(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle
Bureau international

(43) Date de la publication internationale
25 janvier 2024 (25.01.2024)

WIPO | PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 2024/018018 A1

(51) Classification internationale des brevets :
C12N 5/078 (2010.01)

(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/EP2023/070191

(22) Date de dépôt international :
20 juillet 2023 (20.07.2023)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :
22306094.8 21 juillet 2022 (21.07.2022) EP

(71) Déposants : **ETABLISSEMENT FRANCAIS DU SANG** [FR/FR] ; 20 Avenue du Stade de France, 93210 SAINT DENIS (FR). **UNIVERSITE DE BORDEAUX** [FR/FR] ; 35, place Pey Berland, 33000 BORDEAUX (FR). **INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET DE LA RECHERCHE MÉDICALE** [FR/FR] ; 101 rue de Tolbiac, 75013 PARIS (FR).

(72) Inventeurs : **BRUNET DE LA GRANGE, Philippe** ; 4, rue Léo Delibes, 33320 EYSINES (FR). **HUART, Mathilde** ; 132, rue Dupaty, 33300 BORDEAUX (FR). **DEBEISSAT, Christelle** ; 8, avenue de Cadaujac, 33850 LÉOGNAN (FR). **AVALON, Maryse** ; 49 allée Maisonneraie de Pinsolles, 33160 SAINT AUBIN DE MÉDOC (FR). **VLASKI-LAFARGE, Marija** ; 32, rue de Freycinet, 33400 TALENCE (FR). **IVANOVIC, Zoran** ; 15, impasse Charles de Gaulle, 33140 VILLENAVE D'ORNON (FR).

(74) Mandataire : **CABINET BECKER ET ASSOCIES** ; 25, rue Louis le Grand, 75002 PARIS (FR).

(81) États désignés *(sauf indication contraire, pour tout titre de protection nationale disponible)* : AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MU, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

(84) États désignés *(sauf indication contraire, pour tout titre de protection régionale disponible)* : ARIPO (BW, CV, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SC, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), européen (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, ME, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publiée:
— *avec rapport de recherche internationale (Art. 21(3))*

WO 2024/018018 A1

(54) **Title:** USE OF A VITISIN COMPOUND FOR THE PRODUCTION OF HEMATOPOIETIC CELLS

(54) **Titre :** UTILISATION D'UN COMPOSÉ VITISINE POUR LA PRODUCTION DE CELLULES HÉMATOPOÏÉTIQUES

(57) **Abstract:** The present invention relates to the use of a vitisin compound for amplifying and/or differentiating hematopoietic cells. The invention also relates to a method for the *in vitro* production of erythroid progenitors, comprising contacting hematopoietic cells with a cell culture medium containing a vitisin compound.

(57) **Abrégé :** La présente invention concerne l'utilisation d'un composé vitisine pour amplifier et/ou différencier des cellules hématopoïétiques. L'invention concerne également un procédé de production *in vitro* de progéniteurs érythrocytaires comprenant la mise en contact de cellules hématopoïétiques avec un milieu de culture cellulaire comprenant un composé vitisine.

Utilisation d'un composé vitisine pour la production de cellules hématopoïétiques

Domaine de l'invention

La présente invention relève du domaine de la médecine. Elle se rapporte plus particulièrement à de nouveaux procédés de production de progéniteurs érythrocytaires et de globules rouges.

Introduction

Le maintien d'un apport constant en dioxygène aux tissus est indispensable à la survie de nombreux êtres vivants, et en particulier des humains. Ce sont les globules rouges qui transportent le dioxygène au sein de l'organisme via la circulation sanguine. Ce transport est assuré par l'hémoglobine, une protéine spécifique des globules rouges qui est capable de fixer le dioxygène. Lorsque les globules rouges parviennent aux tissus, le dioxygène diffuse à travers les parois des capillaires. Le rôle des globules rouges est donc primordial.

La transfusion de globules rouges est nécessaire lors de situations d'urgences (hémorragie) ou pathologiques (maladies du sang, cancers, etc.). En 2016, plus de 100 millions de poches de sang ont été collectées dans le monde et ont été distribuées afin de répondre aux besoins transfusionnels. A ce jour, les transfusions sanguines reposent exclusivement sur le sang issu de donneurs. Cependant, depuis la crise sanitaire liée au Covid-19, les réserves de poches sanguines s'amenuisent, les donneurs ne se déplaçant plus aussi régulièrement pour les dons du sang.

Chez l'adulte, la production de globules rouges ou érythropoïèse se déroule dans la moelle osseuse dite moelle hématopoïétique, qui est présente dans les os plats et aux extrémités des os longs. Dans la moelle osseuse, des cellules souches multipotentes, appelées cellules souches hématopoïétiques se différencient successivement en différents types de progéniteurs érythrocytaires pour finir en globules rouges matures.

Des milieux d'amplification et de différenciation des cellules hématopoïétiques permettant la production *in vitro* de globules rouges sont connus. Différents essais de production de globules rouges ont été réalisés au cours du temps, décrits notamment dans la revue Yoojin Seo, et al., *Stem Cells International, vol. 2019, Article ID 9281329*. En particulier, différentes sources cellulaires ont été testées et différents protocoles ont été développés, mettant en jeu des cocktails de cytokines différents, des successions d'étapes adaptées aux différentes étapes de différenciation des cellules, en jouant sur les temps de culture (18 à 60 jours) ou en utilisant ou non un bioréacteur.

Les procédés actuels présentent de nombreuses difficultés pour une production à grande échelle, tel qu'un faible rendement en globules rouges à l'issu de la culture qui ne permet pas d'atteindre des volumes transfusionnels efficaces, des systèmes de productions complexes, faisant appels à des cultures en plusieurs étapes successives et différentes, des délais de culture relativement longs pour obtenir des

globules rouges matures, une orientation parfois trop rapide vers une maturation en globules rouges ou encore une différenciation en cellules incapables de réaliser les étapes d'énucléation correctement (Akimov S et al, 2005, Stem cells, 23(9) : 1423-1433 ; Hirose SI et al, 2013, Stem Cell Reports, 1(6) : 499-508 ; Huang X, 2013, Mol. Ther., 22(2) : 451-463). Enfin, d'autres procédés recourent à des co-cultures avec des cellules nourricières (Kurita R et al, 2013, PloS One, 8(3) : e59890), ce qui est à la fois complexe à mettre en place et coûteux.

Il apparaît ainsi que le développement de nouveaux procédés plus efficaces pour produire des globules rouges permettrait de répondre aux besoins d'approvisionnement en cellules sanguines.

L'invention décrite ici vise, entre autres, à répondre à ces besoins.

Résumé de l'invention

Selon un premier aspect, la présente invention concerne un procédé *in vitro* de production d'érythrocytes comprenant :

a) la fourniture de cellules hématopoïétiques multipotentes, de préférence d'origine humaine, sélectionnées dans le groupe constitué des cellules souches hématopoïétiques (CSH), des progéniteurs multipotents (MPP), des progéniteurs myéloïdes communs (CMP), des progéniteurs mégacaryocytaires-érythrocytaires (MEP), et les combinaisons de ceux-ci , et optionnellement l'amplification desdites cellules hématopoïétiques multipotentes;

b) l'induction de la différenciation desdites cellules hématopoïétiques multipotentes en progéniteurs érythrocytaires unipotents, et optionnellement l'amplification desdits progéniteurs érythrocytaires unipotents;

c) l'induction de la différenciation desdits progéniteurs érythrocytaires unipotents en précurseurs érythrocytaires; et

d) l'induction de la maturation des précurseurs érythrocytaires en érythrocytes, et

e) optionnellement la récupération des érythrocytes obtenus ;

dans lequel les cellules sont mises en contact avec un composé vitisine à l'étape a) en particulier lorsque celle-ci comporte l'étape d'amplification des cellules, l'étape b), l'étape c) et/ou l'étape d).

L'invention concerne également un procédé *in vitro* de production de progéniteurs érythrocytaires unipotents comprenant :

a) la fourniture de cellules hématopoïétiques multipotentes, de préférence d'origine humaine, sélectionnées dans le groupe constitué des cellules souches hématopoïétiques (CSH), des progéniteurs multipotents (MPP), des progéniteurs myéloïdes communs (CMP), des progéniteurs mégacaryocytaires-érythrocytaires (MEP), et les combinaisons de ceux-ci , et optionnellement l'amplification desdites cellules hématopoïétiques multipotentes; et

b) l'induction de la différenciation desdites cellules hématopoïétiques multipotentes en progéniteurs érythrocytaires unipotents, et optionnellement l'amplification desdits progéniteurs érythrocytaires unipotents ; et

c) optionnellement la récupération des progéniteurs érythrocytaires unipotents obtenus ;

dans lequel les cellules sont mises en contact avec un composé vitisine à l'étape a) en particulier lorsque celle-ci comporte l'étape d'amplification des cellules et/ou l'étape b).

L'invention a aussi trait à un procédé *in vitro* de production d'érythrocytes comprenant,

a) la fourniture de progéniteurs érythrocytaires unipotents, de préférence obtenus selon le procédé de production de progéniteurs érythrocytaires unipotents selon l'invention;

b) l'induction de la différenciation desdits progéniteurs érythrocytaires unipotents en précurseurs érythrocytaires unipotents;

c) l'induction de la maturation des précurseurs érythrocytaires en érythrocytes, et

d) optionnellement la récupération des érythrocytes obtenus,

dans lequel les cellules sont mises en contact avec un composé vitisine à l'étape b) et/ou l'étape c).

Dans les procédés selon l'invention, les cellules sont mises en contact avec le composé vitisine dans un milieu de culture adapté aux exigences nutritionnelles des cellules hématopoïétiques, en particulier un milieu de culture adapté à l'amplification et/ou la différenciation et/ou la maturation des cellules hématopoïétiques. Les cellules hématopoïétiques sont préférentiellement sélectionnées dans le groupe constitué des cellules CSH, MPP, CMP, MEP, des progéniteurs érythrocytaires unipotents, des précurseurs érythrocytaires, et des combinaisons de ceux-ci, de préférence des CSH ou des progéniteurs érythrocytaires unipotents.

Selon un mode de réalisation, les cellules sont mises en contact avec le composé vitisine i) lors de l'amplification et/ou la différenciation des cellules hématopoïétiques multipotentes ou ii) lors de l'amplification et/ou la différenciation des progéniteurs érythrocytaires unipotents.

Selon un autre mode de réalisation, les cellules sont mises en contact avec le composé vitisine lors de l'amplification et/ou la différenciation des cellules hématopoïétiques multipotentes, et lors de l'amplification et/ou la différenciation des progéniteurs érythrocytaires unipotents et optionnellement lors de la maturation des précurseurs érythrocytaires.

En particulier, les cellules sont mises en contact avec un composé vitisine durant au moins 1 jour, préférence au moins au moins 3, 5, 7, 10 ou 12 jours, lors de l'amplification et/ou la différenciation des cellules hématopoïétiques multipotentes, et/ou durant au moins 1 jour, préférence au moins au moins 3, 5, 7, 10 ou 12 jours, lors de l'amplification et/ou la différenciation des progéniteurs érythrocytaires unipotents.

Dans les procédés selon l'invention, le composé vitisine, lorsqu'il est mis contact avec les cellules, est présent dans le milieu de culture à une concentration comprise entre 1 µM et 500 µM, de préférence ente 5 µM et 100 µM.

Selon un deuxième aspect, l'invention concerne un milieu de culture cellulaire adapté à l'amplification et/ou la différenciation et/ou la maturation de cellules hématopoïétiques et comprenant un composé vitisine.

En particulier, le composé vitisine est présent dans le milieu à une concentration comprise entre 1 µM et 500 µM, de préférence entre 5 µM et 100 µM.

L'invention a également trait à l'utilisation *in vitro* d'un tel milieu de culture cellulaire pour (i) l'amplification et/ou la différenciation de cellules souches hématopoïétiques (CSH), des progéniteurs multipotents (MPP), des progéniteurs myéloïdes communs (CMP), des progéniteurs mégacaryocytaires-érythrocytaires (MEP) ou de progéniteurs érythrocytaires unipotents et/ou (ii) pour la différenciation et/ou la maturation de précurseurs érythrocytaires, et/ou (iii) la production de progéniteurs érythrocytaires unipotents et/ou d'érythrocytes.

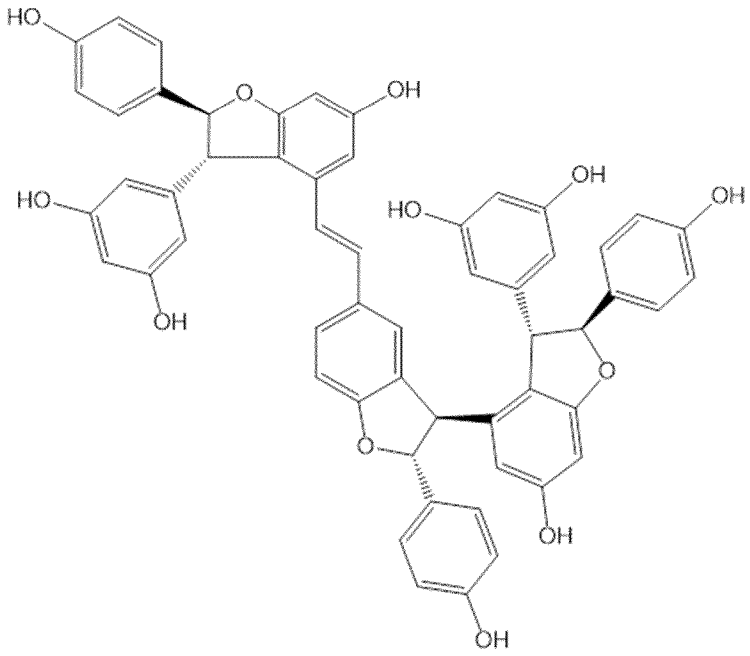
Selon un troisième aspect, l'invention concerne l'utilisation d'un composé vitisine pour supplémenter un milieu de culture cellulaire adapté à l'amplification et/ou la différenciation et/ou la maturation de cellules hématopoïétiques.

L'invention concerne également l'utilisation d'un composé vitisine pour stimuler l'amplification et/ou la différenciation de cellules souches hématopoïétiques (CSH), des progéniteurs multipotents (MPP), des progéniteurs myéloïdes communs (CMP), des progéniteurs mégacaryocytaires-érythrocytaires (MEP) ou de progéniteurs érythrocytaires unipotents et/ou (ii) stimuler la différenciation et/ou la maturation de précurseurs érythrocytaires, et/ou (iii) stimuler la production de progéniteurs érythrocytaires unipotents et/ou d'érythrocytes.

Dans les procédés, milieux de culture, et utilisations envisagés par l'invention, le composé vitisine est choisi dans le groupe constitué de la vitisine B et de ses dérivés.

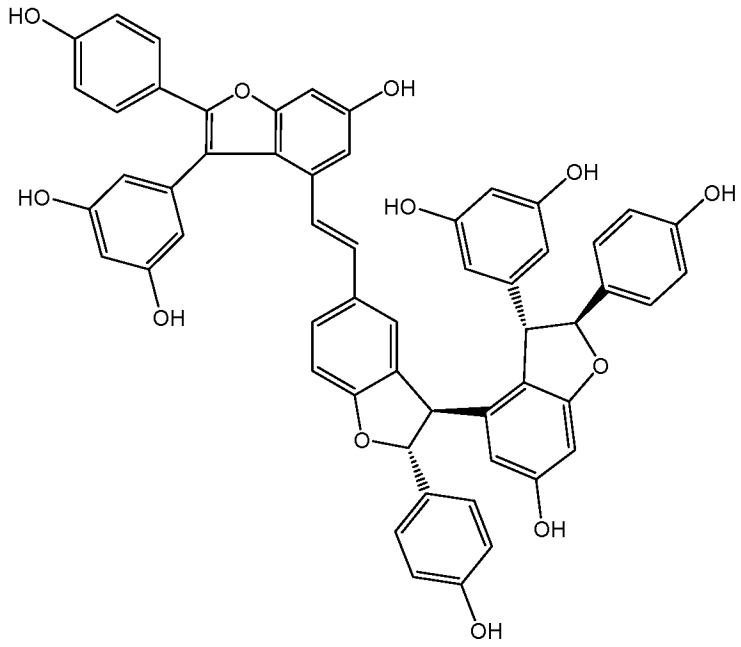
De préférence, le dérivé de vitisine B est un isomère de vitisine B, de préférence un stéréoisomère de vitisine B.

En particulier des dérivés de vitisine B ont pour formule :



(II)

ou



(III)

De préférence, le composé vitisine est la vitisine B.

Description détaillée de l'invention

L'invention consiste à utiliser un composé dérivé de la vigne pour la production de globules rouges. La vitisine B est un stilbène appartenant à la famille des polyphénols, qui peut être extraite notamment à partir de sarments de vigne. La vitisine B présente des avantages surprenants par rapport à d'autres molécules antioxydantes telles que le resvératrol.

L'utilisation de cette molécule sur des cellules hématopoïétiques humaines, en particulier des cellules CD34+, montre deux effets importants et reproductibles :

1) La vitisine B favorise l'engagement des cellules hématopoïétiques multipotentes $CD34^+$ vers les progéniteurs érythrocytaires unipotents en augmentant leur amplification, et

La vitisine B permet également d'accélérer la différenciation des progéniteurs vers les précurseurs érythrocytaires et leur énucléation, aboutissant aux cellules matures : les érythrocytes.

Le procédé selon l'invention permet donc une production plus efficace de globules rouges.

Le procédé de culture *in vitro* selon l'invention a non seulement l'avantage d'être simple et économique, mais ouvre également la voie à une production industrielle à grande échelle de progéniteurs érythrocytaires et de globules rouges. Ceci permet de réduire les risques de pénurie de sang ou d'impasse transfusionnelle, tout en offrant une sécurité optimale aux patients transfusés.

Erythropoïèse et Cellules hématopoïétiques

L'hématopoïèse est un processus biologique continu permettant le renouvellement et le maintien de toutes les cellules sanguines : hématies (encore appelées globules rouges ou érythrocytes), polynucléaires, plaquettes, monocytes et lymphocytes. L'hématopoïèse se définit comme l'ensemble des mécanismes, se déroulant dans la moelle osseuse et qui assurent, à partir des cellules souches hématopoïétiques (CSH), le renouvellement continu et régulé des cellules sanguines, c'est à dire les globules rouges (GR, érythrocytes), les globules blancs (GB, neutrophiles, éosinophiles, monocytes, lymphocytes) et les plaquettes (Neildez-Nguyen et al., 2002).

L'érythropoïèse est un processus biologique permettant le renouvellement des érythrocytes. Au cours du processus d'érythropoïèse, la cellule souche hématopoïétique (CSH) se différencie en progéniteur multipotent (MPP), en progéniteur myéloïde commun (CMP), en progéniteur bipotent MEP (*Megakaryocytic and Erythroid Progenitor,* progéniteurs mégacaryocytaires-érythrocytaires), puis en progéniteur BFU-E (*Burst Forming Unit-Erythroid*) et en CFU-E (*Colony Forming Unit-Erythroid*), ces deux derniers étant irréversiblement engagés vers la lignée érythrocytaire (unipotents), et enfin en précurseurs érythrocytaires (*Iwasaki & Akashi, Immunity. 2007 Jun;26(6):726-40*). La phase terminale de différenciation de l'érythropoïèse permet d'aboutir, à partir des précurseurs érythrocytaires, à la formation du réticulocyte, après l'énucléation (expulsion du noyau), puis à la formation de l'érythrocyte.

Le processus d'érythropoïèse est bien connu de l'homme de l'art et peut être suivi par une cinétique d'expression de différents marqueurs spécifiques, selon le stade de différenciation des cellules. En particulier, il est possible d'étudier l'antigène de surface CD34 pour sélectionner une population de cellules hématopoïétiques $CD34^+$ primitives, le récepteur à la transferrine (CD71) qui est un marqueur de

la différenciation érythrocytaire précoce ainsi que la glycophorine A (GPA), qui est un marqueur de la différenciation terminale.

La Glycophorine A (GPA) est une protéine de 10 kDa exprimée au niveau de la membrane des précurseurs érythrocytaires (proérythroblastes) et des érythrocytes. Il s'agit donc d'un marqueur de la différenciation érythrocytaire terminale puisqu'elle est absente des progéniteurs engagés (BFU-E et CFU-E), apparaît progressivement sur les érythroblastes basophiles et reste exprimée de façon stable sur les érythrocytes.

Le récepteur de la transferrine 1 (CD71) est une protéine de 95 kDa exprimée au niveau de la membrane des progéniteurs et des précurseurs érythrocytaires. Contrairement à la GPA, l'expression du CD71 diminue au fur et à mesure de la différenciation, les érythrocytes n'expriment pas CD71. Il s'agit donc d'un marqueur de la différenciation érythrocytaire plus précoce.

La différenciation des cellules érythrocytaires est associée à la diminution et à la disparition du CD71 et à l'acquisition de la GPA donnant finalement des cellules matures (érythrocytes et réticulocytes) caractérisées par le phénotype $CD71^{-}GPA^{+}$.

En particulier, la différenciation érythrocytaire peut être observée par cytométrie en flux, sur la base de marqueurs d'expressions spécifiques tels que des antigènes de surface membranaires (clusters de différenciation (CD)) tels que les marqueurs CD34, CD123, CD45RA, CD71 et GPA.

Les différentes cellules érythrocytaires sont également observables par microscopie grâce à la coloration May-Grünwald Giemsa (MGG). En effet, à chaque étape de différenciation, une diminution de la taille de la cellule et de son noyau est observée, aboutissant à terme à la formation d'une cellule érythrocytaire mature anucléée. Cette technique de cytologie permet notamment d'analyser la maturation des précurseurs érythrocytaires et donc de détecter et quantifier les différents précurseurs ainsi que les érythrocytes matures.

Le test clonogénique CFC (cellules formant colonies) permet également d'identifier les différentes cellules érythrocytaires. Ce test permet de quantifier le nombre de progéniteurs hématopoïétiques (PH) capables de former des colonies de cellules matures érythrocytaires lorsqu'ils sont cultivés en milieux semi-solides, tels que des milieux comprenant de la méthylcellulose. Ces milieux sont de préférence complémentés en cytokines nécessaires à la différenciation érythropoïétique. Ces tests clonogéniques permettent de détecter les progéniteurs qui ont un potentiel érythroïde et de les quantifier en s'affranchissant des marqueurs phénotypiques.

Ces différentes techniques sont bien connues de l'homme du métier.

Tel qu'utilisés ici les termes « cellules hématopoïétiques », « cellules de la lignée érythrocytaire » et « cellules de la lignée hématopoïétique » sont équivalents et peuvent être employés l'un pour l'autre. Ces termes désignent l'une quelconque des cellules permettant d'arriver à un érythrocyte. Ces termes

comprennent les cellules hématopoïétiques multipotentes, les progéniteurs érythrocytaires unipotents et les précurseurs érythrocytaires tels que définis ci-dessous. En particulier, les cellules hématopoïétiques comprennent les cellules CSH, MPP, CMP, MEP, BFU-E, CFU-E, les proérythroblastes, les érythroblastes basophiles, les érythroblastes polychromatophiles et les érythroblastes orthochromatiques. Les cellules hématopoïétiques selon invention sont de préférence obtenues à partir d'un sujet donneur, en particulier un sujet donneur sain. En particulier, les cellules hématopoïétiques, et plus particulièrement les CSH, peuvent être obtenues ou préparées à partir d'un échantillon biologique d'un donneur, tel qu'un échantillon de sang, par exemple de sang périphérique, de sang de cordon ombilical ou de sang placentaire, ou un échantillon de moelle osseuse.

De préférence, les cellules telles qu'utilisées dans la présente invention sont des cellules d'origine humaine.

Tel qu'utilisés ici le terme « cellules hématopoïétiques multipotentes » se réfère à des cellules CD34+ multipotentes capables de se différencier pour produire au moins deux types cellulaires parmi les différentes cellules sanguines que sont les globules blancs (cellules immunitaires), les globules rouges et les plaquettes. Dans le contexte de la présente invention, le terme « cellules hématopoïétiques multipotentes » comprend les CSH, les MPP, les CMP et les MEP. De préférence, les MPP ont un phénotype $CD34^{+}LIN^{neg}CD123^{+}CD45RA^{neg}$, les CMP ont un phénotype $CD34^{+}LIN^{neg}CD123^{+}CD45RA^{neg}$ et les MEP ont un phénotype $CD34^{+}LIN^{neg}CD123^{neg}CD45RA^{neg}$. De préférence, les cellules hématopoïétiques multipotentes telles qu'utilisées dans la présente invention sont sélectionnées dans le groupe constitué des CSH, des MPP, des CMP et des MEP, et des combinaisons de celles-ci. De manière plus particulièrement préférée, les cellules hématopoïétiques multipotentes telles qu'utilisées dans la présente invention sont des CSH, optionnellement en combinaison avec des MPP, des CMP et/ou des MEP.

Tel qu'utilisé ici, le terme de « cellule souche hématopoïétique » ou « CSH » se réfère à des cellules souches multipotentes capables de se différencier pour produire toutes les cellules sanguines que sont les globules blancs (cellules immunitaires), les globules rouges et les plaquettes. Selon les modes de réalisation préférés, les CSH sont des CSH humaines. Les CSH portent des marqueurs particuliers, tels qu'une forte expression du marqueur primitif CD34, une absence d'expression du marqueur CD45RA (isoforme de la phosphotyrosine phosphatase CD45), et optionnellement l'expression du marqueur CD133. De préférence, les CSH expriment également le récepteur à l'IL3 (CD123). Le terme « CSH » englobe notamment les cellules dites « Side Population » (SP). Les « cellules SP » regroupent l'ensemble des cellules chez lesquelles il est possible de mettre en évidence, par cytométrie en flux, une capacité d'efflux d'un colorant vital tels que le Hoescht ou le Dye Cycle Violet (DCV). Les cellules SP ont donc, de préférence, un phénotype $CD34^{+}DCV^{low}$.

Les cellules hématopoïétiques multipotentes peuvent être obtenues à partir de différentes sources et selon des procédés bien connus de l'homme du métier. Elles peuvent notamment être isolées à partir de moelles osseuses, de cytaphérèses, de sang total ou encore de sang de cordon ombilical (ou de sang placentaire) par exemple à l'aide d'un système immuno-magnétique ou d'un système de tri sur la présence de récepteurs membranaires spécifiques (par exemple CD133, CD123, CD45 et/ou CD34).

Les cellules hématopoïétiques multipotentes peuvent être également obtenues par différenciation de cellules souches embryonnaires ou de cellules souches pluripotentes induites (iPS), de préférence des cellules souches pluripotentes induites. Les techniques pour différencier des cellules souches pluripotentes en cellules hématopoïétiques multipotentes sont bien connues de l'homme du métier. Plusieurs protocoles ont été publiés, notamment le protocole de Lengerke C et al (2009, Ann N Y Acad Sci, 1176 :219-27) consistant en une différenciation de 17 jours en passant par une étape intermédiaire de corps embryoïdes et grâce à la combinaison des cytokines suivantes : SCF, Flt-3 ligand, IL-3, IL-6, G-CSF et BMP-4.

Tel qu'utilisé ici, le terme de « cellule souche embryonnaire » se réfère à des cellules dérivées de la masse cellulaire interne du blastocyste et qui ont la capacité de conduire à la formation de tous les tissus de l'organisme (mésoderme, endoderme, ectoderme), y compris aux cellules de la lignée germinale. La pluripotence des cellules souches embryonnaires peut être évaluée par la présence de marqueurs tels que les facteurs de transcription OCT4 et NANOG et des marqueurs de surface comme SSEA3/4, Tra-1-60 et Tra-1-81. Les cellules souches embryonnaires peuvent être obtenues sans destruction de l'embryon dont elles sont issues, par exemple à l'aide de la technique décrite par Chung et al. (Cell Stem Cell, 2008, 2(2) : 113-117). Dans un mode de réalisation particulier, et pour des raisons légales ou éthiques, les cellules souches embryonnaires sont des cellules souches embryonnaires non humaines. Dans un autre mode de réalisation particulier, les cellules souches embryonnaires utilisées dans l'invention sont des cellules souches embryonnaires humaines, de préférence obtenues sans destruction de l'embryon dont elles sont issues. Les embryons utilisés sont de préférence des embryons surnuméraires obtenus dans le cadre d'un projet parental après obtention des autorisations réglementaires et éthiques conformes aux lois en vigueur.

Tel qu'utilisé ici, le terme de « cellule souche pluripotente induite » (CSPi, IPSc ou iPS), se réfère à des cellules souches pluripotentes obtenues par reprogrammation génétique de cellules somatiques différenciées, et présentant une morphologie et un potentiel d'auto-renouvellement et de pluripotence en partie similaires à ceux des cellules souches embryonnaires. Ces cellules sont notamment positives pour les marqueurs de pluripotence, notamment la coloration à la phosphatase alcaline et l'expression des protéines NANOG, SOX2, OCT4 et SSEA3/4. Les procédés permettant l'obtention des cellules souches pluripotentes induites sont bien connus de l'homme du métier et sont notamment décrits dans les articles

de Yu et al (Science, 2007, 318 (5858) : 1917–1920), Takahashi et al (Cell, 2007, 131(5) : 861–872) et Nakagawa et al (Nat Biotechnol, 2008, 26(1) : 101-106).

Tel qu'utilisé ici, le terme de « progéniteurs érythrocytaires unipotent » se réfère à des cellules progénitrices obtenues par différenciation de CSH au cours de l'érythropoïèse et qui ont la capacité de se diviser et de se différencier ultérieurement en précurseurs érythrocytaires puis en globules rouges par énucléation. En particulier, après le stade MEP (dernier stade multipotent), les cellules acquièrent progressivement des marqueurs spécifiques des progéniteurs érythrocytaires. Dans un premier temps, le marqueur CD71 (récepteur de la transferrine) apparait, suivi par l'apparition de la Glycophorine A (GPA ou CD235a). Les progéniteurs érythrocytaires unipotents englobent les cellules BFU-E (Burst Forming Unit – E) et CFU-E (Colony Forming Unit – E) qui sont irréversiblement engagés vers la lignée érythrocytaire. Les cellules BFU-E (Burst Forming Unit – E) présentent un phénotype $CD34^{+}CD36^{neg}GPA^{neg}CD123^{neg}CD71^{low}$. Les CFU-E (Colony Forming Unit – E) présentent un phénotype $CD34^{neg}CD36^{neg}GPA^{neg}CD123^{neg}CD71^{high}$.

Tel qu'utilisé ici, le terme « précurseur érythrocytaire » définit les cellules obtenues par différenciation des progéniteurs érythrocytaires unipotents et capables de produire des réticulocytes. Ce terme englobe les proérythroblastes, les érythroblastes basophiles, les érythroblastes polychromatophiles et les érythroblastes orthochromatiques. La distinction entre ces cellules est possible sur une base cytologique par coloration des cellules par coloration de May-Grünwald Giemsa (MGG), par l'analyse de la coloration et du rapport noyau/cytoplasme, selon des techniques bien connues de l'homme du métier.

Tel qu'utilisés ici les termes « globule rouge », « globule rouge mature », « hématie », « érythrocyte » et « érythrocyte mature » sont équivalents et peuvent être employés l'un pour l'autre. Le terme de « érythrocyte » se réfère à une cellule énucléée présentant des marqueurs caractéristiques de la maturation érythrocytaire. Les érythrocytes expriment notamment la glycophorine A (CD235a) mais n'expriment pas le marqueur CD36. Leur identification peut être basée sur des critères cytologiques bien connus de l'homme du métier, tels que la taille de la cellule et l'absence de noyau cellulaire.

Selon un mode de réalisation, les cellules hématopoïétiques multipotentes utilisées dans les procédés selon l'invention pour produire des progéniteurs érythrocytaires unipotents ou pour produire des érythrocytes sont issues d'un prélèvement réalisé chez un donneur ou dérivent de cellules obtenues chez un donneur. En particulier, les progéniteurs érythrocytaires ou érythrocytes ainsi obtenus peuvent être destinés à être transplantés chez un patient receveur, notamment par transfusion.

Le donneur et le receveur peuvent être le même individu ou des individus différents. Dans un mode de réalisation, le donneur et le receveur sont le même individu. Dans un autre mode de réalisation préféré, le donneur est différent du receveur. Dans ce cas, le donneur est de préférence un donneur sain, en particulier un individu dépourvu de pathologie hématologique.

Composé vitisine

L'invention consiste à utiliser un composé vitisine lors de la production *ex vivo* ou *in vitro* de cellules hématopoïétiques multipotentes et/ou de progéniteurs érythrocytaires unipotents et/ou de globules rouges, en particulier pour favoriser l'amplification et/ou la différenciation des cellules hématopoïétiques. Le composé vitisine permet en particulier une différenciation érythrocytaire plus rapide et plus importante des cellules hématopoïétiques multipotentes, en particulier des CSH, en progéniteurs érythrocytaires unipotents. Il permet également une différenciation érythrocytaire plus rapide et plus importante des progéniteurs érythrocytaires unipotents en précurseurs érythrocytaires et/ou des précurseurs érythrocytaires en globule rouge.

Tel qu'utilisé ici, le terme « composé vitisine » se réfère à un stilbène appartenant à la famille des polyphénols, pouvant par exemple être extrait à partir de sarments de vigne. Ce terme désigne la vitisine B ou l'un de ses dérivés.

De préférence, le terme « composé vitisine » n'englobe pas les composés choisis parmi le resvératrol, le pallidol, l'e-viniferine, l'ampelopsine, l'oxyresveratrol, le piceatannol et/ou le gnetol.

Selon des modes de réalisation préférés, le composé vitisine est la vitisine B.

La vitisine B est un tétramère du resvératrol présent dans les plantes du genre Vitis, telle que *Vitis vinifera*.

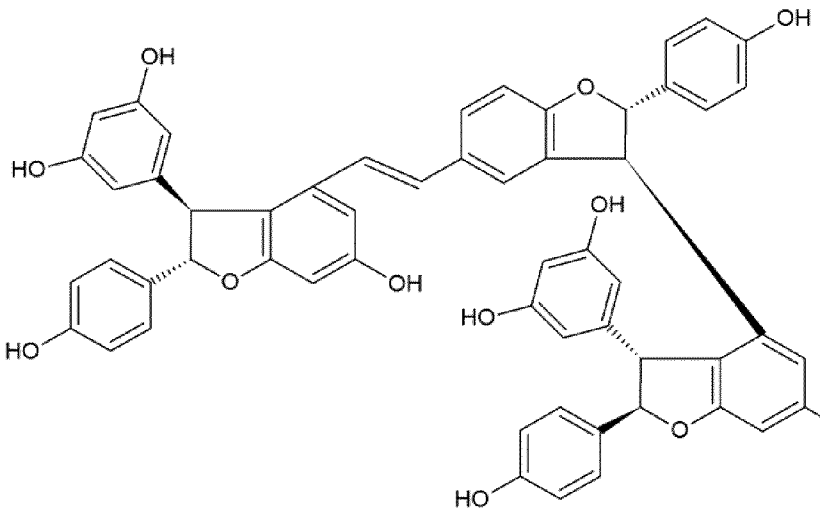
La vitisine B est également connue sous les noms

- 1,3-Benzenediol, 5-[(2R,2'S,3R,3'S)-5-[(1E)-2-[(2S,3S)-3-(3,5-dihydroxyphenyl)-2,3-dihydro-6-hydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)-4-benzofuranyl]ethenyl]-2,2',3,3'-tetrahydro-6'-hydroxy-2,2'-bis(4-hydroxyphenyl)[3,4'-bibenzofuran]-3'-yl]- (9CI, ACI) ;

- 1,3-Benzenediol, 5-[5-[2-[3-(3,5-dihydroxyphenyl)-2,3-dihydro-6-hydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)-4-benzofuranyl]ethenyl]-2,2',3,3'-tetrahydro-6'-hydroxy-2,2'-bis(4-hydroxyphenyl)[3,4'-bibenzofuran]-3'-yl]-, [2R-[2α,3β(2'S*,3'S*),5[E(2S*,3S*)]]]- (ZCI) ; ou

-5-[(2R,2'S,3R,3'S)-5-[(1E)-2-[(2S,3S)-3-(3,5-Dihydroxyphenyl)-2,3-dihydro-6-hydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)-4-benzofuranyl]ethenyl]-2,2',3,3'-tetrahydro-6'-hydroxy-2,2'-bis(4-hydroxyphenyl)[3,4'-bibenzofuran]-3'-yl]-1,3-benzenediol (ACI), et a en particulier pour numéro d'enregistrement CAS 142449-90-9.

En particulier, la vitisine B telle qu'utilisée selon l'invention a la formule (I) suivante :



(I)

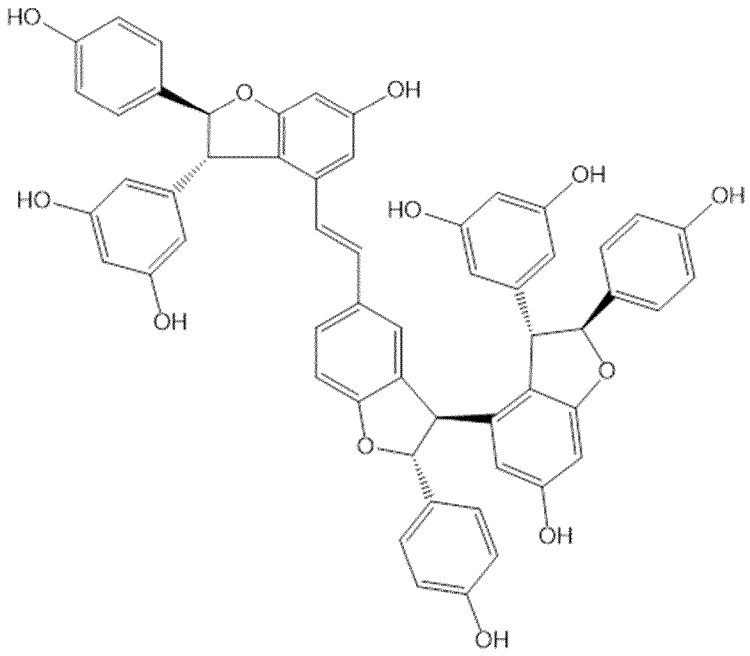
La vitisine B peut notamment être sous forme de sel ou d'hydrate.

Selon d'autres modes de réalisation, le composé vitisine est un dérivé de vitisine B. De préférence, le dérivé de vitisine est un isomère de vitisine B, de préférence un stéréoisomère de vitisine B. En particulier, les stéréoisomères de vitisine B englobent les stéréoisomères R ou S sur l'un quelconque des sites stéréochimiques de la vitisine B.

Des exemples d'isomères peuvent être par exemple sans s'y être limités un composé ayant un numéro de CAS choisi parmi CAS 165883-77-2, CAS180580-73-8, CAS142507-86-6, CAS 1373138-12-5, CAS1807631-15-7, CAS879897-47-9, CAS879897-46-8 et CAS681004-56-8 ; ou un composé de formules(I), (II) et (III) décrit ci-dessous et des combinaisons de ceux-ci.

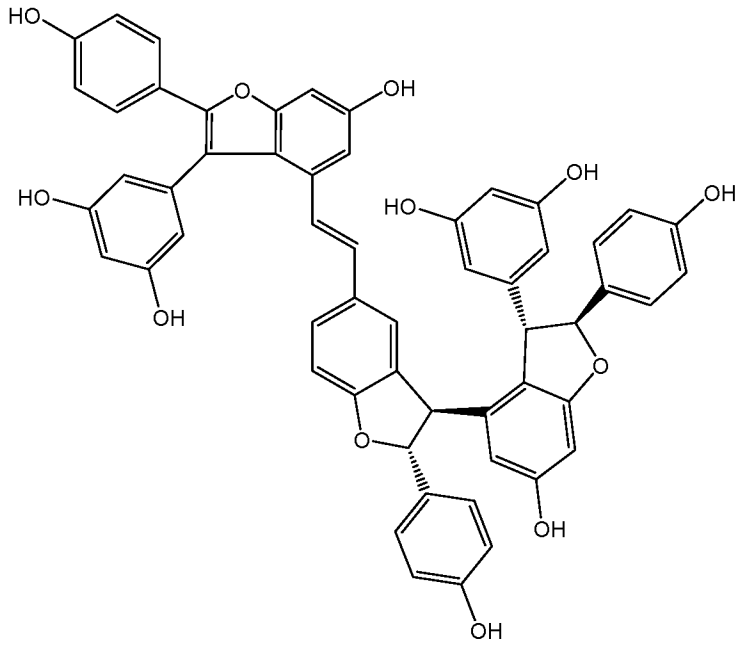
En particulier, le dérivé de vitisine B peut être un stéréoisomère de vitisine B, par exemple tel que décrit dans la demande WO2015126129. De préférence, le dérivé de vitisine B est un stéréoisomère qui dépend de la double liaison, en position Z (composé 20 de la demande WO2015126129) ou en position E (composé 22 de la demande WO2015126129).

Le dérivé de vitisine B peut notamment avoir la formule (II) ou (III) suivante :



(II)

ou



(III)

Selon certains modes de réalisation particuliers, le composé vitisine est choisi dans le groupe constitué des composés de formules (I), (II) et (III), et des combinaisons de ceux-ci.

Ainsi, selon certains modes de réalisation, le composé vitisine peut être choisi parmi la vitisine B et un dérivé de vitisine B ayant un numéro CAS choisi parmi CAS142449-90-9, CAS 165883-77-2, CAS180580-73-8, CAS142507-86-6, CAS 1373138-12-5, CAS1807631-15-7, CAS879897-47-9, CAS879897-46-8 et CAS681004-56-8 ou un composé de formules(I), (II) et (III) décrit ci-dessus et des combinaisons de ceux-ci.

La mise en contact du composé vitisine avec les cellules peut être réalisée par l'addition du composé vitisine dans un milieu de culture, en particulier un milieu permettant la culture des cellules hématopoïétiques. Le milieu de culture est de préférence adapté aux exigences nutritionnelles des cellules hématopoïétiques et en particulier adapté à la croissance et/ou différenciation des cellules hématopoïétiques, dans lequel est ajouté le composé vitisine. De tels milieux sont connus de l'homme du métier et certains sont plus spécifiquement décrits ci-dessous.

De préférence, le composé vitisine est utilisé à une concentration comprise entre environ 0,5 µM et environ 1 mM, environ 0,5 µM et environ 500 µM, environ 0,5 µM et environ 200 µM, environ 0,5 µM et environ 100 µM, entre environ 0,5 µM et environ 50 µM, entre environ 0,5 µM et environ 40 µM, entre environ 0,5 µM et environ 30 µM, entre environ 0,5 µM et environ 20 µM, entre environ 0,5 µM et environ 15 µM ou entre environ 0,5 µM et environ 10 µM, environ 5 µM et environ 1 mM, environ 5 µM et environ 500 µM, environ 5 µM et environ 200 µM, environ 5 µM et environ 100 µM, entre environ 5 µM et environ 75 µM, entre environ 5 µM et environ 50 µM, entre environ 5 µM et environ 40 µM, entre environ 5 µM et environ 30 µM, entre environ 5 µM et environ 20 µM, entre environ 5 µM et environ 15 µM ou entre environ 5 µM et environ 10 µM, de préférence entre environ 10 µM et environ 1 mM, environ 10 µM et environ 500 µM, environ 10 µM et environ 200 µM, environ 10 µM et environ 100 µM, 10 µM et environ 75 µM, entre environ 10 µM et environ 50 µM, entre environ 10 µM et environ 40 µM, entre environ 10 µM et environ 30 µM, entre environ 10 µM et environ 20 µM, de manière préférée à une concentration d'environ 10 µM. De préférence, le composé vitisine est utilisé à une concentration comprise entre 1 µM et 500 µM, préférentiellement entre 5 µM et 100 µM. En particulier, la vitisine-B est utilisée à une concentration d'environ 0,5, 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 80, 90, 95 ou 100 µM.

Procédés de production

La présente invention concerne des procédés de production ou de préparation de cellules de la lignée érythrocytaire.

En particulier, les procédés de production selon l'invention peuvent comprendre :

a) l'amplification, la différenciation et/ou la maturation de cellules de la lignée érythrocytaire, et

b) facultativement, la récupération des cellules de la lignée érythrocytaire multipliées et/ou différenciées et/ou matures, et

c) facultativement, le stockage des cellules de la lignée érythrocytaire obtenues/récupérées.

De préférence, les cellules de la lignée érythrocytaire sont choisies parmi les CSH, MPP, CMP, MEP, BFU-E, les CFU-E, et les précurseurs érythrocytaires, à savoir les proérythroblastes, les érythroblastes

basophiles, les érythroblastes polychromatophiles, les érythroblastes orthochromatiques, les réticulocytes et/ou les érythrocytes, et l'une quelconque de leur combinaison.

Dans les procédés selon l'invention, le composé vitisine peut être mis en contact, de préférence dans un milieu de culture adapté, avec les cellules de la lignée érythrocytaire lors de l'amplification, de la différenciation et/ou de la maturation des cellules, de préférence lors de l'amplification et/ou la différenciation des cellules.

Dans certains modes de réalisation, le composé vitisine est mis en contact avec des cellules hématopoïétiques multipotentes, en particulier des cellules choisies parmi les cellules CSH, MPP, CMP et MEP, et leurs combinaisons, afin d'amplifier lesdites cellules ou/ou obtenir des progéniteurs érythrocytaires unipotents, des précurseurs érythrocytaires et/ou des érythrocytes par différenciation desdites cellules.

Dans d'autres modes de réalisation, le composé vitisine est mis en contact avec des progéniteurs érythrocytaires unipotents afin d'amplifier lesdits progéniteurs et/ou obtenir des précurseurs érythrocytaires et/ou des érythrocytes par différenciation desdits progéniteurs.

Dans d'autres modes de réalisation, le composé vitisine est mis en contact avec des précurseurs érythrocytaires afin d'obtenir des érythrocytes par différenciation et maturation desdits précurseurs.

Dans d'autres modes de réalisation, le composé vitisine est mis en contact avec des cellules CD34+, c'est-à-dire des cellules choisies parmi les cellules CSH, MPP, CMP, MEP et BFU-E, et leurs combinaisons, afin d'amplifier lesdites cellules et/ou obtenir des progéniteurs CFU-E, des précurseurs érythrocytaires et/ou des érythrocytes par différenciation desdites cellules.

En particulier, la présente invention concerne un procédé *in vitro* de production d'érythrocytes comprenant :

a) la fourniture de cellules hématopoïétiques multipotentes, de préférence d'origine humaine, sélectionnées dans le groupe constitué des cellules souches hématopoïétiques (CSH), des progéniteurs multipotents (MPP), des progéniteurs myéloïdes communs (CMP), des progéniteurs mégacaryocytaires-érythrocytaires (MEP), et les combinaisons de ceux-ci, et optionnellement l'amplification desdites cellules hématopoïétiques multipotentes;

b) l'induction de la différenciation desdites cellules hématopoïétiques multipotentes en progéniteurs érythrocytaires unipotents, et optionnellement l'amplification desdits progéniteurs érythrocytaires unipotents;

c) l'induction de la différenciation desdits progéniteurs érythrocytaires unipotents en précurseurs érythrocytaires; et

d) l'induction de la maturation des précurseurs érythrocytaires en érythrocytes, et optionnellement la récupération des érythrocytes obtenus.

Dans ce procédé, les cellules (cellules hématopoïétiques multipotentes, progéniteurs érythrocytaires unipotents et/ou précurseurs érythrocytaires) sont mises en contact avec un composé vitisine à l'étape a) (lorsque celle-ci comprend l'amplification desdites cellules hématopoïétiques multipotentes), l'étape b), l'étape c) et/ou l'étape d).

De préférence, la présente invention concerne un procédé *in vitro* de production d'érythrocytes comprenant :

a) la fourniture de cellules hématopoïétiques multipotentes, de préférence d'origine humaine, sélectionnées dans le groupe constitué des cellules souches hématopoïétiques (CSH), des progéniteurs multipotents (MPP), des progéniteurs myéloïdes communs (CMP), des progéniteurs mégacaryocytaires-érythrocytaires (MEP), et les combinaisons de ceux-ci, et l'amplification desdites cellules hématopoïétiques multipotentes;

b) l'induction de la différenciation desdites cellules hématopoïétiques multipotentes en progéniteurs érythrocytaires unipotents, et optionnellement l'amplification desdits progéniteurs érythrocytaires unipotents;

c) l'induction de la différenciation desdits progéniteurs érythrocytaires unipotents en précurseurs érythrocytaires; et

d) l'induction de la maturation des précurseurs érythrocytaires en érythrocytes, et

optionnellement la récupération des érythrocytes obtenus.

Dans ce procédé, les cellules (cellules hématopoïétiques multipotentes, progéniteurs érythrocytaires unipotents et/ou précurseurs érythrocytaires) sont mises en contact avec un composé vitisine à l'étape a), l'étape b), l'étape c) et/ou l'étape d).

La présente invention concerne également un procédé *in vitro* de production de progéniteurs érythrocytaires unipotents comprenant :

a) la fourniture de cellules hématopoïétiques multipotentes, de préférence d'origine humaine, sélectionnées dans le groupe constitué des cellules souches hématopoïétiques (CSH), des progéniteurs multipotents (MPP), des progéniteurs myéloïdes communs (CMP), des progéniteurs mégacaryocytaires-érythrocytaires (MEP), et les combinaisons de ceux-ci , et optionnellement l'amplification desdites cellules hématopoïétiques multipotentes ; et

b) l'induction de la différenciation desdites cellules hématopoïétiques multipotentes en progéniteurs érythrocytaires unipotents, et optionnellement l'amplification desdits progéniteurs érythrocytaires unipotents ; et

c) optionnellement la récupération des progéniteurs érythrocytaires unipotents obtenus ;

Dans ce procédé, les cellules (cellules hématopoïétiques multipotentes et/ou progéniteurs érythrocytaires unipotents) sont mises en contact avec un composé vitisine à l'étape a) (lorsque celle-ci comprend l'amplification desdites cellules hématopoïétiques multipotentes) et/ou à l'étape b).

De préférence, la présente invention concerne également un procédé *in vitro* de production de progéniteurs érythrocytaires unipotents comprenant :

a) la fourniture de cellules hématopoïétiques multipotentes, de préférence d'origine humaine, sélectionnées dans le groupe constitué des cellules souches hématopoïétiques (CSH), des progéniteurs multipotents (MPP), des progéniteurs myéloïdes communs (CMP), des progéniteurs mégacaryocytaires-érythrocytaires (MEP), et les combinaisons de ceux-ci , et l'amplification desdites cellules hématopoïétiques multipotentes ; et

b) l'induction de la différenciation desdites cellules hématopoïétiques multipotentes en progéniteurs érythrocytaires unipotents, et optionnellement l'amplification desdits progéniteurs érythrocytaires unipotents ; et

c) optionnellement la récupération des progéniteurs érythrocytaires unipotents obtenus ;

Dans ce procédé, les cellules (cellules hématopoïétiques multipotentes et/ou progéniteurs érythrocytaires unipotents) sont mises en contact avec un composé vitisine à l'étape a) et/ou à l'étape b).

Ce procédé a notamment pour but d'induire la différenciation des cellules hématopoïétiques multipotentes en progéniteurs érythrocytaires unipotents, et de permettre soit l'amplification de cette population de progéniteurs tout en conservant leur capacité à se différencier ultérieurement en globules rouges, soit de poursuivre la différenciation de cette population de progéniteurs en précurseurs érythrocytaires et globules rouges.

La présente invention concerne également un procédé *in vitro* de production de précurseurs érythrocytaires comprenant :

a) la fourniture de progéniteurs érythrocytaires unipotents ;

b) l'induction de la différenciation desdits progéniteurs érythrocytaires unipotents en précurseurs érythrocytaires; et

optionnellement la récupération des précurseurs érythrocytaires obtenus.

Dans ce procédé, les cellules (progéniteurs érythrocytaires unipotents et/ou précurseurs érythrocytaires) sont mises en contact avec un composé vitisine à l'étape b).

De préférence, les progéniteurs érythrocytaires unipotents fournis dans l'étape a) sont obtenus par le procédé de production de progéniteurs érythrocytaires unipotents selon l'invention.

La présente invention concerne également un procédé *in vitro* de production d'érythrocytes comprenant,

a) la fourniture de progéniteurs érythrocytaires unipotents ;

b) l'induction de la différenciation desdits progéniteurs érythrocytaires unipotents en précurseurs érythrocytaires;

c) l'induction de la maturation des précurseurs érythrocytaires en érythrocytes, et

optionnellement la récupération des érythrocytes obtenus.

Dans ce procédé, les cellules (progéniteurs érythrocytaires unipotents et/ou précurseurs érythrocytaires) sont mises en contact avec un composé vitisine à l'étape b) et/ou l'étape c).

De préférence, les progéniteurs érythrocytaires unipotents fournis dans l'étape a) sont obtenus par le procédé de production de progéniteurs érythrocytaires unipotents selon l'invention

La présente invention concerne également un procédé *in vitro* de production d'érythrocytes comprenant,

a) la fourniture de précurseurs érythrocytaires; et

b) l'induction de la maturation des précurseurs érythrocytaires en érythrocytes, et

optionnellement la récupération des érythrocytes obtenus.

Dans ce procédé, les cellules précurseurs érythrocytaires sont mises en contact avec un composé vitisine à l'étape b).

De préférence, les précurseurs érythrocytaires fournis dans l'étape a) sont obtenus par un procédé de production de précurseurs érythrocytaires selon l'invention.

Les cellules hématopoïétiques multipotentes fournies dans les procédés selon l'invention peuvent être obtenues par toute méthode connue de l'homme du métier. Comme indiqué ci-dessus, elles peuvent notamment être isolées à partir d'échantillons de moelle osseuse, de cytaphérèse, de sang total, de sang de cordon ombilical ou placentaire, par exemple à l'aide d'un système immuno-magnétique ou d'un système de tri sur la présence de récepteurs membranaires spécifiques. Elles peuvent également être obtenues par différenciation de cellules souches embryonnaires ou de cellules souches pluripotentes induites (iPS) comme indiqué ci-dessus. Optionnellement, avant leur utilisation dans l'un des procédés selon l'invention, ces cellules hématopoïétiques multipotentes peuvent être amplifiées par culture dans un milieu adapté à l'amplification de ces cellules. Les cellules hématopoïétiques multipotentes fournies comprennent des CSH, MPP, CMP et/ou MEP, de préférence des CSH et optionnellement des MPP, CMP et/ou MEP. Les cellules hématopoïétiques multipotentes fournies peuvent également comprendre d'autres types cellulaires. En particulier, ces cellules peuvent être des cellules CD34+ et peuvent également comprendre des BFU-E.

Les progéniteurs érythrocytaires unipotents fournis dans les procédés selon l'invention peuvent être obtenus par le procédé de production de progéniteurs érythrocytaires unipotents selon l'invention ou par toute autre méthode connue de l'homme du métier. En particulier, ces progéniteurs peuvent être isolés à partir d'échantillons de moelle osseuse, de cytaphérèse, de sang total, de sang de cordon ombilical ou placentaire, par exemple à l'aide d'un système immuno-magnétique ou d'un système de tri sur la présence de récepteurs membranaires spécifiques. Ils peuvent également être obtenus par différenciation de cellules hématopoïétiques multipotentes selon toute méthode connue de l'homme du métier. Optionnellement, avant leur utilisation dans l'un des procédés selon l'invention, ces progéniteurs

érythrocytaires unipotents peuvent être amplifiés par culture dans un milieu adapté à l'amplification de ces cellules. Les progéniteurs érythrocytaires unipotents fournis comprennent des BFU-E et/ou des CFU-E. Ils peuvent également comprendre d'autres types cellulaires tels que des CSH, MPP, CMP et/ou MEP.

Les précurseurs érythrocytaires fournis dans les procédés selon l'invention peuvent être obtenus par un procédé de production de précurseurs érythrocytaires selon l'invention ou par toute autre méthode connue de l'homme du métier. En particulier, ces précurseurs érythrocytaires peuvent être isolés à partir d'échantillons de moelle osseuse, de cytaphérèse, de sang total, de sang de cordon ombilical ou placentaire, par exemple à l'aide d'un système immuno-magnétique ou d'un système de tri sur la présence de récepteurs membranaires spécifiques. Ils peuvent également être obtenus par différenciation de cellules hématopoïétiques multipotentes ou de progéniteurs érythrocytaires unipotents selon toute méthode connue de l'homme du métier. Optionnellement, avant leur utilisation dans l'un des procédés selon l'invention, ces précurseurs érythrocytaires peuvent être amplifiés par culture dans un milieu adapté à l'amplification de ces cellules.

Dans les procédés selon l'invention, les cellules peuvent être mises en contact avec le composé vitisine dans un milieu de culture adapté aux exigences nutritionnelles des cellules hématopoïétiques. Selon les étapes durant lesquelles a lieu cette mise en contact, ce milieu de culture peut être un milieu de culture adapté à l'amplification et/ou la différenciation et/ou la maturation des cellules hématopoïétiques.

Le milieu de culture adapté aux exigences nutritionnelles des cellules hématopoïétiques peut être tout milieu connu de l'homme du métier pour subvenir aux besoins de ces cellules et plus particulièrement pour subvenir aux besoins des cellules sélectionnées dans le groupe constitué des cellules CSH, MPP, CMP, MEP, des progéniteurs érythrocytaires unipotents, des précurseurs érythrocytaires, et des combinaisons de ceux-ci. Ce milieu satisfait les exigences minimales de survie des cellules à cultiver et permet, selon les situations et les compléments apportés, le maintien, l'amplification, la différenciation et/ou la maturation des cellules hématopoïétiques. De nombreux milieux de culture adaptés aux exigences nutritionnelles des cellules hématopoïétiques d'intérêt sont connus de l'homme du métier et disponibles dans le commerce, tels que le milieu de Dulbecco modifié selon Iscove (milieu IMDM), le milieu Stem Span SFEM II (Stemcell technologies) ou encore le milieu « StemMACS HSC Expansion Media XF, Human » (Miltenyi Biotec). La composition de ces milieux est connue.

De préférence, dans les procédés selon l'invention, le composé vitisine est mis en contact avec les cellules dans un milieu adapté à l'amplification et/ou la différenciation et/ou la maturation des cellules hématopoïétiques. De tels milieux sont bien connus de l'homme du métier. Des exemples de tels milieux sont notamment mentionnés dans la section « Milieu de culture » ci-dessous. De manière générale, les milieux adaptés à l'amplification, la différenciation et la maturation des cellules peuvent être obtenus à

partir du même milieu de base adapté aux exigences nutritionnelles des cellules hématopoïétiques, par exemple le milieu IMDM ou le milieu Stem Span SFEM II, et différent essentiellement de par leur composition en cytokines.

Tel qu'utilisé ici, le terme « croissance », « multiplication » ou « amplification » se réfère à la multiplication des cellules. Ainsi, un milieu adapté à l'amplification des cellules hématopoïétiques est un milieu permettant la multiplication des cellules hématopoïétiques multipotentes, à savoir CSH, MPP, CMP et/ou MEP, des progéniteurs érythrocytaires unipotents et/ou des précurseurs érythrocytaires. Un milieu de culture adapté à l'amplification d'un type cellulaire peut être également adapté à la différenciation de ce type cellulaire. A l'inverse, lorsque seule l'amplification est souhaitée, par exemple pour augmenter le pool de cellules hématopoïétiques multipotentes ou de progéniteurs érythrocytaires unipotents, le milieu de culture adapté à l'amplification ne stimule pas ou peu la différenciation des cellules.

Dans les procédés selon l'invention, les cellules hématopoïétiques multipotentes peuvent être amplifiées avant différenciation. Cette amplification peut se faire dans tout milieu adapté à l'amplification des cellules hématopoïétiques multipotentes, notamment des CSH, et connu de l'homme du métier. En particulier, les cellules hématopoïétiques multipotentes peuvent être amplifiées dans un milieu adapté aux exigences nutritionnelles des cellules hématopoïétiques, par exemple le milieu IMDM ou le milieu Stem Span SFEM II, comprenant, ou supplémenté en G-SCF, SCF, FLT3-L et TPO, en particulier dans les concentrations décrites ci-dessous dans la section « Milieu de culture ».

Dans les procédés selon l'invention, les progéniteurs érythrocytaires peuvent être amplifiés avant différenciation. Cette amplification peut se faire dans tout milieu adapté à l'amplification des progéniteurs érythrocytaires et connu de l'homme du métier. En particulier, les progéniteurs érythrocytaires peuvent être amplifiés dans un milieu adapté aux exigences nutritionnelles des cellules hématopoïétiques, par exemple le milieu IMDM ou le milieu Stem Span SFEM II, comprenant, ou supplémenté en, G-SCF, SCF, FLT3-L et TPO, en particulier dans les concentrations décrites ci-dessous dans la section « Milieu de culture ».

Dans les procédés selon l'invention, les précurseurs érythrocytaires peuvent être amplifiés avant maturation. Cette amplification peut se faire dans tout milieu adapté à l'amplification des précurseurs érythrocytaires et connu de l'homme du métier. En particulier, les précurseurs érythrocytaires peuvent être amplifiés dans un milieu adapté aux exigences nutritionnelles des cellules hématopoïétiques, par exemple le milieu IMDM ou le milieu Stem Span SFEM II, comprenant, ou supplémenté en EPO, Hydrocortisone , en facteurs de croissance adaptés, en transferrine, sérum et/ou du plasma, ou l'une quelconque de leur combinaison, en particulier dans les concentrations décrites ci-dessous dans la section « Milieu de culture ».

Le terme « différenciation » se réfère à l'acquisition par les cellules cultivées de caractéristiques qui n'étaient pas présentes dans les cellules initialement utilisées pour ensemencer le milieu. Dans le cas présent, ce terme se réfère à l'acquisition de caractéristiques de cellules plus avancées dans le processus d'érythropoïèse. Ainsi, un milieu adapté à la différenciation des cellules hématopoïétiques est donc un milieu permettant la différenciation des cellules hématopoïétiques multipotentes, telles que des CSH, MPP, CMP et/ou MEP, en progéniteurs érythrocytaires unipotents et/ou la différenciation des progéniteurs érythrocytaires unipotents en précurseurs érythrocytaires et/ou la différenciation des précurseurs érythrocytaires afin d'obtenir, après maturation, des érythrocytes. Typiquement, un milieu de culture adapté à la différenciation d'un type cellulaire est également adapté à l'amplification des cellules.

Dans les procédés selon l'invention, les cellules hématopoïétiques multipotentes peuvent être différenciées en progéniteurs érythrocytaires unipotents. Cette différenciation peut se faire dans tout milieu adapté à la différenciation des cellules hématopoïétiques multipotentes, notamment des CSH, et connu de l'homme du métier. En particulier, les cellules hématopoïétiques multipotentes peuvent être différenciées dans un milieu adapté aux exigences nutritionnelles des cellules hématopoïétiques, par exemple le milieu IMDM ou le milieu Stem Span SFEM II, comprenant de l'IL3, de l'IL6, du SCF, de l'albumine sérique en particulier bovine, de l'insuline, de la transferrine et optionnellement de l'EPO.

Dans les procédés selon l'invention, les progéniteurs érythrocytaires peuvent être différenciés en précurseurs érythrocytaires. Cette différenciation peut se faire dans tout milieu adapté à la différenciation des progéniteurs érythrocytaires et connu de l'homme du métier. En particulier, les progéniteurs érythrocytaires peuvent être différenciés dans un milieu adapté aux exigences nutritionnelles des cellules hématopoïétiques, par exemple le milieu IMDM ou le milieu Stem Span SFEM II, comprenant de l'IL3, du SCF, de l'hydrocortisone et optionnellement de l'EPO.

Tel qu'utilisé ici, le terme « maturation » se réfère au processus par lequel les précurseurs érythrocytaires deviennent des globules rouges et qui implique notamment l'énucléation des cellules. Ainsi, un milieu adapté à la maturation des cellules hématopoïétiques est donc un milieu permettant la maturation des précurseurs érythrocytaires en érythrocytes. Typiquement, un milieu adapté à la l'amplification et/ou à la différenciation des cellules hématopoïétiques ne favorise pas cette maturation. La maturation des précurseurs érythrocytaires se traduit notamment par l'expression des marqueurs de maturation érythrocytaire tels que CD235a et par l'énucléation.

Dans les procédés selon l'invention, les précurseurs érythrocytaires peuvent être maturés pour obtenir des érythrocytes. Cette maturation peut se faire dans tout milieu adapté à la maturation des précurseurs érythrocytaires et connu de l'homme du métier. En particulier, les précurseurs érythrocytaires peuvent être maturés dans un milieu adapté aux exigences nutritionnelles des cellules

hématopoïétiques, par exemple le milieu IMDM ou le milieu Stem Span SFEM II, comprenant, ou supplémenté en, EPO, de préférence 2 ou 3 UI/ml d'EPO. De préférence, le milieu ne comprend pas de cytokines. De préférence, la maturation des précurseurs érythrocytaires est induite à une concentration cellulaire élevée, par exemple supérieure à 5 000 000 cellules/ml de culture.

Ainsi, dans les procédés selon l'invention,

- l'amplification des cellules hématopoïétiques multipotentes peut se faire en plaçant les cellules hématopoïétiques multipotentes dans un milieu de culture adapté à l'amplification des cellules hématopoïétiques multipotentes, en particulier un milieu tel que décrit ci-dessus ou dans la section « Milieu de culture », typiquement durant une période de 3 à 15 jours, de préférence de 5 à 8 jours ;
- l'amplification des progéniteurs érythrocytaires peut se faire en plaçant les progéniteurs érythrocytaires dans un milieu de culture adapté à l'amplification des progéniteurs érythrocytaires, en particulier un milieu tel que décrit ci-dessus ou dans la section « Milieu de culture », typiquement durant une période de 3 à 15 jours, de préférence de 4 à 12 jours;
- l'amplification des précurseurs érythrocytaires peut se faire en plaçant les précurseurs érythrocytaires dans un milieu de culture adapté à l'amplification des précurseurs érythrocytaires, en particulier un milieu tel que décrit ci-dessus ou dans la section « Milieu de culture », typiquement durant une période de 2 à 6 jours, de préférence de 2 à 4 jours ;
- l'induction de la différenciation des cellules hématopoïétiques multipotentes en progéniteurs érythrocytaires peut se faire en plaçant les cellules hématopoïétiques multipotentes dans un milieu de culture adapté à la différenciation des cellules hématopoïétiques multipotentes, en particulier un milieu tel que décrit ci-dessus ou dans la section « Milieu de culture », typiquement durant une période de 3 à 10 jours, de préférence de 3 à 6 jours ;
- l'induction de la différenciation des progéniteurs érythrocytaires en précurseurs érythrocytaires peut se faire en plaçant les progéniteurs érythrocytaires dans un milieu de culture adapté à la différenciation des progéniteurs érythrocytaires, en particulier un milieu tel que décrit ci-dessus ou dans la section « Milieu de culture », typiquement durant une période 3 à 10 jours, de préférence de 3 à 6 jours ;
- l'induction de la maturation des précurseurs érythrocytaires peut se faire en plaçant les précurseurs érythrocytaires dans un milieu de culture adapté à la maturation des précurseurs érythrocytaires, en particulier un milieu tel que décrit ci-dessus ou dans la section « Milieu de culture », typiquement durant une période 5 à 15 jours, de préférence de 8 à 12 jours.

Les techniques pour modifier la composition d'un milieu de culture sont bien connues de l'homme du métier. En particulier, l'ajout d'une molécule ou l'augmentation de sa concentration peut se faire directement dans le milieu de culture préexistant et le retrait d'une molécule ou la diminution de sa

concentration peut se faire par centrifugation des cellules et re-suspension dans un nouveau milieu de culture ou par dilution du milieu de culture.

Les durées de chaque étape du procédé données ci-dessus sont données à titre indicatif. Ces durées peuvent être aisément définies/ajustées par l'homme du métier en observant le nombre et/ou la nature des cellules en culture.

Dans les procédés selon l'invention, les cellules peuvent être mises en contact avec le composé vitisine durant

- l'étape d'amplification des cellules hématopoïétiques multipotentes, et/ou

- l'étape de différenciation des cellules hématopoïétiques multipotentes en progéniteurs érythrocytaires unipotents, et/ou

- l'étape d'amplification des progéniteurs érythrocytaires unipotents, et/ou

- l'étape de différenciation des progéniteurs érythrocytaires unipotents en précurseurs érythrocytaires; et/ou

- l'étape d'amplification des précurseurs érythrocytaires, et/ou

- l'étape d'induction de la maturation des précurseurs érythrocytaires en érythrocytes.

Selon certains modes de réalisation particuliers, les cellules sont mises en contact avec le composé vitisine au cours de chacune de ces étapes.

Selon d'autres modes de réalisation particuliers, les cellules sont mises en contact avec le composé vitisine durant l'étape d'amplification des cellules hématopoïétiques multipotentes et/ou l'étape de différenciation des cellules hématopoïétiques multipotentes en progéniteurs érythrocytaires unipotents.

Selon d'autres modes de réalisation particuliers, les cellules sont mises en contact avec le composé vitisine durant l'étape d'amplification des progéniteurs érythrocytaires unipotents et/ou l'étape de différenciation des progéniteurs érythrocytaires unipotents en précurseurs érythrocytaires.

Selon d'autres modes de réalisation particuliers, les cellules sont mises en contact avec le composé vitisine durant l'étape d'amplification des progéniteurs érythrocytaires unipotents et/ou l'étape de différenciation des progéniteurs érythrocytaires unipotents en précurseurs érythrocytaires et/ou l'étape de différenciation des progéniteurs érythrocytaires unipotents en précurseurs érythrocytaires.

Selon d'autres modes de réalisation particuliers, les cellules sont mises en contact avec le composé vitisine durant (i) l'étape d'amplification des cellules hématopoïétiques multipotentes et/ou l'étape de différenciation des cellules hématopoïétiques multipotentes en progéniteurs érythrocytaires

unipotents et (ii) l'étape d'amplification des progéniteurs érythrocytaires unipotents et/ou l'étape de différenciation des progéniteurs érythrocytaires unipotents en précurseurs érythrocytaires.

Selon d'autres modes de réalisation particuliers, les cellules sont mises en contact avec le composé vitisine durant (i) l'étape d'amplification des cellules hématopoïétiques multipotentes et/ou l'étape de différenciation des cellules hématopoïétiques multipotentes en progéniteurs érythrocytaires unipotents et (ii) l'étape d'amplification des progéniteurs érythrocytaires unipotents et/ou l'étape de différenciation des progéniteurs érythrocytaires unipotents en précurseurs érythrocytaires et iii) l'étape de maturation des précurseur érythrocytaires en érythrocytes.

Selon d'autres modes de réalisation particuliers, les cellules sont mises en contact avec le composé vitisine durant l'étape de différenciation des cellules hématopoïétiques multipotentes en progéniteurs érythrocytaires unipotents, et l'étape de différenciation des progéniteurs érythrocytaires unipotents en précurseurs érythrocytaires; et optionnellement durant l'étape d'amplification des cellules hématopoïétiques multipotentes et/ou l'étape d'amplification des progéniteurs érythrocytaires unipotents.

Selon d'autres modes de réalisation particuliers, les cellules sont mises en contact avec le composé vitisine durant l'étape de différenciation des cellules hématopoïétiques multipotentes en progéniteurs érythrocytaires unipotents, et l'étape de différenciation des progéniteurs érythrocytaires unipotents en précurseurs érythrocytaires; et optionnellement durant l'étape d'amplification des cellules hématopoïétiques multipotentes et/ou l'étape d'amplification des progéniteurs érythrocytaires unipotents, et optionnellement durant l'étape de maturation des précurseur érythrocytaires en érythrocytes.

De manière préférée, les cellules sont mises en contact avec le composé vitisine au moins durant l'étape d'amplification des progéniteurs érythrocytaires unipotents et/ou l'étape de différenciation des progéniteurs érythrocytaires unipotents en précurseurs érythrocytaires.

Lorsque les cellules sont mises en contact avec le composé vitisine durant une étape du procédé, le composé vitisine peut être présent dans le milieu de culture durant toute l'étape ou durant une partie de cette étape. De préférence, le composé vitisine est présent durant toute la durée de l'étape. Alternativement, le composé vitisine peut être présent durant au moins 1 jour, de préférence au moins 3, 5, 7, 10 ou 12 jours lors de l'étape.

En particulier, les cellules peuvent être mises en contact avec un composé vitisine durant au moins 1 jour, de préférence durant au moins 3, 5, 7, 10 ou 12 jours, lors de l'amplification et/ou la différenciation des cellules hématopoïétiques multipotentes, et/ou durant au moins 1 jour, de préférence durant au

moins 3, 5, 7, 10 ou 12 jours, lors de l'amplification et/ou la différenciation des progéniteurs érythrocytaires unipotents.

De préférence, les cellules sont mises en contact avec un composé vitisine durant au moins 1 jour, de préférence durant au moins 3, 5, 7, 10 ou 12 jours, lors de l'amplification des cellules hématopoïétiques multipotentes, durant au moins 1 jour, de préférence durant au moins 3, 5, 7, 10 ou 12 jours, lors de la différenciation des cellules hématopoïétiques multipotentes, durant au moins 1 jour, de préférence durant au moins 3, 5, 7, 10 ou 12 jours, lors de l'amplification des progéniteurs érythrocytaires unipotents et durant au moins 1 jour, de préférence durant au moins 3, 5, 7, 10 ou 12 jours, lors de la différenciation des progéniteurs érythrocytaires unipotents.

En particulier, les cellules peuvent être mises en contact avec un composé vitisine entre 2 et 15 jours, en particulier entre 3 et 12 jours, particulièrement entre 3 et 10 jours.

Selon des modes de réalisation particuliers, les procédés selon l'invention peuvent comprendre

- l'amplification des cellules hématopoïétiques multipotentes dans un milieu de culture adapté à l'amplification des cellules hématopoïétiques multipotentes, de préférence un milieu IMDM supplémenté en G-SCF, SCF, FLT3-L et TPO, et comprenant en outre un composé vitisine, de préférence de la vitisine B, typiquement durant une période 3 à 15 jours, de préférence de 5 à 8 jours ;

et

- l'induction de la différenciation des cellules hématopoïétiques multipotentes en progéniteurs érythrocytaires dans un milieu de culture adapté à la différenciation des cellules hématopoïétiques multipotentes, de préférence un milieu IMDM supplémenté en l'IL3, IL6, SCF, albumine sérique en particulier bovine, insuline, transferrine et optionnellement EPO et comprenant en outre un composé vitisine, de préférence de la vitisine B, typiquement durant une période de 3 à 10 jours, de préférence de 3 à 6 jours.

Selon des modes de réalisation particuliers, les procédés selon l'invention peuvent comprendre

- l'amplification des progéniteurs érythrocytaires dans un milieu de culture adapté à l'amplification des progéniteurs érythrocytaires, de préférence un milieu IMDM ou Stem Span SFEM II supplémenté en G-SCF, SCF, FLT3-L et TPO, et comprenant en outre un composé vitisine, de préférence de la vitisine B, typiquement durant une période de 3 à 15 jours, de préférence de 4 à 12 jours; et

- l'induction de la différenciation des progéniteurs érythrocytaires en précurseurs érythrocytaires dans un milieu de culture adapté à la différenciation des progéniteurs érythrocytaires, de préférence un milieu IMDM ou Stem Span SFEM II supplémenté en IL3, SCF, hydrocortisone et optionnellement de EPO, et comprenant en outre un composé vitisine, de préférence de la vitisine B, typiquement durant une période de 3 à 10 jours, de préférence de 3 à 6 jours.

Selon des modes de réalisation particuliers, les procédés selon l'invention peuvent comprendre l'induction de la maturation des précurseurs érythrocytaires en érythrocytes dans un milieu de culture adapté à la maturation des précurseurs érythrocytaires, de préférence un milieu IMDM ou Stem Span SFEM II supplémenté EPO, de préférence comprenant 2 ou 3 UI/ml d'EPO, et comprenant en outre un composé vitisine, de préférence de la vitisine B, typiquement durant une période de 5 à 15 jours, de préférence de 8 à 12 jours. De préférence, ce milieu de maturation ne comprend pas de cytokines.

Selon des modes de réalisation, les cellules hématopoïétiques sont cultivées dans un milieu de culture adapté aux exigences nutritionnelles des cellules hématopoïétiques pendant moins de 50 jours, moins de 45 jours, moins de 40 jours, moins de 35 jours ou moins de 30 jours. En particulier, les cellules hématopoïétiques sont cultivées dans un milieu de culture adapté aux exigences nutritionnelles des cellules hématopoïétiques entre 3 et 35 jours, entre 7 et 35 jours, entre 15 et 35 jours, entre 25 et 35 jours, entre 28 et 35 jours, entre 7 et 28 jours, entre 15 et 28 jours, entre 20 et 28 jours de manière préférée pendant environ 28 ou 35 jours.

Dans un mode de réalisation particulier, lorsque le procédé comprend la production d'érythrocytes à partir de progéniteurs unipotents, les cellules hématopoïétiques sont cultivées dans un milieu de culture adapté aux exigences nutritionnelles des cellules hématopoïétiques pendant 25 à 30 jours, en particulier environ 28 jours.

Dans un mode de réalisation particulier, lorsque le procédé comprend la production d'érythrocytes à partir de cellules hématopoïétiques multipotentes, en particulier à partir de CSH, les cellules hématopoïétiques sont cultivées dans un milieu de culture adapté aux exigences nutritionnelles des cellules hématopoïétiques pendant 30 à 40 jours, en particulier environ 35 jours.

Dans les procédés selon l'invention, les étapes de culture cellulaire, à savoir les étapes d'amplification, de différenciation et/ou de maturation, sont réalisées de préférence à une température adaptée à la multiplication et/ou la différenciation des cellules hématopoïétiques. De préférence, la température est d'environ 37°C.

La teneur en CO2 et/ou O2 est de préférence contrôlée durant les étapes de culture cellulaire. De préférence, le taux de CO2 est compris entre 2% et 10%, entre 3% et 7% ou entre 4% et 6%, et est préférentiellement d'environ 5%. Le taux d'O2 est de préférence compris entre 1% et 30%, entre 5% et 25%, entre 10% et 25% ou entre 15% et 25%, et est préférentiellement d'environ 20%.

De manière tout particulièrement préférée, les cellules sont cultivées à environ 37°C, avec un taux de CO2 de 5% et/ou avec un taux d'O2 de 20%.

De préférence, les cellules hématopoïétiques d'intérêt dans la présente invention sont mises en culture à une concentration comprise entre 200 et 10 000 cellules/ml, de préférence entre 500 et 2000 cellules/ml, et de manière encore préférée à environ 1000 cellules/ml.

De préférence, durant les étapes de culture, les cellules hématopoïétiques sont mises en contact avec des cellules mésenchymateuses (CSM) ou des cellules stromales. Le terme "cellules stromales", « CSM » ou « cellules mésenchymateuses » désigne les cellules non hématopoïétiques de la moelle osseuse, telles que des cellules endothéliales, des cellules vasculaires non striées (cellules fibrotiques), des adipocytes et des macrophages. Les cellules souches mésenchymateuses sont présentes dans divers tissus de l'organisme adulte, principalement dans la moelle osseuse mais aussi dans le tissu adipeux. Elles peuvent se différencier en de nombreux types cellulaires dont les ostéoblastes, les chondrocytes, les myocytes et les adipocytes, et ainsi produire et/ou réparer les tissus osseux et graisseux. Au sein de la niche médullaire, les cellules mésenchymateuses et les cellules hématopoïétiques sont en contact. En particulier, les cellules hématopoïétiques multipotentes et les progéniteurs hématopoïétiques sont notamment régulés de façon extrinsèque au sein des niches hématopoïétiques médullaires et cette régulation fait intervenir, des contacts intercellulaires et des facteurs diffusibles. Les cellules souches mésenchymateuses sécrètent des facteurs de croissance contrôlant la prolifération et la différenciation de ces cellules hématopoïétiques.

Les cellules stromales ou mésenchymateuses sont de préférence cultivées dans des conditions de culture appropriées de sorte qu'elles adhèrent ou non à une surface de substrat.

Les cellules hématopoïétiques peuvent être cultivées en coculture avec des cellules mésenchymateuses (CSM) formant un tapis cellulaire à confluence. L'homme du métier peut utiliser toute technique connue pour obtenir un tapis cellulaire à confluence de CSM.

Selon certains modes de réalisation particuliers, dans les procédés selon l'invention, l'étape de différenciation des cellules hématopoïétiques multipotentes en progéniteurs érythrocytaires unipotents, et/ou l'étape de différenciation des progéniteurs érythrocytaires unipotents en précurseurs érythrocytaires et/ou l'étape de maturation des précurseurs érythrocytaires, sont réalisées en coculture avec des cellules CSM. De préférence, les étapes de différenciation des cellules hématopoïétiques multipotentes en progéniteurs érythrocytaires unipotents et de différenciation des progéniteurs érythrocytaires unipotents en précurseurs érythrocytaires, et optionnellement l'étape de maturation des précurseurs érythrocytaires, sont réalisées en coculture avec des cellules CSM.

Lors que les procédés selon l'invention comprennent une étape de co-culture avec des CSM, le milieu de culture peut comprendre en outre du sérum de veau fœtale (SVF), en particulier à une concentration comprise entre environ 1% et environ 10%, de préférence à une concentration comprise entre environ 1% et environ 5%.

Les procédés selon l'invention peuvent comprendre en outre une ou plusieurs étapes supplémentaires.

Les procédés selon l'invention peuvent notamment comprendre en outre une étape de prélèvement de sang chez un individu, de préférence de sang de cordon ombilical, de sang placentaire et/ou de sang périphérique.

Les procédés selon l'invention peuvent également comprendre une ou plusieurs étapes de tri cellulaire, en particulier une étape de sélection des cellules basée sur l'expression de marqueurs tels que CD34, CD36, CD123, CD235a, CD117, CD71 et/ou GPA ou l'une quelconque de leur combinaison. Cette étape préliminaire peut notamment être réalisée par une technique immunomagnétique utilisant des anticorps dirigés contre différents marqueurs phénotypiques des cellules d'intérêt, en particulier tels que décrits à la section « Erythropoïèse et cellules hématopoïétique ».

Les procédés de production d'érythrocytes selon l'invention peuvent comprendre en outre une étape d'élimination des cellules nucléées. Cette étape permet notamment d'obtenir une population homogène comprenant uniquement des érythrocytes matures.

Les procédés de production selon l'invention peuvent en outre comprendre une étape de récupération des cellules obtenues. Cette étape peut se faire par toute technique connue de l'homme du métier, notamment par filtration, centrifugation et élimination du milieu de culture.

Les procédés de production selon l'invention peuvent également comprendre en outre une étape de lavage des cellules obtenues/récupérées. Cette étape peut se faire par toute technique connue de l'homme du métier, notamment par une succession d'étapes de filtration, centrifugation et re-suspension.

Les procédés de production selon l'invention peuvent également comprendre une étape de stockage des cellules obtenues/récupérées. Cette étape peut se faire par toute technique connue de l'homme du métier, notamment par congélation. En particulier, les cellules récupérées peuvent être mélangées avec une solution volume à volume de sérum de veau fœtal (SVF) décomplémenté et de cryoprotecteur avant mise au congélateur.

Dans les procédés selon l'invention, le composé vitisine, de préférence la vitisine-B, peut être additionné à l'un quelconque des milieux de culture adaptés aux étapes d'amplification, de différenciation et/ou de maturation.

En particulier, le composé vitisine, de préférence la vitisine B, peut être présent dans le milieu à une concentration comprise entre environ 0,5 µM et environ 1 mM, environ 0,5 µM et environ 500 µM, environ 0,5 µM et environ 200 µM, environ 0,5 µM et environ 100 µM, entre environ 0,5 µM et environ 50 µM, entre environ 0,5 µM et environ 40 µM, entre environ 0,5 µM et environ 30 µM, entre environ 0,5 µM et environ 20 µM, entre environ 0,5 µM et environ 15 µM ou entre environ 0,5 µM et environ 10 µM,

environ 5 µM et environ 1 mM, environ 5 µM et environ 500 µM, environ 5 µM et environ 200 µM, environ 5 µM et environ 100 µM, entre environ 5 µM et environ 75 µM, entre environ 5 µM et environ 50 µM, entre environ 5 µM et environ 40 µM, entre environ 5 µM et environ 30 µM, entre environ 5 µM et environ 20 µM, entre environ 5 µM et environ 15 µM ou entre environ 5 µM et environ 10 µM, de préférence entre environ 10 µM et environ 1 mM, environ 10 µM et environ 500 µM, environ 10 µM et environ 200 µM, environ 10 µM et environ 100 µM, 10 µM et environ 75 µM, entre environ 10 µM et environ 50 µM, entre environ 10 µM et environ 40 µM, entre environ 10 µM et environ 30 µM, entre environ 10 µM et environ 20 µM, de manière préférée à une concentration d'environ 10 µM. De préférence, le composé vitisine est utilisé à une concentration comprise entre 1 µM et 500 µM, préférentiellement entre 5 µM et 100 µM. En particulier, la vitisine-B peut être utilisée à une concentration d'environ 0,5, 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 80, 90, 95 ou 100 µM.

Milieu de culture

La présente invention concerne également un milieu de culture cellulaire comprenant un composé vitisine, en particulier un milieu de culture cellulaire adapté aux exigences nutritionnelles des cellules hématopoïétiques, en particulier des cellules hématopoïétiques multipotentes, pluripotentes ou unipotentes, de préférence sélectionnées dans le groupe constitué des cellules CSH, MPP, CMP, MEP, des progéniteurs érythrocytaires unipotents, des précurseurs érythrocytaires, et des combinaisons de ceux-ci, et comprenant un composé vitisine. En particulier, le milieu de culture cellulaire selon l'invention peut être un milieu adapté au maintien, à l'amplification, à la différenciation et/ou à la maturation des cellules hématopoïétiques, de préférence des cellules sélectionnées dans le groupe constitué des cellules CSH, MPP, CMP, MEP, des progéniteurs érythrocytaires unipotents, des précurseurs érythrocytaires, et des combinaisons de ceux-ci. Ce milieu peut notamment être utilisé dans les différentes étapes des procédés selon l'invention.

Le milieu de culture selon l'invention peut être tout milieu de base connu par l'homme du métier pour être adapté aux exigences nutritionnelles des cellules hématopoïétiques, en particulier des cellules hématopoïétiques multipotentes, des progéniteurs unipotents et/ou précurseurs érythrocytaires, auquel un composé vitisine est ajouté. De nombreux milieux de culture adaptés aux exigences nutritionnelles des cellules hématopoïétiques sont connus de l'homme du métier et disponibles dans le commerce, tels que le milieu de Dulbecco modifié selon Iscove (milieu IMDM), le milieu Stem Span SFEM II (Stemcell technologies) ou encore le milieu « StemMACS HSC Expansion Media XF, Human » (Miltenyi Biotec).

Le milieu de culture cellulaire est de préférence choisi parmi un milieu de Dulbecco modifié selon Iscove (milieu IMDM) et un milieu Stem Span SFEM II (Stemcell technologies). De manière préférée, le milieu de culture est un milieu de culture Dulbecco modifié selon Iscove (IMDM_PAN BIOTECH). Le milieu

de culture IMDM est notamment obtenu à partir du milieu de culture de Eagle Modifié selon Dulbecco (DMEM) enrichi en sélénite de sodium mais aussi en vitamines et acides aminés. La composition des milieux IMDM et Stem Span SFEM II sont bien connues dans la littérature. Le milieu IMDM comprend notamment des acides aminés, des vitamines, des sels, du D-glucose, de l'HEPES et du pyruvate de sodium.

Le milieu de culture selon l'invention peut être liquide, semi-solide ou solide. L'homme du métier sait comment solidifier un milieu de culture, notamment par ajout d'agar.

Le milieu de culture selon l'invention peut comprendre un ou plusieurs acides aminés, antibiotiques, vitamines, sels, minéraux ou lipides. Le milieu de culture selon l'invention peut comprendre en outre d'autres composés favorables à l'amplification et/ou la différenciation des cellules hématopoïétiques, notamment des facteurs de croissance ou de survie, par exemple tels que décrits dans la demande WO2010096746. En particulier, le milieu de culture cellulaire peut être complémentée avec de l'érythropoïétine (EPO), du Stem Cell Factor (SCF), de l'Hydrocortisone (HC), des facteurs de croissance, de l'interleukine 3 (IL3), de l'interleukine 6 (IL6), de l'interleukine 11 (IL11), de la transferrine, de l'héparine, de l'insuline, de la thrombopoïétine, du ligand de la tyrosine kinase 3 de type FMS (Flt3-L) du Facteur de stimulation des colonies de granulocytes (G-CSF), de la L-glutamine, de l'inositol, un antibiotique tel que pénicilline et/ou streptomycine, de l'acide folique, du mono-thioglycérol, du nitrate de fer, du sulfate de fer, du Complément en BIT 9500 (Stem Cell Technologies), du sérum d'albumine, du sérum et/ou du plasma, ou l'une quelconque de leur combinaison. Les concentrations de ces différents composés sont aisément déterminées par l'homme du métier sur la base des recommandations des fournisseurs ou des connaissances générales du domaine. L'homme du métier sait ajuster la présence de tels composés adaptés à la culture des cellules hématopoïétiques.

Le milieu de culture selon l'invention peut optionnellement comprendre un antibiotique, par exemple de la pénicilline et/ou de la streptomycine, à une concentration comprise entre environ 0,1 % et environ 10 %, de préférence entre environ 0,5 % et environ 5 %, de manière encore préférée à une concentration d'environ 1%.

Les composés du milieu de culture selon l'invention sont de préférence des composés humains obtenus par des techniques recombinantes ou de purification.

De préférence, le milieu de culture selon l'invention comprend notamment de :

- IL-3, de préférence IL-3 humaine, à une concentration comprise entre environ 1 ng/mL et environ 20 ng/mL, de préférence entre environ 5 ng/mL et environ 15 ng/mL, de manière encore préférée à une concentration d'environ 5 ou 10 ng/mL ; et/ou

- IL-6, de préférence IL-6 humaine, à une concentration comprise entre environ 1 ng/mL et environ 20 ng/mL, de préférence entre environ 5 ng/mL et environ 15 ng/mL, de manière encore préférée à une concentration d'environ 10 ng/mL ; et/ou
- SCF à une concentration comprise entre environ 1 ng/mL et environ 500 ng/mL, de préférence environ 10 ng/mL et environ 200 ng/mL, préférentiellement entre environ 50 ng/mL et environ 150 ng/mL, de manière préférée entre environ 50 ng/mL et environ 100 ng/mL, de manière toute préférée environ 100 ng/ml ; et/ou
- EPO, de préférence humaine, à une concentration comprise entre environ 0,5 IU/mL et environ 10 IU/mL, de préférence entre environ 1 IU/mL et environ 5 IU/mL, de manière encore préférée à une concentration d'environ 2 ou 3 IU/mL ; et/ou
- FLT3-L à une concentration comprise entre environ 1 ng/mL et environ 500 ng/mL, de préférence environ 10 ng/mL et environ 200 ng/mL, préférentiellement entre environ 50 ng/mL et environ 150 ng/mL, préférentiellement une concentration de 100 ng/ML ; et/ou
- TPO à une concentration comprise entre environ 0,1 ng/mL et environ 200 ng/mL, de préférence environ 1 ng/mL et environ 100 ng/mL, préférentiellement entre environ 10 ng/mL et environ 50 ng/mL, préférentiellement une concentration de 20 ng/ML ; et/ou
- G-CSF à une concentration comprise entre environ 0,1 ng/mL et environ 200 ng/mL, de préférence environ 1 ng/mL et environ 100 ng/mL, préférentiellement entre environ 5 ng/mL et environ 25 ng/mL, préférentiellement une concentration de 10 ng/ML, et/ou
- transferrine, de préférence transferrine humaine, à une concentration comprise entre environ 50 µg/mL et environ 400 µg/mL, de préférence entre environ 50 µg/mL et environ 200 µg/mL, de manière préférée entre 100 µg/mL et 150 µg/mL, de manière encore préférée à une concentration d'environ 120 µg/mL ; et/ou
- insuline, de préférence insuline humaine, à une concentration comprise entre environ 1 µg/mL et environ 50 µg/mL, de préférence entre environ 5 µg/mL et environ 20 µg/mL, de manière encore préférée à une concentration d'environ 10 µg/mL ; et/ou
- héparine, de préférence héparine humaine, à une concentration comprise entre environ 0,5 U/mL et environ 10 U/mL, de préférence entre environ 1 U/mL et environ 5 U/mL, de manière encore préférée à une concentration d'environ 3 U/mL ; et/ou
- L-glutamine à une concentration comprise entre environ 0,1 mM et environ 50 mM, de préférence entre environ 1 mM et environ 15 mM, de manière préférée entre environ 1 mM et environ 5 mM, de manière toute préférée d'environ 4 mM ; et/ou
- Inositol à une concentration comprise entre environ 10 µg/mL et environ 200 µg/mL, de préférence entre environ 20 µg/mL et environ 100 µg/mL, de manière préférée entre 20

µg/mL et 60 µg/mL, de manière encore préférée à une concentration d'environ 40 µg/mL ; et/ou

- Acide folique à une concentration comprise entre environ 0,1 µg/mL et environ 100 µg/mL, de préférence entre environ 1 µg/mL et environ 100 µg/mL, de manière préférée entre 5 µg/mL et 20 µg/mL, de manière encore préférée à une concentration d'environ 10 µg/mL ; et/ou
- Mono-thioglycérol à une concentration comprise entre environ 10^{-5} M et environ 10^{-3} M, de préférence entre environ $0{,}1.10^{-4}$ M et environ 10.10^{-4} M, de manière préférée entre 10^{-4} M et environ 5.10^{-4} M, de manière encore préférée à une concentration d'environ $1{,}6.10^{-4}$ M ; et/ou
- Hydrocortisone (HC) à une comprise entre environ 10^{-7} M et environ 10^{-8} M, de préférence à une concentration d'environ 10^{-6} M ; et/ou
- Sérum de veau fœtal à une concentration comprise entre environ 1 % et environ 10 %, de préférence entre environ 3 % et environ 7 %, de manière encore préférée à une concentration d'environ 5%, ; et/ou
- Nitrate de fer à une concentration comprise entre environ 1 ng/mL et environ 200 ng/mL, de préférence entre environ 10 ng/mL et environ 150 ng/mL, préférentiellement entre environ 50 ng/mL et environ 150 ng/mL, de manière encore préférée à une concentration d'environ 90 ng/mL ;
- Sulfate de fer à une concentration comprise entre environ 100 ng/mL et environ 1500 ng/mL, de préférence entre environ 500 ng/mL et environ 1500 ng/mL, préférentiellement entre environ 800 ng/mL et environ 1000 ng/mL, de manière encore préférée à une concentration d'environ 900 ng/mL ;
- Sérum d'albumine humaine ou bovine à une concentration comprise entre environ 1 mg/mL et environ 50 mg/mL, de préférence entre environ 5 mg/mL et environ 20 mg/mL, de manière encore préférée à une concentration d'environ 10 mg/mL ;
- Albumine à une concentration comprise entre environ 1 % et environ 10 %, de préférence entre environ 3 % et environ 7 %, de manière encore préférée à une concentration d'environ 4%, et/ou
- Complément en BIT 9500 (Stem Cell Technologies) à une concentration comprise entre environ 1 % et environ 30 %, de préférence entre environ 10 % et environ 20 %, de manière encore préférée à une concentration d'environ 15% ; et/ou ;

- du sérum, plasma ou pool de sérum, de préférence humains, à une concentration comprise entre environ 1 % et environ 10 %, de préférence entre environ 3 % et environ 7 %, de manière encore préféré à une concentration d'environ 5%, et/ou un lysat plaquettaire, de préférence d'origine humaine, à une concentration comprise entre environ 0,05% et environ 0,5 %, de préférence entre environ 0,1 % et environ 0,5 %, de manière encore préféré à une concentration d'environ 0,3 % ;

ou l'une quelconque de leur combinaison.

Selon certains modes de réalisation, le milieu de culture selon l'invention est un milieu de culture comprenant :

- L-glutamine à une concentration comprise entre environ 0,1 mM et environ 50 mM, de préférence entre environ 1 mM et environ 15 mM, de manière préférée entre environ 1 mM et environ 5 mM, de manière toute préférée d'environ 4 mM ; et/ou
- Inositol à une concentration comprise entre environ 10 µg/mL et environ 200 µg/mL, de préférence entre environ 20 µg/mL et environ 100 µg/mL, de manière préférée entre 20 µg/mL et 60 µg/mL, de manière encore préférée à une concentration d'environ 40 µg/mL ; et/ou
- Acide folique à une concentration comprise entre environ 0,1 µg/mL et environ 100 µg/mL, de préférence entre environ 1 µg/mL et environ 100 µg/mL, de manière préférée entre 5 µg/mL et 20 µg/mL, de manière encore préférée à une concentration d'environ 10 µg/mL ; et/ou
- Mono-thioglycérol à une concentration comprise entre environ 10^{-5} M et environ 10^{-3} M, de préférence entre environ $0{,}1.10^{-4}$ M et environ 10.10^{-4} M, de manière préférée entre 10^{-4} M et environ 5.10^{-4} M, de manière encore préférée à une concentration d'environ $1{,}6.10^{-4}$ M ; et/ou
- transferrine, de préférence transferrine humaine, à une concentration comprise entre environ 50 µg/mL et environ 400 µg/mL, de préférence entre environ 50 µg/mL et environ 200 µg/mL, de manière préférée entre 100 µg/mL et 150 µg/mL, de manière encore préférée à une concentration d'environ 120 µg/mL ; et/ou
- insuline, de préférence insuline humaine, à une concentration comprise entre environ 1 µg/mL et environ 50 µg/mL, de préférence entre environ 5 µg/mL et environ 20 µg/mL, de manière encore préférée à une concentration d'environ 10 µg/mL ; et/ou
- Nitrate de fer à une concentration comprise entre environ 1 ng/mL et environ 200 ng/mL, de préférence entre environ 10 ng/mL et environ 150 ng/mL, préférentiellement entre environ

50 ng/mL et environ 150 ng/mL, de manière encore préférée à une concentration d'environ 90 ng/mL ;

- Sulfate de fer à une concentration comprise entre environ 100 ng/mL et environ 1500 ng/mL, de préférence entre environ 500 ng/mL et environ 1500 ng/mL, préférentiellement entre environ 800 ng/mL et environ 1000 ng/mL, de manière encore préférée à une concentration d'environ 900 ng/mL ;
- Sérum d'albumine humaine à une concentration comprise entre environ 1 mg/mL et environ 50 mg/mL, de préférence entre environ 5 mg/mL et environ 20 mg/mL, de manière encore préférée à une concentration d'environ 10 mg/mL ; et/ou
- IL-3, de préférence IL-3 humaine, à une concentration comprise entre environ 1 ng/mL et environ 20 ng/mL, de préférence entre environ 5 ng/mL et environ 15 ng/mL, de manière encore préférée à une concentration d'environ 5 ng/mL ; et/ou
- SCF à une concentration comprise entre environ 1 ng/mL et environ 500 ng/mL, de préférence environ 10 ng/mL et environ 200 ng/mL, préférentiellement entre environ 50 ng/mL et environ 150 ng/mL, de manière préférée entre environ 50 ng/mL et environ 100 ng/mL, de manière toute préférée environ 100 ng/ml ; et/ou
- EPO, de préférence humaine, à une concentration comprise entre environ 0,5 IU/mL et environ 10 IU/mL, de préférence entre environ 1 IU/mL et environ 5 IU/mL, de manière encore préférée à une concentration d'environ 3 IU/mL ; et/ou
- Hydrocortisone (HC) à une comprise entre environ 10^{-7} M et environ 10^{-8} M, de préférence à une concentration d'environ 10^{-6} M.

Selon certains modes de réalisation, le milieu de culture est un milieu d'amplification, notamment adapté à l'amplification des cellules hématopoïétiques multipotentes ou des progéniteurs érythrocytaire unipotents, par exemple un milieu IMDM ou Stem Span II, comprenant en outre :

- G-CSF à une concentration comprise entre environ 0,1 ng/mL et environ 200 ng/mL, de préférence environ 1 ng/mL et environ 100 ng/mL, préférentiellement entre environ 5 ng/mL et environ 25 ng/mL, préférentiellement une concentration de 10 ng/ML, et
- SCF à une concentration comprise entre environ 1 ng/mL et environ 500 ng/mL, de préférence environ 10 ng/mL et environ 200 ng/mL, préférentiellement entre environ 50 ng/mL et environ 150 ng/mL, préférentiellement une concentration de 100 ng/ML, et
- FLT3-L à une concentration comprise entre environ 1 ng/mL et environ 500 ng/mL, de préférence environ 10 ng/mL et environ 200 ng/mL, préférentiellement entre environ 50 ng/mL et environ 150 ng/mL, préférentiellement une concentration de 100 ng/mL, et

- TPO à une concentration comprise entre environ 0,1 ng/mL et environ 200 ng/mL, de préférence environ 1 ng/mL et environ 100 ng/mL, préférentiellement entre environ 10 ng/mL et environ 50 ng/mL, préférentiellement une concentration de 20 ng/ML.

Selon certains modes de réalisation, le milieu de culture est un milieu d'amplification, notamment adapté à l'amplification des précurseurs érythrocytaire, par exemple un milieu IMDM ou Stem Span II, comprenant en outre :

- SCF en particulier à une concentration comprise entre environ 1 ng/mL et environ 500 ng/mL, de préférence environ 10 ng/mL et environ 200 ng/mL, préférentiellement entre environ 50 ng/mL et environ 150 ng/mL, de manière préférée entre environ 50 ng/mL et environ 100 ng/mL, de manière toute préférée environ 100 ng/ml ;
- Hydrocortisone (HC) en particulier à une concentration comprise entre environ 10^{-7} M et environ 10^{-8} M, de préférence à une concentration d'environ 10^{-6} M et/ou optionnellement,
- transferrine (BIT), de préférence transferrine humaine, à une concentration comprise entre environ 50 µg/mL et environ 400 µg/mL, de préférence entre environ 50 µg/mL et environ 200 µg/mL, de manière préférée entre 100 µg/mL et 150 µg/mL, de manière encore préférée à une concentration d'environ 120 µg/mL ;
- EPO, de préférence humaine, à une concentration comprise entre environ 0,5 IU/mL et environ 10 IU/mL, de préférence entre environ 1 IU/mL et environ 5 IU/mL, de manière encore préférée à une concentration d'environ 2 IU/mL, et/ou
- du sérum, plasma ou pool de sérum, de préférence humains, à une concentration comprise entre environ 1 % et environ 10 %, de préférence entre environ 3 % et environ 7 %, de manière encore préféré à une concentration d'environ 5%, et/ou un lysat plaquettaire, de préférence d'origine humaine, à une concentration comprise entre environ 0,05% et environ 0,5 %, de préférence entre environ 0,1 % et environ 0,5 %, de manière encore préféré à une concentration d'environ 0,3 %.

Selon certains autres modes de réalisation, le milieu de culture est un milieu de différenciation, permettant notamment la différenciation des cellules hématopoïétiques multipotentes en progéniteurs érythrocytaires unipotents, par exemple un milieu IMDM ou Stem Span II, comprenant en outre :

- IL-3, de préférence IL-3 humaine, à une concentration comprise entre environ 1 ng/mL et environ 20 ng/mL, de préférence entre environ 5 ng/mL et environ 15 ng/mL, de manière encore préférée à une concentration d'environ 10 ng/mL ;

- IL-6, de préférence IL-6 humaine, à une concentration comprise entre environ 1 ng/mL et environ 20 ng/mL, de préférence entre environ 5 ng/mL et environ 15 ng/mL, de manière encore préférée à une concentration d'environ 10 ng/mL ;
- SCF à une concentration comprise entre environ 1 ng/mL et environ 500 ng/mL, de préférence environ 10 ng/mL et environ 200 ng/mL, préférentiellement entre environ 25 ng/mL et environ 100 ng/mL, préférentiellement une concentration d'environ 50 ng/ML,
- Sérum d'albumine bovine (BSA) à une concentration comprise entre environ 1 mg/mL et environ 50 mg/mL, de préférence entre environ 5 mg/mL et environ 20 mg/mL, de manière encore préférée à une concentration d'environ 10 mg/mL ;
- transferrine (BIT), de préférence transferrine humaine, à une concentration comprise entre environ 50 µg/mL et environ 400 µg/mL, de préférence entre environ 50 µg/mL et environ 200 µg/mL, de manière préférée entre 100 µg/mL et 150 µg/mL, de manière encore préférée à une concentration d'environ 120 µg/mL ;
- insuline, de préférence insuline humaine, à une concentration comprise entre environ 1 µg/mL et environ 50 µg/mL, de préférence entre environ 5 µg/mL et environ 20 µg/mL, de manière encore préférée à une concentration d'environ 10 µg/mL ;
- Optionnellement EPO, de préférence humaine, à une concentration comprise entre environ 0,5 IU/mL et environ 10 IU/mL, de préférence entre environ 1 IU/mL et environ 5 IU/mL, de manière encore préférée à une concentration d'environ 2 IU/mL, et
- Optionnellement, du sérum de veau fœtale (SVF), en particulier à une concentration comprise entre environ 1% et environ 10%, de préférence à une concentration comprise entre environ 1% et environ 5%.

La BSA, l'insuline et la transferrine peuvent notamment être apportée par l'utilisation de BIT 9500 (Stem Cell Technologies) à une concentration comprise entre environ 1 % et environ 30 %, de préférence entre environ 10 % et environ 20 %, de manière encore préférée à une concentration d'environ 15%, et

Selon certains modes de réalisation, le milieu de culture est un milieu de différenciation, notamment adapté à la différenciation des progéniteurs unipotents en précurseurs érythrocytaires, par exemple un milieu IMDM ou Stem Span II, comprenant en outre :

- IL-3, de préférence IL-3 humaine, en particulier à une concentration comprise entre environ 1 ng/mL et environ 20 ng/mL, de préférence entre environ 5 ng/mL et environ 15 ng/mL, de manière encore préférée à une concentration d'environ 5 ng/mL ; et
- SCF en particulier à une concentration comprise entre environ 1 ng/mL et environ 500 ng/mL, de préférence environ 10 ng/mL et environ 200 ng/mL, préférentiellement entre environ 50

ng/mL et environ 150 ng/mL, de manière préférée entre environ 50 ng/mL et environ 100 ng/mL, de manière toute préférée environ 100 ng/ml ; et

- Hydrocortisone (HC) en particulier à une concentration comprise entre environ 10^{-7} M et environ 10^{-8} M, de préférence à une concentration d'environ 10^{-6} M et/ou optionnellement, et
- Optionnellement, de l'EPO, de préférence humaine, en particulier à une concentration comprise entre environ 0,5 IU/mL et environ 10 IU/mL, de préférence entre environ 1 IU/mL et environ 5 IU/mL, de manière encore préférée à une concentration d'environ 3 IU/mL ; et
- Optionnellement, du sérum de veau fœtale (SVF), en particulier à une concentration comprise entre environ 1% et environ 10%, de préférence à une concentration comprise entre environ 1% et environ 5%.

Selon certains autres modes de réalisation, le milieu de culture est un milieu de maturation ; par exemple un milieu IMDM ou Stem Span II ne comprenant pas de cytokines. De préférence, le milieu de maturation ne comprenant pas de cytokines, mais est supplémenté en érythropoïétine (environ 2 ou 3 UI/mL).

Selon un mode de réalisation très particulier, le milieu de culture selon l'invention comprend un composé vitisine et les composés du Tableau 1, de préférence en concentrations mentionnées dans le tableau 1.

Composés	Concentration (mM)	Composés	Concentration (mM)
Glycine	0.4	Chlorure de choline	0.03
L-Alanine	0.28	Pantothénate de D-Calcium	0.008
L-Alanyl-L-Glutamine	4.0	Acide Folique	0.009
L-Arginine hydrochloride	0.4	Niacinamide	0.033
L-Asparagine	0.19	Chlorhydrate de pyridoxal	0.02
Acide L-Aspartique	0.23	Riboflavine	0.001
L-Cystine	0.22	Thiamine hydrochloride	0.012
Acide L-Glutamique	0.51	Vitamine B12	9.59E-6
L-Histidine hydrochloride-H2O	0.2	i-Inositol	0.04
L-Isoleucine	0.80	CaCl2-2H2O	1.97
L-Leucine	0.80	MgSO4-7H2O	1.67
L-Lysine hydrochloride	0.80	KCl	4.4
L-Methionine	0.20	KNO3	7.52E-4
L-Phenylalanine	0.4	NaHCO3	36.0
L-Proline	0.35	NaCl	77.59
L-Serine	0.4	NaH2PO4-2H2O	1.02
L-Thréonine	0.80	Na2SeO3-5H20	6.46E-5
L-Tryptophane	0.08	Dextrose	25.0
L-Tyrosine disodium	0.46	HEPES	25.03
L-Valine	0.80	Rouge Phénol	0.04
Biotine	5.33E-5	Pyruvate de sodium	1.0

Tableau 1. Exemple de composition de milieu de culture adapté à la culture de cellules hématopoïétiques.

Selon un autre mode de réalisation, le milieu de culture selon l'invention est un milieu de culture comprenant les composés du Tableau 1, de préférence en concentrations mentionnées dans le tableau 1, ainsi que de la BSA, de l'insuline humaine, de la transferrine humaine et optionnellement du 2-Mercaptoethanol, ledit milieu comprenant en outre un composé vitisine.

Le composé vitisine, de préférence la vitisine-B, peut être additionné à l'un quelconque des milieux de culture décrits ci-dessus, tels que des milieux d'amplification, de différenciation et/ou de maturation. En particulier, le composé vitisine, de préférence la vitisine-B, peut être présent dans le milieu selon l'invention à une concentration comprise entre environ 0,5 µM et environ 1 mM, environ 0,5 µM et environ 500 µM, environ 0,5 µM et environ 200 µM, environ 0,5 µM et environ 100 µM, entre environ 0,5 µM et environ 50 µM, entre environ 0,5 µM et environ 40 µM, entre environ 0,5 µM et environ 30 µM, entre environ 0,5 µM et environ 20 µM, entre environ 0,5 µM et environ 15 µM ou entre environ 0,5 µM et environ 10 µM, environ 5 µM et environ 1 mM, environ 5 µM et environ 500 µM, environ 5 µM et environ 200 µM, environ 5 µM et environ 100 µM, entre environ 5 µM et environ 75 µM, entre environ 5 µM et environ 50 µM, entre environ 5 µM et environ 40 µM, entre environ 5 µM et environ 30 µM, entre environ 5 µM et environ 20 µM, entre environ 5 µM et environ 15 µM ou entre environ 5 µM et environ

10 µM, de préférence entre environ 10 µM et environ 1 mM, environ 10 µM et environ 500 µM, environ 10 µM et environ 200 µM, environ 10 µM et environ 100 µM, 10 µM et environ 75 µM, entre environ 10 µM et environ 50 µM, entre environ 10 µM et environ 40 µM, entre environ 10 µM et environ 30 µM, entre environ 10 µM et environ 20 µM, de manière préférée à une concentration d'environ 10 µM. De préférence, le composé vitisine est utilisé à une concentration comprise entre 1 µM et 500 µM, préférentiellement entre 5 µM et 100 µM. En particulier, le composé vitisine, de préférence la vitisine B, est ajouté au milieu de culture à une concentration d'environ 0,5, 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 80, 90, 95 ou 100 µM.

Le milieu de culture selon l'invention comprenant un composé vitisine pourra avantageusement être utilisé dans les procédés de préparation de cellules souches hématopoïétiques (CSH), des progéniteurs multipotents (MPP), des progéniteurs myéloïdes communs (CMP), des progéniteurs mégacaryocytaires-érythrocytaires (MEP), progéniteurs érythrocytaires unipotents, de précurseurs érythrocytaires et de globules rouges. En particulier, le milieu de culture selon l'invention comprenant un composé vitisine peut être utilisé dans l'un quelconque des procédés selon l'invention, en particulier tel que décrit ci-dessus dans la section « Méthode de culture ».

La présente invention concerne ainsi également l'utilisation du milieu de culture cellulaire selon l'invention, en particulier un milieu de culture adapté à l'amplification, la différenciation et/ou la maturation des cellules hématopoïétiques et comprenant un composé vitisine, notamment un milieu tel que décrit dans l'un quelconque des différents modes de réalisation ci-dessus, pour (i) l'amplification et/ou la différenciation de cellules souches hématopoïétiques (CSH), des progéniteurs multipotents (MPP), des progéniteurs myéloïdes communs (CMP), des progéniteurs mégacaryocytaires-érythrocytaires (MEP) ou de progéniteurs érythrocytaires unipotents et/ou (ii) pour la différenciation et/ou la maturation de précurseurs érythrocytaires, et/ou (iii) la production de progéniteurs érythrocytaires unipotents et/ou d'érythrocytes, notamment selon les procédés de l'invention décrits ci-dessous, et plus particulièrement pour stimuler la différenciation des CSH, MPP, CMP et/ou MEP en progéniteurs érythrocytaires unipotents ; la différenciation progéniteurs érythrocytaires unipotents en précurseurs érythrocytaires et/ou pour stimuler la maturation des précurseurs érythrocytaires en érythrocytes.

La présente invention concerne également l'utilisation d'un composé vitisine pour supplémenter un milieu de culture cellulaire, en particulier un milieu de culture cellulaire adapté à l'amplification et/ou la différenciation et/ou la maturation de cellules hématopoïétiques, et plus particulièrement un milieu de culture cellulaire adapté à (i) l'amplification et/ou la différenciation de cellules souches hématopoïétiques (CSH), des progéniteurs multipotents (MPP), des progéniteurs myéloïdes communs (CMP), des progéniteurs mégacaryocytaires-érythrocytaires (MEP) ou de progéniteurs érythrocytaires unipotents

et/ou (ii) la maturation de précurseurs érythrocytaires, et/ou (iii) la production de progéniteurs érythrocytaires unipotents et/ou d'érythrocytes.

La présente invention concerne également l'utilisation d'un composé vitisine pour (i) stimuler l'amplification et/ou la différenciation de cellules souches hématopoïétiques (CSH), des progéniteurs multipotents (MPP), des progéniteurs myéloïdes communs (CMP), des progéniteurs mégacaryocytaires-érythrocytaires (MEP) ou de progéniteurs érythrocytaires unipotents et/ou (ii) stimuler la maturation de précurseurs érythrocytaires, et/ou (iii) stimuler la production de progéniteurs érythrocytaires unipotents et/ou d'érythrocytes.

Le composé vitisine peut être simplement ajouté à un milieu de base, de préférence un milieu de base adapté aux exigences des cellules hématopoïétiques. Le composé vitisine est de préférence ajouté dans un milieu de culture choisi parmi un milieu d'amplification, un milieu de différenciation et un milieu de maturation, notamment tel que défini ci-dessus. Le composé vitisine peut notamment être ajouté pour être présent dans le milieu supplémenté à une concentration telle que définie ci-dessus.

Compositions à base de composé vitisine et leur utilisation

Selon un autre aspect, la présente invention concerne l'utilisation d'un composé vitisine pour favoriser ou stimuler la production de cellules hématopoïétiques, en particulier d'érythrocytes, chez un individu, en particulier un individu souffrant d'une hémopathie.

La présente invention concerne également le composé vitisine en tant que médicament pour le traitement d'une pathologie hématologique. Le terme « médicament », tel qu'utilisé ici, englobe des médicaments à usage humain et animal en médecine humaine et vétérinaire et fait référence à toute substance acceptable sur le plan pharmacologique qui procure un effet thérapeutique et/ou bénéfique.

La présente invention concerne aussi une composition, en particulier une composition pharmaceutique comprenant un composé vitisine pour son utilisation dans le traitement d'une pathologie hématologique ou le traitement de patient ayant subi une perte de sang.

Telle qu'utilisée ici, une « composition pharmaceutique » désigne une préparation d'un agent actif avec d'autres composants chimiques optionnels tels que des supports physiologiquement appropriés et/ou des excipients. La composition pharmaceutique selon l'invention englobe les compositions pharmaceutiques utilisées en médecine humaine et les compositions pharmaceutiques utilisées en médecine animale, c'est à dire les compositions vétérinaires.

Le terme « traitement » se rapporte ici à l'obtention d'un effet pharmacologique et/ou physiologique souhaité. L'effet peut être prophylactique en termes de prévention totale ou partielle d'une maladie ou d'un symptôme et/ou peut être thérapeutique en termes de guérison partielle ou complète

d'une maladie et/ou d'un effet indésirable attribuable à la maladie. Le terme « traitement » tel qu'utilisé ici couvre tout traitement d'une maladie chez un sujet, en particulier chez un humain, pour : réduire l'incidence et/ou le risque de rechute de la maladie pendant une période sans symptômes; soulager ou réduire un symptôme de la maladie; empêcher la maladie de se produire chez un sujet qui peut être prédisposé à la maladie mais qui n'a pas encore été diagnostiqué comme l'ayant; inhiber la maladie, c'est-à-dire stopper son développement (par exemple, réduire le taux de progression); réduire la fréquence des épisodes de la maladie; et soulager la maladie, c'est-à-dire provoquer une régression totale ou partielle de la maladie.

Les termes « maladie du sang », « hémopathie » ou « pathologie hématologique » sont interchangeables et se réfèrent ici à une maladie affectant les composants du sang (cellules sanguines telles qu'érythrocytes, leucocytes et plaquettes) ou d'autres composants (hémoglobine, protéines sanguines) ou qui affectent la production du sang ou ses mécanisme (coagulation, etc.). En particulier, l'hémopathie envisagée par l'invention est une maladie liée à une atteinte des globules rouges ou à une insuffisance de production des cellules hématopoïétiques, de préférence de globules rouges.

La maladie hématologique peut notamment être sélectionnée parmi la drépanocytose, syndromes myéloprolifératifs (leucémies, maladie de Vaquez), l'anémie aplasique ainsi que les anémies d'autres étiologies.

La composition pharmaceutique ou le composé vitisine peut également être utilisé pour le traitement d'une insuffisance de production des cellules hématopoïétiques, de préférence des globules rouges, causée par une autre maladie, par exemple un cancer.

La composition pharmaceutique ou le composé vitisine peut également être utilisé pour le traitement de patients qui ont subi une forte perte de sang, notamment dans le cadre de patient nécessitant une transfusion sanguine. En particulier, la transfusion survient chez des patients pour lesquels l'hémoglobinémie est inférieure à 10. La transfusion sanguine consiste à injecter du sang ou un composant sanguin par voie intraveineuse. La composition pharmaceutique ou le composé vitisine peuvent ainsi être utilisés en complément d'une transfusion sanguine.

La composition pharmaceutique selon l'invention comprend un composé vitisine comme principe actif.

Dans un mode de réalisation, la composition pharmaceutique peut, en outre, contenir au moins un principe actif pharmaceutique supplémentaire. On entend par « principe actif pharmaceutique », tout composé ou substance dont l'administration a un effet thérapeutique ou un effet bénéfique à la santé ou condition générale d'un patient ou d'un sujet auquel il est administré.

La formulation d'une telle composition pharmaceutique peut varier en fonction de la voie d'administration et du dosage pour lesquels la composition est destinée à être utilisée.

La composition selon l'invention peut comprendre en outre un support pharmaceutiquement acceptable Tel qu'utilisé ici, les termes « support pharmaceutiquement acceptable » ou « excipient pharmaceutiquement acceptable » ou « véhicule pharmaceutiquement acceptable » sont interchangeables et comprennent tous composés ou combinaisons de composés qui sont connus de l'homme de l'art comme étant utiles dans la formulation de compositions pharmaceutiques ou vétérinaires. L'homme de l'art sait sélectionner les véhicules et excipients les plus appropriés à la préparation d'un type donné de formulation.

Le composé vitisine ou la composition pharmaceutique peut être utilisé pour être administré à un sujet. Les termes « individu », « hôte », « sujet » et « patient », sont utilisés ici de manière interchangeable, et désignent un animal, de préférence un mammifère, et plus particulièrement un humain. De préférence, le patient traité est un être humain, par exemple un enfant ou un adulte. En particulier, les sujets envisagés par l'invention sont atteints d'une pathologie hématologique ou d'une autre pathologie induisant une insuffisance de production des cellules hématopoïétiques, de préférence des globules rouges, par exemple un cancer.

La présente invention concerne encore une méthode de traitement d'une pathologie hématologique ou d'une autre pathologie induisant une insuffisance de production des cellules hématopoïétiques. Les méthodes de traitement selon l'invention impliquent généralement l'administration à un individu qui en a besoin d'une quantité efficace du composé vitisine ou d'une composition comprenant un composé vitisine. En particulier, le traitement est soit dans un but curatif soit dans un but préventif afin de limiter ou retarder l'apparition d'une pathologie hématologique, d'une autre pathologie induisant une insuffisance de production des cellules hématopoïétiques ou un symptôme associé à la maladie.

La quantité thérapeutiquement efficace ou suffisante d'un composé vitisine ou d'une composition pharmaceutique comprenant ce composé, est une quantité permettant d'obtenir l'effet recherché, à savoir un effet favorisant la production de cellules hématopoïétiques, en particulier de globules rouges, par le patient.

Dans un mode de réalisation particulier, un traitement classique connu par l'homme du métier pour traiter une pathologie hématologique peut être complété par l'administration d'un composé vitisine selon l'invention. Par exemple, l'administration du composé vitisine peut être associé à l'administration d'érythropoïétine ou à une transfusion sanguine. L'administration du composé vitisine peut être réalisée avant, pendant et/ou après le traitement conventionnel envisagé pour la maladie à traiter.

Trousse

Dans un dernier aspect, la présente invention concerne encore une trousse comprenant les composés permettant l'obtention d'un milieu de culture cellulaire selon l'invention, en particulier tel que décrit ci-dessus à la section « Milieu de culture », ledit milieu ne comprenant pas de composé vitisine, ladite trousse comprenant en outre un composé vitisine.

En particulier, la présente invention concerne une trousse comprenant :

- un milieu de culture cellulaire, en particulier un milieu d'amplification, de différenciation et/ou de maturation des cellules hématopoïétiques, de préférence tel que décrit ci-dessus à la section « Milieu de culture », ledit milieu ne comprenant pas de composé vitisine ; et
- un composé vitisine, et
- optionnellement, des cellules hématopoïétiques telles que décrites ci-dessus à la section « Erythropoïèse et cellules hématopoïétiques », en particulier des CSH, MPP, CMP, MEP, progéniteurs érythrocytaires unipotents et/ou précurseurs érythrocytaires ; et
- optionnellement, un guide contenant des instructions pour l'utilisation d'une telle trousse.

De préférence, la trousse comprend :

- un milieu de culture cellulaire, en particulier tel que décrit ci-dessus à la section « Milieu de culture », de préférence un milieu IMDM et/ou un milieu Stem Span II, ledit milieu ne comprenant pas de composé vitisine ;
- un ou plusieurs composés choisis parmi de l'érythropoïétine (EPO), du Stem Cell Factor (SCF), de l'Hydrocortisone (HC), des facteurs de croissance, de l'interleukine 3 (IL3), de l'interleukine 6 (IL6), de l'interleukine 11 (IL11), de la transferrine, de l'héparine, de l'insuline, de la thrombopoïétine, du ligand de la tyrosine kinase 3 de type FMS (Flt3-L) du Facteur de stimulation des colonies de granulocytes (G-CSF), de la L-glutamine, de l'inositol, un antibiotique tel que pénicilline et/ou streptomycine, de l'acide folique, du mono-thioglycérol, du nitrate de fer, du sulfate de fer, du sérum d'albumine humaine, du sérum, ou du plasma, ou l'une quelconque de leur combinaison, de préférence choisi parmi de l'érythropoïétine (EPO), du Stem Cell Factor (SCF), de l'Hydrocortisone (HC), des facteurs de croissance, de l'interleukine 3 (IL3), de l'interleukine 6 (IL6), de l'interleukine 11 (IL11), du BIT9500, du ligand de la tyrosine kinase 3 de type FMS (Flt3-L) du Facteur de stimulation des colonies de granulocytes (G-CSF), de la thrombopoïétine (TPO), un antibiotique tel que pénicilline et/ou streptomycine, ou l'une quelconque de leur combinaison ;
- un composé vitisine,

- optionnellement, des cellules hématopoïétiques telles que décrites ci-dessus à la section « Erythropoïèse et cellules hématopoïétiques », en particulier des CSH, MPP, CMP, MEP, progéniteurs érythrocytaires unipotents et/ou précurseurs érythrocytaires ; et
- optionnellement, un guide contenant des instructions pour l'utilisation d'une telle trousse.

Alternativement, la trousse selon l'invention peut comprendre :

- un milieu de culture cellulaire tel que défini ci-dessus à la section « milieu de culture » et comprenant un composé vitisine ; et

- - optionnellement, des cellules hématopoïétiques telles que décrites ci-dessus à la section « Erythropoïèse et cellules hématopoïétiques » en particulier des CSH, MPP, CMP, MEP, progéniteurs érythrocytaires unipotents et/ou précurseurs érythrocytaires ; et
- optionnellement, un guide contenant des instructions pour l'utilisation d'une telle trousse.

En particulier, la présente trousse peut comprendre les ingrédients nécessaires à l'obtention du milieu de culture sous forme déshydratée, dans un contenant commun ou dans des contenants séparés.

La trousse selon l'invention peut comprendre en outre divers matériaux et réactifs à utiliser conformément à la présente invention dans des contenants et des matériaux d'emballage appropriés, notamment des pipettes, des tubes ou des flacons.

La trousse peut en outre comprendre des moyens permettant le prélèvement d'un échantillon biologique tel que du sang, par exemple une seringue.

La présente invention concerne également l'utilisation d'une trousse selon l'invention pour produire des progéniteurs érythrocytaires, précurseurs érythrocytaires et/ou des érythrocytes, notamment selon les procédés de l'invention décrits ci-dessus.

Tel qu'utilisé ici, le terme « comprenant » ou « comprend » est utilisé en référence à des substances, composés ou procédés qui sont essentiels à l'invention, mais qui sont ouverts à l'inclusion d'éléments non spécifiques, essentiels ou non. L'utilisation de « comprenant » indique l'inclusion plutôt que la limitation.

Le terme « et/ou » tel qu'il est utilisé ici doit être considéré comme une description spécifique de chacune des deux caractéristiques ou composants spécifiés, avec ou sans l'autre. Par exemple, « A et/ou B » doit être considéré comme une divulgation spécifique de chacun des éléments suivants : (i) A, (ii) B et (iii) A et B, comme si chacun d'eux était présenté individuellement.

Le terme « environ » tel qu'utilisé ici en relation avec toutes les valeurs (incluant les extrémités inférieures et supérieures de plages numériques) signifie toute valeur ayant une variation acceptable allant jusqu'à +/- 10% (par exemple, +/- 0,5%, +/- 1%, +/- 1,5%, +/- 2%, +/- 2,5%, +/- 3%, +/- 3,5%, +/- 4%, +/- 4,5%, +/- 5%, +/- 5,5%, +/- 6%, +/- 6,5%, +/- 7%, +/- 7,5%, +/- 8%, +/- 8,5%, + / - 9%, +/- 9,5%). L'utilisation du terme « environ » au début d'une liste de valeurs modifie chacune d'entre elles (c'est-à-dire « environ 1, 2 et 3 » se réfère à environ 1, environ 2 et environ 3). En outre, lorsqu'une liste de valeurs est décrite (par exemple environ 50%, 60%, 70%, 80%, 85% ou 86%), la liste inclut toutes ses valeurs intermédiaires et fractionnaires (par exemple 54% ou 85,4%).

Toutes les références citées dans cette demande, y compris les articles de journaux ou les résumés, les demandes de brevets publiées, les brevets délivrés ou tout autre référence, sont entièrement incorporées ici par référence, ce qui inclus tous les résultats, tables, figures et textes présentés dans ces références.

D'autres caractéristiques et avantages de l'invention apparaîtront mieux à la lecture des exemples suivants donnés à titre illustratif et non limitatif.

Description des figures

Figure 1 : Effet de la vitisine B sur l'amplification *ex vivo* de progéniteurs hématopoïétiques, notamment sur des progéniteurs à potentiel érythrocytaires $CD34^{+}CD133^{neg}$ dans une procédure d'amplification réalisée à partir de cellules CD34+ de sang périphérique. Les données représentent le nombre absolu à la fin du protocole de chaque sous-population cellulaire identifiée phénotypiquement. Les données représentent la moyenne de 4 expériences.

Figure 2 : Comparaison des effets de la Vitisine B avec d'autres dérivés/analogues du Resvératrol sur la production *ex vivo* de progéniteurs à potentiel érythrocytaires $CD34^{+}CD133^{neg}$. Les données représentent une comparaison des proportions (A) et des nombres absolus (B) de progéniteurs $CD34^{+}CD133^{neg}$ en fin de protocole en fonction des molécules testées. Les données représentent la moyenne de 5 expériences.

Figure 3 : Effet de la Vitisine B sur la différenciation érythrocytaire, dans une procédure simplifiée de différenciation érythrocytaire (PROTOCOLE ERYTHRO 1, détaillé dans la partie expérimentale) à partir de cellules $CD34^{+}$ de sang périphérique. Les données représentent le niveau d'expression membranaire du CD71 (intensité moyenne de fluorescence, valeurs arbitraires relatives) (A) et les proportions relatives de cellules ayant acquis l'expression de la GPA à leur membrane (B) en fonction de la dose de Vitisine B dans le milieu de culture. Les données représentent la moyenne de 6 expériences. Les quantités de la vitisine B indiquées correspondent aux concentrations de 5, 10, 15, 20 et 30 µM, respectivement.

Figure 4 : Effet de la Vitisine B sur la différenciation érythrocytaire, dans une procédure simplifiée de différenciation érythrocytaire (PROTOCOLE ERYTHRO 1, détaillé dans la partie expérimentale) à partir de sous-population SP, CMP et MEP isolées à partir de cellules $CD34^+$ de sang périphérique. Les données représentent l'évolution au cours de la culture des proportions relatives de cellules exprimant la GPA et le CD71 à leur membrane (A) ainsi que l'évolution du niveau d'expression membranaire du CD71 (intensité moyenne de fluorescence, valeurs arbitraires relatives) (B) et fonction de la présence ou non de Vitisine B (10 µM) dans le milieu de culture. Les données représentent la moyenne de 3 expériences.

Figure 5 : Effet de la Vitisine B sur l'amplification totale de cellules $CD34^+$ de sang placentaire selon un procédé optimisé de production en trois phases (PROTOCOLE ERYTHRO 2, détaillé dans la partie expérimentale). Le graphique représente le nombre absolu de cellules obtenues et comptées au cours de la culture en absence ou en présence de Vitisine B (10 µM). CTRL : Absence de Vitisine B en culture / Vitisine B I : Présence de Vitisine B pendant la phase I / Vitisine B II : Présence de Vitisine B pendant les phases I et II / Vitisine B III : Présence de Vitisine B pendant les trois phases du protocole. Les données représentent la moyenne de deux expériences.

Figure 6 : Effet de la Vitisine B sur la différenciation en cellules érythrocytaires de cellules $CD34^+$ de sang placentaire et de sang périphérique. La cinétique d'expression de la Glycophorine A (GPA) et du récepteur à la transferrine 1 (CD71) a été analysée au cours de la différenciation des cellules érythrocytaires en présence ou en absence de la molécule Vitisine B (10 µM). **Panels A et B** : Cellules $CD34^+$ de sang placentaire, les données représentent la moyenne de deux expériences. Les histogrammes représentent l'évolution au cours de la culture des proportions relatives (panel A) et des quantités (panel B) de cellules de phénotype $CD71^{neg}GPA^+$. **Panel C** : Cellules $CD34^+$ de sang périphérique, les données représentent la moyenne de 5 expériences. Les histogrammes représentent l'évolution au cours de la culture des quantités de cellules de phénotype $CD71^{neg}GPA^+$.

Figure 7 : Effet de la Vitisine B sur l'amplification des progéniteurs érythrocytaires BFU-E et CFU-E à partir de cellules $CD34^+$ de sang placentaire. Le nombre de progéniteurs érythrocytaires primitifs (BFU-E, panel A) et matures (CFU-E, Panel B) a été estimé dans le cadre d'un test clonogénique réalisé à J4, J8 et J11 de la culture érythrocytaire. Les données représentent la moyenne de 4 expériences.

Exemples

Préambule - Principales étapes

1. Première étape -Test de molécules sur l'amplification de cellules hématopoïétiques

La Vitisine B a été testée dans un protocole d'amplification des cellules hématopoïétiques et a été comparée à 7 autres molécules de type stilbène.

Des cellules $CD34^+$, issues de sang périphérique en homéostasie ont été utilisées dans cette expérience.

Un protocole de culture cellulaire unique, dédié à l'amplification globale des progéniteurs hématopoïétiques, a été utilisé. Il s'agit du « PROTOCOLE AMPLIFICATION » décrit ci-dessous dans la partie Matériels et Méthode section B.1.

Les résultats obtenus au cours de cette étape ont permis d'identifier la molécule « Vitisine B » comme molécule favorisant spontanément l'amplification d'une sous-population à potentiel érythrocytaire.

2. Seconde étape de l'étude – Etude de l'effet de la Vitisine B sur la production de cellules érythrocytaires

La Vitisine B a été testée pour définir sa capacité à optimiser la production de progéniteurs érythrocytaires et de globules rouges dans des systèmes de cultures dédiés à la différenciation érythrocytaires.

Différentes populations cellulaires d'intérêts ont été testées

- Les cellules $CD34^+$ totales.
- Différentes sous-population de $CD34^+$: *Side Population* (SP), CMP (*Common Myeloid Progenitor*), MEP (*Megakaryocytic and Erythroid progenitor*), et BFU-E (*Burst Forming Unit Erythroid*).

L'ensemble de ces différentes populations cellulaires est physiologiquement organisé selon la hiérarchie SP->CMP->MEP->BFU-E->Erythroblaste/Réticulocyte/Globule rouge d'une part et SP->CMP- ->autres cellules sanguines d'autres part. Ces différentes populations concourent ainsi à la production de cellules sanguines matures.

L'étude de l'effet de la vitisine B vise ainsi des populations cellulaires ayant un potentiel à produire des globules rouges ($CD34^+$, SP, CMP, MEP et BFU-E).

Ces populations cellulaires d'intérêt sont issues de 2 sources différentes de cellules, le sang périphérique en homéostasie (SSBP) et/ou le sang placentaire (USP). Les populations cellulaires d'intérêt étudiées proviennent donc de l'une de ces deux sources, ou éventuellement de chacune de ces deux sources.

En particulier, les cellules CD34+ proviennent de sang périphérique et/ou placentaire, les cellules SP, CMP et MEP de sang périphérique, et les cellules BFU-E de sang placentaire.

Deux protocoles différents de culture permettant la différenciation des populations cellulaires d'intérêt en cellules érythrocytaires ont été utilisés :

- un protocole simplifié en 2 phases (décrit dans le Matériels et Méthodes, section B.2.b)
- un protocole optimisé en 3 phases (décrit dans le Matériels et Méthodes, section B.2.c)

Le tableau 2 ci-dessous récapitule l'organisation de l'étude.

	Type cellulaire	Source	Protocole	Molécules testées	Figure associée
Etape 1	CD34+	sang périphérique	AMPLIFICATION	DMSO (contrôle) RESVERATROL PALLIDOL E-VINIFERINE AMPELOSINE VITISINE B OXYRESVERATROL GNETOL	Figures 1 et 2
Etape 2	CD34+	sang périphérique	ERYTHRO 1	VITISINE B	Figure 3
	CD34+	sang placentaire	ERYTHRO 2	VITISINE B	Figure 6
	SP	sang périphérique	PRESTIM +ERYTHRO 2	VITISINE B	Figure 5 et 7
	CMP	sang périphérique	ERYTHRO 1	VITISINE B	Figure 4
	MEP	sang périphérique	ERYTHRO 1	VITISINE B	Figure 4
	BFU-E	sang placentaire	Phase 1 ERYTHRO 2	VITISINE B	Figure 7
	CFU-E	sang placentaire	Phase 1 ERYTHRO 2	VITISINE B	Figure 7

Tableau 2. Organisation de l'étude.

I. Matériels et Méthodes

A. Isolement des populations d'intérêt

Les phénotypes à partir desquels les différentes populations d'intérêt sont isolées à partir des cellules CD34+ (phénotype décrit au point II.A.1 ci-dessous) sont résumés dans le Tableau 3 ci-dessous avec un renvoi aux sections correspondantes du « Matériels et Méthodes ».

	Phénotype	Section Matériels & Méthodes
SP	$CD34^{+}DCV^{low}$	II.A.2. a
CMP	$CD34^{+}LIN^{neg}CD123^{+}CD45RA^{neg}$	II.A.2. b
MEP	$CD34^{+}LIN^{neg}CD123^{neg}CD45RA^{neg}$	II.A.2. b
BFU-E	$CD34^{+}CD123^{neg}CD36^{neg}GPA^{neg}CD71^{low}$	II.A.2.c
CFU-E	$CD34^{neg}CD123^{neg}CD36^{+}GPA^{neg}CD71^{high}$	II.A.2.c

Tableau 3. Phénotypes utilisés pour l'isolement des différentes sous-populations de cellules CD34+ utilisées au cours de l'étude.

1. Isolement des cellules $CD34^{+}$

Cet isolement repose sur une technique de tri immunomagnétique. La sélection des cellules de la lignée hématopoïétique possédant l'antigène de surface CD34 a été réalisée par l'isolement préalable de la fraction des cellules mononucléées du sang à partir des leucocytes du sang périphérique ou du sang placentaire. Les cellules sont isolées du sang par gradient de densité, en utilisant une solution isotonique

de Ficoll (d = 1.077). Les cellules mononucléées sont ensuite débarrassées des plaquettes sanguines résiduelles par gradient de densité (d=1,040), et lavage du culot cellulaire dans une solution de sucrose (d=1,0721) puis centrifugé (430g, 10 min, 4°C). Après élimination des plaquettes, les culots contenant les cellules mononucléées sont récupérés et rincés deux fois avec du tampon de sélection (PBS PH 7,2, EDTA 200 mM et albumine humaine (20%)) par centrifugation (430g, 10 min, 4°C). Le culot est ensuite remis en suspension dans 2mL de tampon de sélection supplémenté en DNase et Tégéline (0,5g/mL).

Les cellules CD34+ obtenues ont ensuite été isolées par une procédure de sélection positive immunomagnétique réalisée à partir d'un kit de sélection (Indirect kit CD34 microbeads kit, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) (Peytour et al., 2010).

2. Isolement des différentes sous-population de cellules CD34+

a. Isolement des cellules Side Population (cellules SP)

Les cellules SP sont identifiables grâce à leur propriété d'expulsion de certains colorants tels que le Hoescht ou le Dye Cycle Violet (DCV)). Cette expulsion se fait grâce à des pompes ATP Binding Cassette (ABCG2) dépendantes du calcium (Brunet de la Grange et al., 2013). Pour identifier les cellules SP au sein des cellules $CD34^+$ préalablement isolées, celles-ci sont mises en incubation avec un colorant DCV (5µM) dans un milieu $DMEM^+$ (Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), 2% SVF, 1% HEPES) pendant 2h à 37°C et à l'obscurité. Après l'incubation, toutes les manipulations jusqu'au tri final des cellules sont réalisées dans la glace et en milieu PBS^+ (PBS, 2% SVF), milieu pauvre en glucose et calcium provoquant l'arrêt des pompes d'expulsion. Les cellules sont rincées par du PBS^+ froid et centrifugées (430g, 10 min, 4°C). Après remise en suspension du culot dans du PBS^+, les cellules sont incubées avec le marqueur de viabilité 7AAD (7-Aminoactinomycine-D) (1 :100000) permettant d'exclure les éventuelles cellules mortes, et un anticorps anti-CD34-APC (1 :100000) (Beckman Coulter). Après incubation pendant 15 minutes, les cellules sont rincées dans du PBS^+, centrifugées (430 g, 10 min, 4°C) et remises en suspension dans du PBS^+. Les cellules $CD34^+$ présentant une intensité de fluorescence faible pour le marqueur DCV (cellules CD34+SP) sont analysées (UV 350nm ou violet 405nm), triées et récupérées grâce à un trieur de cellules ARIA (Becton Diockinson).

b. Isolement des progéniteurs CMP et MEP

Les cellules $CD34^+$ préalablement isolées par la technique immunomagnétique ont été marquées avec des anticorps (BD Pharmingen) anti-CD34-BV421 (1 :100000), anti-CD45RA-BB517 (1 :100000), anti-CD123-Alexa647 (1,5 :100000) et par un cocktail d'anticorps anti-LIN-PE (2 :100000) pendant 15 minutes. Les anticorps du cocktail LIN sont dirigés contre des marqueurs spécifiques des cellules matures (CD2, CD3, CD4, CD7, CD8, CD10, CD11b, CD14, CD19, CD20, CD56, CD235a). Ce cocktail LIN permet ainsi un enrichissement en cellules immatures dites « LIN^{neg} » par déplétion des cellules matures.

Après incubation avec ces anticorps, les cellules sont rincées par une solution de PBS^+ (PBS + 2% Sérum Veau Fœtal (SVF)) et centrifugées (430g, 10 min, 4°C).

Après remise en suspension des cellules dans du PBS^+, les CMP de phénotype $CD34^+LIN^{neg}CD123^+CD45RA^{neg}$ et les MEP de phénotype $CD34^+LIN^{neg}CD123^{neg}CD45RA^{neg}$ sont triées et récoltées grâce à un trieur de cellules ARIA (Manz et al., 2002).

c. Isolement des progéniteurs BFU-E et CFU-E

Des cellules $CD34^+$ de sang placentaire, préalablement isolées par tri immunomagnétique, sont marquées avec des anticorps spécifiques d'antigènes de surface permettant de cibler et de discriminer les progéniteurs érythrocytaires primitifs BFU-E, à savoir des anticorps anti-CD34, anti-GPA, anti CD123 et anti-CD36. Les progéniteurs érythrocytaires primitifs (BFU-E) sont définis par le phénotype suivant : $CD34^+CD123^{neg}CD36^{neg}GPA^{neg}$. Les progéniteurs érythrocytaires matures (CFU-E) sont définis par le phénotype suivant : $CD34^{neg}CD123^{neg}CD36^+GPA^{neg}CD71^{high}$.

Pour réaliser l'immunomarquage, les cellules sont incubées avec une solution de blocage pendant 10 minutes à 4°C afin de saturer les récepteurs Fc qui sont des sites de fixation non spécifiques des anticorps. Les anticorps sont ajoutés et la suspension incubée 15 minutes à l'obscurité et à température ambiante. L'excès d'anticorps est éliminé par lavage des cellules avec 40 mL de Tampon PBS/BSA à 300 g pendant 10 minutes à 4°C, puis le culot cellulaire a été remis en suspension à une concentration de $15x10^6$ cellules/mL. Cette suspension cellulaire a été incubée pendant 10 minutes dans la glace avec le marqueur de viabilité fluorescent 7-AAD (7-aminoactinomycine D) qui permet donc de mettre en évidence la viabilité cellulaire et d'exclure les cellules mortes

Après le marquage phénotypique, les progéniteurs érythrocytaires primitifs (BFU-E) sont isolés par la technique du tri cellulaire (ARIA BD).

Après le tri cellulaire de la population enrichie en progéniteurs érythrocytaires primitifs BFU-E celle-ci est lavée dans du tampon PBS et centrifugée à 300 g pendant 10 minutes à 4°C. Le culot cellulaire a été remis en suspension.

L'enrichissement de la population cellulaire en BFU-E a été vérifié par réalisation d'un test clonogénique CFC (Colony Forming Cells).

B. Stratégies de culture cellulaire

Les cultures cellulaires ont été effectuées en conditions stériles sous PSM (poste de sécurité microbiologique). Les cellules ont été cultivées dans un incubateur à 37°C avec un taux de CO2 de 5%.

En fonction l'objectif et de la population cellulaire de départ, plusieurs stratégies de cultures ont été utilisées :

1. Concernant la 1ère étape de l'étude : « PROTOCOLE AMPLIFICATION »

Il s'agit d'une stratégie d'amplification des progéniteurs hématopoïétiques. Cette culture est constituée comme suit : les cellules $CD34^+$ du sang périphérique sont isolées (comme indiqué dans la section II.A.1), et sont mises en cultures pendant 12 jours dans un Milieu Stem Span II (Stem Cell Technologies) complémenté en cytokines : SCF à 100 ng/ML, FLT3-L à 100 ng/ML, TPO à 20 ng/ML, G-CSF 10 ng/ML. Le produit d'amplification est analysé par quantification de la prolifération (comptage sur lames de Malassez) et analyse phénotypique des sous-populations de cellules $CD34^+$ par cytométrie en flux. La Vitisine B est utilisée à différentes concentrations, notamment 10 et 50 µM. La Vitisine B est également comparée aux molécules de type stilbène suivantes à la concentration de 10 µM :

Resvératrol, Pallidol, E-Viniférine, Ampelopsine, Oxyresvératrol, Picéatannol, Gnétol

2. Concernant la 2nde étape de l'étude _ PROTOCOLES ERYTHRO 1 et ERYTHRO 2

Il s'agit d'une stratégie de différenciation érythrocytaires des différentes cellules hématopoïétiques d'intérêt.

a. Amplification / pré-stimulation des cellules SP

Cette étape ne concerne que les cellules SP. Du fait du faible nombre de cellules SP pouvant être isolées (cellules rares par nature) ainsi que de leur statut très immature cette sous-population est de préférence amplifiée et pré-stimulée avant d'être soumise au protocole de différenciation érythrocytaire. Ainsi, les cellules SP sont préalablement mises en culture dans un milieu liquide de culture cellulaire (milieu Stem Span) complémenté en Granulocyte-Colony Stimulating Factor (G-SCF) (10 ng/mL), SCF (100 ng/µL), FLT3-L (100 ng/µL) et Thrombopoïétine (TPO) (100 ng/µL) pendant 7 jours. A l'issue de cette étape, les cellules SP sont soumise à un protocole de différenciation érythrocytaire.

b. PROTOCOLE ERYTHRO 1 : Protocole de différenciation érythrocytaire ex vivo simplifié (en 2 phases)

Ce protocole a été appliqué aux cellules $CD34^+$ du sang périphérique et du sang placentaire, aux cellules SP pré-stimulées, aux cellules CMP et aux cellules MEP. Pour cette culture, les populations cellulaires d'intérêt sont isolées comme indiqué précédemment et sont mises en culture dans un milieu de culture IMDM complémenté comme suit :

- 15% de BIT 9500 (Stem Cell Technologies). Le BIT est un mélange de BSA (albumine sérique bovine), insuline et transferrine.
- Cytokines : IL3 à 10 ng/ML, IL6 à 10ng/ML, SCF à 50 ng/ML.
- Mélange d'antibiotiques Pénicilline - Streptomycine (100 U/mL) notamment pour éviter toute contamination bactérienne

Les différentes populations cellulaires sont ensemencées dans des plaques 24 puits à raison de 200 000 cellules/mL pour les CD34+, les CMP et les MEP. La totalité des cellules récupérées après l'étape « Amplification / pré-stimulation » pour les cellules SP (soit 5000 à 50 000 cellules) a été mise en culture dans des plaques 24 puits.

Cette culture comporte 2 phases :

- Phase 1 : de J0 à J6, culture sans EPO
- Phase 2 : à partir de J6 adition de 2 UI/ML d'EPO et prolongement de la culture jusqu'à J21 minimum et J28 maximum.

Afin de tester l'effet de la Vitisine B dans ce contexte, la culture est réalisée en absence et en présence de Vitisine B :

- **Condition CTRL** : Absence de Vitisine B pendant l'intégralité du protocole.
- **Condition test** : Présence de Vitisine B à 5, 10, 15, 20 ou 30 µM pendant toute la durée du protocole (phase 1 + phase 2).

Au cours du protocole de culture, le produit de différenciation est analysé par quantification de la prolifération (comptage) et analyse des marqueurs de différenciation érythrocytaires par cytométrie en flux grâce aux marqueurs CD71 et CD235a.

c. PROTOCOLE ERYTHRO 2 : Protocole de différenciation érythrocytaire en 3 phases

Ce protocole a été appliqué aux cellules $CD34^+$. La phase 1 de ce protocole a été en particulier appliquée aux cellules BFU-E. Ce protocole a été adapté de la publication de Vlaski et al. (Experimental Hematology 2009 ;37 :573–584).

La production d'érythrocytes *ex vivo* a été établie sur une culture cellulaire de 28 jours et se compose de trois phases, à savoir 1) l'amplification des progéniteurs érythrocytaires primitifs, puis 2) la différenciation desdits progéniteurs en précurseurs érythrocytaires, et enfin 3) le stade terminal de maturation avec l'énucléation des cellules et le développement des érythrocytes matures.

i. Description détaillée des 3 phases du protocole

- **La Phase I** du protocole démarre à J0 par l'ensemencement de 10^4 cellules/mL dans 5 mL de milieu IMDM supplémenté tel que défini ci-dessous (voir section ii). Au jour 4, une dilution de la culture est réalisée en récupérant 3 mL que l'on remplace par le même volume de milieu frais. Au jour 8, afin de permettre la survie et la différenciation de ces progéniteurs érythrocytaires dépendants notamment des cytokines, les cellules de toutes les conditions sont remises en suspension à 3×10^5/mL et incubées dans 5 mL de milieu IMDM en présence de cytokines (interleukine 3 humaine (hIL3), *Stem Cell Factor* (SCF), Hydrocortisone (HC) et érythropoïétine (EPO)) pendant les 3 jours suivants.
- **La Phase II** du protocole démarre au jour 11, qui correspond au développement des précurseurs érythrocytaires. Du jour 11 à la fin du processus, les cellules sont placées sur une couche de cellules

stromales mésenchymateuses (CSM) (coculture), ce qui permet d'achever la maturation terminale en cellules énucléées fonctionnelles grâce au contact entre cellules stromales et précurseurs érythrocytaires. Les cellules érythrocytaires en suspension sont ensemencées à une concentration de $3x10^{5}$/ml et sont co-cultivées du jour 11 au jour 15 dans du milieu frais avec des cytokines (SCF, IL-3, EPO et HC) et 5% de sérum de veau fœtal (SVF) nécessaire aux CSM.

Au jour 15, les cellules érythrocytaires en suspension sont retirées de la culture, lavées, puis réensemencées sur une nouvelle couche adhérente de CSM et cultivées pendant 4 jours supplémentaires dans 2 mL de milieu frais contenant uniquement de l'EPO.

- **La Phase III** du protocole commence au jour 19. A ce stade, les cellules achèvent leur maturation par l'énucléation des érythroblastes orthochromatiques pour former des réticulocytes et aboutir à la formation d'érythrocytes. Au jour 19, les cellules sont lavées et étalées sur une nouvelle couche de CSM dans 2 mL de milieu frais sans cytokines. Au jour 23, les cultures sont alimentées avec du milieu frais jusqu'au jour 28 qui correspond au dernier jour de culture du protocole d'érythropoïèse.

ii. Description du milieu de culture

Les cellules sont incubées dans un milieu de culture Iscove 's Modified Dulbecco Medium (IMDM_PAN BIOTECH) supplémenté avec différents réactifs pour obtenir un milieu favorisant la croissance des cellules engagées vers la lignée érythrocytaire à savoir :

- L-Glutamine (4 mM),
- Streptomycine et de la pénicilline (1%),
- Inositol (40 µg/mL),
- Acide folique (10 µg/mL),
- Mono-thioglycérol ($1,6.10^{-4}$ M),
- Transferrine (120 µg/mL),
- Insuline (10 µg/mL), N
- Nitrate de fer (90 ng/mL),
- Sulfate de fer (900 ng/mL)
- Albumine sérique humaine (10 mg/ml).

Après préparation du milieu de culture, des cytokines sont ajoutées extemporanément au milieu de culture :

- Stem Cell Factor (SCF) à 100 ng/mL,
- Interleukine-3 (IL-3) à 5 ng/mL,
- Erythropoïétine (EPO) à 3 UI/mL,
- Hydrocortisone (HC)à 10^{-6} M.

Les cellules CD34+ sont incubées à 20% d'O2 et 5% de CO2 à 37°C durant 28 jours.

iii. Description des conditions de culture réalisées

Afin de tester l'effet de la Vitisine B dans ce contexte, différentes conditions ont été définies.

Pour les cellules CD34$^+$

- **Condition CTRL** : Absence de Vitisine B pendant l'intégralité du protocole.
- **Condition I** : Présence de Vitisine B (10 µM) pendant la phase I du protocole.
- **Condition II** : Présence de Vitisine B (10 µM) pendant les phases I et II du protocole.
- **Condition III** : Présence de Vitisine B (10 µM) pendant les 3 phases du protocole.

Des analyses sont réalisées sur les cellules de chaque condition. La différenciation et la maturation des cellules érythrocytaires sont suivies par la quantification des progéniteurs, l'analyse de l'expression des marqueurs GPA et CD71, ainsi que par l'analyse morphologique.

Pour les BFU-E

- **Condition CTRL** : les cellules sont mises en culture pendant 7 jours en absence de Vitisine B.
- **Condition TEST** : les cellules sont mises en culture pendant 7 jours en présence de Vitisine B à 10 µM.

C. Stratégies d'analyse des cultures cellulaires

a. Stratégies d'analyse de l'amplification (ETAPE 1 de l'étude)

Au terme du protocole d'amplification des cellules hématopoïétiques, une analyse de la prolifération cellulaire et de l'amplification de populations cellulaires immatures et engagées est réalisée.

La prolifération cellulaire est évaluée par énumération des cellules sur lames de Malassez avec exclusion des cellules mortes au bleu de Trypan.

L'amplification de populations cellulaires repose sur une analyse phénotypique portant sur l'évolution de l'expression des marqueurs membranaires CD34 et CD133 par cytométrie en flux. Ces marqueurs permettent de définir des populations de cellules plus ou moins immatures organisées hiérarchiquement comme suit : $CD34^+CD133^+$ -> $CD34^+CD133^{neg}$ -> $CD34^{neg}CD133^{neg}$. Pour cela, les cellules sont incubées avec les anticorps anti-CD34 (1 :100000) (BD Pharmingen) et anti-CD133 (1 :100000) (BD Pharmingen) pendant 15 minutes. Les cellules sont ensuite rincées par une solution de PBS et centrifugées (430g, 10 min, 4°C). Après remise en suspension des culots cellulaires dans du PBS, les cellules sont analysées par cytométrie en flux (FACSCantoII, Becton Dickinson, San Jose, CA).

Les proportions de chaque population phénotypique ainsi observées et la quantité de cellules totale permettent de calculer le taux d'amplification des cellules les plus immatures ($CD34^+CD133^+$) comparativement à l'amplification de progéniteurs plus engagés ($CD34^+CD133^{neg}$ et $CD34^{neg}CD133^{neg}$).

b. Stratégies d'analyse de la différenciation érythrocytaire (ETAPE 2 de l'étude)

i. Comptage cellulaire et analyse phénotypique (concerne les PROTOCOLES ERYTHRO 1 et ERYTHRO 2)

Au cours et au terme des différents protocoles de différenciation érythrocytaire, une analyse de la prolifération cellulaire et de la différenciation cellulaire est effectuée. La prolifération cellulaire est évaluée par énumération des cellules sur lames de Malassez avec exclusion des cellules mortes au bleu de Trypan. Les différentes populations et conditions de culture sont également analysées par cytométrie en flux afin d'observer l'apparition des marqueurs de différenciation érythrocytaire et donc la cinétique de différenciation des cellules. Pour cela, les cellules sont incubées avec des anticorps spécifiques de la différenciation érythrocytaire : anti-CD71 (1 :100000) (BD Pharmingen) et anti-CD235 (1 :100000) (BD Pharmingen) pendant 15 minutes. Un marquage avec l'anticorps anti-CD34 (1 :100000) (Beckman Coulter), est également réalisé conjointement aux autres anticorps afin de suivre la perte du CD34 témoignant de la maturation des cellules. Les cellules sont ensuite rincées par une solution de PBS et centrifugées (430g, 10 min, 4°C). Après remise en suspension des culots cellulaires dans du PBS, les cellules sont analysées par cytométrie en flux (FACSCantoII, Becton Dickinson, San Jose, CA).

Les proportions de chaque population phénotypique ainsi observées et la quantité de cellules totale permettent de calculer les quantités de cellules ayant atteints les différents stades de différenciation.

ii. Analyse de la production de progéniteurs érythrocytaires (concerne uniquement le PROTOCOLE ERYTHRO 2)

Au cours des étapes de différenciation vers les globules rouges, les populations d'intérêt produisent des progéniteurs engagés dans la voie érythrocytaire qui peuvent être mis en évidence directement par leurs capacités clonogéniques, c'est-à-dire leur capacité individuelle à générer lors de la culture une colonie de cellules différenciées et morphologiquement identifiables. Pour cela, le test de CFC (*Colony Forming Cells*) est utilisé. Les progéniteurs engagés sont capables de générer des colonies après une culture en milieu semi-solide composé de méthylcellulose et supplémenté de cytokines. Ainsi, les progéniteurs engagés (ici les BFU-E et CFU-E) produits au cours des cultures érythrocytaires peuvent être comptés.

Cette analyse de la production des BFU-E et CFU-E a été réalisée uniquement au cours de la phase 1 du PROTOCOLE 2. Les cellules cultivées et récoltées aux jours 4, 8 et 11 de la phase 1 sont ensemencées dans un kit prêt à l'emploi de méthylcellulose H4034 supplémenté en cytokines (*Stem Cell Technology, Meylan, France*) à des concentrations de 150 cellules/250 µL H4034 pour le jour 4 et 300 cellules/250

II. Résultats

1. Effet de la Vitisine B et des différentes molécules antioxydantes sur l'amplification de progéniteurs hématopoïétiques (Figures 1 et 2)

Dans le contexte d'amplification des progéniteurs hématopoïétiques (PROTOCOLE AMPLIFICATION), la Vitisine B induit une amplification jusqu'à 250% de la quantité totale de progéniteurs de phénotype $CD34^+$ dès la dose de 10µM (Figure 1). Il est également observé que la Vitisine B induit une amplification d'une sous-population particulière, $CD34^+CD133^{neg}$, dont le potentiel érythrocytaire a déjà été montré par l'équipe des inventeurs (Lapostolle *et al.* 2018 Haematologica Vol. 103 No. 10 (2018)). Ces progéniteurs $CD34^+CD133^{neg}$ a fort potentiel érythrocytaire ont par conséquent le potentiel de produire des globules rouges matures. Que ce soit pour la population $CD34^+$ totale ou pour la population $CD34^+CD133^{neg}$, l'effet de la Vitisine B se produit déjà à 10 µM, l'augmentation de la dose à 50 µM n'induisant pas d'effet supplémentaire.

La comparaison de la Vitisine B avec d'autres polyphénols (des stilbènes) dérivés du Resvératrol (RESVERATROL, PALLIDOL, E-VINIFERINE, AMPELOPSINE, OXYRESVERATROL, PICEATANNOL et GNETOL) à la dose de 10µM montrent que seule la Vitisine B produit un effet probant sur la proportion et la quantité totale de cellules $CD34^+CD133^{neg}$ (Figure 2). Cela signifie que dans un contexte d'amplification de cellules $CD34^+$, la vitisine B est capable d'amplifier une sous-population enrichies en progéniteurs érythrocytaires. Ce résultat dans le contexte d'amplification des CD34 indique un effet spécifique de la Vitisine B, là où d'autres molécules antioxydantes connu comme le Resvératrol ne produisent aucun effet.

Ainsi, seule la Vitisine B permet d'amplifier une population enrichie en progéniteurs érythrocytaires par rapport aux autres molécules testées, montrant qu'il existe une singularité des effets de Vitisine B.

2. Effet de la Vitisine B sur la différenciation érythrocytaire

a. Dans le contexte du protocole différenciation érythrocytaire ERYTHRO 1

i. A partir des cellules CD34+ du sang périphérique (figure 3)

L'effet de la Vitisine B a été observée au niveau de la différenciation érythrocytaire à partir de cellules $CD34^+$ de sang périphérique, évalué selon un protocole simplifié (PROTOCOLE ERYTHRO 1, présenté au point B.2.b du Matériels et Méthodes).

Dans ces conditions, les inventeurs ont observé que la Vitisine B induit une différenciation plus rapide et plus importante des cellules $CD34^+$ en précurseurs érythrocytaires (Figure 3). Cet effet est mesuré par cytométrie en flux sur la base de l'expression des antigènes membranaires CD71 et CD235a (GlycoPhorine A, GPA) selon la séquence de différenciation : $CD71^+GPA^{neg}$ -> $CD71^+GPA^+$ -> $CD71^{low}GPA^+$. Les inventeurs ont observé une acquisition plus précoce du CD235a accompagné d'une baisse plus rapide de l'expression du CD71 ($CD71^{low}$), indiquant la différenciation.

A l'issue de ces deux protocoles (AMPLIFICATION et ERYTHRO 1), deux effets distincts et complémentaires de la Vitisine B sont donc observés : une amplification des progéniteurs à potentiel érythrocytaire et une accélération de la différenciation vers les précurseurs érythrocytaires.

ii. A partir des cellules SP, CMP et MEP (figure 4)

Des résultats identiques à ceux décrits pour les $CD34^+$ du sang périphérique sont retrouvés pour les sous-population de $CD34^+$ triées : SP, CMP et MEP. Ces résultats montrent une accélération de la différenciation érythrocytaire en présence de Vitisine B (acquisition du phénotype $CD71^+GPA^+$) pour les CMP et les MEP (figure 4A) ainsi qu'une diminution jusqu'à 40% par rapport au contrôle de l'expression membranaire du CD71 pour les SP, les CMP et les MEP dès le J7 de culture (figure 4B).

b. Dans le contexte du protocole de différenciation érythrocytaire en 3 phases ERYTHRO 2

i. Amplification totale des cellules $CD34^+$ du sang placentaire (figure 5)

L'effet de la molécule Vitisine B sur le développement des cellules érythrocytaires a également été étudié dans un protocole de production d'érythrocytes *ex vivo* en trois phases selon un protocole optimisé (PROTOCOLE ERYTHRO 2, présenté au point B.2.c du Matériels et Méthodes). La Figure 5 représente le nombre de cellules érythrocytaires dans la culture au cours du protocole d'érythropoïèse dans les différentes conditions testées.

- **Condition CTRL** : Absence de Vitisine B pendant l'intégralité du protocole.
- **Condition I** : Présence de Vitisine B pendant la phase I du protocole.
- **Condition II** : Présence de Vitisine B pendant les phases I et II du protocole.
- **Condition III** : Présence de Vitisine B pendant les 3 phases du protocole.

En phase I (Jours 0 à 11), la prolifération cellulaire est similaire pour chacune des conditions testées. A partir du passage en phase II (Jour 11), une forte augmentation de la prolifération cellulaire pour les 3 conditions où la Vitisine B est présente a été observée, jusqu'à atteindre un pic de prolifération au 21ème jour. En particulier, la condition I présente un nombre de cellules 1,5 fois supérieur à la condition contrôle (CTRL). Ces résultats sont observés à la fois à partir des cellules CD34+ de sang placentaire ainsi que des cellules CD34+ de sang périphérique en homéostasie.

L'amplification des cellules érythrocytaires a été considérablement augmentée en présence de Vitisine B en culture. La Vitisine B stimule la production des cellules progénitrices menant au développement de précurseurs et de cellules érythrocytaires matures.

ii. Différenciation érythrocytaire à partir des cellules CD34$^+$ du sang périphérique et du sang placentaire (figure 6)

La différenciation érythrocytaire a été observée par l'expression des marqueurs CD71 (récepteur à la transferrine 1) et GPA (Glycophorine A) pour confirmer l'effet de la molécule Vitisine B sur la différenciation pendant le protocole d'érythropoïèse *ex vivo* (PROTOCOLE ERYTHRO 2).

La présence de la molécule Vitisine B augmente le pourcentage de cellules de phénotype CD71^{neg}GPA$^+$ (Figure 6A). En effet, au jour 8 de culture moins de 20 % des cellules expriment la GPA. L'expression de GPA apparait au jour 15 et augmente jusqu'au jour 28 plus rapidement en présence de la molécule Vitisine B (plus de 50 % des cellules l'expriment) en comparaison à la condition CTRL (40%).

Cet effet est encore plus marquant en ce qui concerne le nombre absolu de cellules de phénotype CD71^{neg}GPA$^+$ en culture (Figure 6B). La présence de la molécule Vitisine B en phase I du protocole augmente le nombre de cellule de phénotype différencié CD71^{neg}GPA$^+$. Le même effet est observé concernant le nombre absolu de cellules CD71^{neg}GPA$^+$ produit à partir des cellules CD34$^+$ du sang périphérique (figure 6C).

Ces résultats montrent que la présence de la molécule Vitisine B permet une différenciation des cellules érythrocytaires plus rapide et plus efficace ce qui se traduit *in fine* par une production plus efficace de globules rouges.

***3.* Effet de la Vitisine B sur les progéniteurs érythrocytaires BFU-E et CFU-E (figure 7)**

Les inventeurs se sont également intéressés à une population de progéniteurs particuliers, les BFU-E et les CFU-E. Ces progéniteurs sont produits physiologiquement par différenciation de cellules plus immatures et aussi *ex vivo* lorsque les conditions de culture le permettent. Ils sont détectés par des tests en méthyl cellulose (voir section C.b. ii du Matériels et Méthodes) au cours desquels ils produisent des colonies de cellules érythrocytaires matures (réticulocytes et érythrocytes). Ils ont observé que la présence de Vitisine B accélère l'apparition des progéniteurs érythrocytaires primitifs (BFU-E ; figure 7A) mais aussi des progéniteurs plus différenciés (CFU-E ; figure 7B) issus des BFU-E.

Ces résultats montrent l'avantage de la Vitisine B sur une population cellulaire hématopoïétique primitive, permettant donc de favoriser la production de cellules érythrocytaires matures énucléées, c'est-à-dire de réticulocytes et d'érythrocytes.

III. Conclusion

L'étude des cellules érythrocytaires tout au long de cette étude a permis d'évaluer l'effet de la Vitisine B sur l'amplification et la différenciation des cellules hématopoïétiques.

En particulier, la Vitisine B exerce son effet stimulant au cours des premières étapes du développement qui concerne l'engagement des cellules CD34$^+$ vers la lignée érythrocytaire et

l'amplification de progéniteurs. Elle promeut l'engagement des cellules hématopoïétiques primitives $CD34^+$ vers les progéniteurs érythrocytaires en augmentant leur amplification.

La Vitisine B permet également d'accélérer la différenciation des progéniteurs vers les précurseurs érythrocytaires et leur énucléation, aboutissant aux cellules matures : les réticulocytes et les érythrocytes. La mise en contact des cellules hématopoïétiques avec la Vitisine B permet ainsi d'obtenir un meilleur rendement de production de globules rouges ex vivo et d'accélérer le procédé de production.

Ces deux effets combinés permettent ainsi de dépasser des verrous observés pour la production de globules rouges ex vivo, en particulier le faible rendement et la durée de production.

Revendications

1. Procédé *in vitro* de production d'érythrocytes comprenant :

a) la fourniture de cellules hématopoïétiques multipotentes, de préférence d'origine humaine, sélectionnées dans le groupe constitué des cellules souches hématopoïétiques (CSH), des progéniteurs multipotents (MPP), des progéniteurs myéloïdes communs (CMP), des progéniteurs mégacaryocytaires-érythrocytaires (MEP), et les combinaisons de ceux-ci , et optionnellement l'amplification desdites cellules hématopoïétiques multipotentes;

b) l'induction de la différenciation desdites cellules hématopoïétiques multipotentes en progéniteurs érythrocytaires unipotents, et optionnellement l'amplification desdits progéniteurs érythrocytaires unipotents;

c) l'induction de la différenciation desdits progéniteurs érythrocytaires unipotents en précurseurs érythrocytaires; et

d) l'induction de la maturation des précurseurs érythrocytaires en érythrocytes, et

e) optionnellement la récupération des érythrocytes obtenus ;

dans lequel les cellules sont mises en contact avec un composé vitisine à l'étape a) lorsque celle-ci comporte l'étape d'amplification des cellules, l'étape b), l'étape c) et/ou l'étape d).

2. Procédé *in vitro* de production de progéniteurs érythrocytaires unipotents comprenant :

a) la fourniture de cellules hématopoïétiques multipotentes, de préférence d'origine humaine, sélectionnées dans le groupe constitué des cellules souches hématopoïétiques (CSH), des progéniteurs multipotents (MPP), des progéniteurs myéloïdes communs (CMP), des progéniteurs mégacaryocytaires-érythrocytaires (MEP), et les combinaisons de ceux-ci , et optionnellement l'amplification desdites cellules hématopoïétiques multipotentes; et

b) l'induction de la différenciation desdites cellules hématopoïétiques multipotentes en progéniteurs érythrocytaires unipotents, et optionnellement l'amplification desdits progéniteurs érythrocytaires unipotents ; et

c) optionnellement la récupération des progéniteurs érythrocytaires unipotents obtenus ;

dans lequel les cellules sont mises en contact avec un composé vitisine à l'étape a) lorsque celle-ci comporte l'étape d'amplification des cellules et/ou l'étape b).

3. Procédé *in vitro* de production d'érythrocytes comprenant,

a) la fourniture de progéniteurs érythrocytaires unipotents, de préférence obtenus selon le procédé de la revendication 2 ;

b) l'induction de la différenciation desdits progéniteurs érythrocytaires unipotents en précurseurs érythrocytaires unipotents ;

c) l'induction de la maturation des précurseurs érythrocytaires en érythrocytes, et

d) optionnellement la récupération des érythrocytes obtenus,

dans lequel les cellules sont mises en contact avec un composé vitisine à l'étape b) et/ou l'étape c).

4. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, dans lequel les cellules sont mises en contact avec le composé vitisine dans un milieu de culture adapté aux exigences nutritionnelles des cellules hématopoïétiques, en particulier un milieu de culture adapté à l'amplification et/ou la différenciation et/ou la maturation des cellules hématopoïétiques.

5. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, dans lequel les cellules sont mises en contact avec le composé vitisine i) lors de l'amplification et/ou la différenciation des cellules hématopoïétiques multipotentes ou ii) lors de l'amplification et/ou la différenciation des progéniteurs érythrocytaires unipotents.

6. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, dans lequel les cellules sont mises en contact avec le composé vitisine lors de l'amplification et/ou la différenciation des cellules hématopoïétiques multipotentes, et lors de l'amplification et/ou la différenciation des progéniteurs érythrocytaires unipotents et optionnellement lors de la maturation des précurseurs érythrocytaires.

7. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, dans lequel les cellules sont mises en contact avec un composé vitisine durant au moins 1 jour, préférence au moins au moins 3, 5, 7, 10 ou 12 jours, lors de l'amplification et/ou la différenciation des cellules hématopoïétiques multipotentes, et/ou durant au moins 1 jour, préférence au moins au moins 3, 5, 7, 10 ou 12 jours, lors de l'amplification et/ou la différenciation des progéniteurs érythrocytaires unipotents.

8. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, dans lequel le composé vitisine, lorsqu'il est mis contact avec les cellules, est présent dans le milieu de culture à une concentration comprise entre 1 µM et 500 µM, de préférence ente 5 µM et 100 µM.

9. Milieu de culture cellulaire adapté à l'amplification et/ou la différenciation et/ou la maturation de cellules hématopoïétiques et comprenant un composé vitisine.

10. Milieu de culture cellulaire selon la revendication 9, sélectionnées dans le groupe constitué des cellules CSH, MPP, CMP, MEP, des progéniteurs érythrocytaires unipotents, des précurseurs érythrocytaires, et des combinaisons de ceux-ci.

11. Milieu de culture cellulaire selon la revendication 9, dans lequel les cellules hématopoïétiques sont des CSH ou des progéniteurs érythrocytaires unipotents.

12. Milieu de culture cellulaire selon la revendication 9 ou 10, lequel le composé vitisine est présent dans le milieu à une concentration comprise entre 1 µM et 500 µM, de préférence entre 5 µM et 100 µM.

13. Utilisation *in vitro* d'un milieu de culture cellulaire selon l'une quelconque des revendications 9 à 12 pour (i) l'amplification et/ou la différenciation de cellules souches hématopoïétiques (CSH), des progéniteurs multipotents (MPP), des progéniteurs myéloïdes communs (CMP), des progéniteurs mégacaryocytaires-érythrocytaires (MEP) ou de progéniteurs érythrocytaires unipotents et/ou (ii) pour la différenciation et/ou la maturation de précurseurs érythrocytaires, et/ou (iii) la production de progéniteurs érythrocytaires unipotents et/ou d'érythrocytes.

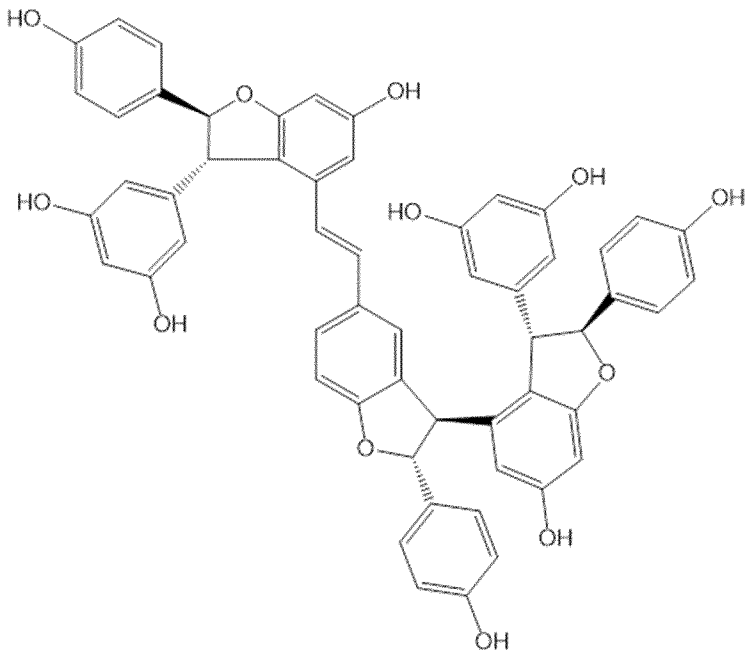
14. Utilisation d'un composé vitisine pour supplémenter un milieu de culture cellulaire adapté à l'amplification et/ou la différenciation et/ou la maturation de cellules hématopoïétiques.

15. Utilisation d'un composé vitisine pour stimuler l'amplification et/ou la différenciation de cellules souches hématopoïétiques (CSH), des progéniteurs multipotents (MPP), des progéniteurs myéloïdes communs (CMP), des progéniteurs mégacaryocytaires-érythrocytaires (MEP) ou de progéniteurs érythrocytaires unipotents et/ou (ii) stimuler la différenciation et/ou la maturation de précurseurs érythrocytaires, et/ou (iii) stimuler la production de progéniteurs érythrocytaires unipotents et/ou d'érythrocytes.

16. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 8, milieu de culture selon l'une quelconque des revendications 9 à 12, ou utilisation selon l'une quelconque des revendications 13 à 15, dans lequel le composé vitisine est la vitisine B ou l'un de ses dérivés.

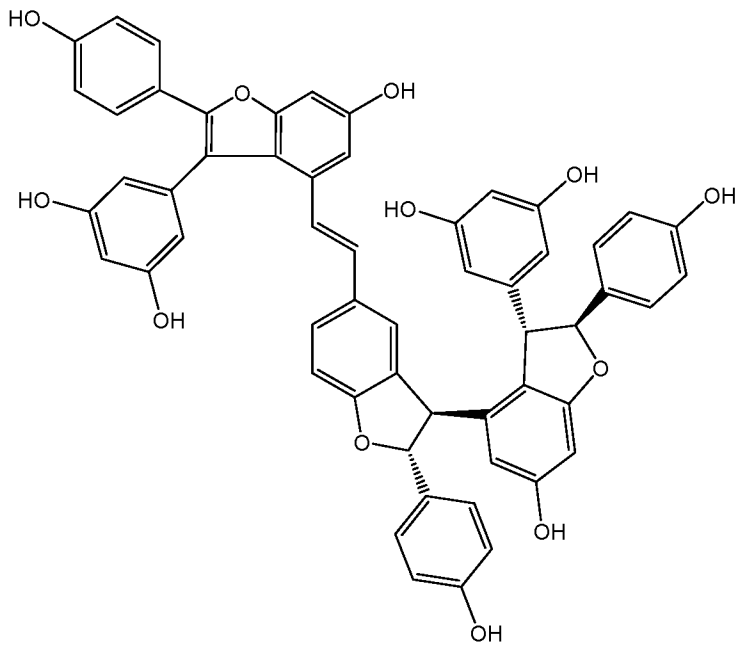
17. Procédé la revendication 16, milieu de culture selon la revendication 16 ou utilisation selon la revendication 16, dans lequel le dérivé de vitisine B est un isomère de vitisine B, de préférence un stéréoisomère de vitisine B.

18. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 8, milieu de culture selon l'une quelconque des revendications 9 à 12, utilisation selon l'une quelconque des revendications 13 à 15, dans lequel le composé vitisine est un dérivé de vitisine de formule :



(II)

ou



(III)

19. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 8, milieu de culture selon l'une quelconque des revendications 9 à 12, ou utilisation selon l'une quelconque des revendications 13 à 15, dans lequel le composé vitisine est la vitisine B.

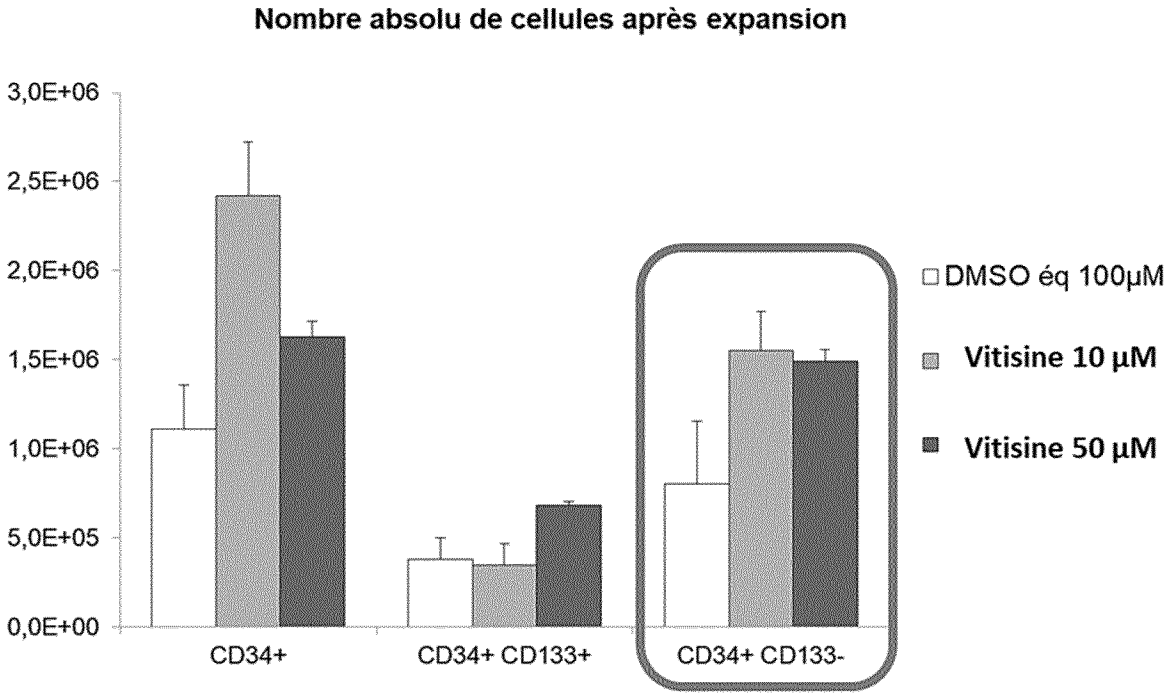

Nombre absolu de cellules après expansion
3,0E+06
2,5E+06
2,0E+06
1,5E+06
1,0E+06
5,0E+05
0,0E+00
CD34+
CD34+ CD133+
CD34+ CD133-
DMSO éq 100µM
Vitisine 10 µM
Vitisine 50 µM

Figure 1

Figure 2

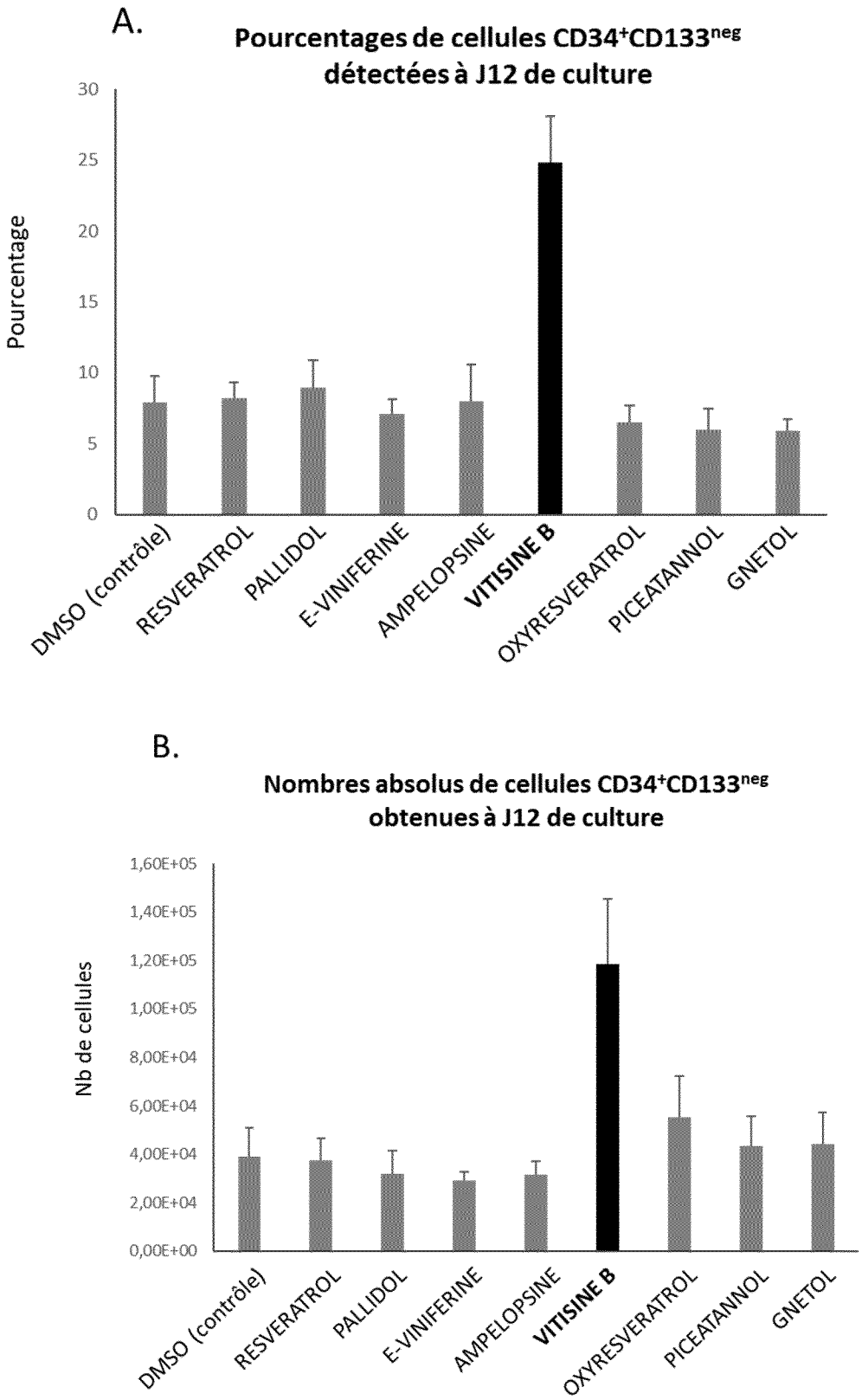

A.
Pourcentages de cellules CD34+CD133neg détectées à J12 de culture
Pourcentage
30
25
20
15
10
5
0
DMSO (contrôle)
RESVERATROL
PALLIDOL
E-VINIFERINE
AMPELOPSINE
VITISINE B
OXYRESVERATROL
PICEATANNOL
GNETOL
B.
Nombres absolus de cellules CD34+CD133neg obtenues à J12 de culture
Nb de cellules
1,60E+05
1,40E+05
1,20E+05
1,00E+05
8,00E+04
6,00E+04
4,00E+04
2,00E+04
0,00E+00
DMSO (contrôle)
RESVERATROL
PALLIDOL
E-VINIFERINE
AMPELOPSINE
VITISINE B
OXYRESVERATROL
PICEATANNOL
GNETOL

Figure 3

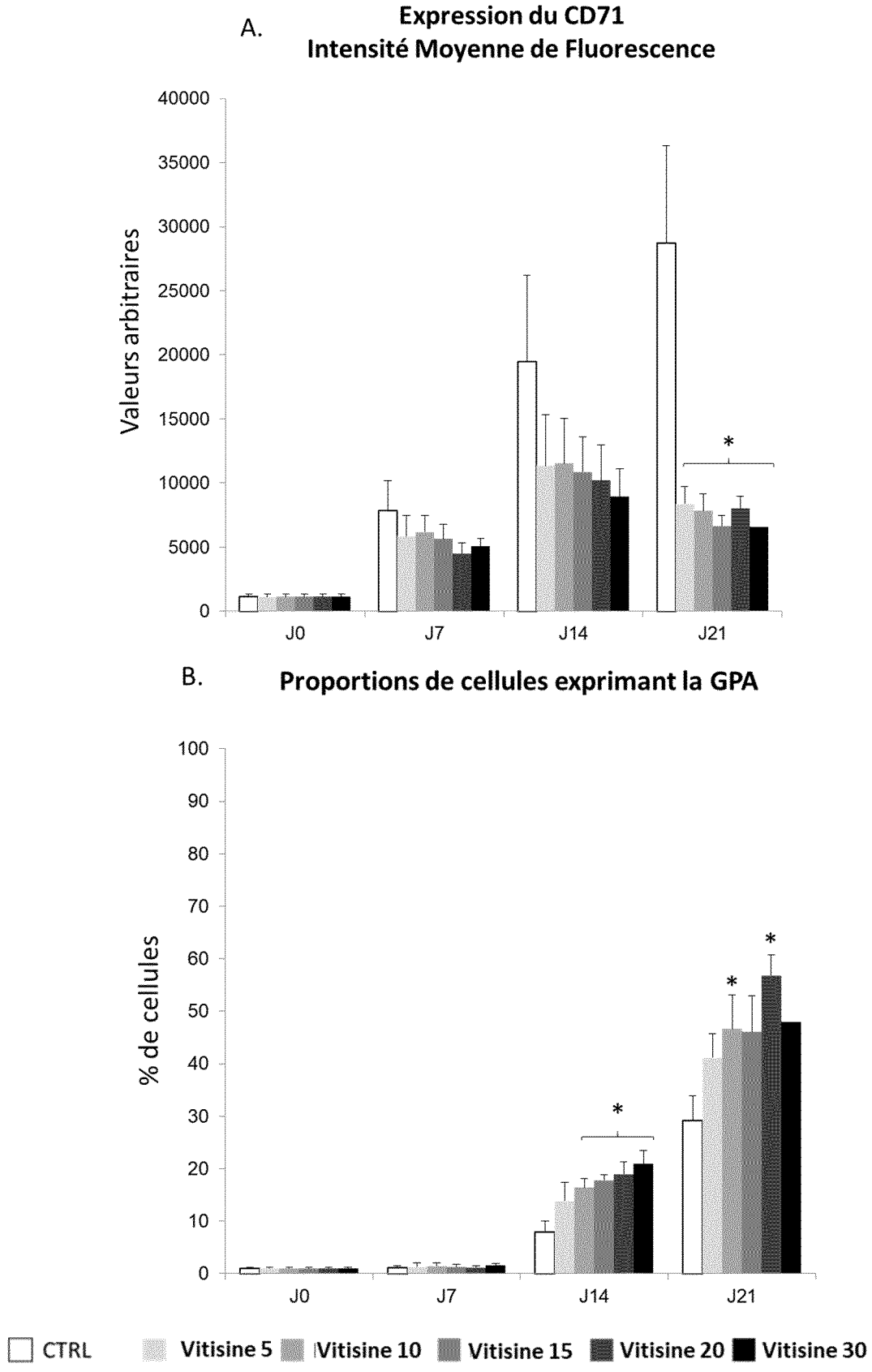
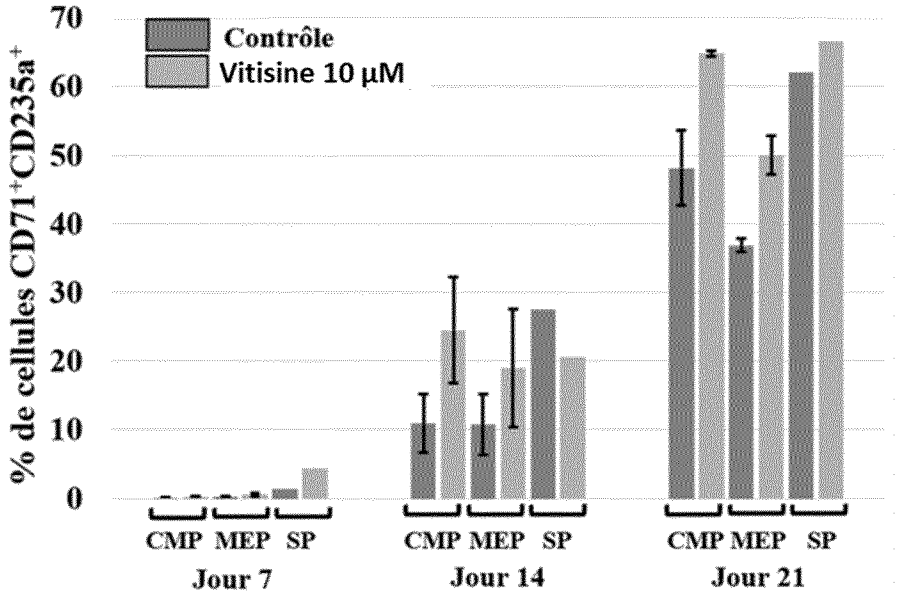

A.
Expression du CD71
Intensité Moyenne de Fluorescence
Valeurs arbitraires
40000
35000
30000
25000
20000
15000
10000
5000
0
J0
J7
J14
J21
*
B.
Proportions de cellules exprimant la GPA
% de cellules
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
J0
J7
J14
J21
*
*
*
CTRL
Vitisine 5
Vitisine 10
Vitisine 15
Vitisine 20
Vitisine 30

Figure 4

A. Proportions de cellules CD71+ CD235+



B. Expression du CD71 membranaires

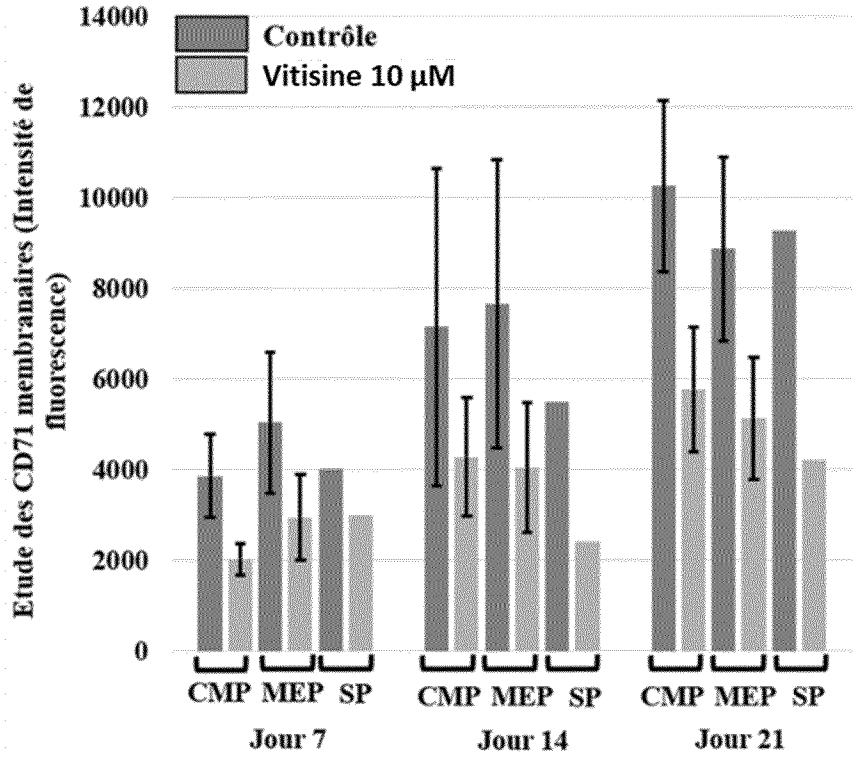


Figure 5

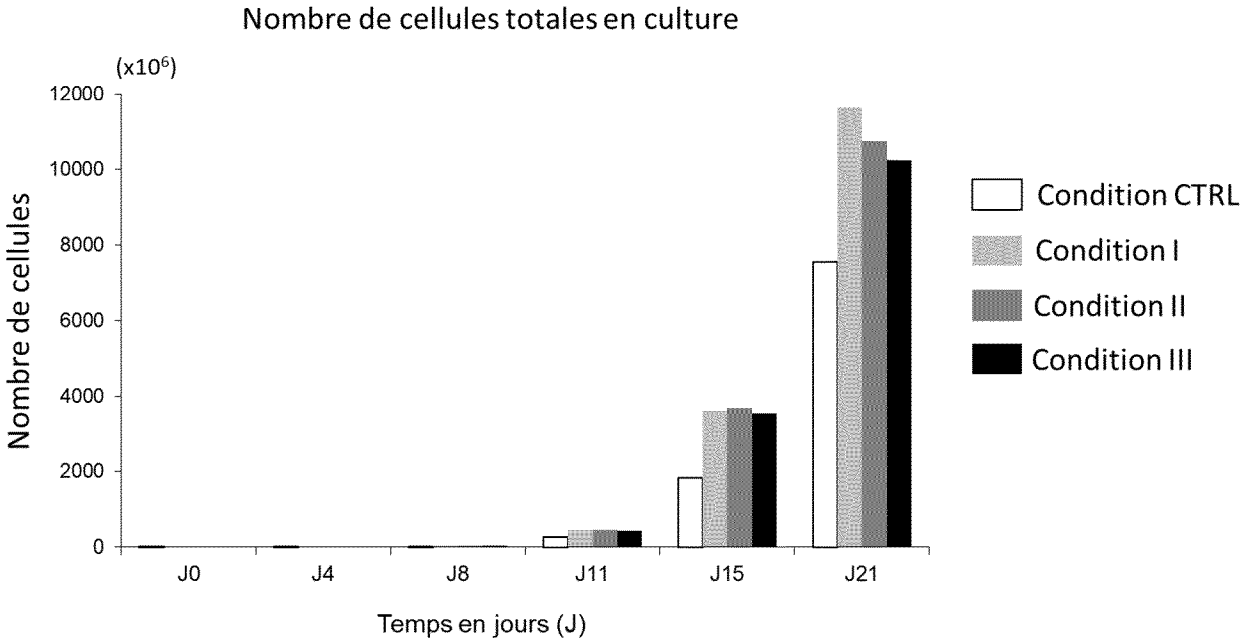


Figure 6

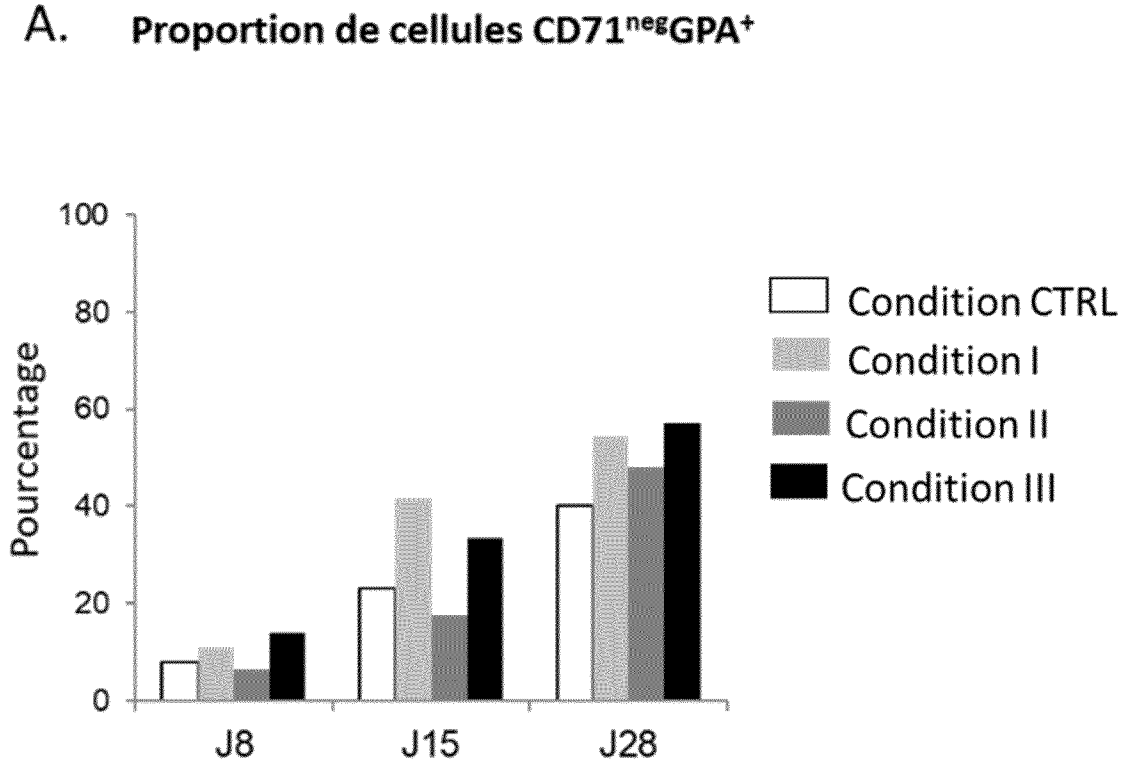
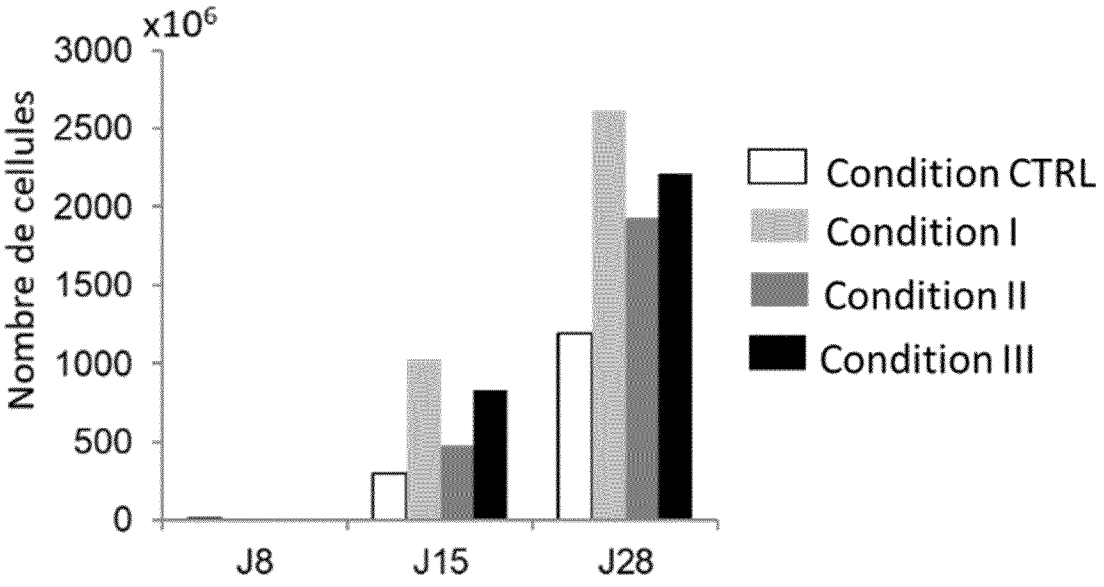


Figure 6 (suite)

B. Nombre absolu de cellules $CD71^{neg}GPA^{+}$



C. Nombre absolu de cellules $CD71^{neg}GPA^{+}$ ($x10^{6}$)

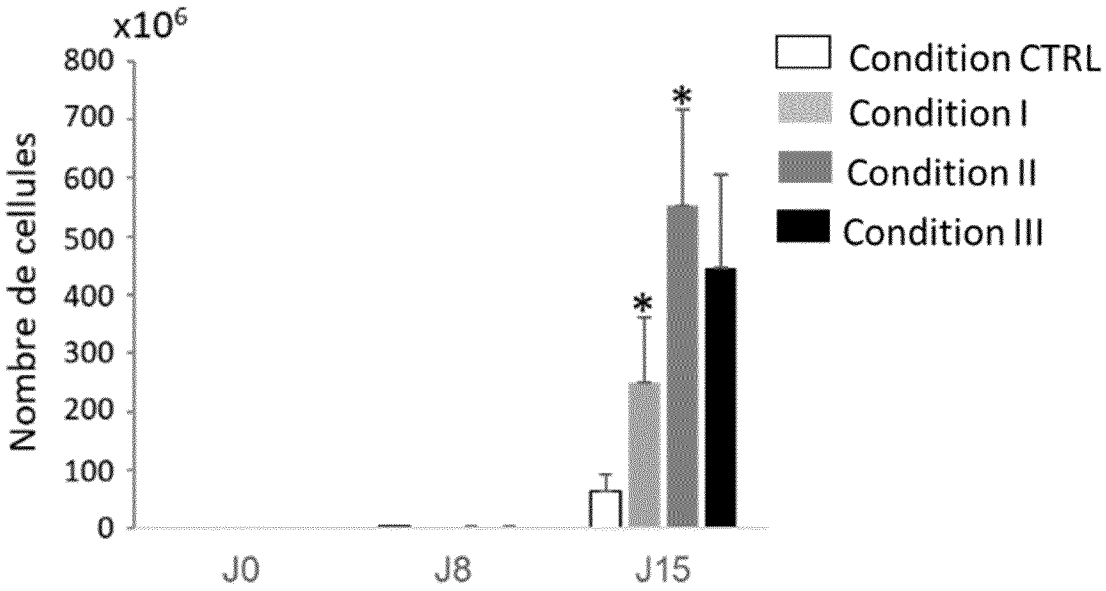
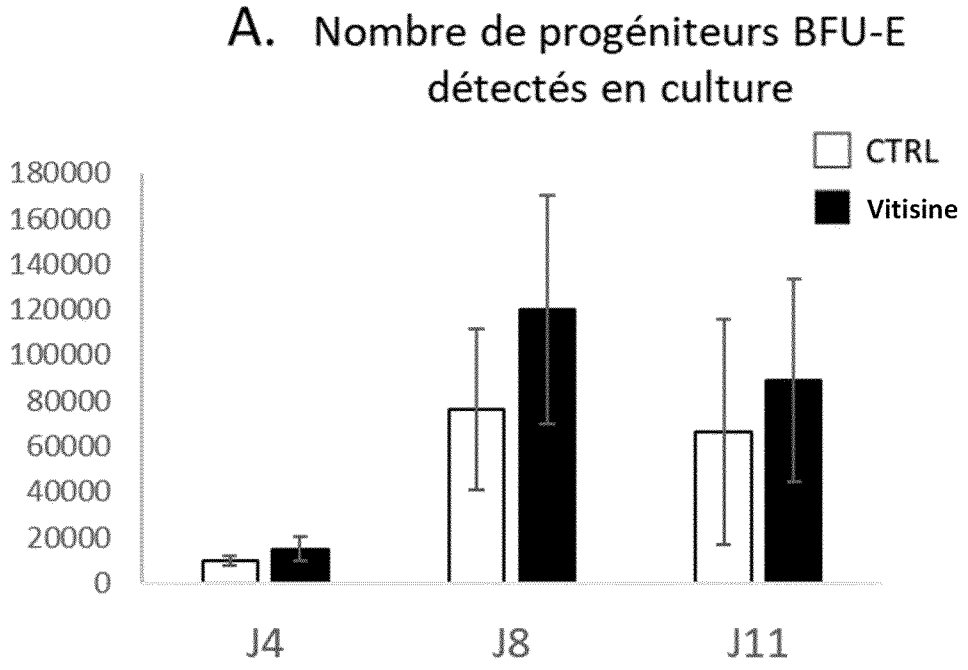
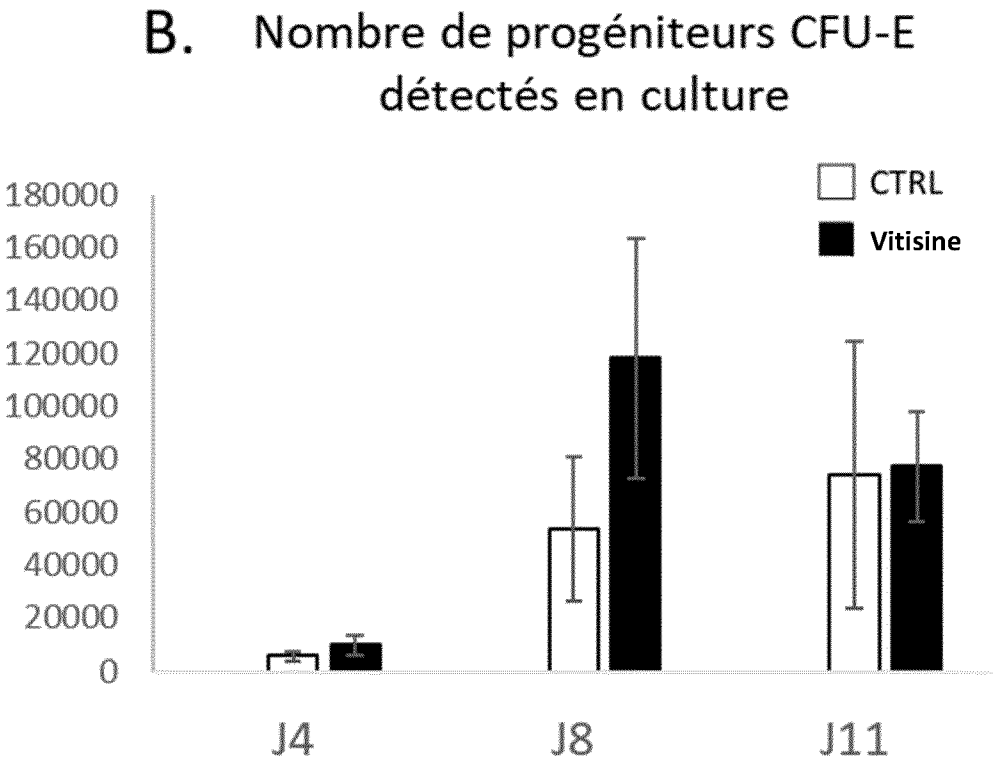


Figure 7


A. Nombre de progéniteurs BFU-E détectés en culture
CTRL
Vitisine
180000
160000
140000
120000
100000
80000
60000
40000
20000
0
J4
J8
J11


B. Nombre de progéniteurs CFU-E détectés en culture
CTRL
Vitisine
180000
160000
140000
120000
100000
80000
60000
40000
20000
0
J4
J8
J11

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/EP2023/070191

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 5/078(2010.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2019002625 A1 (FRANCAIS DU SANG ETS [FR]; INST NAT SANTE RECH MED [FR] ET AL.) 03 January 2019 (2019-01-03)	1-16
A	the whole document claims 1-26 page 18, line 21 - line 25	17-19
X	WO 2022089606 A1 (WESTLAKE THERAPEUTICS HANGZHOU CO LTD [CN]) 05 May 2022 (2022-05-05)	1,3-16
A	the whole document page 18, paragraph 0131 - page 19	2,17-19
X	WO 2022149166 A1 (CHRISTIAN MEDICAL COLLEGE [IN] ET AL.) 14 July 2022 (2022-07-14)	9-16
A	the whole document claims 1-4	1-8,17-19

☑ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☑ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
19 September 2023	**02 October 2023**

Name and mailing address of the ISA/EP	Authorized officer
European Patent Office **p.b. 5818, Patentlaan 2, 2280 HV Rijswijk** **Netherlands** Telephone No. **(+31-70)340-2040** Facsimile No. **(+31-70)340-3016**	**Zuber, Caroline** Telephone No.

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CHRISTOPHER ABISHA CRYSTAL ET AL. "Preferential Expansion of Human CD34 + CD133 + CD90 + Hematopoietic Stem Cells Enhances Gene-Modified Cell Frequency for Gene Therapy" , GB, Vol. 33, No. 3-4, 01 February 2022 (2022-02-01), pages 188-201, HUMAN GENE THERAPY, Retrieved from the Internet: https://www.liebertpub.com/doi/pdf/10.1089/hum.2021.089?casa_token=64i8r-005_oAAAAA:lxOijpNsriCBbVuiGYQIDO4r08LfeG4Hyd2fjp_-GvVkN3Pr2xjz0AIglnufsAFeNUMRfxeK3wUK DOI: 10.1089/hum.2021.089 ISSN: 1043-0342, XP093006686	9-16
A	the whole document	1-8,17-19
A	WO 2014028749 A2 (BOSTON MEDICAL CT CORP [US]; UNIV BOSTON [US]) 20 February 2014 (2014-02-20) the whole document paragraph [0232] - paragraph [0239]	1-19

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/EP2023/070191

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
WO 2019002625 A1	03 January 2019	AU 2018293389 A1	16 January 2020
		CA 3067551 A1	03 January 2019
		CN 111373029 A	03 July 2020
		EP 3645707 A1	06 May 2020
		FR 3068366 A1	04 January 2019
		JP 7162625 B2	28 October 2022
		JP 2020525031 A	27 August 2020
		KR 20200060343 A	29 May 2020
		US 2020370015 A1	26 November 2020
		WO 2019002625 A1	03 January 2019
WO 2022089606 A1	05 May 2022	CN 116568802 A	08 August 2023
		WO 2022089606 A1	05 May 2022
WO 2022149166 A1	14 July 2022	NONE	
WO 2014028749 A2	20 February 2014	AU 2013302512 A1	05 March 2015
		BR 112015003250 A2	14 February 2018
		CA 2882030 A1	20 February 2014
		CN 104919041 A	16 September 2015
		EP 2909313 A2	26 August 2015
		EP 3789483 A1	10 March 2021
		JP 6506689 B2	24 April 2019
		JP 2015528284 A	28 September 2015
		US 2014050711 A1	20 February 2014
		US 2015203819 A1	23 July 2015
		US 2015335680 A1	26 November 2015
		US 2015335682 A1	26 November 2015
		US 2018291344 A1	11 October 2018
		US 2022177845 A1	09 June 2022
		WO 2014028749 A2	20 February 2014

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°
PCT/EP2023/070191

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE

INV. C12N5/078
ADD.

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)
C12N

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)
EPO-Internal, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	WO 2019/002625 A1 (FRANCAIS DU SANG ETS [FR]; INST NAT SANTE RECH MED [FR] ET AL.) 3 janvier 2019 (2019-01-03)	1-16
A	le document en entier revendications 1-26 page 18, ligne 21 - ligne 25	17-19

X	WO 2022/089606 A1 (WESTLAKE THERAPEUTICS HANGZHOU CO LTD [CN]) 5 mai 2022 (2022-05-05)	1,3-16
A	le document en entier page 18, alinéa 0131 - page 19	2,17-19

X	WO 2022/149166 A1 (CHRISTIAN MEDICAL COLLEGE [IN] ET AL.) 14 juillet 2022 (2022-07-14)	9-16
A	le document en entier revendications 1-4	1-8, 17-19

	-/--	

[X] Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

[X] Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

"A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
"E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
"L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
"O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
"P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée
"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
"X" document particulièrement pertinent;; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
"Y" document particulièrement pertinent;; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
"&" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée	Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale
19 septembre 2023	02/10/2023

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale	Fonctionnaire autorisé
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Zuber, Caroline

2

Formulaire PCT/ISA/210 (deuxième feuille) (avril 2005)

C(suite). DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	CHRISTOPHER ABISHA CRYSTAL ET AL: "Preferential Expansion of Human CD34 + CD133 + CD90 + Hematopoietic Stem Cells Enhances Gene-Modified Cell Frequency for Gene Therapy", HUMAN GENE THERAPY , vol. 33, no. 3-4 1 février 2022 (2022-02-01), pages 188-201, XP093006686, GB ISSN: 1043-0342, DOI: 10.1089/hum.2021.089 Extrait de l'Internet: URL:https://www.liebertpub.com/doi/pdf/10.1089/hum.2021.089?casa_token=64i8r-005_oAAAAA:lxOijpNsriCBbVuiGYQIDO4r08LfeG4Hyd2fjp_-GvVkN3Pr2xjz0AIglnufsAFeNUMRfxeK3wUK	9-16
A	le document en entier	1-8, 17-19

A	WO 2014/028749 A2 (BOSTON MEDICAL CT CORP [US]; UNIV BOSTON [US]) 20 février 2014 (2014-02-20) le document en entier alinéa [0232] - alinéa [0239]	1-19

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande internationale n°

PCT/EP2023/070191

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 2019002625 A1	03-01-2019	AU 2018293389 A1	16-01-2020
		CA 3067551 A1	03-01-2019
		CN 111373029 A	03-07-2020
		EP 3645707 A1	06-05-2020
		FR 3068366 A1	04-01-2019
		JP 7162625 B2	28-10-2022
		JP 2020525031 A	27-08-2020
		KR 20200060343 A	29-05-2020
		US 2020370015 A1	26-11-2020
		WO 2019002625 A1	03-01-2019
WO 2022089606 A1	05-05-2022	CN 116568802 A	08-08-2023
		WO 2022089606 A1	05-05-2022
WO 2022149166 A1	14-07-2022	AUCUN	
WO 2014028749 A2	20-02-2014	AU 2013302512 A1	05-03-2015
		BR 112015003250 A2	14-02-2018
		CA 2882030 A1	20-02-2014
		CN 104919041 A	16-09-2015
		EP 2909313 A2	26-08-2015
		EP 3789483 A1	10-03-2021
		JP 6506689 B2	24-04-2019
		JP 2015528284 A	28-09-2015
		US 2014050711 A1	20-02-2014
		US 2015203819 A1	23-07-2015
		US 2015335680 A1	26-11-2015
		US 2015335682 A1	26-11-2015
		US 2018291344 A1	11-10-2018
		US 2022177845 A1	09-06-2022
		WO 2014028749 A2	20-02-2014