

**Direction des bibliothèques**

**AVIS**

Ce document a été numérisé par la Division de la gestion des documents et des archives de l'Université de Montréal.

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**

This document was digitized by the Records Management & Archives Division of Université de Montréal.

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

**AUTOGREFFE DE CELLULES STROMALES DE MOELLE  
OSSEUSE DE CHIEN TRANSDUITES POUR LE GENE  
DE L'ERYTHROPOÏÉTINE CANINE**

par

**Juan Luis Hernandez Rodriguez**

**Département des sciences cliniques  
Faculté de médecine vétérinaire**

**Mémoire présenté à la Faculté de médecine vétérinaire  
en vue de l'obtention du grade de  
maître ès sciences (M.Sc.)  
en sciences vétérinaires  
option sciences cliniques**

**Juin 2009**

**©Juan Luis Hernandez Rodriguez, 2009**

Université de Montréal

Faculté des études supérieures et postdoctorales

Ce mémoire intitulé

**AUTOGREFFE DE CELLULES STROMALES DE MOELLE  
OSSEUSE DE CHIEN TRANSDUITES POUR LE GÈNE DE  
L'ÉRYTHROPOÏÉTINE CANINE**

présenté par

**JUAN LUIS HERNANDEZ RODRIGUEZ**

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Marie-Ève Nadeau, présidente-rapporteuse

Marilyn Dunn, directrice de recherche

Daniel Martineau, codirecteur

Christian Bédard, membre du jury



## RESUME

L'érythropoïétine (EPO) est largement utilisée dans les stratégies de thérapie génique. C'est en particulier le cas des approches consistant à libérer une protéine thérapeutique à partir de cellules autologues génétiquement manipulées. Les cellules stromales de moelle osseuse (MSCs) peuvent être manipulées pour produire des quantités importantes de protéine comme l'EPO. Il a été démontré que des MSCs murines génétiquement modifiées grâce à un rétrovecteur et réimplantées sous la peau peuvent libérer de l'EPO en quantité pharmacologiquement active pendant une période prolongée. Avant d'envisager son application à la médecine humaine, la preuve de la validité du concept de thérapie génique *ex vivo* doit être apporté chez un mammifère de grande taille. L'objectif de cette étude est de réaliser l'autogreffe de MSCs génétiquement modifiées pour produire de l'EPO chez le chien sain. L'efficacité de la transduction par le rétrovecteur était de 73 à 92% telle qu'analysée par Fluorescence-Activated Cell Sorting (FACS), et la production d'EPO *in vitro* telle que mesurée par ELISA de 1,5 à 9,3 U d'EPO/10<sup>6</sup> cellules/24heures. Les MSCs canine transduites étaient mélangées à une matrice de collagène bovin et l'implant était inséré sous la peau des donneurs respectifs. Le nombre et le volume des implants ont été optimisés à 32 implants contenant 4x10<sup>6</sup> MSCs/implant chez les 4 chiens. Une augmentation de 28% en moyenne de l'hématocrite a été observée dans les 12 jours suivant l'implantation et s'est maintenu pendant 5 semaines par rapport au groupe témoin. Cette approche thérapeutique pourrait être utilisée chez nos animaux de compagnie atteints d'anémie secondaire à une insuffisance rénale chronique, une infection virale ou certains cancers. De plus, ces résultats permettent de valider le concept de thérapie génique *ex vivo* et constitue une étape crucial de l'application en médecine humaine.

MOTS CLES : anémie, cellules stromales de moelle osseuse, érythropoïétine, thérapie génique, chien

## 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 *in vivo*. Bone marrow stromal cells (BMSC) can be engineered to produce considerable amounts of therapeutic proteins such as EPO. It has been 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 transduction efficiency by retrovectors was 73 to 92% as analysed by Fluorescence-Activated Cell Sorting (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/24hrs. The canine EPO-engineered BMSCs were embedded in bovine collagen, and the resulting organoid was implanted subcutaneously in the respective donor dogs. The number of embedded BMSCs and volume of implants were optimized : 32 implants containing  $4 \times 10^6$  BMSCs each were implanted in each 4 dogs. Mean hematocrit of treated dogs rose 28% within 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 kidney diseases, 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, erythropoietin, gene therapy, dog

## TABLE DES MATIERES

Liste des figures.....	i
Liste des sigles et abbreviations.....	ii
Dédicace.....	iii
Remerciements.....	iv
1 Introduction .....	3
2 Revue de littérature.....	5
2.1 Le thérapie génique : la révolution du XXème siècle.....	6
2.2 Le principe de la thérapie génique .....	6
2.3 Les cellules mésenchymateuses stromales de moelle osseuse .....	9
2.3.1 Présentation des cellules mésenchymateuses stromales de moelle osseuse (MCS) 9	
2.3.2 Les MSC : des cellules pluripotentes .....	10
2.3.3 Les MSC : une plateforme de synthèse protéique.....	11
2.4 Les vecteurs.....	13
2.4.1 Vecteurs viraux.....	13
2.4.2 Vecteurs non viraux.....	17
2.5 L'érythropoïétine : une protéine d'intérêt.....	18
2.5.1 Anémie et insuffisance rénale .....	18
2.5.2 Traitement actuel de l'anémie associée à l'insuffisance rénale.....	18
2.5.3 Les inconvénients du traitement actuel de l'anémie associée à l'insuffisance rénale .....	19
2.5.4 L'érythropoïétine : des effets biologiques faciles à objectiver.....	20
2.5.5 Entre la souris et l'homme...le chien.....	20
3 Méthodologie .....	22
3.1 Animaux.....	23
3.2 Isolement des MSCs .....	23
3.3 Production du rétrovecteur.....	24

3.4	Transduction des MSCs.....	24
3.5	Mesure de la sécrétion d'EPO canine.....	24
3.6	Implantation des MSCs transduites.....	25
3.7	Suivi clinique et biologique .....	26
3.8	Examen histologique des implants.....	27
3.9	Statistiques .....	27
4	Présentation et analyse des résultats.....	28
4.1	Efficacité de la transduction.....	29
4.2	Expression de l'EPO canine <i>in vitro</i> .....	29
4.3	Expression de l'EPO canine <i>in vivo</i> .....	29
4.4	Oestrus .....	31
4.5	Réaction locale des sites d'implantation et analyse histologique des implants .	31
4.6	Innocuité .....	33
5	Discussion générale .....	34
6	Conclusion.....	38
7	Bibliographie .....	40
8	Curriculum vitae.....	44

## LISTE DES FIGURES

<u>Figure n°1</u> : Niveau de facteur VIII canin après injection sous-cutanée à des souris hémophiles A immunocompétentes .....	8
<u>Figure n°2</u> : MSC simiennes transduites pour le gène codant pour l'EPO humaine injectées en intra-musculaire chez des souris NOD/SCID induisent une augmentation de l'érythropoïétinémie et de l'hématocrite. ....	11
<u>Figure n°3</u> : Hématocrite des souris implantées en sous-cutané avec des MSC transduites pour le gène de l'EPO avec ou sans matrice de collagène.....	12
<u>Figure n°4</u> : Dispositif TheraCyte® utilisé pour le confinement des cellules génétiquement modifiées .....	13
<u>Figure n°5</u> : Cycle de l'infection d'une cellule par un rétrovirus.....	15
<u>Figure n°6</u> : Injection sous-cutanée du collagène contenant les MSCs transduites pour le gène de l'EPO canine. ....	26
<u>Figure n°7</u> : Représentation graphique de la fluorescence des MSCs permettant de quantifier le pourcentage de cellules exprimant la GFP. ....	29
<u>Figure n°8</u> : Variation de l'hématocrite moyen des 4 chiens ayant subi l'autogreffe de MSCs transduites pour le gène de l'EPO canine. ....	30
<u>Figure n°9</u> : Variation du taux d'érythropoïétine moyen chez les 4 chiens ayant subi l'autogreffe de MSCs transduites pour le gène de l'EPO canine. ....	31
<u>Figure n°10</u> : Flanc d'un chien montrant le bombement cutané visible et palpable correspondant aux implants sous-cutanés de collagène contenant les MSCs transduites.....	32
<u>Figure n°11</u> : aspect macroscopique et examen histologique d'un implant .....	32



## LISTE DES SIGLES ET ABREVIATIONS

AAV : adénovecteur associé  
ADN : acide désoxyribonucléique  
ARN : acide ribonucléique  
EGFP : “enhanced green flurescente protein”  
ELISA : “enzyme-linked immunosorbent assay”  
EPO : érythropoïétine  
FACS : « Fluorescent activated cell sorter »  
Hct : hématocrite  
HPS : hématoxyline-phloxine-safran  
HSV : « herpes simplex virus »  
IRES : « internal ribosomal entry site »  
IU : « international units »  
IV : intraveineux  
MoMuLV : « moloney murine leukemia virus »  
NESP : « novel erythropoiesis-stimulatin protein »  
NOD-SCID : « non obsese diabetic-SCID”  
PCR : “polymerase chain reaction”  
SC : “sous-cutané”  
SCID : « severe-combined immunodeficiency »  
VSG-G : protéine G du virus de la stomatite vésiculeuse

**DEDICACE**

*A mon Hélène,*  
qui a accepté de quitter sa terre natale pour me permettre de réaliser mon rêve. Tu es le  
soleil de mes jours...

*A mon petit Antoine,*  
qui existait déjà dans nos pensées lors de notre épopée canadienne

*A ma mère,*  
*A qui je dois tout*

## REMERCIEMENTS

**Dre Marie-Eve Nadeau** pour avoir accepté la présidence de ce jury de Maîtrise et avoir contribué à l'enrichissement de ma vision de la cancérologie vétérinaire par nos conversations téléphoniques et nos rencontres à la FMV.

**Dre Marilyn Dunn** pour avoir codirigé ce travail de maîtrise. Merci de m'avoir permis de vivre cette merveilleuse aventure canadienne et de m'avoir tant apporté. Outre l'apport purement scientifique ô combien incommensurable, Marilyn restera une icône de sincérité, d'empathie, de douceur et de tolérance. Autant de qualités que je n'oublierai jamais.

**Dr Daniel Martineau** pour avoir codirigé ce travail de maîtrise et pour avoir fait preuve de tant de patience et de pédagogie dans mon initiation à la génétique moléculaire.

**Dr Christian Bédard** pour avoir accepté de participer à ce jury de Maîtrise. Merci d'avoir participé à ma découverte de la cytologie et d'avoir favorisé toutes ces interactions quotidiennes qui m'ont tant enrichi.

**François Fontaine** qui a réalisé toute les manipulations de laboratoire avec grande compétence. Merci François d'avoir accepté de m'expliquer certaines notions approximativement 150 fois et toujours avec autant de patience et de gentillesse.

**Martine Lamarre et Kim Selby** qui ont beaucoup participé au bien-être des animaux de l'étude. Merci beaucoup pour votre professionnalisme, votre respect et votre dynamisme. Merci également d'avoir accepté de partager un peu de vos vies avec moi. Vous êtes merveilleuses.

*Cette page est pour moi l'occasion de remercier toutes les personnes qui de près ou de loin ont participé à mon enrichissement tant sur le plan strictement scientifique que humain.*

**Dre Manon Lécuyer** pour avoir su allier la fermeté et le déterminisme à la sensibilité et la compassion. Subtil mélange de qualités qui font que Manon est une des personnes qui m'ont le plus marqué. Merci pour tout.

**Dr Marie-Claude Bélanger** pour m'avoir fait découvrir la cardiologie sous un nouvel angle. Merci d'avoir été à l'origine de mes premiers émois de cathétérisme interventionnel.

**Dr Rocky DiFruscia** pour m'avoir apporté ce recul sur la médecine vétérinaire et pour avoir apporté cette touche d'humour, parfois scatologique, si plaisante au quotidien.

**Dr Mathieu Ouellet** qui restera mon co-résident à jamais. Nous avons partagé tant d'émotions, joyeuses ou moins joyeuses. Merci pour ta loyauté tout au long de ces 3 années.

**Dr Alice Defarges** sans qui cette aventure canadienne n'aurait certainement pas eu lieu. Nous avons partagé beaucoup d'émotions ensemble. Merci d'être toujours aussi présente, sensible et humaine.

## **1 Introduction**

L'anémie est une conséquence fréquente de l'insuffisance rénale chronique ou des traitements de chimiothérapie anti-cancéreuse. Cette anémie est actuellement traitée grâce à l'utilisation d'érythropoïétine recombinante humaine (hrEPO) ou d'autres agents stimulants l'érythropoïèse (ASE). En pratique, les patients humains sous dialyse reçoivent une injection sous-cutanée d'hrEPO ou d'ASE toutes les 48 à 72 heures. Ce traitement permet une amélioration de la qualité de vie des patients insuffisants rénaux en redonnant dynamisme et tonus musculaire associés à la normalisation de l'hématocrite.

Toutefois, ce traitement n'est pas dénué d'inconvénients. Son coût de production et de purification est très élevé (près de 28 millions CA\$ au Québec en 2002-source [www.ramq.gouv.qc.ca](http://www.ramq.gouv.qc.ca) consulté en juin 2005). De plus, les patients dialysés sont continuellement traités avec des anti-coagulants et développent donc fréquemment des hématomes sur les sites d'injection sous-cutanée.

La thérapie génique est une stratégie thérapeutique qui consiste à faire pénétrer des gènes dans les cellules ou les tissus d'un individu pour traiter une maladie. Dans notre approche, la thérapie génique vise à surexprimer une protéine, l'érythropoïétine en l'occurrence, dont l'activité a un impact thérapeutique. La thérapie génique soulève un certain nombre de craintes qui concernent principalement la persistance d'un potentiel pathogène du vecteur et le risque de cancérisation au sein de l'organisme traité.

La thérapie cellulaire quant à elle, vise à soigner un organisme par l'apport de cellules modifiées. Ces dernières peuvent d'ailleurs appartenir au même organisme. La manipulation subie par les cellules a pour objectif de les orienter vers une fonction particulière. Là encore, les craintes concernent l'absence de contrôle possible sur les cellules introduites.

Notre approche a consisté à combiner thérapie génique et thérapie cellulaire (dixit thérapie génique *ex vivo*) pour offrir un moyen sûr et, souhaitons-le, efficace de traitement de l'anémie classiquement gérée par l'administration d'érythropoïétine recombinante humaine ou d'ASE.

## **2 Revue de littérature**

## **2.1 Le thérapie génique : la révolution du XXème siècle**

Le concept thérapeutique de thérapie génique a vu le jour à la fin des années 1980 et a été à son paroxysme médiatique lors de la publication du succès thérapeutique du protocole de Fischer sur le traitement des enfants-bulles atteints d'immunodéficience sévère. En 1998-99, de très jeunes enfants atteints du SCID-X (Severe Combined Immunodeficiency) ont reçu un traitement visant à rendre actif leurs lymphocytes T déficients. Plus précisément, la thérapie consistait à insérer un gène restaurant la fonctionnalité d'un récepteur de l'interleukine 2.[1] Dans un premier temps, l'entreprise s'est révélée être une réussite totale avec la guérison des patients: la plupart des bébés ont pu sortir de leurs bulles et vivre normalement. Cependant, quatre de ces miraculés sur la vingtaine d'enfants traités par ce type de thérapie ont développé une leucémie après quelques années. De nombreuses données convergent pour penser que le type de vecteur utilisé s'était intégré dans un proto-oncogène. Il s'agit donc bien d'un effet secondaire direct imputable à la stratégie elle-même. [1-4]

Cet essai clinique "phare" de la thérapie génique a eu plusieurs répercussions. Il a tout d'abord montré que le concept de thérapie génique était valable et qu'une stratégie de manipulation du génome pouvait avoir un impact thérapeutique. Mais il a mis aussi en évidence la nécessité d'améliorer les stratégies :

- Utilisation de nouveaux vecteurs limitant les insertions génotoxiques
- Réduction de la quantité de cellules exposées au vecteur puis réinjectées au patient, afin de limiter le risque de toucher un autre gène.
- Nécessité de pouvoir retirer les cellules transduites en cas d'effet indésirable.

## **2.2 Le principe de la thérapie génique**

Le principe général de la thérapie génique consiste à insérer un ou plusieurs gènes au sein des cellules de l'organisme afin de corriger un défaut (l'exemple des enfants « bulles ») ou de provoquer la synthèse d'une protéine défectueuse ou déficiente (l'exemple de l'érythropoïétine).

Chez le chien, plusieurs maladies ont déjà été traitées par cette approche :



- Les maladies monogéniques sont celles qui ont été le plus précocement étudiées à cause de la simplicité de leur modèle. C'est le cas des déficits génétiques en une protéine fonctionnelle fondamentale comme les facteur VIII et IX de la coagulation ou la protéine pigmentaire de la rétine RPE65 (Retinal Pigment Epithelium 65). Ces déficits ont fait l'objet de traitement génique efficace. L'exemple le plus parlant est le retour à la vision chez les jeunes Briards déficients en RPE65 après une injection sous rétinienne d'un vecteur (Adénovirus associé-AAV) porteur du gène défaillant [5].
- Les maladies polygéniques font l'objet de beaucoup d'intérêt. C'est le cas des traitements anti-cancéreux. Chez le chien, plusieurs publications font état de l'efficacité du traitement génique du mélanome malin par rapport aux thérapies conventionnelles. Dans la dernière étude en date, la stratégie a consisté à insérer dans le génome des cellules tumorales un gène « suicide ». Il s'agit du gène codant pour la thymidine kinase du virus de l'herpes simplex. L'administration de ganciclovir induit alors une mort par apoptose des cellules tumorales. De manière concomitante, des cellules sécrétant des cytokines anti-tumorales (granulocyte-macrophage colony stimulating factor et Interleukine-2) ont été introduites dans la tumeur afin d'amplifier l'immunité anti-tumorale. Cette double approche thérapeutique (gène « suicide » et activation de l'immunité anti-tumorale) a permis une médiane de survie de 160 j [57-509] contre 82 j [43-216] dans le groupe traité par exérèse chirurgicale seule [6].

Le succès de cette stratégie a fait largement ses preuves mais a également soulevé certaines craintes mentionnées dans le paragraphe précédent. Les effets secondaires décrits sont rattachés aux réactions immunitaires, à la toxicité du vecteur, à la transmission de la manipulation génétique par les cellules germinales et au risque de carcinogenèse [4, 7, 8]. Pour limiter le nombre de cellules génétiquement modifiées et contrôler les effets de la manipulation, de nombreux essais cliniques de thérapie génique ont utilisé une stratégie de protocole dite *ex vivo*. Le principe consiste à prélever des cellules cibles de l'individu et à les soumettre aux vecteurs de transfert du gène thérapeutique en dehors de l'organisme. Les cellules sont ensuite réinjectées au patient. Cela permet d'évaluer l'ampleur de la modification génétique tant au niveau du

pourcentage de cellules modifiées génétiquement qu'au niveau de l'expression des protéines thérapeutiques. C'est ainsi que Hideto Matsui et al. [9] ont montré que des cellules endothéliales murines (CEM) génétiquement modifiées *ex vivo* sont capables de traiter des souris atteintes d'hémophilie A. Dans cette étude, les auteurs ont prélevé les CEM, les ont transduites pour le gène codant pour le facteur VIII canin et les ont réintroduites sous la forme d'une injection sous-cutanée. Les cellules injectées ont montré leur capacité à synthétiser le facteur VIII à des niveaux thérapeutiques pendant une période de temps prolongée. Les résultats sont illustrés dans la figure n°1.

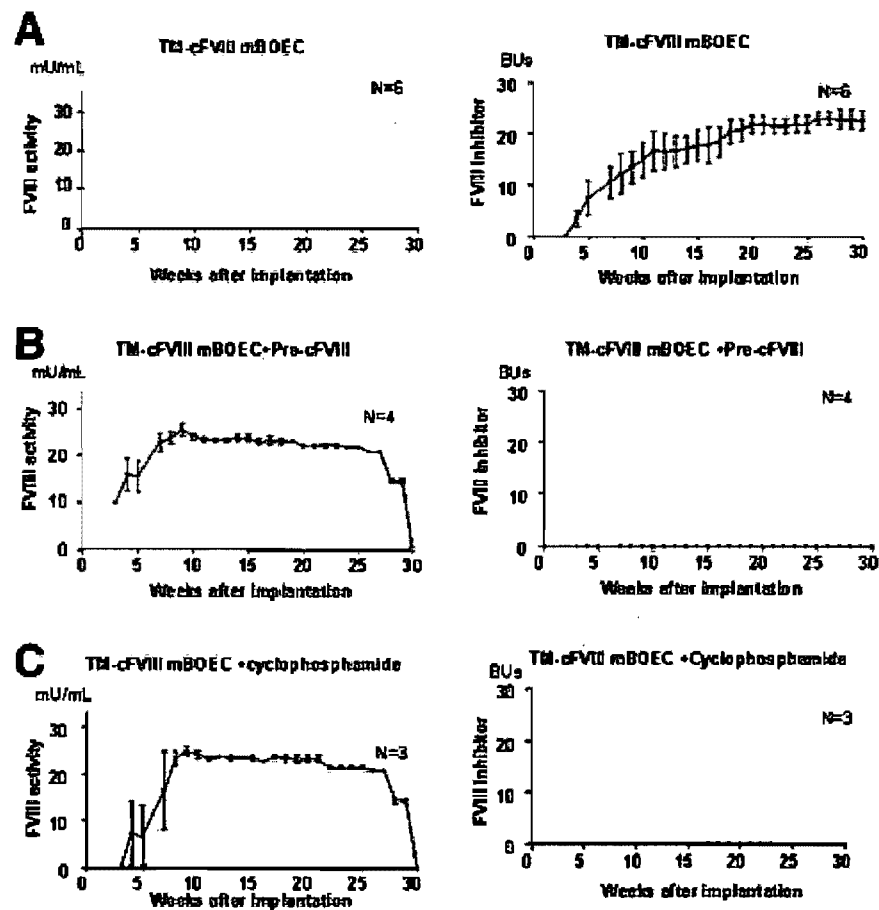


Figure n°1 : Niveau de facteur VIII canin après injection sous-cutanée à des souris hémophiles A immunocompétente. (A): Souris hémophiles A injectées avec les CEM transduites avec le gène du facteur VIII canin. (B): Souris hémophiles A injectées avec les CEM transduites avec le gène du facteur VIII canin après injection de facteur VIII canin. (C): Souris hémophiles A injectées avec les CEM transduites avec le gène du facteur VIII canin ayant reçu un traitement immunodépresseur à base de cyclophosphamide. [9]

Cette stratégie de transfert de gène *ex vivo* ouvre une voie thérapeutique efficace et plus sûre qui a retenu notre attention. Les chapitres suivants présentent les principaux acteurs de cette thérapie génique *ex vivo* : les cellules mésenchymateuses stromales de moelle osseuse, les vecteurs de transfert de gène et le choix d'un modèle expérimental.

## **2.3 Les cellules mésenchymateuses stromales de moelle osseuse**

### **2.3.1 Présentation des cellules mésenchymateuses stromales de moelle osseuse (MCS)**

Au sein de la moelle osseuse, les cellules stromales sont des cellules non hématopoïétiques dont le rôle principal est d'assurer le microenvironnement propice à la vie des cellules hématopoïétiques. Parmi cette population de cellules stromales, on trouve une sous-population de cellules souches adultes possédant un fort potentiel de différenciation : ce sont les cellules souches mésenchymateuses stromales de moelle osseuse (bone Marrow Stromal Cells -MSC). Relativement accessibles chez l'homme et les carnivores domestiques, elles sont isolées par ponction de moelle osseuse puis sélectionnées *ex vivo* grâce à leur capacité d'adhérence aux plastiques de culture. Les cellules souches mésenchymateuses sont caractérisées par l'expression d'un ensemble de marqueurs cellulaires dont CD105 (TGFβ receptor/endoglin), CD73 (ecto-5'-nucleotidase), CD90 (thy1) et CD44 (hyaluronate receptor), et par l'absence d'expression des marqueurs spécifiques des cellules hématopoïétiques CD34, CD146 et CD45 et des cellules endothéliales CD31 (PECAM1). Le phénotype immunitaire des MSC est décrit comme étant MHC I<sup>+</sup>, MHC II<sup>-</sup>, CD40<sup>-</sup>, CD80<sup>-</sup> et CD86<sup>-</sup>. Par conséquent les MSC sont considérées comme étant non immunogènes et l'allogreffe ne nécessiterait pas d'immunodépression. [10] Certaines de ces caractéristiques immunophénotypiques ont été montrées dans le travail de maîtrise de F. Fontaine.[11]

### 2.3.2 Les MSC : des cellules pluripotentes

L'une des capacités fondamentales des cellules souches mésenchymateuses est leur potentiel de différenciation. L'équipe de Pittenger a démontré en 1999 que les MSC issues de la moelle osseuse contribuent à la régénération des tissus mésenchymateux et ont la capacité de se différencier en adipocytes, ostéoblastes et chondrocytes, [12]. D'autres équipes ont par la suite montré les capacités de différenciation en cellules musculaires (lisses, myocardiques ou squelettiques), hépatiques, intestinales, voire même nerveuses[13]. Leur accessibilité ainsi que leurs propriétés de différenciation et d'expansion *ex vivo* font des MSC des cellules d'intérêt majeur en thérapie cellulaire et en médecine régénérative.

L'autre caractéristique majeure des MSC concerne leur capacité à synthétiser et à sécréter une protéine hétérologue. Pour montrer cette propriété, de nombreux transgènes ont été insérés dans les MSC *in vitro*. Les plus étudiées sont le gène codant pour la  $\beta$ -galactosidase, la Green Fluorescent Protéine (GFP) et la Red Fluorescent Protein (DsRed) [14]. Ces protéines sont actuellement couramment utilisées comme des marqueurs d'efficacité de la transduction et d'expression du transgène. En effet, l'expression des gènes codant pour la  $\beta$ -galactosidase, la GFP ou la DsRed est facile à observer en microscopie optique ou par cytométrie de flux puisque les protéines sont à l'origine d'une coloration spécifique des cellules qui l'expriment [15]. Egalement, plusieurs équipes de recherche ont démontré, dans des études pré-cliniques, que les MSC peuvent être modifiées génétiquement pour exprimer un transgène biologiquement actif et transplantées afin d'induire un effet thérapeutique prolongé. Par exemple, Bartholomew et al. [16] ont rapporté avoir détecté de l'érythropoïétine humaine ainsi qu'une augmentation de l'hématocrite chez des babouins chez lesquels avaient été injectées des MSC génétiquement modifiées pour exprimer ce transgène. Les graphiques suivants illustrent les résultats de Bartholomew.

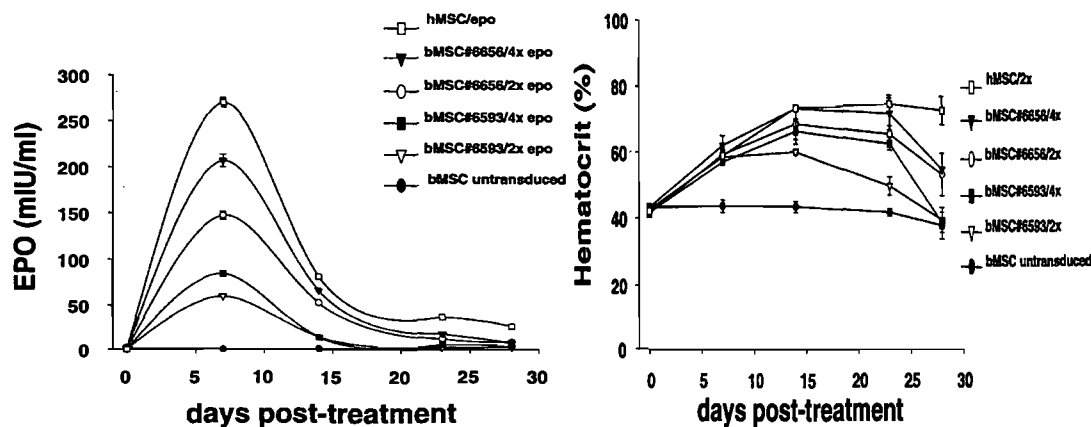


Figure n°2: MSC simiennes transduites pour le gène codant pour l'EPO humaines injectées en intra-musculaire chez des souris NOD/SCID induisent une augmentation de l'érythropoïétinémie et de l'hématocrite [16]. Légendes : hMSC : cellules stromales mésenchymateuses de moelle osseuse humaine ; bMSC : cellules stromales mésenchymateuses de moelle osseuse de babouin ; 4x/2x : nombre de cycles de transduction.

Les MSC, avec leur capacités pluripotentes, peuvent être modifiées génétiquement *ex vivo* pour sécréter des protéines aux propriétés thérapeutiques et retournées à l'organisme pour le faire bénéficier de cette synthèse. Ces observations ouvrent la voie du traitement génique *ex vivo* de l'anémie EPO-déficitaire.

### 2.3.3 Les MSC : une plateforme de synthèse protéique

Pour répondre à la problématique de départ sur la nécessité de pouvoir contrôler les MSC une fois réintroduites dans l'organisme, l'idée de Eliopoulos et al. [17] a été de confiner les cellules au sein d'une matrice de collagène. Ainsi, le confinement des MSC dans un implant de collagène présente l'énorme avantage de permettre un retrait chirurgical, annulant alors l'effet de la protéine lorsqu'elle n'est plus nécessaire. Eliopoulos et al. [17] ont réalisé l'injection de MSC génétiquement modifiées immobilisées dans une matrice de collagène bovin Contigen<sup>TM</sup> (dont l'utilisation clinique était approuvée par la Food and Drug Administration) et ont observé une survie des cellules et l'expression stable du transgène pendant une période prolongée.

De plus, dans cette étude [17], les souris recevant les MSC dans la matrice de collagène expriment le transgène de manière plus durable que celles qui reçoivent les MSC sans matrice tel que l'illustrent les graphiques suivants.

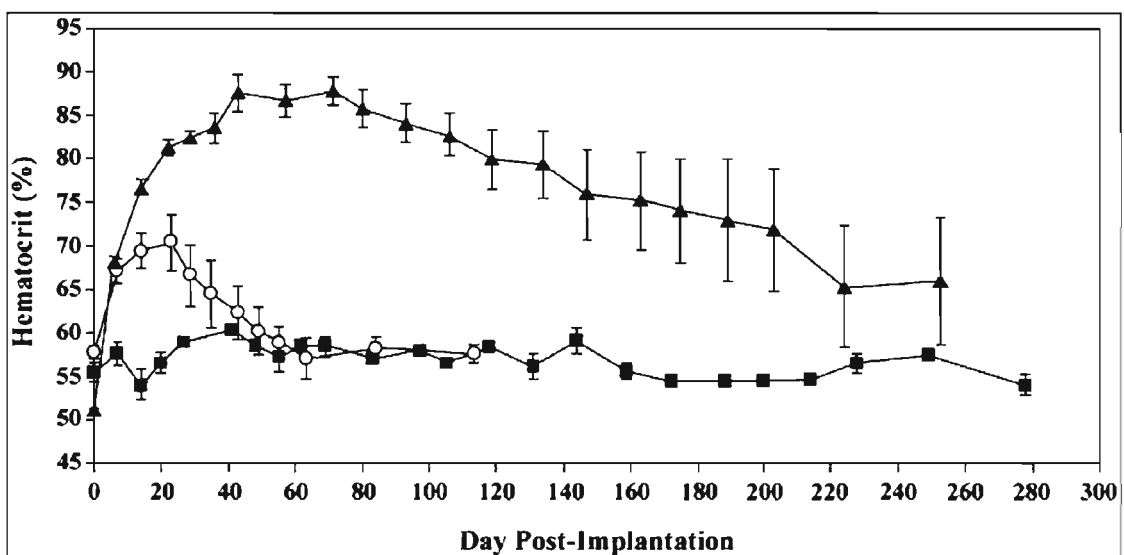


Figure n°3 : Hématocrite des souris implantées en sous-cutané avec des MSC transduites pour le gène de l'EPO avec (triangle plein) ou sans (rond vide) matrice de collagène. Témoin injecté avec matrice seule sans MSC (carré plein). [17]

Dans le même esprit de confinement des cellules génétiquement modifiées pour pouvoir les contrôler, Yanay et al. [18] ont montré l'efficacité de l'injection de cellules transduites pour le gène de l'EPO du rat lorsqu'elles sont encapsulées dans un système de tube synthétique (TheraCyte®) et réinjectées par voie sous-cutanée ou intra-péritonéale. En dehors de la possibilité de retirer et de remplacer le dispositif, ce système présente l'avantage de constituer une barrière contre la réponse immunitaire de l'hôte.

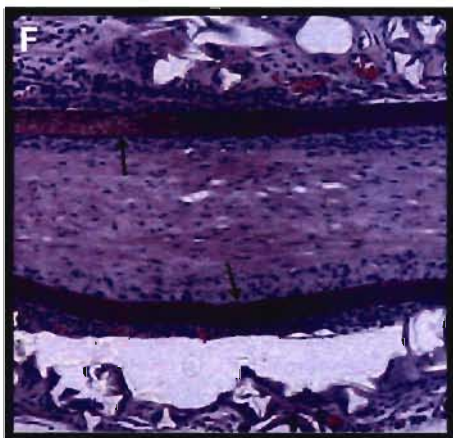


Figure n°4 : Dispositif TheraCyte® (flèches) utilisé pour le confinement des cellules génétiquement modifiées par Yanay et al. [18]

## 2.4 Les vecteurs

L'approche de thérapie génique *ex vivo* avec les MSC constitue une approche thérapeutique séduisante pour de nombreuses maladies. Pour rendre possible cette stratégie, l'étape cruciale est de sélectionner le vecteur qui permet le transfert du gène d'intérêt dans les cellules cibles. On distingue les vecteurs viraux des vecteurs non viraux.

### 2.4.1 Vecteurs viraux

L'utilisation de virus modifiés pour transporter un gène thérapeutique repose sur le constat d'efficacité des virus pour transférer leur propre matériel génétique dans les cellules humaines. Pour produire des vecteurs viraux, on utilise des virus modifiés génétiquement, délétés pour les séquences répliquatives. Le principe consiste à éliminer les séquences du virus qui codent des protéines associées à la réplication et à un éventuel comportement pathogène du virus, et à ne conserver que celles qui sont utilisées pour construire la particule virale et assurer le cycle d'infection. Le génome du virus est reconstruit pour porter les séquences du gène thérapeutique. Les protéines virales qui potentiellement manqueraient à la formation des particules virales thérapeutiques sont fournies par des cellules dites productrices ou d'encapsidation lors de la phase de production des vecteurs.

#### 2.4.1.1 Vecteurs adénoviraux

L'adénovirus est un virus à ADN. Il présente la caractéristique de faire pénétrer son matériel génétique dans la cellule cible sans attendre la mitose et sans insérer la nouvelle information génétique dans le génome de la cellule cible. Il est particulièrement apprécié pour sa capacité à infecter les cellules, qu'elles soient en division ou pas et pour l'efficacité de son transfert de gène. Bien que très utilisé dans de nombreux essais cliniques, l'adénovirus conserve ses séquences répliquatives qui le rendent potentiellement pathogène. De plus, l'adénovirus est immunogène et risque par conséquent d'induire une réponse immunitaire chez le receveur qui, dans le meilleur des cas, limitera l'expression du transgène ou, dans le pire des cas, peut occasionner une

réaction d'hypersensibilité [19]. Le cas de la mort d'un jeune garçon ayant reçu une injection de vecteur adénoviral en 1999 a considérablement restreint l'utilisation de ce genre de vecteur.

### **2.4.1.2 Vecteurs rétroviraux**

Les rétrovirus sont utilisés comme vecteur en thérapie génique car ils permettent d'insérer l'information génétique dans le génome de la cellule cible. Le nouveau gène se transmet alors de cellules mères en cellules filles de manière égale sans perte de l'information génétique dans le temps. Le génome des rétrovirus est composé de molécules d'ARN. L'infection par un rétrovirus implique une étape de rétrotranscription de l'ARN en un fragment d'ADN qui pourra être intégré au génome de l'hôte. La rétrotranscription est assurée par la transcriptase inverse virale. Une combinaison de protéines virales et de protéines de la cellule cible assure ensuite le transfert des molécules d'ADN du cytoplasme cellulaire vers le noyau et l'intégration dans le génome de l'hôte (intégrases). Une fois intégré, le génome du rétrovirus sous sa forme ADN est stable et transmis comme n'importe quel gène de la cellule. Les rétrovirus simples possèdent les gènes *gag*, *pol* et *env* codant respectivement pour les protéines structurelles, les enzymes polymérase et intégrase et les glycoprotéines de surface. La séquence d'encapsulation  $\psi$  est nécessaire à la formation des virions. Le schéma suivant illustre l'action des rétrovirus sur la cellule.



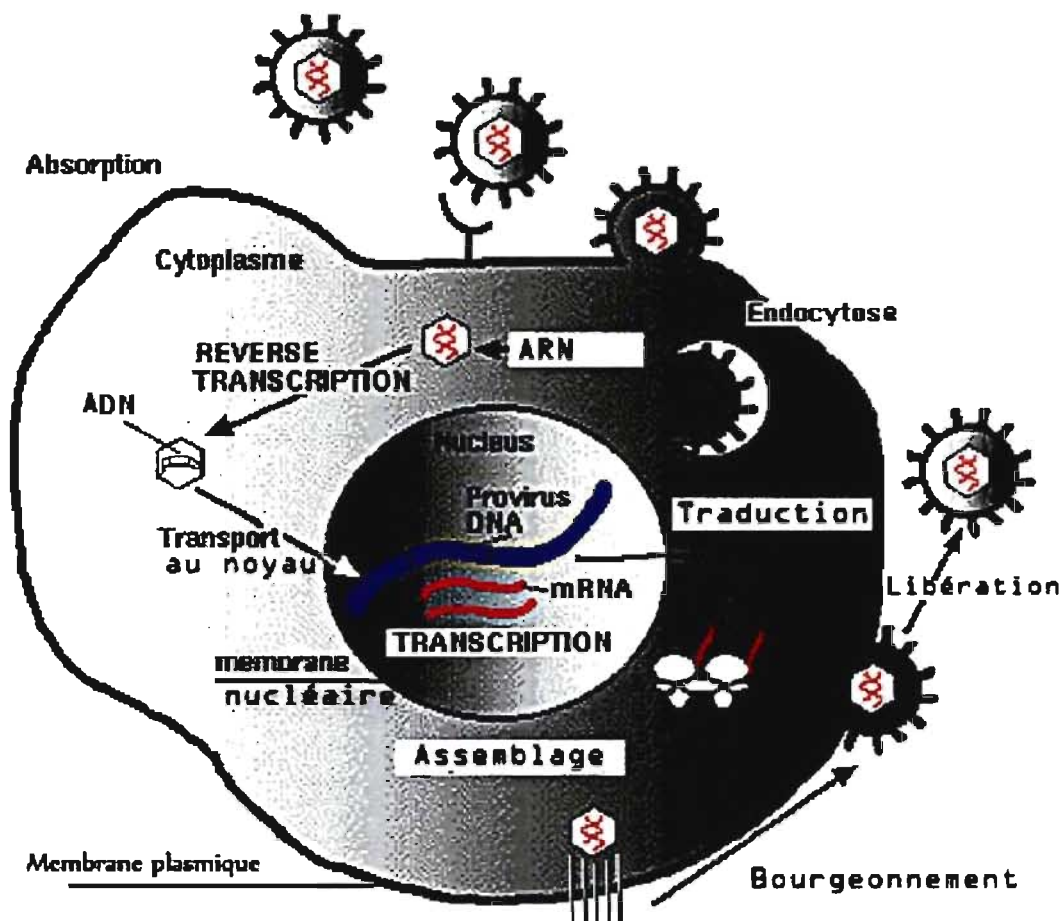


Figure n°5 : Cycle de l'infection d'une cellule par un rétrovirus montrant l'intégration de son matériel génétique au sein du génome de l'hôte. Modifié d'après <http://www.emc.maricopa.edu>.

Les rétrovecteurs utilisés en thérapie génique sont délétés pour leur séquence *gag*, *pol* et *env* laissant place à 8 kb d'ADN exogène.

La plupart des essais cliniques ont été réalisés avec des vecteurs dérivés de rétrovirus de souris. Plus récemment, des essais cliniques utilisent des vecteurs dérivés du virus VIH. Ce dernier type de vecteur, appelé vecteur lentiviral, est certes dérivé du virus humain mais est totalement sécurisé. En effet, il est capable de modifier génétiquement des cellules au repos. L'intégration des vecteurs rétroviraux dans le génome de la cellule cible, si elle est un atout majeur pour la pérennisation et la transmission de l'information génétique, représente néanmoins une difficulté en termes de sécurité car il introduit le

risque d'une mutagenèse insertionnelle. L'exemple des « enfant-bulle » de Fischer et al. l'illustre parfaitement [3]. La stratégie de thérapie génique *ex vivo* que nous utilisons permet de s'affranchir de ce risque puisque le patient n'est pas exposé au vecteur rétroviral.

Le pseudotypage est un artifice biochimique destiné à rendre plus sécuritaire l'utilisation des rétrovecteurs. Il consiste à modifier la molécule de surface du virus afin de le rendre plus spécifique de certaines cellules. Galipeau et al. [20] ont montré que le virus de la stomatite vésiculeuse pseudotype G est en mesure d'effectuer un transfert de gène efficace et sécuritaire. Pour se faire, Galipeau et al. ont utilisé une lignée de cellules embryonnaires rénales humaines (lignée 293GPG) dite lignée d'encapsidation. Les cellules de la lignée 293GPG possèdent les gènes *gag*, *pol* et *env* mais sur trois constructions différentes rendant leur combinaison improbable et donc la formation de particules répliquatives très peu vraisemblable. La transfection des cellules 293GPG avec un gène d'intérêt muni du signal d'encapsidation  $\psi$  permet la production de titres élevés de rétrovecteurs contenant l'ARN thérapeutique.

### **2.4.1.3 Vecteurs de type adénovirus associés (AAV)**

Les adénovirus associés sont des virus dont l'infection dépend d'un virus auxiliaire. Les vecteurs de type AAV (Adeno Associated Virus) sont dérivés de virus associés aux adénovirus. Ces virus ont la particularité de favoriser une intégration de leur génome toujours au même endroit. Ces vecteurs ont été fortement développés pour leur potentiel sécuritaire bien qu'ils ne soient capables que de transférer des petits gènes (5 kb). Les virus dérivés des AAV ont été beaucoup utilisés en clinique. Longtemps considérés comme inoffensifs, à l'inverse des vecteurs adénoviraux et rétroviraux, leur développement a été favorisé depuis quelques années. Mais, le décès récent au cours de l'été 2007 d'un patient dans un essai clinique de traitement de la polyarthrite rhumatoïde par des vecteurs dérivés de l'AAV a montré que la tension reste forte dès l'utilisation de la thérapie génique *in vivo*. A posteriori, l'AAV est hors de cause puisque le décès de ce jeune patient de 36 ans a été attribué à une histoplasmosse généralisée (source : <http://www.the-scientist.com/>).

#### **2.4.1.4 Vecteurs dérivés d'autres virus**

Au-delà de ces vecteurs fréquemment utilisés en clinique, de nombreuses tentatives d'utilisation de vecteurs à partir de virus sont décrits dans la littérature. On relèvera de nombreux travaux concernant l'utilisation du virus Herpes Simplex (HSV) [21], des poxvirus [22], du virus de la grippe [23], .... Ces diverses tentatives témoignent d'une part de l'inexistence d'un vecteur viral universel poussant les scientifiques à tester de nouvelles voies, et d'autre part de la volonté pour certains industriels de se positionner dans le domaine avec des brevets propriétaires.

#### **2.4.2 Vecteurs non viraux**

Les vecteurs viraux permettent des transferts de gène efficaces. Toutefois, les inquiétudes de sécurité ont motivé la recherche de voies alternatives n'utilisant pas les vecteurs viraux.

Différentes stratégies ont été élaborées pour introduire directement la molécule d'ADN. Ces stratégies reposent sur la combinaison de molécules chimiques (polycations, polymers, liposomes, ...) avec la molécule d'ADN ou de procédés physiques (électroporation) afin de faciliter la traversée de la membrane des cellules et la rentrée des molécules d'ADN. Ces vecteurs produits par des bactéries, facilement purifiables, sont des particules inertes et n'ont pas les caractères potentiellement pathogènes des virus. A l'inverse des vecteurs viraux, ils sont plus faciles à produire, à manipuler et à stocker et sont caractérisables comme des produits pharmaceutiques classiques. Cependant, leur efficacité est bien moindre que celle des virus pour transférer une information génétique dans une grande population de cellules, rendant difficile leur utilisation dans certains cas (modification d'une grande partie des cellules d'une tumeur par exemple). En outre, ils n'ont qu'une capacité très réduite à intégrer l'information génétique dans le génome, les rendant ainsi inutiles pour des modifications génétiques pérennes de populations cellulaires en prolifération active. Cette technologie peut être cependant parfaitement adaptée à certaines stratégies thérapeutiques reposant sur le

déclenchement d'une cascade d'évènements à partir de quelques cellules modifiées génétiquement (activation du système immunitaire, par exemple).[14, 24]

## **2.5 L'érythropoïétine : une protéine d'intérêt**

### **2.5.1 Anémie et insuffisance rénale**

L'association entre anémie et maladie rénale chronique est bien établie. L'érythropoïétine (EPO) est synthétisée par les reins. Sa production est régulée par un système de senseur d'oxygène rénal. Elle se fixe et active les récepteurs des progéniteurs érythroblastiques et induit leur différenciation en érythrocytes matures [25]. Les maladies rénales chroniques s'accompagnent d'une réduction des capacités de sécrétion d'EPO aboutissant à l'apparition d'une anémie normochrome normocytaire hyporégénérative. D'autres facteurs interviennent dans l'apparition de cette anémie : carence en fer et en vitamine B12, pertes digestives, toxicité médullaire de l'urée, durée de vie plus courte des érythrocytes,...

### **2.5.2 Traitement actuel de l'anémie associée à l'insuffisance rénale**

Le développement de l'érythropoïétine recombinante humaine (rhEPO) dans les années 1980 a eu des conséquences majeures sur la qualité de vie des patients traités [26]. Chez le chien et le chat, l'rhEPO est également utilisée mais la formation d'anticorps neutralisants peut aboutir à terme à l'apparition d'une anémie non régénérative. L'érythropoïétine recombinante féline a été développée mais n'est pas disponible en pratique vétérinaire. Plus récemment, d'autres agents stimulants l'érythropoïèse (ASE) comme la darbopoïétine ont vu le jour [27]. Certains de ces ASE ont été synthétisés en modifiant la séquence en acides aminés de l'EPO et en provoquant une hyperglycosylation. Les propriétés pharmacocinétiques de la darbopoïétine sont ainsi

modifiées permettant un allongement de sa demi-vie sérique par rapport à l'rhEPO. La fréquence d'administration semble donc pouvoir être réduite.

## **2.5.3 Les inconvénients du traitement actuel de l'anémie associée à l'insuffisance rénale**

### **2.5.3.1 Un traitement injectable**

L'rhEPO et les ASE sont exclusivement administrés par voie injectable. En pratique, la nécessité de réaliser des injections nuit au confort du patient car, en dehors de la gêne que cela suppose, des hématomes peuvent apparaître aux points d'injections. En effet, les patients traités par hémodialyse reçoivent en parallèle un traitement hypocoagulant.

### **2.5.3.2 Hypertension artérielle systémique : un effet secondaire de l'administration d'rhEPO**

Les patients humains ou animaux souffrant de maladie rénale chronique présentent parfois une hypertension artérielle systémique. Celle-ci est la conséquence directe de la maladie rénale par le biais de l'activation du système rénine-angiotensine-aldostérone. Toutefois, de plus en plus de preuves scientifiques abondent pour incriminer l'administration d'rhEPO ou de tout autre ASE dans l'apparition de cette hypertension. C'est un effet direct de l'rhEPO ou des ASE sur le système cardio-vasculaire. Son action semble porter sur les récepteurs endothéliaux (endothéline en particulier). Les effets sur la rhéologie sanguine (augmentation de la viscosité sanguine associée à l'augmentation de l'hématocrite) ne sont pas impliqués.[28]

Cette observation amène à souhaiter le développement d'agents stimulant spécifiquement l'érythropoïèse sans effet vasculaire associé.

### **2.5.3.3 Un traitement onéreux**

Comme précisé en introduction, le coût de production et de purification de l'rhEPO est très élevé (près de 28 millions CA\$ au Québec en 2002-source [www.ramq.gouv.qc.ca](http://www.ramq.gouv.qc.ca))

consulté en juin 2005). Ce coût semble encore plus élevé avec les ASE. L'aspect financier de la gestion de l'anémie associée aux maladies rénales chroniques est au cœur des préoccupations depuis l'arrivée de la crise économique mondiale de 2008. Pour cette raison, les recommandations thérapeutiques ont été quelque peu modifiées en visant une concentration en hémoglobine plus basse et en intensifiant la supplémentation en fer [29].

#### **2.5.4 L'érythropoïétine : des effets biologiques faciles à objectiver**

L'EPO est une protéine dont l'efficacité biologique est facile à observer. Elle induit la multiplication et la maturation des progéniteurs érythroblastiques médullaires. Il s'ensuit une réticulocytose et une élévation du taux d'hématocrite, de la concentration en hémoglobine et de la numération des hématies. Le taux d'hématocrite peut très facilement être mesuré chez tout sujet en prélevant du sang périphérique et en le faisant centrifuger à l'aide d'une centrifugeuse à micro-hématocrite. L'évaluation concomitante des protéines plasmatiques par réfractométrie est réalisée afin de déceler toute hémococoncentration qui pourrait faussement augmenter le résultat obtenu.

Par ailleurs, l'EPO humaine, canine et féline peuvent être dosées grâce à des trousse de dosage commercialisées à cet effet. Elles utilisent toutes des anticorps monoclonaux dirigés contre l'EPO humaine.

#### **2.5.5 Entre la souris et l'homme...le chien**

Le concept de thérapie génique *ex vivo* a été validé chez la souris par les études de Eliopoulos et al. [17, 30]. Ces résultats montrent clairement l'utilité des MSCs en tant que « plateforme » productrice d'EPO pouvant faire l'objet d'une régulation par le retrait possible de l'implant. L'efficacité et la réversibilité de l'implant de MSCs génétiquement modifiées *ex vivo* ont également été montrées dans un modèle expérimental de souris souffrant d'anémie secondaire à une insuffisance rénale [31].

Peut-on raisonnablement extrapoler ces données à l'humain et décider de les appliquer directement chez des patients anémiés ? Peut-on considérer que les MSCs auront le

même comportement biologique (croissance, efficacité de la transduction *in vitro*, survie dans l'implant,...) chez l'humain ?

Nous pensons que l'extrapolation est hasardeuse et qu'un modèle animal intermédiaire entre la souris et l'humain s'impose. Plusieurs observations biologiques nous ont naturellement conduit vers le chien.

- La taille des chiens est très variable (de 500 g à presque 100 kg) ce qui permet d'observer des comportements pharmacologiques plus proches de ceux de l'humain.
- La durée de vie des hématies du chien (90 jours) est beaucoup plus proche de celle de l'humain (100 jours) que de la souris (43 jours).
- La durée de vie du chien (10-15 ans) permet d'observer des effets secondaires à long terme comme des événements de carcinogénèse qui ne sont pas observables chez la souris dont la durée de vie est plus courte (2-3 ans).
- Le chien souffre également spontanément d'insuffisance rénale chronique avec anémie secondaire.

L'objectif principal de notre étude est d'utiliser le chien pour valider le concept de thérapie génique *ex vivo* en utilisant les MSCs comme plateforme productrice d'EPO chez un mammifère intermédiaire. Pour se faire, nous souhaitons montrer que l'autogreffe de MSCs transduites pour le gène de l'EPO canine grâce à un rétrovecteur et contenues dans une matrice de collagène donne lieu à une élévation durable de l'hématocrite sans effets secondaires notables.

### **3 Méthodologie**



### 3.1 Animaux

Quatre chiennes de race Beagle pesant entre 9,5 et 12 kg et âgé de 14 à 18 mois sont hébergées dans des installations agréées par le Comité du bien-être animal canadien. Le protocole expérimental a été validé par le Comité d'éthique de la Faculté de Médecine Vétérinaire de l'Université de Montréal.

### 3.2 Isolement des MSCs

Une ponction de moelle osseuse est réalisée dans le fût huméral sous anesthésie générale après préparation stérile de la région. Une prémédication à base de butorphanol (0,05 mg/kg, Wyeth, Guelph, Ontario, Canada) et acépromazine (0,05 mg/kg, Ayerst, Guelph, Ontario, Canada) est injectée en intramusculaire. L'induction anesthésique est réalisée avec une injection intraveineuse de 4 mg/kg de propofol. Après intubation endotrachéale, l'anesthésie est maintenue avec de l'isoflurane.

Une aiguille à ponction de moelle osseuse 18 G est introduite dans le fût huméral par le tubercule majeur et une aspiration de 12 à 15 mL de liquide médullaire est réalisée à l'aide d'une seringue héparinée.

Le liquide médullaire est dilué au tiers dans du D-PBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline) et déposé sur du Ficoll (Amersham Biosciences, Baie d'Urfe, Québec, Canada). L'ensemble est centrifugé à 400 g pendant 30 minutes à température ambiante. La couche d'interface contenant les cellules mononuclées et les plaquettes est prélevée et de nouveau centrifugée à 300 g pendant 10 minutes. La couche d'interface est prélevée et déposée sur le milieu de culture des MSCs contenant : 1) du Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Wisent Technologies, St-Bruno, QC), 2) du sérum bovin foetal 10% inactivé par la chaleur (Wisent Technologies), 3) 1 ng/ml de facteur de croissance des fibroblastes humain recombinant (aFGF; R&D Systems Inc.), 4) 5 U/ml héparine (Sigma-Aldrich, Oakville, Canada), 5) 250 ng/ml d'amphotéricine B (Wisent Technologies), 6) 50 U/ml de pénicilline et 7) 50 µg/ml de streptomycine (Pen/Strep; Wisent Technologies). Les cellules sont déposées dans des flasques T75 à la densité de  $5,6 \times 10^5$  cellules/cm<sup>2</sup> puis dans des boîtes de pétri tapissées de gélatine cutanée bovine 1%

### 3.3 Production du rétrovecteur

Le lignée cellulaire 293GPG est cotransfectée avec 5 µg de plasmide rétroviral cEpo-IRES-EGFP et avec 0.5 µg de plasmide de résistance pJ6ΩBleo en utilisant la lipofectamine et selon les instructions du fabricant (Invitrogen Life Technologies). Les cellules transfectées sont ensuite sélectionnées en utilisant la zéocine (100 µg/ml) (Invitrogen). Une population polyclonale de cellules encapsidatrices 293GPG ayant intégré la construction cEpo-IRES-EGFP est donc formée. Le retrait de la tétracycline du milieu de culture permet l'expression de la protéine d'enveloppe G du virus de stomatite vésiculeuse (VSV). Après 72 heures de culture après retrait de la tétracycline, on obtient des titres élevés de particules rétrovirales marquées avec la protéine G du VSV et équipées de la construction cEPO-IRES-EGFP.

### 3.4 Transduction des MSCs

Au 2ème passage, les MSCs sontensemencées à la densité de  $4,3 \times 10^3$  cellules/cm<sup>2</sup>. Le lendemain, les cellules sont exposées au rétrovecteur pendant 6 heures avec une supplémentation de 6 µg/ml de Polybrene. A l'issue des 6 heures, les particules rétrovirales sont retirées et remplacées par du milieu de culture. Une 2ème séance de transduction est réalisée le lendemain dans les mêmes conditions. Une analyse par cytométrie de flux est réalisée 5 jours après la première transduction afin de confirmer l'intégration et l'expression de la construction cEPO-IRES-EGFP en mesurant la fluorescence de la GFP. Une analyse southern blot est également réalisée afin de montrer l'intégration de la séquence d'intérêt.

### 3.5 Mesure de la sécrétion d'EPO canine

Afin de mesurer la production *in vitro* quotidienne d'EPO canine par les MSCs transduites, le milieu est retiré 7 jours après la transduction et remplacé par du sérum. Les cellules sont incubées pendant 24 heures et le surnageant est prélevé et centrifugé à

40 g en utilisant un filtre (Amicon Ultra-4 PL-10, Millipore Corporation). Après mesure des protéines totales grâce à la trousse de dosage Bio-Rad (Bio-Rad, Mississauga, Ontario, Canada), 30 µg est soumis au champ électrophorétique sur gel d'acrylamide 12%. Après transfert sur membrane de Nylon, l'EPO canine est détectée à l'aide d'anticorps polyclonaux anti-rhEPO (Santa Cruz Biotechnology Inc.). Une solution commerciale d'rhEPO (Eprex<sup>TM</sup>, Janssen-Ortho Inc., ON, Canada) sert de contrôle positif. La bande de migration de l'EPO canine est visualisée par électrochemiluminescence avec les substrats appropriés (SuperSignal West Pico, Pierce).

La détermination des concentrations d'EPO *in vitro* et *in vivo* est réalisée avec un test ELISA commercialisé pour le dosage de l'EPO humaine (Roche Diagnostics). La réaction croisée des anticorps monoclonaux permet également le dosage de l'EPO canine dans le milieu de culture et dans le sérum des chiens.

### **3.6 Implantation des MSCs transduites**

Les MSCs transduites sont mélangées à la matrice de collagène (Contigen<sup>TM</sup>) et injectées par voie sous-cutanée sur les 2 flancs de 4 Beagles. Cent trente millions de MSCs autologues sont implantées à chaque chien sous la forme de 32 implants de 200 µl chacun. Les injections ont lieu sous anesthésie générale. Les sites d'implantation sont marqués à l'aide d'agrafes chirurgicales afin d'être certain de pouvoir les suivre dans le temps.

Quatre chiens Beagle sains non traités constituent le groupe témoin.



Figure n°6 : Injection sous-cutanée du collagène contenant les MSCs transduites pour le gène de l'EPO canine. Le site d'implantation est marqué à l'aide d'agrafes chirurgicales.

### **3.7 Suivi clinique et biologique**

Un examen clinique complet est réalisé quotidiennement la première semaine post-implantation puis hebdomadairement. Il consiste à évaluer l'état général, la température rectale, la couleur des muqueuses, l'auscultation cardio-thoracique, l'appareil génital externe et les sites d'implantation. La pression artérielle systémique est mesurée après une période d'acclimatation par la méthode Doppler sur un membre antérieur.

Une prise de sang est réalisée dans une veine jugulaire à J-5, J0, J4, J7, J15, J21, J28, J35, J42, J49, J56 et J63, le prélèvement est transvasé dans un tube contenant de l'EDTA, un tube contenant de l'héparine et un tube sec.

L'hématocrite est mesuré à l'aide de tube à micro-hématocrite et d'une micro-centrifugeuse. La mesure de l'activité sérique des enzymes alanine aminotransférase (ALT) et aspartate aminotransférase (ALP) est réalisée. Le dosage de la bilirubine, du glucose, de l'urée, de la créatinine, des protéines totales, de l'albumine, du calcium total, du phosphore, du potassium, du sodium, du chlore et des bicarbonates sériques est pratiqué à l'aide d'un analyseur biochimique (Synchron CX5, Beckman Coulter, Inc. Fullerton, CA) selon les recommandations du fabricant. L'examen hématologique,

réalisé avec un automate (Cell-Dyn 3500, Abott Diagnostics Division, Mountain View, CA), permet d'obtenir une numération plaquettaire, une numération et formule leucocytaire, une numération globulaire rouge, une concentration en hémoglobine et un volume corpusculaire moyen. Le fer total et le Total Iron Binding Capacity (TIBC) sont mesurés à J0, J7, J14 et J63 grâce à la méthode ferrozine avec les instruments Roche Hitachi 917 (Roche diagnostics).

Un frottis vaginal est réalisé à l'aide d'un coton-tige et examiné par un pathologiste clinique après coloration de Wright-Giemsa modifiée à la recherche de signes d'oestrus pouvant perturber l'évolution de l'hématocrite.

### **3.8 Examen histologique des implants**

Deux mois après implantation, 2 implants sont retirés chirurgicalement sous anesthésie générale pour analyse histologique. Les implants fixés dans le formol sont tranchés en sections de 5  $\mu\text{m}$  et colorés à l'hématoxyin-phloxin-saffron.

### **3.9 Statistiques**

Le pourcentage de variation des paramètres, dont l'hématocrite, est évalué en réalisant une analyse de la variance (ANOVA) et en utilisant le test de Dunnett's posthoc. Les comparaisons entre le groupe traité et le groupe témoin sont réalisées selon un modèle linéaire de mesures répétées. Une valeur de  $p=0,05$  est choisie.

## **4 Présentation et analyse des résultats**

## 4.1 Efficacité de la transduction

L'efficacité de la transduction des MSCs est mesurée par cytométrie de flux grâce à la fluorescence de la GFP. Elle se situe entre 73% to 92 % chez les 4 chiens.

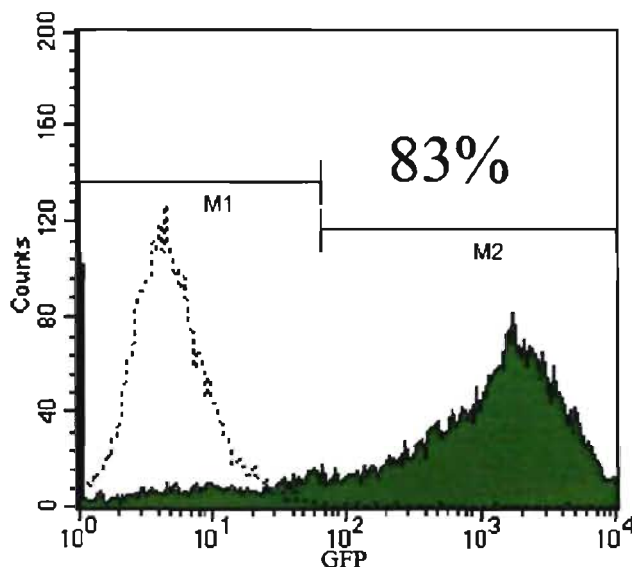


Figure n°7: représentation graphique de la fluorescence des MSCs permettant de quantifier le pourcentage de cellules exprimant la GFP. L'efficacité de transduction de ce cas est évaluée à 83%. M1 correspond à la fluorescence des cellules n'exprimant pas la GFP et M2 correspond à la fluorescence des cellules exprimant la GFP.

## 4.2 Expression de l'EPO canine *in vitro*

L'EPO canine libérée dans le milieu de culture par les MSCs transduites a été détectée par western blot chez les 4 chiens.

*In vitro*, les MSCs transduites produisent de 1,3 à 7,9  $\mu\text{g}$  d'EPO/ $10^6$  cellules/24heures.

## 4.3 Expression de l'EPO canine *in vivo*

Une augmentation moyenne de l'hématocrite de 28% est observée chez les 4 chiens.

Cette augmentation a lieu en moyenne dans les 12 jours qui suivent l'implantation. Cette augmentation est statistiquement significative par rapport au groupe témoin pendant 5 semaines consécutives ( $p < 0,05$ ).

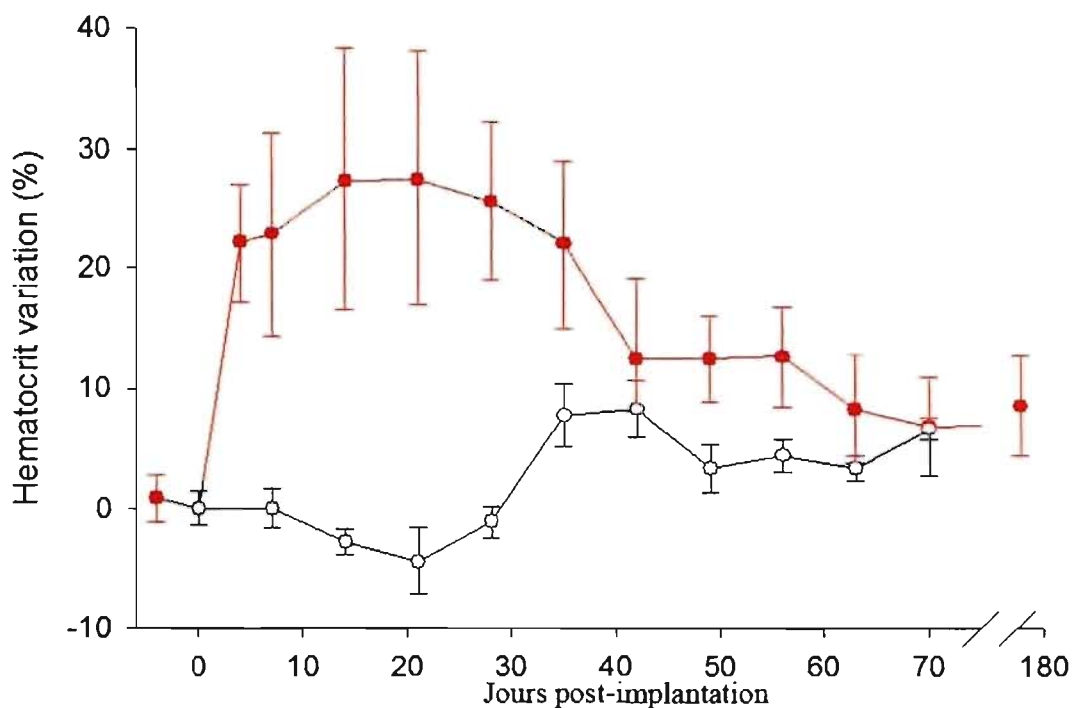


Figure n°8 : Variation de l'hématocrite moyen des 4 chiens ayant subi l'autogreffe de MSCs transduites pour le gène de l'EPO canine (Ronds rouges pleins) et de 4 chiens témoins (Ronds vides). L'augmentation est statistiquement significative de J5 à J42 ( $p < 0,05$ ).

La concentration sérique en EPO a significativement augmenté chez les chiens traités jusqu'à J7 ( $p = 0,025$ ) et se maintient élevée à J14 sans être statistiquement significative ( $p = 0,08$ ). La concentration sérique en EPO a chuté en dessous de la valeur pré-implantation à J28.



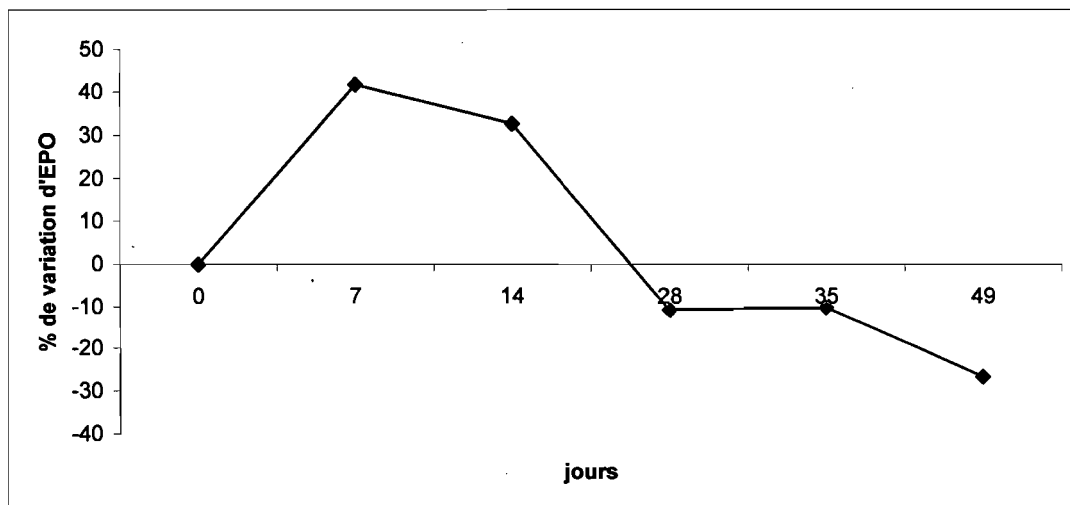


Figure n°9 : variation du taux d'érythropoïétine moyen chez les 4 chiens ayant subi l'autogreffe de MSCs transduites pour le gène de l'EPO canine. L'augmentation est statistiquement significative à J7 ( $p < 0,05$ ), non statistiquement significative à J14 ( $p = 0,08$ ) et chute en dessous de la valeur de départ à J28.

#### 4.4 Oestrus

Afin de déceler toute fluctuation de l'hématocrite potentiellement liée au cycle œstral des chiennes Beagle (pertes sanguines, effet des oestrogènes), un suivi sexuel a été réalisé. D'après l'examen cytologique vaginal, seule la chienne n°4 était en phase d'activité sexuelle (oestrus) au jour 61. Aucune variation de l'hématocrite ou du TIBC n'a été observée pendant cette phase.

#### 4.5 Réaction locale des sites d'implantation et analyse histologique des implants

Dans les jours qui suivent l'implantation sous-cutanée, nous avons observé et palpé un discret gonflement évoquant un œdème. La peau est restée de couleur normale (absence de rougeur). Le gonflement a totalement régressé dans les 6 jours.

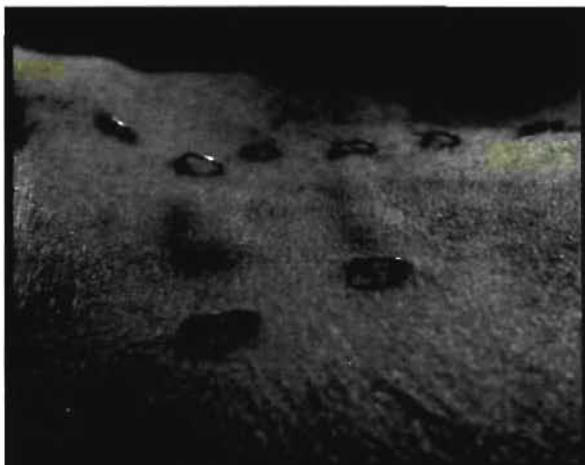


Figure n°10 : Flanc d'un chien montrant le bombement cutané visible et palpable correspondant aux implants sous-cutanés de collagène contenant les MSCs transduites.

L'examen histologique des implants retiré à J60 a montré une infiltration périphérique par des cellules lymphocytaires et, dans une moindre mesure, des macrophages. De rares granulocytes éosinophiles sont également observés. Une fine couche de collagène de l'hôte entoure l'implant et l'infiltrat inflammatoire. Le centre apparaît pâle, peu cellulaire et fragmenté chez 2 des 4 chiens.

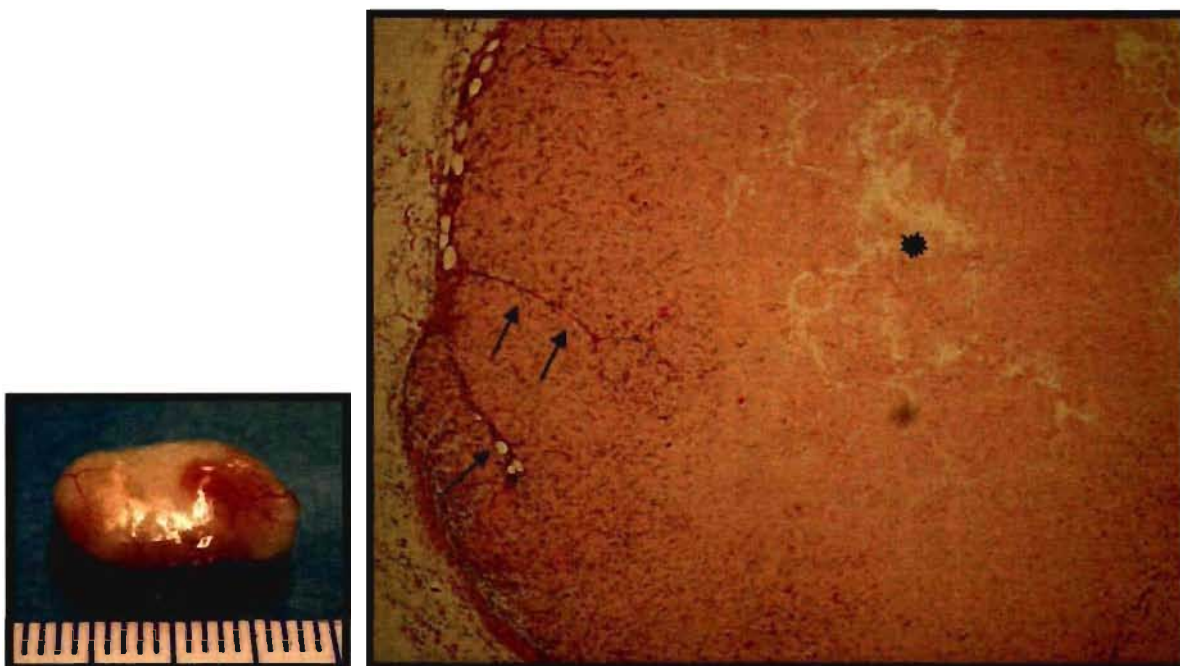


Figure n°11 : aspect macroscopique d'un implant (cette photo est celle d'un implant de 1 mL de l'étude préliminaire non rapportée dans ce travail) montrant une néovascularisation. L'examen histologique montre la néovascularisation périphérique

(flèches noires), l'infiltrat inflammatoire mixte périphérique et l'absence de cellules au centre de l'implant (étoile noire).

## **4.6 Innocuité**

Aucune modification clinique n'a été observée chez les chiens pendant toute la durée du protocole. Aucune variation de la pression artérielle systémique n'a été détectée. L'examen biochimique et hématologique (en dehors de la numération érythrocytaire) est resté stable pour tous les paramètres mesurés. L'hyperphosphatémie modérée observée de J0 à J49 est considérée comme étant physiologique chez de jeunes adultes [32]. Présente dès J0, elle ne peut être imputée au déroulement du protocole expérimental.

## **5 Discussion générale**

Cette étude constitue une avancée dans le domaine de la thérapie génique *ex vivo*.

La moelle osseuse du chien est facile à obtenir puisqu'une seule ponction dans le fût huméral permet d'obtenir 12 mL de liquide médullaire et d'en extraire théoriquement  $10^{13}$  cellules en culture.[14]

L'efficacité de transduction se situe entre 73 et 92%. Ce résultat peut être qualifié d'excellent quand on le compare aux résultats de Cherington et al. [33] qui obtiennent une efficacité de transduction de l'ordre de 50%. Cette différence peut être expliquée par le large tropisme offert par les rétoparticules pseudotypées avec la protéine G du virus de la stomatite vésiculeuse.

La mesure des concentrations en EPO dans le milieu de culture des MSCs transduites et dans le sérum des chiens a montré une production importante *in vitro* (de 1,3 à 7,9  $\mu\text{g}$  d'EPO/ $10^6$  cellules/24 heures) et *in vivo* (augmentation de 40% par rapport à J0). Cette observation permet de valider l'efficacité du transfert de gène mais également les capacités sécrétrices des MSCs. En effet, on peut ainsi affirmer que les MSCs possèdent toute la machinerie cellulaire permettant la synthèse d'EPO. En revanche, l'augmentation de la concentration en EPO dans le milieu et le sérum des chiens traités ne permet pas de savoir si les propriétés biologiques de l'EPO sécrété sont satisfaisantes. Ainsi, l'élévation subséquente de l'hématocrite permet de vérifier que cette EPO sécrétée est biologiquement active. Les MSCs possèdent donc tout l'arsenal cellulaire nécessaire à la glycosylation de l'EPO.

La concentration sérique en EPO a augmenté pendant 14 jours puis a chuté en dessous de la valeur de départ. Cette chute s'explique non seulement par l'arrêt de la sécrétion d'EPO par l'implant mais également par la présence d'un système régulateur de l'EPO endogène. En effet, la hausse de l'hématocrite est à l'origine d'un rétrocontrôle négatif sur les cellules rénales sécrétrices d'EPO. Les effets de cette augmentation transitoires de l'EPO sont quant à eux beaucoup plus durables puisque l'élévation de l'hématocrite s'est maintenue pendant 45 jours. Ceci s'explique par l'induction d'une vague d'érythropoïèse dont les effets sont observables pendant la durée de vie des globules rouges produits.

L'hypothèse d'une production d'anticorps anti-EPO n'a pas été explorée dans cette étude. Elle semble toutefois peu vraisemblable dans la mesure où le gène utilisé est celui codant pour l'EPO canine.

La mesure des concentrations d'EPO doit être considérée avec prudence. En effet, aucune trousse de dosage de l'EPO canine n'est disponible. Seules les trousse EPOEIA® et EPO-Trac® ont fait l'objet de validation publiée [34, 35]. La fabrication de ces trousse est désormais interrompues et seules des trousse non validées chez le chien sont actuellement disponibles. Les anticorps monoclonaux dirigés contre l'EPO humaine croisent certainement avec l'EPO canine mais cette information ne peut être considérée comme irréfutable faute de preuve.

L'élévation de l'hématocrite observée chez les 4 chiens traités montre que la matrice de collagène bovin utilisée constitue un milieu permettant la survie des MSCs ainsi que la sécrétion et la diffusion de l'EPO à des concentrations biologiquement actives. Le confinement des MSCs génétiquement modifiées au sein de cette matrice présente l'immense avantage de pouvoir les retirer simplement. Ceci permet une éventuelle régulation de la quantité d'EPO sécrétée par les implants. En cas d'excès d'EPO et de polycythémie secondaire, quelques implants peuvent être extraits.

La tolérance du traitement semble excellente puisque aucun animal n'a présenté d'effets indésirables décelables par les examens cliniques ou par les analyses hématobiochimiques sanguines.

La durée de sécrétion de la protéine d'intérêt est limitée dans le temps puisque l'augmentation d'EPO sérique n'est observée que pendant 14 jours. Plusieurs facteurs limitent la survie des MSCs au sein de l'implant de collagène :

- La réaction inflammatoire observée histologiquement contribue certainement au raccourcissement de la durée de la sécrétion d'EPO en provoquant la mort d'une partie des MSCs.
- La diffusion de nutriments, oxygène et facteurs de croissance est limitée au sein de l'implant. A cause de leur importante activité sécrétrice au sein de l'implant, les MSCs sont extrêmement sensibles à leur environnement immédiat. *In vivo*, les MSCs résident dans des niches où le microenvironnement est propice à leur

survie. La néoascularisation observée a lieu en périphérie de l'implant et la zone centrale est avasculaire et acellulaire [36]. La brutalité du changement d'environnement (passage du milieu de culture à la matrice de collagène en quelques secondes) est également un paramètre qui limite certainement la survie des MSCs.

Certains paramètres pourront être modifiés dans les futures études pour améliorer la survie des MSCs :

- Les implants peuvent être réduits de taille afin de favoriser la diffusion des nutriments, oxygène et facteurs de croissance au cœur de l'implant.
- Le développement de nouvelles matrices plus poreuses permettant une diffusion aisée des nutriments et le développement rapide de néo-vaisseaux est également à privilégier.
- La co-transduction des MSCs avec un gène codant pour un facteur de croissance vasculaire (Vascular Endothelial Growth-factor-VEG-f) visant à favoriser la néovascularisation au sein de l'implant.
- Une transition plus douce du microenvironnement des MSCs est également à explorer. Des conditions de culture *in vitro* à basse pression partielle en oxygène (2 à 3%) [36] afin de les préconditionner à leur milieu *in vivo* est possible.

## **6 Conclusion**



En résumé, cette étude a permis de démontrer que l'autogreffe de MSCs transduites pour le gène de l'EPO canine et réimplantées au sein d'une matrice de collagène est à l'origine d'une sécrétion d'EPO biologiquement active chez le chien immunocompétent. En effet, les MSCs canines peuvent être prélevées, cultivées *in vitro*, efficacement transduites grâce à des retroparticules pseudotypées et réimplantées par voie sous-cutanée mélangées à une matrice de collagène. L' "organoïde" ainsi formé sécrète une EPO biologiquement active et en quantité suffisante pour entraîner une augmentation de l'hématocrite. L'implant est facile à retirer et constitue ainsi un moyen simple de régulation de la sécrétion d'EPO. L'innocuité du traitement est apparue excellente. Ces résultats valident le concept de thérapie génique *ex vivo* et constitue une étape cruciale de l'application en médecine humaine.

## 7 Bibliographie

1. Cavazzana-Calvo, M., et al., *Gene therapy of human severe combined immunodeficiency (SCID)-X1 disease*. Science, 2000. 288(5466): p. 669-72.
2. Kohn, D.B. and F. Candotti, *Gene therapy fulfilling its promise*. N Engl J Med, 2009. 360(5): p. 518-21.
3. Hacein-Bey-Abina, S., et al., *LMO2-associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1*. Science, 2003. 302(5644): p. 415-9.
4. Hacein-Bey-Abina, S., et al., *Insertional oncogenesis in 4 patients after retrovirus-mediated gene therapy of SCID-X1*. J Clin Invest, 2008. 118(9): p. 3132-42.
5. Le Meur, G., et al., *Restoration of vision in RPE65-deficient Briard dogs using an AAV serotype 4 vector that specifically targets the retinal pigmented epithelium*. Gene Ther, 2007. 14(4): p. 292-303.
6. Finocchiaro, L.M., et al., *Suicide gene and cytokines combined nonviral gene therapy for spontaneous canine melanoma*. Cancer Gene Ther, 2008. 15(3): p. 165-72.
7. Themis, M., et al., *Oncogenesis following delivery of a nonprimate lentiviral gene therapy vector to fetal and neonatal mice*. Mol Ther, 2005. 12(4): p. 763-71.
8. Yang, Y., et al., *Immune responses to viral antigens versus transgene product in the elimination of recombinant adenovirus-infected hepatocytes in vivo*. Gene Ther, 1996. 3(2): p. 137-44.
9. Matsui, H., et al., *Ex vivo gene therapy for hemophilia A that enhances safe delivery and sustained in vivo factor VIII expression from lentivirally engineered endothelial progenitors*. Stem Cells, 2007. 25(10): p. 2660-9.
10. Caulfield, T., et al., *Stem cell research ethics: consensus statement on emerging issues*. J Obstet Gynaecol Can, 2007. 29(10): p. 843-8.
11. Fontaine, F., *Délivrance d'érythropoïétine canine par une glande synthétique endocrine composée de cellules stromales de la moelle osseuse autologues chez des chiens immunocompétents* in *Faculté de médecine vétérinaire*. 2004, Maîtrise de Sciences. Université de Montréal: Montréal.

12. Pittenger, M.F., et al., *Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells*. Science, 1999. 284(5411): p. 143-7.
13. Pontikoglou, C., B. Delorme, and P. Charbord, *Human bone marrow native mesenchymal stem cells*. Regen Med, 2008. 3(5): p. 731-41.
14. Reiser, J., et al., *Potential of mesenchymal stem cells in gene therapy approaches for inherited and acquired diseases*. Expert Opin Biol Ther, 2005. 5(12): p. 1571-84.
15. Stepanenko, O.V., et al., *Fluorescent proteins as biomarkers and biosensors: throwing color lights on molecular and cellular processes*. Curr Protein Pept Sci, 2008. 9(4): p. 338-69.
16. Bartholomew, A., et al., *Baboon mesenchymal stem cells can be genetically modified to secrete human erythropoietin in vivo*. Hum Gene Ther, 2001. 12(12): p. 1527-41.
17. Eliopoulos, N., et al., *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): p. 741-8.
18. Yanay, O., et al., *Long-term erythropoietin gene expression from transduced cells in bioislator devices*. Hum Gene Ther, 2003. 14(17): p. 1587-93.
19. Huang, X. and Y. Yang, *Innate Immune Recognition of Viruses and Viral Vectors*. Hum Gene Ther, 2009.
20. Galipeau, J., et al., *Vesicular stomatitis virus G pseudotyped retrovector mediates effective in vivo suicide gene delivery in experimental brain cancer*. Cancer Res, 1999. 59(10): p. 2384-94.
21. Kulu, Y., et al., *Comparison of intravenous versus intraperitoneal administration of oncolytic herpes simplex virus 1 for peritoneal carcinomatosis in mice*. Cancer Gene Ther, 2008.
22. Yu, Y.A., et al., *Regression of human pancreatic tumor xenografts in mice after a single systemic injection of recombinant vaccinia virus GLV-1h68*. Mol Cancer Ther, 2009. 8(1): p. 141-51.
23. Wu, K., et al., *Molecular basis of therapeutic approaches to gastric cancer*. J Gastroenterol Hepatol, 2009. 24(1): p. 37-41.

24. Pitkanen, L., et al., *Vitreous is a barrier in nonviral gene transfer by cationic lipids and polymers*. Pharm Res, 2003. 20(4): p. 576-83.
25. Stockenhuber, F., et al., *Recombinant human erythropoietin activates a broad spectrum of progenitor cells*. Kidney Int, 1990. 37(1): p. 150-6.
26. Nielsen, O.J. and J.H. Thaysen, *Response to erythropoietin in anaemic haemodialysis patients*. J Intern Med, 1989. 226(2): p. 89-94.
27. Wiecek, A., T. Nieszporek, and J. Chudek, *Perspectives in the treatment of renal anaemia new concepts and new drugs*. Prilozi, 2007. 28(1): p. 225-37.
28. Krapf, R. and H.N. Hulter, *Arterial hypertension induced by erythropoietin and erythropoiesis-stimulating agents (ESA)*. Clin J Am Soc Nephrol, 2009. 4(2): p. 470-80.
29. Wish, J.B., *Past, present, and future of chronic kidney disease anemia management in the United States*. Adv Chronic Kidney Dis, 2009. 16(2): p. 101-8.
30. Eliopoulos, N., et al., *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): p. 478-89.
31. Eliopoulos, N., et al., *Erythropoietin delivery by genetically engineered bone marrow stromal cells for correction of anemia in mice with chronic renal failure*. J Am Soc Nephrol, 2006. 17(6): p. 1576-84.
32. Harper, E.J., et al., *Age-related variations in hematologic and plasma biochemical test results in Beagles and Labrador Retrievers*. J Am Vet Med Assoc, 2003. 223(10): p. 1436-42.
33. Cherington, V., et al., *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): p. 1397-407.
34. Cook, S.M. and C.D. Lothrop, Jr., *Serum erythropoietin concentrations measured by radioimmunoassay in normal, polycythemic, and anemic dogs and cats*. J Vet Intern Med, 1994. 8(1): p. 18-25.

35. Pechereau, D., P. Martel, and J.P. Braun, *Plasma erythropoietin concentrations in dogs and cats: reference values and changes with anaemia and/or chronic renal failure*. Res Vet Sci, 1997. 62(2): p. 185-8.
36. Ma, T., et al., *Hypoxia and stem cell-based engineering of mesenchymal tissues*. Biotechnol Prog, 2009. 25(1): p. 32-42.

## 8 Curriculum vitae

### Formation

---

Juillet 06	Diplômé de l' <b>American College of Veterinary Internal Medicine</b>
Juillet 06	<b>Diplôme d'Etudes Spécialisées</b> Médecine Interne des animaux de compagnie. Université de Montréal.
Juillet 03-juillet 06	<b>Résidanat de médecine interne</b> des petits animaux - ACVIM, université de Montréal, faculté de médecine vétérinaire de Saint-Hyacinthe. <u>Superviseur</u> : Dre M. Dunn, Dipl. ACVIM.
Avril 2003	<b>Thèse de doctorat vétérinaire</b> : <i>Elaboration d'un modèle expérimental d'anémie déficitaire en EPO chez le chat destiné à faire l'objet d'une thérapie génique.</i>
Oct 02-juin 03	<b>Cours du DEA</b> de physiologie et pathologie de la circulation, hôpital Bichat, Paris.
Sept 01-août 02	<b>Assistant en Imagerie Médicale</b> ENVA (radiographie et échographie abdominale).
Sept 00-Juil 02	<b>CEAV de médecine interne des animaux de compagnie</b>
Sept 00-Juin 01	<b>Certificat de maîtrise</b> de biologie et pathologie moléculaire, hôpital Cochin.

### FORMATION POST-UNIVERSITAIRE

---

Oct 05 et 06	Cours de statistiques et de communication scientifique orale et écrite. Université de Montréal.
Déc 05	Colloque de la société de thérapie génique du Québec
Juin 05, 06, 07 et 09	Congrès ACVIM
Juil 01	European congress of veterinary diagnosis imaging, Paris.
Oct 01	Enseignement post-universitaire en échocardiographie-Doppler, en échographie abdominale, en endoscopie digestive et respiratoire.

### PUBLICATIONS

---

- **J. Hernandez**, G. Brochand, F. Berto (2000) Un cas de Polycythemia Vera chez un chat. *Prat Méd Chir Anim Comp.* 35 : 457-465.
- **J. Hernandez**, N. Granger, I. Weber, JF. Salomon, D. Rault, V. Chetboul, D. Tessier, S. Leloup et J. Besso (2002) Rupture biliaire et suspicion de thrombo-embolie pulmonaire chez un chien. *Point Vét.* 226 : 62-65.
- G. Blanchard, **J. Hernandez** et BM. Paragon (2001) Ostéofibrose nutritionnelle chez un chaton. *Nouveau Praticien* 6 : 59-62.

- **J. Hernandez**, J. Besso, D. Rault, A. Cohen, A. Guionnet, D. Begon, Y. Ruel (2003) Radiographic findings of emphysematous pyometra in a dog. *Vet Radiol Ultrasound*. Mar-Apr ; 44(2) :196-8.
- I. Weber, **J. Hernandez**, V. Chetboul (2002) L'angiostrongylose canine : étude de 3 cas. *Prat Méd Chir Anim Comp*. 37 : 61-66.
- **J. Hernandez** (2004) Un cas de cardiomyopathie féline ressemblant à la Cardiomyopathie Ventriculaire Droite Arythmogène de l'homme. *Prat Méd Chir Anim Comp*. 39 : 27-31
- E. Meler, **J. Hernandez** (2005) Un cas d'hémangiosarcome de l'oreillette droite traité par exérèse chirurgicale et chimiothérapie. *Prat Méd Chir Anim Comp*.
- S. Rouillon, **J. Hernandez**, L. Blond (2005) Lésions radiographiques pulmonaires associées à la leptospirose canine : à propos de 16 cas. *Médecin vétérinaire du Québec*.
- **J. Hernandez**, MC. Bélanger, MO. Benoit, P. Pibarot Left coronary aneurysm and subaortic stenosis in a dog. *J Vet Cardiol*. 2008 Jun;10(1):75-9
- C. Villemonte, K. Gendron, **J. Hernandez** (2005). Un cas d'hyperaldostéronisme primaire chez un chat. *Prat Méd Chir Anim Comp*.

#### COURS, POSTER ET CONFERENCES

- Plusieurs présentations annuelles depuis 2006 dans le cadre de l'Association Française des Vétérinaires des Animaux de Compagnie (AFVAC)
- **Poster** au Lady Davis Hospital de Montréal : Transplant of autologous bone marrow stromal cells genetically engineered with canine EPO leads to an increase in hematocrit in healthy dogs. **J. Hernandez**, F. Fontaine, H. Boucher, G. Beauchamp, N. Eliopoulos, J. McLeod, J. Galipeau, D. Martineau, M. Dunn. Mai 2005
- **Présentation orale** au Congrès ACVIM 2005, Baltimore. Transplant of autologous bone marrow stromal cells genetically engineered with canine EPO leads to an increase in hematocrit in healthy dogs. Prix : **Resident research award**.

#### BOURSE ET PRIX

- Prix *Vétoquinol* du « résident sachant le mieux transmettre ses connaissances aux étudiants finissants », 1000 \$, juin 2005 et de « l'étudiant de cycle supérieur ayant montré un intérêt en gériatrie canine et féline », 1000 \$, juin 2004.
- Bourse de l'Association canadienne de recherche contre le cancer, 20 000 \$ utilisés à financer les recherches sur la thérapie génique de l'EPO, septembre 2004 et 2005.