



HAL
open science

Vers une production efficace de plaquettes à partir de cellules souches

D. Baruch, G. Sicot, S. Poirault-Chassac, A. Le Goff, V. Nivet-Antoine, A. Kauskot, C.V. Denis, I. Dusanter

► To cite this version:

D. Baruch, G. Sicot, S. Poirault-Chassac, A. Le Goff, V. Nivet-Antoine, et al.. Vers une production efficace de plaquettes à partir de cellules souches. Bulletin de l'Académie Nationale de Médecine, 2021, 205 (9), pp.1109-1116. 10.1016/j.banm.2021.07.022 . hal-03543171

HAL Id: hal-03543171

<https://hal.science/hal-03543171>

Submitted on 5 Jan 2024

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



Distributed under a Creative Commons Attribution - NonCommercial 4.0 International License

Vers une production efficace de plaquettes
à partir de cellules souches*

Cultured platelets from micro to macro, how to move towards an efficient production?

Dominique Baruch^{1,2,3}, Géraldine Sicot¹, Sonia Poirault-Chassac², Anne Le Goff³, Valérie Nivet-Antoine², Alexandre Kauskot⁴, Cécile V. Denis⁴ et Isabelle Dusanter⁵.

¹Société PlatOD, Paris Santé Cochin, Paris

²UMR_S INSERM U1140, Université de Paris

³BMBI - UMR CNRS 7338, Université de Technologie de Compiègne

⁴UMR_S INSERM U1176, Université Paris-Saclay, Le Kremlin-Bicêtre

⁵UMR_S INSERM U1016, Université de Paris

*Séance du 29 juin 2021. Les autres communications relatives à cette séance sont publiées dans le numéro portant la référence : Bull Acad Natl Med 2020;204:961-988

Résumé

Le mégacaryocyte (MK), cellule mère des plaquettes, subit des remaniements du cytosquelette et libère les plaquettes de façon synchronisée lorsqu'on lui applique dans un dispositif de flux fonctionnalisé avec du facteur Willebrand des forces de cisaillement comparables à celles qui initient l'adhérence des plaquettes à la surface vasculaire. Ce principe est robuste et fonctionne avec différentes sources de MK humains provenant du sang de cordon, du sang adulte mobilisé, de cellules souches embryonnaires (ES) ou d'une lignée immortalisée de MK (imMK) produite à partir de cellules souches pluripotentes induites (iPS). En parallèle, comprendre la biogénèse plaquettaire passe aussi par des hypothèses situées en amont de l'action du cytosquelette. Un consortium d'équipes académiques réuni autour de PlatOD et soutenu par l'ANR a établi un nouveau mécanisme régulateur en lien avec les variations des espèces réactives de l'oxygène (ROS). Nos résultats suggèrent que l'augmentation des taux d'oxygène dans le micro-environnement des MK matures de la moelle osseuse, en élevant les concentrations locales de ROS, déclenche une boucle d'auto-activation qui permet d'initier la biogénèse des plaquettes à partir de ces MK. Nous décrivons les étapes parcourues par différents groupes pour développer un laboratoire de production de plaquettes de culture *ex vivo*. De grands progrès ont été obtenus dans le domaine des plaquettes de culture, mais la production de plaquettes à grande échelle représente un défi majeur à relever dans les années à venir. La compréhension fine des mécanismes de la biogénèse des plaquettes à l'échelle micro contribuera à atteindre plus facilement le changement d'échelle de production.

Mots clés: Plaquettes - Mégacaryocytes - Flux - Facteur Willebrand – Espèces réactives de l'oxygène

Summary

Keywords: Platelets - Megakaryocytes - Flow – Von Willebrand Factor – Reactive oxygen species- Cell therapy

Megakaryocytes (MK) are platelet-generating cells that undergo a cytoskeletal reorganization and release platelets in a synchronized way, when they are exposed to a flow device coated with von Willebrand factor, to shear forces similar to those that initiate platelet adhesion to the vessel wall. Such principle is robust as it is reproduced with human MK of different sources from cord blood, mobilized adult blood, embryonic stem (ES) cells or an immortalized MK cell line (imMK) originated from induced pluripotent stem (iPS) cells. In addition, platelet biogenesis may involve a mechanism upstream of MK cytoskeletal reorganization. A consortium of academic teams and PlatOD - with the financial support of ANR - has established a new regulatory mechanism associated with the variations of reactive oxygen species (ROS) in mature MK. Indeed, our data suggest that increased levels of oxygen in the microenvironment of mature MK, by enhancing local ROS, trigger an auto-activation loop that then sustains platelet biogenesis. The present manuscript deals with the ways that different groups address the development of an *ex vivo* platelet production unit. Even if significant improvements have been obtained in the field of cultured platelets, it remains that large scale platelet production represents a major challenge for the coming years. Understanding such mechanisms at the research scale will contribute to scale-up platelet production.

1. Introduction

La fonction principale des plaquettes sanguines est la prévention des hémorragies spontanées et l'arrêt du saignement en cas de brèche vasculaire. Attirées sur le site de la blessure vasculaire, les plaquettes vont rapidement s'activer pour former un agrégat, renforcé par la présence de fibrine qui provient de l'activation de la cascade de la coagulation, en une succession d'étapes coordonnées. A l'inverse, un fonctionnement exacerbé des plaquettes conduit aux situations délétères de thrombose. Les plaquettes présentent d'autres propriétés dans la cicatrisation, l'angiogenèse et la production de facteurs de croissance notamment [1].

Les indications de la transfusion de concentrés plaquettaires provenant de donneurs pour le traitement ou la prévention de l'hémorragie concernent majoritairement les patients en oncologie (50%), en contexte chirurgical (~10%), et en soins intensifs (5 à 15%). Tandis que la sécurité envers le risque infectieux a augmenté durant les 30 dernières années, cette amélioration s'est faite au détriment de l'efficacité, certaines techniques ayant diminué le rendement transfusionnel et augmenté la fréquence transfusionnelle [2]. La gestion des stocks de concentrés plaquettaires est complexe en raison de leur température de conservation (20-25°C) ou de leur durée de péremption (5-7 jours). Cela oblige les établissements de transfusion à répéter les appels aux dons dans des conditions de pénurie de donneurs rencontrée lors du confinement imposé par la pandémie de Covid-19, dans des conditions climatiques extrêmes, ou simplement en période de vacances. L'avantage des plaquettes produites *ex vivo* est d'être un produit standardisé dont l'efficacité est prévisible et documentée, fabriqué de manière stérile, et disponible dès la production contrairement aux plaquettes de donneurs qui doivent subir les contrôles/traitements bactériens/viraux (au moins 1,5 jours). Disposer de plaquettes dès leur production est une garantie de meilleure qualité puisque l'efficacité des plaquettes diminue au cours du stockage. Cette revue décrit

les aspects de la production de plaquettes liés au flux pour faire le point sur 10 ans de développements de bioréacteurs et examine les éléments qui semblent favoriser le succès du changement d'échelle pour une application industrielle. Elle présente également les avancées sur la compréhension de la façon dont elles sont produites physiologiquement sous l'effet du gradient de pression d'oxygène lors du passage dans la circulation pulmonaire.

2. Production des plaquettes

2.1. Organes de production des plaquettes

Les plaquettes proviennent de la différenciation des cellules souches hématopoïétiques (CSH) de la moelle osseuse en mégacaryocytes (MK). A la suite d'étapes successives de différenciation et d'endomitoses, le MK atteint l'état de maturation lui permettant de libérer les plaquettes en dehors de la moelle, dans la circulation sanguine. C'est seulement en 2007 que la preuve en a été apportée directement grâce à la microscopie multiphotonique au niveau de la boîte crânienne de la souris vivante [3]. Les auteurs ont observé que les MK proches des vaisseaux sinusoides de la moelle se déforment pour émettre de longs prolongements qui franchissent la paroi du vaisseau constituée d'une couche de cellules endothéliales. Après leur passage transendothélial, ces extensions de MK subissent très rapidement des modifications sous l'effet du flux sanguin. Le poumon est aussi un organe de production de plaquettes connu depuis près d'un siècle grâce à l'observation d'une augmentation du nombre de plaquettes à la sortie de la circulation pulmonaire comparée à celle dans les artères pulmonaires [4], confirmé par une étude ultra-structurale dans les capillaires pulmonaires [5] et récemment de façon élégante par des expériences de souris transgéniques [6]. Ces travaux soulèvent la question de savoir si le poumon est un organe hématopoïétique ou bien si, plus vraisemblablement, il est un lieu de remodelage des

extensions pro-plaquettaires issues de la moelle osseuse voire des MK eux-mêmes lorsqu'ils sont sortis de la MO pour diverses raisons physiopathologiques. Il est important de noter que la production de plaquettes à l'état physiologique se fait à l'extérieur de la moelle osseuse, et que tous les facteurs contribuant à faire sortir les MK de la moelle sont susceptibles d'augmenter la production de plaquettes.

2.2. Principes de production de plaquettes en flux

2.2.1. Effet mécanique du flux dépendant de la liaison au facteur Willebrand

Les plaquettes sont essentielles pour arrêter et prévenir les hémorragies en étant responsables de l'hémostase dans le flux sanguin, et c'est grâce à leur interaction avec le facteur Willebrand (VWF) en présence de forces de cisaillement (FC) générées par le frottement des couches de fluide entre elles, qu'elles peuvent se localiser au niveau de la blessure vasculaire et arrêter le saignement. Ceci est étudié dans différents modèles expérimentaux d'adhérence des plaquettes à la paroi vasculaire en conditions de flux développés à la suite des travaux princeps de Kjell Sakariassen [7]. En étendant le concept d'adhérence des plaquettes en flux à celui de la naissance des plaquettes à partir de MK, nous avons montré pour la première fois en temps réel la naissance des plaquettes en faisant circuler à FC élevées dans une chambre de perfusion recouverte de VWF, des MK matures humains produits en culture, et en observant par vidéomicroscopie en contraste de phase les déformations des MK et l'apparition d'extensions cytoplasmiques en forme de colliers de perles qui se détachent pour libérer des proplaquettes et des plaquettes [8]. En effet, la présence du récepteur du VWF (la GPIb) à la surface des MK matures permet d'accélérer, de synchroniser et d'augmenter la production de plaquettes sous l'effet du flux en présence de VWF. Le VWF est une protéine comportant différents domaines de liaison à ses récepteurs

plaquettaires (GPIb, $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$) et aux composants de la paroi vasculaire [9]. Récemment, nous avons observé qu'au lieu d'utiliser la protéine plasmatique purifiée complète (Wilfactin[®], LFB), nous pouvons nous limiter à des fragments recombinants du VWF préparés dans les cellules BHK qui expriment le domaine de liaison à la GPIb, soit seul, soit combiné au domaine de liaison à $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$. Nos résultats montrent que la production de plaquettes est améliorée par le VWF ou ses fragments recombinants, par rapport à un témoin représenté par l'albumine (BSA) qui ne permet pas l'accroche des MK à FC élevées. L'intérêt de cette étude est de préciser l'influence du site de liaison à la GPIb seul ou associé au site de liaison à $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$, d'autre part, d'ouvrir la voie à une approche d'ingénierie de fragments protéiques dans une logique industrielle (Collaboration PlatOD-UMR_S INSERM U1176, données non publiées). Enfin, notons que l'intensité de la production de plaquettes en flux n'est pas corrélée au % d'expression du récepteur GPIb [10].

2.2.2. Importance du gradient d'oxygène dans la moelle osseuse

De nombreux arguments indiquent l'importance d'une signalisation dépendante de l'oxygène dans la maturation des MK. Les MK matures sont situés à proximité des vaisseaux sinusoides de la moelle osseuse [3]. De façon directe, il existe une polarité de leur passage transendothélial, avec l'existence d'un gradient d'oxygène entre le microenvironnement de la moelle osseuse et l'espace intra-vasculaire [11] indiquant une organisation spatiale de la thrombopoïèse [12]. De nombreux médiateurs chimiques peuvent augmenter la thrombopoïèse par le biais de voies de signalisation impliquant les ROS [13-15]. Les mitochondries représentent une source majeure de ROS dans de nombreux types cellulaires et la dynamique mitochondriale a un impact important sur cette production des ROS et sur la différenciation cellulaire [16] ; en particulier dans la neurogénèse et la maturation neuronale [17], dont une étape-clé est l'extension de longues projections comme le font les MK. Nous

avons récemment établi un rôle des ROS et de la dynamique mitochondriale dans le déclenchement de la thrombopoïèse à partir des MK humains parvenus à maturation [18]. Ceci est en faveur d'un modèle d'auto-amplification entre l'augmentation de pression d'oxygène et la production de ROS dans les MK matures qui permet de déclencher l'initiation de la thrombopoïèse et de maintenir la formation des plaquettes [18].

3. Le procédé microfluidique

3.1. Deux générations de dispositifs microfluidiques

Le modèle de flux initial dans un canal lisse s'est révélé intéressant pour observer les modifications morphologiques des cellules, mais peu adapté à la caractérisation de grandes quantités de plaquettes. La première génération de puce microfluidique dédiée à la production de plaquettes repose sur le principe du confinement des MK à l'intérieur d'un canal comportant une forêt de micropiliers, ce qui permet d'augmenter le nombre de MK en contact avec les surfaces recouvertes de VWF, puis leur fragmentation en proplaquettes et en plaquettes sous l'effet des FC (*Figure 1*) [19]. Les MK [$1-2 \cdot 10^5/\text{mL}$] sont perfusés à un débit de $333 \mu\text{L}/\text{min}$ à FC de 1800 s^{-1} et recirculent de façon continue pendant 2 heures. L'aspect des MK en colliers de perles est retrouvé avec toutes les sources de MK testées, démontrant la robustesse du procédé (*Figure 2*). Afin d'améliorer le rendement exprimé en nombre de plaquettes recueillies à la sortie de la puce par nombre de MK initialement introduits dans la puce, (de l'ordre de 5 plaquettes/MK issu de sang de cordon ombilical), plusieurs puces microfluidiques ont été fabriquées pour déterminer la longueur optimale de la zone texturée, la géométrie d'organisation des piliers dans la direction du flux et dans la direction perpendiculaire au flux, et l'organisation de piliers les uns par rapport aux autres. En comparant le nombre de plaquettes produites dans la puce de 1^e génération, la géométrie

interne de la puce de 2^{ème} génération a été déterminée. Sa principale caractéristique est d'avoir des espaces inter-piliers organisés selon un gradient de taille qui décroît sur le premier centimètre de la partie texturée. Elle permet d'augmenter le rendement d'un facteur 2 mais surtout d'introduire des volumes et des concentrations de cellules en quantité 10 fois supérieure à celles de la puce de 1^e génération.

Une autre approche pour augmenter le rendement consiste à comprendre les déterminants des fragmentations conduisant aux proplaquettes et aux plaquettes. Pour cela, des outils microfluidiques adaptés à l'observation des cellules individuelles, ont été développés. Dans une chambre d'écoulement abritant des piliers très espacés, les MK peuvent s'allonger sans interagir avec les piliers ou les cellules voisines. En calculant le taux d'élongation, défini par la variation de vitesse divisée par la distance entre deux renflements (proplaquettes) au sein du MK en élongation, on observe des taux d'élongation très variables, voire négatifs indiquant une contraction (*Figure 3*). Ces variations entre élongation et contraction se manifestent autour d'une plaquette en formation. Ceci indique que les MK immobilisés se déforment de façon très hétérogène, en dépit de l'homogénéité des forces de cisaillement exercées par l'écoulement. Les mécanismes qui mènent à cette localisation et déterminent la position et le moment des ruptures sont encore largement inconnus.

En parallèle des progrès dans l'obtention de puce microfluidique, les plaquettes produites ont été caractérisées en les comparant à des plaquettes isolées du sang. Ces plaquettes ont une taille un peu plus grande (2-7 μm) que celle des plaquettes du sang ; l'expression des récepteurs de surface par mesure quantitative révèle que celle des récepteurs CD61, CD41, CD49 et CD36 est semblable à celle des plaquettes du sang ou de poches de sang, mais toujours un peu plus basse pour CD42b et CD42a. Les plaquettes ne sont pas activées à l'état basal, et sont activables par le peptide d'activation du récepteur de la thrombine (TRAP)

combiné à l'ADP, avec une fixation de l'anticorps PAC-1 de 80% de plaquettes positives (tandis que les plaquettes du sang sont toutes positives dans les mêmes conditions). L'ultrastructure en microscopie électronique à transmission (MET) montre que les plaquettes sont équipées de tous les organites des plaquettes du sang, et leur injection à la souris immunodéficiente révèle que ces plaquettes circulent et ont une demi-vie de $17,3 \pm 2,0$ h vs $22,4 \pm 1,7$ h pour les plaquettes isolées du sang (*Figure 4*).

3.2. Sources de cellules

L'origine des cellules productrices de plaquettes influence le comportement des cellules en flux dans le dispositif microfluidique. Sur le plan qualitatif, le même phénomène est observé, consistant en l'accroche des MK sur les piliers, suivie de remaniements et d'élongations du cytosquelette pour parvenir à la fragmentation en proplaquettes et en plaquettes [19]. Cette séquence est reproduite avec une majorité des sources de cellules, qu'il s'agisse de CSH primaires (sang de cordon, sang périphérique mobilisé, ou de cellules souches soit ES, soit iPS [20]). Afin de s'affranchir de la variabilité liée à l'utilisation de cellules primaires, il a été possible de tester une lignée mégacaryocytaire immortalisée développée par l'équipe de K. Eto (cf § 3.3) [21]. En 2018, la Société PlatOD a effectué des expériences préliminaires à Kyoto et a ensuite signé un accord de transfert de matériel avec la société Megakaryon pour étudier la production de plaquettes dans ses puces microfluidiques à partir de cette lignée. Les cellules sont maintenues en culture en l'absence de doxycycline pendant 1 à 6 jours sous agitation continue, puis introduites dans la puce microfluidique et la production est suivie au cours du temps pendant 3 heures. Dans la puce de 1^e génération, nous avons montré une production de plaquettes qui augmente en fonction du nombre de jours de culture (sous agitation douce avant le flux), pour atteindre un rendement de 52 plaquettes par MK en 2,5 heures après 4 à

5 jours de culture et décroît au 6^e jour. Le passage dans la puce microfluidique de 2^{ème} génération de PlatOD permet d'atteindre des rendements de 80 à 100 plaquettes/imMK après 4 jours de culture.

3.3. *Les différents bioréacteurs : avantages et inconvénients*

Selon les étapes du procédé physiologique de formation des plaquettes, plusieurs bioréacteurs ont été développés qui miment le procédé complet ou certaines de ces étapes. Le modèle que PlatOD a développé s'inspire de l'étape terminale de production de plaquettes après le passage transendothélial des MK matures. Il reprend aussi le concept de « progénie » des plaquettes, selon lequel le procédé de formation des proplaquettes ne se limite pas à la sortie de la moelle osseuse, mais se poursuit dans la circulation [22]. Le bioréacteur développé à Harvard (US) par la Société Platelet Biogenesis (actuellement PlateletBio) est formé de deux canaux séparés par une membrane, fonctionnant sur le mimétisme de l'étape du passage des MK au travers des sinusoides de la moelle. Les MK passent dans le canal central qui est fermé à une extrémité, les cellules sont obligées de passer par les pores de la membrane et étendent leurs proplaquettes dans le canal extérieur. Les pores ont une taille inférieure à celle des cellules (de 3 -10 μm) et la capacité en cellules est limitée. Le débit est de 5 -150 mL/h, et la parallélisation est de 16 canaux [23]. Le bioréacteur développé par le groupe d'Alessandra Balduini mime également le passage des MK hors de la moelle. Ici les cellules sont introduites dans une structure d'éponge biocompatible d'origine animale (provenant du ver à soie) qui comporte des pores de taille plus grande, de 126 μm en moyenne. Plusieurs générations de bioréacteurs ont été décrites par cette équipe [24-26] . Dans une publication récente, il est montré que les MK doivent coloniser toutes les zones puis être drainés dans des canaux sous un flux ayant un débit de 10 $\mu\text{L}/\text{min}$ pendant 6 heures. L'équipe Japonaise a développé des

bioréacteurs permettant de cultiver sous agitation continue plusieurs litres de cellules pendant 6 jours dans un système clos par ondulations (Wave), produisant un rendement de production de l'ordre de 20 plaquettes/MK, qui a été amélioré à 80 plaquettes/MK dans un bioréacteur qui fonctionne sur le principe de turbulences créées par des mouvements de va-et-vient de deux pales introduites dans une bonbonne de grande capacité (8 litres) [27]. Cependant, comme les deux autres bioréacteurs, ce bioréacteur fonctionne sans la présence de VWF et de FC élevées et ne possède pas la rapidité du procédé de PlatOD (optimisé dans sa puce pour la production de plaquettes après 4 jours de culture des cellules imMK, cf §3.2) puisque les plaquettes sont recueillies 6 jours après l'introduction des cellules.

3.4. *Optimisation du rendement de production*

Pour finir cette partie consacrée à la production de plaquettes *ex vivo* dans des dispositifs de flux, les chiffres de rendement décrits plus hauts doivent être mis en perspective avec ceux qui apparaissent dans la littérature. En mettant en rapport le nombre de MK sortant de la moelle osseuse et le nombre de plaquettes circulantes, un calcul théorique indique que chaque MK permet de produire environ 1000 plaquettes [6]. Les premières estimations expérimentales du rendement en plaquettes par MK qu'on retrouve de façon récurrente datent des années 2005, et sont basés sur des extrapolations d'observation en vidéomicroscopie de formation de proplaquettes de souris pendant des cultures de plusieurs jours mais sans recueillir les plaquettes [28]. Dès que le calcul tient compte d'une production réelle de plaquettes mesurées, l'utilisation de MK en culture permet de produire entre 10 et 100 plaquettes par MK [23]. Le rendement est de 15 plaquettes par MK dans une approche consistant à calculer une production *in vivo* de plaquettes à partir d'un nombre connu de MK

humains dérivés de CSH de moelle ou de sang périphérique mobilisées qui sont perfusés à la souris [29]. Ces chiffres sont confirmés dans une étude récente [30].

4. Perspectives industrielles

Dans les laboratoires spécialisés s'intéressant aux propriétés des plaquettes isolées des autres constituants sanguins, s'il est aisé d'obtenir des plaquettes sanguines en s'adressant à la banque de sang, il est nécessaire d'agir rapidement car les plaquettes perdent leurs propriétés dans l'hémostase dès lors qu'elles se trouvent hors du corps humain, qu'elles soient ou non isolées de leur environnement plasmatique et/ou cellulaire [31]. Caractériser les plaquettes produites *ex vivo* nécessite de recueillir et d'isoler les quantités de plaquettes suffisantes dans une suspension dépourvue de MK : par exemple le test classique d'agrégation se fait avec $2 \cdot 10^7$ plaquettes par échantillon [30] et l'étude de la transfusion des plaquettes chez le lapin thrombopénique avec 10^{10} plaquettes [27]. La source de MK représente un facteur limitant à ces études, car il est plus difficile de disposer de façon régulière d'une quantité importante de MK dérivés de CSH primaires que d'une lignée MK immortalisée. En compilant l'ensemble des données de rendement de production de plaquettes obtenues par le procédé de PlatOD dans la puce microfluidique de deuxième génération, en fonction de la taille des cellules, une relation entre taille des cellules et rendement de production a été observée, ce qui confirme l'importance de la ploïdie dans le mécanisme de formation des proplaquettes déjà connu lors de la mégacaryopoïèse [32]. Dans une revue récente exhaustive des bioréacteurs de production plaquettaire, le rendement le plus élevé cité ne dépasse pas 100 plaquettes par MK [33]. Les voies d'amélioration restent nombreuses, mais il est maintenant probable que les rendements de 1000 plaquettes par MK ne sont pas obtenus immédiatement lors d'une

production *ex vivo*, mais peuvent être obtenus *in vivo*, lorsque les plaquettes sont présentes dans la circulation sanguine et continuent de se fragmenter sous l'effet du flux [22, 34].

Dans une perspective de production à des fins thérapeutiques, une question centrale pour l'aspect économique est de disposer d'un levier qui permet d'augmenter l'efficacité de la production de plaquettes/MK de culture sans augmenter de façon démesurée les coûts de la production de MK, c'est-à-dire les volumes de milieu de culture, des cytokines et des facteurs de croissance. Aussi l'utilisation d'un dispositif de flux, qui produit des plaquettes pendant un temps relativement court, permet d'introduire des quantités élevées de cellules sous forme concentrée, ce qui réduit les volumes de milieux de culture et garantit aux plaquettes un état de fraîcheur compatible avec l'expression de leurs propriétés hémostatiques, permettant des gains économiques substantiels. La parallélisation des dispositifs microfluidiques permet de multiplier la quantité de plaquettes produites, mais elle multiplie aussi les coûts en ajoutant aux frais de culture, les frais de microfabrication. L'approche « macro » pour le modèle de production de plaquettes devrait combiner les propriétés des microcanaux microfluidiques avec une bien plus grande capacité de volumes de suspensions cellulaires (de l'ordre de 10 litres). L'élaboration d'une telle unité de production de plaquettes requiert une adaptabilité du procédé au changement d'échelle, c'est-à-dire de pouvoir conserver ses propriétés de rendements de production et de qualité fonctionnelle des plaquettes entre l'échelle microscopique et la fabrication industrielle de plaquettes à but thérapeutique. C'est sur ce dispositif évolutif que la Société HémostOD va désormais porter ses efforts.

5. Conclusion : au-delà du biomimétisme ?

Produire en grande quantité des MK de bonne qualité à partir d'une lignée établie représente une étape-clé, car les coûts de la culture sont incontournables. C'est pourquoi le recours à un

dispositif de flux efficace représente le passage nécessaire pour réussir le changement d'échelle et maîtriser les coûts. Mais la réussite de la production doit être abordée de façon pragmatique : une approche transversale sera indispensable.

Le concept de dispositif de flux reproduisant la production naturelle des plaquettes dans la moelle a évolué. S'inspirer de la nature, certes, mais en gardant présent à l'esprit l'évolution des connaissances. Nos travaux soulignent l'importance de se libérer des modèles établis, par exemple, faut-il mimer la production à partir des MK quittant la moelle osseuse ? L'état des connaissances a progressé et s'il fallait définir un organe de production plaquettaire, il faudrait associer à la moelle osseuse, les capillaires pulmonaires et la continuité du réseau vasculaire. La réussite d'une production de plaquettes hors du corps humain sera plus que jamais conditionnée par l'obtention d'une plateforme de production en flux construite par une équipe multidisciplinaire de biologistes, d'ingénieurs et de physiciens.

6. Remerciements

Les auteurs remercient l'Agence Nationale de Recherches pour son soutien financier par le programme ANR-17-PRCE18-0025 (TRIMEP).

7. Liens d'intérêt

Dominique Baruch est consultante de HemostOD SA.

8. Références

1. Leslie M. Beyond Clotting: The Powers of Platelets. *Science*. 2010;328(5978):562-4.
2. Garban F, Guyard A, Labussière H, Bulabois CE, Marchand T, Mounier C, et al. Comparison of the Hemostatic Efficacy of Pathogen-Reduced Platelets vs Untreated Platelets in Patients With Thrombocytopenia and Malignant Hematologic Diseases: A Randomized Clinical Trial. *JAMA Oncol*. 2018;4(4):468-75.
3. Junt T, Schulze H, Chen Z, Massberg S, Goerge T, Krueger A, et al. Dynamic visualization of thrombopoiesis within bone marrow. *Science*. 2007;317.

4. Howell WH, Donahue DD. The production of blood platelets in the lungs. *The Journal of Experimental Medicine*. 1937;65(2):177-203.
5. Zucker-Franklin D, Philipp CS. Platelet Production in the Pulmonary Capillary Bed : New Ultrastructural Evidence for an Old Concept. *Am J Pathol*. 2000;157(1):69-74.
6. Lefrancais 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(7648):105-9.
7. Sakariassen KS, Fressinaud E, Girma JP, Meyer D, Baumgartner HR. Role of platelet membrane glycoproteins and von Willebrand factor in adhesion of platelets to subendothelium and collagen. *Ann N Y Acad Sci*. 1987;516:52-65.
8. Dunois-Larde C, Capron C, Fichelson S, Bauer T, Cramer-Borde E, Baruch D. Exposure of human megakaryocytes to high shear rates accelerates platelet production. *Blood*. 2009;114(9):1875-83.
9. Baruch D. Interactions plaquettes-paroi vasculaire. *Thérapie*. 2006;61(5):371-8.
10. Six KR, Sicot G, Devloo R, Feys HB, Baruch D, Compernelle V. A comparison of haematopoietic stem cells from umbilical cord blood and peripheral blood for platelet production in a microfluidic device. *Vox Sang*. 2019;114(4):330-9.
11. Mostafa SS, Miller WM, Papoutsakis ET. Oxygen tension influences the differentiation, maturation and apoptosis of human megakaryocytes. *British journal of haematology*. 2000;111(3):879-89.
12. Stegner D, vanEeuwijk JMM, Angay O, Gorelashvili MG, Semeniak D, Pinnecker J, et al. Thrombopoiesis is spatially regulated by the bone marrow vasculature. *Nature communications*. 2017;8(1):127.
13. Luff SA, Kao C-Y, Papoutsakis ET. Role of p53 and transcription-independent p53-induced apoptosis in shear-stimulated megakaryocytic maturation, particle generation, and platelet biogenesis. *PLoS ONE*. 2018(9).
14. Chen S, Su Y, Wang J. ROS-mediated platelet generation: a microenvironment-dependent manner for megakaryocyte proliferation, differentiation, and maturation. *Cell Death Dis*. 2013;4:e722.
15. O'Brien JJ, Spinelli SL, Tober J, Blumberg N, Francis CW, Taubman MB, et al. 15-deoxy- Δ 12,14-PGJ2 enhances platelet production from megakaryocytes. *Blood*. 2008;112(10):4051-60.
16. Chen S, Hu M, Shen M, Xu Y, Wang C, Wang X, et al. Dopamine induces platelet production from megakaryocytes via oxidative stress-mediated signaling pathways. *Platelets*. 2017;1-7.
17. Steib K, Schäffner I, Jagasia R, Ebert B, Lie DC. Mitochondria Modify Exercise-Induced Development of Stem Cell-Derived Neurons in the Adult Brain. *Journal of Neuroscience*. 2014;34(19):6624-33.
18. Poirault-Chassac S, Nivet-Antoine V, Houvert A, Kauskot A, Lauret E, Lai-Kuen R, et al. Mitochondrial dynamics and reactive oxygen species initiate thrombopoiesis from mature megakaryocytes. *Blood Advances*. 2021;5(6):1706-18.
19. 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.
20. 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(13):2817-30.

21. 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(4):535-48.
22. Schwertz H, Koster S, Kahr WHA, Michetti N, Kraemer BF, Weitz DA, et al. Anucleate platelets generate progeny. *Blood*. 2010;115(18):3801-9.
23. Thon JN, Mazutis L, Wu S, Sylman JL, Ehrlicher A, Machlus KR, et al. Platelet bioreactor-on-a-chip. *Blood*. 2014;124(12):1857-67.
24. 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(14):2254-64.
25. Di Buduo CA, Soprano PM, Tozzi L, Marconi S, Auricchio F, Kaplan DL, et al. Modular flow chamber for engineering bone marrow architecture and function. *Biomaterials*. 2017;146(Supplement C):60-71.
26. Tozzi L, Laurent P-A, Di Buduo CA, Mu X, Massaro A, Bretherton R, et al. Multi-channel silk sponge mimicking bone marrow vascular niche for platelet production. *Biomaterials*. 2018;178:122-33.
27. 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(3):636-48.
28. Richardson JL, Shivdasani RA, Boers C, Hartwig JH, Italiano JE, Jr. Mechanisms of organelle transport and capture along proplatelets during platelet production. *Blood*. 2005;106(13):4066-75.
29. 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(23):3627-36.
30. 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. *Scientific Reports*. 2020;10(1).
31. Hechler B, Ohlmann P, Chafey P, Ravanat C, Eckly A, Maurer E, et al. Preserved functional and biochemical characteristics of platelet components prepared with amotosalen and ultraviolet A for pathogen inactivation. *Transfusion*. 2013;53(6):1187-200.
32. Avanzi MP, Mitchell WB. Ex vivo production of platelets from stem cells. *Br J Haematol*. 2014;165(2):237-47.
33. Ingavle G, Shabrani N, Vaidya A, Kale V. Mimicking megakaryopoiesis in vitro using biomaterials: Recent advances and future opportunities. *Acta Biomaterialia*. 2019;96:99.
34. Poirault-Chassac S, Nguyen KA, Pietrzyk A, Casari C, Veyradier A, Denis CV, et al. Terminal Platelet Production is Regulated by Von Willebrand Factor. *PLoS ONE*. 2013;8(5):e63810.

Légendes des Figures

Figure 1 : représentation de la puce microfluidique à 16 canaux parallèles disposés sur une largeur de 500 μm et une longueur de 13,2 cm en forme de serpent, comportant des piliers répartis sur toute la hauteur du canal de 55 μm , et dans la direction du flux au niveau de 3 zones de 4,4 cm chacune. Chaque pilier a un rayon de 15 μm , est situé à une distance de 85 μm (de centre-à-centre) des autres piliers, et une inclinaison de 15° est observée dans la direction perpendiculaire au flux.

Figure 2 : microphotographie de formation de « colliers de perles » lors de l'ancrage du MK à un micro-pilier (visible à gauche des photos des 4 premières lignes) dans la puce microfluidique. MK-CO : MK provenant de sang de cordon ; MK-SP de sang périphérique ; MK-ES de cellules ES ; MK-iPS de cellules iPS ; imMK de lignée immortalisée.

Figure 3 : Elongation et ruptures à l'échelle du MK individuel ancré sur un pilier d'une chambre microfluidique à piliers espacés.

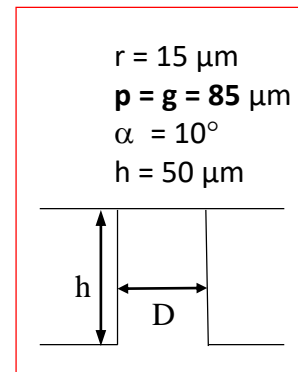
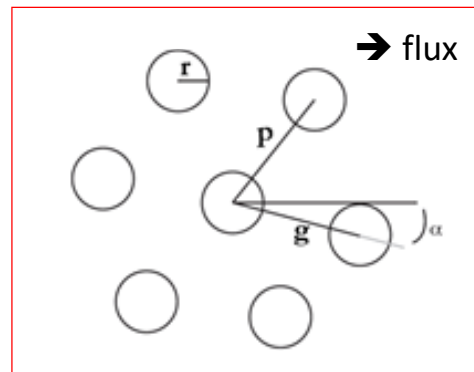
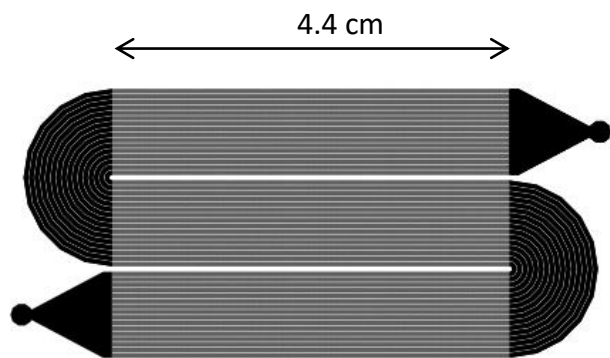
Panneaux supérieurs : Observation en champ clair d'un MK en élongation avant panneau du haut) et après (panneau du milieu) fragmentation d'une proplaquette à l'extrémité opposée au pilier (indiquée par une flèche verticale blanche). L'écoulement se fait de la gauche vers la droite.

Panneau du bas : Cartographie du taux d'élongation, calculé comme la variation temporelle, normalisée, de la distance entre deux plaquettes voisines au sein du MK en élongation. Certaines régions s'allongent rapidement (en rouge foncé), d'autres moins vite (en jaune), voire se contractent (en bleu).

Figure 4 : Caractérisation des plaquettes formées ex vivo

Panneau de gauche : Microphotographie d'une plaquette produite ex vivo, montrant les organites typiques de plaquettes sanguines.

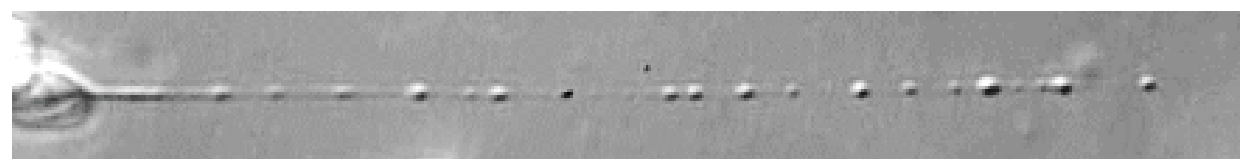
Panneau de droite : calcul de la demi-vie de plaquettes humaines produites ex vivo (exPLT) injectée à une souris immuno-déprimée (cercles noirs) comparativement aux plaquettes isolées du sang (bPLT, carrés blancs). L'axe vertical indique le pourcentage de plaquettes humaines parmi les plaquettes totales de la souris.



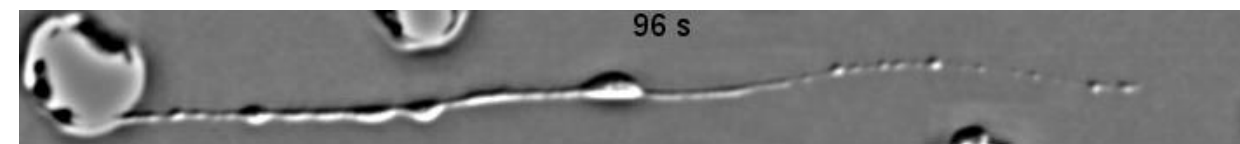
MK-CO



MK -SP



MK -ES



MK -iPS



imMK

