



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

Plaquettes sanguines de culture : état de l'art[☆]



Cultured platelets

C. Strassel*, F. Lanza, C. Gachet

Inserm, EFS Grand Est, BPPS UMR-S 949, FMTS, université de Strasbourg, 67000 Strasbourg, France

Reçu le 20 mai 2020 ; accepté le 3 octobre 2020

Disponible sur Internet le 14 octobre 2020

MOTS CLÉS

Plaquettes sanguines ;
Plaquettes de culture ;
Bioproduction ;
Progrès récents ;
Transfusion

Résumé Les plaquettes sanguines sont des éléments anucléés du sang. D'un diamètre de 2 à 3 μm , ce sont les plus petits éléments figurés du sang. Alors que leur rôle principal est d'arrêter ou prévenir les saignements, elles sont également impliquées dans d'autres fonctions, comme l'immunité, l'inflammation ou la progression tumorale. L'essor des biotechnologies et les connaissances acquises sur les mécanismes qui régulent la biogénèse des plaquettes permettent aujourd'hui d'envisager la production de plaquettes de culture. Dès lors, ce type de produit pourrait avoir sa place pour relever un certain nombre de défis transfusionnels comme l'allo-immunisation ou les états réfractaires. Cependant les rendements de culture restent faibles et de nombreux obstacles doivent encore être franchis avant d'envisager une application en transfusion. Cet article recense les arguments qui motivent la production de plaquettes de culture à visée transfusionnelle et récapitule les principales avancées dans le domaine tout en soulignant ses limites.

© 2020 l'Académie nationale de médecine. Publié par Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

KEYWORDS

Blood platelets;
Cultured platelets;
Biomufacturing;
Recent advances;
Transfusion

Summary Blood platelets are anucleated elements of the blood. With a diameter of 2 to 3 μm , they are the smallest elements of blood. While their main role is to stop or prevent bleeding, they are also involved in other functions, such as immunity, inflammation or tumour progression. The development of biotechnology and the knowledge acquired about the mechanisms regulating the biogenesis of platelets makes the production of cultured platelets a viable option today. Consequently, this type of product could have its place in meeting a number of transfusion challenges such as alloimmunization or refractory states. However, culture yields remain

[☆] 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 : catherine.strassel@efs.sante.fr (C. Strassel).

low and many hurdles still need to be overcome before considering an application in transfusion. This article reviews the rationale for the production of cultured platelets for transfusion and summarizes the main advances in the field while highlighting its limitations.

© 2020 l'Académie nationale de médecine. Published by Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

Les cellules souches pluriipotentes

Alors que la transfusion sanguine fait partie de la pratique clinique de routine depuis les années 1950, l'accroissement et le vieillissement de la population mondiale conduiront, dans les prochaines décennies, à une augmentation de l'incidence des pathologies nécessitant un support transfusionnel. Ce constat, allié à l'essor des biotechnologies et des connaissances en matière d'hématopoïèse, amènent à envisager la production *in vitro* de cellules sanguines matures à visée transfusionnelle. Un premier pas en ce sens a été franchi avec la génération de globules rouges de culture où toutes les étapes de recherche ont été réalisées avec succès, y compris la démonstration de la faisabilité de l'administration à l'homme [1–4].

Cent millions de dons de sang sont collectés chaque année à travers le monde, représentant une source de préoccupations quotidiennes pour maintenir un approvisionnement suffisant en plaquettes, la sécurité transfusionnelle ainsi que la prévention de la transmission de maladies infectieuses. C'est sur la base de ces trois menaces principales :

- le risque de pénurie;
- le risque de transmission d'agents infectieux par voie transfusionnelle et;
- le risque immunologique, que se fonde le développement de techniques de production de plaquettes sanguines en laboratoire.

La menace de pénurie

Le maintien de stocks appropriés de concentrés plaquettaires devient une préoccupation majeure dans de nombreux pays. Ceci est lié au nombre toujours croissant de patients souffrant de thrombocytopénies graves et de longue durée causées par une insuffisance médullaire, un traitement anticancéreux, ou une greffe de moelle osseuse [5]. De plus, la durée de vie limitée de 8 à 10 jours des plaquettes humaines impose des transfusions régulières de concentrés plaquettaires.

Il est à noter qu'aux États-Unis, la transfusion de plaquettes a augmenté de 7,3 % entre 2008 et 2011. Les projections sur la prochaine décennie suggèrent que le besoin devrait continuer de croître à un rythme de 5,3 % par an justifiant pour de nombreux chercheurs le développement de la production de plaquettes *in vitro* [6]. Ces chiffres prospectifs ne sont pas pour autant la seule motivation pour développer la production de plaquettes de culture, car ils ne s'appliquent pas de la même façon à tous les pays. En France, par exemple, la transfusion plaquettaire

n'a augmenté que de 0,5 % de 2012 à 2016 et est restée stable depuis, principalement en raison de nouvelles recommandations permettant une réduction du nombre de plaquettes transfusées par unité de poids corporel [7]. L'évolution à long terme mérite cependant d'être surveillée et les besoins, anticipés par les chercheurs. À cela peuvent s'ajouter des tensions logistiques importantes en cas de diminution importante du don de sang (épidémie, congés, jours fériés, conditions climatiques difficiles) qui là encore justifient la production de plaquettes *in vitro* pour maintenir des stocks de concentrés plaquettaires à un niveau optimal.

Le risque de contamination

Bien que la transfusion de plaquettes soit de pratique courante depuis une cinquantaine d'années [8] elle n'est toutefois pas exempte de risques. Plus que la contamination virale, qui est la même que celle décrite pour les culots de globules rouges, la contamination bactérienne reste une préoccupation quotidienne pour les centres de transfusions du fait de leur conservation à température ambiante pouvant conduire à des incidents transfusionnels potentiellement graves [9]. Des efforts importants ont été réalisés permettant la sensibilisation des différents acteurs conduisant à une sélection rigoureuse des donneurs et à une désinfection systématique de la peau. À cela s'ajoute la mise en place en France depuis 2017 de techniques de détection bactérienne ou bien d'inactivation des pathogènes dans les concentrés de plaquettes qui permettent d'élever la sécurité transfusionnelle à des niveaux jamais atteints. [10].

Les risques biologiques et de contamination des produits sanguins ne peuvent malgré tout pas être totalement éliminés. S'ajoutent à ces risques la capacité des plaquettes elles-mêmes à capturer et véhiculer des pathogènes [11]. Pour contourner ces risques et atteindre des conditions de sécurité absolue, les plaquettes cultivées seraient une alternative intéressante.

Le risque immunologique

La transfusion de plaquettes est également associée à une complication importante, l'état réfractaire lié à l'allo-immunisation anti-HLA et anti-HPA. Dans ce cas la transfusion régulière de plaquettes ne permet plus d'augmenter la numération plaquettaire du patient thrombopénique, car son système immunitaire les détruit rapidement, notamment immédiatement dans le système réticuloendothélial de la rate. Ces patients développent des anticorps anti-HLA ou anti-HPA, après une transfusion sanguine, une transplantation d'organes ou une grossesse

[12]. La sélection de plaquettes HLA/HPA compatibles ou de donneurs négatifs au test de compatibilité croisée pourrait résoudre ces problèmes mais pose des problèmes d'approvisionnement [13]. En plus de l'allo-immunisation, l'incompatibilité ABO peut entraîner une efficacité transfusionnelle réduite [14]. Dans ces cas rares, mais aux enjeux transfusionnels importants, la génération de plaquettes de culture universelles pourrait être envisagée puisque les techniques actuelles pourraient permettre de générer des plaquettes HLA négatives et exprimant de préférence l'antigène O [15].

Même si la transfusion de plaquettes est aujourd'hui autosuffisante et sécurisée au maximum, la précaution impose d'anticiper et d'axer la recherche sur la production efficace de plaquettes de culture. La disponibilité de telles plaquettes, exemptes de risques infectieux, inflammatoires et immunitaires, constituerait un réel progrès pour les patients nécessitant des transfusions fréquentes ou manquant de donneurs compatibles.

Les plaquettes de culture, un défi technologique

Malgré les progrès réalisés, la culture de plaquettes à échelle transfusionnelle représente un défi. Produites à partir de progéniteurs hématopoïétiques, elles doivent être générées à raison de $2-5,10^{11}$ plaquettes par unité pour satisfaire aux besoins transfusionnels, tout en conservant la qualité et la fonctionnalité de plaquettes natives. Pour cela les conditions établies *in vitro* doivent reproduire le plus fidèlement possible celles rencontrées *in vivo* dans la moelle osseuse où un mégacaryocyte (MK) produit de 2000 à 3000 plaquettes. Malheureusement, et malgré une meilleure connaissance des mécanismes qui contrôlent la production de plaquettes et le développement de bioréacteurs, les rendements actuels restent limités à 100 à 250 plaquettes/MK [16,17]. Il est donc nécessaire d'augmenter les rendements d'un facteur de 20 environ pour espérer faire des plaquettes de culture un produit industrialisable, qui associe les bonnes pratiques de fabrication et un coût raisonnable. Ceci ne peut se faire qu'en renforçant les connaissances sur les mécanismes qui gouvernent la production de plaquettes.

Les voies d'amélioration:

- atteindre une efficacité suffisante d'amplification des progéniteurs mégacaryocytaires;
- obtenir un niveau de maturation des MK proche de ceux rencontrés dans la moelle osseuse;
- libérer plus efficacement les plaquettes à partir des MK matures;
- démontrer les propriétés et qualités hémostatiques des plaquettes après transfusion;
- atteindre une production à l'échelle industrielle.

Prérequis à la transfusion de plaquettes de culture

La biogenèse des plaquettes

Les plaquettes sanguines sont de petites cellules anucléées (2 à 4 μm de diamètre) issues de la fragmentation cytoplasmique de leur précurseur, le mégacaryocyte (MK) [18]. Les cellules souches hématopoïétiques (CSH) à l'origine de ce

processus donnent naissance aux MK immatures [19] qui vont alors subir plusieurs étapes de maturation, l'augmentation de leur matériel nucléaire (jusqu'à 64N) par endomitose et le développement d'un réseau membranaire intracellulaire, le système de membranes de démarcation (DMS), qui constitue le réservoir de membranes des futures plaquettes [20–22]. Les MK devenus matures se retrouvent associés à l'endothélium sinusoïdal où ils vont pouvoir émettre de longues protrusions cytoplasmiques, appelées proplaquettes, dans la lumière du vaisseau. Ces protrusions seront arrachées sous l'effet des forces de cisaillement permettant ensuite la libération des futures plaquettes lors du passage dans la microcirculation [23,24]. L'ensemble du processus est sous le contrôle de multiples facteurs parmi lesquels de nombreuses cytokines, différents composants de la matrice extracellulaire, l'environnement cellulaire médullaire, la rigidité de la matrice et les forces hémodynamiques [25] (Fig. 1).

Améliorer l'efficacité d'amplification des progéniteurs mégacaryocytaires.

Le choix des cellules souches ou des progéniteurs hématopoïétiques est d'une importance capitale car il va conditionner les capacités d'expansion et donc les stratégies de culture. Deux sources sont principalement utilisées:

- les cellules souches pluripotentes, comprenant les cellules souches embryonnaires humaines (hESC) et les cellules souches pluripotentes induites (iPSC) et;
- les progéniteurs hématopoïétiques dérivés de la moelle osseuse (MO), du sang ombilical et du sang périphérique, identifiables par la présence du marqueur de surface CD34.

Chacune présente des avantages et des inconvénients à prendre en compte pour le développement d'un produit transfusionnel.

Cellules souches pluripotentes

Les hESC et les iPSC possèdent comme avantage d'être auto-renouvelables. Les iPSC offrent en supplément d'éviter les préoccupations éthiques soulevées par les hESC et leur utilisation est actuellement privilégiée [26–28]. Des progrès significatifs ont été réalisés dans l'ingénierie des iPSC pour produire des plaquettes. Le développement le plus prometteur en vue d'une application transfusionnelle a sans doute été la génération de lignées immortalisées de MK à partir de ces cellules [27]. Une première lignée a été obtenue par introduction séquentielle de facteurs de transcription importants de la mégacaryopoïèse (c-MYC, BMI1 et BCL-XL) [29]. Une seconde lignée a été développée en surexprimant d'autres facteurs de transcription impliqués dans la maturation des MK (GATA-1, FLI1 et TAL1) [30]. Ces deux lignées tolèrent la cryoconservation et peuvent être par conséquent cultivées à la demande. De plus elles produiraient des plaquettes avec une plus grande efficacité et dans des délais plus courts que des MK directement dérivés des iPSC. Pour prévenir voire pour contourner les états réfractaires, un développement intéressant a été la génération de MKs dérivés

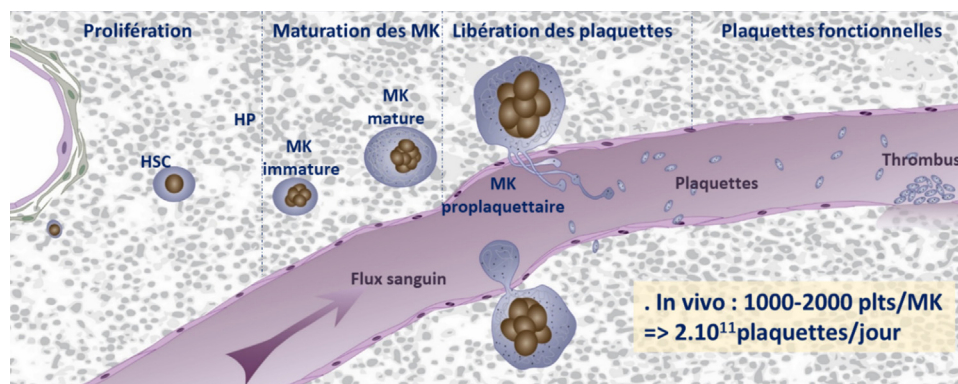


Figure 1 Visualisation des différentes étapes de la biogénèse des plaquettes. La cellule souche au contact de facteurs intrinsèques et extrinsèques du microenvironnement médullaire de la moelle osseuse va pouvoir proliférer et s'engager irrémédiablement dans le lignage mégacaryocytaire. Le mégacaryocyte alors immature va subir deux grandes étapes de maturation, le développement de son cytoplasme et la ploïdisation de son noyau. Devenu mature, au contact des vaisseaux sinusoides il va émettre de longues extensions cytoplasmiques, les proplaquettes, ou d'épaisses protrusions cytoplasmiques dans la lumière du vaisseau qui s'arracheront sous l'effet du flux sanguin et enfin se remodeleront pour former les futures plaquettes.

d'iPSC déficientes en HLA de classe I qui permettraient la génération de plaquettes dites « universelles » [31–33].

Malgré les avantages évoqués ci-dessus, de possibles problèmes sont à considérer dans l'utilisation d'iPSC modifiées génétiquement. Un risque éventuel est le potentiel tumorigène de ces cellules puisque la présence de matériel nucléaire résiduel ne peut pas être absolument exclue. Par ailleurs, le rendement en plaquettes reste très faible avec cette source de cellules avec moins de 50 plaquettes/MK, sans doute en raison d'une immaturité des MK illustrée par une faible ploïdie et un DMS peu développé [27,29,30,34].

Les progéniteurs hématopoïétiques

Les progéniteurs hématopoïétiques, isolés sur leur positivité pour la sialomucine CD34, sont comparativement plus faciles à obtenir et cultiver que les hESC et iPSC. Ils peuvent provenir de sang de cordon ombilical, de moelle osseuse ou de sang périphérique et leur récolte est raisonnablement aisée, sans problème éthique et pour un coût modéré [35]. De plus, les rendements en plaquettes à partir de progéniteurs CD34+ sont plus élevés, habituellement entre 100 et 150 plaquettes/MK, avec des propriétés morphologiques et fonctionnelles proches des plaquettes natives [36–38].

Jusqu'ici, la principale limite à l'utilisation des progéniteurs CD34+ a été leur faible capacité proliférative. Une limite qui pourrait être contournée par un accès facilité aux banques de sang de cordon dont l'automatisation et la normalisation de leur collecte permettent la constitution de stocks homogènes et sûrs. Les cellules CD34+ ne possèdent pas le potentiel d'expansion illimité des iPSC mais des développements récents pourraient apporter des améliorations. On pourra citer l'utilisation de composés améliorant la prolifération des progéniteurs comme la StemRegenin 1 (SR1) [39], la nicotinamide (NAM) [40] ou des ligands de la voie de signalisation notch [41] ou des techniques de coculture en présence de cellules mésenchymateuses [42]. Un avantage encore mal reconnu des cellules CD34+ est qu'elles permettent, à l'image des iPS d'obtenir des plaquettes dites universelles, puisque les CSH dérivées de sang de cordon

et de sang périphérique pourraient être sélectionnées et regroupées en fonction de leur phénotype HLA/ABO produisant des plaquettes compatibles avec les receveurs lors de transfusion. Notre laboratoire a choisi de produire des plaquettes à partir de cellules CD34 par une méthode de culture permettant de générer un progéniteur mégacaryocytaire hautement compétent pour la production de plaquettes [37]. Nous envisageons d'établir une banque de progéniteurs mégacaryocytaires, à partir de cellules CD34 de différents phénotypes (HLA, ABO...), que nous immortaliserons, pour produire des plaquettes de culture à la demande hautement compatibles avec le receveur concerné.

Choisir entre iPSC ou progéniteurs CD34+ revient donc à répondre à un compromis qui intègre le potentiel de prolifération et la capacité de maturation des cellules.

Obtenir un niveau de maturation des mégacaryocytes proche de celui observé dans la moelle osseuse

La production efficace de plaquettes nécessite d'atteindre un degré de maturation des MK, proche de celui observé dans la moelle osseuse qui dépend :

- d'une endomitose efficace et;
- de l'expansion des membranes de démarcation (DMS) [43].

Une endomitose efficace et une ploïdie élevée favorisera la biosynthèse protéique et par là-même lipidique, le développement d'organelles [22] et l'expansion du DMS. Celui-ci fournira les membranes nécessaires pour alimenter l'extension des proplaquettes et libérer de nombreuses plaquettes. Pour atteindre un degré optimal de maturation des MK in vitro, il est nécessaire de reproduire le plus fidèlement ces étapes, qui sont influencées par des microenvironnements spécifiques de la moelle osseuse (cellulaire, cytokines, rigidité).

Ploïdisation

Jusqu'à présent, même dans les meilleures conditions décrites, les MK dérivés de progéniteurs adultes ou d'iPSC présentaient des niveaux de ploïdie inférieurs à ceux des MK résidant dans la moelle osseuse, indiquant une certaine immaturité. Il est reconnu que les MK plus petits et faiblement polypléïdes produisent moins de plaquettes [44]. Ceci se confirme pour les MK provenant de fœtus et de nouveau-nés, qui sont de petite taille et peu polypléïdes et produisent moins de plaquettes que les MK provenant d'adultes [45]. Les mécanismes qui contrôlent la ploïdisation des MK commencent à être assez bien connus et ont abouti par exemple à l'utilisation d'un inhibiteur de SRC kinase (SU6656) permettant une augmentation de la ploïdie et du rendement en plaquettes [46]. L'identification de la protéine IGF2BP3, une protéine liant l'ARN, comme acteur de la transition des MK fœtaux aux MK adultes, a quant à elle conduit via son inhibition à une augmentation de la production de plaquettes [47].

Expansion du DMS

La production, par un seul MK, de milliers de plaquettes nécessite une synthèse considérable de membranes et leur organisation structurée pour former le DMS. Ce réseau intriqué est alimenté par l'invagination de membranes externes et par l'apport de membranes internes directement via l'appareil de Golgi et de lipides au contact du réticulum endoplasmique [20,48]. Il est connu que les MK au stade immature ont déjà une grande capacité de synthèse de cholestérol et de phospholipides. Il a également été démontré qu'ils étaient capables de capturer les acides gras [49]. Une meilleure connaissance des voies lipidiques impliquées dans ces étapes précoces pourrait à terme permettre la conception de milieux de culture plus performants pour améliorer la production de plaquettes.

La moelle osseuse est un tissu complexe et dynamique où les MK interagissent avec d'autres cellules et protéines de matrice où des forces sont appliquées (et subissent des forces) dans une configuration tridimensionnelle (3D) [50] (Malara et al., 2015). Des travaux récents ont mis en évidence que la rigidité de la moelle osseuse influençait positivement la maturation des MK, favorisant une ploïdie plus élevée et la production de plaquettes [36,51]. Dans le même sens, Aguilar et al. ont montré que les MK cultivés dans de la méthylcellulose à 2 % (30–60 Pa), reproduisant ainsi la rigidité de la moelle osseuse, présentaient une expansion du DMS accrue et une augmentation de la production de plaquettes, ouvrant des perspectives pour améliorer la production de plaquettes *in vitro* [52].

Libérer efficacement les plaquettes à partir des MK matures

In vivo, et dans des conditions physiologiques, la libération de plaquettes nécessite:

- la transmigration d'extensions cytoplasmiques à partir des MK, couramment appelées proplaquettes, à travers la barrière endothéliale et;
- leur fragmentation lors de l'exposition au flux sanguin dans les sinusoides de la moelle et la microcirculation pulmonaire [24,53].

La barrière endothéliale des vaisseaux sinusoides

En atteignant les sinusoides, les MK entrent en contact avec les cellules endothéliales sur leur face basale. Une des conséquences est de contribuer à leur maturation comme l'ont montré la coculture de progéniteurs CD34+ et de cellules endothéliales de la MO (BMEC) humaine [54]. Une analyse microscopique détaillée a montré que les MK les plus matures vont former des podosomes qui traversent la paroi endothéliale et aboutissent à la formation de larges protrusions cytoplasmiques, sources de futures plaquettes, dans la lumière du vaisseau. L'importance de ces podosomes dans la formation des plaquettes est également soulignée par l'existence de thrombopénies dans des modèles murins déficients pour des protéines impliquées dans la formation des podosomes (WASP, cdc42, (alpha en symbol)-actinine, Arp2-3, CD44) [55,56].

La transposition de ces étapes de transmigration dans des bioréacteurs a déjà été tentée mais sans réel succès. Les cellules endothéliales introduites dans les systèmes de perfusion en 3D, n'ont pas eu d'effets positifs sur la quantité de plaquettes libérées [36,57].

Systèmes de libération des plaquettes en conditions de flux

Cultivées en conditions statiques, les MK libèrent des plaquettes individuelles avec une très faible efficacité.

Plusieurs systèmes ont été développés principalement basés sur l'utilisation de chambres microfluidiques pour tenter d'imiter les conditions *in vivo* où les MK interagissent avec les cellules endothéliales et où les protrusions cytoplasmiques sont soumises aux flux dans les sinusoides. À ce jour cependant aucun de ces dispositifs ne permet de récapituler l'ensemble du processus de formation des plaquettes mais se limitent pour l'essentiel à provoquer la libération des plaquettes à partir de mégacaryocytes matures préalablement cultivés en systèmes statiques.

L'équipe de D. Baruch a conçu un bioréacteur comprenant une multitude de piliers disposés en quinconce et recouverts d'une matrice adhésive, le facteur Willebrand. Les MK matures adhérents aux piliers sont soumis à un taux de cisaillement de 1800 s^{-1} pour favoriser l'extension de proplaquettes et la libération d'éléments plaquettaires (Fig. 2A). Les rendements observés sont assez faibles, inférieurs à 50 plaquettes/MK et ces plaquettes répondent à des agonistes classiques dans des tests menés uniquement *in vitro* [58].

Une chambre de perfusion, développée par l'équipe de J. Thon, est composée de deux canaux parallèles séparés par une série de pores de $2 \mu\text{m}$ de diamètre. Les MK matures sont insérés dans le canal supérieur et le flux est appliqué dans le canal inférieur (600 s^{-1}). Sous l'effet du flux, les MK sont piégés dans les interstices, émettent des proplaquettes

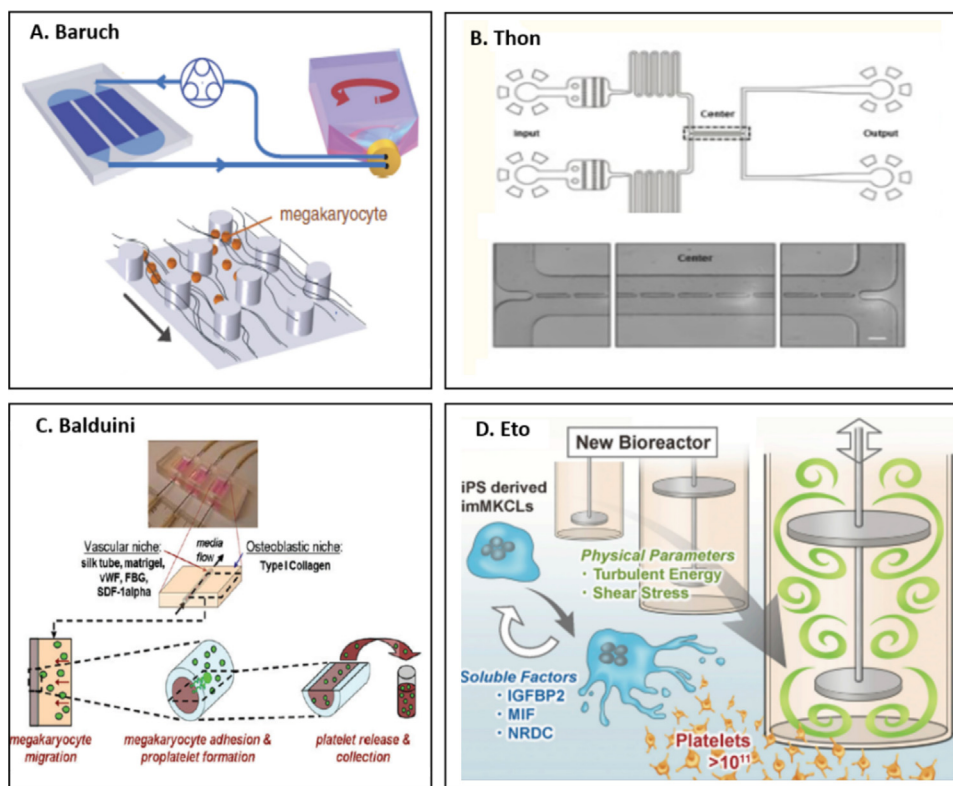


Figure 2 Les différents dispositifs de libération des plaquettes.

et libèrent les plaquettes dans le canal inférieur (Fig. 2B). Les rendements obtenus et la fonctionnalité des plaquettes n'ont encore pas été rapportés [59].

Un autre système développé par l'équipe d'A. Balduini est lui basé sur l'utilisation de fibres de soie étirées pour mimer les vaisseaux sinusoides. Ces fibres sont entourées d'hydrogel où sont piégés les MK matures. L'ensemble est maintenu par une éponge qui renforce la rigidité à l'image des forces qu'exercent l'os sur la moelle osseuse (Fig. 2C). Les MK matures sont ensemencés dans la lumière des fibres ce qui permet une exposition complète des cellules endothéliales aux MK. Avec un flux d'environ 60 s^{-1} , ce bioréacteur permet de générer des plaquettes fonctionnelles mais toujours avec un faible rendement, < 20 plaquettes/MK. Un atout de ce système pour passer au stade de production est l'utilisation de la soie, un biomatériau déjà utilisé dans l'industrie et qui présente une bonne biocompatibilité, est non thrombogène, et dont les propriétés mécaniques sont ajustables [60].

Enfin, le dernier système, décrit par le groupe de Koji Eto, est un bioréacteur. Son développement a été conçu pour une production en masse, la cuve pouvant contenir jusqu'à 10 L de MK, ce qui le distingue des dispositifs précédents. Ce bioréacteur dispose d'une turbine d'agitation composée de deux disques mobiles, l'un permettant un écoulement axial et l'autre un écoulement radial ce qui permet de générer des flux turbulents (Fig. 2D). Basé sur les résultats publiés, ce bioréacteur est clairement le plus performant et proche d'une application transfusionnelle. Un rendement de 150 plaquettes/MK est obtenu, et les plaquettes générées sont morphologiquement proches des plaquettes

humaines. Ces plaquettes ont des propriétés hémostatiques préservées, un critère essentiel pour faire des plaquettes de culture un produit transfusionnel [61].

Un dispositif permettant la libération des plaquettes de culture de conception différente mais également basé sur l'application de flux turbulents a été généré dans notre laboratoire. Il fait actuellement l'objet d'un dépôt d'un brevet dans lequel nous avons montré une morphologie et une fonctionnalité des plaquettes générées semblables aux plaquettes natives.

Démontrer la fonctionnalité native et des propriétés hémostatiques après transfusion

Pour que les plaquettes de culture puissent être considérées comme une réelle alternative transfusionnelle, elles devront égaler la qualité des plaquettes issues de donneurs en termes:

- de morphologie et d'ultrastructure et;
- de fonctionnalité.

Morphologie et ultrastructure

Les plaquettes natives sont anucléées, elles possèdent une forme discoïde caractéristique et contiennent des granules (α , δ , lysosomes) nécessaires à leur fonction. Les analyses microscopiques ont révélé que les plaquettes de culture sont généralement plus grosses que les plaquettes natives, ne sont pas nucléées mais contiennent une quantité

importante d'ARN, caractéristique des plaquettes nouvellement produites [29,34,37,59], questionnant leur capacité de recirculation et leur durée de vie après transfusion.

Évaluation des fonctions plaquettaires in vitro

Dans la majorité des études publiées jusqu'ici, la fonctionnalité des plaquettes produites in vitro n'a été que partiellement caractérisée. Dans la grande majorité des cas, l'activabilité des plaquettes a été évaluée par cytométrie de flux sur l'exposition de P-sélectine et de la forme activée de l'intégrine $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ (PAC-1). Habituellement, ces marqueurs sont positifs après stimulation par des agonistes comme l'ADP ou la thrombine [29,34,36]. On peut cependant noter que les plaquettes présentent souvent un léger état de pré-activation, visualisé par l'expression de la P-sélectine, en absence d'agoniste [60,62]. Cette positivité ne prédit pas inévitablement de mauvaises propriétés transfusionnelles [63]. L'agrégation plaquettaire, qui est un test plus classique et complet pour étudier la fonction des plaquettes natives, n'a que très rarement été rapportée en raison du nombre limité de plaquettes obtenues en culture [34,38,61].

Évaluation des fonctions plaquettaires in vivo

La fonctionnalité des plaquettes de culture a été principalement attestée dans des modèles de thrombose dans la souris. Après transfusion, ces plaquettes sont capables de s'intégrer au thrombus formé d'une majorité de plaquettes endogènes, aboutissant à la formation d'un clou plaquettaire mixte [29,34]. Quant à leur capacité de recirculation, elle n'a été démontrée que dans de rares études dont celles effectuées par notre laboratoire ou une demi-vie assez semblable à celle des plaquettes natives a été observée après transfusion dans des souris immunodéficientes [29,30,34,38]. En plus de ces résultats encourageants, notre laboratoire, comme celui de K. Eto [61], a pu montrer que ces plaquettes étaient capables d'assurer leur fonction principale, l'hémostase, en corrigeant une tendance hémorragique chez des souris rendues thrombopéniques [38].

Atteindre une production à l'échelle industrielle

Développer une culture rentable et à grande échelle de plaquettes de culture universelles ou appariées par groupe sanguin permettrait une certaine indépendance vis-à-vis des donateurs et réduirait au minimum les éventuels effets indésirables relatifs aux variations de groupe sanguin entre donateurs et patients. L'objectif minimal de production pour le marché français serait de 30 CPA/semaine dans les cas d'état réfractaire. En effet, selon les données 2019 de l'ANSM, l'inefficacité transfusionnelle après transfusion de CP est de 11,3/100 000 CP transfusés. Sachant qu'environ 300 000 CP sont transfusés chaque année, la cible théorique pour les plaquettes de culture serait de 33 patients par an, sachant que cette évaluation est un grand minimum pour la France où l'inefficacité transfusionnelle plaquettaire est notoirement sous-déclarée. Par contre, une fois qu'un patient est étiqueté réfractaire, il est transfusé

plusieurs fois. S'il s'agit d'un patient atteint d'une leucémie aigüe avec une allogreffe à la fin du projet thérapeutique, il va recevoir 3 CP/semaine pendant 3 semaines lors de 4 ou 5 cures, soit environ 50 CP jusqu'à rémission complète. La transfusion de 50 CP à un minimum de 33 patients par an représente au moins 1500 CP de culture/an. Un CPA coûtant environ 500 euros, le coût total des CP utilisés pour ces 33 patients s'élève à 750 000 euros. Pour être compétitif vis-à-vis de ce produit, la production d'un CPA de plaquettes universelles ou appariées par groupe sanguin ne pourrait donc excéder 1000 euros. Un ordre de prix qui, au vu des investissements engendrés par des coûts de production imposés par des procédés encore longs et coûteux et la mise en conformité avec les normes de bonnes pratiques de fabrication relatives aux médicaments de thérapie cellulaires, ne pourrait valoir que par la seule production de plaquettes de culture à destination des états réfractaires mais qui nécessiterait une production plus soutenue en élargissant notamment les champs d'application des plaquettes de culture à des besoins non transfusionnels. En effet, les plaquettes de culture pourraient être utilisées comme des vecteurs pour l'administration d'agents pharmacologiques du fait de leur implication dans des processus pathologiques comme l'inflammation, l'immunité ou la dissémination métastatique [64,65]. Ces autres applications thérapeutiques offriraient un marché plus large pour les plaquettes de culture et donc des marges plus importantes qui engendreraient une réduction des coûts et une certaine rentabilité.

Alors que plusieurs équipes sont engagées dans ce domaine, c'est le groupe de K. Eto, qui a réalisé les avancées les plus décisives et qui permet d'entrevoir la production de plaquettes de culture à l'échelle industrielle. En effet, son utilisation de cellules iPS, de bioréacteurs optimisés, l'obtention d'iMK et les différents développements de milieux, lui permettent aujourd'hui de produire l'équivalent d'un CPA (2.10^{11} plaquettes) dans 16 L de culture, ce qui représente encore un volume et un coût conséquents au regard du marché à couvrir. Coûts qui augmentent si l'on produit des plaquettes universelles en invalidant la β2 microglobuline puisque les rendements actuels obtenus à partir d'iPS ou directement à partir d'iMK sont encore très faibles (5–50 plaquettes/MK) sans doute dû aux nombreuses manipulations des iPS.

Un autre point important qui impactera directement le coût des plaquettes de culture est leur possibilité de stockage. On peut penser que les plaquettes de culture étant décrites comme des plaquettes « jeunes » et dont les conditions de production garantissent une absence de contamination par des microorganismes auront des capacités de stockage augmentée mais pour l'instant, aucune donnée n'a encore été publiée sur ce point majeur des pratiques transfusionnelles.

Conclusion et perspectives

Au cours des cinq dernières années, des efforts considérables ont été déployés au plan international pour améliorer la production de plaquettes in vitro. Il est à prévoir que dans des années proches, on verra apparaître les premières études évaluant la recirculation et la durée de vie des plaquettes de culture transfusées chez un volontaire

sain. La compétition est importante et la production de plaquettes de culture à l'échelle clinique et commerciale se rapproche pour les équipes qui disposent d' iMK capables de libérer des plaquettes universelles. Cependant pour en faire une source rentable, des étapes encore importantes d'optimisation des systèmes de production s'appuyant sur une meilleure compréhension des mécanismes, moléculaires et cellulaires, régissant la production de plaquettes sont encore requises pour que les plaquettes de culture deviennent une véritable alternative transfusionnelle. Pour conclure, et même en anticipant d'importantes avancées techniques, on ne peut raisonnablement envisager que les plaquettes de culture puissent un jour complètement remplacer le don de sang volontaire, bénévole et anonyme. Par contre, l'avenir des plaquettes de culture se situera probablement dans des indications de niche comme celle des états réfractaires avec allo-immunisation anti-HLA/HPA, où les recherches sont déjà très avancées, et également hors indications transfusionnelles où elles seraient utilisées comme des vecteurs de médicaments.

Déclaration de liens d'intérêts

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

Références

- [1] Neildez-Nguyen TM, Wajcman H, Marden MC, Bensidhoum M, Moncollin V, Giarratana MC, et al. Human erythroid cells produced ex vivo at large scale differentiate into red blood cells in vivo. *Nat Biotechnol* 2002;20:467–72 [PubMed PMID: 11981559].
- [2] Giarratana MC, Kobari L, Lapillonne H, Chalmers D, Kiger L, Cynober T, et al. Ex vivo generation of fully mature human red blood cells from hematopoietic stem cells. *Nat Biotechnol* 2005;23:69–74 [PubMed PMID: 15619619].
- [3] Douay L, Giarratana MC. The cultured red blood cell: a study tool with therapeutic perspectives. *Cell Cycle* 2005;4:999–1000 [PubMed PMID: 15970677].
- [4] Douay L. In vitro generation of red blood cells for transfusion: a model for regenerative medicine. *Regen Med* 2012;7:1–2 [PubMed PMID: 22168487].
- [5] Tiberghien P, Follea G, Muller JY. Platelet Transfusions in Acute Leukemia. *N Engl J Med* 2016;375:96–7 [PubMed PMID: 27406370].
- [6] Thon JN, Medvetz DA, Karlsson SM, Italiano Jr JE. Road blocks in making platelets for transfusion. *J Thromb Haemost* 2015;13(Suppl 1):S55–62 [PubMed PMID: 26149051; PubMed Central PMCID: 5565795].
- [7] Slichter SJ, Kaufman RM, Assmann SF, McCullough J, Triulzi DJ, Strauss RG, et al. Dose of prophylactic platelet transfusions and prevention of hemorrhage. *N Engl J Med* 2010;362:600–13 [PubMed PMID: 20164484; PubMed Central PMCID: 2951321].
- [8] Han T, Stutzman L, Cohen E, Kim U. Effect of platelet transfusion on hemorrhage in patients with acute leukemia. An autopsy study. *Cancer* 1966;19:1937–42 [PubMed PMID: 5224775].
- [9] Frazier SK, Higgins J, Bugajski A, Jones AR, Brown MR. Adverse Reactions to Transfusion of Blood Products and Best Practices for Prevention. *Crit Care Nurs Clin North Am* 2017;29(3):271–90 [PubMed PMID: 28778288].
- [10] Benjamin RJ, Braschler T, Weingand T, Corash LM. Hemovigilance monitoring of platelet septic reactions with effective bacterial protection systems. *Transfusion* 2017;57:2946–57 [PubMed PMID: 28840603].
- [11] Assinger A. Platelets and infection – an emerging role of platelets in viral infection. *Front Immunol* 2014;5:649 [PubMed PMID: 25566260; PubMed Central PMCID: 4270245].
- [12] Slichter SJ. Platelet refractoriness and alloimmunization. *Leukemia* 1998;12(Suppl 1):S51–3 [PubMed PMID: 9777897].
- [13] Salama OS, Aladl DA, El Ghannam DM, Elderiny WE. Evaluation of platelet cross-matching in the management of patients refractory to platelet transfusions. *Blood Transfus* 2014;12:187–94 [PubMed PMID: 24931840; PubMed Central PMCID: 4039700].
- [14] Valsami S, Dimitroulis D, Gialeraki A, Chimonidou M, Politou M. Current trends in platelet transfusions practice: The role of ABO-RhD and human leukocyte antigen incompatibility. *Asian J Transfus Sci* 2015;9:117–23 [PubMed PMID: 26420927; PubMed Central PMCID: 4562128].
- [15] Baigger A, Blasczyk R, Figueiredo C. Towards the manufacture of megakaryocytes and platelets for clinical application. *Transfus Med Hemother* 2017;44:165–73 [PubMed PMID: 28626367; PubMed Central PMCID: 5473071].
- [16] Heazlewood SY, Nilsson SK, Cartledge K, Be CL, Vinson A, Gel M, et al. Progress in bio-manufacture of platelets for transfusion. *Platelets* 2017;28:649–56 [PubMed PMID: 28067095].
- [17] Thon JN, Dykstra BJ, Beaulieu LM. Platelet bioreactor: accelerated evolution of design and manufacture. *Platelets* 2017;28(5):472–7 [PubMed PMID: 28112988; PubMed Central PMCID: 5507711].
- [18] Kaushansky K. Historical review: megakaryopoiesis and thrombopoiesis. *Blood* 2008;111(3):981–6.
- [19] Woolthuis CM, Park CY. Hematopoietic stem/progenitor cell commitment to the megakaryocyte lineage. *Blood* 2016;127:1242–8 [PubMed PMID: 26787736; PubMed Central PMCID: 5003506].
- [20] Eckly A, Heijnen H, Pertuy F, Geerts W, Proamer F, Rinckel JY, et al. Biogenesis of the demarcation membrane system (DMS) in megakaryocytes. *Blood* 2014;123:921–30 [PubMed PMID: 24152908].
- [21] Guo T, Wang X, Qu Y, Yin Y, Jing T, Zhang Q. Megakaryopoiesis and platelet production: insight into hematopoietic stem cell proliferation and differentiation. *Stem Cell Investig* 2015;2:3 [PubMed PMID: 27358871; PubMed Central PMCID: 4923649].
- [22] Mazzi S, Lordier L, Debili N, Raslova H, Vainchenker W. Megakaryocyte and polyploidization. *Exp Hematol* 2018;57:1–13 [PubMed PMID: 29111429].
- [23] Patel SR, Hartwig JH, Italiano Jr JE. The biogenesis of platelets from megakaryocyte proplatelets. *J Clin Invest* 2005;115:3348–54 [PubMed PMID: 16322779; PubMed Central PMCID: 1297261].
- [24] Junt T, Schulze H, Chen Z, Massberg S, Goerge T, Krueger A, et al. Dynamic visualization of thrombopoiesis within bone marrow. *Science* 2007;317:1767–70 [PubMed PMID: 17885137].
- [25] Leiva O, Leon C, Kah Ng S, Mangin P, Gachet C, Ravid K. The role of extracellular matrix stiffness in megakaryocyte and platelet development and function. *Am J Hematol* 2018;93:430–41 [PubMed PMID: 29247535; PubMed Central PMCID: 5803306].
- [26] Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 2007;131:861–72 [PubMed PMID: 18035408].
- [27] Sugimoto N, Eto K. Platelet production from induced pluripotent stem cells. *J Thromb Haemost* 2017;15:1717–27 [PubMed PMID: 28752663].
- [28] Karagiannis P, Eto K. Manipulating megakaryocytes to manufacture platelets ex vivo. *J Thromb Haemost* 2015;13(Suppl 1):S47–53 [PubMed PMID: 26149050; PubMed Central PMCID: 4501322].

- [29] Nakamura S, Takayama N, Hirata S, Seo H, Endo H, Ochi K, 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 [PubMed PMID:24529595].
- [30] Moreau T, Evans AL, Vasquez L, Tijssen MR, Yan Y, Trotter MW, et al. Large-scale production of megakaryocytes from human pluripotent stem cells by chemically defined forward programming. *Nat Commun* 2016;7:11208 [PubMed PMID:27052461; PubMed Central PMCID:4829662].
- [31] Liu Y, Wang Y, Gao Y, Forbes JA, Qayyum R, Becker L, et al. Efficient generation of megakaryocytes from human induced pluripotent stem cells using food and drug administration-approved pharmacological reagents. *Stem Cells Transl Med* 2015;4:309–19 [PubMed PMID:25713465; PubMed Central PMCID:4367506].
- [32] Borger AK, Eicke D, Wolf C, Gras C, Aufderbeck S, Schulze K, et al. Generation of HLA-universal iPSCs-derived megakaryocytes and platelets for survival under refractoriness conditions. *Mol Med* 2016;22 [PubMed PMID:27262025; PubMed Central PMCID:5023513].
- [33] Zhang N, Zhi H, Curtis BR, Rao S, Jobaliya C, Poncz M, et al. CRISPR/Cas9-mediated conversion of human platelet alloantigen allotypes. *Blood* 2016;127:675–80.
- [34] Feng Q, Shabrani N, Thon JN, Huo H, Thiel A, Machlus KR, et al. Scalable generation of universal platelets from human induced pluripotent stem cells. *Stem Cell Rep* 2014;3:817–31 [PubMed PMID:25418726; PubMed Central PMCID:4235139].
- [35] Lee EJ, Godara P, Haylock D. Biomanufacture of human platelets for transfusion: rationale and approaches. *Exp Hematol* 2014;42:332–46 [PubMed PMID:24667682].
- [36] Di Buduo CA, Wray LS, Tozzi L, Malara A, Chen Y, Ghezzi CE, et al. Programmable 3D silk bone marrow niche for platelet generation ex vivo and modeling of megakaryopoiesis pathologies. *Blood* 2015;125:2254–64 [PubMed PMID:25575540; PubMed Central PMCID:4383799].
- [37] Strassel C, Brouard N, Mallo L, Receveur N, Mangin P, Eckly A, et al. Aryl hydrocarbon receptor-dependent enrichment of a megakaryocytic precursor with a high potential to produce proplatelets. *Blood* 2016;127:2231–40 [PubMed PMID:26966088; PubMed Central PMCID:4859197].
- [38] Do Sacramento V, Mallo L, Freund M, Eckly A, Hechler B, Mangin P, et al. Functional properties of human platelets derived in vitro from CD34(+) cells. *Sci Rep* 2020;10:914 [PubMed PMID:31969609; PubMed Central PMCID:6976668].
- [39] Boitano AE, Wang J, Romeo R, Bouchez LC, Parker AE, Sutton SE, et al. Aryl hydrocarbon receptor antagonists promote the expansion of human hematopoietic stem cells. *Science* 2010;329:1345–8 [PubMed PMID:20688981; PubMed Central PMCID:3033342].
- [40] Horwitz ME, Chao NJ, Rizzieri DA, Long GD, Sullivan KM, Gasparetto C, et al. Umbilical cord blood expansion with nicotinamide provides long-term multilineage engraftment. *J Clin Invest* 2014;124:3121–8.
- [41] Delaney C, Heimfeld S, Brashem-Stein C, Voorhies H, Manger RL, Bernstein ID. Notch-mediated expansion of human cord blood progenitor cells capable of rapid myeloid reconstitution. *Nat Med* 2010;16:232–6 [PubMed PMID:20081862; PubMed Central PMCID:2819359].
- [42] de Lima M, McNiece I, Robinson SN, Munsell M, Eapen M, Horowitz M, et al. Cord-blood engraftment with ex vivo mesenchymal-cell coculture. *N Engl J Med* 2012;367:2305–15 [PubMed PMID:23234514; PubMed Central PMCID:3805360].
- [43] Machlus KR, Thon JN, Italiano Jr JE. Interpreting the developmental dance of the megakaryocyte: a review of the cellular and molecular processes mediating platelet formation. *Br J Haematol* 2014;165:227–36 [PubMed PMID:24499183].
- [44] Mattia G, Vulcano F, Milazzo L, Barca A, Macioce G, Giampaolo A, et al. Different ploidy levels of megakaryocytes generated from peripheral or cord blood CD34+ cells are correlated with different levels of platelet release. *Blood* 2002;99:888–97 [PubMed PMID:11806991].
- [45] de Alarcon PA, Graeve JL. Analysis of megakaryocyte ploidy in fetal bone marrow biopsies using a new adaptation of the feulgen technique to measure DNA content and estimate megakaryocyte ploidy from biopsy specimens. *Pediatr Res* 1996;39:166–70 [PubMed PMID:8825404].
- [46] Vainchenker W, Raslova H. Megakaryocyte polyploidization: role in platelet production. *Platelets* 2019;22:1–10 [PubMed PMID:31544577].
- [47] Elagib KE, Lu CH, Mosoyan G, Khalil S, Zasadzinska E, Foltz DR, et al. Neonatal expression of RNA-binding protein IGF2BP3 regulates the human fetal-adult megakaryocyte transition. *J Clin Invest* 2017;127:2365–77 [PubMed PMID:28481226; PubMed Central PMCID:5451240].
- [48] Eckly A, Strassel C, Cazenave JP, Lanza F, Leon C, Gachet C. Characterization of megakaryocyte development in the native bone marrow environment. *Methods Mol Biol* 2012;788:175–92 [PubMed PMID:22130708].
- [49] Schick PK, Williams-Gartner K, He XL. Lipid composition and metabolism in megakaryocytes at different stages of maturation. *J Lipid Res* 1990;31:27–35 [PubMed PMID:2107271].
- [50] Malara A, Currao M, Gruppi C, Celesti G, Viarengo G, Buracchi C, et al. Megakaryocytes contribute to the bone marrow-matrix environment by expressing fibronectin, type IV collagen, and laminin. *Stem Cells* 2014;32:926–37 [PubMed PMID:24357118; PubMed Central PMCID:4096110].
- [51] Ivanovska IL, Shin JW, Swift J, Discher DE. Stem cell mechanobiology: diverse lessons from bone marrow. *Trends Cell Biol* 2015;25:523–32 [PubMed PMID:26045259; PubMed Central PMCID:4555184].
- [52] Aguilar A, Pertuy F, Eckly A, Strassel C, Collin D, Gachet C, et al. Importance of environmental stiffness for megakaryocyte differentiation and proplatelet formation. *Blood* 2016;128:2022–32 [PubMed PMID:27503502].
- [53] Lefrançais E, Ortiz-Munoz G, Caudrillier A, Mallavia B, Liu F, Sayah DM, et al. The lung is a site of platelet biogenesis and a reservoir for haematopoietic progenitors. *Nature* 2017;544:105–9 [PubMed PMID:28329764].
- [54] Rafii S, Shapiro F, Pettengell R, Ferris B, Nachman RL, Moore MA, et al. Human bone marrow microvascular endothelial cells support long-term proliferation and differentiation of myeloid and megakaryocytic progenitors. *Blood* 1995;86(9):3353–63 [PubMed PMID:7579438].
- [55] Kunishima S, Okuno Y, Yoshida K, Shiraishi Y, Sanada M, Muramatsu H, et al. ACTN1 mutations cause congenital macrothrombocytopenia. *Am J Hum Genet* 2013;92(3):431–8 [PubMed PMID:23434115; PubMed Central PMCID:3591851].
- [56] Di Martino J, Henriët E, Ezzoukhry Z, Goetz JG, Moreau V, Saltel F. The microenvironment controls invadosome plasticity. *J Cell Sci* 2016;129:1759–68 [PubMed PMID:27029343].
- [57] Thon JN, Italiano JE. Platelets: production, morphology and ultrastructure. *Handb Exp Pharmacol* 2012;210:3–22 [PubMed PMID:22918725].
- [58] Blin A, Le Goff A, Magniez A, Poirault-Chassac S, Teste B, Sicot G, et al. Microfluidic model of the platelet-generating organ: beyond bone marrow biomimetics. *Sci Rep* 2016;6:21700 [PubMed PMID:26898346; PubMed Central PMCID:4761988].
- [59] Thon JN, Mazutis L, Wu S, Sylman JL, Ehrlicher A, Machlus KR, et al. Platelet bioreactor-on-a-chip. *Blood* 2014;124:1857–67 [PubMed PMID:25606631; PubMed Central PMCID:4168343].
- [60] 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 Methods 2011;17:1223–32 [PubMed PMID:21895494; PubMed Central PMCID:3226422].
- [61] Ito Y, Nakamura S, Sugimoto N, Shigemori T, Kato Y, Ohno M, et al. Turbulence Activates Platelet Biogenesis to Enable Clinical Scale Ex Vivo Production. *Cell* 2018;174 [PubMed PMID:30017246; 636-48 e18].
- [62] Sullenbarger B, Bahng JH, Gruner R, Kotov N, Lasky LC. Prolonged continuous in vitro human platelet production using three-dimensional scaffolds. *Exp Hematol* 2009;37:101–10 [PubMed PMID:19013002; PubMed Central PMCID:2676426].
- [63] Michelson AD, Barnard MR, Hechtman HB, MacGregor H, Connolly RJ, Loscalzo J, et al. In vivo tracking of platelets: circulating degranulated platelets rapidly lose surface P-selectin but continue to circulate and function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93(21):11877–82 [PubMed PMID:8876231; PubMed Central PMCID:38152].
- [64] Ho-Tin-Noe B. The multifaceted roles of platelets in inflammation and innate immunity. *Platelets* 2018;29:531–2 [PubMed PMID:29608339].
- [65] Mege D, Aubert M, Lacroix R, Dignat-George F, Panicot-Dubois L, Dubois C. Involvement of platelets in cancers. *SeminThromb Hemost* 2019;45:569–75 [PubMed PMID:31382305].