



Since January 2020 Elsevier has created a COVID-19 resource centre with free information in English and Mandarin on the novel coronavirus COVID-19. The COVID-19 resource centre is hosted on Elsevier Connect, the company's public news and information website.

Elsevier hereby grants permission to make all its COVID-19-related research that is available on the COVID-19 resource centre - including this research content - immediately available in PubMed Central and other publicly funded repositories, such as the WHO COVID database with rights for unrestricted research re-use and analyses in any form or by any means with acknowledgement of the original source. These permissions are granted for free by Elsevier for as long as the COVID-19 resource centre remains active.



Disponible en ligne sur

ScienceDirect
www.sciencedirect.com

Elsevier Masson France

EM|consulte
www.em-consulte.com



REVUE GÉNÉRALE

Du laboratoire à l'usage clinique : le défi de la production de plaquettes in vitro[☆]



From the bench to the clinic: The challenge of translating platelet production in vitro

G. Bouet^a, S. Mookerjee^{b,c}, H. Foster^{b,c}, A. Waller^{b,c},
C. Ghevaert^{b,c,*}

^a Mines Saint-Étienne, université Lyon, université Jean-Monnet, Inserm, U 1059 Sainbiose, Centre CIS, Saint-Étienne, France

^b Wellcome trust-medical research council Cambridge Stem Cell Institute and department of haematology, university of Cambridge, CB2 0PT Cambridge, UK

^c National health service blood and transplant, Cambridge biomedical campus, CB2 0PT Cambridge, UK

Reçu le 13 mai 2020 ; accepté le 2 juin 2020

Disponible sur Internet le 13 octobre 2020

MOTS CLÉS

Transfusion ;
Plaquettes ;
In vitro ;
Biosécurité ;
Contrôle qualité

Résumé La transfusion de plaquettes, aujourd'hui totalement dépendante des dons des bénévoles, constitue un besoin vital permanent pour tous les patients thrombo-cytopéniques suite à un trauma, une chirurgie ou des suites d'une pathologie (particulièrement le cancer). La production de plaquettes in vitro représente une avancée et une solution technologique et scientifique majeure qui permettrait de pallier des problématiques logistiques (approvisionnement, stockage, etc.) et médicales (compatibilité, biosécurité). L'émergence et la concrétisation de cette innovation vont de pair avec une maîtrise totale et harmonisée entre les laboratoires du contrôle de la qualité des plaquettes produites in vitro, ainsi que leur efficacité et leur biosécurité pour un usage clinique.

© 2020 Publié par Elsevier Masson SAS au nom de l'Académie nationale de médecine.

[☆] Étant donné le contexte sanitaire épidémique lié à la Covid-19 en 2020, la présentation de cette communication en séance à l'Académie a été reportée.

* Auteur correspondant.

Adresse e-mail : cg348@cam.ac.uk (C. Ghevaert).

KEYWORDS

Transfusion;
Platelets;
In vitro;
Biosafety;
Quality control

Abstract Platelet transfusions, which are currently totally dependent on altruistic donations, are absolutely necessary to the treatment of patients with thrombocytopenia following trauma, surgery or other pathologies (especially malignancies). Producing platelets in vitro represent a major technological and scientific breakthrough that would address logistical issues (supply chain, stock holding ...) and medical concerns (compatibility and biosafety). The translation of this innovation will need to be accompanied by rigorous quality control, harmonised between laboratory when it comes to functionality and biosafety for use in the clinic.

© 2020 Published by Elsevier Masson SAS on behalf of l'Académie nationale de médecine.

Introduction

Les transfusions de plaquettes sont généralement administrées aux patients ayant un taux de plaquettes dans le sang très diminué (thrombocytopenie sévère avec moins de 20×10^6 plaquettes par mL de sang). Dans environ 40 % des cas, cela est dû à des saignements importants suite à un trauma accidentel ou à certains types de chirurgies comme les interventions cardio-vasculaires. Mais dans la majorité des cas, cette thrombocytopenie est secondaire à une diminution de la production plaquettaire dans la moelle osseuse pouvant être causée par une chimiothérapie, l'infiltration de la moelle par des cellules cancéreuses ou, plus rarement, par des maladies génétiques.

Aujourd'hui, nous sommes totalement dépendants des donneurs de sang (et de plaquettes) bénévoles pour fournir les hôpitaux en unités de plaquettes. La demande pour ces dernières continue d'augmenter du fait, principalement, du vieillissement de la population mais aussi à cause des traitements anti-cancéreux de plus en plus agressifs alors que le nombre de donneurs, lui, est plus ou moins statique (Fig. 1) [1].

Cette dépendance aux dons volontaires pour avoir un stock de plaquettes crée de multiples problèmes. Tout d'abord, quand la quantité de donneurs diminue soudainement, comme en Amérique du nord pendant les tempêtes de neige de l'hiver 2018–2019 [2] ou pendant la crise du COVID-19, la réserve de plaquettes devient critique. De plus, les plaquettes expirent 5 à 7 jours après le prélèvement [3] alors que les globules rouges peuvent, eux, être stockés pendant 25 à 42 jours. Les stocks de plaquettes sont donc beaucoup plus sensibles à la présence continue de donneurs [4].

Au cours des trente dernières années, les produits médicaux dérivés du sang ont été le sujet de nombreux scandales dus à la transmission, aux patients qui les reçoivent, d'infections issues des donneurs. C'est particulièrement le cas pour les produits dérivés du plasma pour lesquels plusieurs centaines de dons individuels sont mélangés pendant la production. Les plaquettes, elles aussi, peuvent être produites à partir du mélange de 4 dons individuels. Pour cette raison, l'utilisation de l'aphérèse a nettement augmenté, permettant ainsi la production de plaquettes provenant de donneurs individuels. C'était particulièrement le cas au Royaume-Uni où, suite à la crise d'encéphalopathie

spongiforme des années 90, plus de 80 % des plaquettes provenaient de prélèvement par aphérèse.

Les patients qui reçoivent des transfusions plaquettaires à répétition, ainsi que les femmes ayant eu plusieurs enfants, sont à risque de développer des anticorps contre les épitopes des antigènes HLA Classe I. Pour les patients immunisés, les plaquettes qui ne sont compatibles que pour le groupe A/B/O et le Rhésus D auront une durée de vie très courte dans la circulation après la transfusion. Pour ces patients, les centres de transfusions fournissent des plaquettes collectées à partir de donneurs qui sont compatibles pour HLA Classe I. Cela représente un gros problème logistique résultant à une plus-value importante de ces plaquettes (plus de 400 % du prix de base). De plus, les patients immunisés ont généralement un temps d'hospitalisation plus long, des saignements plus fréquents et requièrent donc plus souvent des transfusions de globules rouges.

Au cours des dernières années, plusieurs groupes de recherche ont énormément progressé sur la question de la production de plaquettes « in vitro » pour la transfusion de patients. Cela inclut la production de mégacaryocytes [5,6] ainsi que le développement de nouveaux bioréacteurs pour extraire les plaquettes produites par ces mégacaryocytes [7–9]. En théorie, les plaquettes produites en laboratoire pourraient adresser plusieurs des problèmes inhérents au fait que nous soyons totalement dépendants des donneurs : la possibilité d'augmenter (ou de diminuer) à volonté la production, une réduction du risque de transmission d'infections et également la possibilité de créer des plaquettes avec des bénéfices cliniques bien déterminés (comme par exemple une immunogénicité réduite) en utilisant les techniques d'édition du génome des cellules souches.

L'article présenté ici va se concentrer sur certains aspects de la production de plaquettes en laboratoire : les différentes méthodes de mesures de la qualité des plaquettes pour :

- permettre la comparaison entre différents produits venant de différents laboratoires et ;
- prouver l'efficacité et la biosécurité de ces plaquettes permettant leur usage en clinique.

Notre article va d'abord se concentrer sur les mesures de la qualité des cellules nucléées donnant naissance aux pla-

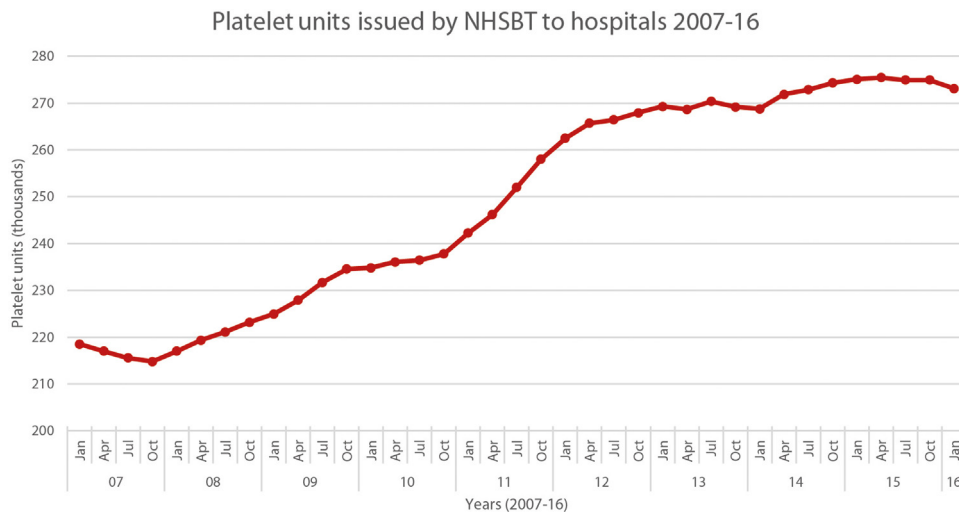


Fig. 1 L'augmentation constante des unités de plaquettes délivrées par le NHSBT montre une tendance à la hausse des plaquettes destinées à la transfusion. Adapté de [1].

quettes en insistant sur l'aspect « sécurité des patients ». Ensuite, nous aborderons la question des techniques pour mesurer la qualité fonctionnelle des plaquettes et en particulier, les difficultés associées à leur production en laboratoire.

Cellules souches et mégacaryocytes : la sécurité d'abord !

L'un des risques majeurs associé à l'utilisation de cellules produites en laboratoire est le risque de tumeurs cancéreuses suite à la transfusion de cellules ayant été en culture pendant une longue période. Les plaquettes (et les globules rouges) sont généralement considérées moins dangereuses que d'autres thérapies cellulaires étant donné que ces cellules ne contiennent pas de noyaux. En réalité, the European Medicine Agency ne catégorise pas les plaquettes comme « Advanced Therapy Medicinal Product » (la désignation pour les thérapies cellulaires) mais comme « Investigational Medicinal Product » (la catégorie des médicaments comme antibiotiques ou anti-hypertensifs) parce que les plaquettes ne sont pas des cellules par définition (due à l'absence de noyau). Mais il est important de tenir compte qu'une unité de transfusion de plaquettes contient 3×10^{11} plaquettes et donc, même si la contamination par des cellules nucléées ne représente que 0,1 % du produit final, chaque transfusion résulterait à l'injection de 3×10^8 cellules contenant de l'ADN au patient.

Il est possible d'utiliser l'irradiation pour induire l'apoptose de toutes les cellules nucléées présentes dans le produit final. Cette procédure est couramment utilisée pour éliminer le risque de réaction du greffon contre l'hôte (GVH), acquise lors d'une transfusion, chez des patients sévèrement immunodéprimés chez qui les lymphocytes du donneur sont capables de se greffer et de déclencher une réponse immunitaire contre le tissu du receveur. Les protocoles d'irradiation ont été développés pour créer suffisamment de dommages dans les lymphocytes de donneurs

pour induire l'apoptose. Il faudrait démontrer que cet effet est tout aussi efficace sur des cellules issues de culture qui auraient acquis un avantage de survie suite au processus de culture en lui-même (ou via une immortalisation). Ces mutations conférant aux cellules en culture un bénéfice de croissance seront naturellement variées ce qui pourrait créer des différences majeures dans la manière dont chaque cellule nucléée réagirait à l'irradiation.

Mesure de l'intégrité génomique

Les sources de cellules utilisées pour obtenir des plaquettes in vitro sont généralement des cellules souches pluripotentes ou des progéniteurs de mégacaryocytes immortalisés et dérivés de lignées de cellules souches pluripotentes. Le maintien des lignées cellulaires en culture présente des challenges majeurs en termes d'intégrité du génome. Plusieurs publications ont montré comment les cellules souches pluripotentes acquièrent des mutations en culture et que ces mutations leur confèrent un avantage de survie si bien qu'en quelques passages, la totalité de la culture est dominée par le clone mutant [10,11]. Les cellules immortalisées sont habituellement générées par manipulation de la voie de signalisation de l'apoptose. Mais, il faut garder à l'esprit que l'apoptose est une des voies que les cellules utilisent pour se protéger des mutations [12]. L'instabilité génomique est donc encore plus préoccupante lorsqu'il s'agit de dériver des plaquettes à partir de mégacaryocytes qui ont été générés par un processus qui implique une immortalisation à un moment donné.

Il apparaît donc crucial de quantifier, d'une manière ou d'une autre, l'instabilité génomique du matériel source ou des intermédiaires cellulaires puisque les cellules nucléées trouveront inévitablement leur chemin dans le produit final.

Des travaux récents ont montré que les cellules acquièrent des mutations directement par adaptation au processus de culture tissulaire puisqu'il n'y a pas de mécanisme extrinsèque aux cellules (e.g. un système immu-

nitaires) pour éliminer les cellules qui pourraient avoir le potentiel de devenir dangereuses. En effet, il a été montré qu'entre 12,5 % et 34 % de toutes les lignées de cellules souches pluripotentes humaines acquéraient des anomalies chromosomiques non-aléatoires spécifiques au cours du temps (en particulier dans la structure et le nombre des chromosomes 1, 12, 17 et 20) rappelant les changements également observés dans les cancers [13]. En outre, les cellules immortalisées ont eu leurs mécanismes intrinsèques de contrôle de dommages de l'ADN supprimés. Des études sur d'autres types cellulaires, manipulés pour surexprimer *c-Myc*, semblent montrer que cela pourrait conduire directement à la formation de tumeurs *in vivo* [14,15], montrant ainsi l'importance d'être vigilant sur ce point dans nos banques de cellules si nous voulons utiliser les cellules immortalisées comme sources de cellules.

Il existe différentes approches de l'analyse de l'intégrité génomique des produits cellulaires présentant chacune des avantages et des inconvénients en terme de faisabilité, de sensibilité et d'interprétation des résultats. Certaines méthodes comme le caryotypage sont couramment utilisées dans la pratique clinique mais peuvent présenter des résultats de « basse définition ». À l'inverse, le séquençage du génome entier fournirait une image complète du génome de la culture cellulaire en question mais reste plus coûteux par rapport aux autres tests et requiert des analyses spécialisées. Les diverses méthodes d'évaluation des cultures ont été examinées dans l'article suivant [16]. Au final, la question de savoir quelles sont les anomalies génomiques « acceptables » (i.e. « sûres » pour une application clinique) reste sans réponse.

Il n'en reste pas moins que la transparence sur l'intégrité génomique des lignées cellulaires utilisées pour produire des plaquettes doit être la norme, même lorsqu'il s'agit de décrire les méthodes qui ne sont pas encore sorties des laboratoires académiques puisque les méthodes de culture elles-mêmes peuvent avoir une influence sur le « profil génomique » de la culture et donc la sécurité future des produits de grade clinique.

Mesure de la différenciation des produits cellulaires

Les cellules souches pluripotentes ont la capacité de se greffer et de former des tératomes. En fait, cette capacité est toujours utilisée comme l'une des mesures de la pluripotence. De plus, il est possible que des progéniteurs intermédiaires de mégacaryocytes aient également la capacité de se greffer et de proliférer après transfusion.

Une mesure clé de la sécurité du produit final est donc l'évaluation du degré de différenciation et de maturité des mégacaryocytes à partir desquels les plaquettes sont générées et de la pureté de la culture, y compris l'identification et la quantification des précurseurs prolifératifs partiellement différenciés.

La plupart des laboratoires utilisent l'expression de marqueurs de surface des principaux récepteurs plaquettaire pour évaluer la différenciation des mégacaryocytes, comme CD41 (ITGA2B) et CD61 (ITGB3). Tous deux forment ensemble l'intégrine hétérodimérique $\alpha 2b \beta 3$, le récepteur du fibrinogène, et sont exprimés au début de

la différenciation. Divers membres du complexe GPIbVIX, récepteur du facteur von Willebrand (CD42a = glycoprotéine IX, CD42b = glycoprotéine Ib, CD42d = glycoprotéine V) sont souvent utilisés comme marqueurs de maturité des mégacaryocytes puisqu'ils sont exprimés tardivement au cours de la différenciation. Cependant, la mesure de la présence des précurseurs restants dans la culture est beaucoup moins bien établie. Ils peuvent être identifiés fonctionnellement en utilisant des tests de formation de colonies qui sont longs et laborieux et donc peu adaptés au suivi de la culture. La cytométrie en flux serait le choix par défaut mais la définition du marqueur de surface identifiant clairement les progéniteurs en culture est actuellement inconnue.

Mesure de la contamination des cellules nucléées

Idéalement, aucune cellule nucléée ne devrait être présente dans le produit plaquettaire final, éliminant ainsi toutes les préoccupations d'ordre tumorigène. En réalité, il sera impossible d'y parvenir complètement en raison du très grand nombre de plaquettes, et donc de mégacaryocytes, en imaginant que l'on pourrait avoir 1 mégacaryocyte/1 million de plaquettes dans le produit final (voir Fig. 2). Globalement, deux méthodes différentes ont été utilisées pour séparer les plaquettes des mégacaryocytes. Pour les méthodes où les plaquettes sont relarguées dans le milieu de culture, les étapes suivantes impliquent la filtration et la centrifugation pour séparer les plaquettes des mégacaryocytes basées sur la différence de taille des cellules [8]. D'autres méthodes impliquent la génération de plaquettes à l'aide de dispositifs où les mégacaryocytes sont « piégés » dans des bioréacteurs dédiés [7,17] ou à l'intérieur d'éponges tridimensionnelles [18,19] et les plaquettes récoltées dans le milieu effluent passant à travers le système.

Quelle que soit la méthodologie utilisée pour générer des plaquettes à partir de mégacaryocytes, la contamination du concentré plaquettaire final par des cellules nucléées devrait être systématiquement divulguée, non seulement parce que cela constituerait clairement un élément essentiel de la mesure de la sécurité du produit, mais aussi parce que cela permettrait de comparer les différentes méthodes utilisées pour libérer et séparer les plaquettes des mégacaryocytes.

En conclusion, avec l'émergence des thérapies cellulaires, un consensus autour des questions de sécurité et des tests qui pourraient être nécessaires a commencé à émerger [20]. Nous préconisons que ces orientations soient appliquées à la production de plaquettes *in vitro*. Par conséquent, tout document relatif à ce domaine, qu'il s'agisse d'un manuscrit original universitaire ou d'une demande de financement ou d'approbation réglementaire, doit clairement chercher à aborder ces questions et présenter des données à l'appui. Nous proposons trois étapes pour contrôler la qualité du produit cellulaire nucléé qui précède la production de plaquettes. Celles-ci devraient inclure :

- un effort pour documenter l'intégrité du génome des cellules souches/lignées cellulaires immortalisées à partir desquelles les mégacaryocytes sont cultivés ;

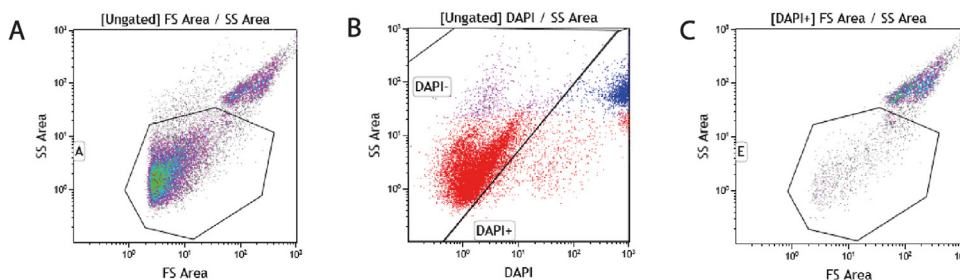


Fig. 2 Taille des plaquettes. Les plaquettes sont normalement définies en utilisant (i) FS/SS ; cependant, lorsqu'elles sont colorées avec (ii) le DAPI et (iii) back-gated au FS/SS, nous pouvons voir que les cellules nucléées contaminent toujours la « gate » des plaquettes.

- la documentation du niveau de différenciation atteint et enfin ;
- dans le produit final, une mesure du nombre de cellules nucléées qui restent après la libération des plaquettes.

Évaluation de la puissance

Définition et comptage des plaquettes

La question de la « puissance » du produit final n'est pas triviale. Pour commencer, le simple fait de compter le nombre de plaquettes produites exige de la rigueur et, surtout, un consensus entre les laboratoires. La plupart des groupes utilisent la cytométrie en flux et des billes de comptage pour compter les plaquettes, en utilisant généralement la prodiffusion (FCS, forward scatter) et la diffusion latérale (SSC, sideways scatter) pour identifier les événements de bonne taille par rapport aux plaquettes du sang périphérique, avec l'ajout de marqueurs de surface cellulaire (tels que CD41 ou CD61), parfois complétés par l'utilisation d'autres récepteurs de surface (CD42). Cependant, en raison de leur taille (<5 microns), les plaquettes peuvent avoir une taille similaire à celle des débris cellulaires. Ces débris cellulaires peuvent également se lier de manière non spécifique à des anticorps, ce qui surestime le nombre de plaquettes produites. Certains groupes, dont le nôtre, ont donc utilisé en plus des colorants de viabilité métabolique tels que la calcéine-AM, pour prouver d'une part que nous avons des cellules intactes, pas seulement des débris, et d'autre part qu'elles sont vivantes (métaboliquement actives). Cela signifie que nous réduisons de 40 à 60 % le nombre d'événements décrits comme « plaquettes » (événements CD41+ versus CD42/CD42/Calcéine+, Fig. 3).

Nous avons également montré que la fonctionnalité d'une suspension de plaquettes dérivée in vitro était limitée à celles qui répondaient aux quatre critères décrits ci-dessus : FCS et SSC conformes aux plaquettes, expression des CD41 et CD42 et rétention de la calcéine-AM (colorant de viabilité). L'absence de définition communément acceptée de « ce qu'est une plaquette » lorsqu'on examine les données de cytométrie en flux sur les cultures cellulaires (et comment les distinguer des débris, des plaquettes mortes, des blebs intacts de mégacaryocytes, etc.) a constitué un obstacle nous empêchant de comparer véritablement le nombre de plaquettes produites par les différentes technologies publiées à ce jour. À cette fin, l'OMS a récemment convenu

qu'une norme de cytométrie en flux évaluant la préparation des plaquettes devrait être développée. L'objectif est de fournir une préparation lyophilisée qui, une fois reconstituée, permettra à tous les utilisateurs d'évaluer leur protocole de cytométrie en flux et de permettre ainsi une comparaison efficace entre les laboratoires. Il est essentiel que cette norme permette l'étalonnage de l'instrument et la comparaison des échantillons à l'aide des quatre marqueurs proposés décrits ci-dessus.

Mesure de la fonction plaquettaire

Dans le monde de la médecine transfusionnelle, la seule mesure de la qualité des plaquettes requise dans une unité donnée est la mesure du pH [21]. En revanche, lors de l'évaluation de la fonction plaquettaire à des fins de diagnostic chez les patients ou dans le domaine de la recherche sur les plaquettes, on nous offre le choix entre une pléthore de tests. Certains de ces tests n'interrogent que des fonctions plaquettaires très spécifiques telles que l'agrégation (agrégométrie optique, LTA) [16], l'adhésion [22], les activités procoagulantes (génération de thrombine) tandis que d'autres examinent des fonctions plus complexes telles que la formation de thrombus (PFA-100) ou la formation/rétraction de caillots (thromboélastographie) [21].

Malheureusement, l'application des tests ci-dessus aux plaquettes produites in vitro nécessite un grand nombre de plaquettes qui est impossible à obtenir dans les systèmes actuels de culture in vitro de plaquettes à petite échelle. Par conséquent, la plupart des articles publiés jusqu'à présent se sont limités à rechercher des alternatives à faible volume, à savoir des essais basés sur la cytométrie en flux. Les tests les plus couramment utilisés analysent deux événements d'activation différents : premièrement, l'activation de CD41/CD61 à l'aide d'un anticorps anti-fibrinogène ou d'un anticorps contre la forme activée du récepteur (e.g. PAC-1) [23], deuxièmement, la preuve de la dégranulation (généralement l'exposition à la sélectine P) (Fig. 4). Toutefois, les résultats publiés sont souvent difficiles à interpréter pour plusieurs raisons. Premièrement, les échantillons colorés avec des anticorps isotopes pour évaluer si les résultats en absence d'agonistes sont vraiment négatifs ne sont pas tracés. Deuxièmement, il n'y a pas de comparaison avec les plaquettes de donneurs, de sorte que l'amplitude de la réponse n'est pas évaluée par rapport à la référence absolue. Enfin, l'absence d'un véritable

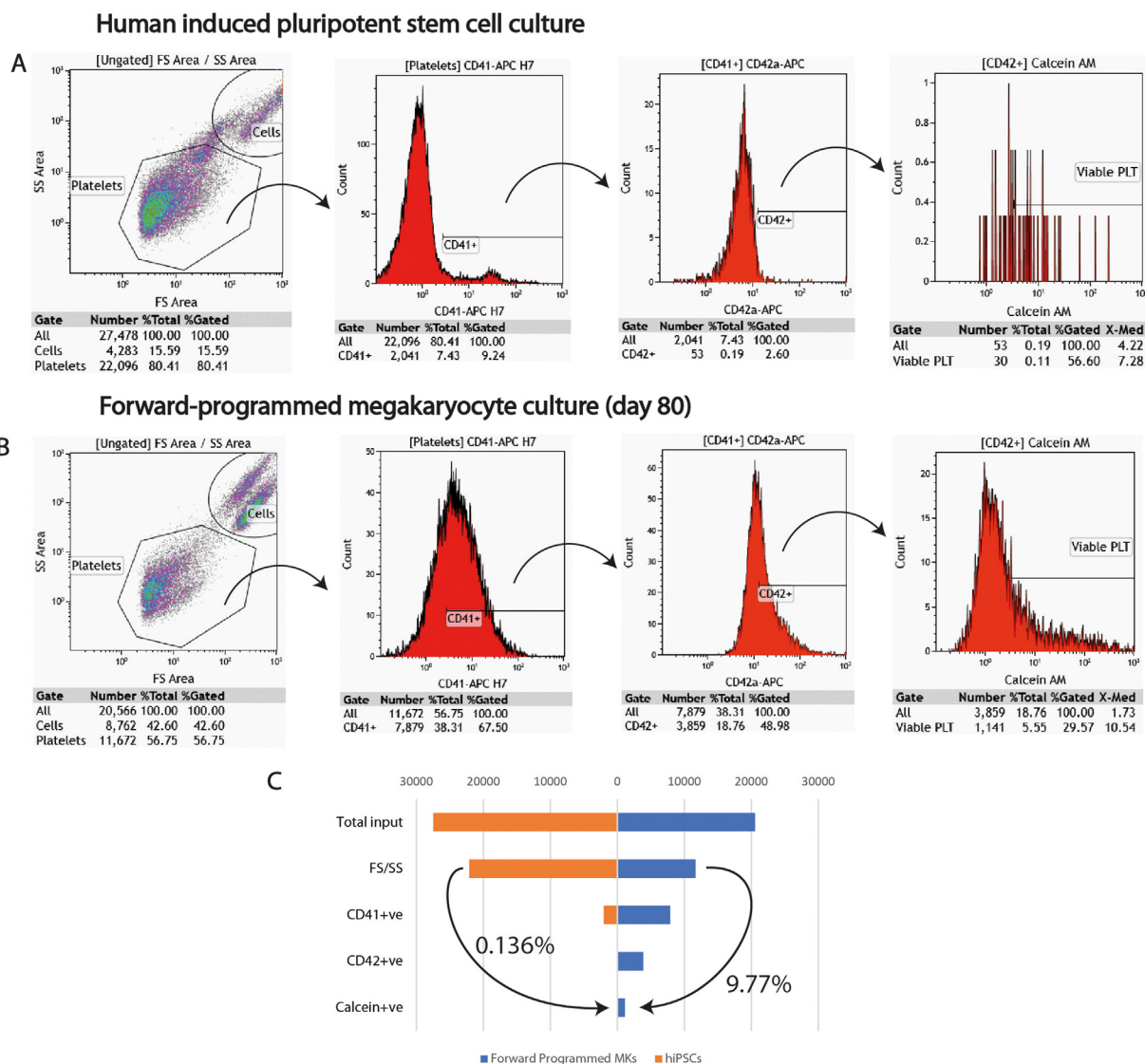


Fig. 3 Viabilité métabolique des plaquettes. Le FS/SS ne suffit pas de fixer la « gate » des plaquettes par cytométrie. Nous constatons qu'une lignée cellulaire non productrice de plaquettes (hiPSC) forme également des débris d'une taille similaire à celle des plaquettes, mais en appliquant un « gating » de CD41, CD42 et Calcéine-AM, cela tombe presque à 0 (i). Parallèlement à cela, une culture de megakaryocytes reprogrammés donne des particules qui sont positives pour les CD41 et CD42 et sont également métaboliquement viables comme mesuré par la calcéine (ii). Cette série de « gating » est résumée dans un graphique en entonnoir (iii). Notez que 9,77 % du matériel de la taille d'une plaquette dans cette culture de mégacaryocytes répond à nos critères – ce qui implique que 90,33 % des particules de taille similaire sont présentes dans la culture et ne répondent pas à ces critères.

contrôle négatif, par exemple l'utilisation de l'EDTA pour dissocier le complexe d'intégrines CD41/CD61 dans les tests d'activation CD41/CD61 ne permet pas de comprendre dans quelle mesure le récepteur est déjà activé dans les échantillons de base. Nous pensons qu'en l'absence d'une stratégie pour bien cibler la « véritable population de plaquettes », comme décrit ci-dessus, l'interprétation et la comparaison des résultats de ces tests basés sur la cytométrie en flux peuvent être difficiles.

D'autres tests à faible volume ont vu le jour, comme l'utilisation de microchambre recherchant la formation de thrombus sous flux [24], ou les micropuces contenant des piliers en PDMS (« nanopostes ») pour vérifier la rétraction des plaquettes après l'adhésion [25]. Le test de la

microchambre est basé sur le revêtement d'une chambre d'écoulement avec un substrat favorisant la formation de thrombus plaquettaires (souvent du collagène fibrillaire) dans lequel du sang complet anticoagulé est envoyé à un taux de cisaillement choisi. Les plaquettes dérivées in vitro (ou provenant de donneurs) peuvent être marquées et leur incorporation dans les thrombus enregistrée et quantifiée. La technologie des nanopostes consiste à faire adhérer des plaquettes en haut de « nano-piliers » et, après l'activation des plaquettes, d'enregistrer la façon dont ces piliers sont « tirés » par les plaquettes à l'aide d'un microscope confocal. Ces tests sont relativement nouveaux, c'est pourquoi leur valeur quantitative pour l'évaluation de la fonctionnalité des plaquettes n'a pas été testée de manière rigoureuse

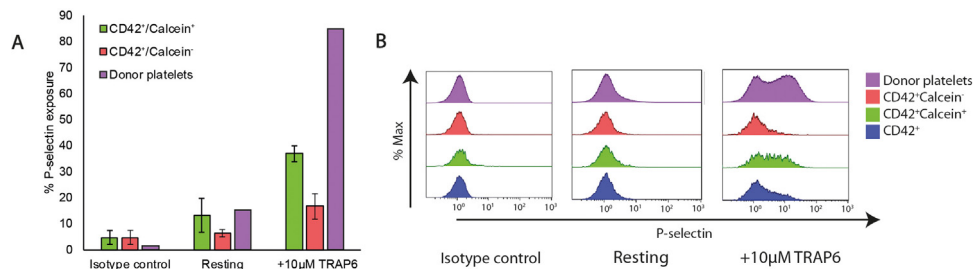


Fig. 4 Fonctionnalité. La nécessité de prouver la viabilité métabolique devient évidente lorsque nous mesurons la fonction de ces particules semblables à des plaquettes (PLP). De toutes les particules CD42 +ve, les particules calcéine +ve sont beaucoup plus susceptibles de répondre aux agonistes et de dégranuler, en exposant la P-sélectine, comparé à la population Calcéine-ve (i). Histogrammes de cytométrie en flux représentatifs montrant que la population de particules CD42 +ve et Calcéine +ve est capable de dégranuler beaucoup plus efficacement que la population CD42+ Calcéine– ou la population CD42+ non sélectionnée pour la Calcéine (ii).

et indépendante, mais ils constituent un complément prometteur aux tests plus traditionnels.

Des modèles in vivo de souris ou de lapin sont également utilisés pour quantifier la qualité des plaquettes en étudiant soit la récupération/survie en circulation, soit l'effet hémostatique. En raison des barrières xénogéniques, les plaquettes ont une durée de vie très courte dans la circulation, même lorsque l'on utilise des animaux immunodéprimés comme les souris NSG [26]. En effet, certains auteurs ont utilisé des liposomes de clodronate pour supprimer les macrophages chez ces animaux afin de prolonger d'avantage la présence des plaquettes en circulation [27]. La manière dont nous interprétons les résultats de la transfusion dans un modèle si artificiel et, en particulier, dont nous tirons des conclusions qui indiquent ce qui se passera après la transfusion chez l'homme est totalement inconnue à ce stade. La mesure de l'activité hémostatique s'est généralement limitée à l'enregistrement de l'accumulation de plaquettes (généralement par marquage fluorescent et microscopie in vivo) au site de la lésion des vaisseaux sanguins [28] mais, jusqu'à présent, un seul groupe a produit des plaquettes en quantités suffisamment importantes pour véritablement évaluer le pouvoir hémostatique des plaquettes dérivées in vitro dans le contexte d'une hémorragie dans un modèle animal thrombocytopénique⁸.

Conclusions finales

Dans ce papier, nous avons essayé de donner une vue d'ensemble et une opinion juste des problèmes auxquels nous sommes confrontés lors de l'évaluation du contrôle de la qualité des plaquettes dérivées in vitro. Tout d'abord, nous nous sommes concentrés sur la source de cellules (lignées de cellules souches) et les produits nucléés intermédiaires (mégacaryocytes) et sur la manière dont nous devrions examiner les problèmes de sécurité qu'ils peuvent poser. Ensuite, nous avons examiné le défi à relever pour évaluer la puissance du produit, à savoir comment nous comptons les plaquettes dans le produit final et comment nous mesurons leur fonctionnalité. Le fait que nous devions maintenant nous poser ces questions alors que nous approchons des études sur l'homme est un signe du chemin parcouru dans ce domaine. Mais cela signifie également que la réponse à ces questions est devenue encore plus

urgente. Il appartient aux chercheurs eux-mêmes, aux examinateurs (et aux éditeurs) de manuscrits ou de demandes de financement ainsi qu'aux organismes de réglementation d'avoir l'intégrité nécessaire pour poser les questions difficiles et demander une normalisation dans ce domaine. Nous le devons aux volontaires et aux patients qui pourraient un jour être transfusés avec ces nouveaux produits cellulaires.

Déclaration de liens d'intérêts

Les auteurs déclarent ne pas avoir de liens d'intérêts.

Bouet a été financée par le National Institute for Health Research, UK ; Ghevaert et Foster par le National Health Service Blood and Transplant, UK ; Mookerjee par le Wellcome Trust. Les données ont été générées et analysées en utilisant les financements provenant des financeurs mentionnés précédemment et ont été incorporées dans cet article.

Références

- [1] Cowan K. Strategies to reduce inappropriate use of platelet transfusions. *Nursing Times* 2017;113:18–21.
- [2] American Red Cross. One-two punch of winter storms canceled blood drives straining Red Cross blood supply; 2019 [https://www.redcrossblood.org/local-homepage/news/article/one-two-punch-of-winter-storms-canceled-blood-drives-straining-.html. Accessed: 4th February 2020].
- [3] Smethurst PA. Aging of platelets stored for transfusion. *Platelets* 2016;27:526–34.
- [4] García-Roa M, et al. Red blood cell storage time & transfusion: current practice, concerns & future perspectives. *Blood Transfus* 2017;15:222–31.
- [5] Nakamura S, et al. Expandable megakaryocyte cell lines enable clinically applicable generation of platelets from human induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* 2014;14:535–48.
- [6] Moreau T, et al. Large-scale production of megakaryocytes from human pluripotent stem cells by chemically defined forward programming. *Nat Commun* 2016;7:11208.
- [7] Thon JN, et al. Platelet bioreactor-on-a-chip. *Blood* 2014;124:1857–67.
- [8] Ito Y, et al. Turbulence activates platelet biogenesis to enable clinical scale ex vivo production. *Cell* 2018;174:636–48 [e18].

- [9] Tozzi L, et al. Multi-channel silk sponge mimicking bone marrow vascular niche for platelet production. *Biomaterials* 2018;178:122–33.
- [10] Merkle FT, et al. Human pluripotent stem cells recurrently acquire and expand dominant negative P53 mutations. *Nature* 2017;545:229–33.
- [11] Baker D, et al. Detecting genetic mosaicism in cultures of human pluripotent stem cells. *Stem Cell Rep* 2016;7:998–1012.
- [12] Zhang J, et al. Anti-apoptotic mutations desensitize human pluripotent stem cells to mitotic stress and enable aneuploid cell survival. *Stem Cell Rep* 2019;12:557–71.
- [13] Na J, Baker D, Zhang J, Andrews PW, Barbaric I. Aneuploidy in pluripotent stem cells and implications for cancerous transformation. *Protein Cell* 2014;5:569–79.
- [14] Merve A, et al. c-MYC overexpression induces choroid plexus papillomas through a T-cell mediated inflammatory mechanism. *Acta Neuropathol Commun* 2019;7:2.
- [15] Soucek L, Evan GI. The ups and downs of Myc biology. *Curr Opin Gen Develop* 2010;20:91–5.
- [16] Allison TF, Andrews PW, Avior Y, Barbaric I, Yamanaka S. Assessment of established techniques to determine developmental and malignant potential of human pluripotent stem cells. *Nat Commun* 2018;9:1925.
- [17] Blin A, et al. Microfluidic model of the platelet-generating organ: beyond bone marrow biomimetics. *Sci Rep* 2016;6.
- [18] Pallotta I, Lovett M, Kaplan DL, Balduini A. Three-dimensional system for the in vitro study of megakaryocytes and functional platelet production using silk-based vascular tubes. *Tissue Eng Part C Meth* 2011;17:1223–32.
- [19] Shepherd JH, et al. Structurally graduated collagen scaffolds applied to the ex vivo generation of platelets from human pluripotent stem cell-derived megakaryocytes: enhancing production and purity. *Biomaterials* 2018;182:135–44.
- [20] Stacey GN, et al. Stem cell culture conditions and stability: a joint workshop of the PluriMes Consortium and Pluripotent Stem Cell Platform. *Regen Med* 2019;14:243–55.
- [21] Cardigan R, Turner C, Harrison P. Current methods of assessing platelet function: relevance to transfusion medicine. *Vox Sanguinis* 2005;88:153–63.
- [22] Finkenstaedt-Quinn SA, Ge S, Haynes CL. Cytoskeleton dynamics in drug-treated platelets. *Anal Bioanal Chem* 2015;407:2803–9.
- [23] Abrams CS, Ellison N, Budzynski AZ, Shattil SJ. Direct detection of activated platelets and platelet-derived microparticles in humans. *Blood Am Soc Hematol* 1987:70.
- [24] Roest M, Reininger A, Zwaginga JJ, King MR, Heemskerk JWM. Flow chamber-based assays to measure thrombus formation in vitro: requirements for standardization. *J Thromb Haemost* 2011;9:2322–4.
- [25] Feghhi S, et al. Glycoprotein Ib-IX-V complex transmits cytoskeletal forces that enhance platelet adhesion. *Biophys J* 2016;111:601–8.
- [26] Newman PJ, Aster R, Boylan B. Human platelets circulating in mice: applications for interrogating platelet function and survival, the efficacy of antiplatelet therapeutics, and the molecular basis of platelet immunological disorders. *J Thromb Haemost* 2007;5:305–9.
- [27] Hu Z, Yang YG. Full reconstitution of human platelets in humanized mice after macrophage depletion. *Blood* 2012;120:1713–6.
- [28] Rosen ED, et al. Laser-induced noninvasive vascular injury models in mice generate platelet- and coagulation-dependent thrombi. *Am J Pathol* 2001;158:1613–22.