

Génération de globules rouges de culture à partir de cellules souches : bref récit du futur

Christelle Mazurier^{1,2,3} et Luc Douay^{1,2,3,4}

¹ INSERM, UMR_S938, Prolifération et différenciation des cellules souches, 75012 Paris, France

² Etablissement Français du Sang Ile de France, Unité d'ingénierie et de thérapie cellulaire, 94017 Créteil, France

³ UPMC Université ParisVI, UMR_S938 CDR Saint-Antoine, Prolifération et différenciation des cellules souches, 75012 Paris, France

⁴ AP-HP, Hôpital Armand Trousseau et Saint-Antoine, Service d'Hématologie et Immunologie Biologiques, 75012 Paris, France

Auteur correspondant : Luc Douay, luc.douay@aphp.fr

Reçu le 18 janvier 2016

Résumé – Les cellules souches adultes pluripotentes humaines, les cellules souches d'origine embryonnaire ou les cellules induites à la pluripotence (iPS) sont autant de sources cellulaires pour de nouvelles approches prometteuses en médecine régénérative. Parce que ces cellules peuvent être patient-spécifiques, elles permettront d'envisager une médecine personnalisée au diagnostic de chacun. La génération de Globules Rouges de culture (GRc) dérivés de cellules souches (CS) est emblématique de cette médecine personnalisée. En effet, les CS ont l'avantage de pouvoir être choisies selon un phénotype sanguin d'intérêt et pourront ainsi apporter des solutions thérapeutiques à des patients en impasse transfusionnelle (alloimmunisation ou sangs rares). Des progrès essentiels ont démontré la faisabilité de cette approche, encore à l'état de concept il y a quelques années. À partir des cellules souches adultes, toutes les étapes de recherche d'amont ont été franchies avec succès, y compris la démonstration de la faisabilité de l'injection à l'Homme. Ceci nous conduit à penser que les Globules Rouges issus des CS *in vitro* seront les futurs acteurs de la transfusion sanguine. Cependant, bien que théoriquement idéales, ces cellules souches suscitent de nombreux challenges biologiques à surmonter, bien que des pistes soient identifiées.

Mots clés : Cellules souches pluripotentes induites (IPS) / cellules souches embryonnaires (CES) / cellules souches hématopoïétiques (CSH) / globules rouges de culture (GRc)

Abstract – *In vitro* generation of blood red cells from stem cells: a sketch of the future.

Human adult pluripotent stem cells, stem cells of embryonic origin and induced pluripotent stem cells (iPS) provide cellular sources for new promising regenerative medicine approaches. Because these cells can be patient-specific, they allow considering a personalized medicine appropriate to the diagnosis of each. The generation of cultured red blood cells (cRBC) derived from stem cells is emblematic of personalized medicine. Indeed, these cells have the advantage of being selected according to a blood phenotype of interest and they may provide treatments to patients in situation of impossible transfusion (alloimmunized patients, rare phenotypes). Essential progresses have established proof of concept for this approach, still a concept some years ago. From adult stem cells, all steps of upstream research were successfully achieved, including the demonstration of the feasibility of injection into human. This leads us to believe that Red Blood Cells generated *in vitro* from stem cells will be the future players of blood transfusion. However, although theoretically ideal, these stem cells raise many biological challenges to overcome, although some tracks are identified.

Key words: Induced pluripotent stem cells (IPS) / embryonic stem cells (ES cells) / hematopoietic stem cells (HSC) / cultured red blood cell (cRBC)

Abréviations

CSE : cellules souches embryonnaires
 CSH : cellules souches hématopoïétiques
 GRc : globules rouges de culture
 CGR : concentré de globules rouges
 SCF : *stem cell factor*

Les iPS, des candidates pour la médecine de demain

Le domaine des cellules souches connaît une phase d'accélération sans précédent dans ses découvertes et l'élargissement du spectre de ses applications depuis une décennie. La découverte des cellules souches embryonnaires chez l'Homme en 1998 (Thomson *et al.*, 1998) a ouvert la marche de cette incroyable ascension. Depuis 2006 (Takahashi & Yamanaka, 2006; Takahashi *et al.*, 2007; Yu *et al.*, 2007) il est désormais possible de reprogrammer à la pluripotence toute cellule somatique (différenciée ou non) par l'expression ectopique d'un jeu de facteurs essentiels impliqués dans la pluripotence, les plus fréquemment utilisés étant Oct4, Sox2, Klf4 et c-Myc. Ces cellules pluripotentes induites (iPS) possèdent les caractéristiques des cellules souches embryonnaires (CSE) : elles sont capables *in vitro* d'autorenouvellement et de différenciation vers tous les types cellulaires des trois feuillettes embryonnaires. Transplantées chez la souris immunodéficente, elles génèrent des tératomes, témoignant de leur pluripotence.

Cependant, bien que théoriquement idéales, ces cellules suscitent de nombreux challenges biologiques et ruptures technologiques à surmonter. En effet, le processus de reprogrammation, quelle que soit la méthode, est chronophage et peu efficace constituant ainsi une première limitation à leur utilisation clinique (Ebrahimi, 2015; Takahashi & Yamanaka, 2015). L'efficacité de reprogrammation vers la pluripotence *via* les techniques de transduction de facteurs de reprogrammation est très faible et peut être expliquée par un modèle stochastique (Yamanaka, 2009). Ainsi, la majorité des cellules initierait un procédé de reprogrammation mais seulement une minorité serait capable de l'achever. De nombreuses pistes d'amélioration de l'efficacité de reprogrammation sont actuellement explorées, notamment des stratégies visant à (i) inhiber les barrières génétiques ou épigénétiques à la reprogrammation (Banito *et al.*, 2009; Guo *et al.*, 2014; Worringer *et al.*, 2014), (ii) surexprimer certains facteurs de transcription (Di Stefano *et al.*, 2014; Hasegawa *et al.*, 2014; dos Santos *et al.*, 2014), (iii) compléter la culture par de petites molécules (Hou *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2011, 2014).

Outre l'efficacité de production des iPS et l'âge du donneur (Lapasset *et al.*, 2011), se pose la question de l'origine de la cellule à reprogrammer. Il est maintenant établi que l'origine tissulaire et le stade de différenciation des cellules reprogrammées influencent significativement la cinétique et l'efficacité de reprogrammation car elles expriment des profils transcriptionnels et épigénétiques distincts (Kim *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2014; Rohani *et al.*, 2014; Vidal *et al.*, 2014). Ceci impose des stratégies de reprogrammation « cellules spécifiques » dont le choix est conditionné par l'application envisagée. Dans un but thérapeutique les méthodes non intégratives font référence. Pour ce qui est des cellules hématopoïétiques, les plus courantes reposent sur les lentivirus et les épisomes qui auraient un avantage en termes de rapidité et d'efficacité. Pour d'autres types cellulaires, les stratégies reposant sur les miRNA paraissent plus efficaces. Aucune équipe n'a toutefois rapporté la génération d'iPS dérivées de cellules hématopoïétiques en utilisant cette méthodologie (Schlaeger *et al.*, 2015).

Dans un but de thérapie cellulaire, plusieurs points cruciaux restent donc à résoudre tels que (i) le choix du type de cellule initiale à reprogrammer; (ii) la méthode de reprogrammation, à savoir s'orienter vers des techniques contrôlant avec précision les sites d'intégration des transgènes pour éviter tout risque de mutation insertionnelle; (iii) optimiser la production cellulaire dans des conditions GMP (*Good Manufacturing Practice*) et industrielles. Chacune de ces questions soulève un défi technologique et scientifique qui devra être relevé avec succès pour passer du laboratoire au chevet du patient.

Déclenchée par l'avènement de cette révolution biotechnologique, réapparaît quelques années plus tard l'idée d'une conversion directe d'un type de cellule déterminée dans un autre, sans passer par un stade pluripotent, simplement en surexprimant des facteurs de transcription ou microARN. Ce procédé de conversion directe ou de transdifférenciation est caractérisé par une activation progressive du programme de la cellule cible tout en supprimant de façon concomitante celui de la cellule de départ. Cette approche qui semble efficace et surtout rapide a été couronnée de succès pour de nombreux types cellulaires d'intérêts cliniques. Ainsi des cellules endothéliales ont pu être converties en progéniteurs hématopoïétiques (Sandler *et al.*, 2014), des fibroblastes en neurones (Son *et al.*, 2011), en cardiomyocytes (Ieda *et al.*, 2010), en hépatocytes (Sekiya & Suzuki, 2011), en cellules hématopoïétiques (Szabo *et al.*, 2010), et enfin récemment des cellules mésenchymateuses en globules rouges (Liu *et al.*, 2015). La principale limite de cette source est leur pérennité. En effet, contrairement aux IPS, il ne s'agit pas de lignées.

La source n'est donc pas illimitée. Il s'agit de production par lot jusqu'à épuisement du pool de cellules.

Cette nouvelle génération de cellules souches représente une précieuse source cellulaire pour de nouvelles applications en médecine régénérative, le criblage de nouvelles thérapeutiques ou encore dans la modélisation des pathologies. Parce que ces cellules peuvent être patient-spécifiques, leur potentiel offert au service de la pathologie est porteur d'immenses espoirs et tend vers un concept de médecine. La génération de Globules Rouges de culture (GRc) dérivés d'iPS est emblématique d'une médecine personnalisée. En effet, certains patients peuvent nécessiter un support transfusionnel pendant des années (anomalies acquises de la moelle osseuse) voire toute leur vie (hémoglobinopathies congénitales). Ceci a pour conséquence d'induire une alloimmunisation des patients qui aboutit quasi inéluctablement à terme, à des situations d'impasse transfusionnelle avec des complications métaboliques et infectieuses souvent graves. Or, nous avons établi qu'avec trois donneurs choisis pour la particularité de leur phénotype érythrocytaire, il serait possible de générer des lignées d'iPS permettant de répondre à plus de 99 % des situations transfusionnelles. Dix donneurs couvriraient 100 % des spécificités (Peyrard *et al.*, 2011). Nous touchons au concept de « GR universels » tant attendu depuis la découverte des groupes sanguins en 1902.

La production de globules rouges de culture pour répondre aux défis actuels et futurs de la transfusion sanguine

L'enjeu de la production de GRc à partir de cellules souches est considérable. 107 millions, c'est le nombre de concentrés globulaires (CGR) collectés et distribués chaque année dans le monde. On estime que 300 millions seraient nécessaires pour couvrir les besoins transfusionnels à l'échelle planétaire. La problématique est fondamentalement différente pour les pays développés, prescripteurs de 40 % de ces CGR, et le reste du monde. Dans ces pays, les politiques nationales de sécurité sanitaire et de santé ont permis de garantir un système de transfusion qualitativement et quantitativement satisfaisant. Le questionnement que soulève la transfusion pour ces pays est de (i) toujours protéger davantage les receveurs en améliorant la compatibilité donneurs/receveur, enjeu majeur et complexe de par la variété des antigènes sanguins (plus de 35 groupes de systèmes sanguins); (ii) trouver de nouvelles solutions pour des patients exposés à un risque d'impasse transfusionnelle (patients présentant un groupe rare, patients polytransfusés

pour le traitement de maladies hématologiques, patients alloimmunisés). Si l'approvisionnement peut sembler aujourd'hui suffisant, il ne permettra plus en l'état de soutenir les besoins d'une population vieillissante qui inéluctablement connaîtra une augmentation de l'incidence des pathologies nécessitant un support transfusionnel.

Garantir la transfusion de demain revient à imaginer et intégrer de nouvelles sources de sang complémentaires au don bénévole. Les iPS ont leur place à prendre dans la médecine transfusionnelle de demain en présentant ainsi un triple intérêt : (1) elles peuvent produire de façon illimitée des GR ; (2) il est possible de choisir les donneurs en fonction des caractéristiques de leurs groupes sanguins (35 familles différentes); (3) l'absence de noyau dans les GRc ainsi que l'absence de globules blancs permettent de maîtriser deux risques inhérents à l'utilisation de cellules issues d'iPS : le risque tumoral par mutagenèse et le risque d'immunisation allogénique anti-HLA.

De la cellule souche au GR *in vitro*

Lorsque les recherches sur la génération de GRc ont été initiées au début des années 2000, seules étaient accessibles les cellules souches hématopoïétiques (CSH) de la moelle osseuse, du sang périphérique ou du sang placentaire. Encore un concept il y a une dizaine d'années, les GRc sont devenus réalité (Neildez-Nguyen *et al.*, 2002; Giarratana *et al.*, 2005, 2011; Miharada *et al.*, 2006; Baek *et al.*, 2008; Fujimi *et al.*, 2008; Migliaccio *et al.*, 2010).

Toutes les étapes de recherche d'amont ont été franchies avec succès, y compris la démonstration de la faisabilité de l'injection à l'homme. Notre équipe de l'université Pierre et Marie Curie, associée à l'Etablissement Français du Sang (EFS) a décrit toutes les étapes de ce projet ambitieux.

L'objectif est de reproduire *in vitro* un mécanisme physiologique fondamental, l'érythropoïèse. Partant de cellules souches, il s'agit d'engager leur différenciation dans la lignée érythroïde jusqu'à l'étape finale de maturation, l'expulsion du noyau. Notre équipe a mis au point un protocole de grade clinique pour la production de réticulocytes fonctionnels en l'absence de stroma et de tous composants xénogéniques partant de CSH. Ce protocole se déroule en trois étapes en présence de plasma humain et de cytokines adaptées : une phase de prolifération (SCF, IL-3 et EPO) pendant 7-8 jours, suivie d'une deuxième phase de différenciation (SCF et EPO) pendant 3 jours, puis d'une troisième phase de maturation en présence d'EPO seule pendant 8 jours. Les cellules obtenues sont des réticulocytes comme en attestent la présence d'ARN ribosomal après coloration à l'acridine orange ou au bleu de crésyl et leur

profil phénotypique marqué notamment par la persistance du récepteur de la transferrine (CD71) et le récepteur de la thrombospondine (CD36). Injectés à la souris NOD/SCID, ces réticulocytes achèvent leur différenciation *in vivo* en GR, allégeant le procédé de culture d'une étape complexe de maturation *in vitro*.

Les valeurs hématologiques, leur contenu enzymatique et leur déformabilité sont ceux de réticulocytes natifs. L'expression des antigènes érythrocytaires est conforme à celle attendue. Ces réticulocytes synthétisent une hémoglobine fonctionnelle car ils peuvent fixer et relarguer l'oxygène. Une analyse métabolomique de ces cellules n'a pas révélé de différences en ce qui concerne les principales voies métaboliques de la cellule érythroïde que sont la glycolyse, le métabolisme du glutathion et la voie des pentoses.

L'ensemble de ce travail a fourni le rationnel pré-clinique pour une étude du comportement de ces cellules après injection chez l'homme. L'objectif était d'étudier la demi-vie des GRc après marquage d'un échantillon homogène au Cr51. Les réticulocytes de culture persistent en totalité 5 jours après injection (94 % à 100 %). Entre 41 et 63 % des réticulocytes circulent encore 26 jours post-injection. Leur demi-vie peut donc être estimée entre 37 et 54 jours, ce qui se compare très favorablement au 28 \pm 2 jours pour une population de GR natifs. Évidemment, ceci ne traduit pas par une meilleure qualité des GRc par comparaison à des GR natifs, mais reflète le caractère homogène d'une population jeune de réticulocytes par rapport à une population hétérogène de GR natifs (Giarratana *et al.*, 2011). Dans le cadre d'une application clinique future, cette observation est majeure car elle permet d'espérer une meilleure efficacité transfusionnelle dans le temps de ce nouveau produit sanguin, et par conséquent d'espacer les transfusions ce qui limitera les complications associées. Au-delà de ces aspects, les GRc permettront de faire face aux problèmes de pénuries offrant un produit (i) adapté à chaque patient y compris ceux présentant un groupe sanguin rare et (ii) dénué des risques infectieux grâce à la sécurisation des dons de cellules souches.

Parce que les cellules souches pluripotentes induites (iPS) peuvent proliférer indéfiniment, être sélectionnées pour un phénotype d'intérêt, elles sont les candidates idéales à la production de GRc. La preuve de concept de différenciation de cellules souches pluripotentes en GRc a initialement été établie à partir des cellules souches embryonnaires (CES). La différenciation érythroïde peut être atteinte grâce à deux approches différentes : (i) le recours à des systèmes de co-cultures sur des stromas nourriciers; (ii) la formation de corps embryoides. En 2006, grâce à un protocole de co-culture de cellules CD34⁺ dérivées des CES (lignée H1

et de cellules de foie foetal immortalisées, Olivier *et al.* (2006) ont généré des érythroblastes nucléés synthétisant un mélange d'hémoglobine embryonnaire et foetale. En prolongeant la culture de 10 jours, ils ont atteint le stade de GR énucléés. Suivant la même stratégie, Ma *et al.*, (2008) ont généré des progéniteurs hématopoïétiques et montré de façon clonale par immunofluorescence et RT-PCR que la β globine était sur-exprimée concomitamment à la sous-expression du gène embryonnaire ε globine. Les cellules érythroïdes isolées des colonies BFU-E sont fonctionnelles sur la base des courbes d'O₂ à l'équilibre et de l'activité enzymatique G6PD. Lu *et al.* (2008) ont généré des érythrocytes énucléés *via* la formation d'hémangioblastes grâce à un protocole multi-étape. Ces érythrocytes, CD71⁺ et Glycophorine A⁺, synthétisent les chaînes $\zeta\varepsilon$ G γ et α de l'hémoglobine mais pas de chaînes adultes A γ ou β . De façon intéressante, la maturation terminale des érythrocytes est fonction des conditions de culture : 10 % d'énucléation en l'absence de stroma *vs.* 65 % en présence de cellules *feeder* de type OP9.

Notre groupe a décrit la différenciation efficace de CES (lignée H1 de *WiCell*) dans la lignée érythroïde grâce à une stratégie innovante basée sur l'engagement précoce et direct dans la lignée érythroïde de cellules dérivées de corps embryoides. Dans ces conditions, il est possible de générer des érythrocytes majoritairement énucléés (65 %), présentant les marqueurs érythroïdes attendus CD71 et CD235a, synthétisant une hémoglobine foetale fonctionnelle (Lapillonne *et al.*, 2010).

Comme pour les CSE, l'issue critique des iPS est de démontrer leur capacité à générer des cellules totalement matures et fonctionnelles. Notre équipe est la première à avoir rapporté la possibilité de générer des GRc à partir d'iPS. Nous avons conçu un protocole en deux étapes : la différenciation des iPS par la formation de corps embryoides en présence de cytokines impliquées dans la différenciation mésodermique (BMP4 et VEGF), l'amplification cellulaire et la différenciation hématopoïétique (SCF, FLT3 et TPO), la différenciation érythroïde (IL3-6 et EPO) pour permettre un engagement précoce. Cette méthodologie originale permet de générer à partir d'iPS et de cellules ES des GRc énucléés capables de synthétiser de l'hémoglobine foetale dans une forme tétramérique fonctionnelle. Notre protocole ne montre aucune différence entre les iPS et les lignées de cellules ES en termes d'engagement érythroïde, d'expression de marqueurs membranaire ou le type et la fonctionnalité de l'hémoglobine synthétisée. Cependant, comme suggéré par d'autres, nous avons pu observer une différence en ce qui concerne l'amplification cellulaire et le pourcentage d'énucléation plus faible pour les iPS (10–26 %) (Lapillonne *et al.*, 2010). Nous avons

de plus observé *in vivo*, le *switch* de l'hémoglobine fœtale à adulte après injection de précurseurs érythroïdes dérivées d'iPS (Kobari *et al.*, 2012).

Des pistes identifiées pour optimiser la production de demain

La communauté scientifique est toujours mise au défi d'identifier les protocoles qui reproduisent fidèlement mais surtout efficacement la différenciation érythroïde terminale. Notre équipe a récemment identifié pour les CSE que le micro RNA mir30a est un acteur majeur du contrôle génétique de l'énucléation terminale. Son inhibition dans les iPS où il est surexprimé permettra certainement d'atteindre des niveaux d'énucléation de 60–70 %, améliorant ainsi considérablement les rendements de production de GRc à partir d'iPS (Rouzbeh *et al.*, 2015). Une meilleure compréhension des mécanismes biologiques fondamentaux de la différenciation érythroïde terminale permettra certainement d'optimiser la génération de GRc à partir des cellules souches pluripotentes. Des études complémentaires menées jusqu'à présent dans différents modèles ont permis de préciser certains mécanismes de la différenciation érythrocytaire. Ainsi, parmi les pistes, des études se focalisent sur l'énucléation en tant que modèle de cytocinèse asymétrique. Cette hypothèse, bien que controversée (Keerthivasan *et al.*, 2010), a été discutée dès les années 1960 et est basée sur des critères morphologiques (Skutelsky & Danon, 1967, 1970). Pour appuyer cette hypothèse, il a été ainsi démontré que les noyaux expulsés comportent une couche de cytoplasme recouverte d'une membrane plasmique intacte ce qui est compatible avec un événement de division cellulaire, par opposition à la simple exocytose du noyau (Hebiguchi *et al.*, 2008).

De même, certaines études se portent sur les facteurs génétiques (Zhang *et al.*, 2011; Thom *et al.*, 2014; Rouzbeh *et al.*, 2015) et épigénétiques (DeVilbiss *et al.*, 2015; Malik *et al.*, 2015) impliqués dans la maturation érythroïde terminale.

Notre stratégie qui a consisté à ne pas chercher à isoler un équivalent de progéniteurs hématopoïétiques de type CD34⁺ pour les différencier subséquemment en précurseurs érythroïdes, mais d'orienter très précocement les cellules souches multipotentes dans la lignée érythroïde s'est avérée efficace, probablement parce que cet équivalent cellulaire n'existe pas. Fonctionnellement, les cellules souches hématopoïétiques sont définies par leur capacité de reconstitution à long terme de toutes les lignées sanguines après transplantation (Siminovitch *et al.*, 1964; Spangrude *et al.*, 1988; Baum *et al.*, 1992; Morrison *et al.*, 1995).

À ce jour, de nombreuses études ont démontré la faisabilité de générer des cellules hématopoïétiques

présentant des capacités clonogéniques *in vitro* à partir d'iPS humaines (Choi *et al.*, 2009a, 2009b; Lengerke *et al.*, 2009; Kennedy *et al.*, 2012; Amabile *et al.*, 2013; Ran *et al.*, 2013; Suzuki *et al.*, 2013; Sturgeon *et al.*, 2014). Aucune toutefois n'a rapporté leur capacité à greffer à long terme et reconstituer l'hématopoïèse *in vivo* (Vo & Daley, 2015), à l'exception du modèle singe. En effet, Gori *et al.* (2015) ont rapporté que la reconstitution d'une niche vasculaire avec des cellules endothéliales exprimant les ligands de Notch (JAG1 et DLL4) permet la production, à partir d'iPS de macaque, de cellules hématopoïétiques CD34⁺/CD45⁺ capables de greffe à long terme chez la souris NSG. Ce déficit fonctionnel des iPS humaines a conduit à consolider la connaissance fondamentale des voies cellulaires et moléculaires qui régissent la formation des cellules hématopoïétiques, notamment celles qui permettent de distinguer hématopoïèse primitive et définitive. Durant l'embryogenèse, les cellules endothéliales et hématopoïétiques se développent en parallèle. Cette proximité de développement a donné naissance à l'hypothèse selon laquelle elles dérivent d'un précurseur commun, l'hémangioblaste. Le fait que les cellules définitives proviendraient en fait de l'endothélium hémogénique plutôt que des hémangioblastes est maintenant largement accepté (Vo & Daley, 2015). En effet, *in vivo*, les CSH émergentes seraient directement issues des cellules de l'endothélium hémogénique qui bordent l'aorte embryonnaire dorsale (Zovein *et al.*, 2008; Eilken *et al.*, 2009; Jaffredo *et al.*, 2013).

Actuellement, plusieurs équipes ont choisi des stratégies variées pour élaborer des protocoles de différenciation hématopoïétique d'iPS basés sur l'addition séquentielle de morphogènes pour spécifier un endothélium hémogénique définitif (Ramos-Mejia *et al.*, 2010; Choi *et al.*, 2012; Sturgeon *et al.*, 2014). Pour l'heure, la démonstration formelle d'une véritable prise de greffe n'a pas encore été démontrée, mais cette voie semble prometteuse. Appliquée à la génération de GRc, cette approche permettra d'accroître fortement le nombre de progéniteurs hématopoïétiques et érythroïdes, qui pourront ensuite être amplifiés et différenciés, et d'apporter ainsi une solution au problème de déficit quantitatif.

Actuellement plusieurs sources de cellules souches sont envisageables pour la production de GRc à visée transfusionnelle, chacune présentant des caractéristiques propres.

Les CSH du sang ou du sang placentaire sont facilement accessibles et biologiquement maîtrisées. En effet, elles sont utilisées depuis plus de 30 ans en alternative à la greffe de moelle osseuse pour le traitement d'hémopathies. Utilisées pour la génération de globules rouges, ces cellules ont de nombreux atouts. Elles possèdent une capacité de prolifération

et de différenciation élevée (de l'ordre de 70–90 % d'énucléation). Dans nos mains, l'équivalent de plusieurs dizaines de CGR peuvent être générés à partir d'une collection par aphérèse non mobilisée ou d'une unité de sang placentaire. Concernant les CSH du sang placentaire, la sélection des donneurs peut se faire sur les principaux systèmes de groupe sanguin, ce qui permet de produire un CGR capable de répondre à des situations transfusionnelles particulières et fréquentes. Concernant les CSH contenues dans une aphérèse, le phénotype d'intérêt pourra être étendu car le choix est facilité par la maîtrise du phénotype immunologique des donneurs. Enfin, ces cellules sont natives, donc non génétiquement modifiées. Elles ne soulèvent aucun problème d'acceptation par les agences de régulation. Leur principale limite demeure sur la dépendance au don et implique un système de production par lot (production jusqu'à épuisement du pool de cellules souches contenues dans l'unité de sang périphérique ou placentaire).

Idéalement, la source cellulaire devrait être illimitée. S'agissant de lignées, les cellules souches pluripotentes induites et cellules souches embryonnaires sont les candidates idéales. Toutefois, les iPS ont de nombreux avantages sur les CS embryonnaires : (1) ne nécessitant pas de destruction d'embryon, elles ne soulèvent aucun problème éthique ; (2) elles ne souffrent pas du choix extrêmement limité du donneur auquel sont astreintes les CS embryonnaires ; (3) elles peuvent être obtenues à partir de donneurs volontaires soigneusement sélectionnés. Cette caractéristique est fondamentale à des fins transfusionnelles. Nous rappelons que nous avons rapporté que seulement 3 lignées d'iPS sélectionnées sur les antigènes les plus immunogènes permettraient de produire des CGR compatibles avec plus de 99 % des patients nécessitant des transfusions de globules rouges (Peyrard *et al.*, 2011). L'étude du Registre National Français des Personnes ayant un Phénotype/Génotype Sanguin Rare révèle que 15 clones d'iPSC couvriraient 100 % des besoins des patients d'origine caucasienne.

Par cette approche, nous touchons au concept de « GR universels ». Par nature, les iPS sont des OGM, et devront satisfaire aux exigences des multiples agences de régulation sanitaire de par le monde. La production industrielle de GR à partir d'iPS sécurisées risque de nécessiter encore de nombreuses années de recherche. Il n'en demeure pas moins que ces iPS représentent la source adéquate de CS pour une application transfusionnelle idéale combinant une production dénuée de risque infectieux continue et à façon de CGRc de phénotypes d'intérêt particulier, résolvant ainsi les problèmes liés à l'alloimmunisation et l'existence de groupes sanguins rares. L'alternative

sera peut-être l'émergence de lignées érythroïdes immortalisées, dont la preuve de concept de la faisabilité de générer des GRc a été établie pour la première fois en 2013 (Kurita *et al.*, 2013).

Références

- Amabile, G., Welner, R.S., Nombela-Arrieta, C., D'Alise, A.M., Di Ruscio, A., Ebralidze, A.K., Kraysberg, Y., Ye, M., Kocher, O., Neuberg, D.S., Khrapko K., Silberstein L.E., and Tenen D.G. (2013). *In vivo* generation of transplantable human hematopoietic cells from induced pluripotent stem cells. *Blood*, 121, 1255-1264.
- Baek, E.J., Kim, H.-S., Kim, S., Jin, H., Choi, T.-Y., and Kim, H.O. (2008). *In vitro* clinical-grade generation of red blood cells from human umbilical cord blood CD34⁺ cells. *Transfusion (Paris)*, 48, 2235-2245.
- Banito, A., Rashid, S.T., Acosta, J.C., Li, S., Pereira, C.F., Geti, I., Pinho, S., Silva, J.C., Azuara, V., Walsh, M., Vallier L., and Gil J. (2009). Senescence impairs successful reprogramming to pluripotent stem cells. *Genes Dev*, 23, 2134-2139.
- Baum, C.M., Weissman, I.L., Tsukamoto, A.S., Buckle, A.M., and Peault, B. (1992). Isolation of a candidate human hematopoietic stem-cell population. *Proc Natl Acad Sci USA*, 89, 2804-2808.
- Choi, K.-D., Vodyanik, M.A., and Slukvin, I.I. (2009a). Generation of mature human myelomonocytic cells through expansion and differentiation of pluripotent stem cell-derived lin-CD34+CD43+CD45+ progenitors. *J Clin Invest*, 119, 2818-2829.
- Choi, K.-D., Yu, J., Smuga-Otto, K., Salvagiotto, G., Rehrauer, W., Vodyanik, M., Thomson, J., and Slukvin, I. (2009b). Hematopoietic and endothelial differentiation of human induced pluripotent stem cells. *Stem Cells Dayt*, 27, 559-567.
- Choi, K.-D., Vodyanik, M.A., Togarrati, P.P., Suknuntha, K., Kumar, A., Samarjeet, F., Probasco, M.D., Tian, S., Stewart, R., Thomson, J.A., and Slukvin I.I. (2012). Identification of the hemogenic endothelial progenitor and its direct precursor in human pluripotent stem cell differentiation cultures. *Cell Rep*, 2, 553-567.
- DeVilbiss, A.W., Sanalkumar, R., Hall, B.D.R., Katsumura, K.R., de Andrade, I.F., and Bresnick, E.H. (2015). Epigenetic Determinants of Erythropoiesis : Role of the Histone Methyltransferase SetD8 in Promoting Erythroid Cell Maturation and Survival. *Mol Cell Biol*, 35, 2073-2087.
- Di Stefano, B., Sardina, J.L., van Oevelen, C., Collombet, S., Kallin, E.M., Vicent, G.P., Lu, J., Thieffry, D., Beato, M., and Graf, T. (2014). C/EBP α poises B cells for rapid reprogramming into induced pluripotent stem cells. *Nature*, 506, 235-239.

- Ebrahimi, B. (2015). Reprogramming barriers and enhancers : strategies to enhance the efficiency and kinetics of induced pluripotency. *Cell Regen*, 4, 10.
- Eilken, H.M., Nishikawa, S.-I., and Schroeder, T. (2009). Continuous single-cell imaging of blood generation from haemogenic endothelium. *Nature*, 457, 896-900.
- Fujimi, A., Matsunaga, T., Kobune, M., Kawano, Y., Nagaya, T., Tanaka, I., Iyama, S., Hayashi, T., Sato, T., Miyanishi, K., Sagawa T., Sato Y, Takimoto R., Takayama T., Kato J., Gasa S., Sakai H., Tsuchida E., Ikebuchi K., Hamada H., and Niitsu Y. (2008). Ex vivo large-scale generation of human red blood cells from cord blood CD34⁺ cells by co-culturing with macrophages. *Int J Hematol*, 87, 339-350.
- Giarratana, M.-C., Kobari, L., Lapillonne, H., Chalmers, D., Kiger, L., Cynober, T., Marden, M.C., Wajcman, H., and Douay, L. (2005). Ex vivo generation of fully mature human red blood cells from hematopoietic stem cells. *Nat Biotechnol*, 23, 69-74.
- Giarratana, M.-C., Rouard, H., Dumont, A., Kiger, L., Safeukui, I., Le Pennec, P.-Y., François, S., Trugnan, G., Peyrard, T., Marie, T., Jolly S., Hebert N., Mazurier C., Mario N., Harmand L., Lapillonne H., Devaux J.Y., and Douay L. (2011). Proof of principle for transfusion of in vitro-generated red blood cells. *Blood*, 118, 5071-5079.
- Gori, J.L., Butler, J.M., Chan, Y.-Y., Chandrasekaran, D., Poulos, M.G., Ginsberg, M., Nolan, D.J., Elemento, O., Wood, B.L., Adair, J.E., Rafii S., and Kiem H.P. (2015). Vascular niche promotes hematopoietic multipotent progenitor formation from pluripotent stem cells. *J Clin Invest*, 125, 1243-1254.
- Guo, S., Zi, X., Schulz, V.P., Cheng, J., Zhong, M., Koochaki, S.H.J., Megyola, C.M., Pan, X., Heydari, K., Weissman, S.M., Gallagher P.G., Krause D.S., Fan R., and Lu J. (2014). Nonstochastic reprogramming from a privileged somatic cell state. *Cell*, 156, 649-662.
- Hasegawa, Y., Tang, D., Takahashi, N., Hayashizaki, Y., Forrest, A.R.R., FANTOM Consortium, and Suzuki, H. (2014). CCL2 enhances pluripotency of human induced pluripotent stem cells by activating hypoxia related genes. *Sci Rep*, 4, 5228.
- Hebiguchi, M., Hirokawa, M., Guo, Y.-M., Saito, K., Wakui, H., Komatsuda, A., Fujishima, N., Takahashi, N., Takahashi, T., Sasaki, T., Nunomura W., Takakuwa Y., and Sawada K. (2008). Dynamics of human erythroblast enucleation. *Int J Hematol*, 88, 498-507.
- Hou, P., Li, Y., Zhang, X., Liu, C., Guan, J., Li, H., Zhao, T., Ye, J., Yang, W., Liu, K., Ge J., Xu J., Zhang Q., Zhao Y., and Deng H. (2013). Pluripotent stem cells induced from mouse somatic cells by small-molecule compounds. *Science*, 341, 651-654.
- Ieda, M., Fu, J.-D., Delgado-Olguin, P., Vedantham, V., Hayashi, Y., Bruneau, B.G., and Srivastava, D. (2010). Direct reprogramming of fibroblasts into functional cardiomyocytes by defined factors. *Cell*, 142, 375-386.
- Jaffredo, T., Lempereur, A., Richard, C., Bollerot, K., Gautier, R., Canto, P.-Y., Drevon, C., Souyri, M., and Durand, C. (2013). Dorsal-ventral contributions in the formation of the embryonic aorta and the control of aortic hematopoiesis. *Blood Cells Mol Dis*, 51, 232-238.
- Keerthivasan, G., Small, S., Liu, H., Wickrema, A., and Crispino, J.D. (2010). Vesicle trafficking plays a novel role in erythroblast enucleation. *Blood*, 116, 3331-3340.
- Kennedy, M., Awong, G., Sturgeon, C.M., Ditadi, A., LaMotte-Mohs, R., Zúñiga-Pflücker, J.C., and Keller, G. (2012). T Lymphocyte Potential Marks the Emergence of Definitive Hematopoietic Progenitors in Human Pluripotent Stem Cell Differentiation Cultures. *Cell Rep*, 2, 1722-1735.
- Kim, K., Doi, A., Wen, B., Ng, K., Zhao, R., Cahan, P., Kim, J., Aryee, M.J., Ji, H., Ehrlich, L.I.R., Yabuuchi A., Takeuchi A., Cunniff K.C., Hongguang H., McKinney-Freeman S., Naveiras O., Yoon T.J., Irizarry R.A., Jung N., Seita J., Hanna J., Murakami P., Jaenisch R., Weissleder R., Orkin S.H., Weissman I.L., Feinberg A.P., and Daley G.Q. (2010). Epigenetic memory in induced pluripotent stem cells. *Nature*, 467, 285-290.
- Kobari, L., Yates, F., Oudrhiri, N., Francina, A., Kiger, L., Mazurier, C., Rouzbeh, S., El-Nemer, W., Hebert, N., Giarratana, M.-C., François S., Chapel A., Lapillonne H., Luton D., Bennaceur-Griscelli A., and Douay L. (2012). Human induced pluripotent stem cells can reach complete terminal maturation : *in vivo* and *in vitro* evidence in the erythropoietic differentiation model. *Haematologica*, 97, 1795-1803.
- Kurita, R., Suda, N., Sudo, K., Miharada, K., Hiroshima, T., Miyoshi, H., Tani, K., and Nakamura, Y. (2013). Establishment of immortalized human erythroid progenitor cell lines able to produce enucleated red blood cells. *PLoS One*, 8, e59890.
- Lapasset, L., Milhavet, O., Prieur, A., Besnard, E., Babled, A., Aït-Hamou, N., Leschik, J., Pellestor, F., Ramirez, J.-M., De Vos, J., Lehmann S., and Lemaître JM. (2011). Rejuvenating senescent and centenarian human cells by reprogramming through the pluripotent state. *Genes Dev*, 25, 2248-2253.
- Lapillonne, H., Kobari, L., Mazurier, C., Tropel, P., Giarratana, M.-C., Zanella-Cleon, I., Kiger, L., Wattenhofer-Donzé, M., Puccio, H., Hébert, N., Francina A., Andreu G., Viville S., and Douay L. (2010). Red blood cell generation from human induced pluripotent stem cells : perspectives for transfusion medicine. *Haematologica*, 95, 1651-1659.
- Lengerke, C., Grauer, M., Niebuhr, N.I., Riedt, T., Kanz, L., Park, I.-H., and Daley, G.Q. (2009). Hematopoietic development from human induced pluripotent stem cells. *Ann New York Acad Sci*, 1176, 219-227.
- Li, J., Song, W., Pan, G., and Zhou, J. (2014). Advances in understanding the cell types and approaches used for generating induced pluripotent stem cells. *J Hematol Oncol*, 7, 50.

- Liu, Z., Lu, S.-J., Lu, Y., Tan, X., Zhang, X., Yang, M., Zhang, F., Li, Y., and Quan, C. (2015). Transdifferentiation of Human Hair Follicle Mesenchymal Stem Cells into Red Blood Cells by OCT4. *Stem Cells Int*, 2015, 389628.
- Lu, S.-J., Feng, Q., Park, J.S., Vida, L., Lee, B.-S., Strausbauch, M., Wettstein, P.J., Honig, G.R., and Lanza, R. (2008). Biologic properties and enucleation of red blood cells from human embryonic stem cells. *Blood*, 112, 4475-4484.
- Ma, F., Ebihara, Y., Umeda, K., Sakai, H., Hanada, S., Zhang, H., Zaike, Y., Tsuchida, E., Nakahata, T., Nakauchi, H., and Tsuji K. (2008). Generation of functional erythrocytes from human embryonic stem cell-derived definitive hematopoiesis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 105, 13087-13092.
- Malik, J., Getman, M., and Steiner, L.A. (2015). Histone methyltransferase Setd8 represses Gata2 expression and regulates erythroid maturation. *Mol Cell Biol*, 35, 2059-2072.
- Migliaccio, G., Sanchez, M., Masiello, F., Tirelli, V., Varricchio, L., Whitsett, C., and Migliaccio, A.R. (2010). Humanized Culture Medium for Clinical Expansion of Human Erythroblasts. *Cell Transplant*, 19, 453-469.
- Miharada, K., Hiroyama, T., Sudo, K., Nagasawa, T., and Nakamura, Y. (2006). Efficient enucleation of erythroblasts differentiated *in vitro* from hematopoietic stem and progenitor cells. *Nat Biotechnol*, 24, 1255-1256.
- Morrison, S.J., Uchida, N., and Weissman, I.L. (1995). The biology of hematopoietic stem cells. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 11, 35-71.
- Neildez-Nguyen, T.M.A., Wajcman, H., Marden, M.C., Bensidhoum, M., Moncollin, V., Giarratana, M.-C., Kobari, L., Thierry, D., and Douay, L. (2002). Human erythroid cells produced *ex vivo* at large scale differentiate into red blood cells *in vivo*. *Nat Biotechnol*, 20, 467-472.
- Olivier, E.N., Qiu, C., Velho, M., Hirsch, R.E., and Bouhassira, E.E. (2006). Large-scale production of embryonic red blood cells from human embryonic stem cells. *Exp Hematol*, 34, 1635-1642.
- Peyrard, T., Bardiaux, L., Krause, C., Kobari, L., Lapillonne, H., Andreu, G., and Douay, L. (2011). Banking of pluripotent adult stem cells as an unlimited source for red blood cell production : potential applications for alloimmunized patients and rare blood challenges. *Transfus Med Rev*, 25, 206-216.
- Ramos-Mejia, V., Melen, G.J., Sanchez, L., Gutierrez-Aranda, I., Ligerio, G., Cortes, J.L., Real, P.J., Bueno, C., and Menendez, P. (2010). Nodal/Activin signaling predicts human pluripotent stem cell lines prone to differentiate toward the hematopoietic lineage. *Mol Ther J Am Soc Gene Ther*, 18, 2173-2181.
- Ran, D., Shia, W.-J., Lo, M.-C., Fan, J.-B., Knorr, D.A., Ferrell, P.I., Ye, Z., Yan, M., Cheng, L., Kaufman, D.S., and Zhang D.E. (2013). RUNX1a enhances hematopoietic lineage commitment from human embryonic stem cells and inducible pluripotent stem cells. *Blood*, 121, 2882-2890.
- Rohani, L., Johnson, A.A., Arnold, A., and Stolzing, A. (2014). The aging signature : a hallmark of induced pluripotent stem cells? *Aging Cell*, 13, 2-7.
- Rouzbeh, S., Kobari, L., Cambot, M., Mazurier, C., Hebert, N., Faussat, A.-M., Durand, C., Douay, L., and Lapillonne, H. (2015). Molecular signature of erythroblast enucleation in human embryonic stem cells. *Stem Cells*, 33, 2431-2441.
- Sandler, V.M., Lis, R., Liu, Y., Kedem, A., James, D., Elemento, O., Butler, J.M., Scandura, J.M., and Rafii, S. (2014). Reprogramming Human Endothelial to Hematopoietic Cells Requires Vascular Induction. *Nature*, 511, 312-318.
- Dos Santos, R.L., Tosti, L., Radziszewska, A., Caballero, I.M., Kaji, K., Hendrich, B., and Silva, J.C.R. (2014). MBD3/NuRD facilitates induction of pluripotency in a context-dependent manner. *Cell Stem Cell*, 15, 102-110.
- Schlaeger, T.M., Daheron, L., Brickler, T.R., Entwisle, S., Chan, K., Cianci, A., DeVine, A., Ettenger, A., Fitzgerald, K., Godfrey, M., Gupta D., McPherson J., Malwadkar P., Gupta M., Bell B., Doi A., Jung N., Li X., Lynes M.S., Brookes E., Cherry A.B., Demirbas D., Tsankov A.M., Zon L.I., Rubin L.L., Feinberg A.P., Meissner A., Cowan C.A., and Daley G.Q. (2015). A comparison of non-integrating reprogramming methods. *Nat Biotechnol*, 33, 58-63.
- Sekiya, S., and Suzuki, A. (2011). Direct conversion of mouse fibroblasts to hepatocyte-like cells by defined factors. *Nature*, 475, 390-393.
- Siminovitch, L., Till, J.E., and McCulloch, E.A. (1964). Decline in colony-forming ability of marrow cells subjected to serial transplantation into irradiated mice. *J Cell Physiol*, 64, 23-31.
- Skutelsky, E., and Danon, D. (1967). An electron microscopic study of nuclear elimination from the late erythroblast. *J Cell Biol*, 33, 625-635.
- Skutelsky, E., and Danon, D. (1970). Comparative study of nuclear expulsion from the late erythroblast and cytokinesis. *Exp Cell Res*, 60, 427-436.
- Son, E.Y., Ichida, J.K., Wainger, B.J., Toma, J.S., Rafuse, V.F., Woolf, C.J., and Eggan, K. (2011). Conversion of mouse and human fibroblasts into functional spinal motor neurons. *Cell Stem Cell*, 9, 205-218.
- Spangrude, G.J., Heimfeld, S., and Weissman, I.L. (1988). Purification and characterization of mouse hematopoietic stem cells. *Science*, 241, 58-62.
- Sturgeon, C.M., Ditadi, A., Awong, G., Kennedy, M., and Keller, G. (2014). Wnt signaling controls the specification of definitive and primitive hematopoiesis from human pluripotent stem cells. *Nat. Biotechnol*, 32, 554-561.
- Suzuki, N., Yamazaki, S., Yamaguchi, T., Okabe, M., Masaki, H., Takaki, S., Otsu, M., and Nakauchi, H. (2013). Generation of engraftable hematopoietic stem cells from induced pluripotent stem cells by way of teratoma formation. *Mol Ther J Am Soc Gene Ther*, 21, 1424-1431.

- Szabo, E., Rampalli, S., Risueño, R.M., Schnerch, A., Mitchell, R., Fiebig-Comyn, A., Levadoux-Martin, M., and Bhatia, M. (2010). Direct conversion of human fibroblasts to multilineage blood progenitors. *Nature*, 468, 521-526.
- Takahashi, K., and Yamanaka, S. (2006). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*, 126, 663-676.
- Takahashi, K., and Yamanaka, S. (2015). A developmental framework for induced pluripotency. *Dev Camb Engl*, 142, 3274-3285.
- Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K., and Yamanaka, S. (2007). Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*, 131, 861-872.
- Thom, C.S., Traxler, E.A., Khandros, E., Nickas, J.M., Zhou, O.Y., Lazarus, J.E., Silva, A.P.G., Prabhu, D., Yao, Y., Aribéana, C., Fuchs S.Y., Mackay J.P., Holzbaaur E.L., and Weiss M.J. (2014). Trim58 degrades Dynein and regulates terminal erythropoiesis. *Dev Cell*, 30, 688-700.
- Thomson, J.A., Itskovitz-Eldor, J., Shapiro, S.S., Waknitz, M.A., Swiergiel, J.J., Marshall, V.S., and Jones, J.M. (1998). Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*, 282, 1145-1147.
- Vidal, S.E., Amlani, B., Chen, T., Tsigirgos, A., and Stadtfeld, M. (2014). Combinatorial modulation of signaling pathways reveals cell-type-specific requirements for highly efficient and synchronous iPSC reprogramming. *Stem Cell Rep*, 3, 574-584.
- Vo, L.T., and Daley, G.Q. (2015). De novo generation of HSCs from somatic and pluripotent stem cell sources. *Blood*, 125, 2641-2648.
- Wang, L., Du, Y., Ward, J.M., Shimbo, T., Lackford, B., Zheng, X., Miao, Y., Zhou, B., Han, L., Fargo, D.C., Jothi R., Williams C.J., Wade P.A., and Hu G. (2014). INO80 facilitates pluripotency gene activation in embryonic stem cell self-renewal, reprogramming, and blastocyst development. *Cell Stem Cell*, 14, 575-591.
- Wang, W., Yang, J., Liu, H., Lu, D., Chen, X., Zenonos, Z., Campos, L.S., Rad, R., Guo, G., Zhang, S., Bradley A., and Liu P. (2011). Rapid and efficient reprogramming of somatic cells to induced pluripotent stem cells by retinoic acid receptor gamma and liver receptor homolog 1. *Proc Natl Acad Sci USA*, 108, 18283-18288.
- Worringer, K.A., Rand, T.A., Hayashi, Y., Sami, S., Takahashi, K., Tanabe, K., Narita, M., Srivastava, D., and Yamanaka, S. (2014). The let-7/LIN-41 pathway regulates reprogramming to human induced pluripotent stem cells by controlling expression of prodifferentiation genes. *Cell Stem Cell*, 14, 40-52.
- Yu, J., Vodyanik, M.A., Smuga-Otto, K., Antosiewicz-Bourget, J., Frane, J.L., Tian, S., Nie, J., Jonsdottir, G.A., Ruotti, V., Stewart, R., Slukvin I.I., and Thomson J.A. (2007). Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science*, 318, 1917-1920.
- Zhang, L., Flygare, J., Wong, P., Lim, B., and Lodish, H.F. (2011). miR-191 regulates mouse erythroblast enucleation by down-regulating Rik3 and Mxi1. *Genes Dev*, 25, 119-124.
- Zovein, A.C., Hofmann, J.J., Lynch, M., French, W.J., Turlo, K.A., Yang, Y., Becker, M.S., Zanetta, L., Dejana, E., Gasson, J.C., Tallquist M.D., and Iruela-Arispe M.L. (2008). Fate tracing reveals the endothelial origin of hematopoietic stem cells. *Cell Stem Cell*, 3, 625-636.