

Production ex vivo des globules rouges et perspectives transfusionnelles

Production ex vivo of red blood cells and transfusional perspectives

Zineb Tlamçani
Narjiss Marzak
Majid Benkirane

Centre de transfusion sanguine,
Hôpital militaire d'instruction
Mohammed V, Rabat,
Faculté de médecine et de pharmacie
de Rabat,
Rabat,
Maroc
<tzineb@hotmail.fr>

La thérapie transfusionnelle à base des globules rouges, plaquettes et neutrophiles dépend des donneurs sains. Des résultats imprévisibles sont possibles lors de transfusions de sang ou de dérivés sanguins, à savoir la transmission de germes pathogènes (hépatite B dans les années soixante, VIH, HTLV et HTLV-2 dans les années quatre-vingt et hépatite C dans les années quatre-vingt-dix). Ces risques ont stimulé le développement de stratégies alternatives telles que la production ex vivo des globules rouges [1].

Le récent développement des techniques de sélection des progéniteurs hématopoïétiques et notre connaissance des facteurs de croissance impliqués spécifiquement dans certaines lignées cellulaires ont rendu envisageable la production ex vivo de populations cellulaires hématopoïétiques à des fins de greffe ou à des fins transfusionnelles (globules blancs, précurseurs mégacaryocytaires ou érythroïdes). Ces cellules peuvent en effet être amplifiées à partir de la prolifération d'un tout petit nombre de cellules souches sanguines, médullaires ou placentaires.

Expansion ex vivo

Le concept d'expansion ex vivo des cellules souches et des progéniteurs hématopoïétiques est basé sur la réflexion fondamentale appuyée à l'origine par des résultats d'hématologie expérimentale effectués sur le modèle animal, en particulier sur la souris [2]. Les cellules souches hématopoïétiques présentes dans la moelle osseuse et le sang du cordon ombilical sont le matériel de base de la production ex vivo des globules rouges. Recueillies avec le consentement de la mère du nouveau-né, les cellules de cordon ombilical constitue un très bon matériel sans complications cliniques ni problèmes éthiques.

Neildez-Nguyen *et al.* ont rapporté que les cellules érythrocytaires humaines (cellules nucléées) qui sont produites en grande quantité ex vivo sont capables de se différencier *in vivo* en érythrocytes énucléés. [3]. Ils ont développé un protocole pour l'expansion du progéniteur érythroïde CD34+ basé sur les trois étapes de l'expansion cellulaire, en utilisant une supplémentation séquentielle au milieu de culture d'une combinaison de cytokines spécifiques [3]. Cette étude a démontré que le progéniteur érythrocytaire produit ex vivo à partir des cellules souches hématopoïétique et/ou progéniteur cellulaire peut avoir des applications cliniques comme alternative à la transfusion des érythrocytes différenciés.

Ultérieurement, le même le groupe a décrit une méthode permettant la production ex vivo d'érythrocytes complètement matures à partir des cellules souches hématopoïétiques et/ou progéniteur cellulaire [4]. Les érythrocytes énucléés produits par cette approche sont immédiatement fonctionnels après transfusion, ce qui n'est pas le cas des cellules érythroïdes qui nécessitent un laps de temps pour l'énucléation.

doi: 10.1684/hma.2012.0695

Tirés à part :
Z. Tlamçani

Énucléation

Le processus permettant l'énucléation et donc la maturation finale aboutissant à la formation du globule rouge est la phase la plus complexe dans le processus de production des globules rouges *ex vivo*, et qui n'a pas été entièrement élucidé à ce jour [5, 6]. Le rôle, dans ce processus, de l'interaction de l'érythroblaste avec les autres cellules telles que les macrophages est controversé [7, 8]. La production des érythrocytes énucléés à partir de progéniteurs hématopoïétiques immatures nécessite la présence de cellules nourricières pour être efficace [3, 4]. Cependant, l'énucléation peut être initiée *ex vivo* chez les érythroblastes stimulés pour la différenciation à un stade avancé, capables de subir l'autoextrusion du noyau [8, 9].

À la base de cette découverte, le groupe de Hiroyama a découvert une méthode efficace de production des érythrocytes énucléés *ex vivo* sans recours aux cellules nourricières [10]. Cette méthode implique l'addition des facteurs VEGF et IGF-II au milieu de culture [11]. Ces deux facteurs sont capables de promouvoir la survie, la prolifération et/ou la différenciation des progéniteurs hématopoïétiques [12, 13]. Ces facteurs ont aussi la capacité de promouvoir l'expansion des progénitures érythrocytaires. Les milieux de cultures utilisés permettent la différenciation des cellules érythrocytaires à un stade avancé, prêt pour l'autoextrusion du noyau [13].

Il a été largement rapporté qu'une énucléation efficace dépend des signaux délivrés par les cellules du milieu environnant, mais cette approche a démontré la possibilité d'énucléation des érythroblastes, sans la nécessité d'une interaction entre les érythroblastes et les autres cellules.

Production de cellules érythrocytaires à partir de cellules souches pluripotentes induites (iPS)

Une équipe de recherche guidée par Yamanaka a réussi à induire des cellules somatiques différenciées de la souris à devenir des cellules souches pluripotentes en utilisant quatre facteurs bien définis. Ces cellules, appelées cellules souches pluripotentes induites (iPS), ont le potentiel de produire différentes cellules différenciées qui seront fonctionnelles *in vivo*. Des aberrations chromosomiques et des mutations génétiques peuvent survenir au cours des cultures à long terme de ces lignées cellulaires d'iPS. Aussi, pour que ces dernières soient utilisables pour des fins cliniques, il faut choisir des cultures de courte durée [10]. Récemment, des productions de cellules érythrocytaires matures à partir de cellules souches embryonnaires humaines et de cellules iPS d'origine humaine, en quantités importantes, ont été rapportées [10].

Injection chez l'homme de globules rouges cultivés

Des chercheurs de l'Inserm et de l'AP-HP sont parvenus à injecter à un patient des globules rouges créés à partir de ses propres cellules souches.

Dirigée par Luc Douay (Université Pierre-et-Marie-Curie, Paris), cette étude s'est déroulée en deux temps. En utilisant des cellules souches d'un donneur humain, le groupe a d'abord réussi à produire des milliards de globules rouges cultivés. Ils ont pour cela utilisé des facteurs de croissance spécifiques qui régulent la prolifération et la maturation des cellules souches en globules rouges [14]. Ces globules rouges cultivés ont ensuite été réinjectés au patient ; le taux de survie de ces globules rouges dans la circulation sanguine était compris entre 94 et 100 % à cinq jours, et entre 41 et 63 % après 26 jours [14]. Ces résultats sont extrêmement positifs, puisque ce taux est comparable à la demi-vie moyenne (28 jours) des globules rouges natifs normaux. L'équipe a donc démontré que la durée de vie et le taux de survie des cellules cultivées sont similaires à ceux des globules rouges « classiques », ce qui étaye leur validité en tant que source possible de transfusion [14]. Il s'agit d'une avancée majeure pour la médecine transfusionnelle, car les globules rouges cultivés pourraient constituer une réserve illimitée de cellules sanguines et une alternative aux produits de transfusion classiques [14].

Conclusion

Dans l'optique de produire des globules rouges par culture cellulaire, l'objectif est aujourd'hui de tenter de concilier deux propriétés : la grande capacité de prolifération des CSH de sang de cordon et l'aptitude des précurseurs érythroïdes issus de moelle osseuse à achever *in vitro* leur maturation jusqu'au stade d'érythrocytes énucléés.

Si ces résultats sont confirmés chez l'homme, il sera possible d'envisager la constitution de banques de sang de cordon pour la production de globules rouges de phénotypes particuliers. Sur le plan de la sécurité transfusionnelle, le sang placentaire est à l'évidence privilégié, car moins susceptible d'être contaminé par des virus non testés de façon systématique (EBV, CMV, B19) ou par des agents émergents dont la transmissibilité par le sang reste discutée. ■

RÉFÉRENCES

1. Douay L. Perspectives transfusionnelles du contrôle *ex vivo* de l'hématopoïèse. *Transf Clin Biol* 2003; 10(3) : 151-5.
2. Ivanovica Z, Boiron JM. Expansion *ex vivo* des cellules hématopoïétiques : concept et utilité clinique *Transf Clin Biol* 2009; 16(5-6) : 489-500.

- 3.** Neildes-Nguyen TMA, Wajcman H, Marden MC *et al.* Human erythroid cells produced *ex vivo* at large scale differentiate into red blood cells *in vivo*. *Nature Biotech* 2002; 20(5):467-72.
- 4.** Giarratana MC, Kobari L, Lapillonne H *et al.* *Ex vivo* generation of fully mature human red blood cells from hematopoietic stem cells. *Nature Biotech* 2005; 23(1):69-74.
- 5.** Lee JCM, Gimm JA, Lo AJ, *et al.* Mechanism of protein sorting during erythroblast enucleation: role of cytoskeletal connectivity. *Blood* 2004; 103(5):1912-9.
- 6.** Kingsley PD, Malik J, Fantauzzo KA, Palis J. Yolk sac-derived primitive erythroblasts enucleate during mammalian embryogenesis. *Blood* 2004; 104(1):19-25.
- 7.** Ohneda O, Bautch VL. Murine endothelial cells support fetal liver erythropoiesis and myelopoiesis via distinct interactions. *Br J Haematol* 1997; 98(4):798-808.
- 8.** Spike BT, Dirlam A, Dibling BC, *et al.* The Rb tumor suppressor is required for stress erythropoiesis. *EMBO* 2004; 23(21):4319-29.
- 9.** Yoshida H, Kawane K, Koike M, Mori Y, Uchiyama Y, Nagata S. Phosphatidylserine-dependent engulfment by macrophages of nuclei from erythroid precursor cells. *Nature*, 2005; 437(7059):754-8.
- 10.** Hiroyama T, Miharada K, Kurita R, Nakamura Y. Plasticity of cells and *ex vivo* production of red blood cells. *Stem Cells International* (SAGE-Hindawi Access to Research) 2011, Article ID 195780, 8 pages, doi:10.4061/2011/195780.
- 11.** K. Miharada, T. Hiroyama, K. Sudo, T. Nagasawa, Y. Nakamura. Efficient enucleation of erythroblasts differentiated *in vitro* from hematopoietic stem and progenitor cells. *Nature Biotech* 2006; 24(10):1255-6.
- 12.** Gerber HP, Ferrara N. The role of VEGF in normal and neoplastic hematopoiesis. *J Mol Med* 2003; 81(1):20-31.
- 13.** Hiroyama T, Miharada K, Aoki N, *et al.* Long-lasting *in vitro* hematopoiesis derived from primate embryonic stem cells. *Exp Hematol* 2006; 34(6):760-9.
- 14.** Giarratana M-C, Rouard H, Dumont A, *et al.* Proof of principle for transfusion of *in vitro* generated red blood. *Blood* 2011; 118(19):5071-9.