



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

La culture de plaquettes à partir de cellules souches pluripotentes induites[☆]



Novel platelet pharming using human induced pluripotent stem cells

C. Flahou^{a,*}, N. Sugimoto^a, K. Eto^{a,b}

^a Department of Clinical Application, Center for iPS Cell Research and Application, Kyoto University, 53, Kawahara-cho, 606-8507 Shogoin, Sakyo-ku, Kyoto, Japon

^b Department of Regenerative Medicine, Chiba University Graduate School of Medicine, Chiba, Japon

Reçu le 17 mars 2020 ; accepté le 8 septembre 2020

Disponible sur Internet le 28 septembre 2020

KEYWORDS

Platelet transfusion;
Megakaryocyte;
Induced pluripotent stem cells;
Bioreactors

Résumé La production in vitro de plaquettes offre une opportunité de résoudre les problèmes liés aux limitations d'approvisionnement et à la sécurité des dons de produits dérivés du sang. Les cellules souches pluripotentes induites – ou iPSC – sont une source idéale pour la production de cellules à des fins de thérapies régénératives. Nous avons précédemment établi avec succès une lignée mégacaryocytaire immortalisée à partir d'iPSC. Celle-ci possède une capacité de prolifération fiable. Par ailleurs, il est possible de les cryoconserver. Elle est donc une source adaptée de cellules primaires pour la production de plaquettes suivant les Bonnes Pratiques de Fabrication (BPF). Dans le même temps, la capacité améliorée des bioréacteurs à reproduire certaines conditions physiologiques, telle que la turbulence, de pair avec la découverte de molécules favorisant la thrombopoïèse, a contribué à l'accomplissement de la production de plaquettes en quantité et qualité suffisantes pour répondre aux besoins cliniques. La production de plaquettes à partir de cellules iPSC s'étend aussi aux patients en état de réfraction allo-immune, par la production de plaquettes autologues ou dont on a génétiquement manipulé l'expression des Antigènes des Leucocytes Humains (HLA) et des Antigènes Plaquettaires Humain (HPA). Considérant ces avancées fondamentales, les plaquettes iPSC avec expression des HLA modifiées se présentent comme un potentiel produit de transfusion universel. Dans cette revue, nous souhaitons apporter une vue d'ensemble de la production in vitro de plaquettes à partir de cellules iPSC, et de son possible potentiel transformatif, d'importance capitale dans le domaine de la transfusion des produits sanguins.

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

[☆] 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.

Adresses e-mail : c.flahou@cira.kyoto-u.ac.jp (C. Flahou), naoshi.sugi@cira.kyoto-u.ac.jp (N. Sugimoto), kojiето@cira.kyoto-u.ac.jp (K. Eto).

<https://doi.org/10.1016/j.banm.2020.09.040>

0001-4079/© 2020 l'Académie nationale de médecine. Publié par Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

MOTS CLÉS

Transfusion de plaquettes ;
Mégacaryocyte ;
Cellules souches pluripotentes induites ;
Bioréacteurs

Summary Ex vivo production of human platelets have been pursued as an alternative measure to resolve limitations in the supply and safety of current platelet transfusion products. To this end, induced pluripotent stem cells (iPSCs) are considered an ideal global source, since they are not only pluripotent and self-renewing, but also are available from basically any person, have relatively few ethical issues, and are easy to manipulate. From human iPSCs, megakaryocyte (MK) lines with robust proliferation capacity have been established by the introduction of specified sets of genes. These expandable MKs are also cryopreservable and thus would be suitable as master cells for good manufacturing practice (GMP) grade production of platelets, assuring availability on demand and safety against blood-borne infections. Meanwhile, developments in bioreactors that physically mimic the in vivo environment and discovery of substances that promote thrombopoiesis have yielded competent platelets with improved efficiency. The derivation of platelets from iPSCs could further resolve transfusion-related alloimmune complications through the manufacturing of autologous products and human leukocyte antigen (HLA)-compatible platelets by manipulation of HLAs and human platelet antigens (HPAs). Considering these key advances in the field, HLA-deleted platelets could become a universal product that is manufactured at industrial level to safely fulfill almost all demands. In this review, we overview the ex vivo production of iPSC-derived platelets towards clinical applications, a production that would revolutionize the blood transfusion system.

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

Introduction

Les plaquettes sont des cellules sanguines anucléées de petite taille (2–3 µm de diamètre), et fragmentées dans le système vasculaire à partir de la membrane plasmique de mégacaryocytes (MK) résidants dans la moelle osseuse. Elles sont indispensables dans l'équilibre homéostatique, et leur dysfonctionnement induit diverses complications hémorragiques. Certaines maladies hématologiques, lourdes pertes de sang, infections sévères, syndromes d'hyper-coagulation, ainsi que des interventions thérapeutiques telles que certaines chirurgies cardiaques, chimiothérapie, radiothérapie et conditionnement des cellules souches hématopoïétiques, provoquent une thrombocytopenie, c'est-à-dire une diminution du nombre de plaquettes au point qu'il en devient insuffisant [1].

Depuis des dizaines d'années, le traitement standard pour palier une thrombocytopenie reste l'allo-transfusion [2,3]. Par le passé, les dons de sang ont assuré l'apport en produits plaquettaires pour la transfusion et ont sauvé de nombreuses vies. En dépit de l'adroite gestion actuelle des inconvénients liés à l'apport et de la sécurité des dons de plaquettes, il est fondamental de répondre à ses fragilités [4,5]. En effet, pour maintenir leur viabilité de manière optimale, les produits plaquettaires sont gardés à température ambiante sous agitation douce. Ceci restreint leur fenêtre d'utilisation déjà limitée à 5 jours au Japon (7 jours en France, si elles sont inactivées pour les pathogènes), donc leur ré-apport doit rester constant.

Par nature, l'allo-transfusion induit inévitablement des risques de transmission d'infections du sang, d'allergies ; des risques liés à l'allo-immunisation [2]. Les produits contaminés par des agents infectieux tels que les virus de l'hépatite, VIH, virus T-lymphotrope humain (HTLV) etc., sont exclus de manière fiable grâce à des tests hautement sensibles, mais le risque ne peut être complètement éliminé en raison de la période de détection. Les plaquettes étant

gardées à température ambiante, elles sont par ailleurs sensibles au risque de contamination bactérienne.

De plus, contrairement aux réponses allo-immunitaires (par exemple la maladie du greffon contre l'hôte), qui sont évitables par la déplétion des leucocytes ou l'irradiation des produits dérivés du sang, être les cas réfractaires aux transfusions de plaquettes non concordantes pour les Antigènes des Leucocytes Humains (HLA) et des Antigènes Plaquettaires Humains (HPA) n'ont pour l'instant pas de solution [6]. D'autre part, certaines molécules bio-réactives incluses dans le sérum des produits plaquettaires, en particulier les cytokines, participent probablement à des complications comme la fièvre, les symptômes allergiques et les œdèmes pulmonaires lésionnels (TRALI).

La production de plaquettes ex-vivo à partir de cellules souches pluripotentes induites (iPSC) est une solution pour résoudre les problèmes liés à la transfusion allogénique. En médecine régénérative, le risque de tumorigénèse liée aux plaquettes provenant d'iPSC est faible. Cependant, le nombre de cellules requises dépasse de plusieurs ordres de grandeur celui demandé par d'autres thérapies cellulaires.

Motivées par ces problématiques, plusieurs avancées fondamentales ont été réalisées dans la production de plaquettes à partir d'iPSC, de telle sorte que les applications cliniques sont attendues dans les prochaines années. Cette revue a pour objectif de résumer les avancées technologiques récentes dans ce domaine. Nous discuterons des lignées mégacaryocytaires, des systèmes à bioréacteurs, et des nouveaux composés découverts. Ces avancées seront également mentionnées dans le cadre des complications liées à l'allo-immunisation, en tant qu'importante direction thérapeutique à explorer.

Les iPSC comme cellules sources

La production ex-vivo de plaquettes est indépendante des dons du sang et représente donc un apport stable et faci-

Tableau 1 Production de plaquettes ex vivo à partir de différentes sources cellulaires.

Cellule source	Origine				Amplification	Procédé de différenciation	Problèmes éthiques
	Tissu/Cellule	Disponibilité	Collecte invasive	Quantité			
Mégacaryocytes (MK)	Moelle Osseuse	Quiconque	++	Faible	Non-établie	Non	—
Cellules souches hématopoïétiques (CSH)	Sang de cordon ombilical*	Limitée : dépend de dons	Non	Très faible	Insuffisante	Relativement court	—
Cellules souches embryonniques (CSE)	Embryon	Très limitée : dépend de dons	Non	—	Illimitée	Long	Importants
Cellule souche pluripotente induite (iPS)	Cellules somatiques	Quiconque	Non, Minimal		Illimitée	Long	Faibles

* Les CSH peuvent être obtenues à partir de la moelle épinière ou de sang périphérique mais le sang de cordon ombilical est la source originelle considérée dans le domaine.

lement contrôlable. Elles peuvent être préparées à partir d'une source de cellule exempte de pathogène produite dans des conditions strictes avec peu de problèmes liés à la disponibilité de dons. De fait, le principal défi réside dans la production suffisante de plaquettes. En pratique, chaque dose transfusée demande un nombre élevé de plaquettes, de l'ordre de 200 ou 300 milliards. Ces dernières étant non-prolifératives, anucléées, et restant en circulation seulement 3 à 10 jours, les transfusions doivent être constantes jusqu'à ce que le patient en recouvre un nombre adéquat. Pour atteindre un nombre suffisant de plaquettes iPSC produites, nous avons développé une source cellulaire pouvant être amplifiée de manière fiable.

Les mégacaryocytes (MK), progéniteurs unipotents des plaquettes, résident en faible quantité dans la moelle osseuse. Ces cellules sont donc une source peu fiable. En revanche, en amont de la lignée développementale, les cellules souches hématopoïétiques (CSH) peuvent être obtenues sans procédure invasive à partir du sang de cordons ombilicaux. Cependant, une unité contient seulement environ 1 million de CSH [7]. Cela signifie qu'une stratégie hautement efficace d'amplification, de différenciation et de production de plaquettes est nécessaire [8]. Seulement, l'amplification des CSH n'est pas optimale pour la production de MK in vitro, et cette option est donc aussi peu réaliste (Tableau 1).

Encore plus en amont dans la lignée développementale se trouvent les cellules souches pluripotentes : les cellules souches embryonniques (CSE) et les iPSC [9,10]. Contrairement aux CSH, les cellules souches pluripotentes peuvent être amplifiées indéfiniment in vitro, puis différenciées en MK et en plaquettes [11–16]. À noter : il n'y a pas de détection de CSH dans ce procédé de différenciation, bien que ces cellules soient considérées comme un intermédiaire obligatoire pour les cellules souches pluripotentes lorsque qu'elles

suivent la trajectoire développementale mégacaryocytaire. La raison de leur absence n'a pas encore été élucidée. Néanmoins, les plaquettes produites de cette manière ont des propriétés comparables aux plaquettes humaines.

Alors que les CSE sont obtenues à partir d'embryons, un équivalent fonctionnel — les iPSC — peut être produit à partir de cellules somatiques par l'introduction de gènes de reprogrammation. Ces cellules présentent donc moins de dilemmes éthiques et leur acquisition est peu invasive [9,10]. Malheureusement, nous ne disposons pas à l'heure actuelle de protocoles amplifiant les iPSC de sorte à atteindre les niveaux de plaquettes requis pour une application clinique. Ceci est sans doute dû à la longueur, la complexité, le coût, et la faible efficacité de leur différenciation en MK, résultant en une variabilité significative entre les lots de culture (Tableau 1). Atteindre une échelle de production applicable en clinique est donc irréalisable dans ces conditions.

Toutefois, les iPSC étant facilement modifiables génétiquement, il a été possible d'induire une surexpression de gènes spécifiques pour établir une lignée mégacaryocytaire amplifiable. C'est cette source cellulaire qui est actuellement considérée comme la plus adaptée pour produire des plaquettes [17,18]. Les iPSC, contrairement aux CSH et aux CSE, peuvent être obtenues à partir d'un petit fragment de peau, de sang périphérique ou ombilical, voire d'urine [19] de n'importe quel donneur, même ceux ayant une maladie hématologique. À l'heure actuelle, une banque d'iPSC est maintenue pour fournir des cellules autologues à partir de donneurs pouvant être compatibles au regard des HLA. Celle-ci est une source d'allogreffe possible (Tableau 1) [20–22]. L'autre possibilité consiste à manipuler l'expression des HLA and HPA pour permettre aux plaquettes produites in vitro d'échapper à la réponse immunitaire [12,23,24].

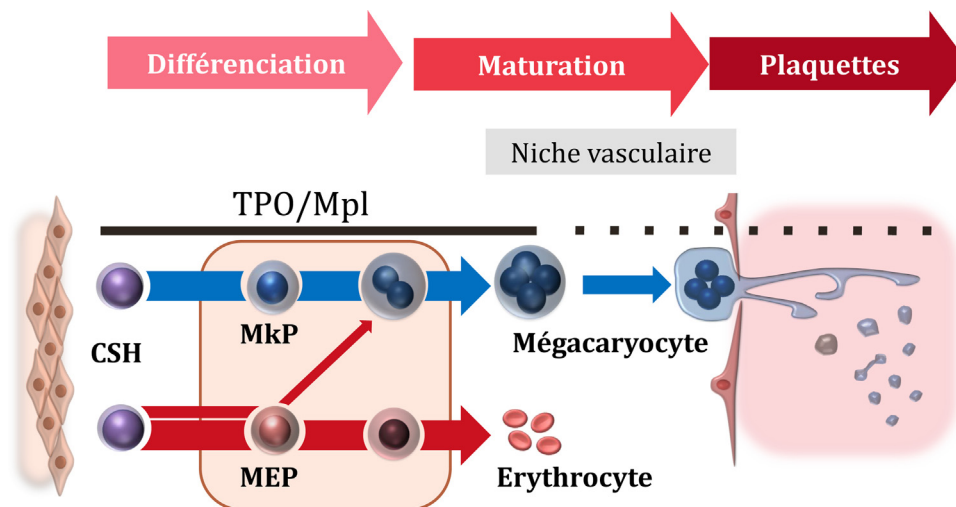


Figure 1 Modèle révisé de la mégacaryopoïèse. Précédemment, il était admis que les cellules souches hématopoïétiques (CSH) génèrent qu'un progéniteur commun des mégacaryocytes et érythrocytes (MEP). Cependant, lors de l'hématopoïèse chez l'adulte, des progéniteurs de mégacaryocytes ayant la capacité de s'auto-renouveler (les MkP) émergent directement des CSH ou de progéniteurs multipotents (MPP) et deviennent les progéniteurs majeurs des MK. Après leur différenciation et maturation, les MK migrent dans la niche vasculaire où ils produisent des plaquettes.

Tableau 2 Manipulations génétiques pour l'établissement de lignées mégacaryocytaires.

	Origine	Gènes introduits	Référence
imMKCL	iPS	<i>c-MYC</i> , <i>BMI1</i> et <i>BCL-XL</i>	[18]
fopMK	iPS	<i>GATA1</i> , <i>FLI1</i> et <i>TAL1</i>	[17]
Converted MK	Fibroblaste	<i>NF-E2</i> , <i>MAFG</i> et <i>MAFK</i> <i>GATA2</i> , <i>RUNX1</i> , <i>GATA1</i> , <i>TAL-1</i> , <i>LMO2</i> et <i>c-MYC</i>	[80] [81]

Mégacaryopoïèse et lignée mégacaryocytaire

L'hypothèse concernant la trajectoire développementale des érythroblastes et des MK leur attribue un progéniteur commun, les MK-érythroïdes (MEP) [25]. Dans ce système, la thrombopoïétine (TPO) et son récepteur associé (MPL) jouent un rôle majeur dans l'amplification, la différenciation et la maturation des MK [26]. De fait, la combinaison de TPO, d'autres cytokines et de divers facteurs participe à la différenciation des MK in vitro [12,27–29].

Des études récentes suggèrent qu'il existerait progéniteur spécifique de la trajectoire développementale des MK dans l'hématopoïèse adulte — MkP — qui proviendrait directement des CSH ou de progéniteurs sanguins multipotents [30], en plus de l'existence de MK ayant des propriétés d'auto-renouvellement (Fig. 1) [31,32]. Dans le but d'obtenir des MkP, Nakamura et al., ont établi une lignée cellulaire immortelle de progéniteurs MK (imMKCL) à partir de progéniteurs hématopoïétiques dérivés d'iPSC, par l'introduction séquentielle des gènes *c-MYC* et *BMI1* suivis par le gène *BCL-XL* (Tableau 2). Ces transgènes sont sous le contrôle du système Tet-on qui permet de faire passer les imMKCL d'un état prolifératif et d'auto-renouvellement à un état de maturation et de production de plaquettes par l'utilisation de doxycycline (Dox, Dox-ON : prolifération, Dox-OFF : maturation) [18]. La surexpression de *c-Myc*

favorise l'amplification des MK sans induire leur maturation [33,34], alors que le complexe du groupe Polycomb *BM1* et le facteur anti-apoptotique *BCL-XL* suppriment respectivement la sénescence et l'apoptose via la régulation d'*ARF* et de *INK41*, et de caspases [35]. La culture de ces des cellules en condition Dox-OFF bloque la surexpression de ces transgènes et augmente l'expression de *GATA1* et de *NF-E2*, des facteurs cruciaux pour la différenciation et la maturation des MK [36,37].

La génération de plaquettes à partir d'imMKCL est plus rapide et possède une efficacité supérieure à leur production à partir d'iPSC, puisque ce système souffre d'une faible efficacité de différenciation en MK. Pour illustrer ce fait, plus de vingt jours ont été nécessaires pour différencier des MK à partir d'iPSC, avec une efficacité d'environ 3 MK par iPSC [33]. De plus, les lignées mégacaryocytaires peuvent être cryoconservées puis amplifiées à la demande. Des produits plaquettaires respectant les règles de BPF peuvent être produits à partir de cellules sources libres de pathogènes en conditions stériles (Fig. 2).

Un obstacle majeur à l'utilisation des cellules dérivées d'iPSC ou de matériel biologique génétiquement modifié concerne le risque de tumorigénicité. Nous discuterons de la mitigation de ce problème par un procédé de purification amélioré et l'irradiation des produits finaux dans la section IV.

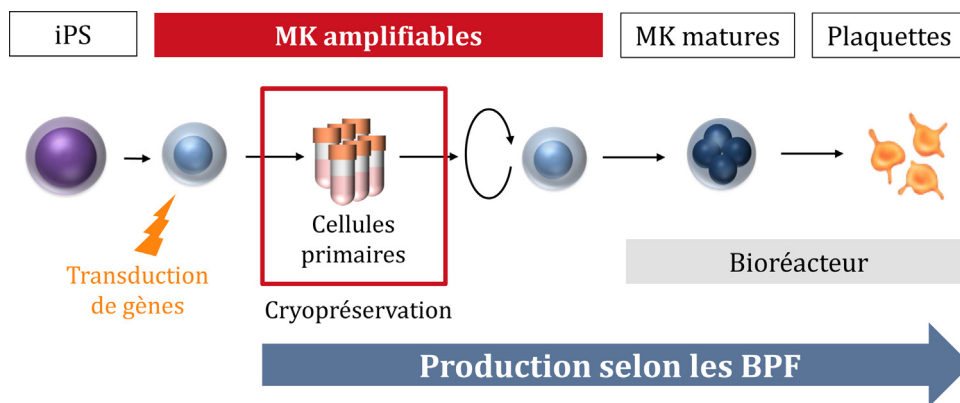


Figure 2 Lignée mégacaryocytaire immortelle et production de plaquettes ex vivo selon les BPF. Lignée mégacaryocytaire amplifiable, établie à partir d'iPS par transduction de gènes particuliers. Ces cellules peuvent être préservées et servir de cellules primaires qu'il est facile de mettre en culture, d'amplifier puis d'en induire la maturation pour produire des plaquettes sur demande.

Bioréacteurs et biogenèse des plaquettes

L'établissement d'une lignée amplifiable mégacaryocytaire ne correspond qu'à la moitié du travail : les MK doivent ensuite être induits à maturation pour produire efficacement des plaquettes fonctionnelles. Pendant leur maturation, les MK passent par plusieurs endomitoses et deviennent des cellules géantes polyploïdes, pouvant atteindre 50–100 μm de diamètre et une quantité d'ADN jusqu'à 128N. Suivant cette augmentation en volume, les MK étendent et invaginent leurs membranes cellulaires pour former un système de membranes de démarcation (DMS). Le procédé est accompagné par le bourgeonnement de nombreuses pro-plaquettes à partir du DMS dans les vaisseaux sinusoïdaux de la moelle osseuse. Les pro-plaquettes contiennent les organelles des plaquettes et possèdent des gonflements correspondants à la taille de ces dernières, arrangées en tandem, qui dépendent du réarrangement de leurs microtubules. Dans les dernières étapes de la thrombopoïèse, des particules anucléées se détachent de la partie distale des protrusions pro-plaquettaires et entrent en circulation, où elles sont de nouveau fragmentées en plus petites particules : les plaquettes [38–41].

À la différence du mécanisme stationnaire de la thrombopoïèse, qui est régulé par la TPO, Un nouveau mécanisme de production de plaquettes qui suit une infection grave ou d'importants saignements a été découvert. Ce mécanisme induit la libération rapide de plaquettes selon un mode de rupture sous l'effet de la cytokine IL-1 α (Fig. 3) [42]. Les plaquettes produites de cette façon sont plus larges et montrent des détériorations mineures, mais leur fonction thrombotique est intacte. Alors que le mécanisme stationnaire est le modèle principal de la production de plaquettes ex-vivo, le mécanisme de production d'urgence de plaquettes, basé sur des signaux inflammatoires, offre des possibilités d'exploration de stratégies alternatives pour augmenter l'efficacité de la production de plaquettes ex-vivo. Dans cette optique, l'utilisation d'IL-1 β , qui partage le même récepteur que l'IL-1 α , a été examinée [17,28,43].

Un seul MK dans la moelle épinière peut potentiellement produire 1000 à 2000 plaquettes, mais dans des conditions statiques en culture in vitro, ce nombre est

comparativement faible, et se réduit à 3 ou 10 [18,44]. De plus, les plaquettes in vitro sont typiquement plus larges, moins réactives et ont une viabilité inférieure [18,44,45]. Cette importante différence a motivé de plus amples études pour optimiser la maturation des MK et la qualité des plaquettes produites.

Dans le but d'imiter au mieux les conditions physiologiques retrouvées in vivo, plusieurs types de bioréacteurs ont été conçus (Tableau 3) [46]. Les bioréacteurs permettent une culture cellulaire en 3D, ce qui augmente la surface disponible aux MK pour produire des pro-plaquettes. Ils permettent aussi de récapituler les forces de cisaillement qui existent dans la circulation et de libérer des plaquettes à partir de la partie distale des pro-plaquettes [38,47]. À noter qu'un mécanisme similaire de production de plaquettes a été décrit dans les poumons [48,49]. Les bioréacteurs récapitulant de manière optimale les forces de cisaillement améliorent significativement le nombre et le ratio de plaquettes produites [50].

Ont suivi d'autres développements de systèmes plus performants permettant d'accroître encore le nombre de plaquettes produites ainsi que leur production dans un état quiescent, leur activation réduisant leur fonction (Tableau 3). Par exemple, Thon et al., ont conçu un bioréacteur sur puce qui reproduit les composants physiques et chimiques de la moelle osseuse telle que la rigidité, la composition de la matrice extracellulaire, la taille des pores, le contact avec les cellules endothéliales, et les forces de cisaillement [51]. Une particularité de leur bioréacteur est de pouvoir incorporer de la microscopie en temps réel. Notre équipe a suggéré que l'angle du flux pourrait être un paramètre important, puisque des expériences avec des angles divers ont montré une corrélation avec une variation du nombre de plaquettes, le meilleur étant de 60 degrés [44]. Dans une tentative de récapituler la niche environnementale des MK, Balduini et al., ont utilisé un support unique fait de protéines de soie contenant des cytokines, des composés de la matrice extracellulaire, et des protéines dérivées de cellules endothéliales [43,52]. Blin et al., ont construit un dispositif microfluidique qui capture les MK dans des micro-piliers enduits de vWF et libère les plaquettes selon différents taux de cisaillement [53].

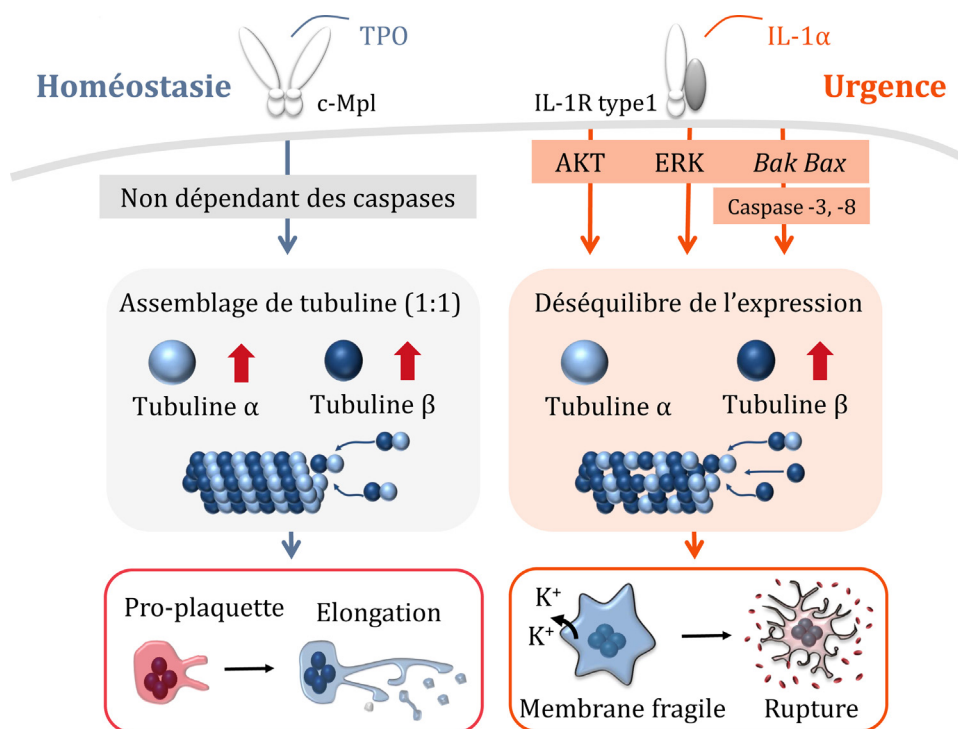


Figure 3 Modèle des deux modes de thrombopoïèse. En état d'équilibre, l'effet de la TPO sur les MK de la moelle osseuse les induit à produire des pro-plaquettes dans la circulation. Dans le cas où une production importante de plaquette est nécessaire, IL-1 α augmente la quantité de β 1-tubuline, ce qui résulte en désorganisation des microtubules de telle sorte que les plaquettes soient libérées suivant un mode de rupture.

Tableau 3 Systèmes de bioréacteurs pour la production de plaquettes.

Référence	Design	Plateforme	Composés extracellulaires	Cellule Endothéliale	Origine des MK	Rendement (%)	Plaquettes/MK	Durée
[51]	Puce micro fluidique	Polymères organiques (silicone)	Fibrinogène, Fibronectine, Matrigel	Cellules HUVEC	iPS	> 90	30	2 h
[43]	Microtubes vasculaires 3D	Microtubes de soie	Collagène, Fibrinogène, Fibronectine, Laminine, SDF-1a	Cellules endothéliales primaires	CD34+ de sang ombilical	12	10–40	48 h
[53]	Puce micro fluidique avec micro piliers	Polymères organiques (silicone)	vWF	—	Divers	10–50	3,7	2 h
[54]	Pseudo-membranes 3D	Membrane en nanofibres	Inhibiteur de ROCK et de polymérisation d'actine	—	CD34+ de sang ombilical	—	100	3 h

Utilisant une technologie permettant des forces de cisaillement basée sur des membranes en nanofibres, Avanzi et al., ont assemblé un bioréacteur capable de produire étape par étape des plaquettes à partir de cellules CD43+ provenant de sang de cordon ombilical [54]. Cependant, en considérant le potentiel physiologique des MK et le niveau de production requis, les bioréacteurs ont encore une marge de

progression importante quant à l'optimisation de la production de plaquettes [46]. De plus, les bioréacteurs qui exploitent les forces de cisaillement n'ont pas réussi à obtenir des plaquettes ayant des propriétés hémostatiques satisfaisantes.

Une approche alternative pour la production de plaquettes est d'injecter en intraveineuse des MK pour utiliser

la caractéristique des poumons à être un site de thrombopoïèse [48,49]. Dans ce cas, les poumons retiennent les MK, qui libèrent ensuite les plaquettes dans les vaisseaux pulmonaires et convertissent les poumons en sorte de bioréacteurs *in vivo* [55,56].

En combinant les bioréacteurs à des molécules stimulant la thrombopoïèse, il est possible d'améliorer la production de plaquette *ex vivo*. Parmi les composés candidats on retrouve des inhibiteurs de la polymérisation d'actine et de la kinase Rho. Ils améliorent la polyploïdisation des MK et la formation de pro-plaquettes [54,57,58]. D'autre part, des études ont montré que l'hypercholestérolémie entraîne la production de plaquettes. On pourrait donc l'optimiser en supplémentant le milieu de culture en cholestérol [59,60]. StemRegenin 1 (SR1), antagoniste du récepteur aryl-hydrocarbène (AhR), non seulement améliore l'amplification des CSH [61–63], mais augmente également la polyploïdie des MK et favorise l'amplification *in vitro* de leur précurseurs [62,64].

Les plaquettes dérivées d'iPSC dans le cas des complications immunes

Parmi les complications immunitaires observées après une transfusion de plaquettes, on retrouve des réactions aiguës telles que de la fièvre, des réactions allergiques, le TRALI, mais aussi des réactions plus tardives telles que la GVHD et une réfraction allo-immune [2,6,65]. Les causes potentielles peuvent être attribuées aux cytokines, allergènes ou autres molécules encore non identifiés. Des étapes de lavages de plaquettes (dites transformation « déplasmatisée ») préviennent les réactions aiguës [2]. De la même manière, le lavage des plaquettes iPSC devrait réduire leur risque de provoquer ce type de réaction. Dans le cas de la GVHD, elle est provoquée par la contamination lymphocytaire du concentré de plaquettes et celle-ci peut être prévenue par leuco-réduction ou irradiation [65]. Ce problème ne se pose pas pour les plaquettes iPSC puisque les lymphocytes ne se différencient pas à partir de MK [18,66].

La réfraction immunitaire à la transfusion de plaquettes est basée sur l'allo-immunité liée à l'expression des antigènes sanguins ABO, mais aussi HLA classe I et HPA. Suivant la transfusion, une réponse immunitaire contre ces antigènes provoque un rejet dans 5 à 15 % des cas [2,6]. Une non-concordance majeure des antigènes ABO réduit la durée entre les transfusions, mais crée peu de conséquences cliniques [67]. Ce n'est pas le cas pour la non-concordance sur les HLA et HPA, qui entraîne de sérieuses complications et demandent une réponse immédiate pour éviter de sérieux problèmes de saignement [2,6].

Les anticorps contre les HLA classe I, et dans une moindre mesure les HPA, sont la cause principale d'allo-réfraction. Il est donc nécessaire de vérifier leur compatibilité avant transfusion [6]. Certains patients deviennent sensibilisés et produisent des anticorps contre le HLA et/ou HPA après plusieurs transfusions, ou après une grossesse. Actuellement, la transfusion de plaquettes concordantes pour les HLA ou HPA est la seule mesure pour éviter ce type de réaction, mais leur disponibilité est limitée, demande une logistique au coût plus important, et peut manquer en situation d'urgence.

Plusieurs approches utilisant les cellules dérivées d'iPSC peuvent être mises en œuvre pour assurer une solution à ces problèmes. D'une part, il est possible de produire des plaquettes dérivées d'iPSC produite à partir des cellules du patient, qui dans ce cas n'élèveront pas de réponse immunitaire. À l'heure actuelle, un essai clinique utilise des plaquettes autologues suivant cette stratégie [68]. Cependant, établir des iPSC autologues, produire la lignée cellulaire MK, puis finalement produire des plaquettes est un processus long et complexe à la qualité variable.

Une approche alternative est de préparer une banque de cellules ayant des propriétés immunogènes amoindries. Des iPSC de donneurs homologues pour les HLA classe I ont déjà été collectés dans cette optique [20–22]. Les produits homologues pour les HLA classe I ne doivent être compatibles qu'avec un seul des deux loci du gène *HLA* classe I du receveur, et peuvent donc être utilisés pour bien plus de patients que les produits hétérologues. Conformément aux estimations, la collection de 100 des types de HLA les plus fréquents pourrait couvrir plus de 80 % de la population japonaise [69]. Cette stratégie permet aux cliniciens de s'appuyer sur des stocks stables, à la place de donneurs compatibles à la disponibilité incertaine. Les HLA sont toutefois très variables dans la population mondiale. En conséquence, plus la couverture est grande et plus la banque cellulaire doit être large.

Enfin, une future stratégie pour minimiser le risque d'allo-réfraction consiste à modifier génétiquement les iPSC pour en supprimer l'expression des HLA classe I et en dériver des plaquettes HLA-nul. En utilisant des technologies telles que shRNA, TALEN ou bien CRISPR/Cas9, la diminution de l'expression des HLA est possible soit par l'extinction du gène de la microglobuline beta-2 ($\beta 2M$), soit par sa délétion [12,70].

Avec cette stratégie, il faut néanmoins prendre en compte le risque posé par cellules Natural Killer (NK), qui ciblent et éliminent les cellules qui ont une expression réduite des HLA [71]. Bien que l'allo-réactivité des NK n'ait pas été démontrée contre les plaquettes, une réaction pourrait apparaître après transfusion de cellules n'ayant aucune expression des HLA. L'utilisation des shRNA pourrait être une solution pour laisser une expression minimale mais suffisante pour prévenir l'activation des NK [72,73]. Des études ont été menées sur l'expression forcée de HLA classe I non classiques (HLA-E, HLA-G) fusionnés avec la $\beta 2M$ dans le but d'inhiber la réponse des NK par leur récepteur CD94, ainsi que sur la suppression sélective de l'expression des HLA-A/B en maintenant l'expression des HLA-C [45,73–75]. Au-delà de ces considérations, nous avons mis en évidence que les plaquettes iPSC génétiquement modifiées afin qu'elles n'expriment pas les HLA classe I ne provoquent pas de réponse immunitaire des NK, et peuvent circuler adéquatement dans un modèle de souris reconstituées avec des cellules NK humaines et des anticorps anti-HLA classe I [76].

L'allo-réfraction provoquée par les HPA est moins fréquente, mais les patients peuvent aussi manifester des réponses cliniques graves telles que des cas de purpura post-transfusionnel (PTP) ou thrombopénie fœtale/néonatale allo-immune (FNAIT) [77]. Dans le cas du PTP, quelques semaines après la transfusion de plaquettes non concordantes pour les HPA, le nombre de plaquettes est plus bas

qu'avant transfusion. Ceci suggère que l'élimination des plaquettes inclue aussi celle du patient [77]. La FNAIT apparaît lors de la grossesse, lorsque le système immunitaire de la mère réagit contre les plaquettes fœtales ayant des HPA non concordants. Ces anticorps traversent le placenta et causent une thrombopénie chez le nouveau-né, induisant des risques de complications sévères potentiellement à long terme [77,78]. L'antigénicité provient principalement de polymorphismes singuliers de nucléotides (SNP) dans les molécules de HPA [77–79]. Étant donné que leur expression est nécessaire pour les plaquettes, une stratégie d'élimination similaire à celle proposée pour les HLA n'est pas réalisable. Il est cependant possible de convertir les SNP et de changer l'allo-type des HPA en utilisant le système CRISPR/Cas9 [24].

Ensembles, les technologies pouvant manipuler les antigènes des plaquettes sont capables d'apporter jusqu'en clinique des plaquettes allo-antigéniques concordantes pour les antigènes impliqués dans les effets secondaires immunitaires des transfusions. Une seule lignée cellulaire MK HLA-nul peut servir de cellules primaires pour une production de masse de cellules universelles pour les HLA, et servir de base pour de futurs développements dans la modification des HPA.

Conclusion

La production de plaquettes ex vivo a grandement progressé ces dernières années. La mise en place d'une lignée mégakaryocytaire, associée au développement de bioréacteurs et la découverte de nouveaux agents, a drastiquement amélioré l'efficacité et la quantité de plaquettes produites et a permis de se rapprocher d'applications en clinique. En raison de la sécurité offerte par le fait que les plaquettes soient anucléées et non prolifératives, des tests cliniques sont attendus dans un avenir proche. Les plaquettes produites ex vivo sont à l'avant-garde de la médecine régénérative utilisant les iPSC, au regard du nombre considérable de personnes nécessitant des transfusions de plaquettes.

Les obstacles à surmonter restent la génération de plaquettes suivant les principes de BPF avec un haut rendement et qui ont des qualités fonctionnelles au plus proche des plaquettes naturelles, ainsi que le développement de procédés de purification pour éliminer les contaminations cellulaires et chimiques, ou encore des méthodes confirmant la sécurité des produits finis et leur préservation optimale [45]. À travers le monde, de nombreuses équipes de recherche travaillent à faire avancer le domaine de la production de plaquettes ex vivo. D'ici quelques années, on peut s'attendre à voir publié les premiers résultats d'essais cliniques dans plusieurs pays, et qu'un accès facile, sûr et abordable à des transfusions plaquettaires soit assuré par leur production ex vivo à partir d'iPSC.

Déclaration de liens d'intérêts

K.E. a soumis des brevets liés aux travaux des références [16,18,33,42,44,69]. K.E. est un co-fondateur de Megakaryon Corporation. Les intérêts de K.E. ont été investigués et sont gérés par l'université de Kyoto en accord avec ses règles de conflits d'intérêts.

En raison des limitations de texte, plusieurs études ayant néanmoins grandement participé à l'avancement de la production de plaquette ex vivo n'ont pas pu être mentionnées. Les auteurs s'excusent de ces omissions.

Remerciements

Les auteurs remercient Dr Peter Karagiannis et Colin Deschamps pour leur relecture critique du manuscrit.

Références

- [1] Deutsch VR, Tomer A. Megakaryocyte development and platelet production. *Br J Haematol* 2006;134:453–66, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2141.2006.06215.x>.
- [2] Estcourt LJ, Birchall J, Allard S, Bassey SJ, Hersey P, Kerr JP, et al. Guidelines for the use of platelet transfusions. *Br J Haematol* 2017;176:365–94.
- [3] Szczepiorkowski ZM, Dunbar NM. Transfusion guidelines: when to transfuse. *Hematol Am Soc Hematol Educ Program* 2013;2013:638–44, <http://dx.doi.org/10.1182/asheducation-2013.1.638>.
- [4] Sapiano MRP, Jones JM, Savinkina AA, Haass KA, Berger JJ, Basavaraju SV. Supplemental findings of the 2017 National Blood Collection and Utilization Survey. *Transfusion (Paris)* 2020;60(Suppl 2):S17–37, <http://dx.doi.org/10.1111/trf.15715>.
- [5] Williamson LM, Devine DV. Challenges in the management of the blood supply. *Lancet* 2013;381:1866–75.
- [6] Stanworth SJ, Navarrete CV, Estcourt LJ, Marsh JCW. Platelet refractoriness – practical approaches and ongoing dilemmas in patient management. *Br J Haematol* 2015;171:297–305.
- [7] Avanzi MP, Mitchell WB. Ex vivo production of platelets from stem cells. *Br J Haematol* 2014;165:237–47.
- [8] Lee E, Godara P, Haylock DN. Biomanufacture of human platelets for transfusion: Rationale and approaches. *Exp Hematol* 2014;42:332–46.
- [9] 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.
- [10] Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapero SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 1998;282:1145–7.
- [11] Bluteau O, Langlois T, Rivera-Munoz P, Favale F, Rameau P, Meurice G, et al. Developmental changes in human megakaryopoiesis. *J Thromb Haemost* 2013;11:1730–41.
- [12] 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.
- [13] Gaur M, Kamata T, Wang S, Moran B, Shattil SJ, Leavitt AD. Megakaryocytes derived from human embryonic stem cells: a genetically tractable system to study megakaryocytopoiesis and integrin function. *J Thromb Haemost* 2006;4:436–42.
- [14] Lu S-J, Li F, Yin HM, Feng Q, Kimbrel EA, Hahm E, et al. Platelets generated from human embryonic stem cells are functional in vitro and in the microcirculation of living mice. *Cell Res* 2011;21:530–45.
- [15] Pick M, Azzola L, Osborne E, Stanley EG, Elefanty AG. Generation of megakaryocytic progenitors from human embryonic stem cells in a feeder- and serum-free medium. *PloS One* 2013;8:e55530–545, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0055530>.
- [16] Takayama N, Nishikii H, Usui J, Tsukui H, Sawaguchi A, Hiroyama T, et al. Generation of functional platelets from human embryonic stem cells in vitro via ES-sacs, VEGF-promoted structures that concentrate hema-

- topoietic progenitors. *Blood* [Internet] 2008;111:5298–306 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18388179>.
- [17] 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.
- [18] 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.
- [19] Zhou T, Benda C, Duzinger S, Huang Y, Li X, Li Y, et al. Generation of induced pluripotent stem cells from urine. *J Am Soc Nephrol JASN* 2011;22:1221–8.
- [20] Gourraud P-A, Gilson L, Girard M, Peschanski M. The role of human leukocyte antigen matching in the development of multiethnic ‘‘haplobank’’ of induced pluripotent stem cell lines. *Stem Cells* 2012;30:180–6.
- [21] de Rham C, Villard J. Potential and Limitation of HLA-Based Banking of Human Pluripotent Stem Cells for Cell Therapy. *J Immunol Res* [Internet] 2014;2014:1–6 <http://www.hindawi.com/journals/jir/2014/518135/> [cité le 14 avr 2020].
- [22] Umekage M, Sato Y, Takasu N. Overview: an iPSC cell stock at CiRA. *Inflammation Regeneration* 2019;39:17.
- [23] Gras C, Schulze KS, Goudeva L, Guzmán CAZ, Blasczyk R, Figueiredo C. HLA-universal platelet transfusions prevent platelet refractoriness in a mouse model. *Hum Gene Ther* 2013;24:1018–28.
- [24] Zhang N, Zhi H, Curtis BR, Rao S, Jobaliya CD, Poncz M, et al. CRISPR/Cas9-mediated conversion of human platelet alloantigen allotypes. *Blood* 2016;127:675–80.
- [25] Tozawa K, Ono-Uruga Y, Matsubara Y. Megakaryopoiesis. *Clin Exp Thromb Hemost* 2014;1(2):54–8.
- [26] Kaushansky K, Lok S, Holly RD, Broudy VC, Lin NL, Bailey MC, et al. Promotion of megakaryocyte progenitor expansion and differentiation by the c-Mpl ligand thrombopoietin. *Nature* 1994;369:568–71.
- [27] Choi ES, Nichol JL, Hokom MM, Hornkohl AC, Hunt P. Platelets Generated In Vitro From Proplatelet-Displaying Human Megakaryocytes Are Functional. *Blood* 1995;85:402–13.
- [28] Cortin V, Pineault N, Garnier A. Ex vivo megakaryocyte expansion and platelet production from human cord blood stem cells. *Methods Mol Biol* 2009;482:109–26.
- [29] Mills JA, Paluru PC, Weiss MJ, Gadue P, French DL. Hematopoietic differentiation of pluripotent stem cells in culture. *Methods Mol Biol* 2014;1185:181–94.
- [30] Notta F, Zandi S, Takayama N, Dobson SM, Gan OI, Wilson GJ, et al. Distinct routes of lineage development reshape the human blood hierarchy across ontogeny. *Science* 2016;351:aab2116.
- [31] Sanjuán-Pla A, Macaulay I, Jensen CT, Woll PS, Luís TC, Mead AJ, et al. Platelet-biased stem cells reside at the apex of the haematopoietic stem-cell hierarchy. *Nature* 2013;502:232–6.
- [32] Yamamoto R, Morita Y, Oeohara J, Hamaoka S, Onodera M, Rudolph KL, et al. Clonal Analysis Unveils Self-Renewing Lineage-Restricted Progenitors Generated Directly from Hematopoietic Stem Cells. *Cell* 2013;154:1112–26.
- [33] Takayama N, Nishimura S, Nakamura S, Shimizu T, Ohnishi R, Endo H, et al. Transient activation of c-MYC expression is critical for efficient platelet generation from human induced pluripotent stem cells. *J Exp Med* 2010;207:2817–30.
- [34] Thompson AD, Zhang Y, Kamen DE, Jackson C, Cardiff R, Ravid K. Deregulated expression of c-myc in megakaryocytes of transgenic mice increases megakaryopoiesis and decreases polyploidization. *J Biol Chem* 1996;271:22976–82.
- [35] Juin P, Hunt A, Littlewood TD, Griffiths B, Swigart LB, Korsmeyer SK, et al. c-Myc functionally cooperates with Bax to induce apoptosis. *Mol Cell Biol* 2002;22:6158–69.
- [36] Shivdasani RA, Rosenblatt M, Zucker-Franklin D, Jackson C, Hunt P, Saris CJM, et al. Transcription factor NF-E2 is required for platelet formation independent of the actions of thrombopoietin/MGDF in megakaryocyte development. *Cell* 1995;81:695–704.
- [37] Shivdasani RA, Fujiwara Y, McDevitt MA, Orkin SH. A lineage-selective knockout establishes the critical role of transcription factor GATA-1 in megakaryocyte growth and platelet development. *EMBO J* 1997;16:3965–73.
- [38] 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.
- [39] Kōsaki G. Platelet production by megakaryocytes: protoplatelet theory justifies cytoplasmic fragmentation model. *Int J Hematol* 2008;88:255–67.
- [40] Machlus KR, Italiano JE. The incredible journey: From megakaryocyte development to platelet formation. *J Cell Biol* 2013;201:785–96.
- [41] Thon JN, Montalvo AM, Patel-Hett S, Devine MT, Richardson JL, Ehrlicher A, et al. Cytoskeletal mechanics of proplatelet maturation and platelet release. *J Cell Biol* 2010;191:861–74.
- [42] Nishimura S, Nagasaki M, Kunishima S, Sawaguchi A, Sakata A, Sakaguchi H, et al. IL-1 α induces thrombopoiesis through megakaryocyte rupture in response to acute platelet needs. *J Cell Biol* [Internet] 2015;209:453–66 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25963822>.
- [43] Buduo CAD, 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.
- [44] Nakagawa Y, Nakamura S, Nakajima M, Endo H, Dohda T, Takayama N, et al. Two differential flows in a bioreactor promoted platelet generation from human pluripotent stem cell-derived megakaryocytes. *Exp Hematol* [Internet] 2013;41:742–8 <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0301472X13001653>.
- [45] Thon JN, Medvetz DA, Karlsson SM, Italiano JE. Road blocks in making platelets for transfusion. *J Thromb Haemost* 2015;13(Suppl 1):S55–62, <http://dx.doi.org/10.1111/jth.12942>.
- [46] Thon JN, Dykstra BJ, Beaulieu LM. Platelet bioreactor: accelerated evolution of design and manufacture. *Platelets* 2017;28:472–7.
- [47] Li Y, Ma TC, Kniss DA, Yang ST, Lasky LC. Human cord cell hematopoiesis in three-dimensional nonwoven fibrous matrices: in vitro simulation of the marrow microenvironment. *J Hematother Stem Cell Res* 2001;10:355–68.
- [48] Lefrançois E, Ortiz-Muñoz G, Caudrillier A, Mallavia B, Liu F, Sayah DM, et al. The lung is a site of platelet biogenesis and a reservoir for hematopoietic progenitors. *Nature* [Internet] 2017;544:105–9 <http://www.nature.com/doi/10.1038/nature21706> [cité le 26 mar].
- [49] Weyrich AS, Zimmerman GA. Platelets in lung biology. *Annu Rev Physiol* 2013;75:569–91.
- [50] Dunois-Lardé C, Capron CC, Fichelson S, Bauer T, Cramer-Bordé E, Baruch D. Exposure of human megakaryocytes to high shear rates accelerates platelet production. *Blood* 2009;114:1875–83.
- [51] Thon JN, Mazutis L, Wu SK, Sylman JL, Ehrlicher A, Machlus KR, et al. Platelet bioreactor-on-a-chip. *Blood* 2014;124:1857–67.
- [52] 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.
- [53] Blin A, Goff AL, 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, <http://dx.doi.org/10.1038/srep21700>.
- [54] Avanzi MP, Oluwadara OE, Cushing MM, Mitchell M, Fischer SL, Mitchell WB. A novel bioreactor and culture method drives high yields of platelets from stem cells. *Transfusion (Paris)* 2016;56:170–8.
- [55] Wang Y, Hayes V, Jarocha D, Sim X, Harper DC, Fuentes R, et al. Comparative analysis of human ex vivo-generated platelets vs megakaryocyte-generated platelets in mice: a cautionary tale. *Blood* 2015;125:3627–36.
- [56] Xi J, Zhu H, Liu D, Nan X, Zheng W, Liu K, et al. Infusion of Megakaryocytic Progenitor Products Generated from Cord Blood Hematopoietic Stem/Progenitor Cells: Results of the Phase 1 Study. *PLoS One* 2013;8:e54941, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0054941>.
- [57] Avanzi MP, Goldberg F, Davila JG, Langhi DM, Chiattonne CS, Mitchell WB. Rho kinase inhibition drives megakaryocyte polyploidization and proplatelet formation through MYC and NFE2 downregulation. *Br J Haematol* 2014;164:867–76.
- [58] Baatout S, Châtelain B, Staquet P, Symann M, Châtelain C. Inhibition of actin polymerization by cytochalasin B induces polyploidization and increases the number of nucleolar organizer regions in human megakaryocyte cell lines. *Anticancer Res* 1998;18:459–64.
- [59] Murphy AJ, Bijl N, Yvan-Charvet L, Welch CB, Bhagwat N, Rehe-man A, et al. Cholesterol efflux in megakaryocyte progenitors suppresses platelet production and thrombocytosis. *Nat Med* 2013;19:586–94.
- [60] Wang N, Tall AR. Cholesterol in platelet biogenesis and activation. *Blood* 2016;127:1949–53.
- [61] Boitano AE, Wang J, Romeo RD, 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.
- [62] Smith BW, Rozelle SS, Leung A, Ubellacker JM, Parks AJ, Nah SK, et al. The aryl hydrocarbon receptor directs hematopoietic progenitor cell expansion and differentiation. *Blood* 2013;122:376–85.
- [63] Wagner JE, Brunstein CG, Boitano AE, DeFor TE, McKenna DH, Sumstad D, et al. Phase I/II Trial of StemRegenin-1 Expanded Umbilical Cord Blood Hematopoietic Stem Cells Supports Testing as a Stand-Alone Graft. *Cell Stem Cell* 2016;18:144–55.
- [64] Strassel C, Brouard N, Mallo L, Receveur N, Mangin PH, 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.
- [65] Treleaven J, Gennery A, Marsh JCW, Norfolk DR, Page L, Parker A, et al. Guidelines on the use of irradiated blood components prepared by the British Committee for Standards in Haematology blood transfusion task force. *Br J Haematol* 2011;152:35–51.
- [66] Ito Y, Nakamura S, Sugimoto N, Arai F, Nishimura S, Correspondence KE, et al. Turbulence Activates Platelet Biogenesis to Enable Clinical Scale Ex Vivo Production Article Turbulence Activates Platelet Biogenesis to Enable Clinical Scale Ex Vivo Production. *Cell* [Internet] 2018;174, <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2018.06.011> [636-648.e18].
- [67] Pavenski K, Warkentin TE, Shen HP, Liu Y, Heddle NM. Posttransfusion platelet count increments after ABO-compatible versus ABO-incompatible platelet transfusions in noncancer patients: an observational study. *Transfusion (Paris)* 2010;50:1552–60.
- [68] Akabayashi A, Nakazawa E, Jecker NS. The world's first clinical trial for an aplastic anemia patient with thrombocytopenia administering platelets generated from autologous iPSC cells. *Int J Hematol* 2019;109:239–40.
- [69] Ikeda N, Kojima H, Nishikawa M, Hayashi K, Futagami T, Tsujino T, et al. Determination of HLA-A, -C, -B, -DRB1 allele and haplotype frequency in Japanese population based on family study. *Tissue Antigens* 2015;85:252–9.
- [70] Börger A-K, Eicke D, Wolf C, Gras C, Aufderbeck S, Schulze K, et al. Generation of HLA-Universal iPSC-Derived Megakaryocytes and Platelets for Survival Under Refractoriness Conditions. *Mol Med* [Internet] 2016;22:274–85 <https://molmed.biomedcentral.com/articles/10.2119/molmed.2015.00235> [cité le 14 avr 2020].
- [71] Lanier LL. Up on the tightrope: natural killer cell activation and inhibition. *Nat Immunol* 2008;9:495–502.
- [72] Figueiredo C, Wedekind D, Müller T, Vahlsing S, Horn PA, Seltsam A, et al. MHC Universal Cells Survive in an Allogeneic Environment after Incompatible Transplantation [Internet]. *BioMed Res Int* 2013;2013:1–12 <http://www.hindawi.com/journals/bmri/2013/796046/> [cité le 14 avr 2020].
- [73] Xu H, Wang B, Ono M, Kagita A, Fujii K, Sasaki N, et al. Targeted Disruption of HLA Genes via CRISPR-Cas9 Generates iPSCs with Enhanced Immune Compatibility [Internet]. *Cell Stem Cell* 2019;24 [566-578e7] <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1934590919300475> [cité le 26 fev 2020].
- [74] Weiss EH, Lilienfeld BG, Müller SM, Müller E, Herbach N, Kessler B, et al. HLA-E/human beta2-microglobulin transgenic pigs: protection against xenogeneic human anti-pig natural killer cell cytotoxicity. *Transplantation* 2009;87:35–43.
- [75] Zhao L, Teklemariam T, Hantash BM. Heterologous expression of mutated HLA-G decreases immunogenicity of human embryonic stem cells and their epidermal derivatives [Internet]. *Stem Cell Res* 2014;13:342–54 <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1873506114000932> [cité le 22 avr 2020].
- [76] Suzuki D, Flahou C, Yoshikawa N, Stirblyte I, Hayashi Y, Sawaguchi A, et al. iPSC-Derived Platelets Depleted of HLA Class I Are Inert to Anti-HLA Class I and Natural Killer Cell Immunity [Internet]. *Stem Cell Rep* 2019 [S221367111930414X] <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S221367111930414X> [cité le 27 dec 2019].
- [77] Metcalfe P. Platelet antigens and antibody detection. *Vox Sang* 2004;87:82–6, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1741-6892.2004.00437.x>.
- [78] Curtis BR. Recent progress in understanding the pathogenesis of fetal and neonatal alloimmune thrombocytopenia. *Br J Haematol* 2015;171:671–82.
- [79] Hayashi T, Hirayama F. Advances in alloimmune thrombocytopenia: perspectives on current concepts of human platelet antigens, antibody detection strategies, and genotyping. *Blood Transfus Trasfus Sanguie* 2015;13:380–90.
- [80] Ono Y, Wang Y, Suzuki H, Okamoto S, Ikeda Y, Murata M, et al. Induction of functional platelets from mouse and human fibroblasts by p45NF-E2/Maf. *Blood* 2012;120:3812–21.
- [81] Pulecio J, Alejo-Valle O, Capellera-Garcia S, Vitaloni M, Río P, Mejía-Ramírez E, et al. Direct Conversion of Fibroblasts to Megakaryocyte Progenitors. *Cell Rep* 2016;17:671–83.