

LES PLAQUETTES DE CULTURE : UNE BIOTHÉRAPIE D'AVENIR POUR DES IMPASSES THÉRAPEUTIQUES

ETAT DES LIEUX

Catherine Strassel

Chercheuse EFS, GEST, Strasbourg



- SOCIÉTÉ FRANÇAISE DE TRANSFUSION SANGUINE, MARSEILLE, FRANCE, 24-26 NOVEMBRE 2021



DES PLAQUETTES DE CULTURE POUR RÉPONDRE A DES PROBLÉMATIQUES TRANSFUSIONNELLES

○ Assurer l'auto-suffisance

- **Viellissement de la population** (chimiothérapie, radiothérapie, soins palliatifs...)
=> Accroissement de la demande en CP
- **Stagnation du nombre de donneurs**
- **Durée de conservation limitée** des CP
- **Aléas de collectes** : Congés scolaires, Pandémie...

○ Garantir la sécurité transfusionnelle

- **CP indemnes de risques infectieux, inflammatoires et immunitaires**

○ Répondre à des impasses transfusionnelles

- **Etats réfractaires lié à l'allo-immunisation**
- **Thrombopénie néonatale auto-immune (1/230000)**

=> **Demande croissante de CP phénotypés (5-20%):**

Difficultés d'accès, besoin de planification des dons => Surcoûts hospitaliers

Plaquettes Universelles
HLA1-/-
+
HPA compatibles

DES PLAQUETTES DE CULTURE POUR RÉPONDRE A DES IMPASSES HORS DU CHAMP TRANSFUSIONNEL

Prévenir et stopper les saignements



**Progression
tumorale**

**Réparation
Tissulaire**

Inflammation

Immunité

=> **Capacité d'interaction avec des cellules cibles + Délivrance
de substances sur des sites localisés**

**Plaquettes exprimant des
molécules à visée thérapeutique**
ex : PDL1, IL12...
(± association de substances)

autres cibles à déterminer

LES PRÉREQUIS À LA PRODUCTION DE PLAQUETTES DE CULTURE

Plaquettes Universelles

Plaquettes « Cargo »
(expression de molécules thérapeutiques)

Production industrielle des plaquettes de culture

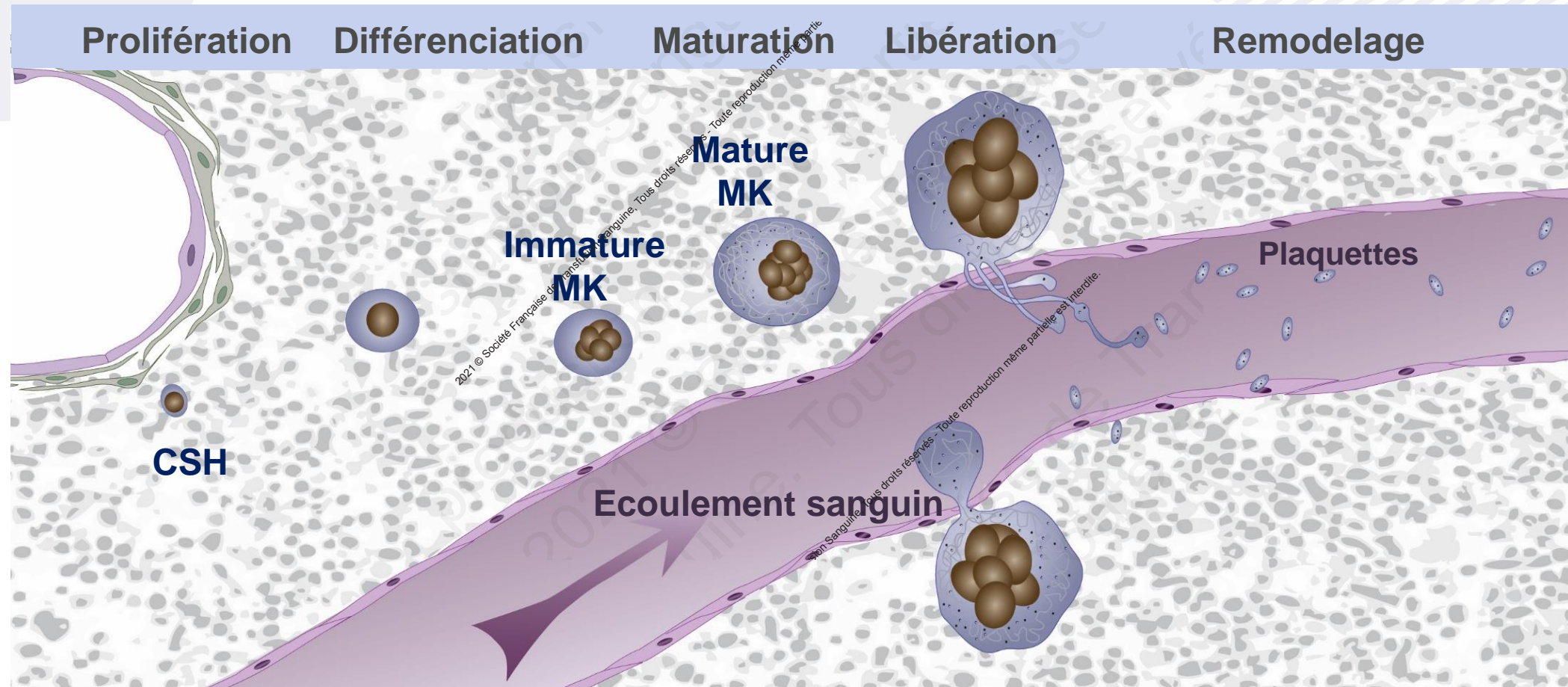
Plaquettes produites à la demande à partir d'une source inépuisable
=> immortalisation d'un progéniteur MK immunocompatible

Plaquettes fonctionnelles en quantité suffisante (développement d'un bioréacteur+ dispositif efficient de libération de plaquettes)

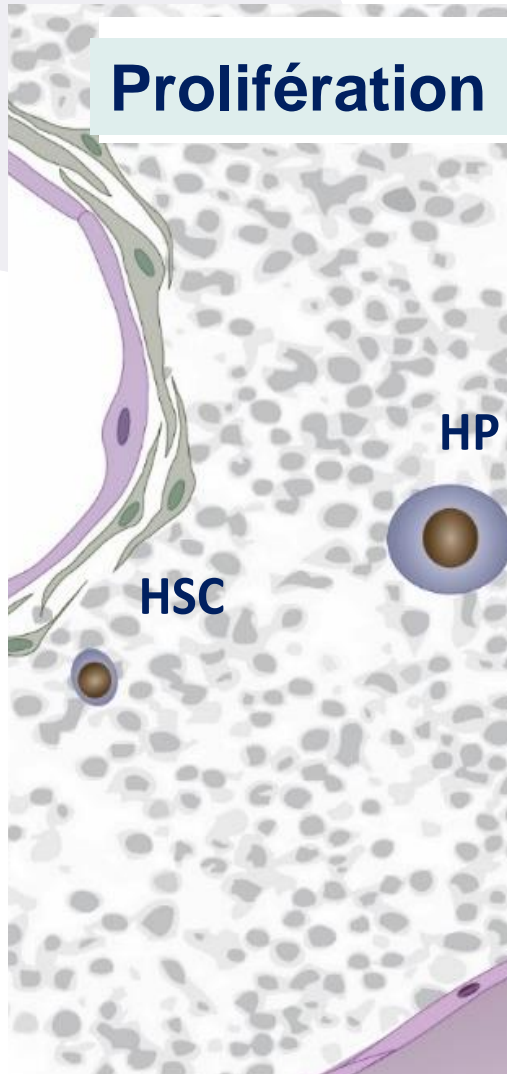
Production à coût raisonnable en adéquation avec le service médical rendu

LA MEGACARYOPOÏÈSE

❖ Production de plaquette de culture : de la recherche fondamentale à ses applications par itérations



LES DIFFÉRENTES SOURCES DE CELLULES SOUCHES



Cellules souches pluripotentes induites : iPS

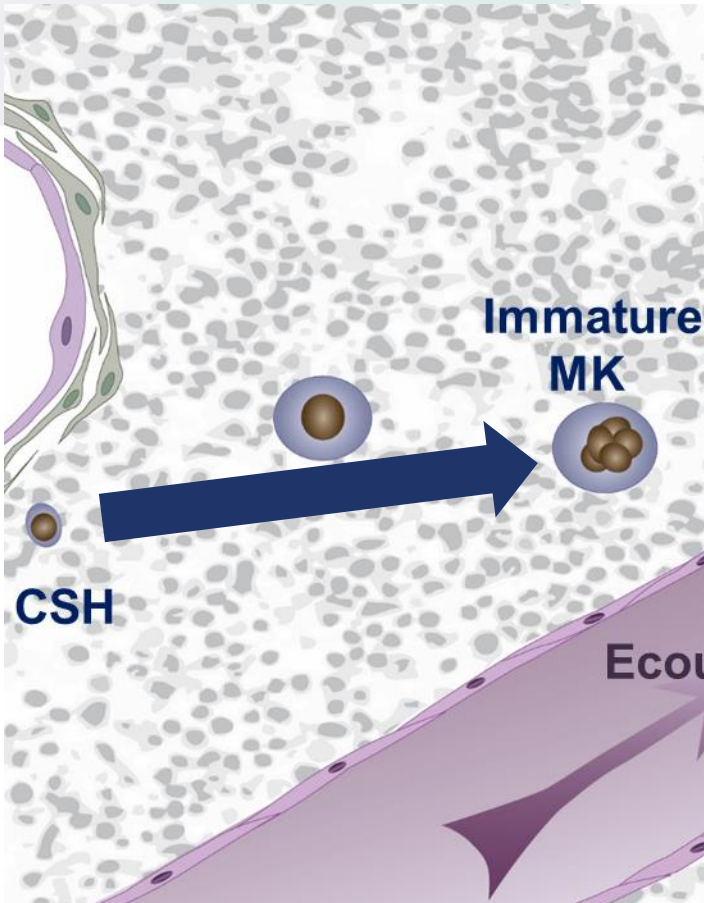
- **Avantages :** Source inépuisable/ **Prolifération++**
- **Inconvénients :** Efficacité de reprogrammation
Modification du génome
- **Alternative :** **iMK => c-MYC+ BMI1, BCL-XL//Surexpression GATA-1, FLI1 et TAL1** (Nakamura et al, 2014, Moreua et al, 2016)
iPS HLA1-/-=> plts universelles (Liu et al, 2015)

Progéniteurs hématopoïétiques CD34+

- **Avantages :** Différenciation efficace
- **Inconvénients :** Mobilisation du donneur
Prolifération faible
Cellules primaires
- **Alternative :** **iMK** (pas de banque disponible : en développement)

FAVORISER L'ENGAGEMENT ET LA MATURATION DES CELLULES SOURCES VERS LES MÉGACARYOCYTES

engagement



Cell source	Medium	Cytokines	Timeline	Reference
CD34+ progenitor cells from peripheral blood	supplemented IMDM	Meg-CSA (natural cytokines contained in protein fraction of aplastic canine serum)	~12-14 days	Mazur et al., 1990 (41)
	serum-free liquid suspension culture medium	IL-3, IL-3, TPO	~12 days	Guerrero et al., 1995 (31)
	supplemented IMDM	Flt3-L, IL-3, TPO	~21 day	Figueiredo et al., 2010 (33)
CD34+ progenitor cells from cord blood	supplemented serum-free IMDM	TPO	~14 days	Tao et al., 1999 (34)
	supplemented serum-free IMDM	SCF, Flt3-L, IL-6, TPO	~17 days	Proulx et al., 2003 (40)
	SFM	TPO	~12 days	Perdomo et al., 2017 (35)
CD34+ progenitor cells from bone marrow	supplemented serum-free IMDM	TPO	~21 day	Tao et al., 1999 (34)
	serum-free liquid culture system medium	SCF, IL-3, IL-6, G-CSF, TPO	~14 days	Gehling et al., 1997 (36)
	supplemented DMEM with addition of hirudin or heparin	TPO	~5 days	Strassel et al., 2012 (61)
CD34+ progenitor cells from fetal liver	supplemented IMDM	TPO	~12 days	Ma et al., 2000 (37)
	supplemented IMDM	TPO	~5 days	Schulze et al., 2016 (39)
	supplemented DMEM	TPO	~4 days	Vijey et al., 2018 (38)
Embryonic stem cells (ESCs)	supplemented DMEM and α MEM	TPO	~8-16 days	Fujimoto et al., 2003 (51)
	supplemented DMEM and Ham F-12 and IMDM	VEGF, SCF, TPO	~24 days	Takayama et al., 2008 (45)
	supplemented serum-free Stemline II medium	SCF, IL-11, TPO	~14 days	Lu et al., 2011 (47)
Induced pluripotent stem cells (iPSCs)	supplemented mTeSR1, STEMspan-ACF, STEMdiff APEL medium	BMP-4, Flt-3 ligand, IL-3, IL-6, SCF, IL-9, TPO	~19 days	Feng et al., 2014 (60)
	supplemented feeder-free and xeno-free SFM	BMP-4, FGF-2, VEGF, IL-11, SCF, TPO/Nplate	~19 days	Liu et al., 2015 (62)
	StemMACS iPSC brew XF, supplemented APEL 2 medium	BMP-4, VEGF, IL-3, SCF, TPO	~22 days	Eicke et al., 2018 (56)

Blasczyk, 2021

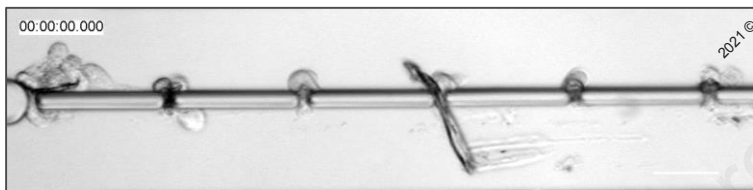
LES PRINCIPAUX ACTEURS DE LA PRODUCTION DE PLAQUETTES



PLATELET
BIOGENESIS

Plaquettes cargo

- Source de cellules : iPS
- *Système de libération microfluidique*



Thon J, 2014

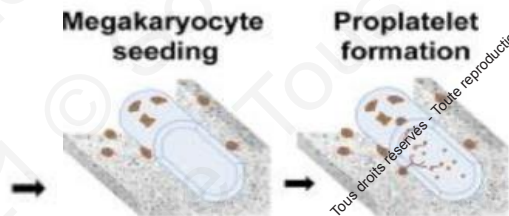
=> Rdt faible < 5 plts/MK
Fonctionnalité des plaquettes
non publiée



SilkFusion

Plaquettes à visée transfusionnelle, Plaquettes cargo

- Source de cellules : CD34+, iPS FOP-MK (lignée immortalisée)
- *Système de libération microfluidique en 3D: fibre de soie*



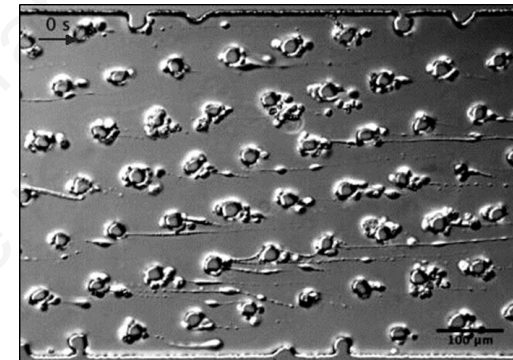
Di Buddo et al, 2015

=> Rdt faible < 10 plts/MK
Fonctionnalité des plaquettes
partiellement démontrée
(pas d'étude *in vivo* publiée)



HemostOD
Platelets On Demand

- Source de cellules : iPS (uniV.) + CD34
- *Système de libération microfluidique*



Blin et al, 2016

=> Rdt modéré < 50 plts/MK
Fonctionnalité des plaquettes
publiée

LES PRINCIPAUX ACTEURS DE LA PRODUCTION DE PLAQUETTES



Megakaryon corporation

Plaquettes à visée transfusionnelle

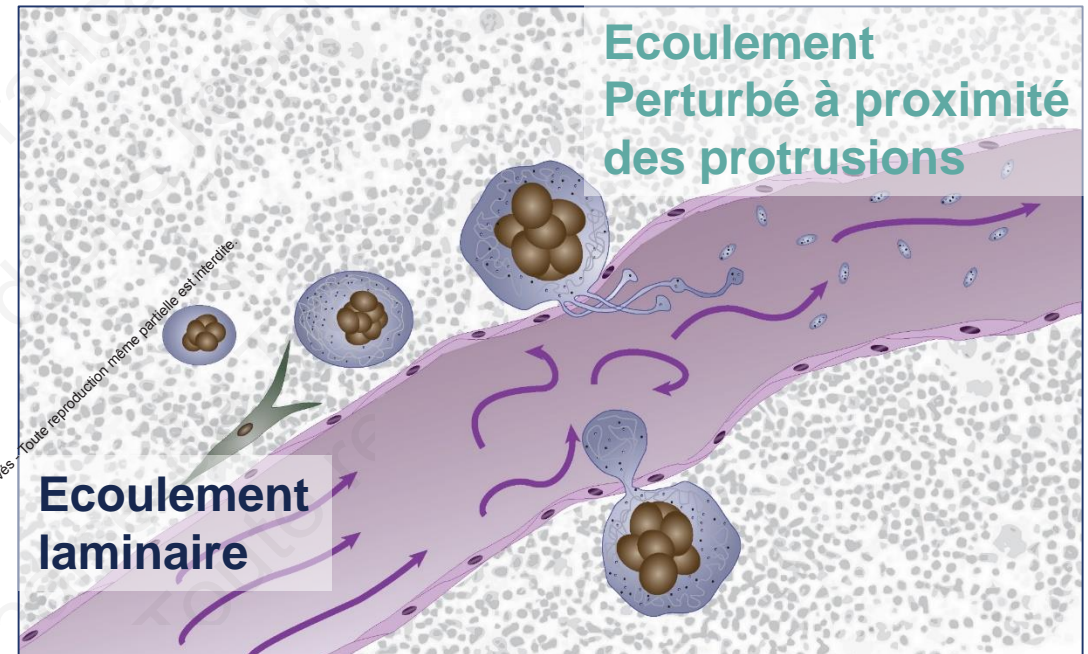
- Source de cellules : iPS + iPS universelles
Immortalisation d'un progéniteur MK à partir d'iPS
- Système de libération « bioreacteur en flux turbulent »
=> **Rdt important 80 plts/MK**



Fonctionnalité des plaquettes démontrée

Etude clinique en cours
« iPS autologue »

Ito et al, 2018



La production de plaquettes de culture à l'UMR_S1255

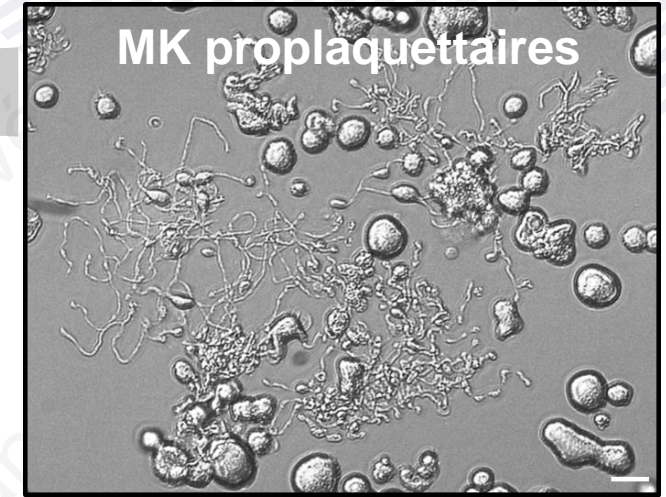
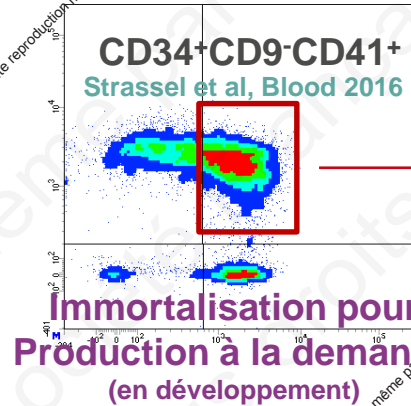


LA PRODUCTION DE PLAQUETTES À L'EFS GRAND EST

Cellules source
CD34+
Constitution de banque :
iMK en cours

Prolifération Engagement Maturation

INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ
INDUSTRIELLE
BREVET DÉPOSÉ
2021 © Société Française de Transfusion Sanguine, Tous droits réservés - Toute reproduction même partielle est interdite.



Libération des plaquettes

Dispositif de libération des plaquettes



Conservation des plaquettes

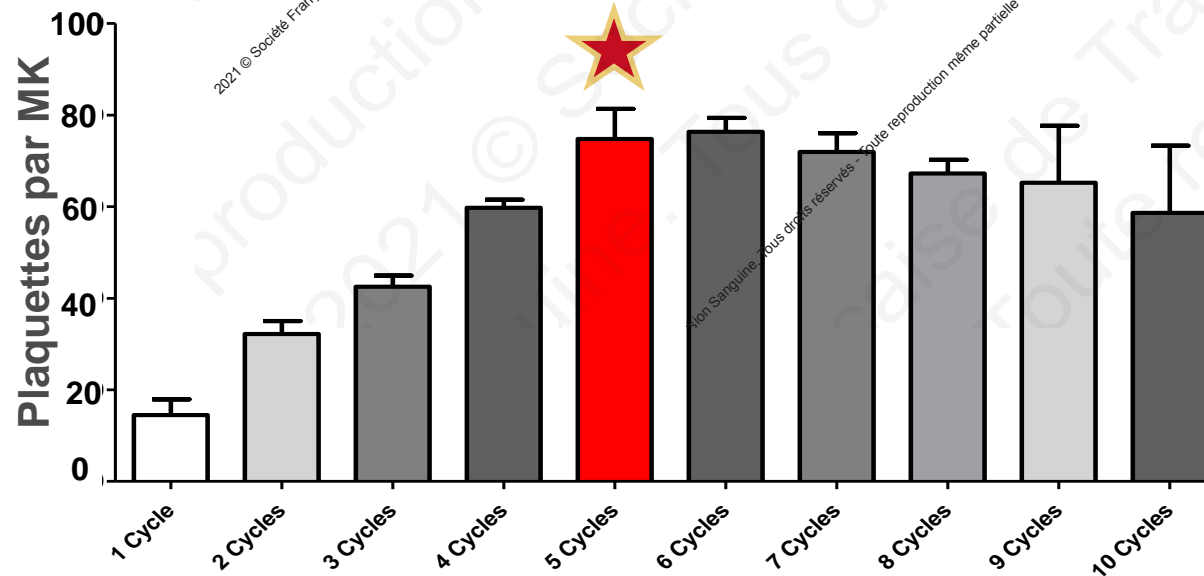


DE CYCLES DE PIPETAGES À UN DISPOSITIF PERFORMANT DE LIBERATION DES PLAQUETTES DE CULTURE

Dispositif de libération

=> Libération optimale de l'ensemble des proplaquettes par les MK

=> Basée sur mon expérience, empirisme
cycles de pipetages = libération efficace des plaquettes

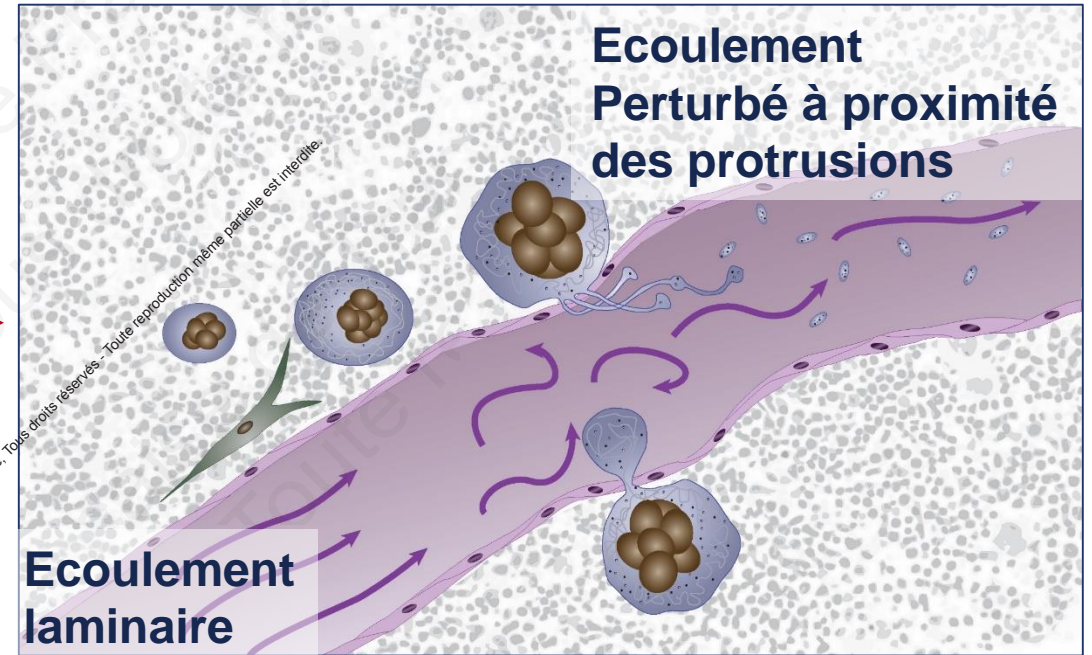
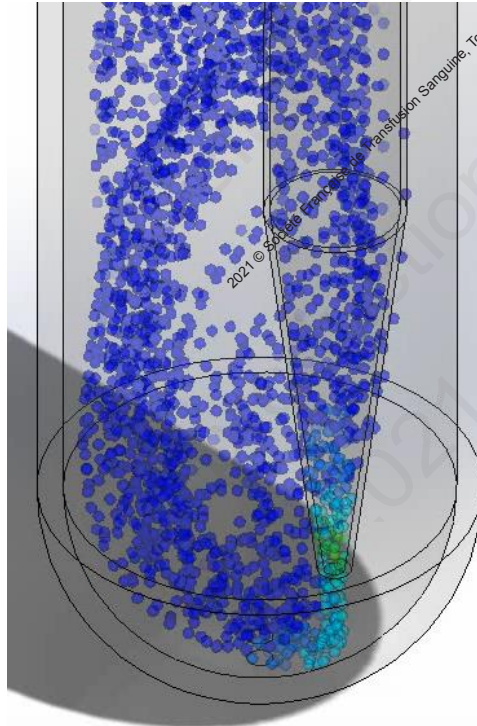
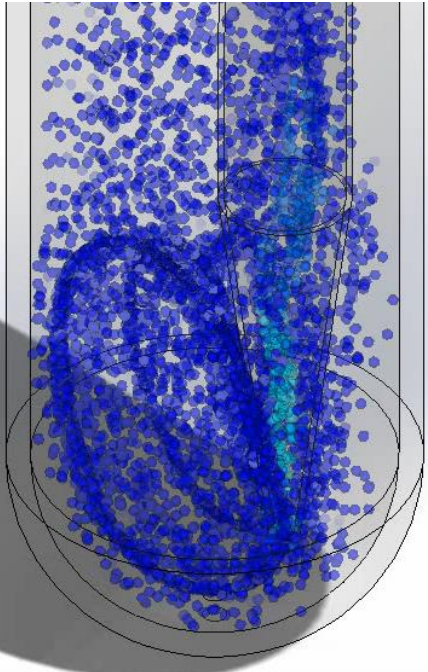


Manuscrit en préparation

RÔLE DE L'HÉMODYNAMIQUE LOCALE À PROXIMITÉ DES PROPLAQUETTES POUR LA LIBÉRATION DES PLAQUETTES

Dispositif de libération

=> Analyse du pipetage

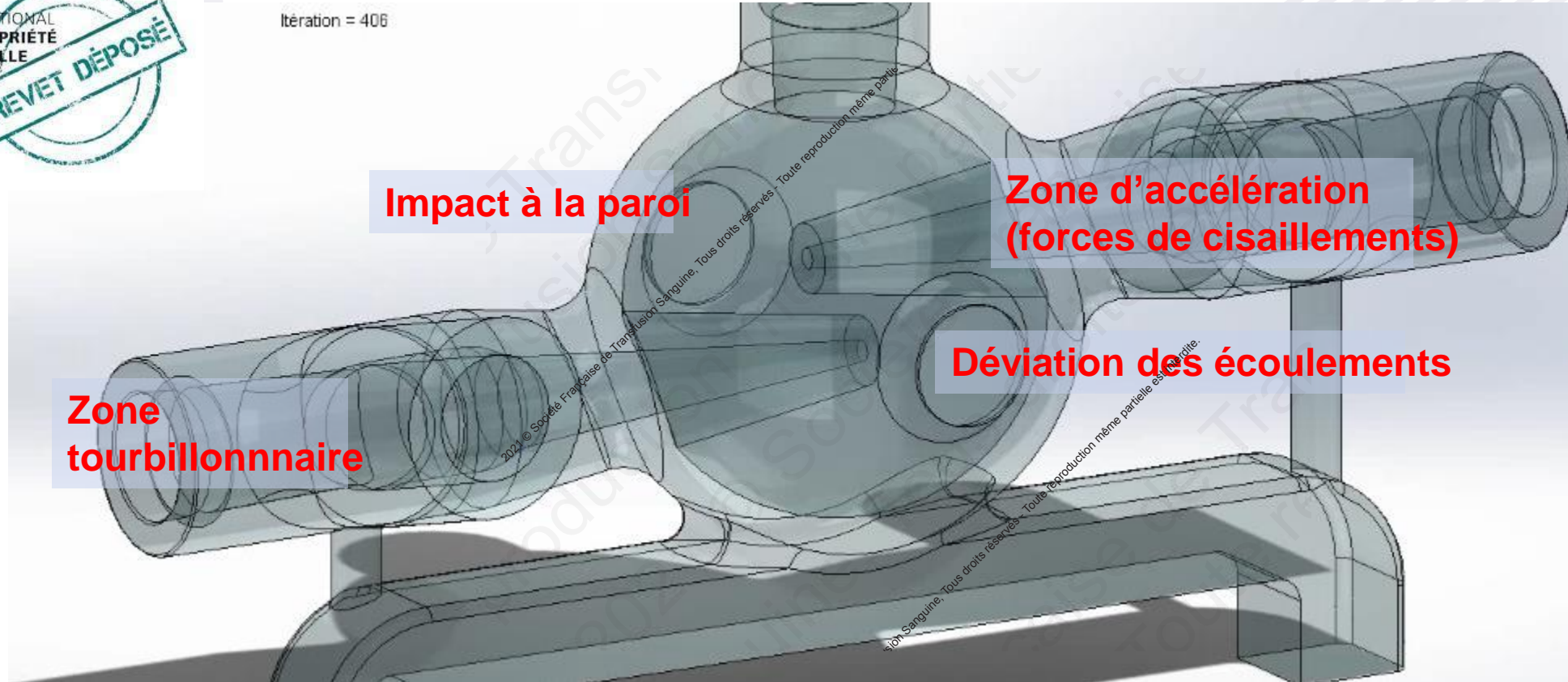


GÉNÉRATION D'UN DISPOSITIF EN FLUX CONTINU MIMANT LES PERTURBATIONS DES ÉCOULEMENTS

INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ
INDUSTRIELLE

BREVET DÉPOSÉ

Itération = 406



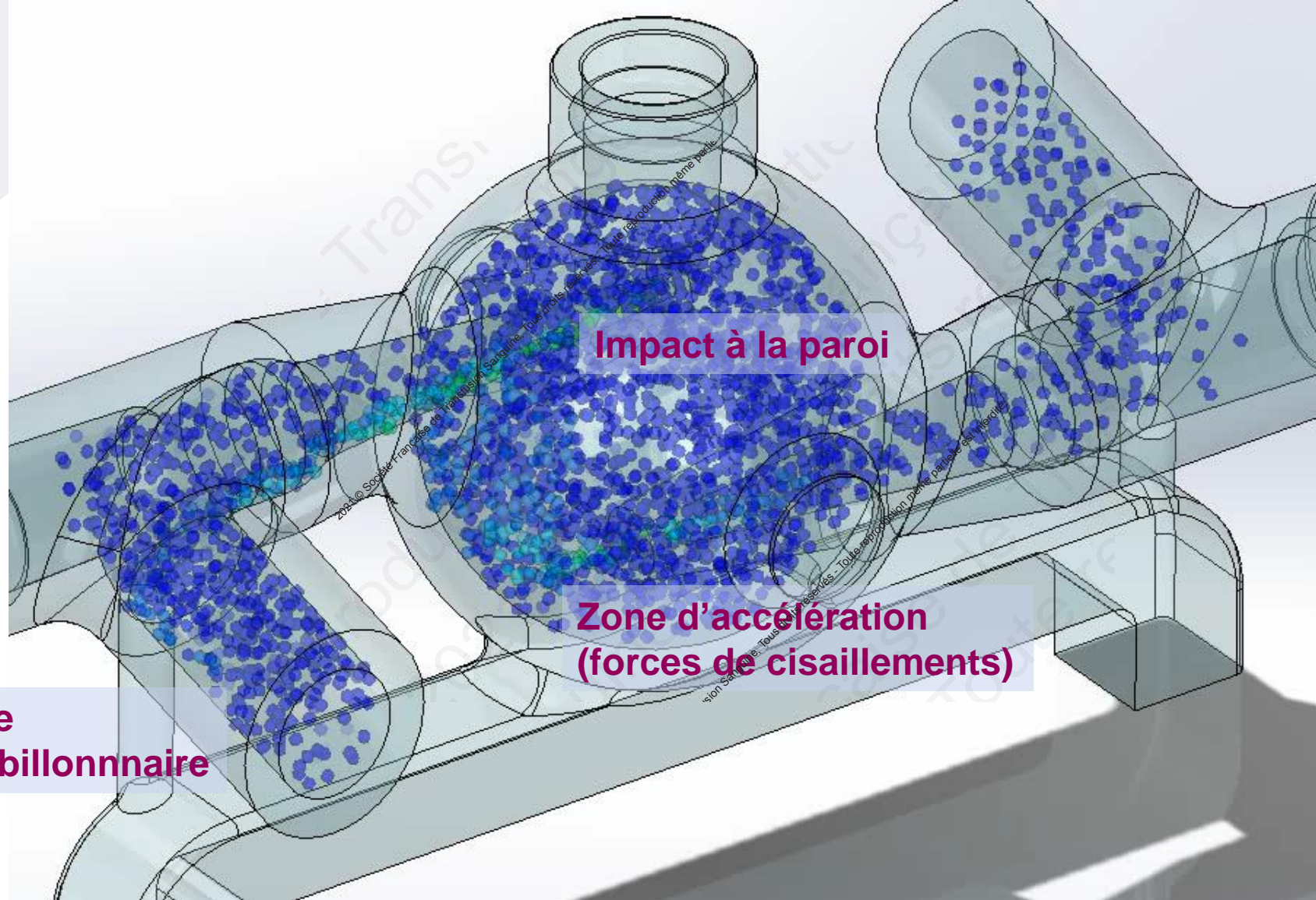
Zone
tourbillonnaire

Impact à la paroi

Zone d'accélération
(forces de cisaillements)

Déviation des écoulements

GÉNÉRATION D'UN DISPOSITIF EN FLUX CONTINU MIMANT LES PERTURBATIONS DES ÉCOULEMENTS



PRINCIPALES CARACTÉRISTIQUES DU DISPOSITIF DE LIBÉRATION DE PLAQUETTES



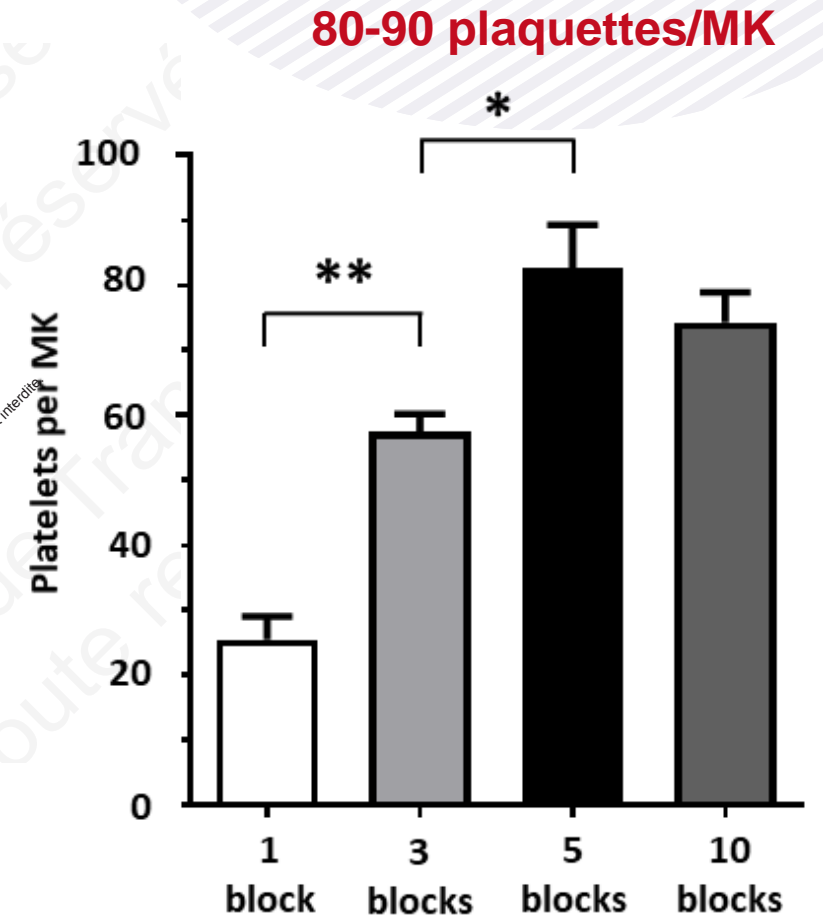
- **Dépendant de la viscosité**
- **Effet cumulatif lié à la périodicité des sphères**
- **Système fonctionne en dépression à -80Pa**

Dispositif développé en collaboration avec un industriel

Polypropylène

Compatible avec les BPF

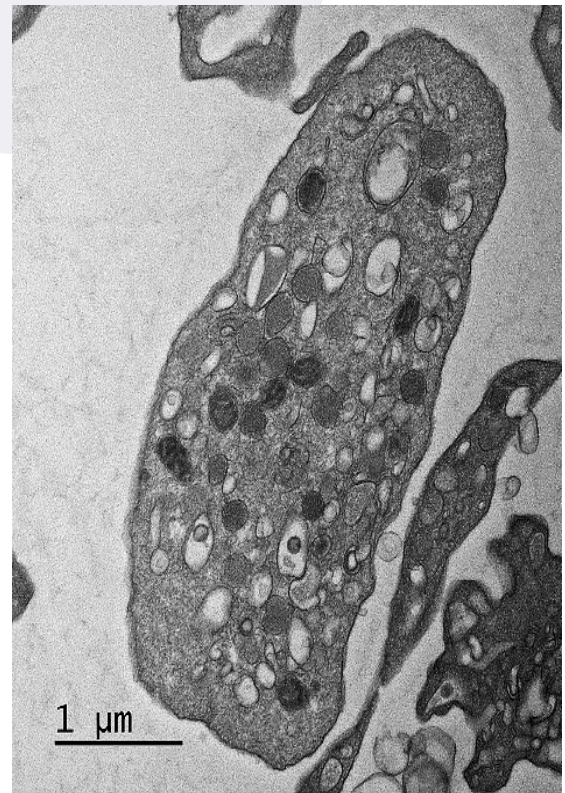
- **Compatible avec une production à grande échelle**
=> 1L en 10 min



Manuscrit en préparation

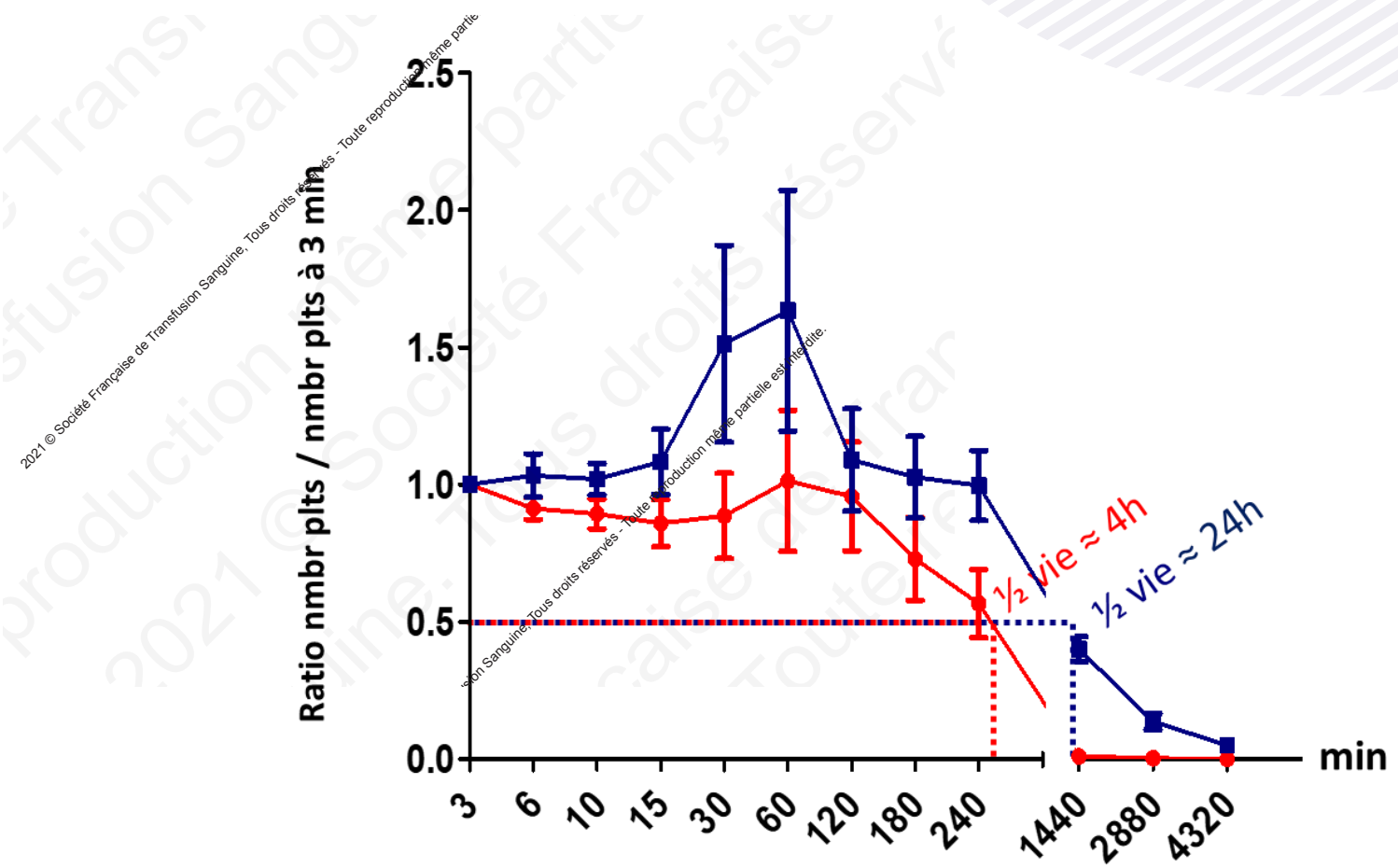
CARACTÉRISATION MORPHOLOGIQUE ET FONCTIONNELLE DES PLAQUETTES PRODUITES

❖ Morphologie



Plaquettes discoïdes
Diamètre 6-7μm
Nombre de granules normal

❖ Recirculation des plaquettes après transfusion



SUITE DU PROJET

- **Ingénierie cellulaire**

Immortalisation de progéniteurs MK « CD34⁺CD9⁻CD41⁺ » => iMK

Pour les plaquettes à visée transfusionnelle

iMK=> iMK HLA-/-.....-> banque iMK phénotype O-HPA déterminé

Pour les plaquettes « cargo »

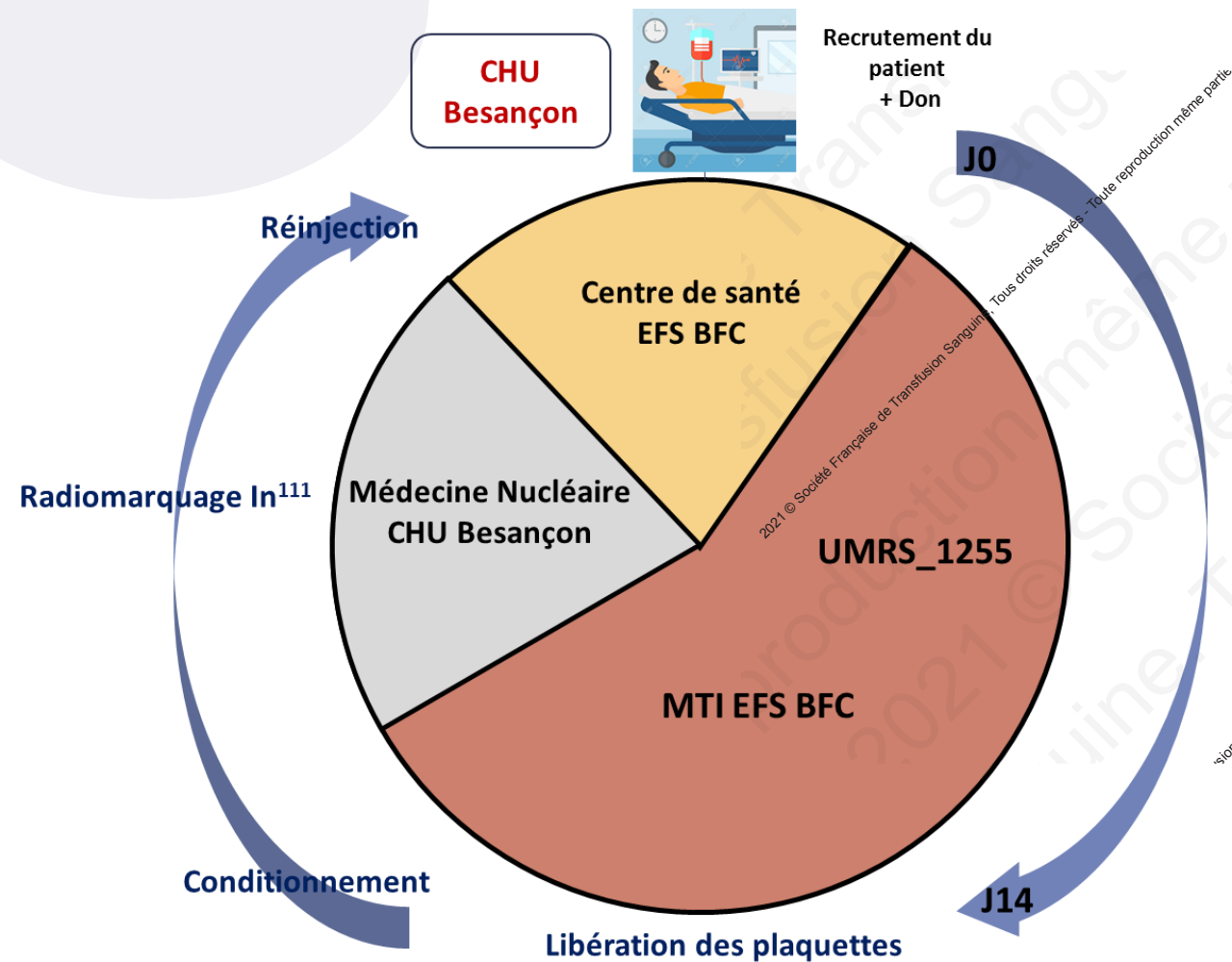
Déterminer la molécule à exprimer (auto-immunité, oncologie...)

- **Baisse des coûts // montée en échelle**

Développement de bioréacteurs : culture, purification, concentration...

Amélioration et Optimisation des milieux

DE LA PRODUCTION EN LABORATOIRE À LA PREVUE DE CONCEPT CHEZ L'HOMME



Objectif : Analyser la recirculation et évaluer la ½ vie des plaquettes de culture et leur localisation chez 3 volontaires sains

Calendrier prévisionnel :

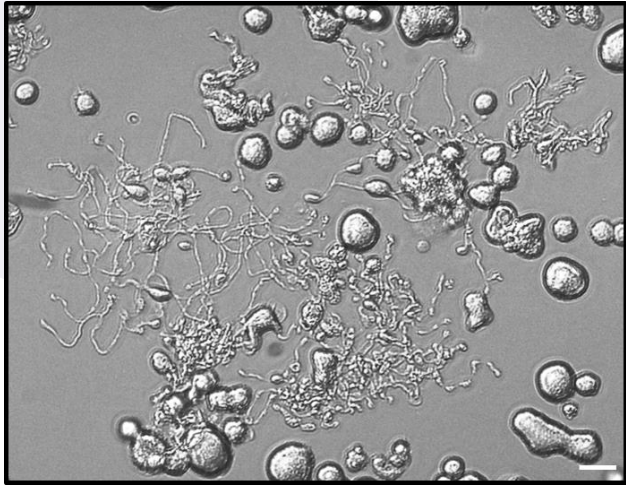
Transfert de la méthode : achevé

Qualification des lots : en cours

Dépôt dossier ANSM : 1^{er} trimestre 2022

Essai clinique : fin 2022

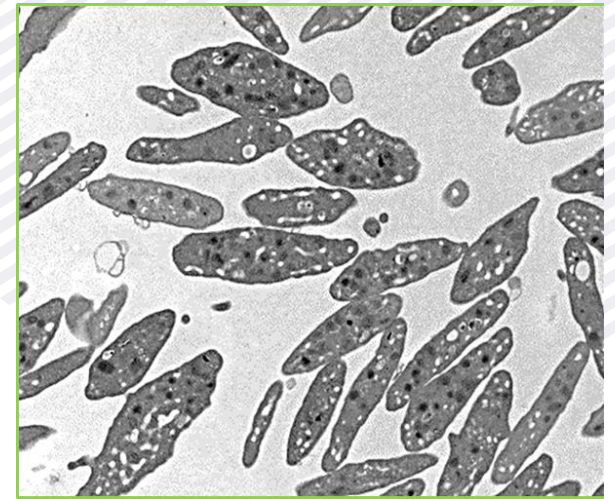
REMERCIEMENTS



UMR_S1255/EFS GEST

Léa Mallo
Anaïs Pongérard
Valentin Do Sacramento
Anita Eckly
Monique Freund
Adeline Galvanin
Catherine Humbrecht

Pierre Mangin
François Lanza
Christian Gachet



LAPEC EA 4278
Université Avignon Aix Marseille
Yannick Knapp

Plateforme MTI de Besançon

Stephane Roux
Maxime Adamczewski

EFS SIEGE

