr, Wong-Staal F. Development of lentiviral vectors for gene therapy for human diseases. *Blood*. 2000;95(8):2499-504.
16. Bunting KD, Galipeau J, Topham D, Benaim E, Sorrentino BP. Transduction of murine bone marrow cells with an MDR1 vector enables *ex vivo* stem cell expansion, but these expanded grafts cause a myeloproliferative syndrome in transplanted mice. *Blood*. 1998;92(7):2269-79.
17. Bunting KD, Zhou S, Lu T, Sorrentino BP. Enforced P-glycoprotein pump function in murine bone marrow cells results in expansion of side population stem cells *in vitro* and repopulating cells *in vivo*. *Blood*. 2000;96(3):902-9.
18. Burns JC, Friedmann T, Driever W, Burrascano M, Yee JK. Vesicular stomatitis virus G glycoprotein pseudotyped retroviral vectors: concentration to very high titer and efficient gene transfer into mammalian and nonmammalian cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1993;90(17):8033-7.
19. Bushman FD. Targeting survival: integration site selection by retroviruses and LTR-retrotransposons. *Cell*. 2003;115(2):135-8.
20. Caplan AI, Bruder SP. Mesenchymal stem cells: building blocks for molecular medicine in the 21st century. *Trends Mol Med*. 2001;7(6):259-64.

21. Cherington V, Chiang GG, McGrath CA, Gaffney A, Galanopoulos T, Merrill W, Bizinkauskas CB, Hansen M, Sobolewski J, Levine PH, Greenberger JS, Hurwitz DR. Retroviral vector-modified bone marrow stromal cells secrete biologically active factor IX *in vitro* and transiently deliver therapeutic levels of human factor IX to the plasma of dogs after reinfusion. *Hum Gene Ther.* 1998;9(10):1397-407.
22. Chiang GG, Rubin HL, Cherington V, Wang T, Sobolewski J, McGrath CA, Gaffney A, Emami S, Sarver N, Levine PH, Greenberger JS, Hurwitz DR. Bone marrow stromal cell-mediated gene therapy for hemophilia A: *in vitro* expression of human factor VIII with high biological activity requires the inclusion of the proteolytic site at amino acid 1648. *Hum Gene Ther.* 1999;10(1):61-76.
23. Christian JA. 2000. "Red blood cell survival and destruction". Pp. 117-124. *In: Schalm's Veterinary Hematology.* Lippincott Williams & Wilkins. Philadelphia. 1344 pp.
24. Chyung YH, Peng PD, Kay MA. System for simultaneous tissue-specific and disease-specific regulation of therapeutic gene expression. *Hum Gene Ther.* 2003;14(13):1255-64.

25. Coffin JH, Hughes SH, Varmus HE, *Retroviruses*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, New York 1997.
26. Colter DC, Class R, DiGirolamo CM, Prockop DJ. Rapid expansion of recycling stem cells in cultures of plastic-adherent cells from human bone marrow. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2000;97(7):3213-8.
27. Cowgill LD, James KM, Levy JK, Browne JK, Miller A, Lobingier RT, Egrie JC. Use of recombinant human erythropoietin for management of anemia in dogs and cats with renal failure. *J Am Vet Med Assoc*. 1998;212(4):521-8.
28. Daga A, Muraglia A, Quarto R, Cancedda R, Corte G. Enhanced engraftment of EPO-transduced human bone marrow stromal cells transplanted in a 3D matrix in non-conditioned NOD/SCID mice. *Gene Ther*. 2002;9(14):915-21.
29. Dave UP, Jenkins NA, Copeland NG. Gene therapy insertional mutagenesis insights. *Science*. 2004;303(5656):333.
30. Demetri GD, Kris M, Wade J, Degos L, Cella D. Quality-of-life benefit in chemotherapy patients treated with epoetin alfa is independent of disease response or tumor type: results from a prospective community oncology study. Procrit Study Group. *J Clin Oncol*. 1998;16(10):3412-25.

31. de Revel T, Becard N, Sorg T, Rousseau S, Spano JP, Thiebot H, Methali M, Gras G, Le Grand R, Dormont D. Retroviral interleukin 1 alpha gene transfer in bone marrow stromal cells in a primate model: induction of myelopoiesis stimulation. *Br J Hematol.* 2002;118(3):875-84.
32. Descamps V, Blumenfeld N, Villeval JL, Vainchenker W, Perricaudet M, Beuzard Y. Erythropoietin gene transfer and expression in adult normal mice: use of an adenovirus vector. *Hum Gene Ther.* 1994;5(8):979-85.
33. Devine SM, Bartholomew AM, Mahmud N, Nelson M, Patil S, Hardy W, Sturgeon C, Hewett T, Chung T, Stock W, Sher D, Weissman S, Ferrer K, Mosca J, Deans R, Moseley A, Hoffman R. Mesenchymal stem cells are capable of homing to the bone marrow of non-human primates following systemic infusion. *Exp Hematol.* 2001;29(2):244-55.
34. Ding L, Lu S, Batchu R, III RS, Munshi N. Bone marrow stromal cells as a vehicle for gene transfer. *Gene Ther.* 1999;6(9):1611-6.
35. Dominici M, Hofmann TJ, Horwitz EM. Bone marrow mesenchymal cells: biological properties and clinical applications. *J Biol Regul Homeost Agents.* 2001;15(1):28-37.

36. Ebert BL, Bunn HF. Regulation of the erythropoietin gene. *Blood*. 1999;94(6):1864-77.
37. Egrie JC, Dwyer E, Browne JK, Hitz A, Lykos MA. Darbepoetin alfa has a longer circulating half-life and greater *in vivo* potency than recombinant human erythropoietin. *Exp Hematol*. 2003;31(4):290-9.
38. Egrie JC, Strickland TW, Lane J, Aoki K, Cohen AM, Smalling R, Trail G, Lin FK, Browne JK, Hines DK. Characterization and biological effects of recombinant human erythropoietin. *Immunobiology*. 1986;172(3-5):213-24.
39. Eliopoulos N, Al-Khaldi A, Beausejour CM, Momparler RL, Momparler LF, Galipeau J. Human cytidine deaminase as an *ex vivo* drug selectable marker in gene-modified primary bone marrow stromal cells. *Gene Ther*. 2002;9(7):452-62.
40. Eliopoulos N, Al-Khaldi A, Crosato M, Lachapelle K, Galipeau J. A neovascularized organoid derived from retrovirally engineered bone marrow stroma leads to prolonged *in vivo* systemic delivery of erythropoietin in nonmyeloablated, immunocompetent mice. *Gene Ther*. 2003;10(6):478-89.
41. Eliopoulos N, Lejeune L, Martineau D, Galipeau J. Human-compatible collagen matrix for prolonged and reversible systemic delivery of

- erythropoietin in mice from gene-modified marrow stromal cells. *Mol Ther.* 2004;10(4):741-8.
42. Emami S, Merrill W, Cherington V, Chiang GG, Kirchgesser M, Appel JM, Hansen M, Levine PH, Greenberger JS, Hurwitz DR. Enhanced growth of canine bone marrow stromal cell cultures in the presence of acidic fibroblast growth factor and heparin. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 1997;33(7):503-11.
43. Eschbach JW, Egrie JC, Downing MR, Browne JK, Adamson JW. Correction of the anemia of end-stage renal disease with recombinant human erythropoietin. Results of a combined phase I and II clinical trial. *N Engl J Med.* 1987;316(2):73-8.
44. Eschbach JW, Haley NR, Egrie JC, Adamson JW. A comparison of the responses to recombinant human erythropoietin in normal and uremic subjects. *Kidney Int.* 1992 Aug;42(2):407-16.
45. Galmiche MC, Koteliansky VE, Briere J, Herve P, Charbord P. Stromal cells from human long-term marrow cultures are mesenchymal cells that differentiate following a vascular smooth muscle differentiation pathway. *Blood.* 1993;82(1):66-76.

46. Gao GP, Alvira MR, Wang L, Calcedo R, Johnston J, Wilson JM. Novel adeno-associated viruses from rhesus monkeys as vectors for human gene therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99(18):11854-9.
47. Gao G, Lebherz C, Weiner DJ, Grant R, Calcedo R, McCullough B, Bagg A, Zhang Y, Wilson JM. Erythropoietin gene therapy leads to autoimmune anemia in macaques. *Blood*. 2004;103(9):3300-2.
48. Goerner M, Horn PA, Peterson L, Kurre P, Storb R, Rasko JE, Kiem HP. Sustained multilineage gene persistence and expression in dogs transplanted with CD34(+) marrow cells transduced by RD114-pseudotype oncoretrovirus vectors. *Blood*. 2001;98(7):2065-70.
49. Gossen M, Freundlieb S, Bender G, Muller G, Hillen W, Bujard H. Transcriptional activation by tetracyclines in mammalian cells. *Science*. 1995;268(5218):1766-9.
50. Gronthos S, Zannettino AC, Hay SJ, Shi S, Graves SE, Kortessidis A, Simmons PJ. Molecular and cellular characterisation of highly purified stromal stem cells derived from human bone marrow. *J Cell Sci*. 2003;116(Pt 9):1827-35.

51. Gunzburg WH, Salmons B. Development of retroviral vectors as safe, targeted gene delivery systems. *J Mol Med.* 1996;74(4):171-82.
52. Hacein-Bey-Abina S, Le Deist F, Carlier F, Bouneaud C, Hue C, De Villartay JP, Thrasher AJ, Wulffraat N, Sorensen R, Dupuis-Girod S, Fischer A, Davies EG, Kuis W, Leiva L, Cavazzana-Calvo M. Sustained correction of X-linked severe combined immunodeficiency by *ex vivo* gene therapy. *N Engl J Med.* 2002;346(16):1185-93.
53. Hacein-Bey-Abina S, Von Kalle C, Schmidt M, McCormack MP, Wulffraat N, Leboulch P, Lim A, Osborne CS, Pawliuk R, Morillon E, Sorensen R, Forster A, Fraser P, Cohen JI, de Saint Basile G, Alexander I, Wintergerst U, Frebourg T, Aurias A, Stoppa-Lyonnet D, Romana S, Radford-Weiss I, Gross F, Valensi F, Delabesse E, Macintyre E, Sigaux F, Soulier J, Leiva LE, Wissler M, Prinz C, Rabbitts TH, Le Deist F, Fischer A, Cavazzana-Calvo M. LMO2-associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1. *Science.* 2003;302(5644):415-9.
54. Hahn WC, Weinberg RA. Modelling the molecular circuitry of cancer. *Nat Rev Cancer.* 2002;2(5):331-41.

55. Hamamori Y, Samal B, Tian J, Kedes L. Persistent erythropoiesis by myoblast transfer of erythropoietin cDNA. *Hum Gene Ther.* 1994;5(11):1349-56.
56. Horn PA, Topp MS, Morris JC, Riddell SR, Kiem HP. Highly efficient gene transfer into baboon marrow repopulating cells using GALV-pseudotype oncoretroviral vectors produced by human packaging cells. *Blood.* 2002;100(12):3960-7.
57. Horn PA, Thomasson BM, Wood BL, Andrews RG, Morris JC, Kiem HP. Distinct hematopoietic stem/progenitor cell populations are responsible for repopulating NOD/SCID mice compared with nonhuman primates. *Blood.* 2003;102(13):4329-35.
58. Horn PA, Morris JC, Neff T, Kiem HP. Stem cell gene transfer-efficacy and safety in large animal studies. *Mol Ther.* 2004;10(3):417-31.
59. Hou Z, Nguyen Q, Frenkel B, Nilsson SK, Milne M, van Wijnen AJ, Stein JL, Quesenberry P, Lian JB, Stein GS. Osteoblast-specific gene expression after transplantation of marrow cells: implications for skeletal gene therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999;96(13):7294-9.

60. Huss R, Smith FO, Myerson DH, Deeg HJ. Homing and immunogenicity of murine stromal cells transfected with xenogeneic MHC class II genes. *Cell Transplant.* 1995;4(5):483-91.
61. Jaalouk DE, Eliopoulos N, Couture C, Mader S, Galipeau J. Glucocorticoid-inducible retrovector for regulated transgene expression in genetically engineered bone marrow stromal cells. *Hum Gene Ther.* 2000;11(13):1837-49.
62. Jelkmann W, Hellwig-Burgel T. Biology of erythropoietin. *Adv Exp Med Biol.* 2001;502:169-87.
63. Johnston J, Tazelaar J, Rivera VM, Clackson T, Gao GP, Wilson JM. Regulated expression of erythropoietin from an AAV vector safely improves the anemia of beta-thalassemia in a mouse model. *Mol Ther.* 2003;7(4):493-7.
64. Kasten P, Luginbuhl R, van Griensven M, Barkhausen T, Krettek C, Bohner M, Bosch U. Comparison of human bone marrow stromal cells seeded on calcium-deficient hydroxyapatite, beta-tricalcium phosphate and demineralized bone matrix. *Biomaterials.* 2003;24(15):2593-603.

65. Kay MA, Glorioso JC, Naldini L. Viral vectors for gene therapy: the art of turning infectious agents into vehicles of therapeutics. *Nat Med.* 2001;7(1):33-40.
66. Kelly PF, Donahue RE, Vandergriff JA, Takatoku M, Bonifacino AC, Agricola BA, Metzger ME, Dunbar CE, Nienhuis AW, Vanin EF. Prolonged multilineage clonal hematopoiesis in a rhesus recipient of CD34 positive cells marked with a RD114 pseudotyped oncoretroviral vector. *Blood Cells Mol Dis.* 2003;30(1):132-43.
67. Kessler PD, Podsakoff GM, Chen X, McQuiston SA, Colosi PC, Matelis LA, Kurtzman GJ, Byrne BJ. Gene delivery to skeletal muscle results in sustained expression and systemic delivery of a therapeutic protein. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1996;93(24):14082-7.
68. Kiem HP, Sellers S, Thomasson B, Morris JC, Tisdale JF, Horn PA, Hematti P, Adler R, Kuramoto K, Calmels B, Bonifacino A, Hu J, von Kalle C, Schmidt M, Sorrentino B, Nienhuis A, Blau CA, Andrews RG, Donahue RE, Dunbar CE. Long-term clinical and molecular follow-up of large animals receiving retrovirally transduced stem and progenitor cells: no progression to clonal hematopoiesis or leukemia. *Mol Ther.* 2004;9(3):389-95.

69. Kirkness EF, Bafna V, Halpern AL, Levy S, Remington K, Rusch DB, Delcher AL, Pop M, Wang W, Fraser CM, Venter JC. The dog genome: survey sequencing and comparative analysis. *Science*. 2003;301:1898-903.
70. King LG, Giger U, Diserens D, Nagode LA. Anemia of chronic renal failure in dogs. *J Vet Intern Med*. 1992;6(5):264-70.
71. Klinman DM, Conover J, Leiden JM, Rosenberg AS, Sechler JM. Safe and effective regulation of hematocrit by gene gun administration of an erythropoietin-encoding DNA plasmid. *Hum Gene Ther*. 1999;10(4):659-65.
72. Kohn DB, Sadelain M, Dunbar C, Bodine D, Kiem HP, Candotti F, Tisdale J, Riviere I, Blau CA, Richard RE, Sorrentino B, Nolta J, Malech H, Brenner M, Cornetta K, Cavagnaro J, High K, Glorioso J; American Society of Gene Therapy (ASGT). American Society of Gene Therapy (ASGT) ad hoc subcommittee on retroviral-mediated gene transfer to hematopoietic stem cells. *Mol Ther*. 2003;8(2):180-7.
73. Krebsbach PH, Zhang K, Malik AK, Kurachi K. Bone marrow stromal cells as a genetic platform for systemic delivery of therapeutic proteins *in vivo*: human factor IX model. *J Gene Med*. 2003;5(1):11-7.

74. Langston CE, Reine NJ, Kittrell D. The use of erythropoietin. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* 2003;33(6):1245-60.
75. Leonard MP, Canning DA, Epstein JI, Gearhart JP, Jeffs RD. Local tissue reaction to the subureteral injection of glutaraldehyde cross-linked bovine collagen in humans. *J Urol.* 1990;143(6):1209-12.
76. Liu YL, Mingozi F, Rodriguez-Colon SM, Joseph S, Dobrzynski E, Suzuki T, High KA, Herzog RW. Therapeutic levels of factor IX expression using a muscle-specific promoter and adeno-associated virus serotype 1 vector. *Hum Gene Ther.* 2004;15(8):783-92.
77. Loudovaris T, Jacobs S, Young S, Maryanov D, Brauker J, Johnson RC. Correction of diabetic nod mice with insulinomas implanted within Baxter immunoisolation devices. *J Mol Med.* 1999;77(1):219-22.
78. Markowitz D, Goff S, Bank A. #1 A safe packaging line for gene transfer: separating viral genes on two different plasmids. *J Virol.* 1988;62(4):1120-4.
79. Markowitz D, Goff S, Bank A. #2 Construction and use of a safe and efficient amphotropic packaging cell line. *Virology.* 1988;167(2):400-6.

80. Martin DR, Cox NR, Hathcock TL, Niemeyer GP, Baker HJ. Isolation and characterization of multipotential mesenchymal stem cells from feline bone marrow. *Exp Hematol.* 2002;30(8):879-86.
81. Martino G, Poliani PL, Marconi PC, Comi G, Furlan R. Cytokine gene therapy of autoimmune demyelination revisited using herpes simplex virus type-1-derived vectors. *Gene Ther.* 2000;7(13):1087-93.
82. Marx JC, Allay JA, Persons DA, Nooner SA, Hargrove PW, Kelly PF, Vanin EF, Horwitz EM. High-efficiency transduction and long-term gene expression with a murine stem cell retroviral vector encoding the green fluorescent protein in human marrow stromal cells. *Hum Gene Ther.* 1999;10(7):1163-73.
83. Maxwell AP. Novel erythropoiesis-stimulating protein in the management of the anemia of chronic renal failure. *Kidney Int.* 2002;62(2):720-9.
84. Meirelles Lda S, Nardi NB. Murine marrow-derived mesenchymal stem cell: isolation, *in vitro* expansion, and characterization. *Br J Haematol.* 2003;123(4):702-11.
85. Neff T, Horn PA, Peterson LJ, Thomasson BM, Thompson J, Williams DA, Schmidt M, Georges GE, von Kalle C, Kiem HP. Methylguanine methyltransferase-mediated *in vivo* selection and chemoprotection of

- allogeneic stem cells in a large-animal model. *J Clin Invest.* 2003;112(10):1581-8.
86. Nolta JA, Hanley MB, Kohn DB. Sustained human hematopoiesis in immunodeficient mice by cotransplantation of marrow stroma expressing human interleukin-3: analysis of gene transduction of long-lived progenitors. *Blood.* 1994;83(10):3041-51.
87. Olivares EC, Hollis RP, Chalberg TW, Meuse L, Kay MA, Calos MP. Site-specific genomic integration produces therapeutic Factor IX levels in mice. *Nat Biotechnol.* 2002;20(11):1124-8.
88. Ory DS, Neugeboren BA, Mulligan RC. A stable human-derived packaging cell line for production of high titer retrovirus/vesicular stomatitis virus G pseudotypes. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1996;93(21):11400-6.
89. Osborne WR, Ramesh N, Lau S, Clowes MM, Dale DC, Clowes AW. Gene therapy for long-term expression of erythropoietin in rats. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995;92(17):8055-8.
90. Palmer TD, Rosman GJ, Osborne WR, Miller AD. Genetically modified skin fibroblasts persist long after transplantation but gradually inactivate introduced genes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991;88(4):1330-4.

91. Peister A, Mellad JA, Wang M, Tucker HA, Prockop DJ. Stable transfection of MSCs by electroporation. *Gene Ther.* 2004;11(2):224-8.
92. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science.* 1999;284(5411):143-7.
93. Pochampally RR, Neville BT, Schwarz EJ, Li MM, Prockop DJ. Rat adult stem cells (marrow stromal cells) engraft and differentiate in chick embryos without evidence of cell fusion. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2004;101(25):9282-5.
94. Prockop DJ. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science.* 1997;276(5309):71-4.
95. Rabbitts TH, Bucher K, Chung G, Grutz G, Warren A, Yamada Y. The effect of chromosomal translocations in acute leukemias: the LMO2 paradigm in transcription and development. *Cancer Res.* 1999;59(7 Suppl):1794s-1798s.
96. Rao SS, Peters SO, Crittenden RB, Stewart FM, Ramshaw HS, Quesenberry PJ. Stem cell transplantation in the normal nonmyeloablated host: relationship

- between cell dose, schedule, and engraftment. *Exp Hematol.* 1997;25(2):114-21.
97. Randolph JF, Stokol T, Scarlett JM, MacLeod JN. Comparison of biological activity and safety of recombinant canine erythropoietin with that of recombinant human erythropoietin in clinically normal dogs. *Am J Vet Res.* 1999;60(5):636-42.
98. Randolph JE, Scarlett J, Stokol T, MacLeod JN. Clinical efficacy and safety of recombinant canine erythropoietin in dogs with anemia of chronic renal failure and dogs with recombinant human erythropoietin-induced red cell aplasia. *J Vet Intern Med.* 2004;18(1):81-91.
99. Recchia A, Parks RJ, Lamartina S, Toniatti C, Pieroni L, Palombo F, Ciliberto G, Graham FL, Cortese R, La Monica N, Colloca S. Site-specific integration mediated by a hybrid adenovirus/adeno-associated virus vector. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1999;96(6):2615-20.
100. Regulier E, Schneider BL, Deglon N, Beuzard Y, Aebischer P. Continuous delivery of human and mouse erythropoietin in mice by genetically engineered polymer encapsulated myoblasts. *Gene Ther.* 1998;5(8):1014-22.

101. Rendahl KG, Quiroz D, Ladner M, Coyne M, Seltzer J, Manning WC, Escobedo JA. Tightly regulated long-term erythropoietin expression *in vivo* using tet-inducible recombinant adeno-associated viral vectors. *Hum Gene Ther.* 2002;13(2):335-42.
102. Salceda S, Caro J. Hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) protein is rapidly degraded by the ubiquitin-proteasome system under normoxic conditions. Its stabilization by hypoxia depends on redox-induced changes. *J Biol Chem.* 1997;272(36):22642-7.
103. Sanchez-Elsner T, Ramirez JR, Sanz-Rodriguez F, Varela E, Bernabeu C, Botella LM. A cross-talk between hypoxia and TGF-beta orchestrates erythropoietin gene regulation through SP1 and Smads. *J Mol Biol.* 2004;336(1):9-24.
104. Schneider BL, Schwenter F, Pralong WF, Aebischer P. Prevention of the initial host immuno-inflammatory response determines the long-term survival of encapsulated myoblasts genetically engineered for erythropoietin delivery. *Mol Ther.* 2003;7(4):506-14.
105. Schwenter F, Deglon N, Aebischer P. Optimization of human erythropoietin secretion from MLV-infected human primary fibroblasts used for encapsulated cell therapy. *J Gene Med.* 2003;5(3):246-57.

106. Schwenter F, Schneider BL, Pralong WF, Deglon N, Aebischer P. Survival of encapsulated human primary fibroblasts and erythropoietin expression under xenogeneic conditions. *Hum Gene Ther.* 2004;15(7):669-80.
107. Sclafani AP, Romo T 3rd, Parker A, McCormick SA, Cocker R, Jacono A. Homologous collagen dispersion (dermalogen) as a dermal filler: persistence and histology compared with bovine collagen. *Ann Plast Surg.* 2002;49(2):181-8.
108. Seidenfeld J, Piper M, Aronson N. Systematic review of controlled trials on erythropoietin to support evidence-based guidelines. *Oncology.* 2002;16(9 Suppl 10):171-88.
109. Seppen J, Barry SC, Harder B, Osborne WR. Lentivirus administration to rat muscle provides efficient sustained expression of erythropoietin. *Blood.* 2001;98(3):594-6.
110. Serguera C, Bohl D, Rolland E, Prevost P, Heard JM. Control of erythropoietin secretion by doxycycline or mifepristone in mice bearing polymer-encapsulated engineered cells. *Hum Gene Ther.* 1999;10(3):375-83.

111. Setoguchi Y, Danel C, Crystal RG. Stimulation of erythropoiesis by in vivo gene therapy: physiologic consequences of transfer of the human erythropoietin gene to experimental animals using an adenovirus vector. *Blood*. 1994;84(9):2946-53.
112. Song L, Tuan RS. Transdifferentiation potential of human mesenchymal stem cells derived from bone marrow. *FASEB J*. 2004;18(9):980-2.
113. Spivak JL. Recombinant human erythropoietin and the anemia of cancer. *Blood*. 1994;84(4):997-1004.
114. Spivak JL. Erythropoietin use and abuse: When physiology and pharmacology collide. *Adv Exp Med Biol*. 2001;502:207-24.
115. Stegman SJ, Chu S, Bensch K, Armstrong R. A light and electron microscopic evaluation of Zyderm collagen and Zyplast implants in aging human facial skin. A pilot study. *Arch Dermatol*. 1987;123(12):1644-9.
116. Stewart MJ, Plautz GE, Del Buono L, Yang ZY, Xu L, Gao X, Huang L, Nabel EG, Nabel GJ. Gene transfer in vivo with DNA-liposome complexes: safety and acute toxicity in mice. *Hum Gene Ther*. 1992;3(3):267-75.

117. Storry PL, Tiplady RJ, Gaines Das RE, Stenning BE, Lamikanra A, Rafferty B, Lee J. Epoetin alfa and beta differ in their erythropoietin isoform compositions and biological properties. *Br J Hematol.* 1998;100(1):79-89.
118. Sun WH, Burkholder JK, Sun J, Culp J, Turner J, Lu XG, Pugh TD, Ershler WB, Yang NS. *In vivo* cytokine gene transfer by gene gun reduces tumor growth in mice. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1995;92(7):2889-93.
119. Terada N, Hamazaki T, Oka M, Hoki M, Mastalerz DM, Nakano Y, Meyer EM, Morel L, Petersen BE, Scott EW. Bone marrow cells adopt the phenotype of other cells by spontaneous cell fusion. *Nature.* 2002;416(6880):542-5.
120. Thomas CE, Ehrhardt A, Kay MA. Progress and problems with the use of viral vectors for gene therapy. *Nat Rev Genet.* 2003;4(5):346-58.
121. Transfiguracion J, Jaalouk DE, Ghani K, Galipeau J, Kamen A. Size-exclusion chromatography purification of high-titer vesicular stomatitis virus G glycoprotein-pseudotyped retrovectors for cell and gene therapy applications. *Hum Gene Ther.* 2003;14(12):1139-53.
122. Trivedi N, Steil GM, Colton CK, Bonner-Weir S, Weir GC. Improved vascularization of planar membrane diffusion devices following continuous

- infusion of vascular endothelial growth factor. *Cell Transplant.* 2000;9(1):115-24.
123. Van Damme A, Vanden Driessche T, Collen D, Chuah MK. Bone marrow stromal cells as targets for gene therapy. *Curr Gene Ther.* 2002;2(2):195-209.
124. Van Damme A, Chuah MK, Dell'accio F, De Bari C, Luyten F, Collen D, VandenDriessche T. Bone marrow mesenchymal cells for haemophilia A gene therapy using retroviral vectors with modified long-terminal repeats. *Haemophilia.* 2003;9(1):94-103.
125. VandenDriessche T, Collen D, Chuah MK. Viral vector-mediated gene therapy for hemophilia. *Curr Gene Ther.* 2001;1(3):301-15.
126. Voulgari PV, Chaidos A, Tzouvara E, Alymara V, Alamanos Y, Drosos AA, Bourantas KL. Antierythropoietin antibodies in thalassemia patients. *Ann Hematol.* 2004;83(1):22-7.
127. Wagers AJ, Weissman IL. Plasticity of adult stem cells. *Cell.* 2004;116(5):639-48.

128. Wang L, Nichols TC, Read MS, Bellinger DA, Verma IM. Sustained expression of therapeutic level of factor IX in hemophilia B dogs by AAV-mediated gene therapy in liver. *Mol Ther.* 2000;1(2):154-8.
129. Wang GL, Semenza GL. General involvement of hypoxia-inducible factor 1 in transcriptional response to hypoxia. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1993;90(9):4304-8.
130. Wang GL, Semenza GL. Purification and characterization of hypoxia-inducible factor 1. *J Biol Chem.* 1995;270(3):1230-7.
131. Wang Z, Goldberg MA, Scadden DT. HIV-1 suppresses erythropoietin production *in vitro*. *Exp Hematol.* 1993;21(5):683-8.
132. Wen D, Boissel JP, Tracy TE, Gruninger RH, Mulcahy LS, Czelusniak J, Goodman M, Bunn HF. Erythropoietin structure-function relationships: high degree of sequence homology among mammals. *Blood.* 1993;82(5):1507-16.
133. Yamada M, Oligino T, Mata M, Goss JR, Glorioso JC, Fink DJ. Herpes simplex virus vector-mediated expression of Bcl-2 prevents 6-hydroxydopamine-induced degeneration of neurons in the substantia nigra *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999;96(7):4078-83.

134. Yanay O, Barry SC, Flint LY, Brzezinski M, Barton RW, Osborne WR. Long-term erythropoietin gene expression from transduced cells in bioisolator devices. *Hum Gene Ther.* 2003;14(17):1587-93.
135. Ye X, Rivera VM, Zoltick P, Cerasoli F Jr, Schnell MA, Gao G, Hughes JV, Gilman M, Wilson JM. Regulated delivery of therapeutic proteins after *in vivo* somatic cell gene transfer. *Science.* 1999;283(5398):88-91.
136. Zeira E, Manevitch A, Khatchatourians A, Pappo O, Hyam E, Darash-Yahana M, Tavor E, Honigman A, Lewis A, Galun E. Femtosecond infrared laser-an efficient and safe *in vivo* gene delivery system for prolonged expression. *Mol Ther.* 2003;8(2):342-50.
137. Zhang XY, La Russa VF, Bao L, Kolls J, Schwarzenberger P, Reiser J. Lentiviral vectors for sustained transgene expression in human bone marrow-derived stromal cells. *Mol Ther.* 2002;5(5 Pt 1):555-65.
138. Zheng C, Baum BJ, Iadarola MJ, O'Connell BC. Genomic integration and gene expression by a modified adenoviral vector. *Nat Biotechnol.* 2000;18(2):176-80.

139. Zhou S, Murphy JE, Escobedo JA, Dwarki VJ. Adeno-associated virus-mediated delivery of erythropoietin leads to sustained elevation of hematocrit in nonhuman primates. *Gene Ther.* 1998;5(5):665-70.

VII. ANNEXES

ANNEXE I

**Premier essai d'implantation
des CSMO autologues chez le chien**

Introduction

La fonctionnalité de l'EPO canine produite par les CSMO a été démontrée lors de l'essai chez les souris immunodéficientes (Voir article figure 5). Suite à cette évidence, nous pouvions procéder à l'implantation des CSMO autologues chez le chien. Les candidats étaient des Beagle femelles âgées entre 1 et 2 ans provenant de la colonie de la Faculté de médecine vétérinaire de l'Université de Montréal. Pour assurer une élévation significative de l'hématocrite (Ht), la quantité d'EPO relâchée par les implants devait idéalement correspondre à la dose thérapeutique administrée chez les patients anémiques, soit environ 150-450 U/ kg/ semaine. La dose de cellules implantées et la méthode d'implantation furent donc des paramètres à mettre au point.

Le taux de mortalité cellulaire *in vivo* est un facteur affectant l'efficacité du traitement mais est très difficile à prédire. En effet, cette mortalité est causée par l'insuffisance de nutriments et d'oxygène et par les variations incontrôlées de température et de pression. Des études pilotes effectuées dans notre laboratoire, utilisant des CSMO canines ingénierées avec le gène *lacZ* et implantées chez le chien avec le collagène bovin, révèlent qu'au delà de 80 % des cellules sont mortes deux semaines suivant l'implantation. C'est donc une observation à tenir en compte lors des essais avec les CSMO produisant l'EPO canine. Néanmoins, la délivrance d'EPO dans l'organisme est quasi immédiate suivant l'implantation et même si cette production diminue rapidement à cause de la mortalité cellulaire, la demi-vie des globules rouges d'environ 100 jours assure un effet prolongé du traitement.

L'inflammation causée par du matériel exogène comme la EGFP de méduse et le collagène bovin doit être minime pour éviter un rejet potentiel. Une telle réponse immunitaire peut engendrer la mort des CSMO autologues puisqu'elles sont EGFP(+). Conséquemment, les chémokines et les composés intracellulaires relâchés amplifient l'activation locale du système immunitaire et mènent au rejet du matériel implanté.

L'objectif de l'essai clinique est de provoquer une augmentation de l'Ht et de maintenir des valeurs élevées le plus longtemps possible sans toutefois altérer les autres fonctions physiologiques.

Matériel et méthodes

L'administration des implants chez les chiens a été effectuée sous anesthésie générale. Les chiens ont été pré-médiqués par une injection intra-musculaire combinée de butorphanol à 0.05 mg/kg et d'acépromazine 0.05 mg/kg. L'anesthésie générale a été induite par une injection intra-veineuse de propofol à 4 mg/kg, suivi d'une intubation trachéale et du maintien de l'anesthésie avec de l'isoflurane. Les cellules incorporées au collagène ont été implantées par voie sous-cutanée avec une aiguille de calibre 18 sur les flancs gauche et droit préalablement aseptisés. Les sites d'implantation étaient identifiés avec une agrafe chirurgicale.

Pour déterminer la dose de cellules à planter, nous nous sommes référés aux essais effectués chez la souris et à la dose d'EPO produite *in vitro*. Nos collègues ont publié un modèle de délivrance d'EPO par des CSMO chez des souris et chacune d'elle avait reçu environ 4×10^6 CSMO incorporées dans le même collagène bovin

utilisé dans cette étude (1). Par extrapolation, si une souris pèse 25 g, un chien de 10 kg devrait recevoir près de 1,5 milliards de cellules. Une telle quantité est très longue à obtenir et augmente les coûts du traitement. C'est pourquoi il faut également considérer la dose d'EPO produite *in vitro* et espérer fournir une dose pharmacologique de la protéine. Les doses thérapeutiques d'EPO recombinante humaine correspondent à 210-640 IU par jour pour un chien de 10 kg (2). Les CSMO du chien produisent *in vitro* 2,05 IU d'EPO/ 10^6 cellules/ 24 h tel que quantifié par ELISA. Il est préférable d'implanter un nombre de cellules fournissant une dose supérieure puisque l'efficacité de transfert de l'EPO n'est pas optimale tout en considérant une mort cellulaire certaine. Après une expansion considérable, $4,8 \times 10^8$ CSMO transduites ont été obtenues pour l'implantation. D'après le dosage d'EPO, cette population produit en moyenne 984 IU d'EPO/ 10^6 cellules/ 24 h, i.e. une dose thérapeutique supérieure à l'administration d'EPO recombinante.

Les $4,8 \times 10^8$ CSMO transduites obtenues ont été culottées par centrifugation, resuspendues avec un minimum de milieu de culture pour finalement occuper un volume de 2,4 mL. Elles ont ensuite été incorporées à 9,6 mL de collagène bovin pour faire 6 implants de 2 mL de l'ordre de 3 par côté.

Un suivi clinique était effectué 4 jours suivant l'implantation et hebdomadairement par la suite. À chaque fois l'Ht, la concentration de protéines circulantes et la pression artérielle étaient mesurés. Un aliquot de sérum a été prélevé pour le dosage d'EPO circulante et pour des analyses hématologiques et biochimiques.

Résultats, discussion et conclusion

L'EPO canine délivrée systématiquement par les CSMO autologues a induit une augmentation significative de l'Ht du chien de 43 % à 59 % (figure 1). Les valeurs élevées d'Ht ont été soutenues pendant cinq semaines. Le traitement est donc très efficace malgré l'importante mort cellulaire rapportée par l'étude avec les CSMO rétrotransduites avec le gène *lacZ*.

Une résection de l'implant a été effectuée 2 mois après l'implantation dans le but d'analyser la viabilité cellulaire dans l'implant et de déterminer s'il y a inflammation ou infiltration immunitaire. Une coupe histologique suivie d'une coloration hématoxyline-phloxine-safran (HPS) (figure 2) montre la distribution des cellules dans l'implant. On observe des cellules viables et des vaisseaux sanguins à la périphérie de l'implant tandis que le centre est acellulaire. Cette mortalité est probablement provoquée par l'hypoxie régnant au centre de l'implant, principalement causée par le manque de vascularisation. Il est possible d'améliorer cette situation en modifiant la méthode d'implantation. La façon la plus simple est de diminuer la taille des implants pour ainsi réduire la grosseur de la région centrale, améliorer le potentiel de vascularisation et augmenter la surface de contact des cellules implantées vers les tissus de l'hôte. De ce fait, les chiens implantés ultérieurement ont reçu moins de CSMO et celles-ci ont été réparties dans des implants plus petits.

On observe très peu de cellules immunitaires de l'hôte sur la coupe de l'implant (figure 2). L'inflammation est donc minime malgré la présence de EGFP de méduse et du collagène bovin. La formation d'une capsule fibreuse autour de

l'implant est un phénomène bien connu lors de l'utilisation du collagène bovin chez les humains (3). Ce niveau de tolérance chez le chien confirme les ressemblances immunitaires entre le chien et l'humain et la validité de notre modèle.

Toutes les données hématologiques et biochimiques étaient normales au cours du traitement. Conséquemment, aucune fonction physiologique n'a été perturbée et le traitement s'est avéré hautement sécuritaire.

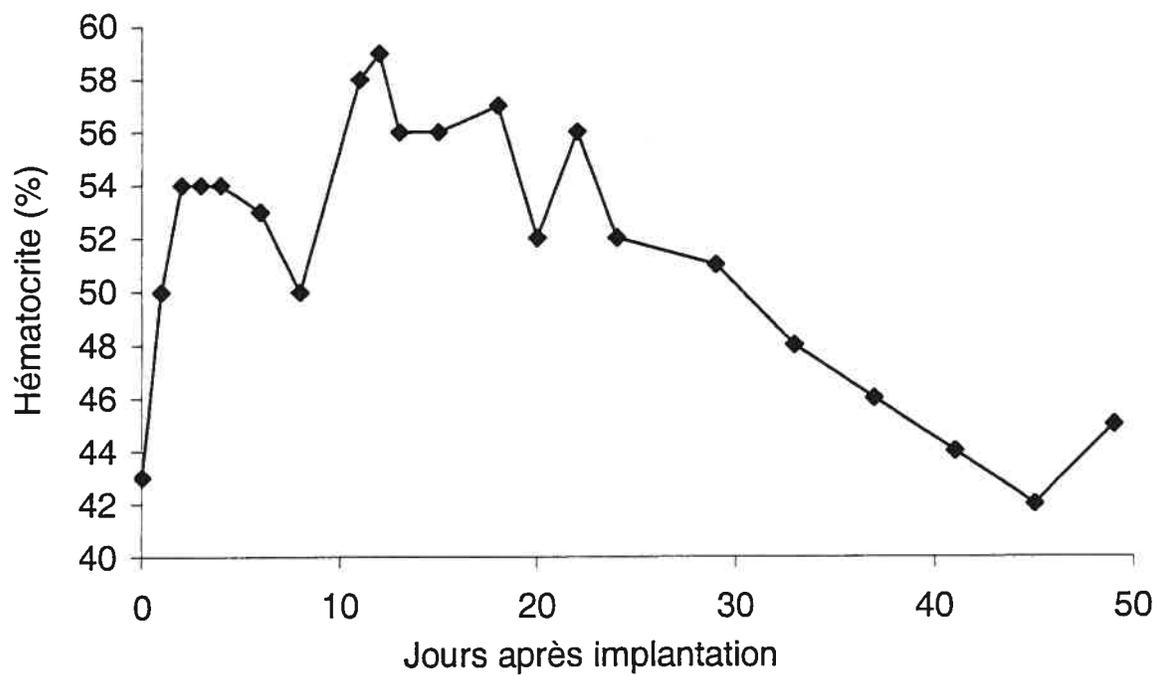


Figure 1: Cinétique de l'hématocrite du premier chien implanté avec les CSMO produisant l'EPO.

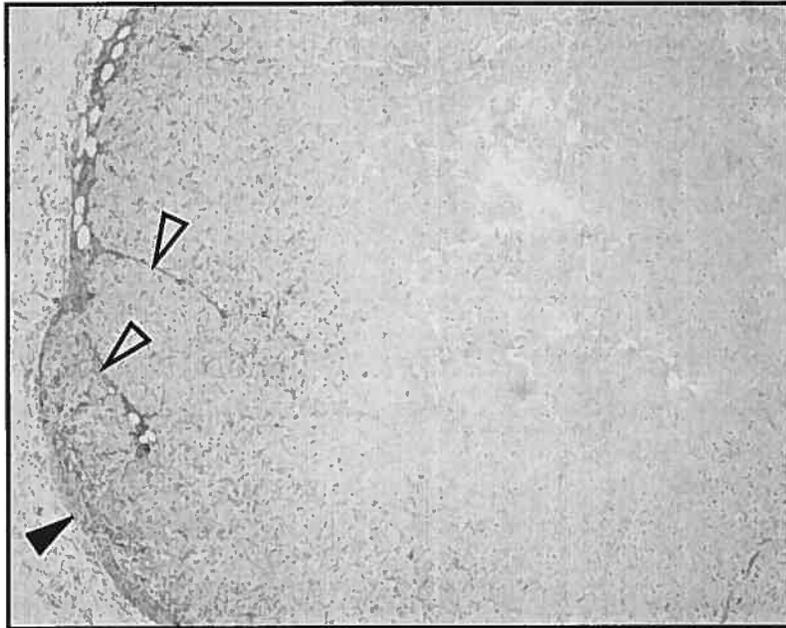


Figure 2: Section centrale de l'implant du premier chien implanté avec les CSMO produisant EPO. Coupe histologique de l'implant #2 gauche après coloration HPS. La capsule fibreuse externe est indiquée par un triangle plein▲. Les vaisseaux sanguins sont indiqués par des triangles vides△. Grossissement 4x.

Références

1. Eliopoulos N, Al-Khaldi A, Crosato M, Lachapelle K, Galipeau J. A neovascularized organoid derived from retrovirally engineered bone marrow stroma leads to prolonged in vivo systemic delivery of erythropoietin in nonmyeloablated, immunocompetent mice. *Gene Ther.* 2003;10(6):478-89.
2. Seidenfeld J, Piper M, Aronson N. Systematic review of controlled trials on erythropoietin to support evidence-based guidelines. *Oncology.* 2002;16(9 Suppl 10):171-88.
3. Leonard MP, Canning DA, Epstein JI, Gearhart JP, Jeffs RD. Local tissue reaction to the subureteral injection of glutaraldehyde cross-linked bovine collagen in humans. *J Urol.* 1990;143(6):1209-12.

ANNEXE II

Production et titrage de MoMLV *in vitro*

Introduction

La sécurité à long terme d'un traitement de thérapie génique doit être assurée avant de l'appliquer cliniquement. Par exemple, l'absence de particules virales capables de se répliquer doit généralement être prouvée. La formation de particules infectieuses pourrait provenir de deux sources: (1) les cellules encapsidatrices 293GPG suite à des événements de recombinaison et (2) des recombinaisons avec des séquences de rétrovirus endogènes du génome canin.

Dans la présente étude, nous avons confirmé l'absence de particules rétrovirales circulantes par la détection de la séquence *gag* du vecteur (voir article, Figure 8). Pour ce faire, l'utilisation d'un témoin positif est essentielle pour la mise au point et la validité de l'essai. Le rétrovirus MoMLV contient le gène *gag* et est facilement propagé en culture. Nous avons donc infecté des cellules NIH3T3 pour produire MoMLV. Le lot de particules a ensuite été titré selon un test *in vitro* développé dans les années 60 pour connaître la concentration de particules infectieuses. Ce test consiste en l'utilisation de cellules de tumeur de rat, une lignée appelée XC, qui forment des syncytia en présence de MoMLV d'après un mécanisme spécifique encore mal compris.

Les cellules XC proviennent d'un sarcome musculaire causé par le virus du sarcome de Rous (RSV). Bien qu'elles possèdent le génome du RSV, elles ne produisent pas de virus (1). L'adhérence de MoMuLV sur la cellule se fait par le contact entre l'enveloppe virale Env et le récepteur cellulaire "cationic amino acid transporter type 1" (CAT1) (2). Lors de la production de virus, la glycoprotéine Env de MoMuLV est synthétisée sous forme de précurseur et est ensuite clivée en sous-

unités de surface et trans-membranaire par une protéase cellulaire. La partie trans-membranaire possède en C-terminal une séquence de 16 acides aminés qui est retirée par une protéase virale lors de la maturation du virus. Il a été démontré que cette séquence, appelée peptide R, retarde la fusion cellulaire des cellules infectées. Des MoMuLV possédant Env avec le peptide R induisent la formation de syncytia chez les cellules XC. De plus, le récepteur CAT1 des cellules XC possède un patron de glycosylation différent du récepteur classique. Bien qu'il ait été démontré que la N-glycosylation est essentielle à la formation de syncytia chez les cellules XC, il semble que d'autres glycoprotéines régulatrices cellulaires seraient responsables de cette propriété intrinsèque (2). De plus, la formation de syncytia chez les cellules XC est indépendante du pH, contrairement à d'autres lignées cellulaires murines telle NIH3T3 (3).

Puisque le nombre de syncytia formés est généralement très élevé, il est préférable de compter les plaques générées par les zones denses de syncytia. L'estimation du titre considère qu'une plaque de syncytia correspond à une particule ayant infecté une cellule (voir la section Calculs).

Matériel et méthodes

Les cellules NIH3T3 sont des cellules embryonnaires murines efficacement infectées par MoLV et peuvent produire du virus sans changement de comportement en culture (phénotype, mortalité). Ces cellules prolifèrent naturellement et se cultivent très facilement avec du "Dulbecco's modified Eagle's medium" (DMEM) ajouté de 10 % de sérum fœtal de bovin (FBS) et avec les antibiotiques pénicilline à

50 U/ml et streptomycine à 50 µg/ml. Une infection efficace des NIH 3T3 par MoMLV se fait par l'ajout de Polybrene[®], un polymère chargé positivement favorisant le contact entre le virus et la membrane cellulaire qui possèdent tous deux un potentiel négatif. Les particules utilisées pour l'infection sont diluées à plusieurs concentrations, voici un tableau des dilutions effectuées :

Dilution	Volume Virus (µL)	Volume DMEM (µL)	Polybreen 6 mg/ml (µL)
1/100	80	7920	5.35 (pour 4 mL)
1/200	4000 de 1/100	3994.6	5.35 (pour 4 mL)
1/400	4000 de 1/200	3994.6	5.35 (pour 4 mL)
1/800	4000 de 1/400	3994.6	5.35 (pour 4 mL)
1/1600	4000 de 1/800	3994.6	5.35 (pour 4 mL)
1/3200	4000 de 1/1600	3994.6	5.35 (pour 4 mL)
1/6400	4000 de 1/3200	3989	10.7 (pour 8 mL)
Contrôle (-)	0	3994.6	5.35 (pour 4 mL)

1 mL de chaque dilution est utilisé pour l'infection dans les puits.

Après 24 h, le virus est retiré et les cellules sont expansionnées pour la sélection des cellules infectées. On récolte ensuite le surnageant des cellules NIH3T3 productrices de MoMLV qui est ensuite conservé à -80°C.

Le lot de MoMLV est ensuite titré selon la formation de syncytia par les cellules XC. Lorsque les NIH3T3 infectées atteignent confluence, elles sont irradiées aux rayons ultraviolets pour créer des dommages à l'ADN et ainsi arrêter leur prolifération. On ajoute ensuite les XC sur les cellules NIH3T3. Les cellules XC sont cultivées avec du αMEM ajouté de 10 % de FBS, des antibiotiques pénicilline à 50 U/ml et streptomycine à 50 µg/ml, de la L-glutamine à 2 mM et des acides aminés non-essentiels à 1 %. Dès le lendemain, les syncytia formés par les cellules XC sont observables par les amas de noyaux engendrés par les fusions de membranes

cytoplasmiques. À confluence, les cellules sont colorées au bleu de méthylène et les plaques de syncytia sont comptées pour déterminer le titre.

Calculs

Le nombre de syncytia est déterminé d'après les plaques formées par les régions denses en ceux-ci. Si une plaque correspond à une particule infectieuse :

$$\frac{(\text{Nombre de plaques} \times \text{facteur de dilution})}{\text{Volume de surnageant (mL)}} = \text{Nombre de MoMuLV/ mL}$$

Résultats, discussion et conclusion

La formation des syncytia de cellules XC formés par l'infection par MoMuLV a permis de déterminer le titre de particules produites *in vitro*. La figure 3 montre des syncytia observés au microscope (grossissement 200x) après coloration au bleu de méthylène. Les plaques formées se voient comme des espaces blancs après la coloration au bleu de méthylène (figure 4). Le nombre de plaques a été déterminé en triplicata pour les dilutions pertinentes et les valeurs sont données dans le tableau I. Le titre moyen ainsi obtenu est de $1,2 \times 10^5$ MoMuLV infectieux/mL selon l'équation de la section Calculs. Cette valeur est acceptable et ne représente que les particules infectieuses. Il peut y avoir jusqu'à 100 fois plus de particules non-infectieuses que de particules infectieuses (4). C'est donc bien suffisant pour la détection du gène *gag* par RT-PCR. Le titre permettra également de déterminer la sensibilité du test d'après le nombre de particules infectieuses présentes.

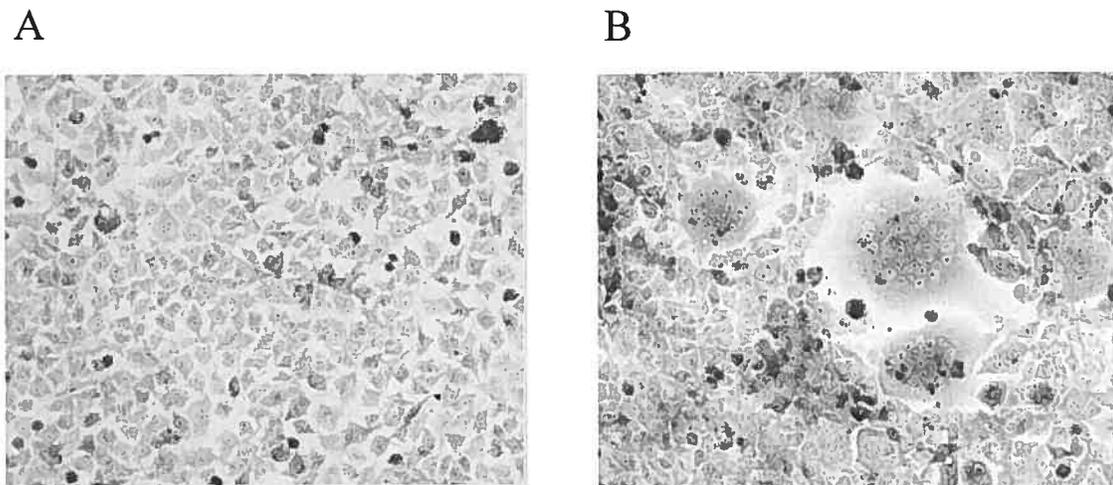


Figure 3: Formation de syncytium par les cellules XC. (A) Cellules XC en absence de MoMuLV. (B) Syncytia formés par les cellules XC en présence de MoMuLV. Grossissement 200x.

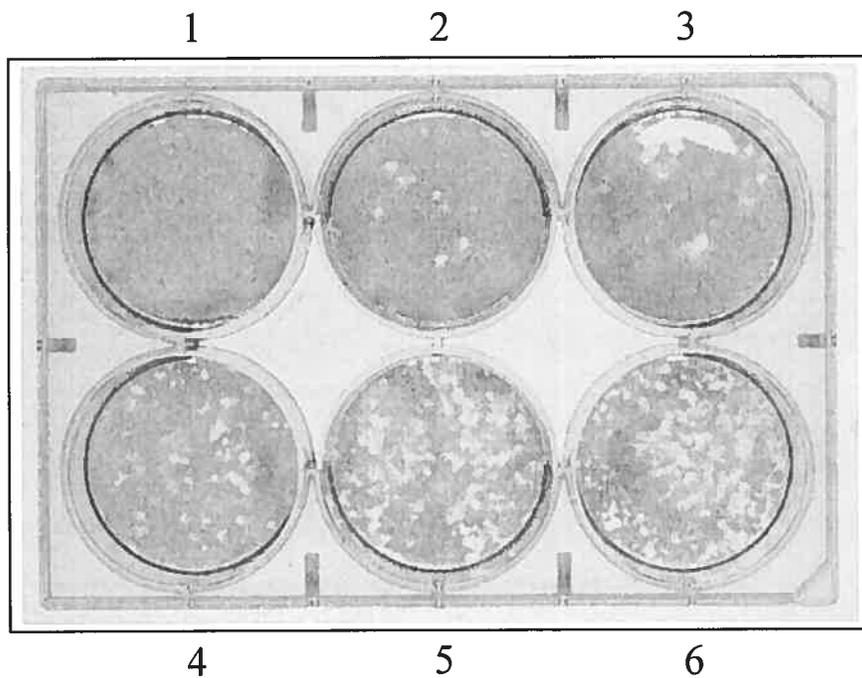


Figure 4: Formation de plaques de syncytia par les cellules XC. Plaques de observées après coloration au bleu de méthylène à différentes dilutions de MoMuLV. Puit 1: cellules XC en absence de MoMuLV; Puits 2-6: dilutions de MoMuLV 1/6400; 1/3200; 1/1600; 1/800; 1/400 respectivement.

Tableau I : Comptes des plaques de syncytia formés par les cellules XC.

Nombre de plaques	Dilution	Titre obtenu (particules/mL)
74*	1600	118400
53*	1600	84800
37*	3200	118400
30*	3200	96000
21*	6400	134400
24*	6400	153600
MOYENNE		117600

*Valeurs en triplicata

Références

1. Klement V, Rowe WP, Hartley JW, Pugh WE. Mixed culture cytopathogenicity: a new test for growth of murine leukemia viruses in tissue culture. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1969;63(3):753-8.
2. Kubo Y, Ishimoto A, Amanuma H. N-Linked glycosylation is required for XC cell-specific syncytium formation by the R peptide-containing envelope protein of ecotropic murine leukemia viruses. *J Virol*. 2003;77(13):7510-6.
3. Jones JS, Risser R. Cell fusion induced by the murine leukemia virus envelope glycoprotein. *J Virol*. 1993;67(1):67-74.
4. Coffin JH, Hughes SH, Varmus HE, *Retroviruses*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, New York 1997, page 28.

ACCORD ET PERMISSION DES COAUTEURS D'UN ARTICLE

IDENTIFICATION DE L'ETUDIANT

Nom de l'étudiant François Fontaine		Code permanent [REDACTED]
Sigle du programme M.Sc.	Titre du programme Sciences vétérinaires	Option Pathologie

DESCRIPTION DE L'ARTICLE

Auteurs François Fontaine, Arnaud Duval, Juan Hernandez, Nicoletta Eliopoulos, James N. MacLeod, Marilyn Dunn, Jacques Galipeau, Daniel Martineau	
Titre Autologous canine bone marrow stromal cells engineered with the canine EPO gene and implanted <i>in vivo</i> produce and release systemically functional EPO over a prolonged period.	
Revue HUMAN GENE THERAPY	Date de publication

DECLARATION DES COAUTEURS

Déclaration À titre de coauteur de l'article identifié ci-dessus, j'autorise le microfilmage du mémoire et je suis d'accord que François Fontaine inclut cet article dans son mémoire de maîtrise qui a pour titre Délivrance systémique d'érythropoïétine canine fonctionnelle par une glande synthétique endocrine composée de cellules stromales de la moelle osseuse autologues chez des chiens immunocompétents.		
Coauteur Daniel Martineau	[REDACTED]	Date 6/01/05
Coauteur Jacques Galipeau	[REDACTED]	Date Nov 23, 2004
Coauteur Marilyn Dunn	[REDACTED]	Date 13/12/2004
Coauteur Juan Hernandez	[REDACTED]	Date 05/01/2005
Coauteur Nicoletta Eliopoulos	[REDACTED]	Date 23/11/2004
Coauteur Arnaud Duval	[REDACTED]	Date 27 dec 2004
Coauteur	[REDACTED]	Date
Coauteur	Signature	Date

Envoyé à la FÉS le

AGREEMENT AND PERMISSION OF PAPER CO-AUTHORS

STUDENT IDENTIFICATION

Student's name François Fontaine		Student's identification [REDACTED]
Degree M.Sc.	Title of the program Sciences vétérinaires	Option Pathologie

ARTICLE'S DESCRIPTION

Authors François Fontaine, Arnaud Duval, Juan Hernandez, Nicoletta Eliopoulos, James N. MacLeod, Marylin Dunn, Jacques Galipeau, Daniel Martineau	
Title Autologous canine bone marrow stromal cells engineered with the canine EPO gene and implanted <i>in vivo</i> produce and release systemically functional EPO over a prolonged period.	
Journal HUMAN GENE THERAPY	Date of publication 2005

COAUTHOR'S DECLARATION

Déclaration I hereby authorize the National Library of Canada to make a microfilm copy of the manuscript entitled "Délivrance systémique d'érythropoïétine canine fonctionnelle par une glande synthétique endocrine composée de cellules stromales de la moelle osseuse autologues chez des chiens immunocompétents" which describes the research conducted by François Fontaine and submitted to the Université de Montréal in partial completion of the Master of Science degree, and which I have co-authored.		
Coauthor James N. MacLeod	Sign: [REDACTED]	Date 11/29/04

Sent to FES on