

⑫

BREVET D'INVENTION

B1

⑤④ **PROGENITEURS DE MEGACARYOCYTES CD34+CD41DIM ET LEURS UTILISATIONS
POUR PRODUIRE DES PLAQUETTES ET/OU DESáMK PORTANT DES PROPLAQUETTES.**

②② **Date de dépôt :** 23.07.15.

③③ **Priorité :**

④③ **Date de mise à la disposition du public
de la demande :** 27.01.17 Bulletin 17/04.

④⑤ **Date de la mise à disposition du public du
brevet d'invention :** 26.10.18 Bulletin 18/43.

⑤⑥ **Liste des documents cités dans le rapport de
recherche :**

Se reporter à la fin du présent fascicule

⑥⑥ **Références à d'autres documents nationaux
apparentés :**

○ **Demande(s) d'extension :**

⑦① **Demandeur(s) :** *ETABLISSEMENT FRANCAIS DU
SANG — FR.*

⑦② **Inventeur(s) :** STRASSEL CATHERINE, GACHET
CHRISTIAN, LANZA FRANCOIS et BROUARD
Nathalie.

⑦③ **Titulaire(s) :** INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET
DE LA RECHERCHE MEDICALE, UNIVERSITE DE
STRASBOURG Etablissement public.

⑦④ **Mandataire(s) :** LAVOIX.



PROGENITEURS DE MEGACARYOCYTES CD34⁺CD41^{DIM} ET LEURS UTILISATIONS
POUR PRODUIRE DES PLAQUETTES ET/OU DES MK PORTANT DES
PROPLAQUETTES

L'invention concerne un procédé pour produire des cellules progénitrices de mégacaryocytes (MK) CD34⁺CD41^{dim}, et une population cellulaire essentiellement pure de cellules précurseurs de mégacaryocytes obtenues par ledit procédé. L'invention concerne aussi un procédé pour produire des MK portant des proplaquettes et/ou des plaquettes utilisant les cellules CD34⁺CD41^{dim}.

ARRIERE-PLAN

Les plaquettes sanguines jouent un rôle crucial tant en physiologie qu'en pathologie, et il est par conséquent d'une importance majeure de comprendre les mécanismes contrôlant leur production. Chez les adultes, les plaquettes sont produites par des mégacaryocytes (MK) de moelle osseuse, qui proviennent eux-mêmes de cellules progénitrices et de cellules souches hématopoïétiques. La production in vitro de plaquettes pour transfusion a fait l'objet de nombreuses études ces dernières années. Des améliorations continues des conditions de culture en font un but réalisable, tout comme la génération récente de globules rouges humains transfusables. Néanmoins, nous sommes toujours incapables de reproduire efficacement le processus natif qui peut générer plus de 1000 plaquettes par MK (Reems JA et al., Transfusion medicine reviews. 2010 ; 24 : 33-43).

Un moyen pour améliorer la production de plaquettes in vitro pourrait consister à isoler et amplifier des progéniteurs de MK ayant une plus forte capacité à mûrir jusqu'au stade des proplaquettes. Dans la carte hiérarchique acceptée de l'hématopoïèse, les MK s'écartent d'un progéniteur d'érythroïdes/MK (MEP) bipotent commun (Chen L et al., Science. 2014 ; 345 : 1251033). Bien que l'existence d'un progéniteur de MK séparé ait été suggérée, aucun tel progéniteur univoque n'a encore été clairement identifié ou expansé à partir de cellules hématopoïétiques adultes humaines. De rares populations humaines qui s'avèrent avoir une capacité accrue à produire des MK portant des proplaquettes ont été observées, mais ces cellules n'ont pas été amplifiées ou évaluées pour la production de plaquettes in vitro (Debili N. et al., Blood. 1992 ; 80 : 3022-3035 ; Dercksen MW et al., Blood. 1995 ; 85 : 3313-3319 ; Norol F. et al., Blood. 1998 ; 91 : 830-843). En particulier, des cellules CD41 positives ont été décrites parmi les cellules CD34⁺ humaines isolées directement à partir de moelle osseuse ou après culture dans des conditions favorisant les MK (Debili N. et al., Blood. 1992 ; 80 : 3022-3035 ; Dercksen MW et al., Blood. 1995 ; 86 : 3771-3782). Toutefois, ces populations étaient fortement polyploïdes et incapables de proliférer (Dercksen MW et al., Blood. 1995 ;

86 : 3771-3782). Des cellules CD34⁺CD41⁺ ont aussi été observées après co-culture de cellules CD34⁺ dérivées de moelle osseuse sur des hMSC sans TPO, mais aucune preuve d'une sous-population de CD41^{dim} distincte n'a été apportée (Cheng L. et al., *Journal of cellular physiology*. 2000 ; 184 : 58-69). Des cellules ayant un phénotype CD34⁺CD41^{low} 5 représentant une population très mineure ont récemment été identifiées dans des cultures dérivées de sang périphérique, mais elles n'ont pas été davantage caractérisées (Debili et al., *Blood*, 2001, 97 (7), 2023-2030).

Classiquement, les MK humains sont différenciés en culture à partir de cellules CD34⁺, une population contenant des cellules souches hématopoïétiques et un mélange de cellules 10 progénitrices ayant divers potentiels. Depuis la disponibilité de la TPO, de nombreux protocoles ont été imaginés pour raffiner la différenciation des MK, utilisant des combinaisons par étapes de cytokines et de facteurs de croissance avec ou sans cellules stromales (Sullenbarger B. et al., *Experimental hematology*. 2009 ; 37 : 101-110 ; Panuganti S. et al. *Tissue engineering Part A*. 2013 ; 19 : 998-1014 ; Pineault N. et al., *Cytotherapy*. 15 2011 ; 13 : 467-480). En résultat, des améliorations ont été rapportées dans l'aptitude à augmenter le nombre de cellules CD34⁺ participantes et à différencier des MK, mis en évidence par leur taille et leur ploïdie plus élevées, l'apparition de marqueurs spécifiques des plaquettes (CD41 et CD42), et leur capacité à produire des proplaquettes. En dépit de ce progrès, le pourcentage de MK atteignant le stade des proplaquettes reste faible, et la 20 production de plaquettes est bien inférieure à celle de MK différenciés in situ dans la moelle osseuse.

Des bases de données transcriptomiques ont révélé que le récepteur d'hydrocarbures aromatiques (AhR) est bien exprimé tout le long de la voie conduisant aux MK (HSC, CMP, MEP et MK) (Smith BW et al., *Blood*. 2013 ; 122 : 376-385). Il a en outre été rapporté que 25 StemRegenin 1 (SR1), un antagoniste d'AhR de forte affinité récemment développé, favorise l'expansion de cellules progénitrices hématopoïétiques (HPC) (Boitano AE et al., *Science*. 2010 ; 329 : 1345-1348).

Des procédés pour la production in vitro de MK ou de plaquettes à partir de cellules souches hématopoïétiques, comprenant une étape de mise en contact avec des 30 modulateurs d'AhR, ont été divulgués.

Le document WO 2012/129109 divulgue un procédé en trois étapes ex vivo pour produire des plaquettes, qui comprend une première étape de génération d'une population de cellules progénitrices de mégacaryocytes par culture de cellules souches en présence d'une pluralité de facteurs de croissance choisis dans un groupe de 29 facteurs de 35 croissance ou familles de facteurs de croissance, comprenant SR1, et co-culture avec des cellules souches mésenchymateuses. Le procédé comprend en outre la maturation des

cellules progénitrices de mégacaryocytes ayant proliféré dans des conditions de plus forte concentration d'oxygène et en présence d'une pluralité de facteurs de croissance, et la culture des mégacaryocytes matures dans une matrice tridimensionnelle, dans des conditions de plus forte concentration d'oxygène et en présence d'une pluralité de facteurs de croissance, pour produire des plaquettes.

Le document WO 2014/028749 divulgue un procédé pour produire une cellule progénitrice de mégacaryocytes/érythroïdes (MEP), comprenant la différenciation d'une cellule précurseur de MEP en une MEP en culture en présence d'un modulateur d'Ahr. Le procédé comprend en particulier la culture de cellules précurseurs de MEP en présence d'un antagoniste d'AHR, et ensuite la culture de cellules précurseurs de MEP en présence d'un agoniste d'AHR.

Le document WO 2014/138485 divulgue un procédé en deux étapes ex vivo, qui comprend une première étape de génération de mégacaryocytes par différenciation dirigée de cellules souches hématopoïétiques et de cellules progénitrices (HSPC), utilisant un antagoniste de récepteur de facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGFR) et une combinaison de cytokines TPO, IL-6, Flt3-L et SCF, et une deuxième étape qui favorise la biogenèse des plaquettes à partir des mégacaryocytes, utilisant un antagoniste d'Ahr et de la TPO, de l'IL-6, du Flt3-L et du SCF, ou un antagoniste d'Ahr et de la TPO, et éventuellement en outre un inhibiteur de métalloprotéinase de matrice (MMP).

RESUME DE L'INVENTION

L'invention concerne un procédé ex vivo pour produire des plaquettes et/ou des mégacaryocytes (MK) portant des proplaquettes, comprenant

a) la culture d'une population isolée de cellules $CD34^+CD41^{dim}$ de progéniteurs de MK dans un milieu de culture sans sérum comprenant de la thrombopoïétine (TPO), en présence d'un antagoniste du récepteur d'hydrocarbures aromatiques (AhR) ou par co-culture avec des cellules stromales mésenchymateuses humaines (hMSC), pendant un temps suffisant pour obtenir une population de cellules comprenant des plaquettes et/ou des MK portant des proplaquettes ; et

b) la collecte de ladite population de cellules comprenant des plaquettes et/ou des MK portant des proplaquettes.

L'invention met en outre à disposition un procédé pour produire des cellules progénitrices de mégacaryocytes (MK) comprenant :

a0) la culture de cellules souches hématopoïétiques (HSC) dans un milieu de culture sans sérum comprenant de la lipoprotéine de basse densité (LDL), du facteur des cellules

souches (SCF), de la TPO, de l'IL-6 et de l'IL-9, en présence d'un antagoniste du récepteur d'hydrocarbures aromatiques (AhR) ou par co-culture avec des cellules stromales mésenchymateuses humaines (hMSC), pendant un temps suffisant pour obtenir une population de cellules comprenant des cellules CD34⁺CD41^{dim} ; et

a1) l'isolation desdites cellules CD34⁺CD41^{dim} à partir de ladite population de cellules.

Dans un autre aspect, l'invention concerne une population cellulaire essentiellement pure de progéniteurs de mégacaryocytes (MK), dans laquelle au moins 80 % des cellules dans la population sont des cellules CD34⁺CD41^{dim}.

Il est également mis à disposition une composition comprenant une population cellulaire de plaquettes et/ou de mégacaryocytes (MK) portant des proplaquettes et un tampon de perfusion pour utilisation en transfusion, dans laquelle ladite utilisation comprend la préparation de plaquettes et/ou de mégacaryocytes (MK) portant des proplaquettes par un procédé selon l'invention.

DESCRIPTION DETAILLEE DE L'INVENTION

Les inventeurs ont trouvé que SR1, un antagoniste d'AhR, a amélioré significativement la production d'éléments analogues à des plaquettes et de MK portant des proplaquettes dans une culture en deux étapes de cellules souches hématopoïétiques (HSC) de sang périphérique. Ce qui est plus important est que la culture avec SR1 conduit à un enrichissement d'une population de CD34⁺CD41^{dim} qui, suite à un tri cellulaire, présente une capacité sans précédent à mûrir jusqu'au stade des proplaquettes.

On a observé un enrichissement similaire de cellules CD34⁺CD41^{dim} présentant un potentiel mégacaryocytaire similaire dans des HSC co-cultivées avec des cellules souches mésenchymateuses (MSC) humaines. Une co-culture avec des MSC, tout comme le traitement au SR1, conduit à une répression de l'AhR.

De plus, les effets de SR1 et des MSC sont tous deux empêchés par un agoniste d'AhR, ce qui indique que l'amplification de précurseurs mégacaryocytaires de CD34⁺CD41^{dim} se déroule par répression de la voie d'AhR.

Production de cellules progénitrices de mégacaryocytes (MK)

L'invention met à disposition un procédé pour produire des cellules progénitrices de mégacaryocytes (MK) comprenant :

a0) la culture de cellules souches hématopoïétiques (HSC) dans un milieu de culture sans sérum comprenant de la lipoprotéine de basse densité (LDL), du facteur des

cellules souches (SCF), de la TPO, de l'IL-6 et de l'IL-9, en présence d'un antagoniste du récepteur d'hydrocarbures aromatiques (AhR) ou par co-culture avec des cellules stromales mésenchymateuses humaines (hMSC), pendant un temps suffisant pour obtenir une population de cellules comprenant des cellules CD34⁺CD41^{dim} ; et

5 a1) l'isolation desdites cellules CD34⁺CD41^{dim} à partir de ladite population de cellules.

Les "cellules souches hématopoïétiques" (HSC), telles qu'utilisées ici, désignent des cellules sanguines immatures ayant la capacité de s'auto-renouveler et de se différencier en cellules sanguines plus matures, comprenant les granulocytes, les érythrocytes, les plaquettes, et les monocytes. Les HSC sont décrites de façon interchangeable comme étant des cellules souches dans toute la description. Dans un mode de réalisation, les HSC sont des cellules CD34⁺. Il est supposé que les cellules CD34⁺ comprennent une sous-population de cellules ayant les propriétés des cellules souches définies ci-dessus. Il est bien connu dans la technique que les HSC comprennent des cellules souches pluripotentes, des cellules souches multipotentes (par exemple une cellule souche lymphoïde), et/ou des cellules souches dédiées à des lignées hématopoïétiques spécifiques. Les sources de HSC comprennent la moelle osseuse non fractionnée, le cordon ombilical, et le sang périphérique. Par exemple, les cellules de sang périphérique normales peuvent être mobilisées avec du G-CSF [cellules de leucaphérèse (LK)], et les cellules CD34⁺ sont isolées des cellules LK par sélection cellulaire. Les HSC comprennent aussi des cellules souches pluripotentes induites (iPS) dédiées à la lignée hématopoïétique. Les cellules iPS sont bien connues de l'homme du métier. A titre d'exemple, des cellules iPS peuvent être obtenues en suivant les enseignements de Takahashi & Yamanaka (2006) Cell 126 : 663-676 et de Yamanaka et al. (2007) Nature 448 : 313-317. De préférence, les HSC sont des cellules humaines.

25 La population de HSC de départ peut de préférence contenir au moins 60 % de cellules CD34⁺, dans certains modes de réalisation plus de 80 % de cellules CD34⁺, ou même plus de 90 % de cellules CD34⁺. La population de HSC de départ peut comprendre entre 10⁵ et 10⁹ cellules nucléées.

Pour la mise en culture, les HSC sont typiquement ensemencées à une densité cellulaire de 1 à 10 x 10⁴ par ml de milieu de culture, par exemple de 2 à 6 x 10⁴ par ml.

Tel qu'utilisé ici dans toute la présente demande, un "milieu de culture" désigne un "milieu de base" qui est complété avec un mélange de cytokines, de facteurs de croissance, et d'antagoniste d'AhR qui est spécifié à chaque étape du procédé. De préférence, le milieu de base n'est pas complété avec, c'est-à-dire que le milieu de culture ne comprend pas, de quelconque composant additionnel en plus du mélange de cytokines, de facteurs de croissance, et d'antagoniste d'AhR qui est spécifié à chaque étape.

De préférence, des cytokines et des facteurs de croissance humains sont utilisés dans le cadre de l'invention.

Un "milieu de base" est un milieu sans sérum synthétique qui comprend typiquement des acides aminés, des sources de carbone, des vitamines, des protéines sériques (par exemple l'albumine), des sels inorganiques, des cations divalents, des tampons et tout autre élément utilisable dans la culture de cellules, et des HSC en particulier. Le milieu de base peut typiquement contenir ou être complémenté avec des antibiotiques destinés à empêcher une contamination durant la culture des cellules, et de la glutamine. Les facteurs de croissance et les cytokines ne sont typiquement pas présents dans un milieu de base.

Des exemples d'un tel milieu de base approprié pour un procédé de culture de HSC comprennent, sans s'y limiter, le milieu d'expansion sans sérum (SFEM) StemSpan™ (StemCell Technologies, Vancouver, Canada), le milieu défini H3000 StemSpan® (StemCell Technologies, Vancouver, Canada), CellGro® SCGM.

Le milieu d'expansion sans sérum (SFEM) StemSpan™ a été développé pour la culture et l'expansion in vitro de cellules hématopoïétiques humaines. Ce milieu contient de la sérumalbumine bovine pré-testée, de l'insuline et de la transferrine, et des suppléments dans du milieu MDM d'Iscove. Les facteurs de croissance hématopoïétiques recombinés, requis pour une croissance et une expansion optimales des cellules hématopoïétiques, ne sont pas présents dans le SFEM StemSpan™.

Pour la production des cellules progénitrices de MK, le milieu de base est complémenté avec de la lipoprotéine de basse densité (LDL), du facteur des cellules souches (SCF), de la TPO, de l'IL-6 et de l'IL-9.

Dans un mode de réalisation, le milieu de culture comprend du CSF, de la TPO, de l'IL-6 et de l'IL-9, présents chacun à une concentration de 1 à 100 ng/ml, telle que 25 à 100 ng/ml, en particulier 10 à 50 ng/ml, 40 à 50 ng/ml, ou 20 à 30 ng/ml.

Le milieu de base est de préférence complémenté avec 1 à 40 µg/ml de LDL, par exemple 10 à 30 µg/ml, ou 15 à 25 µg/ml.

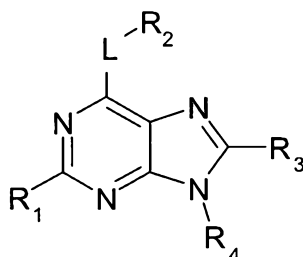
En particulier, le milieu de culture peut comprendre 10 à 30 µg/ml de LDL, 25 à 100 ng/ml de SCF, 40 à 50 ng/ml de TPO, 20 à 30 ng/ml d'IL-6, et 20 à 30 ng/ml d'IL-9.

Dans un mode de réalisation, les SCF, TPO, IL-6 et IL-9 sont ajoutés au milieu de base par addition du supplément d'expansion de mégacaryocytes StemSpan™ (antérieurement connu sous l'appellation CC220) (StemCell Technologies, Vancouver, Canada). Le supplément d'expansion de mégacaryocytes StemSpan™ est fourni sous la forme d'un concentré 100X et il contient une combinaison de cytokines humaines recombinantes (SCF, IL-6, IL-9 et TPO) formulée pour favoriser sélectivement l'expansion et la différenciation de

cellules progénitrices de mégacaryocytes humains dans des cultures liquides initiées avec des cellules CD34+ de sang de cordon ombilical (CB) ou de moelle osseuse (BM).

- 5 La culture de HSC pour produire une population cellulaire comprenant des cellules CD34⁺CD41^{dim} se déroule en outre en présence d'un antagoniste du récepteur d'hydrocarbures aromatiques (AhR) ou par co-culture avec des cellules stromales mésenchymateuses humaines (hMSC).

Dans un mode de réalisation, l'antagoniste d'AhR est un composé synthétique ajouté au milieu de base, qui est de formule (I) :



10

ou un sel pharmaceutiquement acceptable, ou encore un stéréoisomère de celui-ci ;
formule dans laquelle

15

L est choisi parmi $-NR_{5a}(CH_2)_{2-3}-$, $-NR_{5a}(CH_2)_2NR_{5b}-$, $-NR_{5a}(CH_2)_2S-$, $-NR_{5a}CH_2CH(OH)-$ et $-NR_{5a}CH(CH_3)CH_2-$; où R_{5a} et R_{5b} sont indépendamment choisis parmi l'hydrogène et les radicaux alkyle en C_1 à C_4 ;

20

R_1 est choisi parmi les radicaux thiophényle, furanyle, benzimidazolyle, isoquinolinyne, imidazopyridinyle, benzothiophényle, pyrimidinyle, pyrazolyle, pyridinyle, imidazolyle, pyrrolidinyle, pyrazinyle, pyridazinyle, pyrrolyle et thiazolyle ; où lesdits thiophényle, furanyle, benzimidazolyle, isoquinolinyne, imidazopyridinyle, benzothiophényle, pyrimidinyle, pyrazolyle, pyridinyle, imidazolyle, pyrrolidinyle, pyrazinyle, pyridazinyle, pyrrolyle et thiazolyle de R_1 sont éventuellement substitués par 1 à 3 radicaux indépendamment choisis parmi halogéno, cyano, alkyle en C_1 à C_4 , halogénoalkyle en C_1 à C_4 , alcoxy en C_1 à C_4 , $-S(O)_{0-2}R_{8a}$, et $-C(O)OR_{8a}$, où R_{8a} est choisi parmi l'hydrogène et les radicaux alkyle en C_1 à C_4 ;

25

R_2 est choisi parmi $-S(O)_2NR_{6a}R_{6b}$, $-NR_{6a}C(O)NR_{6b}R_{6c}$, phényle, pyrrolopyridinyle, indolyle, thiophényle, pyridinyle, triazolyle, 2-oxoimidazolidinyle, pyrazolyle, et indazolyle ; où

R_{6a} , R_{6b} et R_{6c} sont indépendamment choisis parmi l'hydrogène et les radicaux alkyle en C_1 à C_4 ;

et

30

ledit phényle, pyrrolopyridinyle, indolyle, thiophényle, pyridinyle, triazolyle, oxoimidazolidinyle, pyrazolyle, ou indazolyle de R_2 est éventuellement substitué par 1 à 3 radicaux indépendamment choisis parmi hydroxy, halogéno,

8

méthyle, méthoxy, amino, $-O(CH_2)_nNR_{7a}R_{7b}$, $-OS(O)_2NR_{7a}R_{7b}$ et $-NR_{7a}S(O)_2R_{7b}$; où R_{7a} and R_{7b} sont indépendamment choisis parmi l'hydrogène et les radicaux alkyle en C_1 à C_4 ;

R_3 est choisi parmi l'hydrogène et les radicaux alkyle en C_1 à C_4 et biphenyle ; et

5 R_4 est choisi parmi les radicaux alkyle en C_1 à C_{10} , alcényle en C_1 à C_4 , oxétanyle, tétrahydrofuranyle, cyclohexyle, (oxopyrrolidinyl)éthyle, tétrahydropyranyle, phényle, et benzyle, où lesdits alkyle en C_1 à C_{10} , alcényle en C_1 à C_4 , oxétanyle, tétrahydrofuranyle, cyclohexyle, (oxopyrrolidinyl)éthyle, tétrahydropyranyle, phényle, et benzyle de R_4 peuvent être éventuellement substitués par 1 à 3 radicaux indépendamment choisis parmi hydroxy, 10 alkyle en C_1 à C_4 et halogénoalkyle en C_1 à C_4 .

Dans un mode de réalisation, l'antagoniste d'Ahr de formule (I) est StemRegenin 1 (SR1), c'est-à-dire le 4-(2-(2-(benzo[b]thiophén-3-yl)-9-isopropyl-9H-purin-6-ylamino)éthyl)phénol.

15 Durant l'étape a0), l'antagoniste d'Ahr est typiquement présent dans le milieu de culture à une concentration de 10 nM à 10 μ M, par exemple de 100 nM à 7,5 μ M, en particulier de 1 à 5 μ M.

20 Dans un autre mode de réalisation, les HSC sont co-cultivées avec des cellules stromales mésenchymateuses humaines (hMSC) dans le milieu de culture comprenant de la LDL, du SCF, de la TPO, de l'IL-6 et de l'IL-9. Comme le montrent les inventeurs dans l'exemple qui suit, l'effet de la co-culture avec des hMSC est inversé par l'addition de l'agoniste d'Ahr FICZ, et la co-culture avec des hMSC diminue considérablement la transcription de CYP1B1, une cible en aval d'Ahr. Ces résultats étayent donc qu'une co-culture avec des hMSC a un effet antagoniste sur la voie d'Ahr.

25 Conformément à un mode de réalisation, lesdites hMSC sont obtenues par un procédé comprenant :

- i) l'isolation de cellules mononucléaires de moelle osseuse (BM-MNC) à partir d'un sujet humain en bonne santé par gradient de densité Ficoll ;
- ii) l'ensemencement des BM-MNC isolées dans un milieu de culture comprenant 30 5 à 15 % de sérum de veau fœtal et 0,5 à 5 ng/ml de facteur 2 de croissance des fibroblastes (FGF-2), par exemple 1 ng/ml de FGF-2 ;
- iii) la culture des cellules ensemencées pendant deux jours, la mise au rebut des cellules non adhérentes et l'ensemencement des cellules adhérentes collectées ;
- 35 iv) la culture des cellules adhérentes dans un milieu de culture comprenant 10 % de sérum de veau fœtal et 0,5 à 5 ng/ml de FGF-2 (par exemple 4 ng/ml),

avec remplacement du milieu de culture deux fois par semaine par du milieu de culture frais jusqu'à confluence ; et

- v) la récolte des hMSC, l'ensemencement et la culture des cellules récoltées jusqu'à confluence dans un milieu de culture comprenant 10 % de sérum de veau fœtal et 0,5 à 5 ng/ml de FGF-2.

A l'étape ii), les BM-MNC sont ensemencées par exemple à une densité cellulaire de 10^4 cellules/cm².

La récolte des hMSC est effectuée typiquement en utilisant de la trypsine. Les cellules sont ensuite typiquement ensemencées à une densité cellulaire de 500 cellules/cm² et elles sont cultivées jusqu'à confluence (premier passage, P1). Les hMSC présentent une absence d'expression de CD45, CD14, CD34 et CD31, conjointement avec une forte expression de CD73, CD90 et CD105.

Les hMSC peuvent être maintenues dans un milieu de culture comprenant 10 % de sérum de veau fœtal et 0,5 à 5 ng/ml de FGF-2, par exemple 2 ng/ml de FGF-2.

Les hMSC sont utilisées dans une couche confluite et les cellules CD34⁺ sont typiquement ajoutées à la densité cellulaire spécifiée ci-dessus.

Le milieu de culture utilisé pour la production et le maintien des hMSC est n'importe quel milieu de culture convenant pour la culture de cellules mésenchymateuses, tel qu' α -MEM.

Pour produire des cellules progénitrices de MK, dans l'étape a0), la culture des HSC est menée pendant 6 à 8 jours, de préférence 7 jours.

Les cultures sont typiquement incubées à 37°C, dans des conditions normoxiques (c'est-à-dire 20-21 % d'O₂) et avec 5 % de CO₂.

A la fin de la période de culture, la culture comprend des cellules CD34⁺CD41^{dim} qui sont isolées à partir de la culture cellulaire par tout procédé convenable connu de l'homme du métier.

Typiquement, les cellules en suspension sont récoltées et lavées avec un tampon convenable tel que le PBS.

Des procédés pour isoler la population de cellules CD34⁺CD41^{dim}, basés sur les marqueurs CD34 et CD41, utilisent une cytométrie en flux, plus spécifiquement une technologie de tri cellulaire activé par fluorescence (FACS). A cette fin, les cellules en suspension récoltées à partir de la culture cellulaire sont incubées avec un mélange d'anticorps anti-CD34 et anti-CD41 marqués. L'incubation peut typiquement être effectuée pendant 20 à 40 minutes à 4°C. Les cellules sont ensuite lavées avant tri cellulaire par FACS.

Seules les cellules CD34⁺CD41^{dim} viables sont sélectionnées à partir de la population cellulaire récoltée. Conformément à ce mode de réalisation, les cellules lavées sont encore incubées avec un marqueur fluorescent de viabilité cellulaire, tel que la 7-aminoactinomycine D (7-AAD) ou Hoechst, qui sont des marqueurs d'ADN. L'incubation est typiquement effectuée pendant 20 à 40 minutes à 4°C. Les cellules sont ensuite lavées avant tri cellulaire par FACS.

Les grilles de morphologie et de tri FACS sont typiquement positionnées comme suit :

- CD34 : de $10^{0.2}$ à $10^{1.2}$;
- CD41 : de $\log 10^1$ à $\log 10^2$.

La population de cellules CD34⁺CD41^{dim} peut être facilement identifiée puisqu'une culture en présence d'un antagoniste d'Ahr, tel que SR1, conduit à une population de cellules CD34⁺CD41⁺ présentant une intensité de fluorescence moyenne inférieure aux conditions témoins et qui peut être identifiée comme représenté sur la Figure 10.

Les cellules CD34⁺CD41^{dim} sélectionnées sont caractérisées par l'une quelconque des caractéristiques suivantes, ou leur combinaison :

- une petite taille, typiquement FSC : 200-400, SSC : 200 ;
- une faible ploïdie, typiquement 2n-4n ;
- une forte capacité de maturation en MK purs ; typiquement, une cellule CD34⁺CD41^{dim} peut générer 2 à 3 MK.

Le procédé décrit ici produit au moins 150 000 cellules CD34⁺CD41^{dim} par HSC ensemencée, en particulier par cellule CD34⁺.

L'invention concerne en outre une population cellulaire essentiellement pure de progéniteurs de MK, dans laquelle au moins 80 %, de préférence au moins 85 %, 90 %, 95 % des cellules de la population sont des cellules CD34⁺CD41^{dim}.

Dans un mode de réalisation, ladite population cellulaire essentiellement pure de progéniteurs de MK comprend au moins 150 000 cellules CD34⁺CD41^{dim}.

Ladite population cellulaire essentiellement pure de progéniteurs de MK peut être obtenue, ou est obtenue, par le procédé de production de cellules progénitrices de mégacaryocytes (MK).

Production de plaquettes et/ou de mégacaryocytes (MK) portant des proplaquettes

L'invention met en outre à disposition un procédé pour produire des plaquettes et/ou des mégacaryocytes (MK) portant des proplaquettes, comprenant :

- c) la culture de ladite population isolée de cellules CD34⁺CD41^{dim} de progéniteurs de MK dans un milieu de culture sans sérum comprenant de la thrombopoïétine (TPO), en

présence d'un antagoniste du récepteur d'hydrocarbures aromatiques (AhR) ou par co-culture avec des cellules stromales mésenchymateuses humaines (hMSC), pendant un temps suffisant pour obtenir une population de cellules comprenant des plaquettes et/ou des MK portant des proplaquettes ; et

- 5 d) la collecte de ladite population de cellules comprenant des plaquettes et/ou des MK portant des proplaquettes.

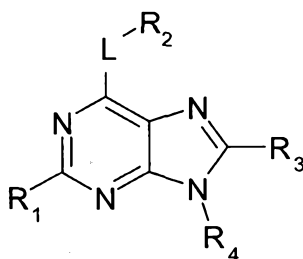
10 Pour la culture, les cellules $CD34^+CD41^{dim}$ sont typiquementensemencées à une densité cellulaire de 1 à 10×10^4 par ml de milieu de culture sans sérum, par exemple 2 à 6×10^4 par ml.

Pour la production de plaquettes et/ou de MK portant des proplaquettes, le milieu de base est complété avec de la TPO et la culture se déroule en présence d'un antagoniste d'AhR.

15 Les expressions "milieu de culture sans sérum", "milieu de base" et "antagoniste du récepteur d'hydrocarbures aromatiques(AhR)" sont telles que définies précédemment.

Dans un mode de réalisation, le milieu de culture comprend 20 à 100 ng/ml de TPO, de préférence 25 à 65 ng/ml, mieux encore 40 à 60 ng/ml.

Dans l'étape a), un antagoniste d'AhR, en particulier un composé de formule (I) :



20 telle que définie ci-dessus, ou une co-culture avec des hMSC, est utilisé indépendamment de l'antagoniste d'AhR ou de la co-culture avec des hMSC, utilisé dans l'étape a0) pour produire des cellules $CD34^+CD41^{dim}$.

Par conséquent, pris tous ensemble, les modes de réalisation suivants sont envisagés par l'invention :

- 25 - dans les deux étapes a0) et a), un antagoniste d'AhR est utilisé, en particulier un composé de formule (I), ou une co-culture avec des hMSC est effectuée;
- dans l'étape a0), un antagoniste d'AhR est utilisé, en particulier un composé de formule (I), tandis que dans l'étape a) une co-culture avec des hMSC est effectuée; et
- dans l'étape a0), une co-culture avec des hMSC est effectuée, et dans l'étape a), un
- 30 antagoniste d'AhR est utilisé, et en particulier un composé de formule (I).

Les cultures sont typiquement incubées à 37°C dans des conditions normoxiques (c'est-à-dire 20 à 21 % d'O₂) et avec 5 % de CO₂.

Dans un mode de réalisation, l'étape a) de culture se déroule pendant 5 à 9 jours, de préférence pendant 6 à 8 jours, mieux encore pendant environ 7 jours.

5 A la fin de la période de culture, les cellules en suspension sont récoltées à partir de la culture, et des plaquettes et/ou des MK portant des proplaquettes présents dans la culture cellulaire sont ainsi collectés.

Les MK portant des proplaquettes peuvent être identifiés par microscopie avec contraste de phases, par détection des cellules rondes et portant des proplaquettes.

10

Dans un mode de réalisation, le procédé comprend en outre la sélection de cellules CD41/CD61+ et CD42c+ à partir de la population cellulaire collectée comprenant des plaquettes et/ou des MK portant des proplaquettes. Les plaquettes ou les particules analogues à des plaquettes sont identifiées comme des événements positifs doubles CD41

15

et CD42c, ayant les mêmes propriétés de diffusion que les plaquettes sanguines humaines. Après tri cellulaire basé sur les marqueurs CD41 et CD42c, la population de cellules comprenant des plaquettes et/ou des MK portant des proplaquettes comprend typiquement au moins 75 %, de préférence 80 %, 85 %, 90 %, 92 % ou 95 % de plaquettes et/ou MK portant des proplaquettes.

20

De préférence, la population de cellules comprenant des plaquettes et/ou des MK portant des proplaquettes comprend au moins 50 000 cellules CD41+ CD42c+, obtenues à partir de 20 000 cellulesensemencées CD34⁺CD41^{dim}. Environ 90 % des MK produits par utilisation d'un antagoniste d'Ahr tel que SR1, et environ 50 % des MK produits par utilisation d'une co-culture avec des hMSC, sont des MK portant des proplaquettes.

25

Le procédé décrit ici produit donc au moins 2, de préférence au moins 2,5, par exemple 2,7 MK portant des proplaquettes par cellule CD34⁺CD41^{dim}ensemencée. On obtient environ 1.10⁶ plaquettes à partir de 20 000 cellules CD34⁺CD41^{dim}, donc environ 50 plaquettes par cellule CD34⁺CD41^{dim}ensemencée.

30

Le procédé pour produire des plaquettes et/ou des MK portant des proplaquettes peut en outre comprendre un lavage des plaquettes et/ou des MK portant des proplaquettes collectés, et la mise en suspension des cellules lavées dans un tampon de perfusion.

35

Cela peut facilement être réalisé en culottant les cellules par centrifugation, par exemple pendant 10 minutes à 1000 g, et en remettant les cellules en suspension dans du tampon de perfusion, par exemple du HSA à 5 % (Baxter) à une concentration comprise entre 10⁷ et 10¹⁰ plaquettes et/ou MK portant des proplaquettes par ml.

Le procédé de l'invention peut produire des plaquettes d'une manière spécifique du patient par utilisation de cellules CD34+ appariées à un HLA.

Compositions et traitements thérapeutiques

L'invention concerne en outre une composition comprenant une population cellulaire de plaquettes et/ou de mégacaryocytes (MK) portant des proplaquettes, en particulier de cellules CD41 et CD42c+, et un tampon de perfusion pouvant être obtenu, ou obtenu, par le procédé de l'invention.

L'invention concerne aussi ladite composition pour son utilisation pour une transfusion allogénique ou autologue. Dans un mode de réalisation, dans la composition pour utilisation en transfusion, ladite utilisation comprend la préparation de plaquettes et/ou de mégacaryocytes (MK) portant des proplaquettes par un procédé selon l'invention.

Il est en outre mis à disposition un procédé de transfusion d'un patient en ayant besoin, qui comprend :

- a) la préparation d'une composition comprenant une population cellulaire de plaquettes et/ou de mégacaryocytes (MK) portant des proplaquettes et un tampon de perfusion par le procédé de l'invention ;
- b) la transfusion de ladite composition à un patient en ayant besoin.

Le sujet selon l'invention est un mammifère, tel qu'un rongeur, un canidé, un félin ou un primate. De préférence, le sujet est un humain.

Le nombre de cellules transfusées prend typiquement en considération des facteurs tels que le sexe, l'âge, le poids, le type de maladie ou trouble, le stade du trouble, le pourcentage des cellules souhaitées dans la population cellulaire et la quantité de cellules nécessaire pour produire un bénéfice thérapeutique. Dans un mode de réalisation particulier, la composition est administrée par perfusion intraveineuse et comprend au moins 10^8 plaquettes/kg, de 10^9 à 10^{10} plaquettes/kg ou plus si nécessaire. Une dose de perfusion est typiquement d'environ 3 à 5×10^{11} plaquettes.

L'invention va être davantage illustrée au vu des figures et exemples qui suivent.

FIGURES

Figure 1 : Préservation de l'expression de CD34 dans des MK cultivés en présence de SR1. (A) Protocole de différenciation de MK. Des cellules CD34⁺ de sang périphérique ont été cultivées en l'absence (Ctrl) ou en présence de SR1 (1 μ M) dans un milieu sans sérum contenant un cocktail de cytokines CC220 du jour 0 au jour 7 et avec de la TPO (30 ng/ml) du jour 7 au jour 14. **(B) Niveau de prolifération.** Les cellules viables ont

été comptées les jours 7 et 10 de la culture au moyen d'un compteur de cellules automatique et le facteur d'augmentation par rapport à l'introduction de cellules CD34⁺ le jour 0 a été calculé. **(C) Proportion de cellules CD34⁺.** La proportion de cellules CD34⁺ a été déterminée les jours indiqués par cytométrie en flux après marquage avec un mAb anti-CD34 conjugué à R-PE-Cy5. Les expériences ont été effectuées au moins trois fois (moyenne \pm erreur-type sur la moyenne (SEM) ; ANOVA bilatérale et post-test de Bonferroni, n.s. $P > 0,05$, *** $P < 0,001$).

Figure 2 : Production accrue de proplaquettes et d'éléments analogues à des plaquettes en présence de SR1. Des cellules CD34⁺ ont été cultivées comme pour la Figure 1A et des analyses ont été effectuées le jour 14. **(A)** Quantification du pourcentage de MK étendant des proplaquettes ($34,6 \pm 2,1$ % avec SR1 contre $11,5 \pm 4,5$ % pour le témoin ; moyenne \pm SEM de 3 expériences ; test t de Student * $P < 0,05$). **(B) Libération des plaquettes.** La suspension cellulaire a été soumise à de multiples pipetages et les éléments analogues à des plaquettes ont été détectés et comptés par cytométrie en flux. *Cadre supérieur* : stratégie de tri représentative basée sur les propriétés de diffusion vers l'avant et latérale et l'expression de CD41/CD42 des cellules. *Cadre inférieur* : nombre d'éléments analogues à des plaquettes par cellule ensemencée au jour 7 ($7,92 \pm 3,25$ pour le témoin contre $20,72 \pm 5,19$ avec SR1 $1 \mu\text{M}$ contre $0,20 \pm 0,04$ avec l'agoniste d'AHR FICZ $0,2 \mu\text{M}$), moyenne \pm SEM de 3 à 5 expériences ; ANOVA bilatérale et post-test de Bonferroni, n.s. $P > 0,05$).

Figure 3 : Emergence d'une population CD34⁺CD41^{dim} en présence de SR1. Des cellules CD34⁺ ont été cultivées comme pour la Figure 1A et des analyses ont été effectuées les jours 7 et 10. **(A) Evolution de l'expression de CD34 et CD41.** Tracés de points de cytométrie en flux représentatifs en l'absence (Ctrl) ou en présence de SR1. Le jour 7, ont été observées trois populations principales qui étaient CD34⁺CD41⁻ (violet), CD34⁺CD41⁺ (rouge) et CD34⁻CD41⁺ (bleu) et qui représentaient respectivement $23,1 \pm 1,3$ %, $59,9 \pm 2,3$ % et $9,7 \pm 1,1$ % de la composition totale pour le témoin, contre $22,4 \pm 1,5$ %, $68,9 \pm 1,8$ % et $3,6 \pm 0,3$ % en présence de SR1. Le jour 10, les deux populations principales étaient CD34⁻CD41⁺ et CD34⁺CD41⁺. Les cellules CD34⁻CD41⁺ représentaient $51,6 \pm 4,9$ % des cellules pour le témoin contre $26,7 \pm 4,5$ % en présence de SR1. La population CD34⁺CD41⁺ (en rouge) était plus abondante dans les cultures traitées au SR1 ($55,1 \pm 4,9$ %) que dans les conditions témoins ($32,1 \pm 0,7$ %). Une sous-population CD34⁺CD41⁺ (région R2) avec un niveau intermédiaire d'expression de CD41, définie comme étant CD34⁺CD41^{dim}, était prédominante dans les cultures avec SR1. **(B) Proportion de cellules CD34⁺CD41^{dim}.** Diagramme en bâtons représentant le pourcentage de cellules CD34⁺CD41^{dim} triées dans R2, qui était de $16,8 \pm 1,4$ % des cellules totales dans le témoin contre $36,8 \pm 1,9$ % après

traitement au SR1 (moyenne \pm SEM de 8 expériences ; test t de Student, $***P < 0,001$). (C) tracés de points de diffusion de la lumière vers l'avant en fonction de l'expression de CD41, montrant la population CD34⁺CD41^{dim} (en rouge) et la population de CD34⁻CD41⁺ (en bleu) à partir d'une culture traitée au SR1 le jour 10.

5 **Figure 4 : Distribution de ploïdie des cellules CD34⁺CD41^{dim} et CD34⁻CD41⁺ provenant d'une culture traitée au SR1 le jour 10** (test t de Student, $*P < 0,05$, $**p < 0,005$).

10 **Figure 5 : Forte capacité des cellules CD34⁺CD41^{dim} à produire des proplaquettes et des éléments analogues à des plaquettes.** (A) Des cellules CD34⁺ cultivées pendant 10 jours en présence de SR1 comme pour la Figure 1A ont été triées en fonction de leur expression de CD34⁺CD41^{dim} et de CD34⁻CD41⁺ au moyen d'un cytomètre de flux FACS Aria II et ensuite cultivées pendant 7 jours dans un milieu contenant de la TPO avec ou sans SR1 (5 μ M). (B) Quantification du pourcentage de MK étendant des proplaquettes 7 jours après ensemencement de cellules CD34⁺CD41^{dim} ($91,0 \pm 2,4$ % avec SR1 contre $10,0 \pm 6,6$ % pour le témoin ; moyenne \pm SEM de 5 expériences ; test t de Student, $***P < 0,001$). (C) Nombre d'éléments analogues à des plaquettes 7 jours après ensemencement de cellules CD34⁺CD41^{dim} ($52,1 \pm 8,8$ avec SR1 contre $7,7 \pm 0,8$ pour le témoin ; moyenne \pm SEM de 5 à 8 expériences ; test t de Student ; $**P < 0,005$).

20 **Figure 6. La co-culture de cellules CD34⁺ avec des hMSC favorise la production de plaquettes et l'émergence d'une population CD34⁺CD41^{dim}.** (A) Des cellules CD34⁺ ont été cultivées comme pour la Figure 1A en l'absence (Ctrl) ou en présence d'une monocouche de hMSC pendant jusqu'à 14 jours. (B) *Niveau de prolifération*. Les cellules viables ont été comptées les jours 7 et 10 de la culture au moyen d'un compteur de cellules automatique et le facteur d'augmentation par rapport à l'introduction de cellules CD34⁺ a été calculé (moyenne \pm SEM de 3 expériences ; test T de Student, n.s. $P > 0,05$). (C) *Quantification de plaquettes dérivées de la culture*. La suspension cellulaire a été soumise à de multiples pipetages le jour 14 de la culture et les éléments analogues à des plaquettes ont été détectés et comptés par cytométrie en flux (moyenne \pm SEM de 3 expériences : test t de Student, $*P < 0,05$).

30 **Figure 7. (A) Effet de FICZ sur la production de plaquettes.** Des cellules CD34⁺ ont été co-cultivées sur des MSC comme pour la Figure 5A en présence ou en l'absence de l'agoniste d'Ahr FICZ (0,2 μ M). Le jour 14, les éléments analogues à des plaquettes ont été comptés par cytométrie en flux ($20,6 \pm 1,3$ contre $4,5 \pm 1,9$ par cellule ensemencée le jour 7, avec ou sans FICZ, respectivement ; moyenne \pm SEM de 3 expériences ; test t de Student, $***P < 0,001$). (B) *Expression de CYP1B1*. Analyse qPCR d'ARNm de CYP1B1 le jour 10

35

dans des MK co-cultivés ou pas avec des MSC ou SR1 et avec ou sans FICZ. Les données représentent les valeurs moyennes \pm SEM de 3 expériences.

Figure 8. (A) Evolution de l'expression de CD34 et CD41. Tracés de points de cytométrie en flux représentatifs de l'expression de CD34 et CD41 dans la suspension cellulaire le jour 10, révélant une population CD34⁺CD41^{dim} dans les co-cultures de MSC. **(B)** Proportion de cellules CD34⁺CD41^{dim}. Diagramme en bâtons représentant la proportion de cellules dans la région CD34⁺CD41^{dim} (moyenne \pm SEM de 3 expériences ; test t de Student, * $P < 0,05$). **(C)** Distribution de ploïdie des cellules CD34⁺CD41^{dim} issues d'une co-culture de MSC le jour 10.

Figure 9. Propriétés comparables de cellules CD34⁺CD41^{dim} obtenues après traitement avec des MSC ou SR1. (A) Des cellules CD34⁺ ont été cultivées pendant 10 jours comme pour la Figure 1A en présence d'une monocouche de MSC. Les cellules CD34⁺CD41^{dim} ont été triées le jour 10 et cultivées pendant encore 7 jours avec de la TPO, de la TPO + SR1 5 μ M, ou de la TPO + MSC. *Cadre i* : Quantification du pourcentage de MK étendant des proplaquettes. *Cadre ii* : Quantification de plaquettes dérivées de la culture. **(B)** Des cellules CD34⁺ ont été cultivées pendant 10 jours comme pour la Figure 1A en présence de SR1 5 μ M. Les cellules CD34⁺CD41^{dim} ont été triées le jour 10 et cultivées pendant encore 7 jours avec de la TPO, de la TPO + SR1 5 μ M, ou de la TPO + MSC. *Cadre i* : Quantification du pourcentage de MK étendant des proplaquettes. *Cadre ii* : Quantification de plaquettes dérivées de la culture. Moyenne \pm SEM de 3-4 expériences.

Figure 10. Tracé de densité permettant de visualiser la population de cellules CD34⁺CD41^{dim}.

EXEMPLE

MATERIELS ET METHODES

Isolation de cellules CD34⁺

Des cellules CD34⁺ ont été récupérées à partir de filtres de leuco-déplétion obtenus à l'Etablissement Français du Sang-Alsace en adaptant une procédure décrite par Ivanovic et al (Transfusion. 2006 ; 46 : 118-125.). En bref, après 15 minutes d'incubation avec du Cocktail de Déplétion en Granulocytes Humains RosetteSep® (StemCell Technologies, Vancouver, Canada), les cellules mononucléaires ont été isolées par séparation à gradient de densité Histopaque®-1077 (Sigma-Aldrich) pendant 30 minutes à 400 g. Les cellules CD34⁺ ont ensuite été isolées par sélection positive en utilisant un système de tri cellulaire immunomagnétique (AutoMacs, Miltenyi, Bergisch Galdbach, Allemagne). Une viabilité de 83,30 \pm 1,96 % et une pureté de CD34⁺ de 82,80 \pm 2,25 % (n= 6) ont régulièrement été obtenues.

Différenciation de MK en culture

Des cellules CD34⁺ ont été ensemencées dans des plaques à 48 puits à une densité de 4×10^4 par ml dans du milieu StemSpan SFEM complémenté avec 20 ng/ml de LDL humaine et du CC220 (1X), un cocktail de cytokines contenant du CSF, de la TPO, de l'IL-6 et de l'IL-9 (tous de Stemcell Technologies), avec ou sans addition de SR1 1 μ M (Cellagen Technology, San Diego, CA) (Figure 1A). Le jour 7, Les cellules ont été récoltées, lavées, et ensemencées à 5×10^4 /ml dans du milieu StemSpan SFEM contenant 30 ng/ml de TPO avec ou sans SR1 1 μ M pendant encore 7 jours. Les cultures ont été incubées à 37°C dans des conditions normoxiques et avec 5 % de CO₂. Les jours 7 et 10 de la culture, les cellules ont été comptées, leur viabilité a été mesurée par exclusion à l'iodure de propidium dans un compteur de cellules automatique (ADAM, Digital-Bio, Corée) et l'expression de CD34, CD41 et CD42b a été analysée dans un cytomètre de flux Gallios utilisant le logiciel Kaluza (Beckman Coulter, Villepinte, France). Dans certaines expériences, SR1 a été remplacé par l'agoniste d'Ahr FICZ (Enzo life sciences, Villeurbanne, France) ajouté à 0,2 μ M.

Dans un deuxième protocole, des cellules CD34⁺ ont été mises en culture en présence de cellules stromales mésenchymateuses (MSC) isolées à partir de moelle osseuse humaine (Guilloton F et al., Blood. 2012 ; 119 : 2556-2567). Les MSC ont été maintenues dans du milieu α -MEM complémenté avec 10 % de sérum de veau fœtal (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) et 2 ng/ml de FGF2 humain recombiné (rh) (Peprotech, Rocky Hill, NJ). Les cellules CD34⁺ ont été ajoutées à une couche confluyente de MSC à une densité de 4×10^4 /ml dans des plaques à 48 puits dans du milieu StemSpan SFEM complémenté avec 20 ng/ml de LDL humaine et du CC220. Le jour 7, les cellules en suspension ont été récoltées, lavées, et co-cultivées à 5×10^4 /ml sur une nouvelle couche de MSC confluentes dans du milieu StemSpan SFEM contenant 30 ng/ml de TPO pendant encore 7 jours (Figure 5A).

Tri des cellules

Les cellules récupérées le jour 10 ont été incubées avec un mélange de mAb anti-CD41 conjugué à de l'Alexa-488 (ALMA.17) et anti-CD34 conjugué à du PE-Cy7 (BD Biosciences) pendant 30 minutes à 4°C. Puis elles ont été lavées dans du PBS-EDTA et incubées pendant 30 minutes dans du PBS contenant du 7-AAD (1/50) pour sélectionner les cellules viables. Les grilles morphologiques et de tri ont été déterminées par analyse FMO (fluorescence moins un) et les précurseurs mégacaryocytaires ont été triés à 500 cellules/s en fonction de leur expression de CD34/CD41 en utilisant un cytomètre de flux FACS Aria II (Becton Dickinson, Mountain View, CA) équipé d'une buse de 50 μ m et de deux lasers à argon opérant à 500 mW et ajustés à 488 et 360 nm, respectivement (Coherent Radiation, Palo Alto, CA). Les cellules CD34⁺CD41^{dim} et CD34⁺CD41⁺ triées ont ensuite été

dénombrées et ensemencées à 4×10^4 /ml dans des plaques à 48 puits dans du milieu StemSpan contenant de la TPO avec ou sans SR1 pendant 7 jours (Figure 4A).

Analyse de maturation des MK

Marqueurs de surface. Les cellules ont été analysées par cytométrie en flux (Gallios, Beckman Coulter, France) après marquage avec les mAb anti-CD34-PE-Cy7 (Beckman Coulter, Fullerton, CA), anti-CD41-Alexa-488 (ALMA.17), anti-CD42c-PE (RAM.1) et anti-CD42d-Alexa-647 (V.1) pendant 30 minutes à 4°C. Les cellules ont ensuite été lavées et remises en suspension dans du PBS contenant du 7-AAD (1/50). Les données acquises ont été analysées avec le logiciel Kaluza.

Ploïdie. Les cellules ont été incubées pendant 2 heures à 37°C avec 10 µg/ml de Hoechst 33342 (Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France) puis colorées avec des mAb anti-CD34-PE-Cy7 et anti-CD41-PE. Les cellules lavées ont été remises en suspension dans du PBS contenant du 7-AAD et la distribution de ploïdie dans la population de CD41⁺ a été déterminée par cytométrie en flux bicolore (Fortessa, BD Biosciences, Rungis, France). Les données acquises ont été analysées avec le logiciel BD FACSDiva (BD Biosciences).

Ultrastructure. Les cellules ont été fixées avec 2,5 % de glutaraldéhyde dans du tampon cacodylate 0,1 M, pH 7,2, contenant 2 % de saccharose, et traitées comme décrit antérieurement (Eckly A et al., Blood. 2014 ; 123 : 921-930). Des sections ultrafines ont été examinées sous un microscope électronique à transmission Philips CM120 Biotwin (FEI, Heindhoven, Pays-Bas) à 120 kV.

Quantification de MK portant des proplaquettes

Le pourcentage de MK étendant des proplaquettes a été déterminé dans les puits de culture par microscopie avec contraste de phases. Dans chaque culture, au moins 100 MK ont été analysés et acquis les images ont été acquises en utilisant un microscope Zeiss Axio Vert.A1 avec un objectif 20x (Marly-le-Roi, France).

Détermination du nombre de plaquettes produites par cellule ensemencée

Des cellules CD34⁺ cultivées pendant 7 jours en présence de CC220 (Figures 1A et 5A) ou de cellules triées CD34/CD41 (Figures 4A et 6A) ont été ensemencées dans un milieu contenant de la TPO. Le jour 7, du PGE₁ 1 µM et 0,02 U/ml d'apyrase ont été ajoutés au milieu de culture et les cellules ont été passées délicatement 5 fois dans une pointe de pipette P1000. La suspension résultante (200 µl) a été incubée avec des mAb anti-CD41-Alexa-647 et anti-CD42c-Alexa-488 pendant 15 minutes à température ambiante avant analyse dans un cytomètre de flux Gallios. Les événements positifs doubles CD41/CD42c, ayant les mêmes propriétés de diffusion que les plaquettes sanguines lavées ont été comptés comme des particules analogues à des plaquettes, et le nombre de particules par cellule ensemencée a été déterminé le jour 7 ou 10 après les expériences.

Extraction d'ARN

Des cellules CD41/61 ont été obtenues les jours 7 et 10 de la culture en utilisant l'anticorps ALMA.17 et des perles magnétiques (EasySep® "Do-It-Yourself" Selection Kit, StemCell Technologies). L'ARN total a été extrait en utilisant un kit RNeasy® Mini (QIAGEN) conformément aux instructions du fabricant. La quantité et la qualité de l'ARN total ont été évaluées pour tous les échantillons en mesurant la DO à 260 nm, et la concentration a été ajustée à 50 ng/ml. Les échantillons d'ARN ont été stockés à -80°C jusqu'à utilisation. Une qRT-PCR a été appliquée dans les conditions standard en utilisant le kit SYBR Green Master Mix sur le système de détection de séquence ABI Prism 7900 (PerkinElmer-Cetus, Courtaboeuf, France). Les amorces pour les gènes ont été choisies à l'aide du programme Oligo 6.0 (National Biosciences, Plymouth, MN), et elles ont été décrites antérieurement (Bieche I. et al., Pharmacogenetics and genomics. 2007 ; 17 : 731-742).

Statistiques

La significativité statistique a été déterminée au moyen du test t de Student ou d'une Anova bilatérale suivie d'un post-test de Bonferroni. Les données ont été traitées en utilisant le logiciel Graphpad Prism 5.

5

RESULTATS

SR1 soutient l'expression de CD34 dans des MK différenciées provenant de cellules CD34⁺ de sang périphérique

L'effet de l'antagoniste d'Ahr SR1 sur l'expansion de précurseurs de MK a été évalué.

10 Du SR1 (50 μ M) a été ajouté les jours 0 et 7 dans un protocole de culture en deux étapes dans lequel des cellules CD34⁺ de sang périphérique (Peytour Y et al., Transfusion. 2010 ; 50 : 2152-2157) ont d'abord proliféré pendant 7 jours en présence de CC220 et d'un mélange optimisé de SCF, TPO, IL-6 et IL-9, et se sont ensuite différenciées pendant encore 7 jours en présence de TPO seule (Figure 1A).

15 Avec l'utilisation de ce protocole, plus de 90 % des cellules témoins, cultivées sans SR1, étaient positives doubles pour les marqueurs plaquettaires CD41 et CD42 le jour 12, et présentaient les caractéristiques des MK entièrement matures lors des analyses de morphologie et de phénotype.

20 La prolifération cellulaire a été estimée les jours 7 et 10, avant l'apparition d'une extension de proplaquettes. Le jour 7, une expansion de $6,7 \pm 1,6$ fois et de $4,2 \pm 1,2$ fois des cellules nucléées totales (moyennes \pm SEM, n = 8) a été observée en l'absence et en présence de SR1, respectivement (Figure 1B). Du jour 7 au jour 10, le nombre de cellules a augmenté de façon similaire, de 2,3 et 2,5 fois, dans les cultures non traitées et traitées au SR1, respectivement. Par conséquent, SR1 n'a pas favorisé la prolifération cellulaire dans
25 les présentes conditions de culture.

L'effet de SR1 sur la maintenance de progéniteurs a ensuite été évalué en suivant l'évolution de l'expression de CD34. La positivité à CD34 a été préservée dans le témoin et les cellules traitées au SR1 durant l'étape d'expansion, avec seulement une diminution de la positivité de 16,8 et de 8,3 % le jour 7, respectivement (Figure 1C). Le jour 10, après
30 passage en présence de TPO seule, la proportion de cellules CD34⁺ a chuté à 40,7 % dans les cultures témoins tandis que 71,6 % restaient positives après traitement au SR1. Ainsi, SR1 a maintenu un phénotype de type progéniteur après transfert des cellules dans un milieu contenant seulement de la TPO ajoutée.

SR1 augmente la production de MK portant des proplaquettes et d'éléments analogues à des plaquettes

Dans les cultures témoins, l'extension des proplaquettes a été observée pour la première fois le jour 10, et elle culminait le jour 14 où $11,5 \pm 4,5$ % des MK présentaient des proplaquettes (Figure 2A). De façon remarquable, cette proportion a triplé après traitement au SR1 ($34,6 \pm 2,1$ %, moyenne \pm SEM, $n = 4$), et ceci a conduit à une production accrue d'éléments analogues à des plaquettes. Tandis que, dans des conditions témoins, $7,92 \pm 3,25$ particules de la taille d'une plaquette avaient été comptées par cellule ensemencée le jour 7 (Figure 2B), le nombre de plaquettes a environ triplé après l'addition de SR1 ($20,72 \pm 5,19$). Ces résultats indiquent que SR1 a non seulement soutenu le potentiel des progéniteurs, mais a aussi fortement amélioré la maturation des MK. A l'inverse, quand SR1 était remplacé par CIFZ, un agoniste fort de l'Ahr, une diminution considérable de l'extension de proplaquettes des MK et de la production d'éléments analogues à des plaquettes ($0,20 \pm 0,04$ plaquette/cellule ensemencée) a été observée. Ces résultats suggèrent fortement que le blocage d'Ahr est à l'origine de l'augmentation de la production de plaquettes en présence de SR1. L'activité antagoniste de SR1 a été confirmée par l'inhibition de l'expression de sa cible en aval CYP1B1 dans une culture de 7 jours, telle que mesurée par qPCR ($579,8 \pm 40,8$ contre $2,5 \pm 0,8$ unités arbitraires dans le témoin et les cellules traitées au SR1, respectivement ; moyenne \pm SEM, $n = 3$).

SR1 favorise l'expansion d'une population $CD34^+CD41^{dim}$

Les découvertes ci-dessus suggèrent un effet double de SR1 puisqu'il soutient l'expression de CD34 et aussi améliore la maturation des MK. Etant donné que CD41 est un marqueur spécifique des MK, son évolution a été évaluée parallèlement à celle de CD34. Le jour 7, une forte proportion similaire de cellules $CD34^+$ avait acquis une positivité à CD41, 60 et 69 % respectivement des cellules étant $CD34^+CD41^+$ dans le témoin et les cultures traitées au SR1 (Figure 3A). Un passage en présence de TPO seule a conduit à une perte significative de positivité à CD34 dans les cultures témoins, seulement 32 % des cellules étant $CD34^+CD41^+$ le jour 10. Par contraste, une forte proportion (55 %) restait positive double pour CD34 et CD41 dans les cultures traitées au SR1. De façon remarquable, une large fraction de ces cellules (37 % des cellules totales contre 17 % dans les témoins) présentait un phénotype $CD41^{dim}$ (région R2) (Figure 3B). La population $CD41^{dim}$ (R2) comprenait des cellules de taille réduite par rapport à celles ayant un niveau plus élevé de CD41 (R1), comme mis en évidence par leurs propriétés FSC (Figure 3C), indiquant un moindre degré de différenciation des MK. Ceci a été confirmé par l'analyse de ploïdie, puisque les cellules $CD34^+CD41^{dim}$ étaient principalement 2n-4n (Figure 4).

Les cellules CD34⁺CD41^{dim} ont une forte capacité à produire des proplaquettes et des particules analogues à des plaquettes

L'addition de SR1 dans le protocole de culture en deux étapes a eu pour résultat une production accrue de MK portant des proplaquettes et d'éléments analogues à des plaquettes (Figures 2A-2B). Il a par conséquent été recherché si ceci était lié à l'expansion et aux propriétés particulières de la population CD34⁺CD41^{dim}. Des cellules CD34⁺CD41^{dim} issues d'une culture de 10 jours avec du SR1 ont été triées par cytométrie en flux et cultivées pendant 7 jours dans un milieu contenant de la TPO et complémenté ou non avec du SR1 (Figure 5A). Une proportion élevée sans précédent de MK atteignait le stade des proplaquettes ($91,0 \pm 2,4 \%$) quand les cellules CD34⁺CD41^{dim} croissaient en présence de SR1 (Figure 4B). Des fréquences bien inférieures ont été observées quand ces mêmes cellules étaient cultivées en l'absence de SR1 ($10,0 \pm 6,6 \%$) (Figure 5B). Le rendement accru en proplaquettes a conduit à une production amplifiée de 6,8 fois d'éléments analogues à des plaquettes dans les cellules CD34⁺CD41^{dim} cultivées avec SR1 en comparaison avec une culture sans SR1 ($52,06 \pm 8,79$ contre $7,68 \pm 0,81$ plaquettes/cellule ensemencée, respectivement) (Figure 5C). Ces résultats indiquent que la population CD34⁺CD41^{dim} ayant proliféré en présence de SR1 a un fort potentiel de production de MK portant des proplaquettes qui sont susceptibles de libérer des plaquettes.

Une co-culture avec des MSC favorise aussi l'émergence d'une population CD34⁺CD41^{dim}

Des cellules stromales dérivées de moelle osseuse peuvent maintenir le caractère souche hématopoïétique, sécréter des cytokines, et favoriser la maturation des MK (Pallotta I et al., PloSone. 2009 ; 4 : e8359 ; Cheng L et al., Journal of cellular physiology. 2000 ; 184 : 58-69), et pourraient offrir un milieu favorable pour l'émergence d'un précurseur de MK. Des cellules CD34⁺ ont été cultivées selon un protocole en deux étapes sur des monocouches préformées de cellules stromales mésenchymateuses humaines (hMSC) isolées à partir de moelle osseuse humaine (Figure 6A). La co-culture avec des hMSC ne modifiait pas significativement la prolifération cellulaire (Figure 6B), mais elle a conduit à une production accrue de MK portant des proplaquettes (données non représentées) et de particules analogues à des plaquettes le jour 14 ($7,9 \pm 4,5$ contre $18,2 \pm 4,9$ plaquettes/cellule ensemencée le jour 7) (Figure 6C).

Il a été recherché si les effets des MSC pouvaient être médiés par une voie en aval de l'Ahr. L'addition de l'agoniste d'Ahr FICZ (Boitano AE et al., Science. 2010 ; 329 : 1345-1348) réduisait la proportion de cellules CD34⁺CD41^{dim} (données non représentées) et empêchait l'augmentation de la production de plaquettes (Figure 7A). De plus, une co-culture de cellules CD34⁺ avec des MSC a eu pour résultat une réduction marquée ($> 90 \%$) des

produits de transcription de CYP1B1, reproduisant l'effet de SR1 (Figure 5E), cet effet étant inversé par l'addition de FICZ (Figure 7B). Ces résultats indiquent que les MSC, d'une manière similaire à SR1, favorisent la maturation des MK et la production des plaquettes en agissant sur l'Ahr.

Cette réponse ressemble à celle obtenue avec SR1, permettant ainsi de déterminer le phénotype CD34/CD41 des cellules. Une population ayant le profil CD34⁺CD41^{dim} était clairement apparente au jour 10 de la co-culture (Figure 8A), et représentait $30,37 \pm 1,98$ % des cellules totales, en comparaison avec $18,95 \pm 1,75$ % dans les cultures témoins sans MSC (Figure 8B). Cette population présentait une faible ploïdie (Figure 8C).

Il a ensuite été recherché si i) les cellules CD34⁺CD41^{dim} dérivées de SR1 et de MSC avaient le même potentiel pour produire des MK matures et ii) une co-culture avec des MSC ou en présence de SR1 favorisait de façon similaire cette maturation. Des cellules CD34⁺ ont été cultivées avec SR1 ou sur des MSC et les cellules CD34⁺CD41^{dim} correspondantes ont été triées le jour 10 (Figure 9). Ces cellules ont ensuite été sous cultivées pendant 7 jours avec de la TPO, avec de la TPO et du SR1, ou avec de la TPO et des MSC. Les résultats montrent que les cellules CD34⁺CD41^{dim} dérivées de MSC présentaient une plus forte capacité à produire des MK portant des plaquettes quand elles étaient cultivées en présence de SR1 (Figure 9A, cadre de gauche), mais avec moins d'efficacité que les cellules dérivées de SR1 (Figure 9B, cadre de gauche) ($49,5 \pm 10,5$ % contre $91,0 \pm 2,4$ %, respectivement, $n = 4$). De plus, une co-culture avec des MSC amplifiait la maturation des MK de cellules CD34⁺CD41^{dim} tant dérivées de MSC (Figure 9A) que dérivées de SR1 (Figure 9B) ($53,3 \pm 10,7$ % contre $67,5 \pm 12,6$ %, respectivement), en comparaison avec une culture avec de la TPO seule (%). Des profils similaires ont été observés pour la capacité à libérer des particules analogues à des plaquettes (Figures 9A-B, cadres de droite). Ainsi, une co-culture avec des MSC phénocopie les réponses obtenues par addition de SR1 à des cultures cellulaires.

En conclusion, il est rapporté ici l'identification et l'enrichissement d'une population discrète de progéniteurs hématopoïétiques adultes amorcés pour la différenciation des MK qui peuvent efficacement mûrir en MK portant des proplaquettes. Cette population, identifiée au moyen de sa signature CD34⁺CD41^{dim}, a été amplifiée quand des cellules CD34⁺ adultes ont été cultivées en présence de SR1, un antagoniste de l'Ahr, ou d'une monocouche de MSC. La culture avec SR1 ou des MSC, en plus de favoriser l'apparition de ce progéniteur de MK, améliore fortement le rendement en MK produisant des proplaquettes et la libération d'éléments analogues à des plaquettes.

Plusieurs caractéristiques de la population CD34⁺CD41^{dim} identifiée ici dans le système humain, telles que la petite taille et la faible ploïdie des cellules ainsi que leur forte capacité à mûrir en MK purs capables d'étendre efficacement des proplaquettes, s'avèrent correspondre à la définition d'un progéniteur ayant une préférence pour les plaquettes. Son phénotype distinctif combine une signature de progéniteur CD34⁺ avec une expression intermédiaire ou faible du marqueur mégacaryocytaire CD41. Des cellules positives à CD41 ont été décrites parmi les cellules CD34⁺ humaines isolées directement à partir de moelle osseuse ou après culture dans des conditions favorisant les MK (Debili N. et al., Blood. 1992 ; 80 : 3022-3035 ; Dercksen MW et al., Blood. 1995 ; 86 : 3771-3782). Toutefois, ces populations ne récapitulaient par complètement le phénotype CD34⁺CD41^{dim} puisqu'elles s'avéraient exprimer des niveaux plus élevés de CD41 et qu'elles étaient fortement polyploïdes et incapables de proliférer (Dercksen MW et al., Blood. 1995 ; 86 : 3771-3782). Des cellules CD34⁺CD41⁺ ont aussi été observées après co-culture de cellules CD34⁺ dérivées de moelle osseuse sur des hMSC sans TPO, mais aucune preuve d'une sous-population CD41^{dim} distincte n'a été apportée (Cheng L. et al., Journal of cellular physiology. 2000 ; 184 : 58-69). Des cellules ayant un phénotype CD34⁺CD41^{low} représentant une population très mineure ont été récemment identifiées dans des cultures dérivées de sang périphérique, mais elles n'ont pas été caractérisées davantage. La population CD34⁺CD41^{dim} présentait une fréquence similairement faible dans nos cultures standard (Fig. 3A), et ne devenait apparente qu'après l'addition de SR1 ou une co-culture avec des MSC. Une population mégacaryoblastique CD31⁺CD34⁺CD41⁺ ressemblant aux cellules décrites ici a été récemment observée dans des cellules iPS reprogrammées, cultivées dans un système sans sérum en trois étapes. Cette population s'avèrait exprimer des niveaux faibles de CD41 et était négative pour CD42.

REVENDICATIONS

1. Procédé ex vivo pour produire des plaquettes et/ou des mégacaryocytes (MK) portant des proplaquettes, comprenant :

5 a) la culture d'une population isolée de cellules CD34⁺CD41^{dim} de progéniteurs de MK dans un milieu de culture sans sérum comprenant de la thrombopoïétine (TPO), en présence d'un antagoniste de récepteur d'hydrocarbures aromatiques (AhR) ou par co-culture avec des cellules stromales mésenchymateuses humaines (hMSC), pendant un temps suffisant pour obtenir une population de cellules comprenant des plaquettes et/ou des MK portant des proplaquettes ; et

10 b) la collecte de ladite population de cellules comprenant des plaquettes et/ou des MK portant des proplaquettes.

15 2. Procédé selon la revendication 1, dans lequel l'étape a) de culture est effectuée pendant 5 à 9 jours.

3. Procédé selon la revendication 1 ou 2, dans lequel le milieu de culture sans sérum comprend 20 à 100 ng/ml de TPO.

20 4. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, lequel procédé comprend, avant l'étape a) :

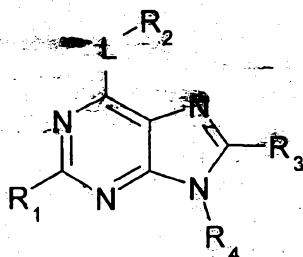
25 a0) la culture de cellules souches hématopoïétiques (HSC) dans un milieu de culture sans sérum comprenant de la lipoprotéine de basse densité (LDL), du facteur des cellules souches (SCF), de la TPO, de l'IL-6 et de l'IL-9, en présence d'un antagoniste de récepteur d'hydrocarbures aromatiques (AhR) ou par co-culture avec des cellules stromales mésenchymateuses humaines (hMSC), pendant un temps suffisant pour obtenir une population de cellules comprenant des cellules CD34⁺CD41^{dim} ; et

30 a1) l'isolation desdites cellules CD34⁺CD41^{dim} à partir de ladite population de cellules.

5. Procédé selon la revendication 4, dans lequel le milieu de culture sans sérum de l'étape a0) comprend 10 à 30 µg/ml de LDL, 25 à 100 ng/ml de SCF, 40 à 50 ng/ml de TPO, 20 à 30 ng/ml d'IL-6 et 20 à 30 ng/ml d'IL-9.

35 6. Procédé selon la revendication 4 ou 5, dans lequel l'étape a0) de culture est effectuée pendant 6 à 8 jours.

7. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, dans lequel, dans les étapes a) et a0), indépendamment, l'antagoniste d'Ahr est un composé de formule (I)



5 L est choisi parmi $-\text{NR}_{5a}(\text{CH}_2)_{2-3}-$, $-\text{NR}_{5a}(\text{CH}_2)_2\text{NR}_{5b}-$, $-\text{NR}_{5a}(\text{CH}_2)_2\text{S}-$, $-\text{NR}_{5a}\text{CH}_2\text{CH}(\text{OH})-$ et $-\text{NR}_{5a}\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2-$; où R_{5a} et R_{5b} sont indépendamment choisis parmi l'hydrogène et les radicaux alkyle en C_1 à C_4 ;

R_1 est choisi parmi les radicaux thiophényle, furanyle, benzimidazolyle, isoquinolinyne, imidazopyridinyle, benzothiophényle, pyrimidinyle, pyrazolyle, pyridinyle, imidazolyle, pyrrolidinyle, pyrazinyle, pyridazinyle, pyrrolyle et thiazolyle ; où lesdits thiophényle, furanyle, benzimidazolyle, isoquinolinyne, imidazopyridinyle, benzothiophényle, pyrimidinyle, pyrazolyle, pyridinyle, imidazolyle, pyrrolidinyle, pyrazinyle, pyridazinyle, pyrrolyle et thiazolyle de R_1 sont éventuellement substitués par 1 à 3 radicaux indépendamment choisis parmi halogéno, cyano, alkyle en C_1 à C_4 , halogénoalkyle en C_1 à C_4 , alcoxy en C_1 à C_4 , $-\text{S}(\text{O})_{0-2}\text{R}_{8a}$, et $-\text{C}(\text{O})\text{OR}_{8a}$, où R_{8a} est choisi parmi l'hydrogène et les radicaux alkyle en C_1 à C_4 ;

R_2 est choisi parmi $-\text{S}(\text{O})_2\text{NR}_{6a}\text{R}_{6b}$, $-\text{NR}_{6a}\text{C}(\text{O})\text{NR}_{6b}\text{R}_{6c}$, phényle, pyrrolopyridinyle, indolyle, thiophényle, pyridinyle, triazolyle, 2-oxoimidazolidinyle, pyrazolyle, et indazolyle ; où R_{6a} , R_{6b} et R_{6c} sont indépendamment choisis parmi l'hydrogène et les radicaux alkyle en C_1 à C_4 ;

et
ledit phényle, pyrrolopyridinyle, indolyle, thiophényle, pyridinyle, triazolyle, oxoimidazolidinyle, pyrazolyle, ou indazolyle de R_2 est éventuellement substitué par 1 à 3 radicaux indépendamment choisis parmi hydroxy, halogéno, méthyle, méthoxy, amino, $-\text{O}(\text{CH}_2)_n\text{NR}_{7a}\text{R}_{7b}$, $-\text{OS}(\text{O})_2\text{NR}_{7a}\text{R}_{7b}$ et $-\text{NR}_{7a}\text{S}(\text{O})_2\text{R}_{7b}$; où R_{7a} and R_{7b} sont indépendamment choisis parmi l'hydrogène et les radicaux alkyle en C_1 à C_4 ;

R_3 est choisi parmi l'hydrogène et les radicaux alkyle en C_1 à C_4 et biphényle ; et
 R_4 est choisi parmi les radicaux alkyle en C_1 à C_{10} , alcényle en C_1 à C_4 , oxétanyle, tétrahydrofuranyle, cyclohexyle, (oxopyrrolidinyl)éthyle, tétrahydropyranyle, phényle, et benzyle, où lesdits alkyle en C_1 à C_{10} , alcényle en C_1 à C_4 , oxétanyle, tétrahydrofuranyle, cyclohexyle, (oxopyrrolidinyl)éthyle, tétrahydropyranyle, phényle, et benzyle de R_4 peuvent

être éventuellement substitués par 1 à 3 radicaux indépendamment choisis parmi hydroxy, alkyle en C₁ à C₄ et halogénoalkyle en C₁ à C₄.

8. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, dans lequel, dans l'étape a) et/ou a0), l'antagoniste d'Ahr est StemRegenin 1 (SR1).

9. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, dans lequel l'étape a) et/ou l'étape a0) sont effectuées par co-culture avec des hMSC.

10. Procédé selon l'une quelconque des revendications 7 à 9, dans lequel lesdites hMSC sont obtenues par un procédé comprenant :

i) l'isolation de cellules mononucléaires de moelle osseuse (BM-MNC) à partir d'un sujet humain par gradient de densité Ficoll ;

ii) l'ensemencement des BM-MNC isolées dans un milieu de culture comprenant 5 à 15 % de sérum de veau fœtal et 0,5 à 5 ng/ml de facteur 2 de croissance des fibroblastes (FGF-2) ;

iii) la culture des cellulesensemencées pendant deux jours, la mise au rebut des cellules non adhérentes et l'ensemencement des cellules adhérentes collectées ;

iv) la culture des cellules adhérentes dans un milieu de culture comprenant 10 % de sérum de veau fœtal et 0,5 à 5 ng/ml de FGF-2, avec remplacement du milieu de culture deux fois par semaine par du milieu de culture frais jusqu'à confluence ; et

v) la récolte des hMSC, l'ensemencement et la culture des cellules récoltées jusqu'à confluence dans un milieu de culture comprenant 10 % de sérum de veau fœtal et 0,5 à 5 ng/ml de FGF-2.

11. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 10, qui comprend en outre la sélection de cellules CD41/CD61+ et CD42c+ à partir de la population cellulaire collectée comprenant des plaquettes et/ou des MK portant des proplaquettes.

12. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 11, qui comprend en outre le lavage des plaquettes et/ou des mégacaryocytes (MK) portant des proplaquettes et la mise en suspension des cellules lavées dans un tampon de perfusion.

13. Procédé pour produire des cellules progénitrices de mégacaryocytes (MK), comprenant :

a0) la culture de cellules souches hématopoïétiques (HSC) dans un milieu de culture sans sérum comprenant de la lipoprotéine de basse densité (LDL), du facteur des cellules souches (SCF), de la TPO, de l'IL-6 et de l'IL-9, en présence d'un antagoniste de récepteur d'hydrocarbures aromatiques (AhR) ou par co-culture avec des cellules stromales

5 mésenchymateuses humaines (hMSC), pendant un temps suffisant pour obtenir une population de cellules comprenant des cellules CD34⁺CD41^{dim} ; et

a1) l'isolation desdites cellules CD34⁺CD41^{dim} à partir de ladite population de cellules.

14. Procédé selon la revendication 13, dans lequel l'étape a0) est effectuée

10 comme défini dans les revendications 5 à 11.

15. Population cellulaire essentiellement pure de progéniteurs de mégacaryocytes (MK), dans laquelle au moins 80 % des cellules dans la population sont des cellules CD34⁺CD41^{dim}, laquelle population cellulaire peut être obtenue par le procédé de la

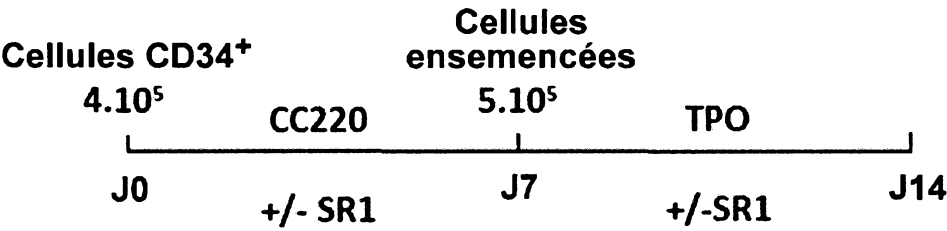
15 revendication 13 ou 14.

16. Composition comprenant une population cellulaire de plaquettes et/ou de mégacaryocytes (MK) portant des proplaquettes et un tampon de perfusion pour utilisation en transfusion, dans laquelle ladite utilisation comprend la préparation de plaquettes et/ou de

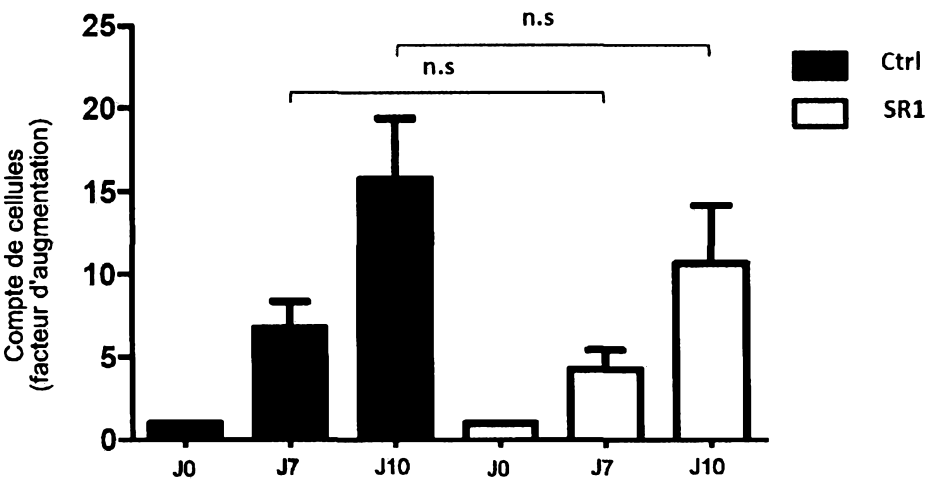
20 mégacaryocytes (MK) portant des proplaquettes par un procédé selon la revendication 12.

1/10

A.



B.



C.

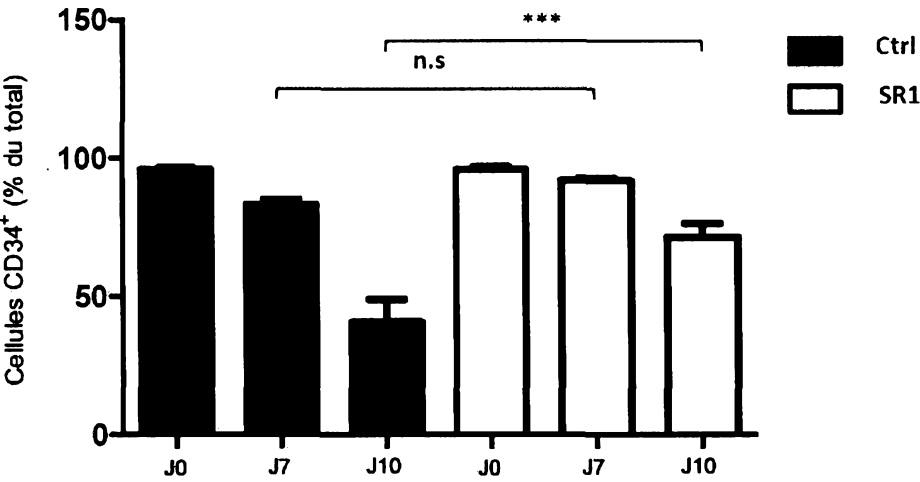


FIG. 1

2/10

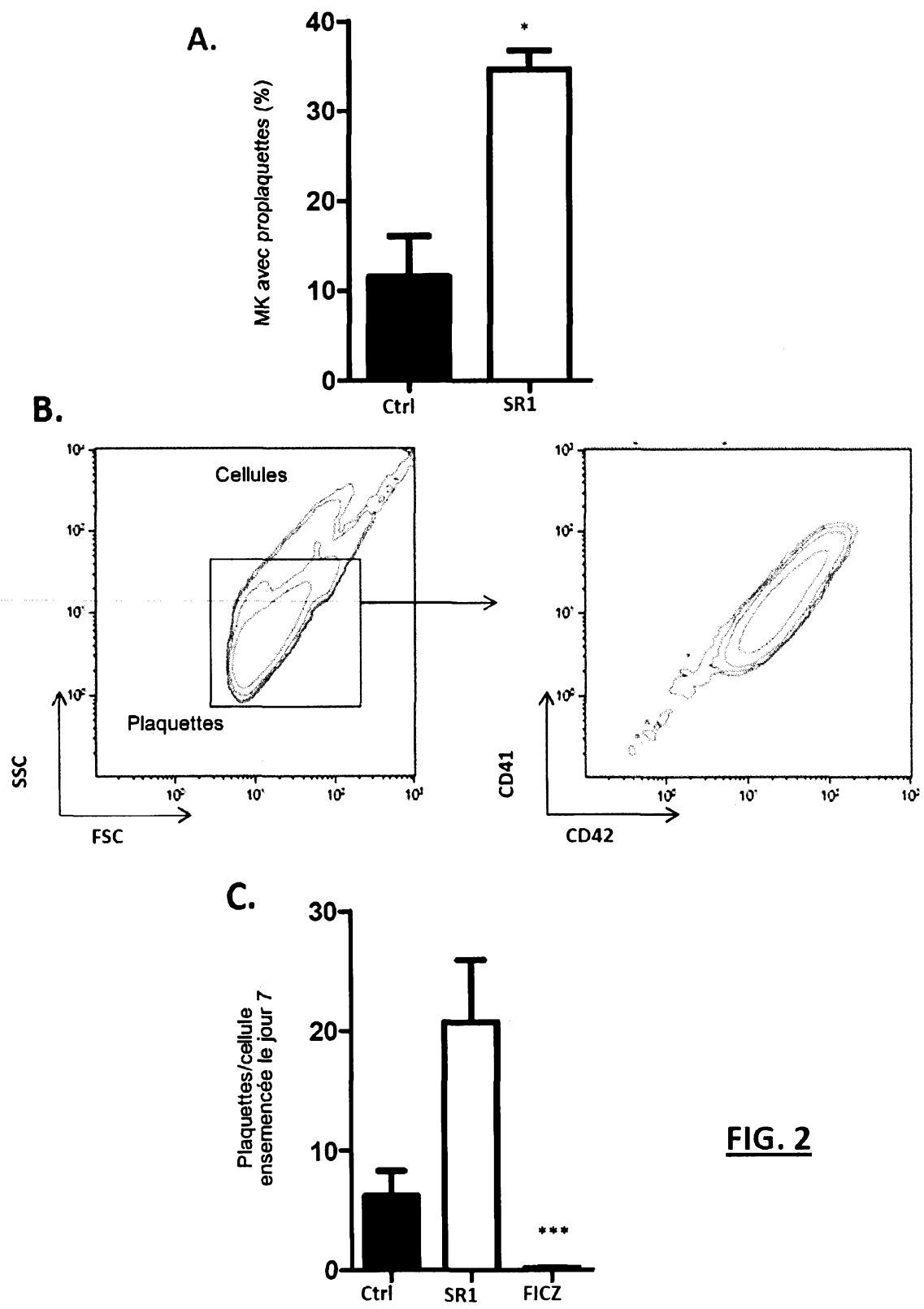
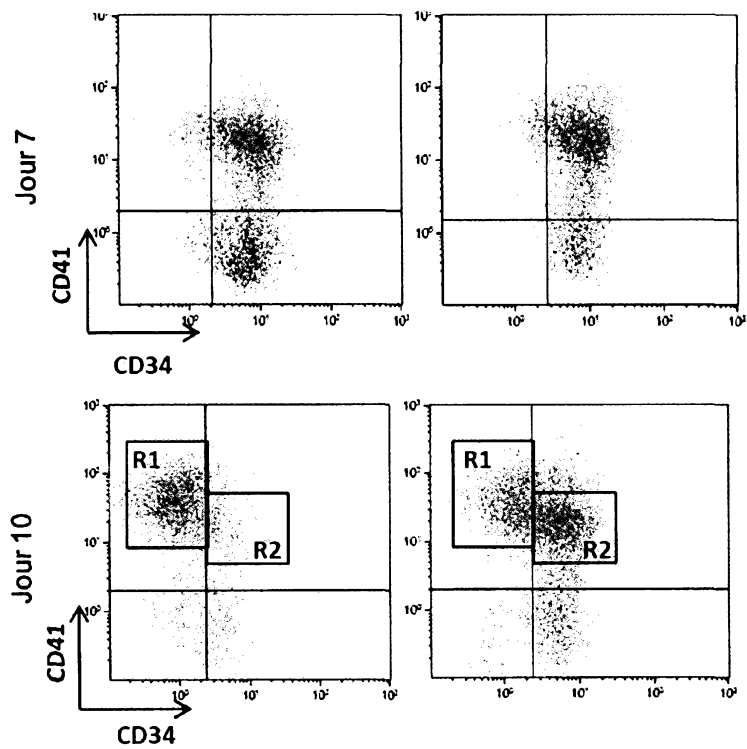


FIG. 2

3/10

A.



B.

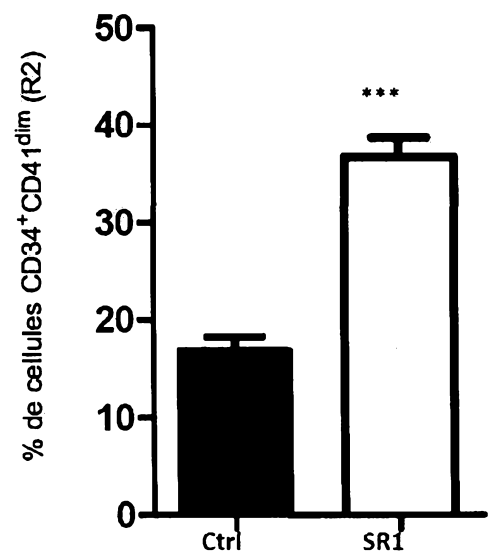


FIG. 3 (début)

4/10

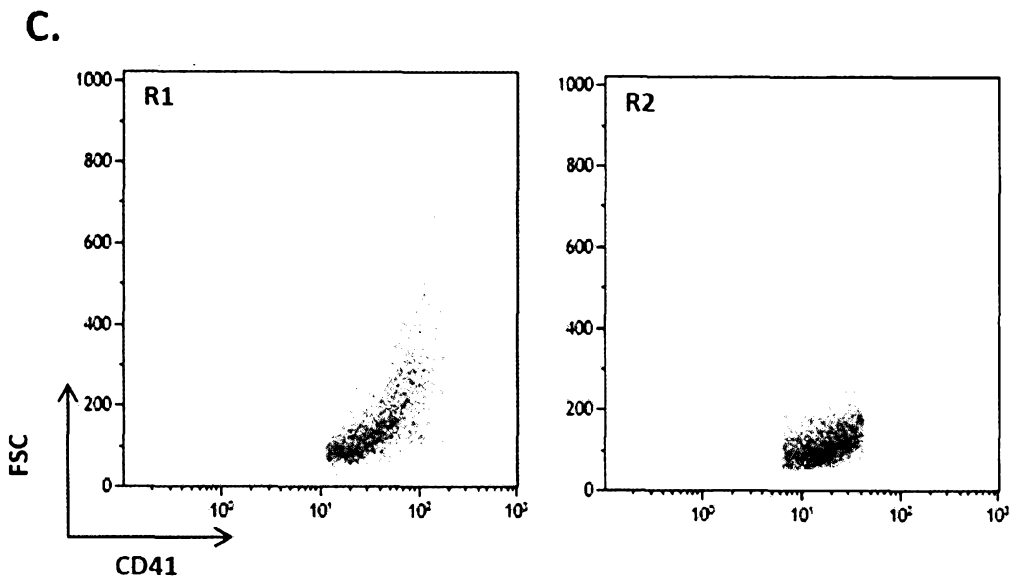


FIG. 3 (fin)

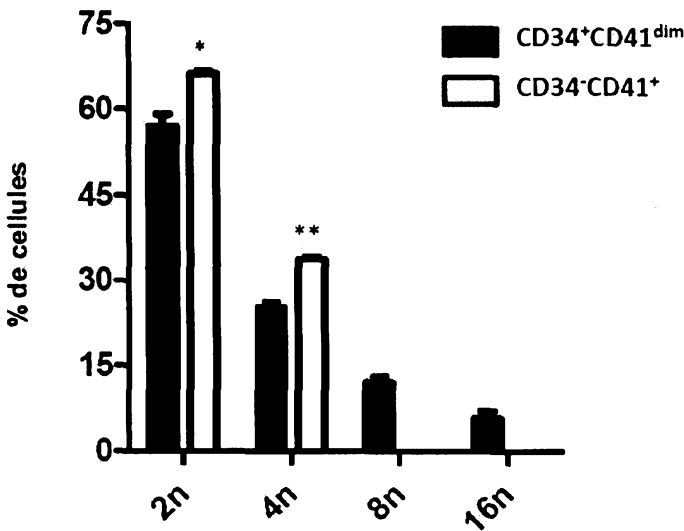
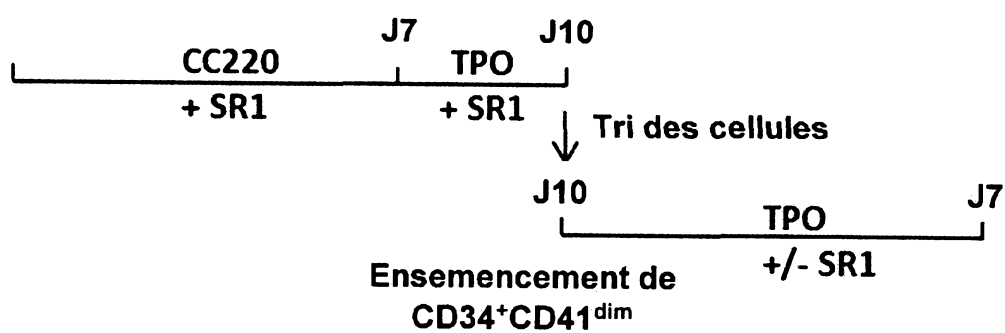


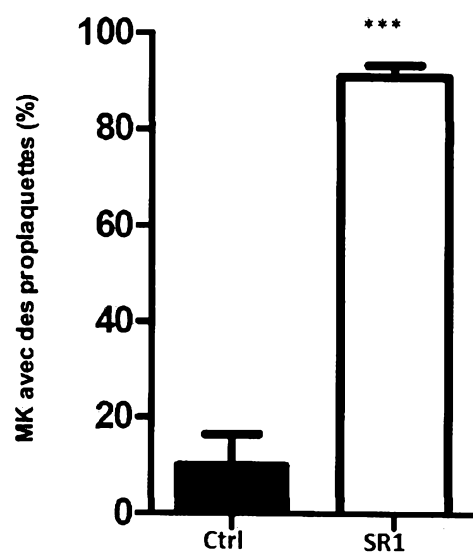
FIG. 4

5/10

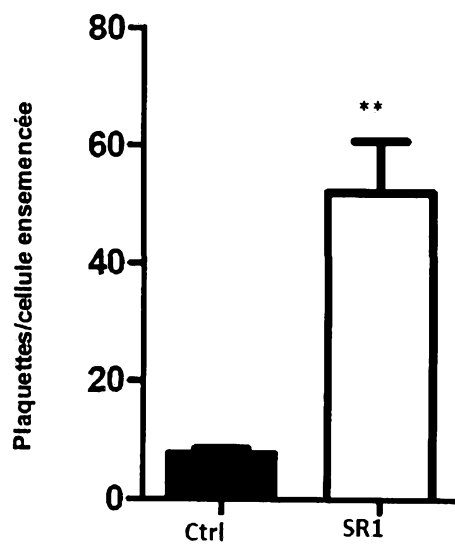
A.



B.

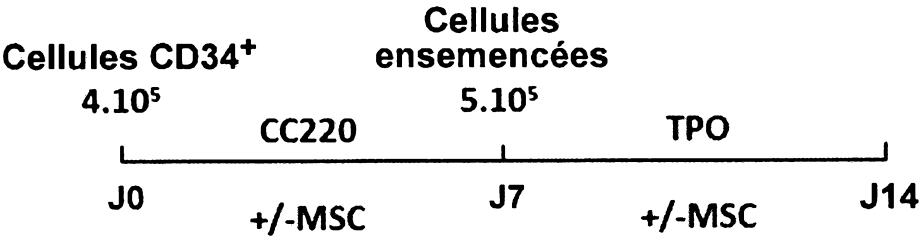
FIG. 5

C.

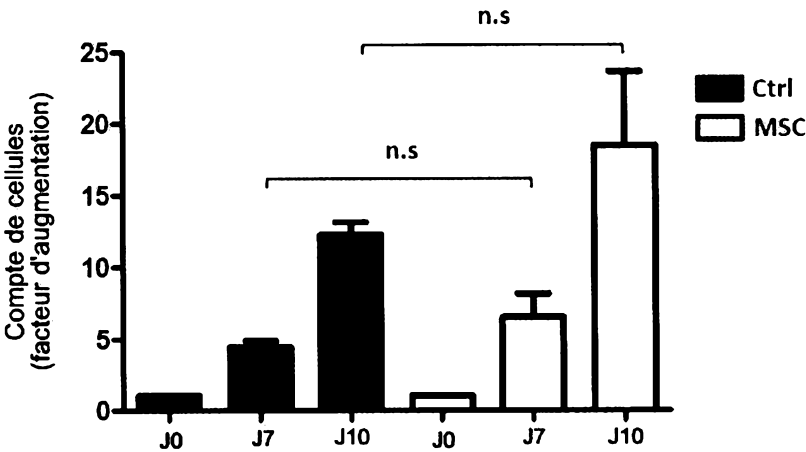


6/10

A.



B.



C.

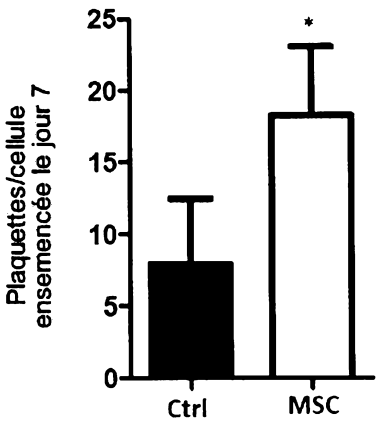


FIG. 6

7/10

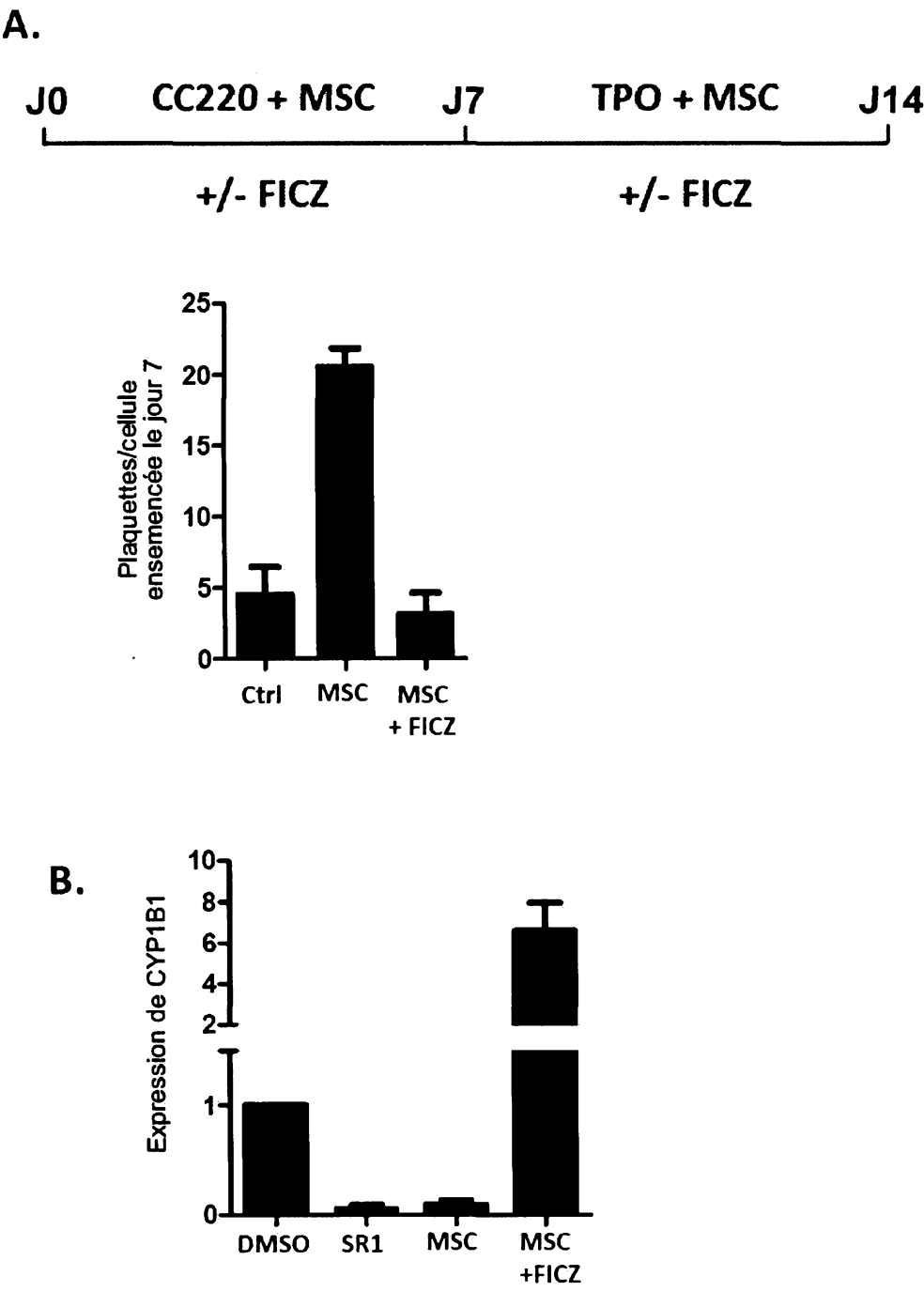


FIG. 7

8/10

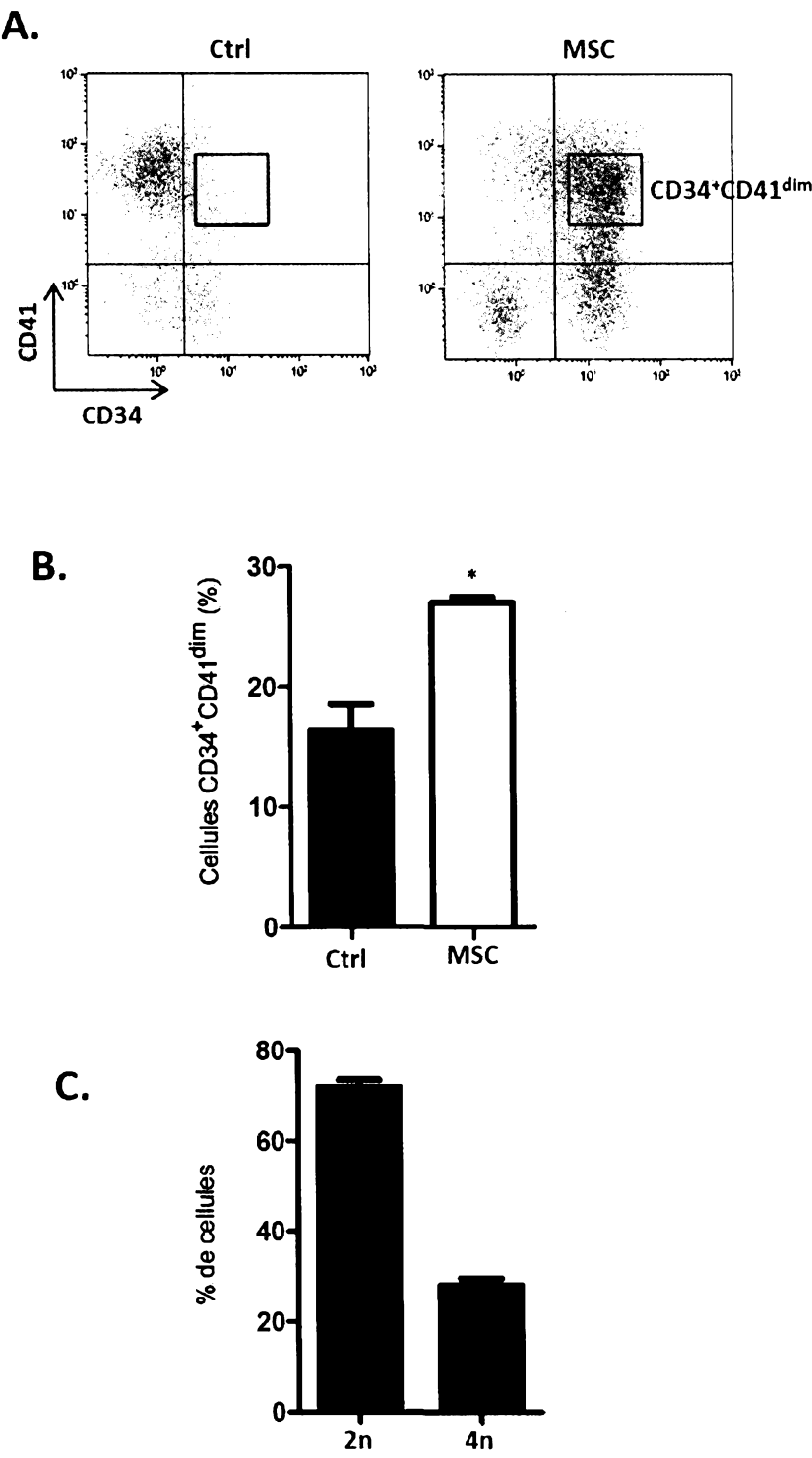


FIG. 8

9/10

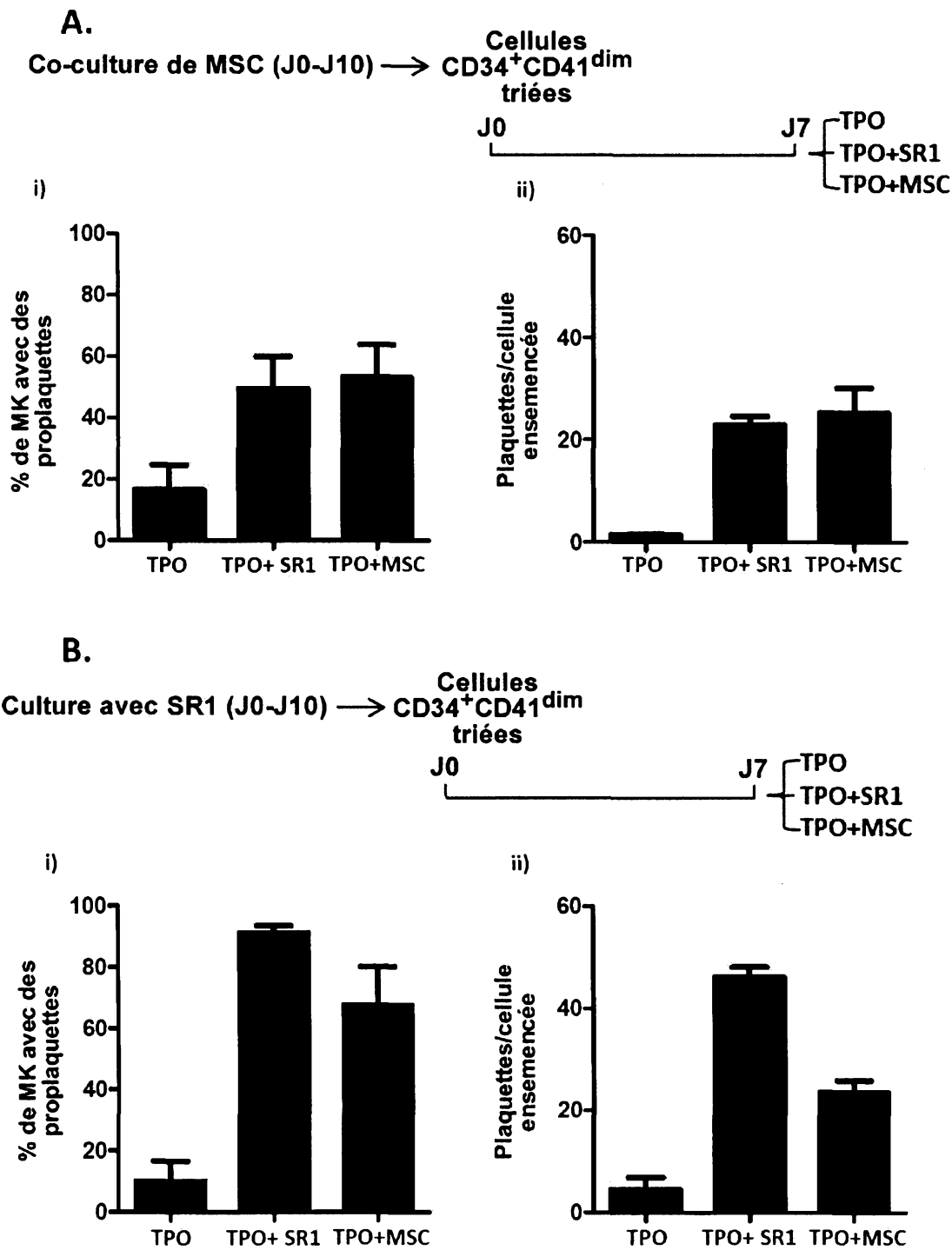
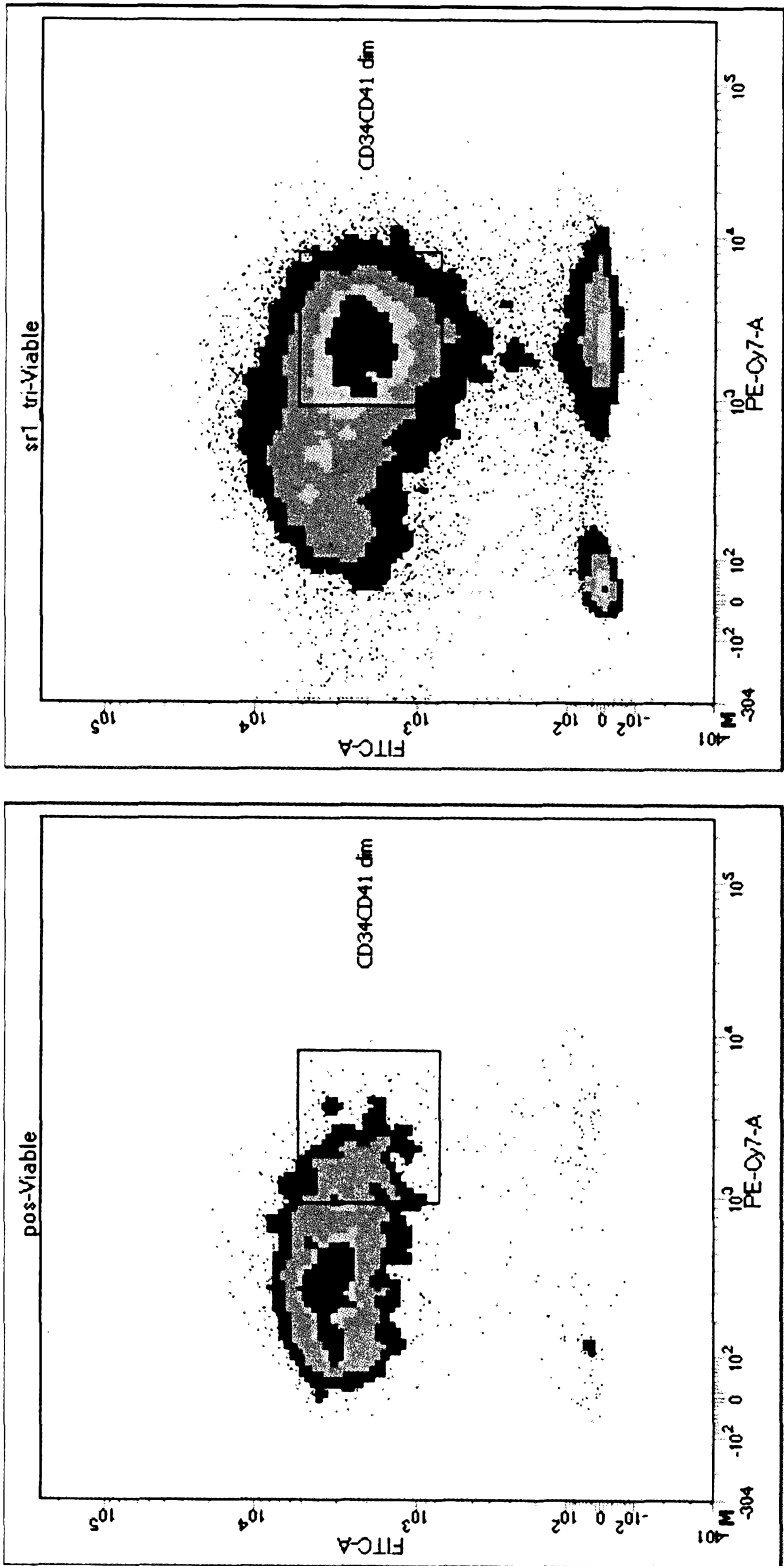


FIG. 9



Intensité de fluorescence de SR1 : 2546

Intensité de fluorescence du témoin : 2734

FIG. 10

RAPPORT DE RECHERCHE

articles L.612-14, L.612-17 et R.612-53 à 69 du code de la propriété intellectuelle

OBJET DU RAPPORT DE RECHERCHE

L'I.N.P.I. annexe à chaque brevet un "RAPPORT DE RECHERCHE" citant les éléments de l'état de la technique qui peuvent être pris en considération pour apprécier la brevetabilité de l'invention, au sens des articles L. 611-11 (nouveau) et L. 611-14 (activité inventive) du code de la propriété intellectuelle. Ce rapport porte sur les revendications du brevet qui définissent l'objet de l'invention et délimitent l'étendue de la protection.

Après délivrance, l'I.N.P.I. peut, à la requête de toute personne intéressée, formuler un "AVIS DOCUMENTAIRE" sur la base des documents cités dans ce rapport de recherche et de tout autre document que le requérant souhaite voir prendre en considération.

CONDITIONS D'ÉTABLISSEMENT DU PRÉSENT RAPPORT DE RECHERCHE

- ☒ Le demandeur a présenté des observations en réponse au rapport de recherche préliminaire.
- ☒ Le demandeur a maintenu les revendications.
- ☐ Le demandeur a modifié les revendications.
- ☐ Le demandeur a modifié la description pour en éliminer les éléments qui n'étaient plus en concordance avec les nouvelles revendications.
- ☐ Les tiers ont présenté des observations après publication du rapport de recherche préliminaire.
- ☐ Un rapport de recherche préliminaire complémentaire a été établi.

DOCUMENTS CITÉS DANS LE PRÉSENT RAPPORT DE RECHERCHE

La répartition des documents entre les rubriques 1, 2 et 3 tient compte, le cas échéant, des revendications déposées en dernier lieu et/ou des observations présentées.

- ☒ Les documents énumérés à la rubrique 1 ci-après sont susceptibles d'être pris en considération pour apprécier la brevetabilité de l'invention.
- ☐ Les documents énumérés à la rubrique 2 ci-après illustrent l'arrière-plan technologique général.
- ☐ Les documents énumérés à la rubrique 3 ci-après ont été cités en cours de procédure, mais leur pertinence dépend de la validité des priorités revendiquées.
- ☐ Aucun document n'a été cité en cours de procédure.

1. ELEMENTS DE L'ETAT DE LA TECHNIQUE SUSCEPTIBLES D'ETRE PRIS EN CONSIDERATION POUR APPRECIER LA BREVETABILITE DE L'INVENTION

LIU B ET AL: "A potential activity of valproic acid in the stimulation of interleukin-3-mediated megakaryopoiesis and erythropoiesis", EXPERIMENTAL HEMATOLOGY, ELSEVIER INC, US, vol. 38, no. 8, 1 août 2010 (2010-08-01), pages 685-695, XP027136852, ISSN: 0301-472X [extrait le 2010-04-08]

MCGRATH KATHLEEN E ED - SANCHEZ ANA ET AL: "Utilization of imaging flow cytometry to define intermediates of megakaryopoiesis in vivo and in vitro", JOURNAL OF IMMUNOLOGICAL METHODS, vol. 423, 17 mars 2015 (2015-03-17), pages 45-51, XP029247220, ISSN: 0022-1759, DOI: 10.1016/J.JIM.2015.03.002

BRUNO S ET AL: "IN VITRO AND IN VIVO MEGAKARYOCYTE DIFFERENTIATION OF FRESH AND EX-VIVO EXPANDED CORD BLOOD CELLS: RAPID AND TRANSIENT MEGAKARYOCYTE RECONSTITUTION", HAEMATOLOGICA, THE HEMATOLOGY JOURNAL : OFFICIAL ORGAN OF THE EUROPEAN HEMATOLOGY ASSOCIATION, FONDAZIONE FERRATA STORTI, IT, vol. 88, no. 4, 1 avril 2003 (2003-04-01), pages 379-387, XP008077211, ISSN: 0390-6078

WO 2014/138485 A1 (IRM LLC [US]; BOITANO ANTHONY E [US]; COOKE MICHAEL P [US]; SNEAD JENN)
12 septembre 2014 (2014-09-12)

L. Cheng ET AL: "Human Mesenchymal Stem Cells Support Megakaryocyte and Pro-Platelet Formation From CD34 Hematopoietic Progenitor Cells", J. Cell. Physiol., 1 janvier 2000 (2000-01-01), pages 58-69, XP055135575, Extrait de l'Internet: URL:[http://onlinelibrary.wiley.com/store/10.1002/\(SICI\)1097-4652\(200007\)184:1<58::AI D-JCP6>3.0.CO;2-B/asset/6ftp.pdf?v=1&t=h20a8j7&s=937389292d034b0fb93b3f66ff525d5ead37f5c](http://onlinelibrary.wiley.com/store/10.1002/(SICI)1097-4652(200007)184:1<58::AI D-JCP6>3.0.CO;2-B/asset/6ftp.pdf?v=1&t=h20a8j7&s=937389292d034b0fb93b3f66ff525d5ead37f5c) [extrait le 2014-08-20]

2. ELEMENTS DE L'ETAT DE LA TECHNIQUE ILLUSTRANT L'ARRIERE-PLAN TECHNOLOGIQUE GENERAL

NEANT

N° d'enregistrement national : 1557020

N° de publication : 3039166

**3. ELEMENTS DE L'ETAT DE LA TECHNIQUE DONT LA PERTINENCE DEPEND
DE LA VALIDITE DES PRIORITES**

NEANT