

Faculté de Pharmacie

Année 2024

Thèse N°

Thèse pour le diplôme d'État de docteur en Pharmacie

Présentée et soutenue publiquement

le 18 janvier 2024

Par

Stanislas VICTOR

Effets de l'énasidenib sur l'érythropoïèse ex-vivo

Thèse dirigée par Monsieur David Rizzo et Monsieur Xavier Lafarge

Examineurs :

Mme. Anne MARFAING-KOKA, Docteure en Médecine, MCU-PH, Hématologie biologique, Hôpital Antoine Béclère, Clamart

Mme. Audrey CRAS, Docteure en Pharmacie, MCU-PH, Faculté de Paris V

Mme Jasmine CHAUZEIX, Docteure en Pharmacie, MCU-PH, Faculté de Pharmacie de Limoges

M. Nicolas PICARD, Docteur en Pharmacie, PU-PH, Faculté de Pharmacie de Limoges

M. David RIZZO, Docteur en Médecine, MCU-PH, Faculté de Médecine de Limoges

M. Xavier LAFARGE, Docteur en Pharmacie, Directeur médical de l'EFS



Faculté de Pharmacie

Année 2024

Thèse N°

Thèse pour le diplôme d'État de docteur en Pharmacie

Présentée et soutenue publiquement

le 18 janvier 2023

Par Stanislas VICTOR

Effets de l'énasidenib sur l'érythropoïèse ex-vivo

Thèse dirigée par **Monsieur David Rizzo et Monsieur Xavier Lafarge**

Examineurs :

Mme. Anne MARFAING-KOKA, Docteure en Médecine, MCU-PH, Hématologie biologique, Hôpital Antoine Béclère, Clamart

Mme. Audrey CRAS, Docteure en Pharmacie, MCU-PH, Faculté de Paris V

Mme. Jasmine CHAUZEIX, Docteure en Pharmacie, MCU-PH, Faculté de Pharmacie de Limoges

M. Nicolas PICARD, Docteur en Pharmacie, PU-PH, Faculté de Pharmacie de Limoges

M. David RIZZO, Docteur en Médecine, MCU-PH, Faculté de Médecine de Limoges

M. Xavier LAFARGE, Docteur en Pharmacie, Directeur médical de l'EFS



Personnel enseignant de la Faculté de Pharmacie de Limoges

Le 1^{er} janvier 2023

Doyen de la Faculté

Monsieur le Professeur COURTIOUX Bertrand

Vice-doyen de la Faculté

Monsieur LÉGER David, Maître de conférences

Assesseurs de la Faculté

Monsieur le Professeur BATTU Serge

Monsieur le Professeur PICARD Nicolas

Professeurs des Universités – Hospitalo-Universitaires

M. PICARD Nicolas	Pharmacologie
Mme ROGEZ Sylvie	Microbiologie, parasitologie, immunologie et hématologie
M. SAINT-MARCOUX Franck	Toxicologie

Professeurs des Universités – Universitaires

M. BATTU Serge	Chimie analytique et bromatologie
M. CARDOT Philippe	Chimie analytique et bromatologie
M. COURTIOUX Bertrand	Microbiologie, parasitologie, immunologie et hématologie
M. DESMOULIERE Alexis	Physiologie
M. DUROUX Jean-Luc	Biophysique et mathématiques
Mme FAGNÈRE Catherine	Chimie organique, thérapeutique et pharmacie clinique
M. LIAGRE Bertrand	Biochimie et biologie moléculaire
Mme MAMBU Lengo	Pharmacognosie
M. TROUILLAS Patrick	Biophysique et mathématiques

Mme VIANA Marylène Pharmacie galénique

Maitres de Conférences des Universités – Hospitalo-Universitaires

M. BARRAUD Olivier (*) Microbiologie, parasitologie, immunologie et hématologie

Mme. CHAUZEIX Jasmine Microbiologie, parasitologie, immunologie et hématologie

M. JOST JérémY Chimie organique, thérapeutique et pharmacie clinique

Maitres de Conférences des Universités – Universitaires

M. BASLY Jean-Philippe (*) Chimie analytique et bromatologie

Mme BEAUBRUN-GIRY Karine Pharmacie galénique

Mme BÉGAUD Gaëlle Chimie analytique et bromatologie

M. BILLET Fabrice Physiologie

Mme BONAUD Amélie Microbiologie, parasitologie, immunologie et hématologie

M. CALLISTE Claude Biophysique et mathématiques

M. CHEMIN Guillaume Biochimie et biologie moléculaire

Mme CLÉDAT Dominique Chimie analytique et bromatologie

M. COMBY Francis Chimie organique, thérapeutique et pharmacie clinique

Mme DELEBASSÉE Sylvie Microbiologie, parasitologie, immunologie et hématologie

Mme DEMIOT Claire-Elise (*) Pharmacologie

M. FABRE Gabin Biophysique et mathématiques

M. LABROUSSE Pascal (*) Botanique et cryptogamie

Mme LAVERDET Betty Pharmacie galénique

M. LAWSON Roland Pharmacologie

M. LÉGER David Biochimie et biologie moléculaire

Mme MARRE-FOURNIER Françoise Biochimie et biologie moléculaire

M. MERCIER Aurélien	Microbiologie, parasitologie, immunologie et hématologie
Mme MILLOT Marion (*)	Pharmacognosie
Mme PASCAUD-MATHIEU Patricia	Pharmacie galénique
Mme POUGET Christelle (*)	Chimie organique, thérapeutique et pharmacie clinique
M. TOUBLET François-Xavier	Chimie organique, thérapeutique et pharmacie clinique
M. VIGNOLES Philippe (*)	Biophysique et mathématiques

(*) Titulaire de l'Habilitation à Diriger des Recherches (HDR)

Assistant Hospitalo-Universitaire

Mme MARCELLAUD Elodie	Chimie organique, thérapeutique et pharmacie clinique
------------------------------	---

Attachés Temporaires d'Enseignement et de Recherche

Mme KENE MALAHA Angéladine	Épidémiologie, statistique, santé publique
M. NASSER Mohamad	Pharmacognosie, botanique et mycologie

Enseignants d'anglais

M. HEGARTY Andrew	Chargé de cours
Mme VERCELLIN Karen	Professeur certifié

Remerciements

Je souhaite exprimer ma profonde gratitude envers tous les membres du jury qui ont généreusement accepté de participer à l'évaluation de cette thèse d'exercice. En particulier, je tiens à remercier chaleureusement Madame la Dre Anne MARFAING-KOKA pour son rôle essentiel dans l'éveil de ma passion et de ma curiosité pour l'hématologie.

Mes sincères remerciements vont à Monsieur le Dr Xavier LAFARGE, Directeur médical de l'EFS, qui a gracieusement accepté d'être mon maître de stage et directeur de thèse. Je suis reconnaissant envers Monsieur le Dr Zoran IVANOVIC pour m'avoir accueilli à l'EFS, et je tiens à exprimer ma reconnaissance envers toute l'équipe R&D de l'EFS pour leur précieux temps et leur assistance.

Un merci tout particulier à ma famille pour leur soutien indéfectible, en particulier à ma mère pour ses relectures attentives et son investissement en temps.

Mes amis et amies méritent également mes remerciements pour leur présence constante tout au long de cette aventure.

Je tiens à exprimer ma reconnaissance envers le personnel de l'internat, toujours souriant, qui a contribué à égayer mes journées avec leur dose quotidienne de bonne humeur.

À tous ceux qui, de près ou de loin, m'ont apporté leur soutien et leur aide, je leur adresse mes plus sincères remerciements.

Enfin, je m'accorde une note de reconnaissance personnelle pour avoir trouvé le temps, la patience, la force et l'énergie nécessaires afin de mener à bien ces études passionnantes et ce travail de longue haleine.

Droits d'auteurs

Cette création est mise à disposition selon le Contrat :

« **Attribution-Pas d'Utilisation Commerciale-Pas de modification 3.0 France** »

disponible en ligne : <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/fr/>



Liste des abréviations

Ac	:	Anticorps
ANSM	:	Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des produits de santé
ATP	:	Adénosine triphosphate
BFU-E	:	Unité de formation d'éclatement érythroïde
CD71	:	Cluster de différenciation 71
CFSE	:	Carboxyfluorescéine succinyl éthanolamine
CFU-E	:	Unité formant colonie érythroïde
CGR	:	Concentré de Globules Rouges
CMF	:	Cytométrie en flux
CMN	:	Cellules mononuclées
CO2	:	Dioxyde de Carbone
CS	:	Cellule souche
CSH	:	Cellules Souches Hématopoïétiques
CSM	:	Cellules Souches Mésenchymateuses
CTL	:	Contrôle
Ena	:	Énasidenib
Ena1	:	Énasidenib en phase I
EPO	:	Erythropoïétine
ES	:	Cellules souches embryonnaires humaines
FDA	:	Food and Drug Administration
GM-CSF	:	Facteur stimulant les colonies de granulocytes et de macrophages
GR	:	Globule rouge
GPA	:	Glycophorine A
G6PD	:	Glucose 6 phosphate déshydrogénase
HAS	:	Haute Autorité de Santé
Hb	:	Hémoglobine
HC	:	Hydrocortisone
HLA	:	Human Leukocyte Antigen
IDH1/2	:	Isocitrate Déshydrogénase de type 1 ou 2
IgG	:	Immunoglobine G
IL3	:	Interleukine-3
IPS	:	Cellules souches pluripotentes induites

ITC	:	Service de thérapie cellulaire innovante
LAM	:	Leucémie Aigüe Myéloblastique
MEB	:	Microscopie électronique à balayage
MGG	:	May Grunwald Giemsa
MO	:	Moelle osseuse
NS	:	Non significatif
O2	:	Dioxygène
PC	:	Protocole court
PL	:	Protocole long
PS	:	Phosphatidylsérine
P/S	:	Pénicilline Streptomycine
RPM	:	Rotations Par Minute
R-2-HG	:	R-2-hydroxyglutarate
SCF	:	Stem Cell Factor
SCID	:	Severe Combined Immunodeficiency
SP2	:	Protocole publication StemSpan 2 + supplément
TA	:	Température ambiante
Trf1	:	Transferrin Receptor 1
USP	:	Unité de Sang Placentaire
VEGF	:	Vascular Endothelial Growth Factor

Table des matières

Introduction	17
I. L'érythrocyte.....	19
I.1. Ontogénèse	19
I.2. Composition du sang	20
I.3. Constitution de l'érythrocyte	21
I.3.1. Association membrane plasmique et cytosquelette	22
I.3.2. Marqueurs membranaires érythrocytaires	23
I.3.3. Récepteur à la transferrine	25
I.3.3.1. Métabolisme du fer chez l'Homme	26
I.3.3.2. La transferrine.....	27
I.3.3.3. CD71 : récepteur à la transferrine	27
I.3.3.4. L'internalisation du fer	28
I.3.4. La Glycophorine A.....	28
I.3.5. Cinétique d'évolution du couple phénotypique CD71/GPA	29
I.3.6. Métabolisme du globule rouge.....	30
I.3.7. Synthèse de la globine	33
I.3.8. Synthèse de l'hème	34
I.3.9. La molécule d'hémoglobine	35
I.4. Fonctions des globules rouges.....	37
I.5. L'érythropoïèse in-vivo	40
I.5.1. La cellule souche hématopoïétique (CSH).....	41
I.5.2. Les progéniteurs communs	42
I.5.3. Les progéniteurs spécialisés	42
I.5.4. Etude clonogénique CFC (Colony-Forming Cells)	43
I.5.5. Les précurseurs hématopoïétiques.....	44
I.5.6. Localisation de l'érythropoïèse in-vivo	47
I.5.7. Régulation de l'érythropoïèse in vivo	50
I.5.7.1. Régulation physique intra-médullaire	51
I.5.7.2. Régulation chimique intra-médullaire	52
I.5.7.3. Autres mécanismes régulateur.....	54
I.5.8. L'EPO, ou érythropoïétine	55
I.5.8.1. Mécanisme d'action	55
I.5.8.2. Rétrocontrôles négatifs	56
I.5.8.3. EPO recombinantes	57
I.5.9. Rôle de l'oxygène dans la régulation de l'érythropoïèse in-vivo	59
I.5.10. Elimination des GR sénescents	63
I.6. L'érythropoïèse ex vivo	65
I.6.1. Chronologie des avancées scientifiques.....	65
I.6.2. Effets observés des variations d'O ₂ <i>in vitro</i>	67
I.6.3. Sources & cellules souches.....	71
I.6.4. Procédés de culture cellulaire in vitro disponibles.....	74

1.6.5. Avantages & inconvénients de l'érythropoïèse <i>ex vivo</i>	74
1.6.6. Présentation de l'énasidenib.....	77
II. Matériel et méthode.....	82
II.1. Isolement des cellules CD34+.....	82
II.1.1. Processus de sélection des cellules CD34+	82
II.1.2. Conservation des cellules CD34+.....	85
II.1.3. Etapes préliminaires aux protocoles de cultures cellulaire	85
II.2. Protocoles d'érythropoïèse <i>ex vivo</i>	86
II.2.1. Protocole court (PC)	86
II.2.2. Protocole long	89
II.2.2.1. Cellule Souche Mésenchymateuse (CSM)	91
II.2.2.2. Coculture des CSM	92
II.2.3. Protocole SP2	92
II.2.4. Ajout de l'énasidenib	93
II.3. Etude de la prolifération cellulaire	94
II.3.1. Etude de la viabilité au bleu de Trypan	94
II.3.2. Marquage au 7-AAD.....	94
II.3.3. Marquage à l'Annexine-V / Iodure de Propidium.....	95
II.3.4. Multiplication cellulaire.....	97
II.3.5. Histoire proliférative, marquage au CFSE.....	98
II.4. Etude de la différenciation cellulaire.....	99
II.4.1. Phénotype CD71/GPA.....	99
II.4.1.1. Etude de l'intensité moyenne de fluorescence (MFI) du CD71 et % CD71 "high"	99
II.4.1.2. Marqueur de la GPA	101
II.4.1.3. Suivi du couple CD71/GPA	101
II.4.2. CFC étude clonogénique	101
II.4.3. Hémoglobinisation	102
II.4.4. Coloration au May Grunwald Giemsa (MGG) et aspect cytologique	102
II.5. Différenciation érythroïde en fonction de la prolifération cellulaire associée	103
II.6. Statistiques	104
III. Résultats	106
III.1. Etude de la toxicité de l'énasidenib	106
III.1.1. Marquage au 7-AAD.....	106
III.1.2. Marquage Annexine-V / Iodure du Propidium	107
III.2. Etude de la prolifération cellulaire	110
III.2.1. Multiplication cellulaire.....	111
III.2.1.1. Avec le protocole court.....	111
III.2.1.2. Protocole long	114

III.2.1.3. Protocole SP2	114
III.2.2. Etude de l'histoire proliférative, marquage au CFSE.....	116
III.3. Etude de l'effet de l'énasidenib sur la différenciation érythroïde	118
III.3.1. Expression du CD71	119
III.3.1.1. MFI (Mean Fluorescence Intensity) du CD71	119
III.3.1.2. pourcentage de cellules exprimant fortement le CD71 (CD71 « high »)	122
III.3.2. Evolution du phénotype CD71/GPA.....	125
III.3.2.1. Evolution des Couples (CD71+/ GPA-) et (CD71+/GPA+) (low,mid,high)...	125
III.3.2.2. Couple CD71-/GPA+	130
III.3.3. Différenciation érythroïde en fonction de la prolifération cellulaire associée.....	130
III.3.4. Etude du potentiel clonogénique.....	133
III.3.4.1. Numération des BFU-E	133
III.3.4.2. Numération des CFU-E	135
III.3.5. Hémoglobinisation	137
III.3.6. Analyse cytologique des cellules en culture.....	138
IV. Discussion	147
V. Conclusion & Perspectives.....	153
VI. Bibliographie	155
VII. Annexes.....	168
Serment De Galien.....	176

Table des illustrations

Figure 1. Réactions catalysées par l'enzyme IDH dans sa forme sauvage et mutée.....	18
Figure 2. Localisations de l'érythropoïèse au cours la vie in utero.....	19
Figure 3. Localisations de l'érythropoïèse au cours de la vie fœtale et chez l'adulte.....	20
Figure 4. Le sang et ses constituants.....	21
Figure 5. Aspect biconcave du GR en MEB.....	22
Figure 6. Association entre la membrane plasmique et le cytosquelette érythrocytaires.....	23
Figure 7. Diversité antigénique (plus de 320 antigènes) des groupes sanguins chez l'Homme.....	24
Figure 8. Cinétique d'apparition des marqueurs membranaires au cours de la différenciation érythroïde.....	25
Figure 9. Distribution du fer chez l'Homme.....	26
Figure 10. Internalisation du fer par endocytose et recyclage du CD71 (Trf1).....	28
Figure 11. GPA présente au niveau des complexes macromoléculaires.....	29
Figure 12. Cinétique d'expression des marqueurs CD71 et GPA de la lignée érythroïde.....	30
Figure 13. Métabolisme du glucose chez le globule rouge.....	31
Figure 14. Système d'oxydoréduction chez le GR.....	31
Figure 15. Hématie fantôme retrouvée dans le déficit en G6PD.....	32
Figure 16. Famille multigénique des gènes de globines.....	33
Figure 17. Chronologie des différentes chaînes de globine au cours du développement.....	33
Figure 18. Structure de l'hémoglobine.....	35
Figure 19. Structures tertiaire et quaternaire de l'hémoglobine.....	36
Figure 20. Hémoglobines présentes chez l'adulte et le nouveau-né.....	37
Figure 21. Aspects elliptique et biconcave du GR contribuant à sa déformabilité.....	37
Figure 22. Echanges gazeux au niveau des alvéoles pulmonaires.....	38
Figure 23. Processus de coagulation au sein des vaisseaux sanguins.....	39
Figure 24. Arbre hématopoïétique.....	40
Figure 25. La lignée rouge.....	41
Figure 26. Lignée érythroblastique : du progéniteur spécialisé à la cellule mature fonctionnelle.....	43
Figure 27. Lignée érythroïde chez l'Homme.....	44
Figure 28. Schéma d'épiphyse d'os long.....	47
Figure 29. Coupe histologique d'os mettant en évidence les logettes médullaires.....	48
Figure 30. Ilot érythroblastique.....	49
Figure 31. Diapédèse ou entrée des cellules rouges dans le sang périphérique.....	50
Figure 32. Différents types de vaisseaux sanguins.....	50
Figure 33. Interactions entre la CSH et son environnement médullaire.....	51
Figure 34. Influence du SCF et de l'EPO.....	52
Figure 35. EPO et sa voie de signalisation JAK2/STAT5.....	55
Figure 36. Boucle de rétrocontrôle négatif impliquant Fas-FasL.....	56
Figure 37. Structure primaire de l'EPO endogène.....	57
Figure 38. Relation entre glycosylations et activité biologique.....	58
Figure 39. Libération d'EPO en réponse à une diminution de la PaO ₂	60
Figure 40. Variations des concentrations en O ₂ dans l'organisme.....	61
Figure 41. Effet du facteur HIF en réponse à l'hypoxie.....	62
Figure 42. Elimination des érythrocytes sénescents.....	64
Figure 43. érythropoïèse ex vivo selon le protocole de Luc DOUAY, Marie-Christine GIARRATANA et al.....	66
Figure 44. Impact des ROS sur le destin des CSH.....	68
Figure 45. Phase 0 du cycle cellulaire, état de quiescence.....	69
Figure 46. Devenir cellulaire selon les concentrations d'O ₂ exposées.....	70
Figure 47. Structure chimique de l'énasidenib.....	77
Figure 48. L'IDH2 mutée converti préférentiellement l'α-CG.....	79
Figure 49. Mécanisme d'action de l'énasidenib.....	80
Figure 50. Effet de l'énasidenib sur la différenciation érythroïde (illustré par Ritika DUTTA et al).....	81
Figure 51. Sélection immunomagnétique des cellules CD34+.....	83
Figure 52. Chronologie des étapes retrouvées en PC.....	88

Figure 53. Chronologie des phases en PL.....	90
Figure 54. Chronologie du protocole SP2.....	93
Figure 55. Numération cellulaire en cellules de Malassez	94
Figure 56. Principe du marquage par l'annexine-V de la phosphatidylsérine externalisée.....	95
Figure 57. Marquage A5/IP à J5 du PC	96
Figure 58. Méthode de calculs des FE aux différents jours en PC	97
Figure 59. Principe du marquage au CFSE	98
Figure 60. Etude de la toxicité de l'énasidenib, en concentration croissante, révélée au 7-AAD. En PC	106
Figure 61. Etude de la toxicité de l'énasidenib au 7-AAD, avec le protocole long et SP2.....	107
Figure 62. Cytogrammes de mortalité cellulaire à J7, en PC	108
Figure 63. étude de la mortalité cellulaire. Marquage à l'A5/IP à J5 en PC.....	109
Figure 64. étude de la mortalité cellulaire. Marquage à l'A5/IP, à J7 en PC.....	109
Figure 65. Tests évaluant la prolifération érythroïde, réalisés aux différents jours de la culture in vitro	110
Figure 66. Expansion cellulaire en PC CO=10 000/mL et dilution réalisée à J4 1/5^{ème}	111
Figure 67. Expansion cellulaire en PC CO=10 000/mL et toutes dilutions réalisées à J4	112
Figure 68. Expansion cellulaire avec le PC (toutes conditions)	113
Figure 69. Expansion cellulaire retrouvée selon le protocole long	114
Figure 70. Expansion cellulaire avec le protocole SP2	115
Figure 71. Histoire proliférative suivi en marquage CFSE entre J0 et J4. (PC).....	116
Figure 72. Histoire proliférative suivie en marquage CFSE entre J0 et J4	117
Figure 73. Protocole expérimental d'étude de la différenciation érythroïde	118
Figure 74. MFI CD71 en PC	119
Figure 75. MFI CD71 en SP2	120
Figure 76. MFI CD71 en PL.....	121
Figure 77. pourcentage des cellules exprimant fortement le CD71	122
Figure 78. % de cellules CD71 "high" en PC	123
Figure 80. %CD71 « high » avec le protocole SP2 (n=4 à J7, n=3 à J11 et J15).....	124
Figure 81. pourcentage de cellules érythroïdes CD71 « high » avec PL	125
Figure 82. % de cellules (CD71+/GPA-) et (CD71+/GPA+) , à J7 et J11 avec le PC.....	126
Figure 83. % de cellules (CD71+/GPA-) et (CD71+/GPA+) , à J7, J11, J15 et J18 avec le PC.....	127
Figure 84. % de cellules (CD71+/GPA-) et (CD71+/GPA+) à J7 et J11 avec PL	128
Figure 85. %(CD71+/GPA-) et %(CD71+/GPA+) à J7 et J11 avec le protocole SP2	129
Figure 86. évolution du phénotype (CD71-/GPA+) à J15 et J18 en PC	130
Figure 87. Nombre de cellules CD71+ GPA+	131
Figure 88. Nombre de cellules CD71+ GPA + avec le PC.....	131
Figure 89. Nombre de cellules CD71+ GPA+ en PL.....	132
Figure 90. Nombre de cellules CD71+ GPA+ (protocole SP2)	132
Figure 91. BFU-E à J4 avec le PC, conditions contrôle (gauche) et Ena1 (droite).....	133
Figure 92. BFU-E/ml avec le protocole court	133
Figure 93. BFU-E/ml avec le protocole long	134
Figure 94. BFUe/mL avec le protocole SP2	134
Figure 95. CFU-E au microscope en PC	135
Figure 96. CFU-E/ml avec le protocole court.	135
Figure 97. CFU-E/ml avec le protocole long.....	136
Figure 98. CFUe/mL avec le protocole SP2	137
Figure 99. Culots cellulaires mettant en évidence l'hémoglobine	137
Figure 100. Culots érythrocytaire en PL vs SP2 à J15 (n=1).....	138
Figure 101. Lame colorée au MGG à J18 du PC	139
Figure 102. Lame colorée au MGG à J18 du PC	140
Figure 103. Lame colorée au MGG , à J18 du PC.....	141
Figure 104. Méthode de comptage des cellules	142
Figure 105. Lame en condition contrôle avec le logiciel Paint	143
Figure 106. Lame colorée au MGG , à J18, avec le protocole SP2	145
Figure 107. Lame colorée au MGG , à J18, avec le protocole SP2	146

Table des tableaux

<i>Tableau 1. Résumé des paramètres pharmacocinétiques d'IDHIFA.....</i>	<i>78</i>
<i>Tableau 2. Concentrations finales des cytokines du PC.....</i>	<i>86</i>
<i>Tableau 3. Conditions expérimentales retrouvées en PC.....</i>	<i>88</i>
<i>Tableau 4. Conditions expérimentales retrouvées en PL.....</i>	<i>89</i>
<i>Tableau 5. Concentrations finales des cytokines en PL.....</i>	<i>89</i>
<i>Tableau 6. Protocole de préparation du milieu de culture avec le protocole long.....</i>	<i>90</i>
<i>Tableau 7. Concentrations des suppléments ajoutés en protocole SP2.....</i>	<i>92</i>
<i>Tableau 8. Conditions expérimentales retrouvées en protocole SP2.....</i>	<i>92</i>
<i>Tableau 9. Quantité de cellules à ensemercer à J0, J4 et J7.....</i>	<i>102</i>

Introduction

Plus d'un siècle après la découverte des groupes sanguins par Landsteiner (système ABO, 1901), la transfusion des globules rouges (GR) est devenue une procédure médicale courante. Cette opération permet de soulager les symptômes de l'anémie (correspondant à une diminution de l'hémoglobinémie) en administrant du sang ou des dérivés sanguins via une perfusion intraveineuse. La transfusion de GR permet de corriger rapidement l'anémie chez le patient en remontant l'hémoglobinémie d'en moyenne 1 g/dL par culot de globules rouges (CGR) transfusé, prélevé sur sang total ou lors d'aphérèse, contribuant ainsi à maintenir de manière significative la qualité de vie et la santé de nombreux patients. (1) Cependant, le phénomène du « sang rare », correspondant à un phénotype de GR rare, reste un défi particulier car la disponibilité de ce produit est loin d'être toujours garantie de manière égale pour tous les patients. En France, un groupe sanguin est dit « rare » lorsque, dans la population, moins de 4 personnes sur 1 000 en sont détenteurs. Environ 250 groupes sanguins rares sont identifiés dans notre pays, et cela concerneraient environ 700 000 individus qui, pour la grande majorité d'entre eux, n'auront jamais besoin d'être transfusés. (2) (3)

Six décennies d'exploration de l'érythropoïèse, depuis la découverte des progéniteurs érythropoïétiques et des cellules souches hématopoïétiques, ont permis de comprendre l'évolution de ce processus *ex vivo* et d'envisager la production de populations cellulaires hématopoïétiques en dehors du corps humain. Ces cellules produites artificiellement pourraient contribuer dans les contextes de greffe et de transfusion, offrant ainsi une solution complémentaire aux dons de sang traditionnels. La possibilité de recueillir facilement les cellules souches, identifiées CD34+, dans le sang périphérique après mobilisation au G-CSF (Granulocyte-Colony Stimulating Factor), ou dans le sang de cordon ombilical à la naissance, ouvre des perspectives thérapeutiques considérables. En effet, la production *ex vivo* de GR est réalisable à partir de la prolifération d'un petit nombre de cellules souches sanguines, médullaires ou placentaires. Cette dernière source est particulièrement intéressante, du fait de sa richesse en progéniteurs immatures et de sa capacité d'expansion plus importante que les cellules issues des deux autres sources, autorisant ainsi une prise de greffe chez l'enfant et parfois chez l'adulte. (4)

De nos jours, l'érythropoïèse *ex vivo* connaît un véritable essor, se rapprochant davantage de ce qu'est capable de réaliser le corps humain en matière de production de cellules matures fonctionnelles. En effet, une production accrue d'érythrocytes est envisageable en combinant, au cours de la culture cellulaire, certaines molécules, à certains moments précis. Ainsi, les antioxydants sont particulièrement attrayants du fait qu'ils favorisent une érythropoïèse efficiente en limitant les dommages générés par le stress oxydatif. Ces molécules physiologiques, telles que le sélénium, les vitamines C et E, et le zinc permettent, entre autres, de stimuler ce processus au sein de l'organisme. (5) C'est en ce sens que l'équipe Recherche & Développement de l'Etablissement Français du Sang a orienté ses recherches afin d'étudier une molécule antioxydante isolée à partir de la vigne (nom de code : B-red), révélant un effet catalyseur de cette molécule sur l'engagement érythroïde. A ce titre, d'une manière générale la Recherche souhaiterait élargir son éventail d'éléments potentialisateurs, en s'intéressant aux progrès que pourraient apporter diverses molécules, telle que l'énasidenib (IDHIFA®). Ce médicament, initialement employé dans le traitement de la leucémie myéloïde aigüe (LAM), est décrit comme un inhibiteur de l'isocitrate déshydrogénase 2 (IDH2) sous sa forme mutée.

Cette enzyme mutée possède une activité altérée à l'origine d'une production accrue de 2-hydroxyglutarate (2-HG), un oncométabolite responsable des principaux signes tumoraux observés. Des études cliniques ont permis de révéler une amélioration inattendue de l'hémoglobinémie et de l'indépendance transfusionnelle chez des patients atteints de LAM traités à l'aide de cette thérapie ciblée.

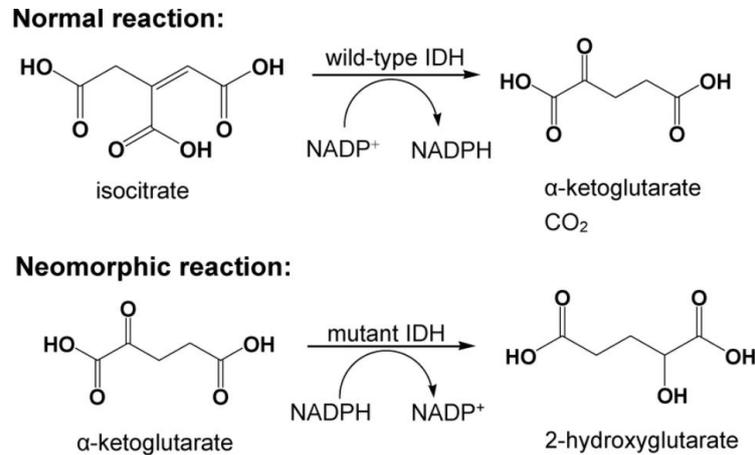


Figure 1. Réactions catalysées par l'enzyme IDH dans sa forme sauvage et mutée.

À la suite de ces observations, Ritika DUTTA et son équipe, ont mené de récentes recherches afin d'évaluer le potentiel effet de cette molécule sur la différenciation des globules rouges produits *ex vivo* à partir de cellules CD34+. Il a été démontré que l'énasidenib posséderait une influence positive sur la différenciation érythrocytaire. (6) (7) (8) (9)

Dans cette perspective, il est intéressant de s'interroger sur l'influence que pourrait avoir cette molécule sur l'érythropoïèse *ex vivo*, afin d'établir sa contribution au processus de production artificiel de GR. Il serait intéressant notamment de connaître l'influence que pourrait avoir l'énasidenib sur l'engagement et la différenciation érythroïdes, accélérant potentiellement cette procédure de synthèse *in vitro*. Le but étant, à long terme, de concevoir et développer une méthode à l'échelle clinique, transférable au niveau industriel. Cette procédure pourrait participer à favoriser la production d'hématies de phénotype d'intérêt, et améliorer in fine la gestion des « sangs rares ».

I. L'érythrocyte

Préalablement à la présentation des travaux illustrant l'influence de l'énasidenib sur l'érythropoïèse *ex vivo*, il est important de comprendre ce processus physiologique au sein de l'organisme. Il est nécessaire, au même titre, d'examiner certaines caractéristiques fondamentales du globule rouge (GR) ; d'où il provient, comment il se forme et se comporte, et les fonctions vitales assurées par ce dernier dans le corps humain. Nous exposerons, par la suite, les récents protocoles permettant de produire des GR *ex vivo*.

I.1. Ontogénèse

Le tissu hématopoïétique apparaît tôt au cours du développement embryonnaire humain. Il va progressivement évoluer dans ses localisations, ses fonctions et ses aspects cytologiques afin d'aboutir, à la naissance, à une hématopoïèse (ou érythropoïèse) de type adulte. (10)

Au cours de la vie embryonnaire, l'hématopoïèse se développe en plusieurs vagues successives caractérisées par un schéma de production de cellules sanguines distinct. Ce processus débute vers le 21^{ème} jour de la vie utérine avec la formation des îlots sanguins localisés au niveau du sac vitellin puis, se poursuit dans la région AGM (aorte – gonade – mésonéphros) entourant l'aorte dorsale de l'embryon et le placenta. Les cellules souches hématopoïétiques (CSH) y produisent GR et macrophages. Les cellules érythropoïétiques formées synthétisent une hémoglobine embryonnaire.

La deuxième vague, correspond à l'hématopoïèse hépatique, se met ensuite en place vers la 6^{ème} semaine de gestation et dure pendant la plus grande partie de la vie fœtale. Les CSH se forment au niveau du foie fœtal et y produisent GR, plaquettes et globules blancs. Il existe aussi une colonisation splénique mais l'érythropoïèse y est moins importante. (11)

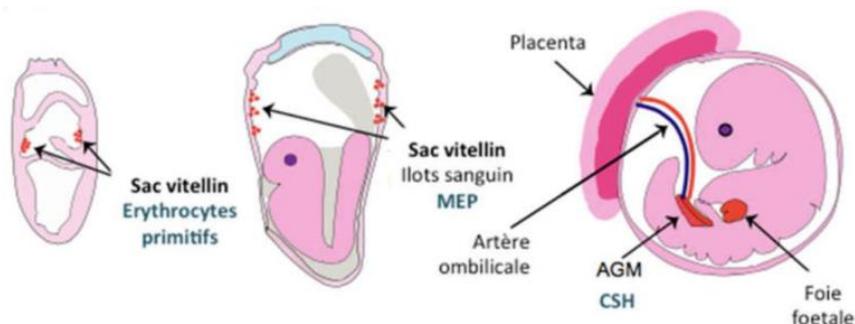


Figure 2. Localisations de l'érythropoïèse au cours la vie in utero

Enfin, la troisième vague, localisée au niveau de la moelle osseuse, prend le relai vers le 4^{ème} mois de la vie fœtale et se poursuit jusqu'à la naissance. Cette localisation médullaire devient prépondérante vers le 7^{ème} mois de gestation et les CSH y produiront la totalité des cellules sanguines. En conditions physiologiques, la répartition des progéniteurs érythroïdes est de 90% dans la moelle osseuse et 10% dans la rate. (12)

Chez l'enfant de bas âge, tous les os possèdent une moelle hématopoïétique active, puis vers cinq ans, une transformation adipeuse de la moelle osseuse débute dans les os longs. Finalement, seuls les os plats et courts (vertèbres, sacrum, os iliaque, côtes, sternum, os du crâne) conserveront cette fonction chez l'adulte.

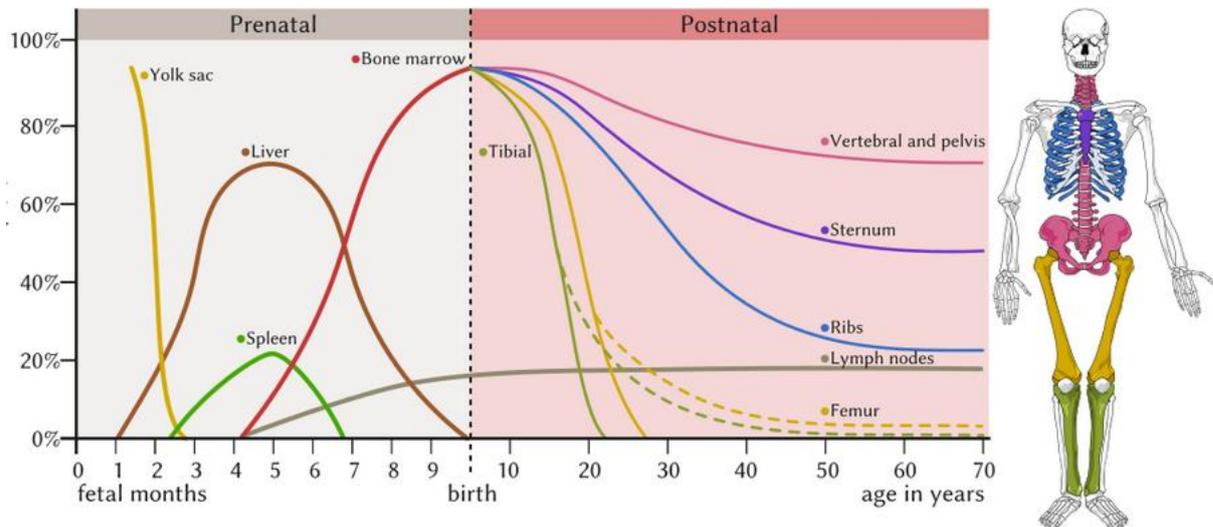


Figure 3. Localisations de l'érythropoïèse au cours de la vie fœtale et chez l'adulte

Au cours de la vie embryonnaire, il existe un étroit lien entre la vasculogénèse (correspondant à la formation du réseau vasculaire primitif) et l'érythropoïèse, les deux processus se produisant simultanément au niveau des mêmes tissus. Les angioblastes, cellules souches embryonnaires pluripotentes, se différencient en CSH et jouent un rôle crucial dans la formation des premiers vaisseaux sanguins et des premières cellules sanguines. Lors de la vasculogénèse, ces cellules se rassemblent pour former des agrégats vasculaires primaires qui se différencieront en cellules endothéliales, tapissant la lumière des vaisseaux sanguins. Ces dernières assurent la synthèse de VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*) qui intervient dans la vasculogénèse et l'érythropoïèse. (13)

I.2. Composition du sang

Le sang est constitué de plasma et d'éléments figurés en suspension dans ce dernier. Les différentes cellules sanguines sont représentées par les hématies, les leucocytes, qui protègent l'organisme contre les infections en éliminant les agents pathogènes, et les plaquettes qui participent à l'hémostase et la cicatrisation des tissus.

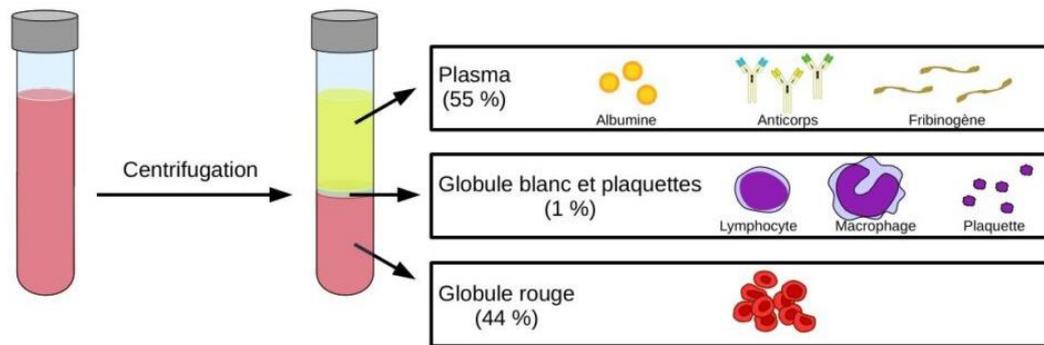


Figure 4. Le sang et ses constituants

Le plasma, liquide transparent et jaunâtre, représente plus de la moitié du volume du sang total (55%). L'eau, les protéines, les lipides, les sels et les hormones reflètent sa composition à hauteur de 90%. Parmi les protéines en suspension dans ce liquide nous retrouvons l'albumine (principale protéine de transport du sang), les immunoglobulines qui interviennent dans la défense de l'organisme, mais également les facteurs de coagulation et le fibrinogène, qui participent de concert à l'hémostase. Le plasma occupe une fonction importante dans le transport des cellules sanguines, nutriments et hormones, contribuant ainsi à la défense contre les infections et à la coagulation du sang.

I.3. Constitution de l'érythrocyte

Le globule rouge (GR), également appelé hématie ou érythrocyte, est la cellule sanguine la plus abondante de l'organisme. L'étymologie de l'érythrocyte provient du grec « eruthros » et « kutos », qui signifient respectivement rouge et cellule. Petite cellule d'un diamètre de 7 à 8 μm , son épaisseur varie du bord (2,5 μm) à la partie centrale (1 μm). Sa morphologie exceptionnelle lui confère ses diverses propriétés lui permettant d'assurer ses fonctions au sein de l'organisme. En effet, sa morphologie particulière de type discoïde et biconcave lui permet d'une part, d'avoir une plus grande surface par rapport à son volume, optimisant ainsi les échanges gazeux, et d'autre part, d'avoir une plus grande déformabilité permettant sa libre circulation dans les micro-vaisseaux sanguins.

De plus, l'hématie est caractérisée par sa couleur rouge foncé du fait de la présence de l'hémoglobine (Hb). L'érythrocyte est saturé en Hb, on ne compte pas moins de 280 millions de molécules par cellule, représentant environ un tiers de sa masse. Le GR, dépourvu de noyau et d'organites, doit assurer la synthèse protéique avant sa maturation finale, synonyme d'éjection du noyau.

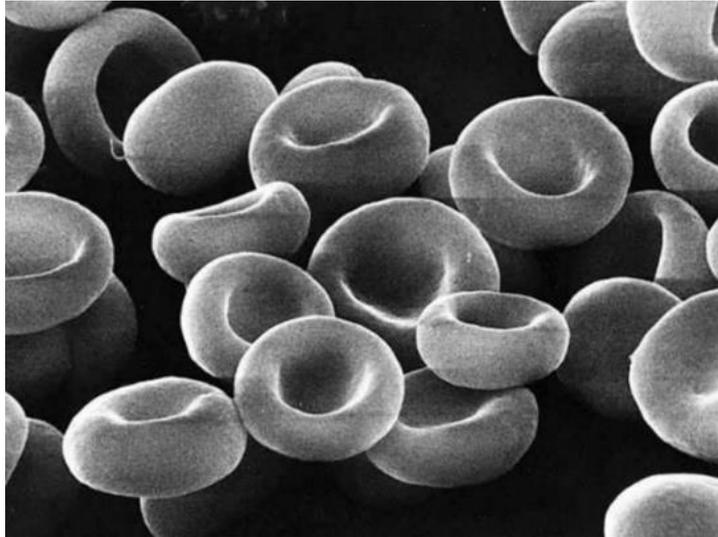


Figure 5. Aspect biconcave du GR en MEB

La membrane plasmique participe à cette morphologie si particulière et confère ainsi au GR ses propriétés remarquables lui permettant de circuler librement dans l'ensemble de l'organisme. Afin d'assurer la communication entre l'intérieur et l'extérieur de la cellule, divers récepteurs membranaires contribuent à remplir cette fonction.

Intéressons-nous plus particulièrement à cette membrane plasmique.

I.3.1. Association membrane plasmique et cytosquelette

La membrane plasmique érythrocytaire, organisée sous forme de bicouche lipidique, est composée de lipides, glucides et protéines. L'agglutination avec les hématies voisines est empêchée grâce à la charge négative globale extérieure. Cette membrane offre à la cellule une importante capacité de déformation lui permettant de traverser les capillaires les plus étroits du corps, du fait de sa finesse et de sa flexibilité. (14) Plus précisément cette propriété d'élasticité est, entre autres, permise par l'association entre la membrane plasmique et le cytosquelette de la cellule. (15)

Le cytosquelette érythrocytaire est composé de protéines fibreuses (dont la spectrine majoritairement), reliées entre elles par des complexes de jonctions, eux-mêmes composés de filaments d'actine, d'ankyrine et de tropomyosine. En effet, l'actine qui est l'un des trois constituants du cytosquelette de toute cellule eucaryote, est un élément essentiel de la contraction musculaire. L'ankyrine, protéine d'ancrage, permet la liaison du cytosquelette à la membrane plasmique et la spectrine, protéine flexible, offre une grande capacité d'étirement et de torsion, afin de s'adapter aux différents mouvements de la cellule. Ce squelette s'organise en un réseau régulier de filaments formant une sorte de maillage qui tapisse la paroi interne de la membrane plasmique du GR. (16)

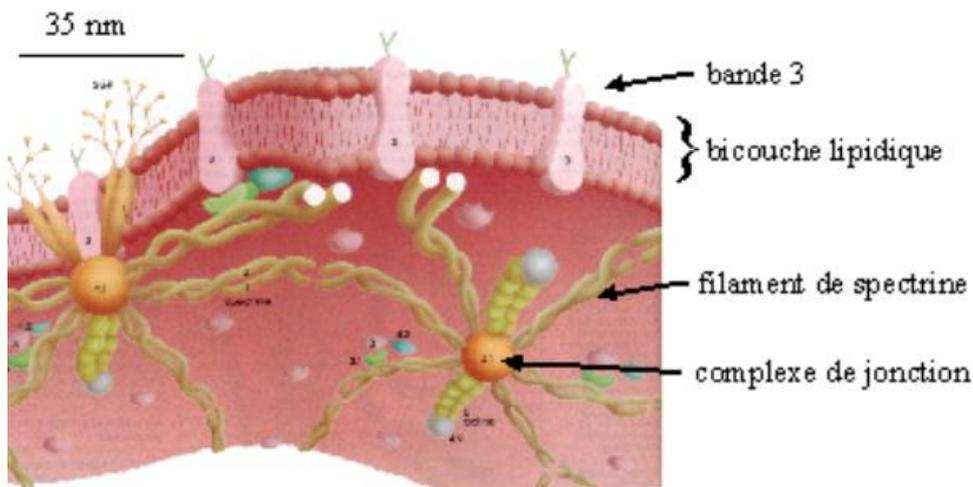


Figure 6. Association entre la membrane plasmique et le cytosquelette érythrocytaires

Grâce à ce cytosquelette, la membrane plasmique peut supporter des contraintes physiques importantes, telles que les forces de cisaillement, la pression hydrostatique, l'osmose, les forces de frottement et les forces de tension exercées dans les vaisseaux sanguins. Cette résistance empêche ainsi l'hémolyse des GR et offre la souplesse nécessaire afin de circuler dans et à travers les vaisseaux sanguins. Cette combinaison particulière entre cytosquelette et membrane plasmique permet à la cellule de se déformer de trois façons différentes, par : extension-compression, cisaillement ou courbure.

Une mutation du gène codant pour la spectrine (plus rarement l'ankyrine) empêche une association efficace entre la membrane et le cytosquelette. Cette mutation, retrouvée dans la sphérocytose héréditaire, aboutit à la formation de GR sphériques qui ne peuvent plus se déformer de manière optimale. Les cellules deviennent plus vulnérables et subissent une hémolyse précoce dans les vaisseaux sanguins. En cas d'hémolyse excessive, cela peut conduire au développement d'anémie.

I.3.2. Marqueurs membranaires érythrocytaires

Les marqueurs membranaires érythrocytaires sont des éléments clés qui participent au bon fonctionnement et à la survie de l'érythrocyte. Ces éléments interviennent dans les interactions avec leur environnement (cellules, molécules, matrices), et participent à la communication intercellulaire, en transmettant les signaux à l'intérieur de la cellule.

Ces divers marqueurs membranaires sont également à l'origine de l'identification des divers groupes sanguins. En effet, plusieurs systèmes de classification ont été décrits de nos jours (les plus connus étant les systèmes ABO et Rhésus), et sont définis par la présence ou l'absence de certains antigènes à la membrane plasmique érythrocytaire (cependant, les antigènes ABO sont ubiquitaires dans l'organisme). (17) (18)

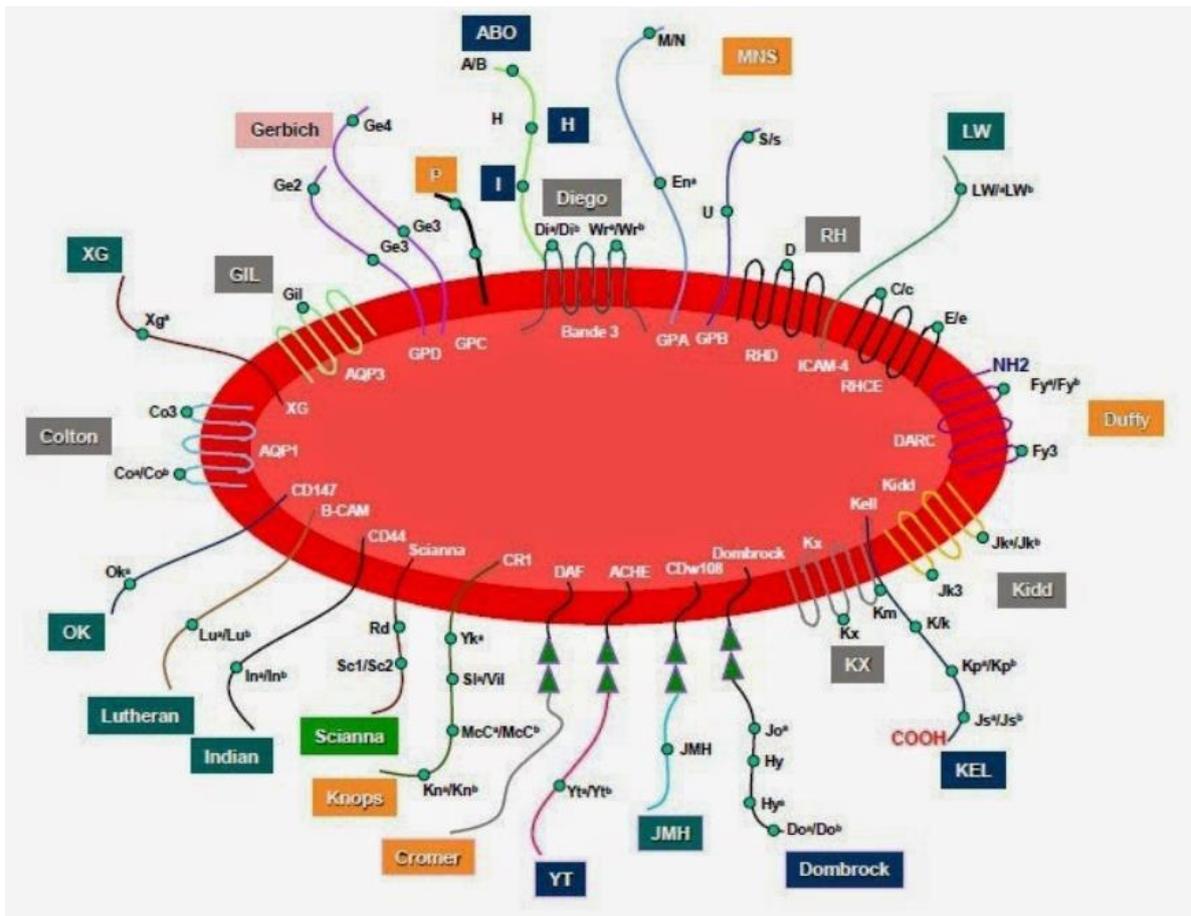


Figure 7. Diversité antigénique (plus de 320 antigènes) des groupes sanguins chez l'Homme

Chez le GR, il est important de faire la distinction entre le polymorphisme et les mutations génétiques, les premiers sont des variations génétiques physiologiques, tandis que les secondes peuvent être à l'origine de pathologies. En effet, le polymorphisme correspond à des variations génétiques qui se produisent fréquemment dans une population donnée. Elles sont, par exemple, retrouvées au niveau des gènes codant pour les antigènes des différents groupes sanguins et peuvent ainsi influencer la compatibilité entre donneurs et receveurs de sang. Une incompatibilité peut survenir entre le sang d'un donneur de groupe sanguin A et celui d'un receveur de groupe sanguin B. En revanche, les mutations génétiques peuvent être à l'origine de pathologies hématologiques, telles que la drépanocytose ou la thalassémie. Ces mutations ont un impact beaucoup plus délétère car elles altèrent directement la structure et la fonction de protéines (type hémoglobines) impliquées dans la formation des GR. Ces phénomènes, généralement rares, sont transmis de manière héréditaire à la descendance et peuvent entraîner des anémies hémolytiques et des complications vasculaires dans les formes les plus graves. (19) (20)

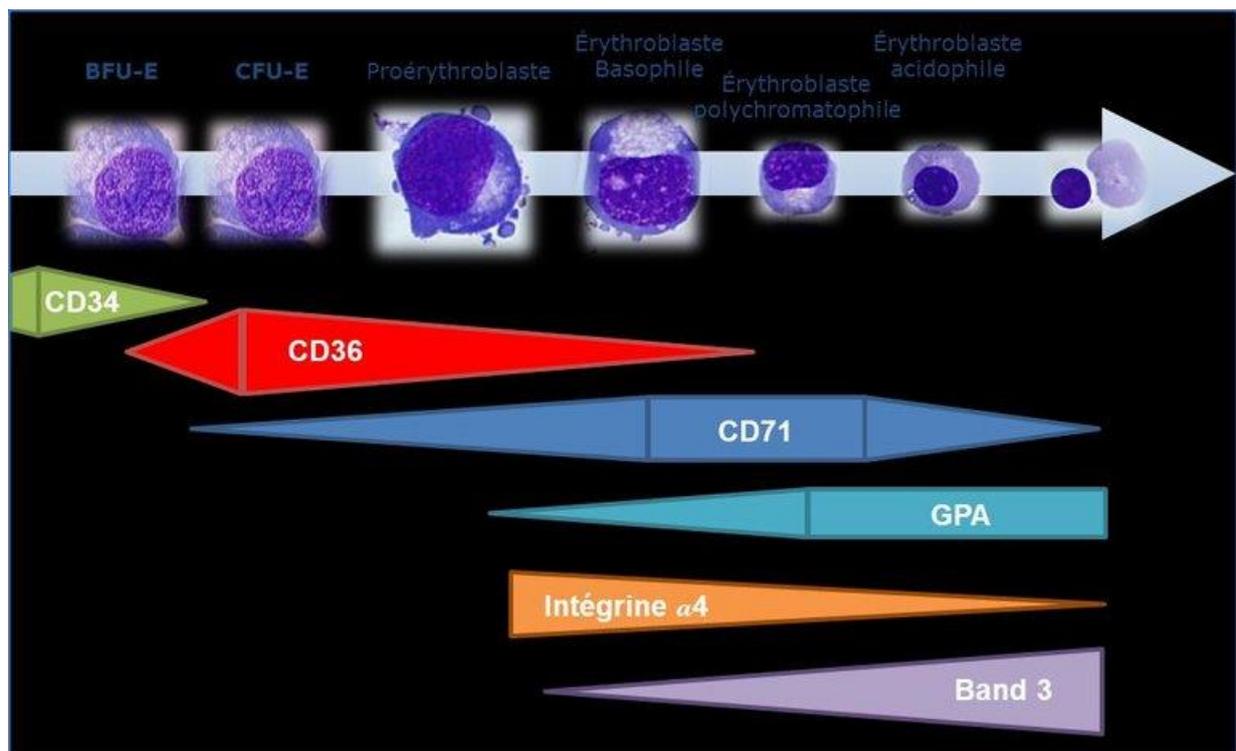


Figure 8. Cinétique d'apparition des marqueurs membranaires au cours de la différenciation érythroïde

Il est également possible de suivre la cinétique d'évolution des marqueurs membranaires, reflétant le stade de développement de la cellule et ainsi connaître son avancement au sein de la lignée rouge. Certains indicateurs, présents dès les stades précoces, disparaîtront au fur et à mesure de l'évolution de la cellule, notamment le marqueur CD34. D'autres marqueurs temporaires émergeront à un stade spécifique pour ensuite disparaître avant d'atteindre la forme mature finale. À titre d'exemple, le marqueur CD71 est exprimé au moment où la cellule commence sa synthèse d'hémoglobine et disparaît avant l'expulsion du noyau, signe de maturité cellulaire. Certains marqueurs, tels que la glycophorine A (GPA), apparaissent au cours du développement et demeurent présents à la membrane érythrocytaire pendant toute la durée de vie des globules rouges.

I.3.3. Récepteur à la transferrine

Le CD71, également connu sous le nom de Trf1 (Transferrin Receptor de type 1), participe à la fixation de la transferrine, principal transporteur de fer au sein de l'organisme. Cette étape contribue à l'intégration du fer au sein de la cellule, permettant à celle-ci de finaliser la synthèse d'hémoglobine.

I.3.3.1. Métabolisme du fer chez l'Homme

Au sein de l'organisme, le fer joue un rôle essentiel dans le maintien de diverses fonctions biologiques vitales, telles que la respiration cellulaire, la synthèse d'ADN et la croissance cellulaire. (21) Cependant, en raison de sa capacité à gagner ou perdre des électrons, le fer peut participer à des réactions potentiellement délétères pour l'organisme, car génératrices de radicaux libres (ROS ou espèces réactives de l'oxygène). Ces radicaux libres induisent un stress oxydatif capable de générer des dommages cellulaires irréversibles, notamment par des altérations de l'ADN et des effets pro-apoptotiques sur les membranes. Une fine régulation du métabolisme est donc primordiale afin d'éviter une surcharge martiale, à l'origine d'effets néfastes pour le corps. Ce minéral est présent dans l'organisme sous deux états d'oxydations ; le fer ferreux Fe^{2+} et le fer ferrique Fe^{3+} . Ce dernier, insoluble et non toxique, se trouve principalement lié à la transferrine dans le plasma. En revanche, le fer ferreux est toxique s'il est libre. À l'intérieur des cellules, le fer ferrique est majoritairement présent sous forme hémique (environ 65%), et participe à la constitution de l'hémoglobine et de la myoglobine au niveau des fibres musculaires. Le tiers restant est stocké sous forme de ferritine et d'hémosidérine, constituant des réserves mobilisables en fonction des besoins de l'organisme. (22) (23)

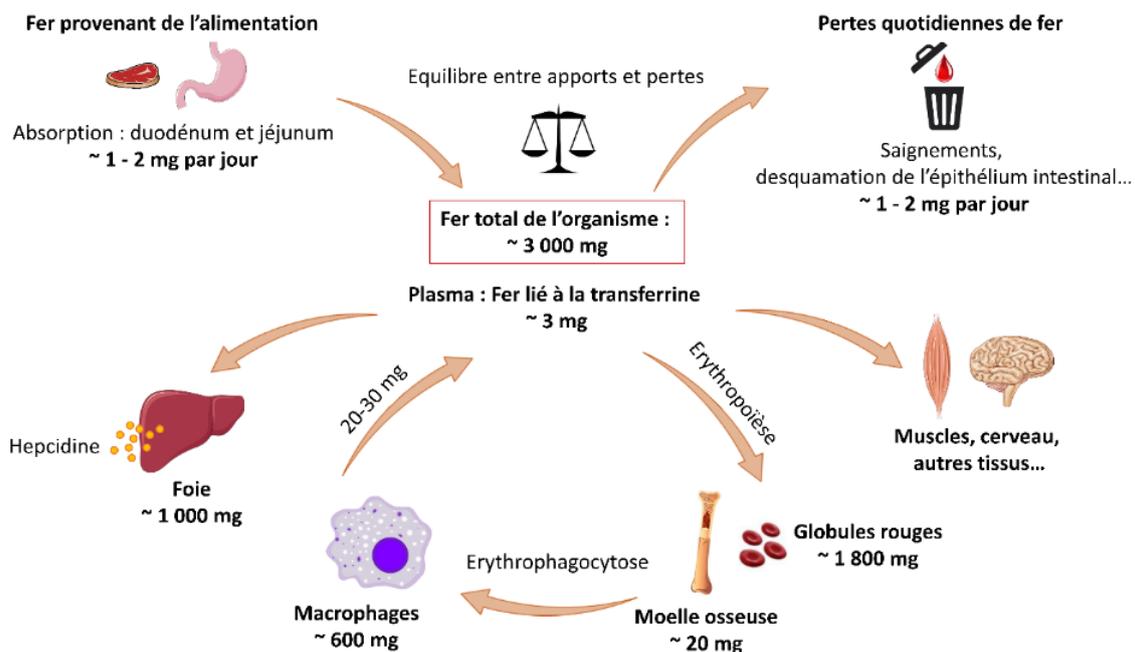


Figure 9. Distribution du fer chez l'Homme

Le corps d'un adulte, qui contient environ 3 à 5 g de fer, voit son métabolisme fonctionner en circuit quasi fermé, c'est-à-dire que l'absorption quotidienne correspond généralement aux pertes (d'environ 1 à 2 mg par jour). Le fer circulant dans le sang, lié à la transferrine, ne représente qu'une fraction minime (0,1%) du fer total de l'organisme. Ainsi, la majeure partie

du fer disponible est stockée dans les macrophages au niveau hépatique, tandis qu'une fraction se trouve dans les précurseurs érythroïdes et les globules rouges matures. (24)

Lorsque l'apport diminue ou que les pertes augmentent (saignements gynécologiques ou digestifs), le corps peut épuiser ses réserves en fer, entraînant progressivement une carence martiale qui peut se manifester sous forme d'anémie ferriprive. Cette anémie, hypochrome et microcytaire, est caractérisée par des GR pâles et de petite taille. Outre l'anémie, la carence martiale présente des manifestations variées, telles que la fatigue et la chute des cheveux, et son diagnostic le plus fiable repose sur le dosage de la ferritine sérique. La correction des réserves en fer peut s'effectuer par voie orale, cependant, chez les patients pour lesquels le fer oral n'est pas efficace ou contre-indiqué, le recours au fer intraveineux peut être envisagé (avec le carboxymaltose ferrique FERINJECT® 50 mg/ml). (25)

I.3.3.2. La transferrine

La transferrine, principale protéine de transport du fer dans l'organisme, joue également un rôle crucial dans son métabolisme en maintenant une concentration adéquate afin de prévenir les carences et les excès martiaux. Cette protéine capture le fer lors de son absorption intestinale et le distribue à l'ensemble des tissus, dont en particulier la moelle osseuse afin d'assurer la synthèse des globules rouges. La transferrine se lie spécifiquement à la forme ferrique Fe³⁺ pour former l'holotransferrine (et apotransferrine lorsqu'elle est non liée au fer). (26) Sa synthèse est localisée principalement au niveau hépatique et est régulée par divers facteurs, tels que la carence martiale, l'inflammation ou l'hypoxie. Lorsque le taux de fer sérique est élevé, sa synthèse est ralentie et inversement, sa production est stimulée lorsque le fer sérique est diminué. (27)

Les souris présentant une déficience en transferrine congénitale souffrent d'une anémie sévère en raison d'une carence martiale, associée à une surcharge au niveau des tissus non hématopoïétiques, illustrant l'importance de cette protéine dans la régulation du métabolisme du fer chez les mammifères. (28)

I.3.3.3. CD71 : récepteur à la transferrine

Le CD71 (également connu sous le nom de Trf1) est la protéine transmembranaire responsable de la liaison spécifique à la transferrine, facilitant ainsi l'internalisation du fer dans le cytoplasme des érythrocytes. Toutes les cellules, à l'exception des érythrocytes matures, expriment cette protéine dont la densité varie en fonction du niveau de prolifération cellulaire. Celle-ci est fortement exprimée chez les cellules ayant des besoins élevés en fer, tels que les précurseurs érythroïdes, les cellules en phase de prolifération, ainsi que chez les lymphocytes et les cellules cancéreuses. (26) Au cours de l'érythropoïèse, le CD71 se manifeste à la surface cellulaire aux stades BFU-E et CFU-E de la lignée érythroïde. (Figure 8). Son expression augmente jusqu'au stade d'érythroblaste basophile, atteint un plateau vers le stade d'érythroblaste polychromatophile, pour ensuite diminuer progressivement vers le stade d'érythroblaste acidophile. Bien que les réticulocytes continuent d'exprimer le CD71, les érythrocytes matures en sont totalement dépourvus.

I.3.3.4. L'internalisation du fer

Le CD71 (TfR1) représente donc la principale voie d'entrée du fer dans les cellules. La liaison de la transferrine au CD71 conduit à la formation d'un complexe ligand-récepteur, internalisé par phénomène d'endocytose. Le fer est ensuite dissocié de la transferrine au niveau des endosomes et son récepteur est recyclé pour faciliter de nouvelles absorptions à la membrane plasmique. Le fer ainsi libéré peut être acheminé en fonction des besoins de la cellule, contribuant à la synthèse de l'hème, ou stocké sous forme de ferritine.

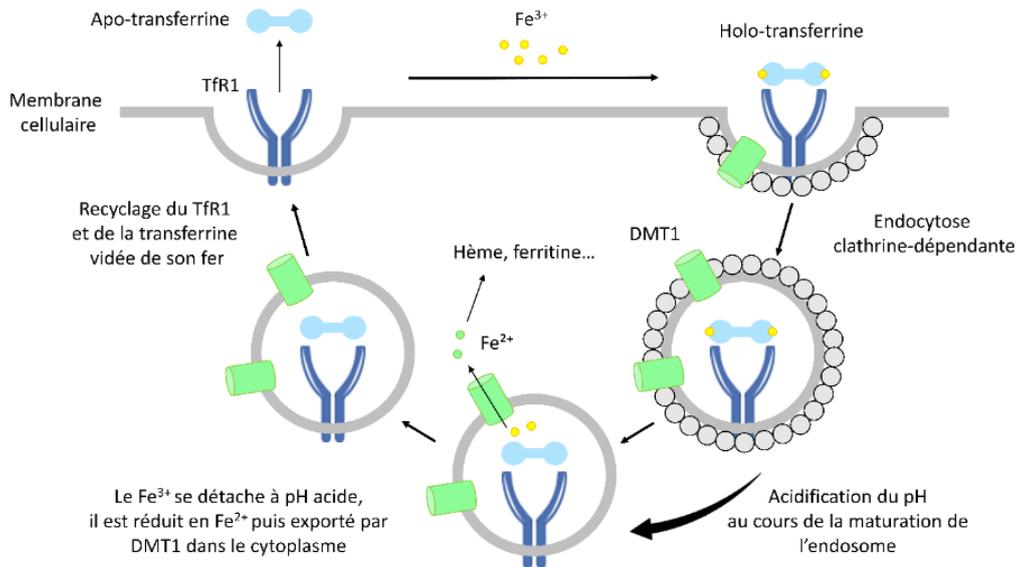


Figure 10. Internalisation du fer par endocytose et recyclage du CD71 (TfR1)

Les souris présentant une carence en CD71 souffrent d'une carence martiale généralisée, accompagnée d'une érythropoïèse anormale. Ainsi, cette protéine occupe un rôle crucial dans le métabolisme du fer en servant d'intermédiaire entre son transport et son utilisation à l'intérieur de la cellule. (29)

I.3.4. La Glycophorine A

La glycophorine A (GPA), également désignée sous l'appellation CD235a (Cluster de Différentiation 235a), représente une protéine membranaire prédominante à la surface des érythrocytes. La GPA constitue le principal élément au sein de la famille des glycophorines, une catégorie de protéines transmembranaires érythrocytaires comprenant la GPB, GPC, et GPD. En association avec la protéine bande 3, dont la fonction principale réside dans le transport membranaire des anions et le maintien de la stabilité de la membrane, la GPA s'impose comme l'une des deux protéines les plus abondantes de la membrane des érythrocytes, atteignant 10^6 molécules par GR environ. (30)

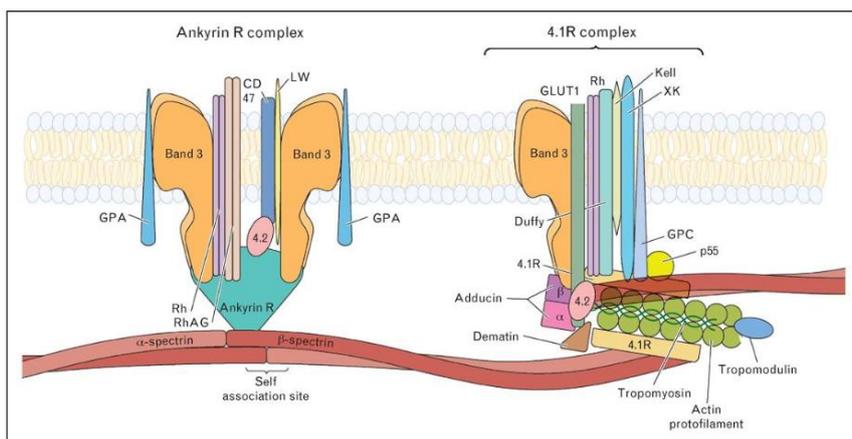


Figure 11. GPA présente au niveau des complexes macromoléculaires

La GPA est responsable de la majeure partie de la charge négative (80%) de la membrane érythrocytaire, contribuant ainsi à réduire l'adhésion et à prévenir l'agrégation cellulaire. (31) En tant que sialoglycoprotéine prédominante des globules rouges, elle joue un rôle crucial dans la régulation de leur adhérence cellulaire, notamment lors de leur circulation dans les vaisseaux sanguins. (32) Sa proximité avec le cytosquelette, les complexes de jonctions et la membrane renforce la stabilité de la membrane cellulaire, limitant ainsi le risque d'hémolyse. De plus, grâce à son association avec la protéine bande 3, la GPA porte les antigènes M et N, en particulier l'antigène MNS (également connu sous le nom d'antigène Ss), déterminant certains des groupes sanguins du système Rhésus (Rh).

I.3.5. Cinétique d'évolution du couple phénotypique CD71/GPA

Il est possible de suivre la différenciation de la lignée érythroïde en suivant l'évolution du couple phénotypique **CD71/GPA**. Le marqueur membranaire CD71, présent de manière temporaire à la surface cellulaire, initie son expression vers le stade CFU-E, et sera finalement absent au stade final de GR mature. Le marqueur de la GPA, apparaît plus tardivement en s'exprimant vers le stade proérythroblastique et demeurant présent au stade d'érythrocyte. Selon la représentation graphique ci-dessous, il est observé que la cellule au stade CFU-E commence à exprimer les récepteurs à la transferrine (CD71) à la membrane plasmique. Ainsi, le premier stade analysé correspond au stade précoce CD71+/GPA-, indiquant que le marquage par anticorps révèle uniquement la présence du marqueur membranaire CD71. Ensuite, la cellule proérythroblastique voit le marqueur GPA initier son expression, aboutissant au couple phénotypique CD71+/GPA+, indiquant une différenciation engagée vers des stades cellulaires plus matures. Les anticorps permettent ainsi de révéler la présence des deux marqueurs à la surface de la membrane érythrocytaire. Enfin, la négativation du CD71, reflétant une différenciation cellulaire avancée au stade mature final, correspond au couple phénotypique CD71-/GPA+. Par conséquent, le stade d'érythroblaste acidophile se caractérise par une diminution de l'expression du CD71, indiquant que la synthèse d'hémoglobine est largement achevée à ce stade. (33)

En résumé, voici l'ordre chronologique d'expression de ces marqueurs :

CD71 + / GPA - → CD71 + / GPA + → CD71 - / GPA +

La cellule érythroïde est positive au CD71, puis double positive, et enfin positive à la GPA seule

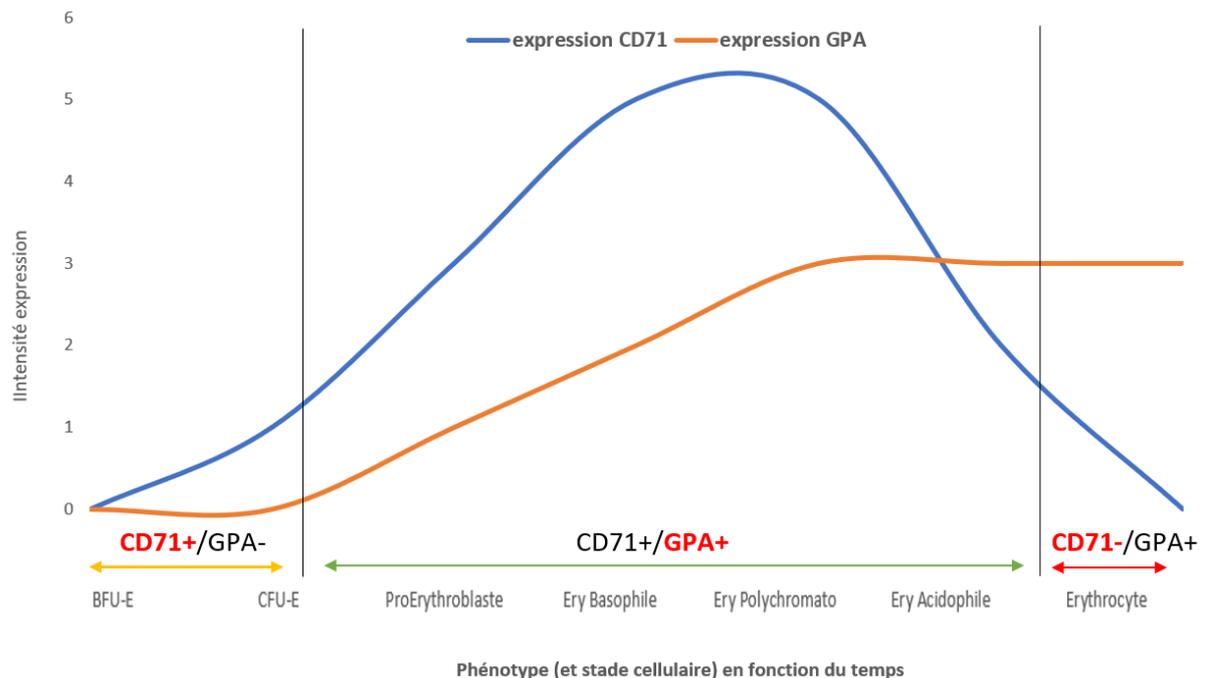


Figure 12. Cinétique d'expression des marqueurs CD71 et GPA de la lignée érythroïde en fonction de la différenciation cellulaire dans le temps

I.3.6. Métabolisme du globule rouge

La production d'énergie au sein du GR est indispensable afin d'assurer 2 fonctions principales, à savoir :

- le maintien de l'intégrité de la membrane plasmique et de l'équilibre ionique (via le transport actif des ions Na⁺/K⁺)
- et le maintien de l'hémoglobine sous sa forme active réduite (fer à l'état Fe²⁺)

Le glucose, qui représente la principale source d'énergie cellulaire, pénètre dans la cellule de manière passive afin de favoriser la synthèse d'adénosine triphosphate (ATP). Le métabolisme énergétique du GR se distingue par deux voies prédominantes : la glycolyse anaérobie et la voie des pentoses phosphates. (34)

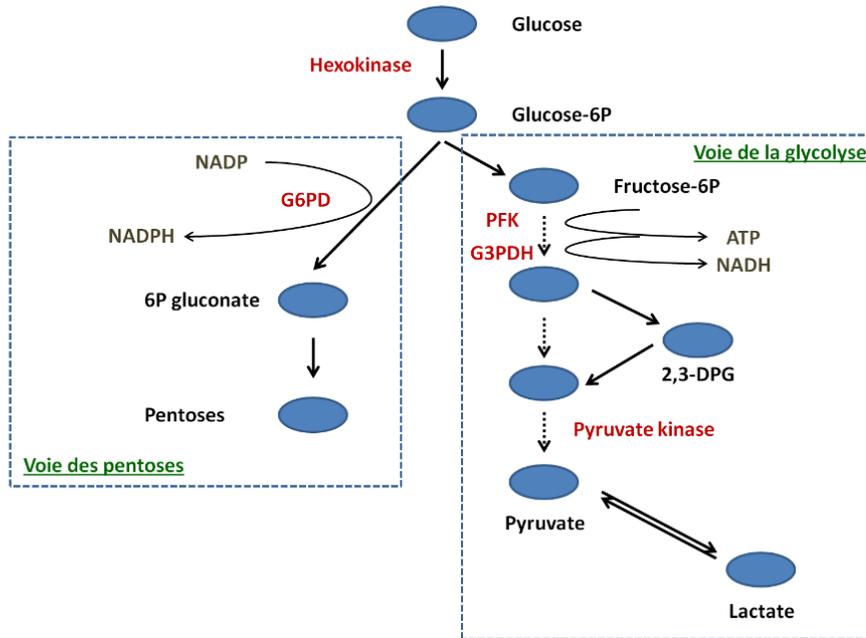
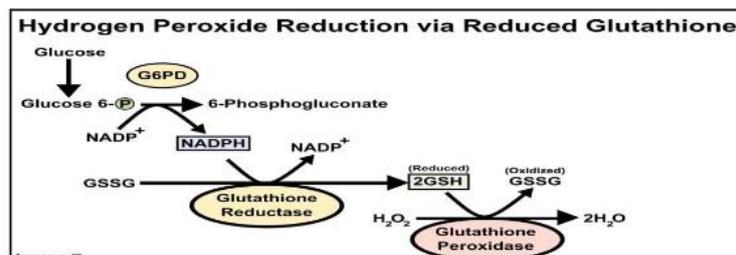


Figure 13. Métabolisme du glucose chez le globule rouge

La voie de la glycolyse anaérobie, qui décompose 90% du glucose, est responsable de la synthèse d'ATP, de NADH (co-enzyme de la méthémoglobine réductase) et de lactate (Figure 13). Le shunt de Rappoport-Luebering, intégré à cette voie, permet de moduler l'affinité de l'hémoglobine pour l'oxygène. Ce mécanisme est particulièrement actif lors d'une activité physique et contribue à accroître l'approvisionnement en oxygène des tissus en permettant aux GR d'en capter davantage. La réversibilité de la fixation du dioxygène (O₂) est en partie régulée par le 2,3-diphosphoglycérate (2,3-DPG), produit au cours de ce shunt. (35)



- Utilisation:

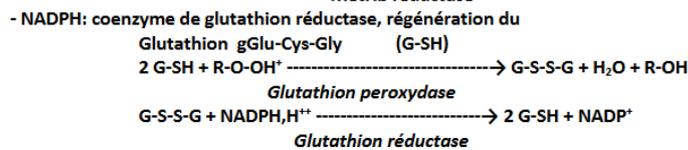
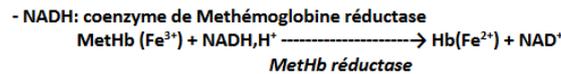


Figure 14. Système d'oxydoréduction chez le GR

Les GR circulants agissent en tant que pièges mobiles de radicaux libres, offrant une protection antioxydante cruciale aux autres tissus et organes. Les processus de glycolyse et de la voie oxydative du pentose phosphate génèrent du NADH et du NADPH, nécessaires à la réduction continue de la méthémoglobine, ainsi qu'au glutathion (GSH) présent à des concentrations élevées.

En effet, dans la voie des pentoses, le NADPH synthétisé régule le système d'oxydoréduction des érythrocytes en maintenant le GSH sous sa forme réduite. Cette forme réduite du GSH convertit le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) intracellulaire, source d'oxydation du fer hémique. Le maintien de la forme réduite de l'hème est également assuré par la voie de la méthémoglobine réductase, qui emploie le NADH produit lors de la glycolyse comme cofacteur. La méthémoglobine, forme oxydée de l'Hb liée au fer Fe^{3+} , perd sa capacité de fixation de l'oxygène (O_2), pouvant ainsi induire une hypoxie tissulaire. Bien que physiologiquement présente chez l'homme, la méthémoglobine représente généralement 1% du fer total de l'Hb. (Figure 14) (35)

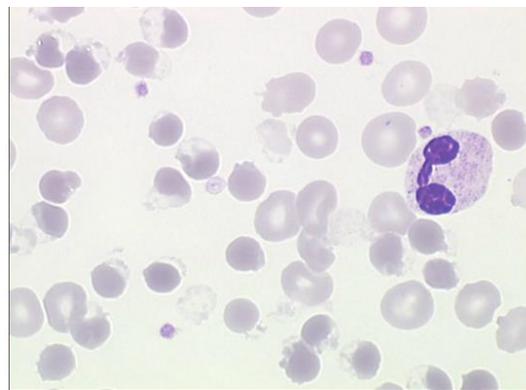


Figure 15. Hématie fantôme retrouvée dans le déficit en G6PD

Le système enzymatique érythrocytaire protège donc l'hémoglobine et la membrane plasmique de l'oxydation et de la dégradation cellulaire. Bien que les anomalies enzymatiques ne soient pas toujours associées à une maladie, il arrive toutefois que des déficits empêchent de maintenir l'intégrité des structures. Le déficit en glucose 6-phosphate déshydrogénase (G6PD) représente le déficit enzymatique héréditaire le plus répandu au sein des érythrocytes, touchant environ 400 millions de personnes à travers le monde. Bien que ce déficit enzymatique soit généralement asymptomatique, il peut conduire à des épisodes d'hémolyse aiguë, en particulier lors d'une exposition à certains médicaments ou agents oxydants (les fèves par exemple). La sévérité de l'hémolyse est directement liée au degré de déficit en G6PD. Les crises d'hémolyse sévère chez les personnes atteintes de ce déficit se manifestent par la présence d'érythrocytes particuliers appelés "hématies fantômes" (visible dans l'image ci-dessus). Ces hématies se caractérisent par une déplétion plus ou moins complète de leur hémoglobine, créant des zones sans hémoglobine et d'autres très riches en hémoglobine, donnant parfois l'apparence de globules rouges "pincés". (36) (37) On retrouve également le déficit en pyruvate kinase (PK), cause la plus fréquente d'anémie hémolytique congénitale.

I.3.7. Synthèse de la globine

Il existe deux principaux groupes de globines ; de type α (alpha) ou β (bêta). Les gènes associés à ces différentes chaînes de globines forment une famille multigénique.

Dans le groupe α , situé sur le chromosome 16, le gène codant pour la chaîne embryonnaire ζ (zêta) précède les gènes des chaînes α . Ces chaînes sont des composantes de l'Hb embryonnaire et de l'Hb adulte.

Dans le groupe β , situé sur le chromosome 11, le gène de la chaîne embryonnaire ϵ (epsilon) est suivi des deux gènes codant pour les chaînes fœtales γ , et par les deux gènes des chaînes adultes δ et β , constituant l'Hb embryonnaire, fœtale et adulte respectivement. (38) (39)

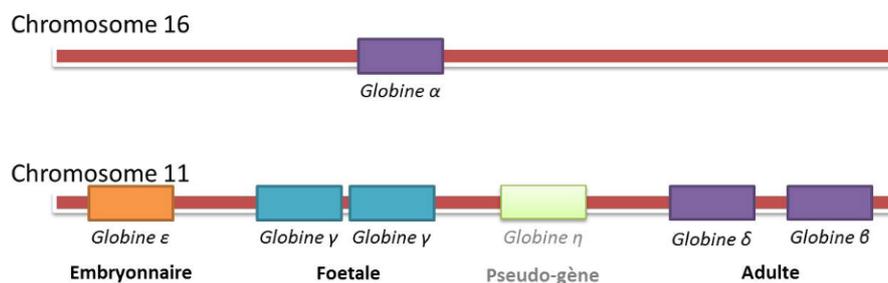


Figure 16. Famille multigénique des gènes de globines

Les différentes chaînes de globines sont, simultanément ou successivement, synthétisées au cours du développement afin de répondre aux besoins de l'organisme en O₂. Lors des premières semaines, les globines ζ et ϵ sont les premières synthétisées au sein des GR. Vers la sixième semaine de développement, la globine γ est produite et remplace progressivement la globine ϵ . Enfin, les globines α et β commencent à remplacer progressivement les chaînes ζ et γ , et deviennent majoritaires chez l'adulte.

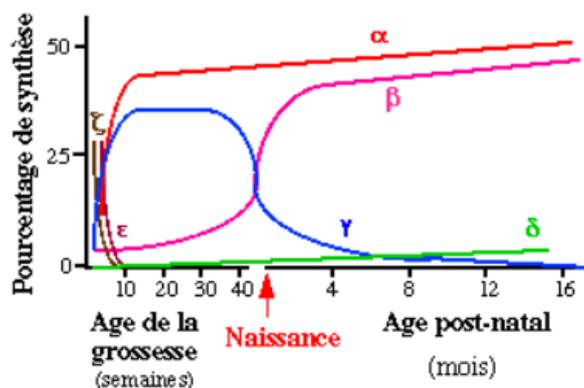


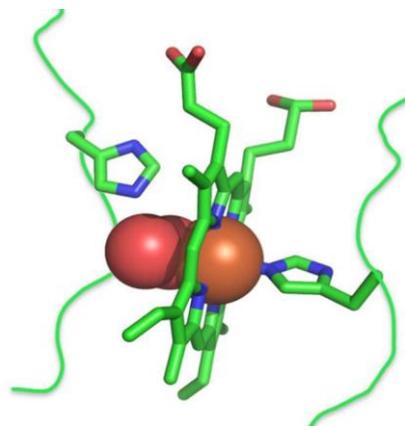
Figure 17. Chronologie des différentes chaînes de globine au cours du développement

La drépanocytose est caractérisée par une mutation de la chaîne β (l'acide glutamique est remplacé par la valine en position 6 de la chaîne) aboutissant à la formation d'hémoglobine non fonctionnelle (ou HbS). Les GR contenant de l'HbS se distinguent morphologiquement par leur aspect en croissant/faucille, caractéristique propre à cette maladie. Les cellules deviennent alors plus fragiles et plus susceptibles de s'hémolyser dans les vaisseaux sanguins, ce qui peut déclencher des crises vaso-occlusives et entraîner une anémie chez le patient. Des déficits quantitatifs, affectant la production des chaînes de globines, sont observés dans les thalassémies α et β (aucune mutation n'est identifiée au niveau de la séquence d'acides aminés). Ces altérations influent sur la capacité des GR à transporter l'oxygène de manière appropriée. (20)

Le diagnostic requiert généralement des analyses spécifiques de l'hémoglobine car les manifestations cliniques de la thalassémie varient selon le type. Les formes légères peuvent ne pas nécessiter de traitement, tandis que les formes sévères peuvent éventuellement requérir une greffe de moelle osseuse. Dans le cas de forme majeure, les patients présentent une anémie accompagnée de symptômes modérés à graves tels que fatigue, essoufflement, pâleur, et une splénomégalie entraînant une sensation de ballonnements et d'inconfort intestinal. (40) (41)

I.3.8. Synthèse de l'hème

L'hème est une molécule essentielle assurant la liaison entre l'O₂ et la globine. Sa synthèse se localise principalement dans les mitochondries (avant d'être expulsées) des érythroblastes. Cette molécule est composée d'un noyau porphyrine composé d'un atome de fer central, retrouvé généralement à l'état ferreux Fe²⁺, formant jusqu'à six liaisons. Quatre liaisons sont établies avec le noyau porphyrine lui-même, tandis que les deux autres permettent la liaison entre l'hème et la globine (via l'histidine) et la fixation de l'O₂. C'est cet atome de fer qui est à l'origine de la couleur rouge de l'hématie. Lors d'anémie hypochrome, retrouvée dans les carences martiales, les GR apparaissent pâles, illustrant l'importance du fer dans la fixation de l'O₂. Une fois l'oxygène libéré dans les tissus, l'hème peut fixer d'autres molécules, telles que le dioxyde de carbone (CO₂) ou le monoxyde de carbone (CO). (38)



Représentation atomique de l'hème

Le CO s'associe à l'Hb pour former le carboxyhémoglobine, avec une affinité 250 fois plus élevée que pour l'O₂. L'importante toxicité du CO (aggravée par le fait que ce gaz soit inodore, incolore, insipide) provient de cet équilibre très difficile à corriger : $\text{HbO}_2 + \text{CO} \leftrightarrow \text{HbCO} + \text{O}_2$. Afin de corriger cet état, l'administration d'oxygène à forte concentration est indispensable, le caisson hyperbare étant utilisé en dernier recours. (42) Notons que le CO représente la principale cause d'intoxication mortelle dans le monde, et des stratégies thérapeutiques, y compris l'échange de globules rouges, ont été envisagées pour éliminer ce poison du sang. (43)

I.3.9. La molécule d'hémoglobine

a) Structure de l'hémoglobine

L'hémoglobine (Hb) est un tétramère formé par l'association de 4 sous-unités, identiques 2 à 2. Une sous-unité correspond à l'association entre une molécule de globine et d'hème. Ce tétramère dispose d'une cavité centrale permettant la fixation et l'acheminement des gaz jusqu'à leur destination respective.

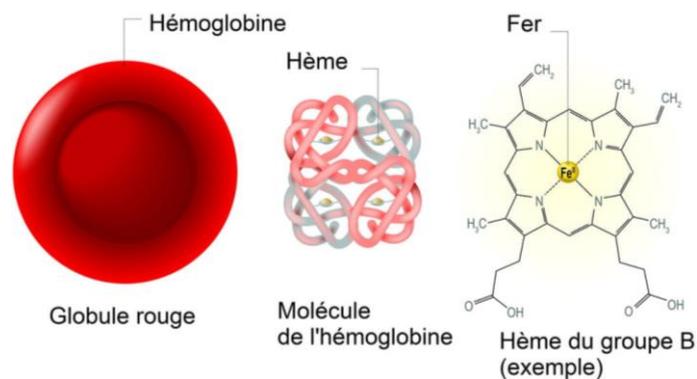


Figure 18. Structure de l'hémoglobine

b) Conformations de l'hémoglobine

L'assemblage de ces sous-unités compose la protéine globulaire complète, également appelée structure quaternaire de l'Hb. En association avec la structure tertiaire qui détermine la disposition des acides aminés dans les chaînes polypeptidiques, ces deux conceptions sont cruciales pour l'exécution de la fonction biologique de l'Hb. En effet, cette dernière existe sous deux conformations, la forme T (tendue) ayant une faible affinité pour l'oxygène, et la forme R (relâchée) présentant une haute affinité. L'équilibre entre ces deux états est influencé par le pH sanguin et la concentration d'oxygène. En conditions de pH élevé et en présence d'oxygène, la forme R prédomine, permettant à l'Hb de capturer plus efficacement l'oxygène.

En revanche, en cas de pH bas et lorsque l'oxygène est rare, la forme T prévaut, permettant à l'Hb de libérer l'oxygène pour répondre aux besoins tissulaires. (44)

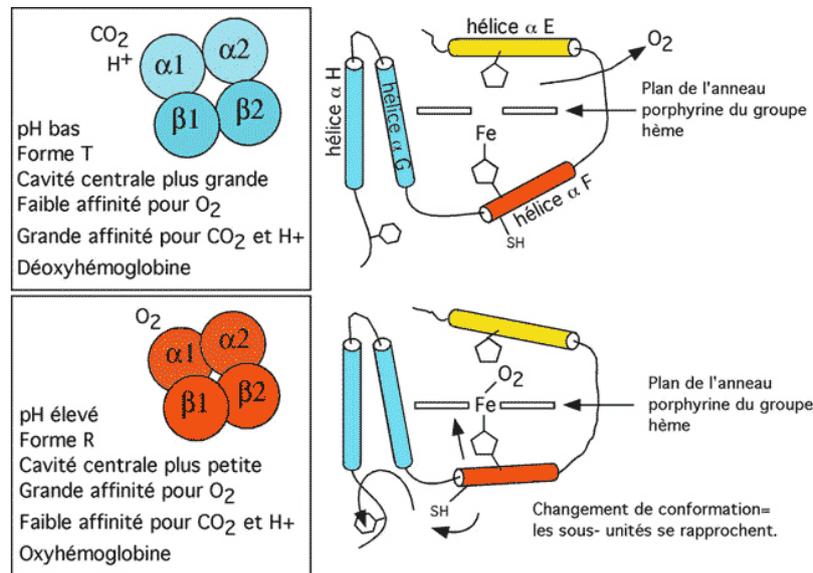


Figure 19. Structures tertiaire et quaternaire de l'hémoglobine

La structure quaternaire permet la réalisation du phénomène de coopération allostérique, où la fixation d'une molécule d'oxygène, par une sous-unité, accroît l'affinité des autres sous-unités envers cette molécule. Cette configuration favorise une capture rapide de l'oxygène au niveau des poumons et une libération plus efficace au niveau des tissus. (45)

Cependant, de nouvelles approches cristallographiques révèlent que la transition allostérique de l'Hb implique des changements de population entre plusieurs conformations quaternaires plutôt qu'un simple changement entre deux états (Tendu ou Relâché). (46) (47)

c) Hémoglobines présentes au cours du développement

Au cours du développement fœtal, différentes Hb sont produites par l'embryon, puis par le fœtus :

- L'hémoglobine embryonnaire (Hb Gower I et II) est synthétisée au cours des premières semaines de la vie embryonnaire, avant que le foie et la moelle osseuse ne prennent le relais. Cette molécule, composée de deux chaînes ζ et ε, possède une affinité très élevée pour l'O₂, facilitant ainsi les apports au fœtus en développement.
- L'hémoglobine fœtale (Hb F) est produite à partir de la 8^{ème} semaine de gestation, jusqu'à quelques mois après la naissance. Elle est composée de deux chaînes α et γ, contribuant au transfert efficace d'oxygène, à travers le placenta, de la mère au fœtus. Cette HbF possède une affinité plus élevée pour l'O₂ que l'HbA, présente chez l'adulte. (38)

		ADULTE	NOUVEAU-NE
Hb A	$\alpha_2\beta_2$	97 %	15 - 30 %
HbA2	$\alpha_2\delta_2$	2 - 3 %	Traces
Hb F	$\alpha_2\gamma_2$	< 1 %	70 - 85 %

Figure 20. Hémoglobines présentes chez l'adulte et le nouveau-né

Chez l'adulte, sont représentées majoritairement l'hémoglobine A (Hb A), l'hémoglobine A2 (Hb A2) et l'hémoglobine fœtale (Hb F). L'Hb A, représentée à hauteur de 97% en situation physiologique, est composée de deux chaînes α et de deux chaînes β . L'Hb A2 représente environ 2-3% de l'Hb chez l'adulte. L'Hb F est synthétisée chez le fœtus avant d'être remplacée progressivement, à la naissance, par l'Hb A. Alors que chez le nouveau-né, l'Hb F est majoritairement représentée, elle est faiblement représentée chez l'adulte (<1%). La persistance de l'hémoglobine F après six mois se rencontre dans les syndromes thalassémiques, surtout les β -thalassémies, dans lesquels le défaut de chaînes β est compensé par des chaînes γ . (48) (49)

I.4. Fonctions des globules rouges

La forme biconcave de l'hématie lui permet de transporter de manière optimale le dioxygène dans l'ensemble de l'organisme et sa morphologie elliptique lui confère cette souplesse nécessaire afin de circuler dans les vaisseaux sanguins. Lorsque la morphologie de la cellule rouge s'écarte de cette géométrie, la membrane plasmique devient plus rigide, donc fragile et cela contribue à l'hémolyse du GR. Lors du transport des gaz, ces cellules parcourent des centaines de kilomètres, au cours des 120 jours de leur existence, traversant les capillaires sanguins dont le diamètre est nettement inférieur au leur. Les propriétés élastiques remarquables offertes par la membrane plasmique permettent ainsi de résister aux contraintes physiques subis dans la circulation sanguine. (50) (51)

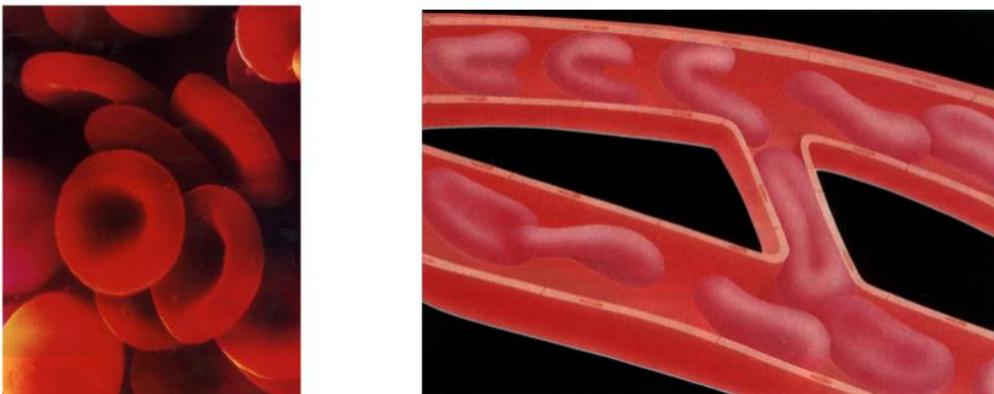


Figure 21. Aspects elliptique et biconcave du GR contribuant à sa déformabilité

La principale fonction des globules rouges réside dans le processus d'hématose, qui correspond à l'oxygénation du sang. Ces cellules jouent un rôle essentiel dans le maintien des fonctions vitales en facilitant les échanges gazeux qui se produisent aux niveaux des poumons et des tissus. L'hématose se déroule spécifiquement au niveau des alvéoles pulmonaires, ces minuscules "poches" d'air situées aux ramifications terminales de l'arbre bronchique. Ces alvéoles sont recouvertes, sur leur paroi externe, de capillaires sanguins facilitant les échanges gazeux. La fine paroi de ces capillaires permet la diffusion passive des gaz, éliminant ainsi le dioxyde de carbone du corps et captant l'oxygène en échange. Le retour du sang vers le cœur s'effectue par l'oreillette gauche, via les veines pulmonaires, avant d'être éjecté hors du ventricule gauche par l'aorte, afin d'être distribué à l'ensemble des tissus du corps.

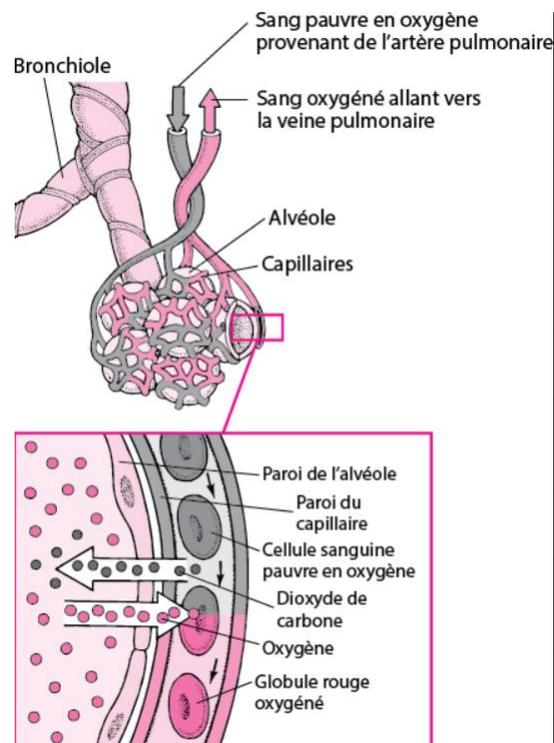


Figure 22. Echanges gazeux au niveau des alvéoles pulmonaires

Au cours de l'inspiration, l'O₂ diffuse dans les capillaires pulmonaires et se lie grâce au fer de l'hème pour former l'oxyhémoglobine présent dans les GR. L'O₂ est ensuite libéré dans les tissus grâce à un gradient de pressions entre les vaisseaux sanguins et les tissus environnants. Ce processus se reproduit lors du transport du CO₂, qui est libéré au niveau des poumons grâce à la différence de pression partielle entre les vaisseaux sanguins et les alvéoles pulmonaires. À la différence de l'O₂, le CO₂ se lie aux fragments d'aa de la globine pour former la carbaminohémoglobine. Chaque molécule d'Hb peut lier jusqu'à quatre molécules de CO₂ ou quatre molécules d'O₂. Un défaut d'apport en oxygène ou une insuffisance de vascularisation peut déclencher un phénomène de nécrose, entraînant une perte irréversible de ces tissus. (52)

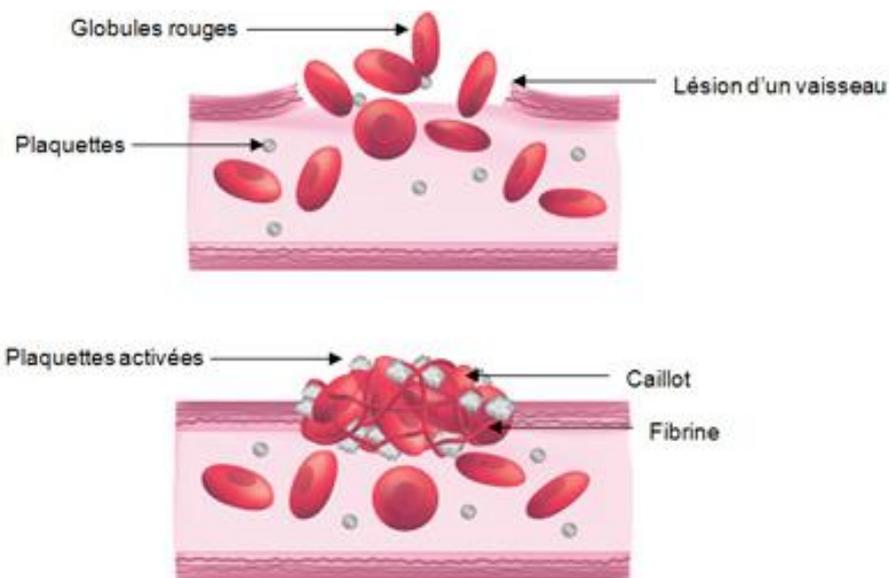


Figure 23. Processus de coagulation au sein des vaisseaux sanguins

Il existe d'autres fonctions assurées par l'érythrocyte au sein de l'organisme :

- La régulation de l'équilibre acido-basique et du pH via le transport des bicarbonates. L'anhydrase carbonique catalyse la synthèse de l'acide carbonique (H_2CO_3), à partir du CO_2 et de l'eau (H_2O), pouvant se dissocier ensuite en ions bicarbonates (HCO_3^-) et hydrogène (H^+). Lors d'une augmentation de l'acidité dans le sang (augmentation des H^+), les GR peuvent libérer une certaine quantité de bicarbonates afin de tamponner l'excès d'acidité, maintenant ainsi le pH sanguin dans les limites physiologiques
- Les GR peuvent également contribuer à la formation du caillot sanguin lors d'une hémorragie. Ces cellules ne jouent pas de rôle direct dans l'hémostase, mais contribuent à renforcer le caillot sanguin en facilitant la liaison entre les plaquettes et le fibrinogène
- Enfin, ces cellules peuvent participer à la régulation de la pression artérielle, en libérant de l'oxyde nitrique (NO) qui induit une vasodilatation, par relaxation des fibres musculaires lisses des artérioles. (53) (54) (55)

I.5. L'érythropoïèse in-vivo

L'érythropoïèse est une branche spécifique de l'arbre hématopoïétique assurant la formation des GR à partir de cellules souches hématopoïétiques (CSH). Ce processus est physiologiquement équilibré entre la naissance de nouvelles CSH et la perte de ces dernières lors de leur engagement irréversible vers les différentes lignées cellulaires. En général, un délai de sept à dix jours est requis pour que les CSH subissent les divisions et les maturation nécessaires, conduisant à la formation des diverses cellules matures fonctionnelles présentes dans le sang périphérique. Les GR, présents à une densité d'environ 4 à 5 millions de cellules par mm³ de sang, ont une durée de vie d'environ 120 jours malgré l'absence de noyau et d'organites. Enfin, on estimerait à plus de 200 milliards le nombre d'érythrocytes synthétisés quotidiennement par la moelle osseuse. (56) Cette production continue de globules rouges est adaptée aux exigences en oxygène des tissus périphériques. Grâce à la plasticité de la moelle osseuse, ce processus peut être multiplié par 7 ou 8 en cas de besoin accru. (57) (58) (59)

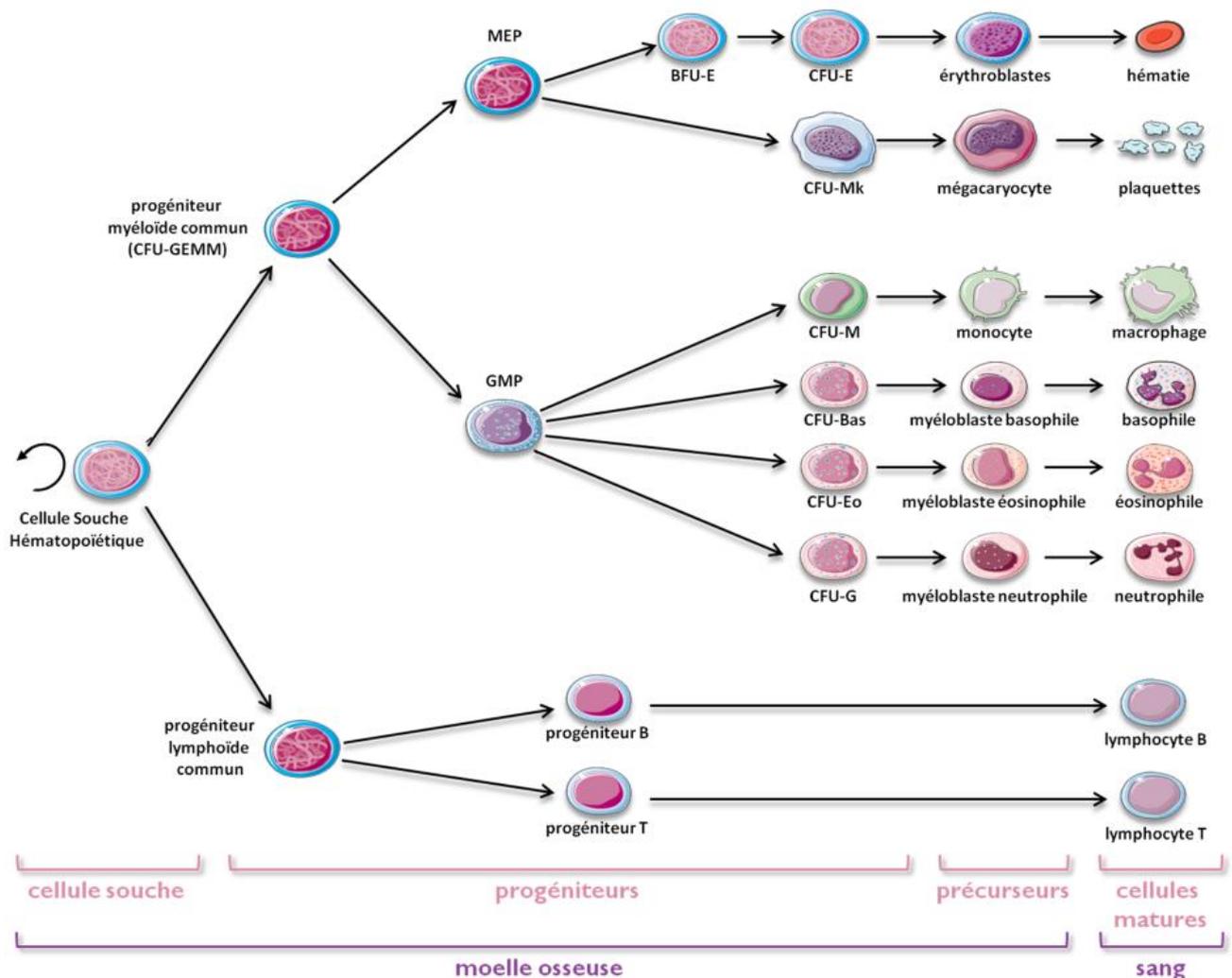


Figure 24. Arbre hématopoïétique

Au cours de cette étude, seule la première branche de l'arbre hématopoïétique est étudiée.

I.5.1. La cellule souche hématopoïétique (CSH)

Ces cellules sont majoritairement présentes, bien que faiblement représentées (de l'ordre de 0.01% à 0.05%), au niveau médullaire mais peuvent toutefois se retrouver dans le sang périphérique. Jusqu'à présent, leur fonction n'a pas pu être rattaché à un phénotype spécifique, tel que l'expression de marqueurs membranaires, et encore moins à une morphologie particulière, la caractérisation des cellules souches repose alors principalement sur des critères fonctionnels. Dans la pratique, la richesse des greffons de CSH est estimée en dénombrant les cellules qui expriment le CD34 (englobant les CSH mais majoritairement composées de cellules progénitrices). (60)

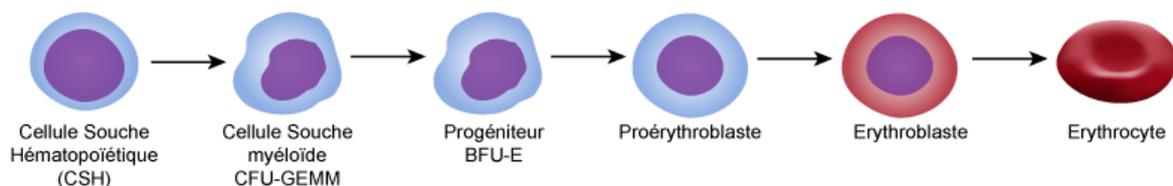


Figure 25. La lignée rouge

Les CSH sont définies par trois caractéristiques spécifiques: l'auto-renouvellement, la multipotence et la transplantabilité. (61) (62) (63) (64) (65)

- 1) L'auto-renouvellement est défini comme étant la capacité de multiplication à l'identique sans subir de différenciation, permettant ainsi de maintenir une réserve constante de CSH. Leur stock ne semble pas diminuer tout au long de l'existence, cependant, les cellules souches subissent un phénomène de «vieillesse» qui les expose davantage aux accidents chromosomiques.
- 2) La multipotence peut être définie par la capacité de se différencier vers l'ensemble des lignées cellulaires hématopoïétiques (myéloïdes et lymphoïdes). La différenciation, qui implique la perte de certaines potentialités et l'acquisition de nouvelles fonctions, conduit aux cellules matures fonctionnelles.
- 3) La capacité de greffe, ou transplantabilité, est associée au phénomène de "homing" (domiciliation), permettant au CSH de retourner (se nicher) dans la moelle osseuse après leur injection. Ce processus permet le repeuplement de la moelle osseuse et la reconstruction de l'hématopoïèse. La transplantabilité reflète la capacité des CSH à établir à long terme un système hématopoïétique complet chez un individu ayant subi une greffe de CSH.

La quiescence et la prolifération lente caractérisent également les CSH. En effet, ces cellules sont principalement en état de repos, correspondant à la phase G0 du cycle cellulaire. Cette quiescence les protège temporairement contre les agressions externes telles que la chimiothérapie ou la radiothérapie. Sous l'influence de signaux de croissance, les CSH entrent en division et peuvent se différencier de manière irréversible en deux types de progéniteurs communs, perdant ainsi leur caractère multipotent. (60) (66) De manière quantitative, une CSH peut engendrer des milliers de cellules progénitrices érythroïdes, lesquelles, à leur tour, ont la capacité de produire des millions d'érythrocytes. (67)

I.5.2. Les progéniteurs communs

Chaque progéniteur est défini par l'association d'un préfixe et de lettres représentant des abréviations anglaises :

Un préfixe : CFU pour Colony Forming Unit (unité formant colonie)

De(s) lettre(s) qui caractérisent les lignées dont elles gardent le potentiel de différenciation

Selon les stimulations reçues, la CSH peut soit se différencier en :

- un progéniteur lymphoïde commun **CFU-L** (Colony Forming Unit - Lymphocyte)
- ou, un progéniteur myéloïde commun **CFU-GEMM** (Colony Forming Unit - Granulocyte Erythrocyte Monocyte Mégacaryocyte)

Les progéniteurs communs, ne peuvent être identifiés morphologiquement par la cytologie, c'est-à-dire lors de l'examen au microscope. Ces progéniteurs communs poursuivront leur croissance en fonction des signaux reçus.

I.5.3. Les progéniteurs spécialisés

D'une part, la **CFU-L** peut se différencier en progéniteur spécialisé B ou T, évoluant en lymphocytes B et T respectivement.

D'autre part, la **CFU-GEMM**, peut se différencier en 2 progéniteurs hématopoïétiques intermédiaires ; GMP (granulocyte-monocyte progenitor) et MEP (megakaryocyte-erythrocyte progenitor).

a) La GMP

Cette cellule a la capacité de générer divers progéniteurs de la lignée granuleuse et monocyttaire, comprenant notamment :

- la CFU-GM (Granulo-Monocyttaire), un progéniteur commun capable de se différencier en progéniteurs G et M. Les granulocytes neutrophiles et les monocytes sont les cellules matures correspondantes

- le progéniteur CFU-B, aboutissant au granulocyte basophile
- et le progéniteur CFU-Eo, aboutissant au granulocyte éosinophile

b) La MEP

Cette cellule a la capacité de générer les progéniteurs de la lignée mégacaryocytaire et érythrocytaire, comprenant notamment :

- le progéniteur CFU-MK, qui se divise et se différencie en mégacaryocytes. Ces cellules subiront ensuite une fragmentation pour donner naissance aux thrombocytes (plaquettes).
- et la **BFU-E** (Burst Forming Unit-Erythroid) qui évolue en **CFU-E** (Colony Forming Unit-Erythroid), progéniteurs de la lignée érythroblastique

Ces cellules ont la capacité de se renouveler par divisions cellulaires et de se différencier en réponse aux différentes cytokines reçues, contribuant ainsi au maintien constant de la synthèse de GR au fil du temps.

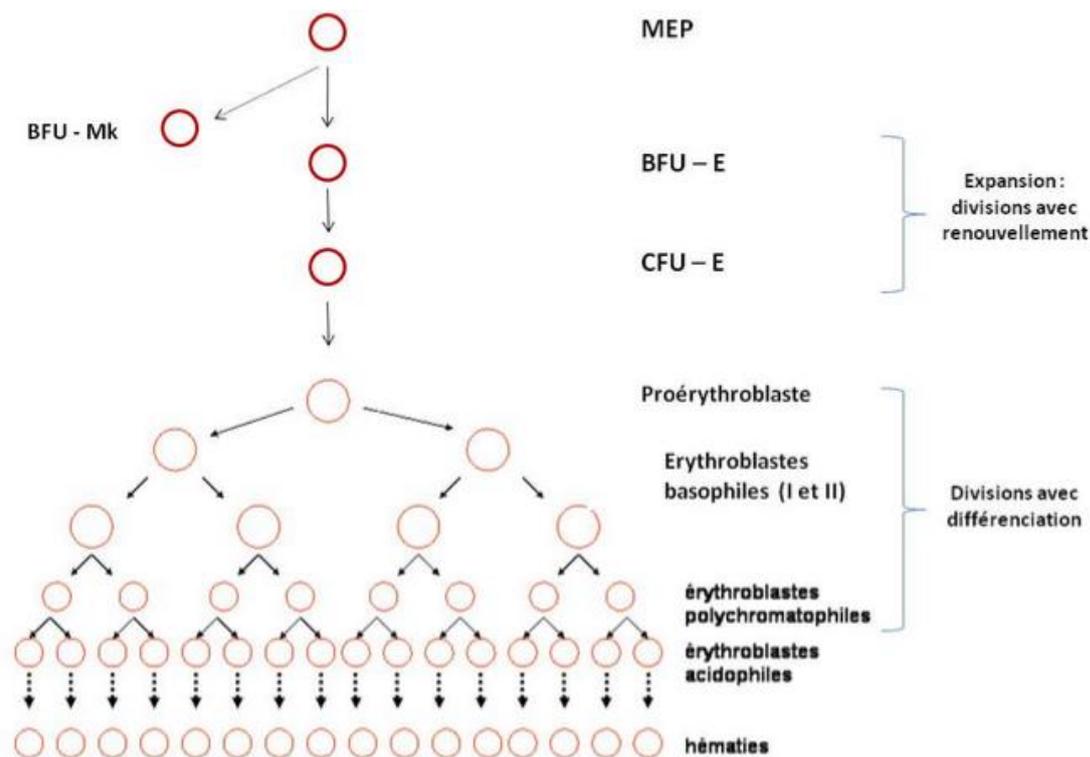


Figure 26. Lignée érythroblastique : du progéniteur spécialisé à la cellule mature fonctionnelle

I.5.4. Etude clonogénique CFC (Colony-Forming Cells)

Les progéniteurs sont orientés vers une ou plusieurs voies de différenciation, et leur capacité d'auto-renouvellement est limitée. Du point de vue quantitatif, ils représentent environ 0,1%

des cellules présentes dans la moelle osseuse. (68) Morphologiquement non identifiables, ils ont été mis en évidence grâce aux cultures en milieu semi-solide en présence de facteurs de croissance appropriés. (69) Dans de telles conditions, ils forment différentes colonies cellulaires, justifiant ainsi leur appellation en anglais : Colony Forming Cells (CFC). (70)

En effet, les cultures en milieu semi-solide révèlent de manière indirecte l'existence des progéniteurs érythroblastiques en démontrant leur capacité à générer des colonies différenciées dans un environnement contenant les facteurs de différenciation appropriés. L'observation des caractéristiques des colonies et de leur composition cellulaire permet d'identifier le type de progéniteur impliqué dans la prolifération et la différenciation. Il convient de souligner que le passage d'un progéniteur précoce à un stade mature se caractérise par une durée de développement plus étendue. Cette observation découle du fait qu'un progéniteur à un stade précoce nécessite un nombre plus élevé de divisions cellulaires et de différenciations pour atteindre le stade de colonie par rapport à une cellule déjà plus mature. Par exemple, la BFU-E aura besoin de plus de temps que la CFU-E pour donner des colonies.

Les BFU-E sont les premières cellules orientées vers la lignée érythrocytaire, reconnu à leur aspect de colonie « éclatée », volumineuse et souvent multicentrique, d'où leur appellation « burst ». Les colonies associées à ces progéniteurs précoces se développent, en moyenne, après 14 jours d'incubation chez l'homme.

Les CFU-E, progéniteurs plus matures, donnent naissance à de petites colonies (constituées de 8 à 100 cellules), qui apparaissent 7 à 10 jours après l'ensemencement des progéniteurs. (71) (72)

I.5.5. Les précurseurs hématopoïétiques

La CFU-E se divise et se différencie en précurseurs érythroblastiques, ou érythroblastes. Ces cellules, morphologiquement identifiables au niveau médullaire, sont dépourvues de la capacité d'auto-renouvellement.

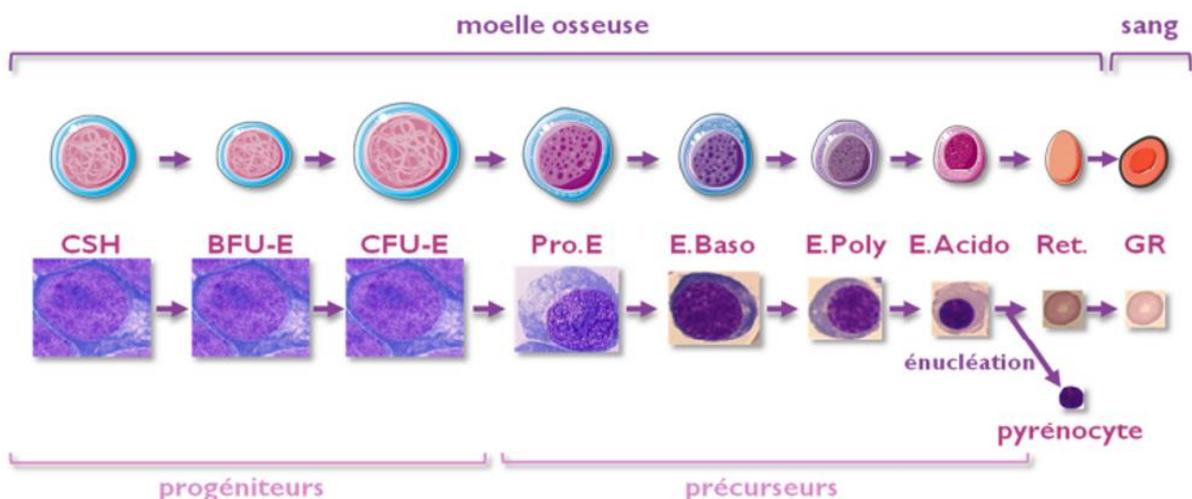
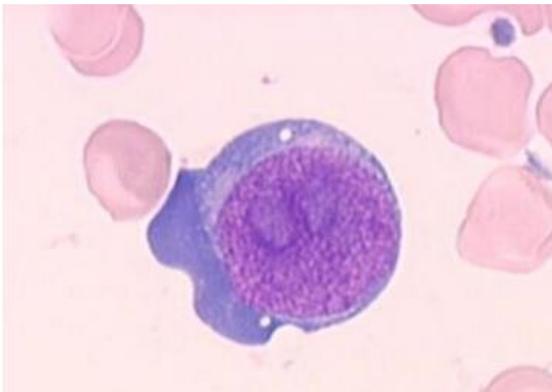


Figure 27. Lignée érythroïde chez l'Homme

Au niveau médullaire, les précurseurs subissent deux phénomènes simultanés, la maturation et la multiplication. En effet, des modifications sont observées au niveau de la taille, de la chromatine et de la composition en organites des cellules tout au long de l'évolution de la lignée des précurseurs. Ces changements comprennent une réduction de la taille cellulaire, la transition d'un cytoplasme basophile à un cytoplasme acidophile, et la condensation du noyau, aboutissant à son expulsion hors de la cellule au stade de l'érythrocyte. Les ribosomes, présents aux stades immatures, jouent un rôle crucial dans la synthèse des protéines nécessaires à l'assemblage de l'hémoglobine, et leur intensité augmente progressivement au cours de la différenciation érythroïde. De plus, chaque stade cytologique est associé à une division cellulaire. Il est estimé que les proérythroblastes subissent quatre à cinq mitoses, caractérisées par une maturation nucléaire (synthèse d'ADN) et cytoplasmique (synthèse d'Hb), avant d'atteindre le stade d'érythroblaste acidophile. La maturation se déroule sur une période d'environ cinq jours chez un individu sain, et théoriquement, un proérythroblaste peut donner naissance à 16 hématies.

La lignée érythroïde se caractérise par les stades cellulaires suivants, classés par ordre de maturité croissante : le proérythroblaste, l'érythroblaste basophile, l'érythroblaste polychromatophile, l'érythroblaste acidophile, le réticulocyte et enfin l'érythrocyte. (73) (74) (75)

Le proérythroblaste :



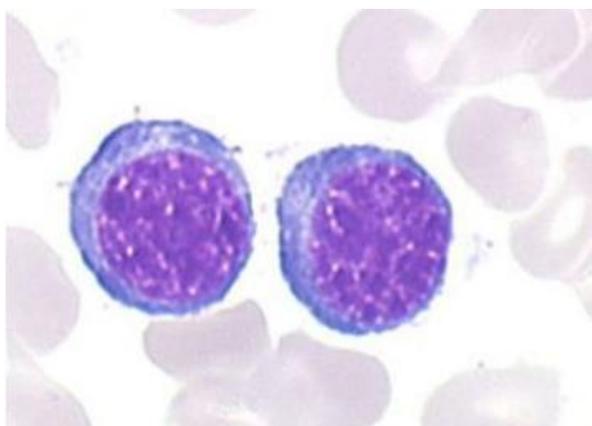
Cellule arrondie de 20 à 30 µm de diamètre

Rapport nucléocytoplasmique élevé

Noyau rond, à chromatine fine et nucléole net

Basophilie intense du cytoplasme (richesse en ARN)

L'érythroblaste basophile :



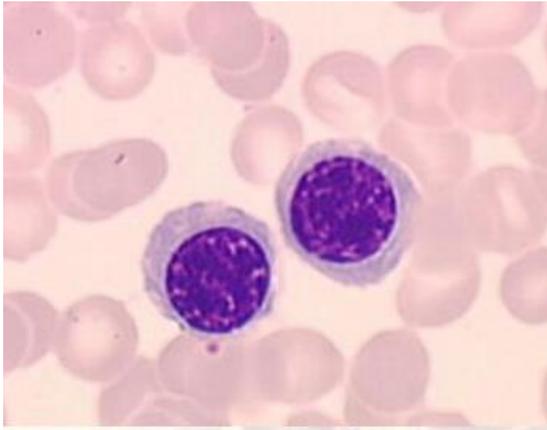
Cellule ronde de 15 à 18 µm

Noyau rond possédant une chromatine fine, mottée

Un nucléole peu ou non visible

Le cytoplasme reste très basophile

L'érythroblaste polychromatophile :



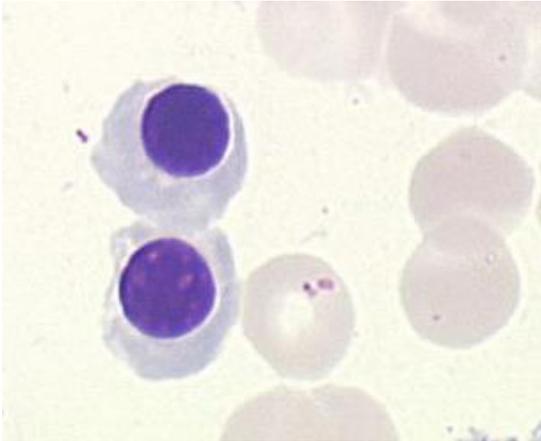
Cellule ronde de 12 à 15 μm

Noyau rond avec une chromatine épaisse en motte régulières

Nucléole absent

Le cytoplasme à une teinte gris-bleu (richesse croissante en hémoglobine et diminution de la quantité d'ARN)

L'érythroblaste acidophile :



Cellule de 8 à 10 μm

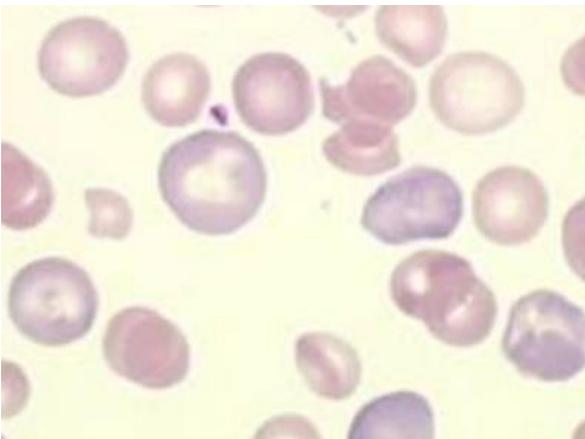
Noyau rond excentré et une chromatine très dense

Le cytoplasme est acidophile (richesse en Hb)

La couleur du cytoplasme devient celle des GR

Cette cellule perd son noyau et devient un réticulocyte

Le réticulocyte :



Obtenu après l'expulsion du noyau de l'érythroblaste acidophile

Il quitte la moelle osseuse après 2 à 5 jours et se retrouve dans le sang, où il évolue en GR définitif en 1 à 2 jours par diminution de la taille et perte de l'ARN résiduel

Le réticulocyte a une taille et un volume légèrement supérieurs à ceux du GR. Il possède encore des ribosomes et des mitochondries qui précipitent avec le bleu de crésyl

En résumé, 4 principaux types cellulaires sont retrouvés au sein de l'érythropoïèse *in vivo* :

- La CSH, à la base des différentes cellules du sang
- La cellule progénitrice, cellule souche engagée vers une lignée cellulaire précise
- La cellule précurseur, qui se divise et se différencie en cellules matures
- La cellule mature, assurant des fonctions bien définies dans l'organisme

I.5.6. Localisation de l'érythropoïèse in-vivo

a) La moelle rouge

La moelle osseuse, cette substance molle et spongieuse présente dans la plupart des os, peut exister sous deux types : la moelle jaune et la moelle rouge. La moelle rouge abrite le processus d'érythropoïèse *in vivo* et se situe principalement dans les os du bassin, les côtes, les vertèbres, la scapula, le sternum et le crâne. Elle peut également être présente au niveau des extrémités arrondies des os longs, et généralement cette moelle régresse avec l'âge. (76)

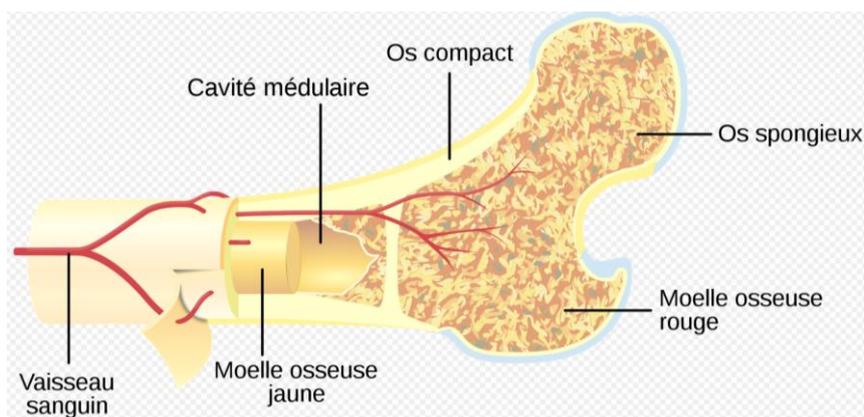


Figure 28. Schéma d'épiphyse d'os long

La moelle jaune, quant à elle, est composée majoritairement de tissu adipeux et voit sa proportion augmenter à mesure que la moelle rouge diminue avec le temps. (77) (78)

b) Les logettes médullaires

Au niveau microscopique, la moelle rouge est constituée de logettes médullaires séparées entres-elles par du tissu osseux et soutenues par une trame réticulo-vasculaire. Cette trame, composée d'un réseau complexe de cellules et de fibres, joue un rôle clé dans la libération des cellules sanguines. En tant que barrière hémato-médullaire, elle assure la filtration des éléments cellulaires les plus matures, autorisant ainsi les cellules au cytosquelette suffisamment malléable à rejoindre la circulation sanguine. Une altération structurale de cette barrière peut conduire à l'érythromyélocytose, soit une présence anormalement élevée de cellules immatures dans le sang périphérique.

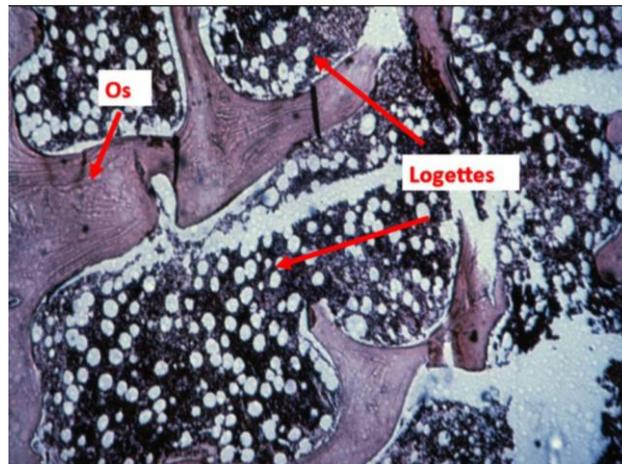


Figure 29. Coupe histologique d'os mettant en évidence les logettes médullaires

c) Îlots érythroblastiques

À l'intérieur des logettes médullaires, les érythroblastes s'assemblent en amas autour des macrophages, formant des îlots érythroblastiques à proximité des vaisseaux sanguins. Ces îlots jouent un rôle crucial dans la prolifération et la différenciation des cellules au cours de leur maturation en fournissant un soutien structural aux cellules immatures et en régulant l'approvisionnement en nutriments et en oxygène. (79) Ces îlots apparaissent souvent sous forme de double (parfois triple) couronne, avec les cellules les plus immatures retrouvées en contact étroit avec un macrophage en position centrale. Ce dernier sécrète des facteurs de croissance (EPO), des cytokines (IL-3, IL-6 GM-CSF) et autres éléments (dont le fer) indispensables à la croissance des cellules érythroïdes. Les macrophages au sein de ces îlots ont également une fonction cruciale dans la phagocytose des cellules défectueuses et des noyaux résiduels des érythroblastes acidophiles, contribuant ainsi à réguler le flux de cellules fonctionnelles. (80)

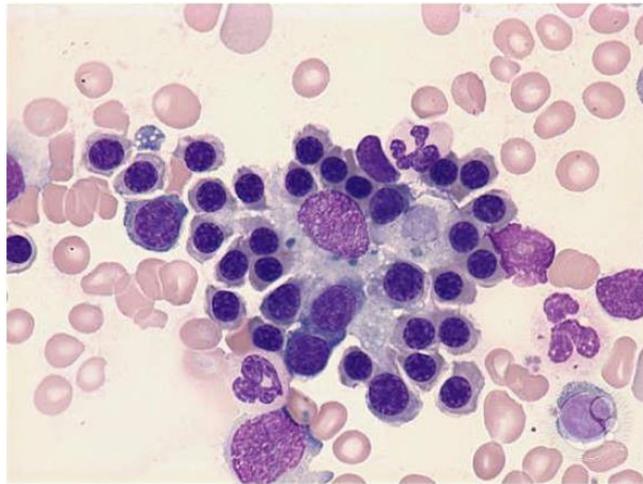


Figure 30. Ilot érythroblastique

L'interaction entre macrophage et érythroblastes est réalisée grâce à l'intégrine présente à la surface des érythroblastes et à son contre-récepteur (VCAM-1 : Molécule d'adhésion cellulaire vasculaire 1) situé sur la membrane des macrophages. Ces deux molécules sont localisées au point de contact intercellulaire. Des études ont démontré qu'un traitement *in utero* de souris avec des anticorps dirigés contre l'antigène-4 tardif induit spécifiquement une anémie. (81) (82)

Lorsque les cultures sont effectuées en l'absence de macrophages, les cellules érythroïdes parviennent à maturer jusqu'à un stade érythroblastique avancé, mais l'énucléation ne se produit pas. Les cultures appauvries en macrophages présentent une nette réduction de la quantité de cellules érythroïdes, suggérant que le contact érythroblaste-macrophage favorise la prolifération et la maturation terminale des cellules érythroïdes, facilitant ainsi l'énucléation. (83) (84) Cependant, il semble exister un programme de différenciation autonome chez les progéniteurs engagés. Des études ont démontré que les précurseurs érythroïdes peuvent accomplir la différenciation terminale *in vitro* en présence d'EPO, malgré l'absence de contact avec les macrophages ou la matrice extracellulaire. Cependant, dans ces conditions, le rendement de la prolifération, de la différenciation, et l'efficacité de l'énucléation s'éloignent de ce qui est observé *in vivo*. (85)

d) La diapédèse

Ce processus marque l'intégration des érythrocytes matures dans la circulation sanguine périphérique afin d'assurer leurs fonctions. Lorsqu'elles quittent les réserves médullaires, les cellules matures passent à travers des capillaires sanguins aux parois fines et perméables. La diapédèse caractérise également le processus de sortie des leucocytes, lors d'une réponse inflammatoire, de la circulation sanguine vers les tissus.

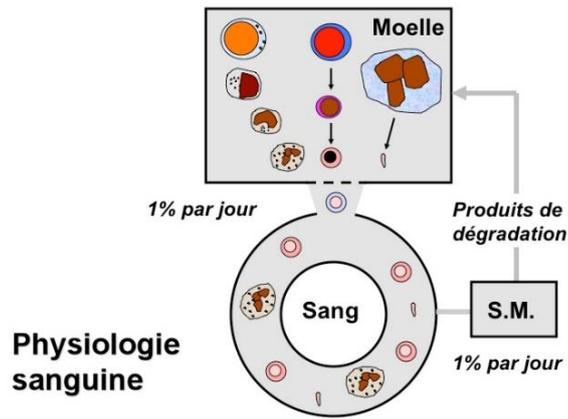


Figure 31. Diapédèse ou entrée des cellules rouges dans le sang périphérique

e) Les capillaires sinusoides

Ces vaisseaux sanguins, principalement présents au niveau hépatique et médullaire, se distinguent par un diamètre irrégulier, des espaces entre les cellules endothéliales et une membrane basale discontinue munie de pores de tailles variables. Cette structure particulière favorise la libre circulation des cellules matures, tant les leucocytes que les érythrocytes.

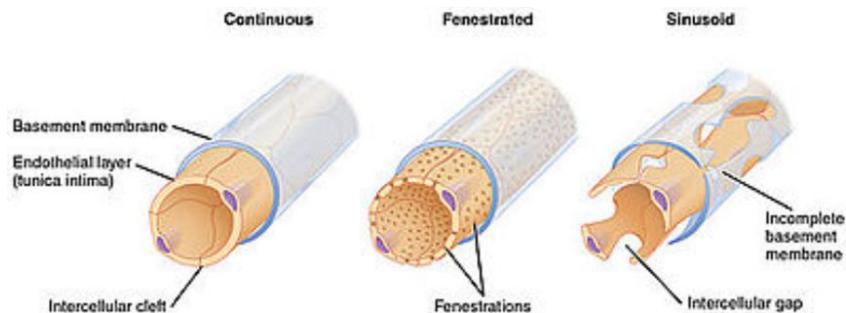


Figure 32. Différents types de vaisseaux sanguins (à droite le capillaire sinusoid)

I.5.7. Régulation de l'érythropoïèse in vivo

La régulation de l'érythropoïèse est essentielle afin de maintenir une quantité de GR relativement constante au cours du temps. Lors d'une hémorragie ou d'une hémolyse excessive, reflétant une perte plus ou moins importante de sang, une synthèse accélérée d'hématies est nécessaire afin de restaurer une volémie optimale. Cette régulation repose sur un équilibre entre des mécanismes cellulaires et humoraux, stimulant ou inhibant cette synthèse de cellules rouges.

I.5.7.1. Régulation physique intra-médullaire

La régulation de l'érythropoïèse au sein de la moelle osseuse implique divers éléments, dont le microenvironnement composé d'une composante cellulaire et d'une matrice extracellulaire (MEC). Le stroma médullaire, présent dans les organes hématopoïétiques, offre un soutien structurel essentiel, créant ainsi une "niche" protectrice pour les CSH. Ce microenvironnement médullaire est composé de diverses cellules telles que les cellules mésenchymateuses, les ostéoblastes/ostéoclastes, les cellules immunitaires (macrophages, lymphocytes T), les cellules endothéliales (CE) et les adipocytes. Ces cellules stromales jouent un rôle crucial en fournissant les facteurs de croissance et en établissant des contacts étroits avec les CSH, contribuant ainsi de manière significative à la synthèse des GR.

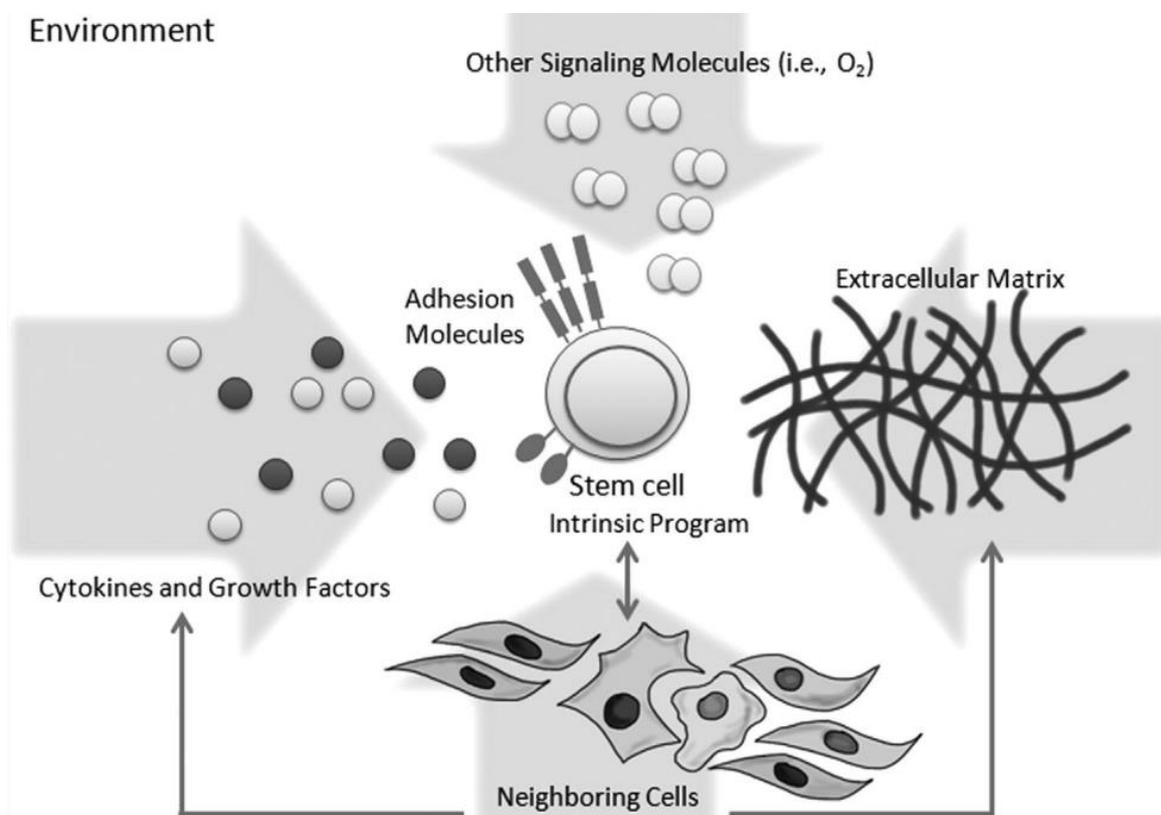


Figure 33. Interactions entre la CSH et son environnement médullaire

La matrice extracellulaire (MEC) forme un réseau complexe de fibres et de protéines servant de points d'adhérence pour les cellules érythroïdes. Cette adhérence revêt une importance cruciale en raison du réservoir de facteurs de croissance présent dans la MEC. Les cellules stromales sont responsables de la sécrétion des composants de cette structure tridimensionnelle, comprenant des protéines (collagène et élastine), des glycoprotéines (principalement laminine et fibronectine), ainsi que des protéoglycanes. Les cellules souches mésenchymateuses (CSM) qui donnent naissance aux cellules stromales, peuvent se différencier en divers types cellulaires tels que les adipocytes, les chondrocytes, les

ostéoblastes ou les fibroblastes grâce à leur propriété de multipotence. La MEC crée des conditions anatomiques favorables, facilitant notamment l'adhésion des cellules souches (notamment grâce au collagène) et contribuant ainsi à leur différenciation. D'autres molécules telles que le CD44 et l'acide hyaluronique jouent un rôle crucial dans la MEC et sont fortement exprimées sur les cellules endothéliales sécrétant le SDF-1, participant ainsi au processus de "homing" des CSH. (86) En culture à long terme, les cellules souches mésenchymateuses (CSM) contribuent à créer un environnement propice à la survie, à la prolifération et à la différenciation des cellules hématopoïétiques immatures sur plusieurs semaines, grâce à un effet anti-apoptotique et inducteur de la prolifération. (87)

I.5.7.2. Régulation chimique intra-médullaire

Les cytokines, également appelées interleukines (IL) lorsqu'elles sont synthétisées par des lymphocytes, sont des protéines, solubles ou membranaires, agissant comme médiateurs au sein des interactions cellulaires. Elles sont sécrétées de manière paracrine pour un effet local ou de manière humorale, circulant dans le sang, pour une action à distance dans l'organisme. Ces molécules interviennent à différents stades dans la régulation de l'érythropoïèse in vivo en se liant aux récepteurs membranaires spécifiques.

a) Cytokines activatrices

L'érythropoïèse est principalement régulée par le **Stem Cell Factor (SCF)** et l'**érythropoïétine (EPO)**. (88)

- l'EPO agit dès le stade de BFU-E afin de stimuler la prolifération, la survie, et la différenciation des progéniteurs érythroïdes.

- le SCF induit des signaux de survie et de prolifération permettant l'expansion des progéniteurs précoces. Cette cytokine agit via son récepteur spécifique c-Kit afin d'induire des signaux de survie et retarder la différenciation, autorisant ainsi la prolifération et l'expansion des progéniteurs érythroïdes immatures. (89) Il semble que le SCF joue un rôle dans la régulation de l'adhésion des cellules érythrocytaires aux éléments du stroma médullaire.

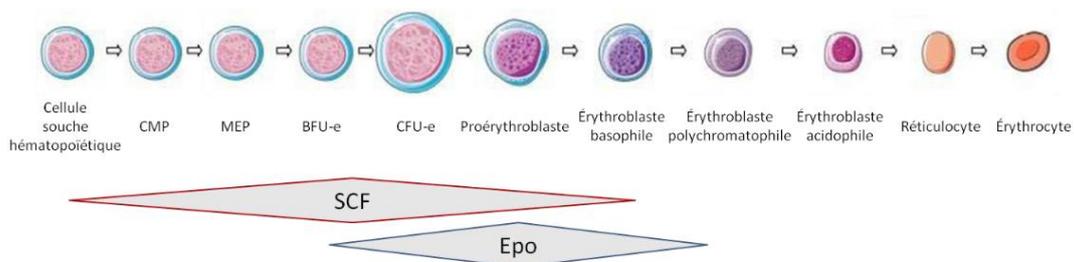


Figure 34. Influence du SCF et de l'EPO

L'EPO et le SCF sont tous deux indispensables à l'érythropoïèse physiologique. Bien que le SCF permette la croissance et la survie des progéniteurs érythroïdes, son effet est largement amplifié par la présence d'EPO. De la même manière, l'EPO seule est capable d'induire la formation de colonies érythroïdes à partir de progéniteurs in vitro, cependant la présence de SCF dans le milieu augmente fortement le nombre de colonies formées. (90) (91) Ces éléments indiquent que l'EPO et le SCF agissent en synergie, suggérant l'existence d'une coopération entre leurs deux récepteurs EPO-R et c-Kit.

Nous retrouvons également parmi les cytokines contribuant à accroître la quantité finale de GR :

- **l'interleukine 3 (IL-3)** forme, en association avec le SCF, le GM-CSF, ainsi que les IL-4 et -9, des molécules à activité BPA (Burst Promoting Activity) soutenant la prolifération des BFU-E. Administrée à des souris saines, l'IL-3 augmente le nombre de CSH et de CFU-E au niveau splénique et médullaire. Le SCF agit de manière synergique avec l'IL-3 aux stades précoces et avec l'EPO aux stades tardifs de la différenciation (CFU-E). (92) (93)

- L'interleukine 11 (IL-11), un facteur de promotion de la cellule souche, accroît le nombre de cellules souches en cycle cellulaire en stimulant la prolifération des BFU-E en synergie avec l'IL-3 et l'EPO. De plus, elle favorise la maturation des CFU-E. (94)

Par ailleurs, **l'axe CXCR4-SDF1** (récepteur CXCR4 - ligand SDF1) est une voie de signalisation clé dans la régulation et la migration des CSH. L'interaction entre CXCR4 et SDF1 permet aux cellules érythroïdes de rester ancrées dans les logettes médullaires, formant ainsi une réserve mobilisable en fonction des besoins de l'organisme. (95) Le SDF-1 (Stromal Cell-Derived Factor 1) ou CXCL-12, une chimiokine produite par les cellules stromales de la moelle, se lie au récepteur CXCR-4 (CD184). L'interaction entre le SDF-1 et son récepteur CXCR-4 sur les cellules CD34+ médullaires primitives déclenche une signalisation impliquant JAK2, conduisant à une réorganisation des protéines du cytosquelette. Le SDF-1 est chimiotactique et chimiokinétique pour les CSH médullaires, induisant leur migration vers des concentrations élevées. (96) De plus, le SDF-1 joue un rôle essentiel dans la mobilisation des cellules hématopoïétiques. Une corrélation inverse a été observée entre la quantité de cellules CD34+ collectées par cytophèrese et l'intensité de leur expression de CXCR-4, avec une diminution exponentielle du nombre de ces cellules à mesure que l'intensité d'expression de CXCR-4 augmente. (97)

b) Cytokines inhibitrices

Une réduction de la production des GR est également constatable, évitant ainsi une surproduction de cellules qui pourrait être préjudiciable à l'organisme, comme observé, par exemple, dans la polyglobulie ou la maladie de Vaquez. Parmi les cytokines qui équilibrent ce processus, il existe :

- Le facteur de nécrose tumorale alpha (TNF- α), une cytokine multifonctionnelle principalement produite par les macrophages et les lymphocytes activés en réponse à des stimuli inflammatoires, est impliqué dans l'apoptose des progéniteurs érythroïdes et bloque partiellement la synthèse d'EPO. Son action peut varier (inhibitrice ou stimulante) en fonction des facteurs de croissance utilisés en culture pour stimuler la prolifération. Son rôle a été

suggéré dans divers syndromes cliniques associés à une insuffisance ou un dysfonctionnement médullaire, tels que la réaction du greffon contre l'hôte, le rejet post-greffe ou l'aplasie médullaire, soulignant son impact inhibiteur sur l'hématopoïèse. (98)

- L'interféron-gamma (IFN- γ), produit par les lymphocytes T et les cellules tueuses naturelles (NK) en réponse à des stimuli inflammatoires, exerce une action antimototique en bloquant l'expression de certains facteurs de transcription essentiels à la synthèse de globules rouges

- le Transforming Growth Factor β (TGF- β) est une protéine multifonctionnelle qui exerce un effet inhibiteur sur la croissance des progéniteurs précoces *in vitro*. Cette protéine joue un rôle crucial dans le contrôle de divers processus cellulaires liés au développement et à l'auto-renouvellement des cellules somatiques. (99) Elle agit en tant qu'inhibiteur de l'entrée en cycle cellulaire des progéniteurs primitifs stimulés par les cytokines telles que SCF, FL, TPO et IL-6. Cependant, l'effet du TGF- β est variable et dépend de l'état de différenciation des cellules ainsi que de son interaction avec d'autres cytokines. (100) Des études ont révélé que le TGF- β sécrété par les CSM présente une activité immunomodulatrice. (101)

- Les hormones thyroïdiennes, telles que la thyroxine (T4) et la triiodothyronine (T3) interviennent également dans la synthèse d'EPO. Une hypothyroïdie peut altérer la maturation érythrocytaire

c) Autres éléments chimiques

Outre les cytokines et l'EPO, divers éléments interviennent dans la régulation de l'érythropoïèse, tels que :

- Les oligoéléments et les minéraux, tels que le fer, le zinc, l'iode, le cobalt, le cuivre, le manganèse et le calcium sont essentiels pour optimiser divers processus métaboliques. Ils agissent en tant que cofacteurs d'enzymes (zinc), contribuent à la structure des vitamines (cobalt), et certains d'entre eux participent à l'expression des signaux hormonaux (zinc et iode).

- La vitamine B12 et l'acide folique sont des vitamines essentielles impliquées dans la synthèse de l'ADN et la mitose. Des carences vitaminiques peuvent induire des anémies mégaloblastiques, caractérisées par la présence de GR anormalement volumineux et immatures.

- L'oxygène joue un rôle majeur dans la synthèse d'EPO et l'insuline, l'IGF1 I (insulin-like growth factor-I) et l'IGF2 potentialisent ses effets. (102)

- L'hormone de croissance GH favorise également l'érythropoïèse. (103)

I.5.7.3. Autres mécanismes régulateur

La régulation transcriptionnelle influence également l'érythropoïèse *in vivo*, avec notamment les facteurs de transcription KLF1, GATA-1 et EKLF, jouant un rôle crucial dans la différenciation érythroblastique. Les modifications épigénétiques, telles que l'acétylation et la méthylation de l'ADN, sont impliquées dans la régulation de l'expression des gènes liés à l'érythropoïèse, influençant ainsi la synthèse des GR. (104)

I.5.8. L'EPO, ou érythropoïétine

L'EPO, glycoprotéine de 34 kDa appartenant à la famille de l'IL2, est la principale régulatrice de l'érythropoïèse dans l'organisme. Sa synthèse est principalement assurée par les cellules mésangiales du cortex rénal, contribuant à hauteur de 90% à la production totale. Chez l'adulte, une petite quantité (10%) est également produite par les cellules hépatiques, tandis que chez le fœtus, cette production hépatique assure initialement la totalité de la production d'EPO. Il est important de noter qu'aucun stockage d'EPO n'est effectué dans le corps. (105)

La production d'EPO est stimulée en réponse à plusieurs signaux, notamment une baisse de la pression partielle en oxygène dans le sang, une diminution de l'hématocrite, ou une augmentation des besoins tissulaires en oxygène. Les conditions d'hypoxie ou d'anémie peuvent entraîner une augmentation significative, jusqu'à un facteur 100, du taux d'EPO plasmatique. À l'inverse, le retour à la normoxie inhibe la production d'EPO. (106)

I.5.8.1. Mécanisme d'action

Afin d'exercer son effet, l'EPO agit directement au niveau médullaire en se liant à son récepteur membranaire spécifique l'EPO-R présent à la surface des cellules érythroïdes. Au sein de la lignée érythroïde, ce récepteur est exprimé à partir de la BFU-E, atteignant une densité maximale aux stades de la CFU-E, du proérythroblaste et de l'érythroblaste basophile. Il est également présent sur d'autres types cellulaires, notamment les mégacaryocytes et les cellules endothéliales. (107)

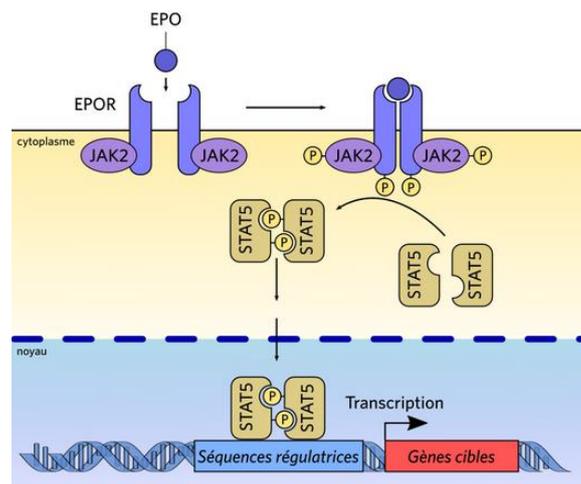


Figure 35. EPO et sa voie de signalisation JAK2/STAT5

Lorsque l'EPO se lie à son récepteur associé à une tyrosine kinase, ce dernier active une molécule sous-membranaire appelée JAK2 par phosphorylation. JAK2, à son tour, active un facteur de transcription, la molécule STAT5. Cette cascade d'activations entraîne la migration vers le noyau cellulaire, favorisant ainsi la transcription des gènes essentiels à la prolifération

et à la différenciation de la lignée érythroïde. Par exemple, la transcription du gène ALAS2, qui code pour l'enzyme acide aminolévulinique synthase 2, catalyse la première étape de la synthèse de l'hème. En plus de la voie JAK2/STAT, la liaison de l'EPO à son récepteur EPO-R active d'autres voies de signalisation, telles que les voies Ras/MAPK ou PI3K/Akt, modulant ainsi la prolifération, la survie ou la différenciation cellulaires en fonction des besoins cellulaires. (108)

I.5.8.2. Rétrocontrôles négatifs

Le rein assume un rôle central dans la régulation endocrine en fonctionnant comme une véritable glande productrice d'EPO, qui cible la moelle osseuse. L'augmentation de la production de GR, stimulée par l'EPO, a pour effet d'accroître la disponibilité d'oxygène pour les tissus, mettant en lumière la corrélation physiologique qui existe entre les taux d'hémoglobine et d'EPO dans la circulation sanguine. Cette variation est détectée par les chémorécepteurs situés au niveau des artères rénales, lesquels, à leur tour, exercent un rétrocontrôle négatif afin de limiter cette synthèse. (109)

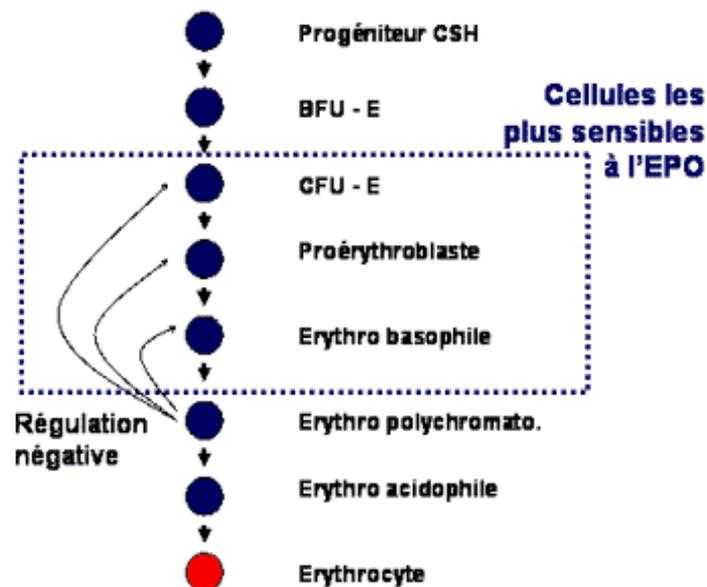


Figure 36. Boucle de rétrocontrôle négatif impliquant Fas-FasL

Physiologiquement, seuls les érythroblastes (Ebl) les plus sensibles à l'EPO prolifèrent et se différencient. Cependant, un second rétrocontrôle négatif existe afin de réprimer la prolifération des Ebl immatures et d'inhiber une production excessive de GR. Dans ce modèle, il a été proposé que les Ebl en fin de différenciation (polychromatophiles et acidophiles), au sein des îlots érythroblastiques de la moelle osseuse, expriment le ligand FAS et interagissent ainsi directement avec les progéniteurs et les précurseurs érythroblastiques plus précoces exprimant le récepteur FAS afin d'interrompre la maturation et d'induire l'apoptose de ces cellules. Ainsi, le taux d'Ebl «matures» de la moelle pourrait contrôler rétroactivement

l'érythropoïèse. En cas d'excès d'EPO, tous les Ebl exprimant l'EPO-R vont proliférer et se différencier afin de synthétiser un nombre accru d'érythrocytes. Les Ebl immatures sont alors protégés contre l'apoptose induite par les Ebl matures. (110)

I.5.8.3. EPO recombinantes

a) Etapes clés dans la découverte de l'érythropoïétine

L'idée d'une régulation de la production des GR par l'hypoxie a été formulée pour la première fois au milieu du XIXe siècle, et la proposition d'un contrôle hormonal a été avancée en 1906. Une avancée significative a été réalisée par Clotilde-Camille DEFLANDRE, sous la direction de son mentor Paul CARNOT, qui, en injectant du sérum de lapins anémiques à des lapins sains, a ainsi considérablement augmenté leur production de GR. À cette époque, le terme "hémopoïétine" était prédominant avant que celui d'érythropoïétine ne s'impose. En 1977, GOLDWASSER et son équipe parviennent à isoler et à purifier l'EPO pour la première fois à partir d'urines de patients anémiques, bien que la quantité obtenue soit limitée. (111)

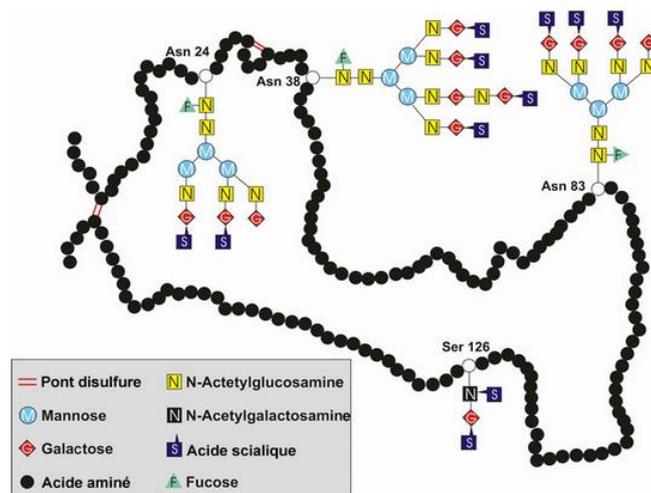


Figure 37. Structure primaire de l'EPO endogène

b) EPOIETINE

Les époétines sont des formes recombinantes d'érythropoïétine humaine (r-HuEPO) qui partagent la même séquence d'acides aminés que l'EPO endogène. Ces molécules glycosylées visent à prolonger la durée de vie de la molécule dans l'organisme, réduisant la fréquence des injections et améliorant ainsi le confort du patient. Cependant, la glycosylation, cruciale pour l'activité biologique in vivo, varie en fonction de la souche de cellules transfectées employée pour la synthèse de l'EPO, ainsi que des conditions physiologiques de culture

auxquelles ces cellules sont exposées. Par conséquent, les différentes époétines disponibles sur le marché présentent des variations dans la proportion de résidus d'acide sialique par rapport à l'EPO endogène, et elles diffèrent les unes des autres au niveau de leurs propriétés pharmacocinétiques. (112)

Actuellement, il existe différentes formes de rHuEPO, notamment les époétines alpha (Eprex®) et bêta (Neorecormon®), considérées comme de première génération et produites par la technique de l'ADN recombinant à partir de cellules ovariennes de hamster chinois (CHO-K1). La rHuEPO est administrée par voie intraveineuse (IV) ou sous-cutanée (SC)

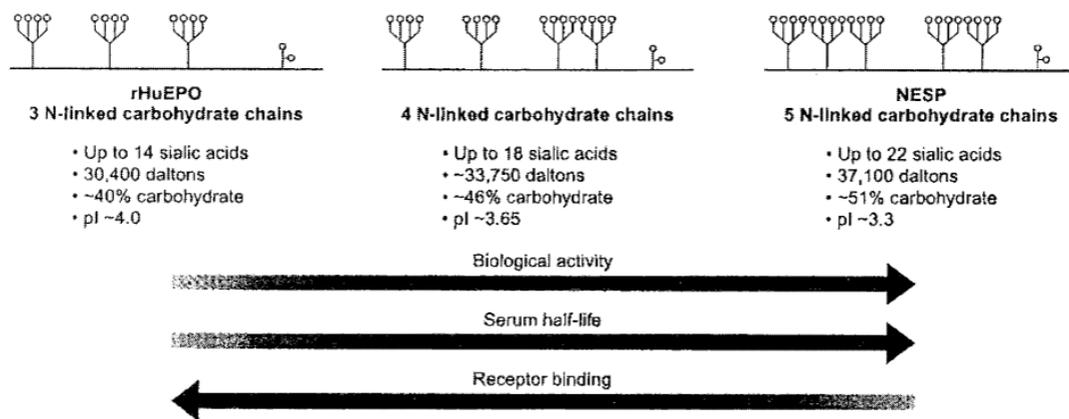


Figure 38. Relation entre glycosylations et activité biologique

Les différences entre les réponses in vitro et in vivo découlent de l'instabilité de l'EPO non glycosylée, dont la demi-vie plasmatique ne dépasse que quelques minutes. En effet, l'EPO non glycosylée est rapidement captée par le foie, où elle subit une dégradation. Ainsi, la glycosylation joue un rôle protecteur en prolongeant la demi-vie plasmatique de l'EPO, et cette prolongation est d'autant plus significative avec l'augmentation du nombre de molécules d'acide sialique gréffée. Par exemple, chez la souris, l'isoforme 14 présente une demi-vie 3,2 fois plus longue que celle de l'isoforme 6. (113) Ces observations suggèrent une corrélation directe entre le contenu en acide sialique, la demi-vie plasmatique et l'activité biologique in vivo. Cependant, une relation inverse est observée en termes d'affinité pour les récepteurs (114), se traduisant de la manière suivante : plus la molécule possède de chaînes glycosylées, plus son affinité pour son récepteur sera faible, mais plus sa demi-vie sera longue et, par conséquent, son activité dans l'organisme sera prolongée.

Cette propriété d'ajout de glycosylations est également exploitée dans le traitement symptomatique du diabète, notamment dans la production d'insulines recombinantes, afin d'allonger la durée d'action et de réduire le nombre d'injections nécessaires, améliorant ainsi le confort chez le patient.

I.5.9. Rôle de l'oxygène dans la régulation de l'érythropoïèse in-vivo

L'objectif fondamental de l'EPO est d'améliorer l'approvisionnement en oxygène des tissus. La concentration de dioxygène, agissant à la fois comme la cause et la conséquence de la libération d'EPO, établit ainsi une relation étroite entre ces deux éléments. En effet, il existe une corrélation inverse entre la concentration d'oxygène et la production d'EPO dans l'organisme. Explorons comment cet élément, constitué de deux atomes d'oxygène et essentiel à notre survie, exerce son influence, à la fois à l'extérieur et à l'intérieur du corps, dans la synthèse des GR.

a) Disponibilité en oxygène dans l'air atmosphérique

La pression partielle en oxygène dans l'air atmosphérique (pO_2 atmosphérique) est la pression partielle en O_2 , à une altitude donnée dans l'atmosphère terrestre, exprimée en mmHg (millimètres de mercure). Lorsque celle-ci décroît, avec l'altitude par exemple, la synthèse d'EPO est stimulée afin de compenser ce phénomène de raréfaction en oxygène. C'est la raison pour laquelle certains alpinistes s'équipent de bouteilles d'oxygène, dépassé une certaine altitude (4500m environ). C'est également la raison pour laquelle certains sportifs s'entraînent en altitude, afin d'acquérir une meilleure oxygénation du sang et pouvoir ainsi réaliser de meilleures performances sportives. (115) (116)

b) Disponibilité en oxygène dans le sang artériel

La PaO_2 (pression partielle d'oxygène dans le sang artériel) est la mesure de la pression partielle de l'oxygène dissous dans le sang artériel, exprimée également en mmHg. Cette mesure est employée afin d'évaluer la capacité des poumons à fournir de l'oxygène au sang. Une diminution de la PaO_2 peut se produire dans différentes conditions, telles que l'hypoxémie, l'hypoventilation, l'insuffisance cardiaque, l'insuffisance respiratoire, la pneumonie et d'autres troubles pulmonaires.

Les répercussions sur le processus de l'érythropoïèse dépendent de la durée et du degré de la diminution de la PaO_2 . En effet, à court terme, lorsque la PaO_2 est basse, l'organisme peut compenser adéquatement dans le but de corriger cette situation, en accroissant la production d'EPO, stimulant à son tour la production de GR et augmentant ainsi la quantité d' O_2 disponible dans le sang périphérique.

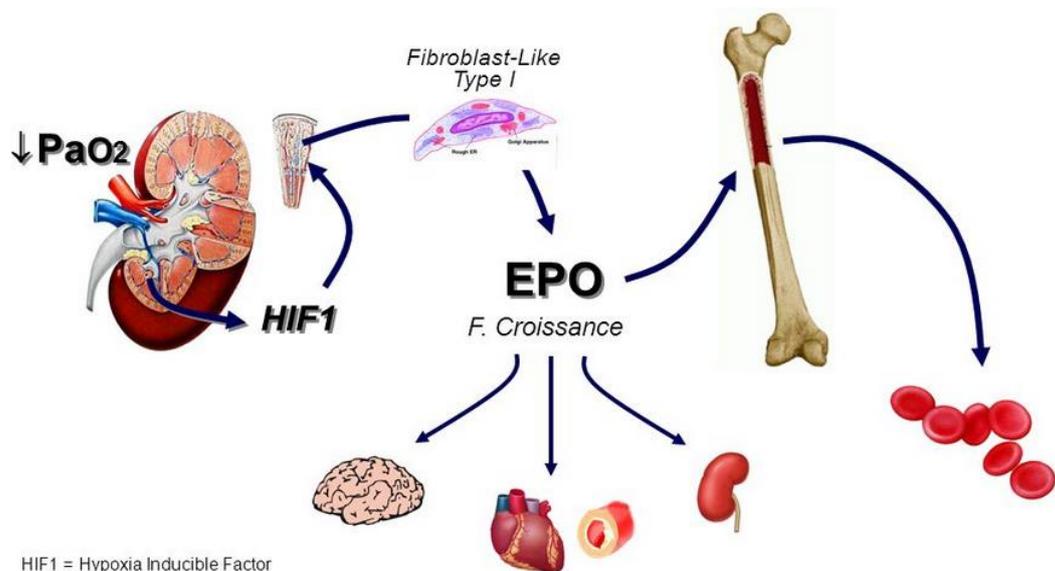


Figure 39. Libération d'EPO en réponse à une diminution de la PaO₂

Cependant, une PaO₂ maintenue à une faible concentration, de manière prolongée, peut induire une diminution de la synthèse d'EPO et donc, une production atténuée en GR. L'organisme, n'étant plus à même de compenser ce défaut, peut finir par s'épuiser, et sans correction de cette situation, une anémie peut s'installer progressivement.

c) Concentration en O₂ au sein des différents tissus

La normoxie physiologique a récemment été définie par des concentrations d'oxygène comprises entre 2% et 9%. (117) Cependant, étendre cette norme à l'ensemble des tissus de l'organisme représente un défi complexe. Malgré les difficultés liées à la mesure précise des concentrations d'oxygène dans les tissus, celles-ci varient considérablement d'un tissu à l'autre, voire à l'intérieur d'un même tissu. En effet, la concentration d'oxygène de l'air (20-21% d'O₂) qui pénètre les poumons diminue progressivement à mesure qu'elle traverse les divers tissus de l'organisme, atteignant presque zéro dans certaines régions. Ces concentrations locales d'oxygène reflètent le statut métabolique de chaque type cellulaire adapté physiologiquement dans le corps.

Ainsi, dans le parenchyme pulmonaire et en circulation, ainsi que dans les organes bien irrigués tels que le foie, les reins et le cœur, les concentrations d'oxygène varient entre 14% et 4%. (118) (119) Dans d'autres tissus relativement moins irrigués, ces concentrations sont encore plus faibles : dans le cerveau, elles oscillent entre 0,5% et 7% (120) tandis que dans l'œil (rétine, corps vitré), elles se situent entre 1% et 5%. (121) Au niveau médullaire, il existe également un gradient spécifique en O₂ où le niveau d'oxygène varie de 0,1% à 5%. (122)

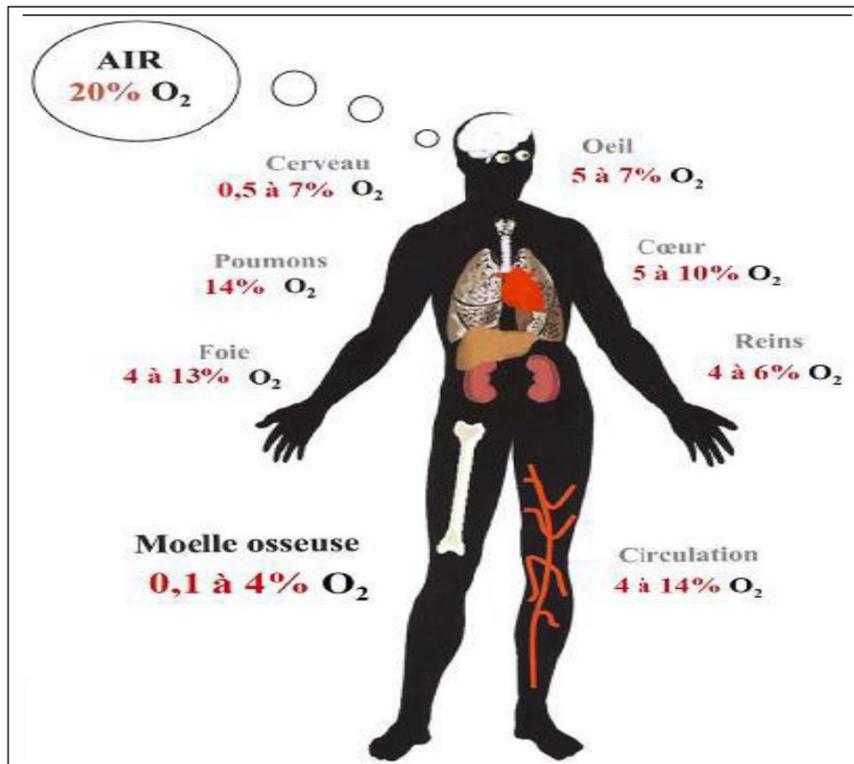


Figure 40. Variations des concentrations en O₂ dans l'organisme

d) Gradient de concentration en O₂ au niveau médullaire

Avant d'explorer plus en détail la relation entre l'oxygène et les CSH dans le contexte de l'érythropoïèse ex vivo, il est essentiel d'examiner de près les niveaux d'oxygénation au sein de la niche des cellules souches. Les analyses des concentrations d'oxygène dans les tissus ont révélé que les zones où résident les cellules souches présentent des niveaux d'oxygène particulièrement bas. Ces niveaux d'oxygénation semblent jouer un rôle protecteur en préservant les CSH des espèces réactives de l'oxygène (ROS), les protégeant ainsi d'un éventuel stress oxydatif pouvant être néfaste pour l'ADN cellulaire. (123)

L'environnement médullaire, ainsi que d'autres environnements de l'organisme, est décrit comme "normoxique" ou "physioxique", caractérisé par un gradient de concentration en oxygène, avec une concentration inférieure à 1% au centre et jusqu'à 7% près des vaisseaux sinusoides. Ce gradient est en partie généré par la diffusion de l'oxygène à partir des vaisseaux sanguins, favorisant une meilleure disponibilité en oxygène dans les régions proches des vaisseaux par rapport aux régions plus profondes. Le terme "hypoxie" n'est pas employé ici, car une concentration d'environ 2% en oxygène est considérée comme physiologique et essentielle afin de préserver l'état de quiescence des cellules souches. En revanche, l'hypoxie est définie dans une situation anormale par rapport à la normoxie. (124)

Au niveau médullaire, il a été établi que des concentrations physiologiquement basses en oxygène permettent de maintenir les CSH dans un état indifférencié, préservant ainsi la phase G₀ du cycle cellulaire essentielle à l'auto-renouvellement. Cette prolifération, caractérisée par une faible énergie, inhibe la différenciation des CSH. (125) En revanche, des concentrations

plus élevées en oxygène favorisent la différenciation érythrocytaire. (126) En d'autres termes, les CSH ont besoin d'oxygène pour se différencier en cellules matures, et l'élévation de la concentration d'oxygène au cours de la migration des cellules souches et progénitrices vers les vaisseaux sanguins, est un indice important orientant leur engagement et leur différenciation. Cela signifie que, lorsque la CSH perd le contact avec son environnement médullaire, elle initie sa différenciation en rejoignant la circulation périphérique. (127)

e) facteur HIF induit par l'hypoxie

L'hypoxémie se caractérise par une diminution de la concentration d'oxygène dans le sang, reflétant une réduction du niveau d'oxygène dans les tissus. En cas d'hypoxie tissulaire sévère, le patient peut présenter une cyanose, une coloration anormalement bleutée de la peau. Afin de remédier à cette situation, les chémorécepteurs rénaux, sensibles aux variations d'oxygène, détectent ces changements d'oxygène et déclenchent en réponse la synthèse et la libération d'EPO via le facteur HIF (facteur induit par l'hypoxie).

L'hétérodimère HIF est composé d'une sous-unité régulatrice α (HIF-1, HIF-2 ou HIF-3), dont l'expression est régulée par l'oxygène, et d'une sous-unité β . En présence d'oxygène, la sous-unité α est hydroxylée et dégradée par la voie ubiquitine-protéasome (VHL). En conditions de normoxie, la protéine HIF-1 α est donc très instable et subit une dégradation rapide, caractérisée par une demi-vie inférieure à cinq minutes. Cependant, en situation d'hypoxie, l'activité hydroxylase est inhibée. La sous-unité α s'accumule et se localise dans le noyau, où elle se lie à HIF-1 β . Ce complexe s'accumule en intracellulaire, agissant comme facteur de transcription dans les cellules rénales et hépatiques, stimulant la synthèse d'EPO, de transferrine (Tf) et de son récepteur (Tfr-1), contribuant ainsi à augmenter la quantité finale de GR circulants. (128) (129) (Figure 41)

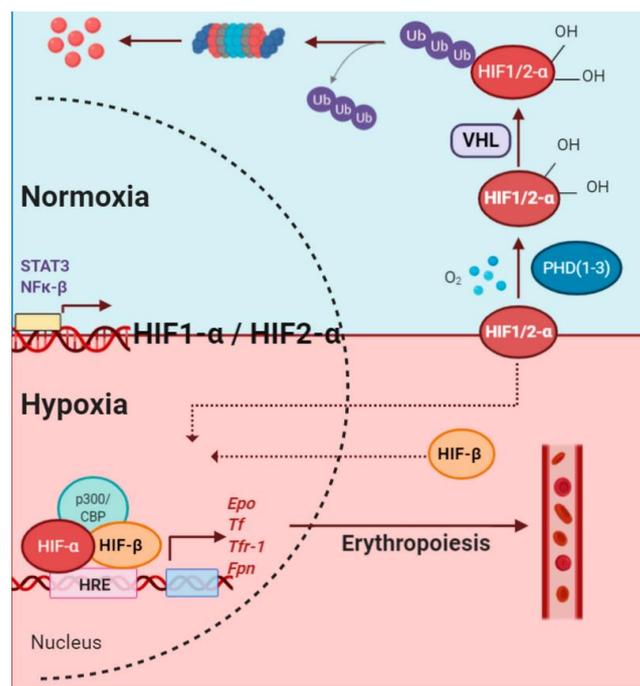


Figure 41. Effet du facteur HIF en réponse à l'hypoxie

L'hétérodimère HIF active plusieurs gènes cibles, classifiables en trois groupes fonctionnels distincts : (1) les protéines impliquées dans l'érythropoïèse, favorisant ainsi l'augmentation de l'apport d'oxygène aux tissus (EPO, transferrine, récepteur de la transferrine...) ; (2) les protéines qui favorisent localement la disponibilité en oxygène (HIF-1 régule l'angiogenèse en stimulant, par exemple, la production de VEGF) ; (3) les protéines essentielles à l'adaptation métabolique en situation d'hypoxie, permettant aux cellules de basculer vers un métabolisme anaérobie (glycolyse) en réponse à des niveaux réduits d'oxygène. (130) (131) (132) (133)

En résumé, l'oxygène joue un rôle crucial dans le processus de l'érythropoïèse in vivo en régulant de manière étroite la synthèse d'EPO. Son influence se manifeste à l'extérieur de l'organisme par une pression partielle en oxygène (PPO₂) appropriée et une disponibilité optimale à l'intérieur de celui-ci, permettant de répondre aux divers besoins des tissus. De plus, en raison de l'existence d'un gradient en oxygène au niveau médullaire, il préserve la quiescence des cellules souches et oriente leur engagement vers les différentes lignées cellulaires

- L'érythropoïèse in vivo peut être stimulée par divers facteurs tels que l'hypoxie d'altitude, l'anémie, une altération de l'affinité de l'hémoglobine pour l'oxygène et une augmentation des besoins tissulaires en oxygène, comme observé dans les cas d'hyperthyroïdie.
- À l'inverse, elle peut être inhibée par des conditions telles qu'une hyperoxygénation, une polyglobulie, et une diminution des besoins tissulaires en oxygène, comme observé dans les cas d'hypothyroïdie et d'hypopituitarisme.

I.5.10. Elimination des GR sénescents

Environ 120 jours après leur formation, la membrane plasmique des érythrocytes subit des dommages dus à la compression répétée au sein des capillaires. Dépourvue de noyaux et d'organites, la cellule n'est pas en mesure de renouveler ses composants défectueux. À mesure que la fragilité de la membrane augmente, le risque d'hémolyse de la cellule rouge augmente, en particulier lorsqu'elle est soumise à la compression dans les vaisseaux étroits de la rate. Les érythrocytes en fin de vie sont alors éliminés de la circulation, subissant une destruction par les macrophages au niveau de la rate et du foie. Les produits résultant de la dégradation de l'hémoglobine sont ensuite recyclés. Ce processus d'élimination des GR sénescents est essentiel afin de maintenir un équilibre au sein de la circulation périphérique et éviter l'accumulation de déchets potentiellement toxiques. (134)

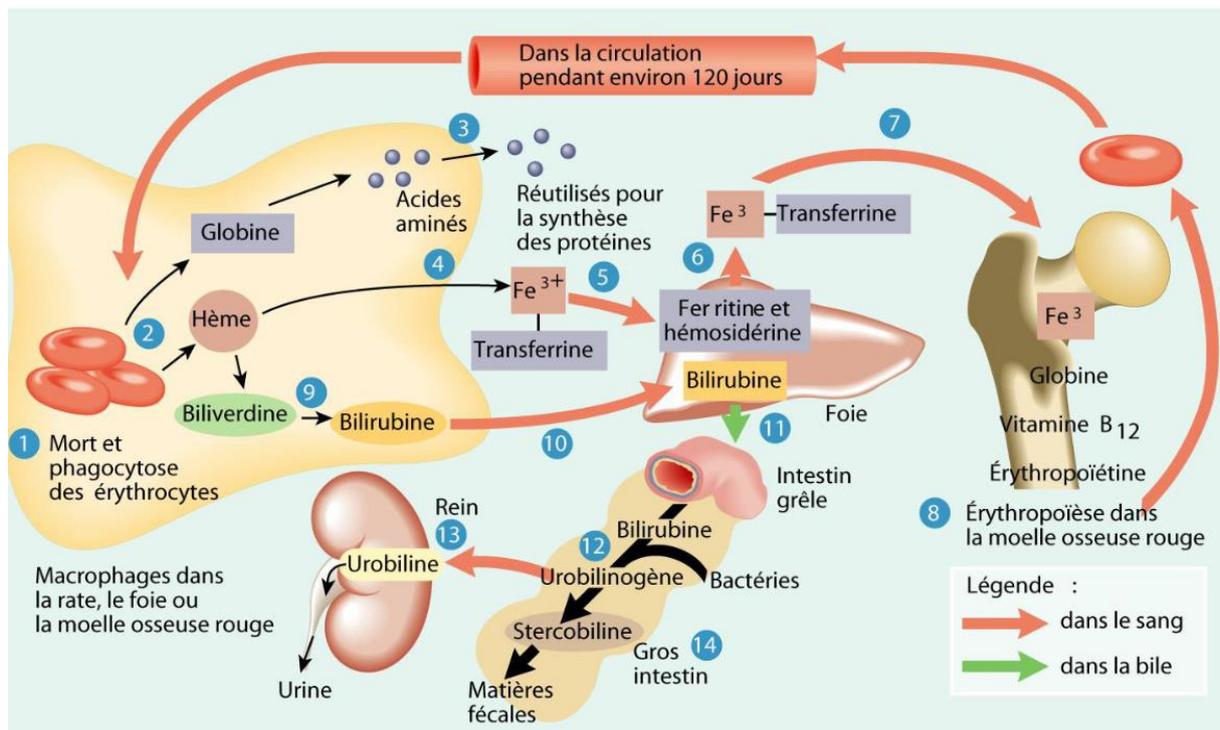


Figure 42. Elimination des érythrocytes sénescents

Lors de la phagocytose par les macrophages, les GR subissent une dégradation enzymatique, scindant l'Hb en ses composants de base : la globine et l'hème. Les chaînes de globine sont hydrolysées en aa, pouvant être réutilisés pour la synthèse de nouvelles protéines. Par exemple, l'enzyme lysosomale cathepsine D catalyse la dégradation des protéines en peptides plus petits. Pour ce qui est de l'hème, ce dernier est converti en biliverdine, puis en bilirubine par l'action de la biliverdine réductase. La bilirubine est transportée vers le foie pour être éliminée dans la bile, qui sera excrétée hors de l'organisme sous forme d'urobilinogène dans les urines et de stercobiline dans les selles (135)

Le fer, libéré lors de ce processus, est destiné au recyclage et au stockage dans le corps. Il peut être réutilisé lors de la synthèse de nouvelles molécules d'Hb ou être stocké au niveau hépatique en vue d'une utilisation future. Dans certaines situations, une quantité excessive de GR, même ceux qui ne sont pas nécessairement endommagés ou vieux, est éliminée au niveau de la rate, créant un cercle vicieux où davantage de cellules sont piégées. La splénectomie, ou l'ablation de la rate, peut être envisagée comme solution afin d'en soulager les symptômes. (136)

I.6. L'érythropoïèse ex vivo

I.6.1. Chronologie des avancées scientifiques

Depuis les années 1970, les avancées dans la compréhension de la physiologie cellulaire et des facteurs de croissance associés, conjuguées aux progrès techniques et technologiques, ont permis aux chercheurs de cultiver les CSH dans des conditions optimales, stimulant leur différenciation en érythrocytes matures.

-Tout d'abord, Dexter et ses collaborateurs (137), pionniers dans ce domaine, ont signalé la possibilité d'une différenciation érythroïde dans un système de culture murin à long terme. Cette équipe de chercheurs ont précocement mis en lumière le rôle des cellules CSM au cours de ce processus, en notant que ; "l'érythropoïèse et la granulopoïèse se produisent en association avec des éléments cellulaires discrets de la couche cellulaire adhérente dans la culture à long terme".

-Par la suite, en 1998, Malik et son équipe (138) ont élaboré un modèle de production in vitro de GR à partir de cellules CD34+ humaines. Sur le plan morphologique, les cellules obtenues présentaient des similitudes avec les réticulocytes et les érythrocytes matures. En outre, le profil de l'hémoglobine, contenu dans les globules rouges, reflétait le schéma de production de la β -globine observé in vivo chez les adultes, avec une synthèse négligeable en γ -globine après la naissance. L'originalité de cette étude réside dans le développement d'un modèle de production de globules rouges à partir de cellules CD34+ provenant de sujets atteints de drépanocytose. Cette approche visait à explorer la physiopathologie de ces troubles congénitaux et à évaluer le potentiel de la thérapie génique, comme l'illustre le passage suivant : "Les cellules CD34(+) ont été génétiquement marquées à l'aide d'un vecteur rétroviral portant un rapporteur de surface cellulaire. Le transfert de gènes dans les cellules CD34(+) suivi d'une différenciation érythroïde a conduit à l'expression du gène marqueur à la surface de la membrane des globules rouges."

-Plus récemment, en 2002, Neildez-Nguyen et son équipe (139) ont développé une méthode visant à accroître le nombre de CSH issues du sang de cordon ombilical humain. Dans un contexte in vitro, le processus de production des précurseurs érythroïdes se caractérisait par une efficacité d'énucléation relativement faible (4 %) et une expression atténuée de l'hémoglobine fœtale (HbF). Cependant, lorsqu'elles étaient administrées à des souris NOD/SCID, il était possible d'observer la différenciation des CSH en globules rouges énucléés.

Plus tard au cours de la même année, Luc DOUAY et ses collègues (4) ont réalisé une avancée majeure en démontrant la maturation finale des précurseurs érythroïdes in vivo. La méthode de culture employée impliquait l'utilisation de combinaisons spécifiques de facteurs de croissance dans un milieu sans sérum, comprenant des cytokines telles que le SCF, le Flt3, la thrombopoïétine, l'EPO et un facteur de croissance analogue à l'insuline, l'IGF-I (insulin-like growth factor-I), ajoutés en trois étapes successives. Ce protocole permettait d'obtenir, après transfusion chez la souris, des globules rouges matures caractérisés par une hémoglobine adulte fonctionnelle. En revanche, il était impossible d'observer cette maturation jusqu'au stade de globules rouges énucléés dans les cultures in vitro.

- Dans la continuité de leurs recherches, en 2005, Luc DOUAY, Marie-Christine GIARRATANA, et leurs équipes (140), ont développé une méthodologie permettant à la fois une expansion significative des cellules CD34+ et leur différenciation complète jusqu'aux

globules rouges matures fonctionnels. Ce protocole, constitué de trois phases distinctes, implique l'utilisation de cytokines (SCF, IL-3, EPO) et de cellules souches mésenchymateuses, dans le but de reproduire le microenvironnement médullaire. Les résultats obtenus, extrêmement prometteurs et encourageants, ont été les suivants :

- À J15, 98 % des cellules étaient des réticulocytes.
- À J18, pratiquement 100 % des cellules étaient des GR énucléés présentant toutes les caractéristiques morphologiques des cellules natives. (Figure 43)

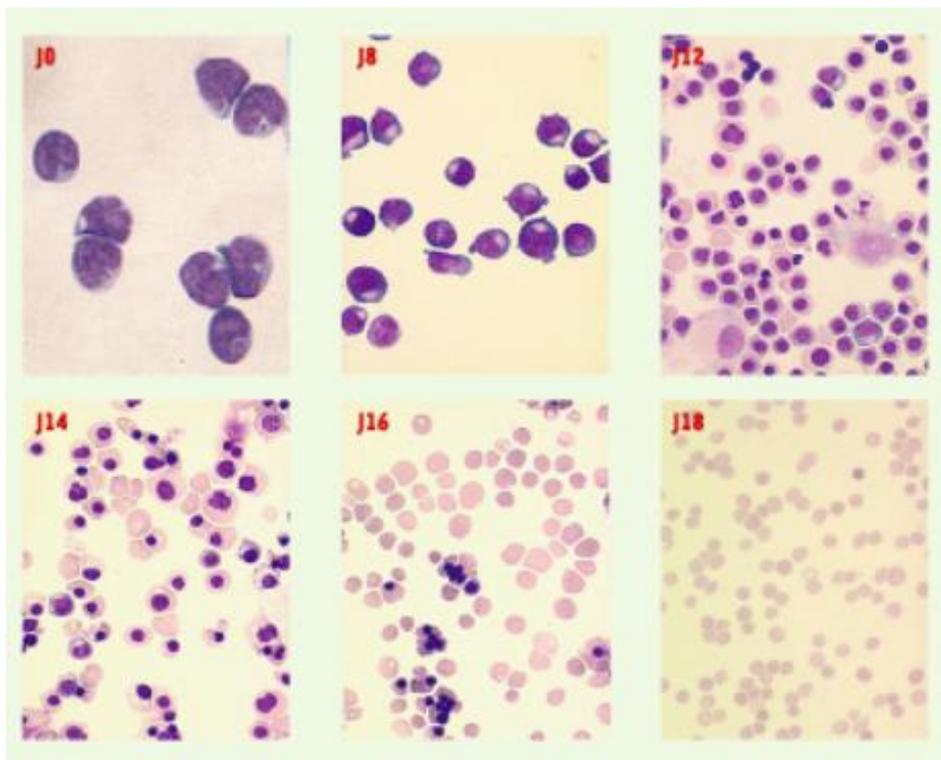


Figure 43. érythropoïèse ex vivo selon le protocole de Luc DOUAY, Marie-Christine GIARRATANA et al

De plus, les GR produits ressemblaient aux cellules natives à divers égards :

1. Une composition enzymatique conforme (en G6PD, PK), maintenant le glutathion et la concentration d'ATP optimales
2. Une membrane plasmique fonctionnelle, garantissant leur capacité de déformation
3. Une Hb fonctionnelle, capable de lier et de libérer l'oxygène (démonstré par photodissociation au laser et mesure de la saturation en oxygène).
4. Une survie assurée in vivo, confirmée lors de l'injection chez des souris NOD/SCID.

Jusqu'en 2011, l'applicabilité clinique d'une telle approche n'ayant jamais été prouvée, Marie-Christine GIARRATANA et son équipe (141) ont entrepris d'examiner la capacité des globules rouges cultivés (cRBC) à survivre chez les êtres humains. Ils ont élaboré, pour ce faire, un protocole de culture décrit en trois phases distinctes, impliquant l'emploi de certaines cytokines (HC, SCF, IL-3, et EPO). La différenciation érythroïde des CSH prélevées dans le sang périphérique, et une population homogène de globules rouges fonctionnels ont pu être obtenues. Ces GR se sont révélés conformes en termes de déformabilité, contenu enzymatique, capacité de fixation/libération d'oxygène par l'hémoglobine, ainsi que l'expression d'antigènes de groupe sanguin.

La possibilité de transfuser ces cRBs chez des souris SCID a ensuite été envisagée, démontrant que les globules rouges atteignaient, *in vivo*, les conditions nécessaires à leur maturation complète : « La transformation des réticulocytes en discocytes dès le 3ème jour après l'injection, ainsi que la réduction de la taille des cellules, attestent du niveau de différenciation atteint *in vivo*. »

Ces résultats ont finalement permis d'ouvrir la voie à une transfusion chez l'être humain, dans un contexte autologue, d'un échantillon de 10^{10} globules rouges cultivés marqués au 51C. Les résultats obtenus ont indiqué que « les érythrocytes survivaient en grand nombre pendant les 5 premiers jours après l'injection (94 % - 100 % de survie) et que leur taux de survie dans la circulation après 26 jours était compris entre 41 % et 63 %, ce qui se compare favorablement à la demi-vie rapportée de 28 ± 2 jours pour les globules rouges natifs. Leur survie *in vivo* témoigne globalement de leur qualité et de leur fonctionnalité ».

Le milieu de culture employé au cours de cette expérience correspond au milieu du "Protocole Court (PC)" de notre étude.

Les données issues de la littérature ont établi les bases en démontrant la faisabilité d'une transfusion de globules rouges produits *in vitro* chez l'Homme, ouvrant la voie à de nouvelles perspectives prometteuses dans le domaine de la médecine transfusionnelle. Ces travaux ont non seulement validé l'efficacité de cette approche novatrice, mais ont également suscité un intérêt considérable en raison de son potentiel médical et thérapeutique. Cependant, il est essentiel de poursuivre l'exploration de cette méthode de manière continue et d'adopter une approche créative afin de surmonter les défis techniques, notamment ceux liés à la complexité du système de coculture.

I.6.2. Effets observés des variations d'O₂ *in vitro*

a) Influence des ROS

Les espèces réactives de l'oxygène (ROS) sont des molécules hautement réactives, comprenant au moins un atome d'oxygène portant des électrons de valence non appariés. Bien qu'elles soient physiologiquement produites au cours du métabolisme cellulaire, leur présence peut également résulter d'expositions à des facteurs externes tels que l'irradiation et le rayonnement ultraviolet. La toxicité cellulaire des métabolites de l'oxygène (comme le peroxyde d'hydrogène H₂O₂ et les radicaux hydroxyle OH) est attribuable à la grande

réactivité chimique des ions O⁻, également appelés « radicaux libres », et peut se traduire par la peroxydation des lipides, altérant les membranes cellulaires et pouvant conduire à l'apoptose. Les antioxydants jouent un rôle crucial en neutralisant ces molécules. (142) (143)

Afin de prendre conscience de la corrélation qui existe entre la concentration en oxygène et les ROS, des expériences ont été menées sur des cultures de cellules CD34+ placentaires humaines à 5% d'oxygène, révélant une faible production de ROS, par rapport à une concentration d'oxygène de 20%. (144) (145)

b) Influence des niveaux d'O₂ in vitro

Quand les CSH résident dans un environnement à faible concentration en oxygène, elles démontrent la capacité de restreindre leur prolifération tout en évitant le stress oxydatif associé à l'accumulation de ROS. Des études suggèrent que le niveau intracellulaire de ROS et les voies de signalisation qui y sont associées pourraient jouer un rôle crucial dans la régulation de l'auto-renouvellement et la préservation à long terme des CSH, influençant ainsi leur processus de sénescence. (146) (147) (148) (Figure 44).

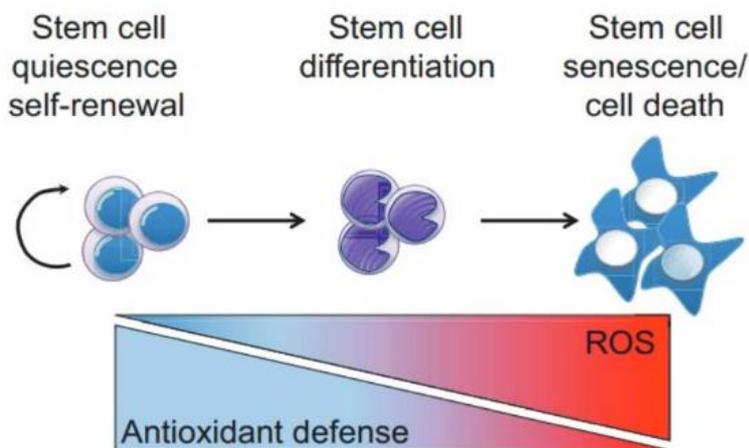


Figure 44. Impact des ROS sur le destin des CSH

Les cellules souches réagissent de différentes manières en fonction du niveau d'exposition à l'oxygène :

- À des concentrations faibles en oxygène :
 - **Quiescence et auto-renouvellement cellulaire.** Les CSH peuvent entrer dans un état de quiescence (ou phase 0), caractérisé par une réduction significative de leur activité métabolique et de leur division cellulaire. En réponse à une stimulation, les CSH peuvent sortir de cet état de quiescence pour entrer en cycle cellulaire, favorisant ainsi l'auto-renouvellement.

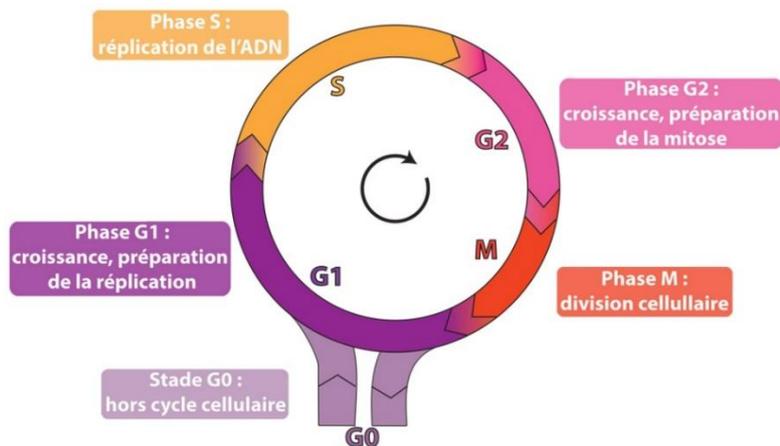


Figure 45. Phase 0 du cycle cellulaire, état de quiescence

- **Protection contre le stress oxydatif.** Les faibles niveaux d'oxygène contribuent à minimiser la production de radicaux oxygénés (ROS), réduisant ainsi le stress oxydatif et préservant l'intégrité génomique des CSH. Des études ont révélé que certaines parties du programme des cellules quiescentes sont spécifiquement dédiées à la détoxification, soulignant la capacité des CSH à adopter des mécanismes métaboliques pour se protéger contre l'augmentation des niveaux de ROS. (149)
- À des concentrations élevées en oxygène, on observe une **stimulation de la différenciation érythroïde.** Il est important de souligner que bien que des niveaux modérément élevés d'oxygène puissent stimuler la prolifération, des niveaux excessifs ou une exposition prolongée peuvent entraîner des effets négatifs par le stress oxydatif. La culture des CSM à 20% d'O₂ (hyperoxie) conduit à l'accumulation des molécules ROS, à l'origine de l'apoptose et du vieillissement cellulaire prématuré. En effet, les CSM exposées à des taux élevés d'oxygène subissent une sénescence prématurée et une réduction de l'expansion en comparaison avec celles cultivées à 2% (150) et à 1% d'O₂ (151) (152)

Marija VLASKI, Xavier LAFARGE, Zoran IVANOVIC et leur équipe ont réalisé une étude visant à examiner l'influence d'une faible teneur en oxygène sur le processus d'érythropoïèse ex vivo. Leurs observations ont révélé qu'une exposition des cellules CD34+ à de faibles concentrations d'oxygène, comprises entre 1,5 % et 5 %, pendant la première phase de culture (de J0 à J11), entraînait une augmentation significative de la production finale de GR. En d'autres termes, une concentration réduite en oxygène amplifie les progéniteurs en stimulant leur prolifération, ce qui se traduit par un rendement final accru en GR. Une seconde étude a montré que les cellules qui se divisent une fois ou plus à 1 % d'oxygène génèrent beaucoup plus de progéniteurs en culture secondaire que celles qui ne se divisent pas, ainsi que celles issues de la culture primaire à 20 % d'oxygène, lors de l'étude de cellules murines après 8 jours de culture primaire. (153)

Il a également été démontré que la production et l'amplification de BFU-E semblaient être améliorées à une concentration d'environ 1% d'O₂. En revanche, une expansion intensive des cellules formant les colonies (CFC) était observée à des concentrations plus élevées d'oxygène (21%), jusqu'à l'épuisement ultime de la population de cellules souches. Ainsi, une faible concentration en oxygène contribue à préserver le renouvellement optimal des cellules souches. (154) (Figure 46)

	LT-SRC	MRA, LTC-IC	CFC	Precursors	Functional properties	
20% O ₂					Supra physiological Absent in vivo	Chow et al., 2001 Ivanovic 2009b Tisdale et al., 1998 Holyoake et al., 1997
3 to 1.5 % O ₂					Quiescence : - Slow cycling : ? Self-Renewal : + Proliferation : +++ Differentiation : +++ Maturation : +++	Danet et al., 2003 Ivanovic et al., 2004b Koller et al., 1992a
1% O ₂					Rapid differentiation with limited proliferation Quiescence : - Slow cycling : + Self-Renewal : + Proliferation : +/- Differentiation : + Maturation : ?	Ivanovic et al., 2000 Ivanovic et al., 2002 Shima et al., 2009 Kovacevic-Filipovic et al., 2007
0.1% O ₂					Unexplored Quiescence : ++ Slow cycling : ? Self-Renewal : - Proliferation : - Differentiation : ? Maturation : ?	Hermitte et al., 2006

Figure 46. Devenir cellulaire selon les concentrations d'O₂ exposées

De récents travaux ont étudié le profil métabolique des CSH, reflétant leur localisation spécifique au sein du micro-environnement médullaire. En ce sens, une étude a décrit que ces cellules souches ont recours à la glycolyse (via HIF), voie anaérobie dont le coût est faible en énergie, afin s'adapter aux conditions avec une faible concentration en oxygène. (155) Dans ce contexte, des études ont démontré que les CSH en cycle mitotique lent sont localisées au niveau des zones pauvres en oxygène, tandis que les progéniteurs ayant un cycle plus actif et une capacité d'auto-renouvellement limitée résident dans des zones proches de la vascularisation. (156)

Aparté sur les concentrations d'O₂ employées en culture cellulaire ; il est courant d'observer dans la littérature scientifique des paramètres d'incubation traditionnels, caractérisés par ; une température de culture à 37°C, une concentration en CO₂ à 5% et une concentration en O₂ de 21%. Malheureusement, la plupart du temps, ces concentrations employées lors des

cultures ne reflètent pas celles mesurées dans les tissus biologiques, variant physiologiquement de 1 à 8% en O₂ (représentant en réalité des conditions hyperoxiques). Par exemple, le gradient d'oxygène localisé au niveau médullaire est caractérisé par des concentrations en O₂ ; d'environ 7% à proximité des vaisseaux sanguins et, inférieures à 1% dans les régions les plus profondes, qualifiant ainsi de « physioxique » l'environnement de la niche des CSH. Par conséquent, afin de mimer autant que possible les conditions in vivo, il semble essentiel de vouloir les reproduire en culture cellulaire.

L'équilibre entre la stimulation de la prolifération et la préservation de l'intégrité cellulaire est minutieusement régulé en fonction des besoins de l'organisme. En conditions anaérobies (oxygène < 1%), il existe donc un contexte énergétique suffisant pour la prolifération, permettant l'auto-renouvellement et la quiescence cellulaires, tout en empêchant l'engagement des cellules dans le processus de différenciation qui nécessite une quantité d'oxygène et d'énergie plus importantes. (124)

I.6.3. Sources & cellules souches

a) Cellules souches

Les CSH, les cellules souches embryonnaires humaines (ES) et les cellules souches pluripotentes induites (iPS), constituent les trois principales sources capables de générer des quantités adéquates de globules rouges. (157)

- **Cellules ES**

Les cellules souches embryonnaires sont des cellules indifférenciées, elles n'ont pas encore acquis de spécialisation cellulaire spécifique. Ces dernières peuvent se diviser indéfiniment (autorenouvellement) et ont un potentiel illimité de différenciation en divers types cellulaires (totipotente). Cela signifie qu'elles peuvent se différencier en de nombreux types de cellules spécialisées présentes dans les trois feuilletts embryonnaires (ectoderme, mésoderme, endoderme), y compris les GR.

Ces cellules sont dérivées de l'embryon aux premiers stades du développement, soulevant d'importantes questions éthiques. Les ES sont prélevées sur la masse cellulaire interne entre le 5^e et le 7^e jour suivant une fécondation in vitro (stade blastocyste du développement embryonnaire). La différenciation des ES en GR peut être difficile à obtenir. Cependant, elles ont un grand potentiel en recherche biomédicale dans le but de comprendre le développement embryonnaire, modéliser des maladies, et potentiellement le traitement de diverses pathologies. (158)

- **Cellules iPS**

Les cellules iPS sont des cellules de peau ou de sang, génétiquement reprogrammées, par transfert de certains gènes spécifiques dans les cellules cibles. Ces cellules sont également pluripotentes, ce qui signifie qu'elles ont un potentiel de différenciation cellulaire important (mais

moindre que la totipotence offerte par les ES). Comme les cellules ES, les cellules iPS ont la capacité de s'auto-renouveler, pouvant se diviser et produire des cellules filles identiques.

Les cellules iPS présentent un potentiel thérapeutique considérable, pouvant être utilisées pour modéliser des maladies, tester des médicaments, en thérapies cellulaires (en particulier pour les lésions de la moelle épinière), ainsi qu'à la recherche sur les cellules iPS spécifiques aux maladies neurologiques (en particulier pour la maladie de Parkinson et la maladie d'Alzheimer). Il est important de noter qu'il existe des défis techniques, comme avec la différenciation des iPS en GR qui peut être complexe et nécessiter des méthodes de culture sophistiquées. Il existe des défis de sécurité associés à leur utilisation, notamment des questions liées à la reprogrammation génétique et à la stabilité de ces cellules. (159) (160)

- **CSH**

Ces cellules sont représentées au cours de ces travaux. Physiologiquement impliquées dans la production des cellules sanguines, elles sont présentes au niveau de la moelle osseuse, du sang périphérique et du placenta. Les CSH sont toutefois peu nombreuses, leur expansion in vitro peut être limitée et leur différenciation en GR matures n'est pas totalement maîtrisée.

- b) Sources des CSH

De nos jours, trois principales sources de CSH sont employées en France, la moelle osseuse (MO), les cellules souches périphériques (CSP) mobilisées et le sang placentaire (SP), chaque type de greffon possédant ses avantages et ses inconvénients.

- **Moelle Osseuse (MO)**

Jusqu'en 1990, cette méthode était la seule source viable de CSH. Le prélèvement de MO s'effectue par ponction au niveau du bassin du donneur sain, impliquant une anesthésie générale de deux heures et une hospitalisation de 48 heures. Chez les donneurs mineurs, la moelle demeure la seule source autorisée de CSH prélevable. (161) La MO constitue une source précieuse de CSH, des cellules progénitrices endothéliales et des CSM. La greffe de MO est fréquemment employée pour traiter des affections telles que des leucémies, des lymphomes, des myélodysplasies, l'anémie aplasique sévère, et d'autres troubles altérant la production physiologique des cellules sanguines. Elle intervient également dans le traitement de maladies génétiques, où les CSH défectueuses sont remplacées par des cellules souches saines.

Depuis 1998, on observe une diminution de l'utilisation des greffons de MO, au profit des greffons de cellules souches périphériques mobilisées et du sang placentaire. Bien que leur utilisation ait été largement dépassée dans de nombreux cas, les greffes de MO peuvent encore être pertinentes, notamment dans le traitement de l'anémie aplasique et d'autres maladies bénignes. Cette approche présente des avantages potentiels, tels que la réduction du risque de la maladie du greffon contre l'hôte (GvHD), tout en conservant une prise de greffe rapide. (162)

- **Sang périphérique ou CSP mobilisées**

Une alternative à l'emploi de la MO a été explorée, impliquant la mobilisation des CSH dans le sang périphérique à l'aide du facteur de croissance G-CSF (Granulocyte Colony-Stimulating Factor). Cependant, le développement de cette technique de mobilisation s'est révélé complexe, et ce n'est qu'en 1995 qu'a été réalisée avec succès la première greffe de CSH mobilisées par le G-CSF. (163) Le processus de mobilisation requiert que le donneur subisse plusieurs injections de facteurs de croissance afin de stimuler la libération des CSH dans la circulation sanguine. Le greffon est ensuite prélevé par cytophérèse au moyen d'un appareil de tri cellulaire. Outre le G-CSF, d'autres facteurs sont actuellement utilisés pour la mobilisation. L'inhibiteur de CXCR-4 est identifié comme le plus efficace, bien que son coût élevé limite son utilisation, étant réservé aux patients qualifiés de "mauvais mobilisateurs," c'est-à-dire ceux qui ne répondent pas suffisamment au G-CSF. Son utilisation se fait en association avec le G-CSF, avec ou sans chimiothérapie, et est indiquée exclusivement pour l'autogreffe.

Les CSH mobilisées par le G-CSF ont largement supplanté le recours à la MO, et depuis 2004, elles constituent la principale source de greffons allogéniques en France et dans le monde. (164) (165)

- **Sang placentaire ou CSH issues du sang de cordon ombilicale**

Le placenta, organe temporaire développé pendant la grossesse, représente une source prometteuse de CS. Ces cellules sont localisées dans le sang du cordon ombilical et les tissus placentaires, et peuvent être collectées de manière non invasive après la naissance, sans causer de douleur ou de risques pour la mère ou le bébé. En outre, étant donné que le placenta est souvent considéré comme un "déchet médical" après l'accouchement, l'utilisation de ses CS permet de valoriser ce précieux matériau biologique qui serait autrement éliminé. De plus, le risque de transmission d'infections par cette voie est moindre.

Les CS issues du sang du cordon ombilical présentent un faible risque de rejet lors de la transplantation en raison de leur immaturité et de leur tolérance immunologique. Elles engendrent également un risque réduit de provoquer une maladie du greffon contre l'hôte (GvHD). Cette caractéristique les rend plus compatibles avec des donneurs non apparentés, augmentant ainsi les chances d'obtenir un donneur. Du fait de leur immaturité par rapport aux cellules souches adultes, les CS issues du sang du cordon ombilical présentent une capacité proliférative plus importante. De plus, cette source est disponible "à la demande", contrairement au don volontaire, pour lequel l'organisation du prélèvement prend en moyenne 3 à 4 semaines. (166)

Il est important de noter qu'il existe d'autres potentielles sources permettant d'isoler des cellules souches chez l'homme, telles que le tissu adipeux (graisse), la peau et les follicules pileux.

I.6.4. Procédés de culture cellulaire in vitro disponibles

Aujourd'hui, différentes techniques existent dans le but de produire des GR ex vivo. En voici quelques exemples (liste non exhaustive) :

- **La culture en suspension.** Les cellules sont placées dans un milieu de culture avec des facteurs de croissance, régulièrement renouvelés, favorisant ainsi la différenciation en érythrocytes. Cette méthode est relativement simple et peut produire des quantités importantes de GR en peu de temps. Cependant, il peut exister une qualité et une fonctionnalité moindres des cellules obtenues par rapport aux cellules natives.

- **La culture en milieu semi-solide.** Les CSH sont placées dans un gel de méthylcellulose, en combinaison avec des facteurs de croissance et des cytokines (telles que les géloses H4030 et H4034, mettant en évidence les BFU-E et CFU-E respectivement). Cette méthode permet de mieux comprendre les mécanismes moléculaires impliqués dans la différenciation cellulaire

- **La culture en milieu solide.** Implique la coculture de CSH en présence de cellules stromales, fournissant ainsi les signaux de différenciation et de croissance nécessaires à la production de GR matures (notons que la culture en suspension et en milieu solide peuvent cohabiter simultanément, condition retrouvée au cours du protocole long « PL » de notre étude)

- **La culture en Bioréacteur.** Les cellules sont cultivées dans un bioréacteur, caractérisé par des microsphères poreuses qui imite la structure spongieuse de la moelle osseuse in vivo. Ces bioréacteurs fournissent un contrôle précis des conditions, tels que la concentration en oxygène, les nutriments et les facteurs de croissance

- **La culture dans des Biomatériaux (hydrogels et nanofibres).** Ces biomatériaux offrent la possibilité de reproduire l'environnement médullaire propice à la croissance et à la différenciation des cellules érythroïdes. Par exemple, une nouvelle famille de matrice extracellulaire artificielle appelée modèles colloïdaux auto-assemblés (cSAP) a été utilisée pour l'expansion des CSP murines et humaines. Dans cette étude, le cSAP améliore la pluripotence et le potentiel hématopoïétique des CSH, générant par la suite davantage de cellules rouges. (167)

I.6.5. Avantages & inconvénients de l'érythropoïèse ex vivo

a) Avantages de la génération ex vivo de GR

Tout d'abord, sur le plan de l'efficacité transfusionnelle, cette production offre :

1. **Une disponibilité constante.** La production, de manière continue et contrôlée, de quantités importantes de GR, à partir d'un nombre limité de CSH, assurerait ainsi un approvisionnement constant en cellules matures fonctionnelles, moins dépendant de la disponibilité de donneurs qui varie tout au long de l'année.
2. **Une meilleure qualité et pureté.** Ces cellules produites ex vivo peuvent être purifiées et contrôlées plus précisément, améliorant leur qualité et leur sécurité. On peut imaginer que les GR récemment produits pourraient avoir une durée de vie plus longue, entraînant une péremption plus longue et une recirculation in vivo plus longue également (par comparaison à une transfusion de CGR standard, dont la demi-vie avoisine les 28 jours).
3. **Une logistique facilitée.** Les GR produits ex vivo peuvent potentiellement réduire les problèmes liés au stockage et au transport des unités de sang, produits selon les besoins transfusionnels.

Ensuite, sur le plan de la sécurité transfusionnelle, les GR produits peuvent être finement analysés avant leur injection, contribuant ainsi à :

4. **Une réduction du risque de transmission d'agents pathogènes.** Le sang placentaire est à l'évidence privilégié car le moins susceptible aux contaminations (virales ou agents non conventionnels), comparé aux produits actuellement disponibles. En évitant l'emploi de sang de donneurs adultes, le risque de transmission d'infections (VIH ou VHB) est considérablement réduit.
5. **Une réduction des immunisations anti-érythrocytaires.** En personnalisant les GR selon les besoins de chaque patient, ou en utilisant une source de cellule dépourvue des antigènes immunogènes les plus fréquents, le risque de réaction immunitaire du receveur est minimisé.
6. **Une réduction du nombre de transfusions nécessaires.** Ce procédé permettrait de diminuer la fréquence des transfusions, réduisant la surcharge martiale liée aux transfusions répétées et rapprochées dans le temps chez un même patient. La surcharge martiale peut entraîner des hémochromatoses secondaires qui s'accompagnent d'atteintes multiviscérale (cirrhose hépatique, pigmentation de la peau, diabète, arthropathie, troubles de l'érection, fatigue, et parfois insuffisance cardiaque).
7. **Un potentiel pour des thérapies personnalisées.** Ce processus ouvre la voie à des traitements personnalisés, notamment chez des patients atteints de maladies hématologiques héréditaires ou certaines formes de cancer (drépanocytose, thalassémies, ...)
8. **Une indépendance vis-à-vis des donneurs.** La production ex vivo permet de se détacher de la dépendance aux donneurs de sang, ce qui peut résoudre les problèmes de pénurie et de compatibilité sanguine. (140)

9. **Des banques de sang placentaire.** Ces établissements ainsi que les maternités auxquels ils sont associés font partie du réseau français du sang placentaire (RFSP), piloté par l'Agence de la biomédecine et l'Établissement Français du Sang (EFS).

b) Inconvénients des GR produits *ex vivo*

Cependant, il est important de retenir que cette production *ex vivo* de GR est freinée par :

1. **Une complexité technique à reproduire.** La génération de GR *ex vivo* est un processus complexe qui nécessite une manipulation subtile des cellules souches, illustrant la difficulté d'obtenir des GR présentant une qualité et une fonctionnalité équivalentes à celles observées physiologiquement dans le corps humain. De plus, la réalisation simultanée d'une prolifération massive et d'une différenciation complète dans les lignées érythroïdes cultivées représente un défi technique important. Il est fréquent d'observer une prolifération abondante sans maturation finale, ou bien une énucléation partielle accompagnée d'une amplification limitée. Les résultats demeurent souvent non entièrement reproductibles en raison de la complexité des mécanismes de l'érythropoïèse qui ne sont pas complètement élucidés. Par exemple, le phénomène naturel d'énucléation, crucial pour la fonctionnalité des cellules, n'est pas encore totalement maîtrisé à ce jour. Enfin, il existe une grande variabilité de protocoles pour la production de GR matures, nécessitant la définition de normes afin de parvenir à une production à grande échelle encadrée.
2. **Une efficacité limitée.** Le rendement de la production de GR en laboratoire est généralement atténué par rapport à la production physiologique rencontrée *in vivo*. Les protocoles de culture doivent être encore optimisés afin d'accroître le rendement final.
3. **Un temps de production** non négligeable. La production *ex vivo* peut prendre du temps, généralement plusieurs semaines, d'autant plus long s'il y'a contamination. Cela constitue un inconvénient majeur en réponse aux besoins massifs de transfusions sanguines dans certaines situations d'urgence.
4. **Des coûts élevés.** Les coûts associés à la culture cellulaire, à l'achat de réactifs et à l'équipement nécessaires à la génération de GR en laboratoire peuvent constituer un frein au développement d'une telle technique.
5. **Un risque de contamination** (bactérienne ou fongique) demeure présent au cours de la culture cellulaire, pouvant ainsi altérer la qualité des GR produits. Ce risque serait maîtrisé à l'aide des contrôles de stérilité.
6. **La stabilité et durée de conservation.** Ces cellules *ex vivo* peuvent présenter une durée de vie plus courte et être moins stables que les cellules natives, constituant ainsi des défis en lien avec le stockage et la disponibilité à long terme.
7. **Éthique et réglementation.** La production *ex vivo* soulève des questions éthiques et réglementaires, notamment en ce qui concerne la manipulation génétique des cellules souches (ES, iPS) et la sécurité des produits finaux.

En résumé, les résultats préliminaires des études précliniques sont encourageants, suggérant que les GR produits pourraient être fonctionnels et bien tolérés chez l'Homme. Cette technologie offre ainsi des perspectives pour la production de quantités importantes de GR à des fins de transfusion, pour le développement d'ITC ou bien la recherche scientifique. De plus, la production *ex vivo* de GR est un processus récent permettant d'étudier les étapes terminales ou encore non élucidées de l'érythropoïèse, comme l'énucléation, et la synthèse de l'hémoglobine. Cependant, des études supplémentaires sont requises afin d'évaluer les risques et les avantages lors d'un potentiel emploi *in vivo*. Il est donc crucial de poursuivre les efforts de recherches afin d'améliorer la quantité, la qualité et la fonctionnalité des GR produits *in vitro*.

I.6.6. Présentation de l'énasidenib

a) IDHIFA

L'énasidenib, commercialisé sous le nom d>IDHIFA® (marque déposée par Celgene Corporation), a reçu l'approbation le 28 avril 2016 en tant que "médicament orphelin", dans le traitement de certaines formes de leucémie aiguë myéloïde (LAM). Ce médicament est administré par voie orale, sous forme de comprimés, aux dosages de 50 mg ou 100 mg. (168)

La composition chimique de ce médicament, notée C19-H17-F6-N7-O, est caractérisée par la présence de deux groupes tri-fluorométhyle (-CF₃). Cette particularité confère à la molécule une forte polarité et une faible solubilité dans l'eau, lui permettant de renforcer son affinité envers sa cible thérapeutique, l>IDH2, en établissant des interactions chimiques spécifiques avec les résidus d'acides aminés de l'enzyme mutée.

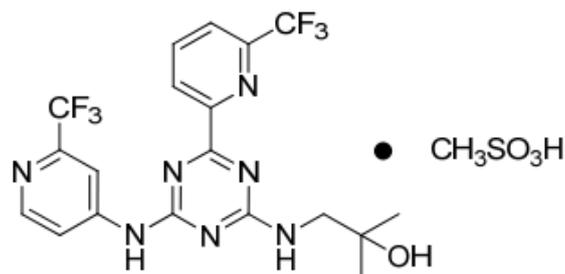


Figure 47. Structure chimique de l'énasidenib

b) Propriétés pharmacocinétiques

Tableau 1. Résumé des paramètres pharmacocinétiques d'IDHIFA chez des patients atteints de tumeurs hématologiques avancées avec mutation de l'IDH2 après administration en doses répétées (169)

	^a C _{max}	^a T _{max}	^b t _{1/2}	^a AUC ₀₋₂₄	^b CL/F	^b V/F
Dose multiple de 100 mg chez les patients	11,6 µg/mL	2,15 h	190 h	258,506 µg *h/mL	0,70 l/h	192 l

La valeur moyenne est présentée pour tous les paramètres à l'exception de T_{max} pour lequel c'est la médiane qui est présentée.

Signalé pendant la phase 2 de l'étude AG221-C-001
^aSelon la pharmacocinétique de population

Concernant les principales propriétés pharmacocinétiques de ce médicament :

- L'absorption** : pour une dose quotidienne de 100 mg chez des patients atteints de tumeurs hématologiques avancées, les concentrations plasmatiques à l'état d'équilibre ont été atteintes après environ 29 jours. La concentration plasmatique maximale (C_{max}) obtenue est de 11,6 µg/mL, atteinte après un délai médian (T_{max}) de 2,15 heures. La biodisponibilité absolue après une dose orale de 100 mg d'énasidenib est d'environ 57 % (soit un peu plus de la moitié du principe actif qui rejoint la circulation générale).
- La distribution** : une analyse pharmacocinétique a estimé un volume de distribution (V_d) apparent de 192L (versus 56L chez des sujets sains). Cette molécule est donc très lipophile, propriété particulièrement intéressante afin d'obtenir une distribution étendue dans les tissus. L'énasidenib présente une forte affinité pour les protéines plasmatiques humaines, avec une liaison de 98,5 %, tandis que son métabolite AGI-16903 affiche une liaison de 96,6 % in vitro.
- Métabolisme** : l'énasidenib subit un métabolisme hépatique important par le cytochrome P450 (CYP3A4). Les métabolites résultants ne sont généralement pas pharmacologiquement actifs. Cependant, l'emploi concomitante d'énasidenib avec des inhibiteurs ou des inducteurs puissants du CYP3A4 peut augmenter ou diminuer les concentrations plasmatiques d'énasidenib. Des précautions sont alors nécessaires afin de prévenir ces interactions médicamenteuses.
- L'élimination** : chez les patients atteints de tumeurs hématologiques avancées, l'énasidenib présente une demi-vie terminale de 190 heures, tandis que la clairance corporelle totale moyenne (CL/F) est estimée à 0,70 L/heure. Concernant l'excrétion, environ 89 % de la dose d'énasidenib est éliminée dans les selles, tandis que 11 % se retrouve dans l'urine. (détails complet en annexe).

c) L'énasidenib dans les LAM IDH2 muté

Les LAM sont des cancers caractérisés par la multiplication incontrôlée de cellules indifférenciées, ou immatures, envahissant la moelle osseuse. Cette invasion entraîne un déclin de la production physiologique de GR mature mais également des cellules du système immunitaire. Les LAM restent les cancers les plus difficiles à traiter, caractérisées par des faibles taux de guérison (25%) et de survie à 5 ans (28 %).

L'énasidenib inhibe l'activité des formes mutées de l'enzyme isocitrate déshydrogénase 2 (IDH2), retrouvées dans 15 à 20 % des cas des LAM. **L'IDH2 mutée** est responsable d'une production excessive de l'oncométabolite D-2-HG (l'énantiomère R-2-hydroxyglutarate), à l'origine du blocage de la maturation des cellules érythroïdes. Une fois mutée, cette enzyme perd sa capacité oxydative en raison d'un affaiblissement de son affinité pour l'isocitrate, aboutissant ainsi à une synthèse préférentielle de 2-HG à partir d' α -CG. Dans les cellules saines, l' α -CG est physiologiquement produit à partir de l'isocitrate lors de la réaction catalysée par l'IDH dans sa forme non mutée. L' α -CG est ensuite converti en succinyl-CoA, étape cruciale dans la production d'énergie au niveau du cycle de Krebs.

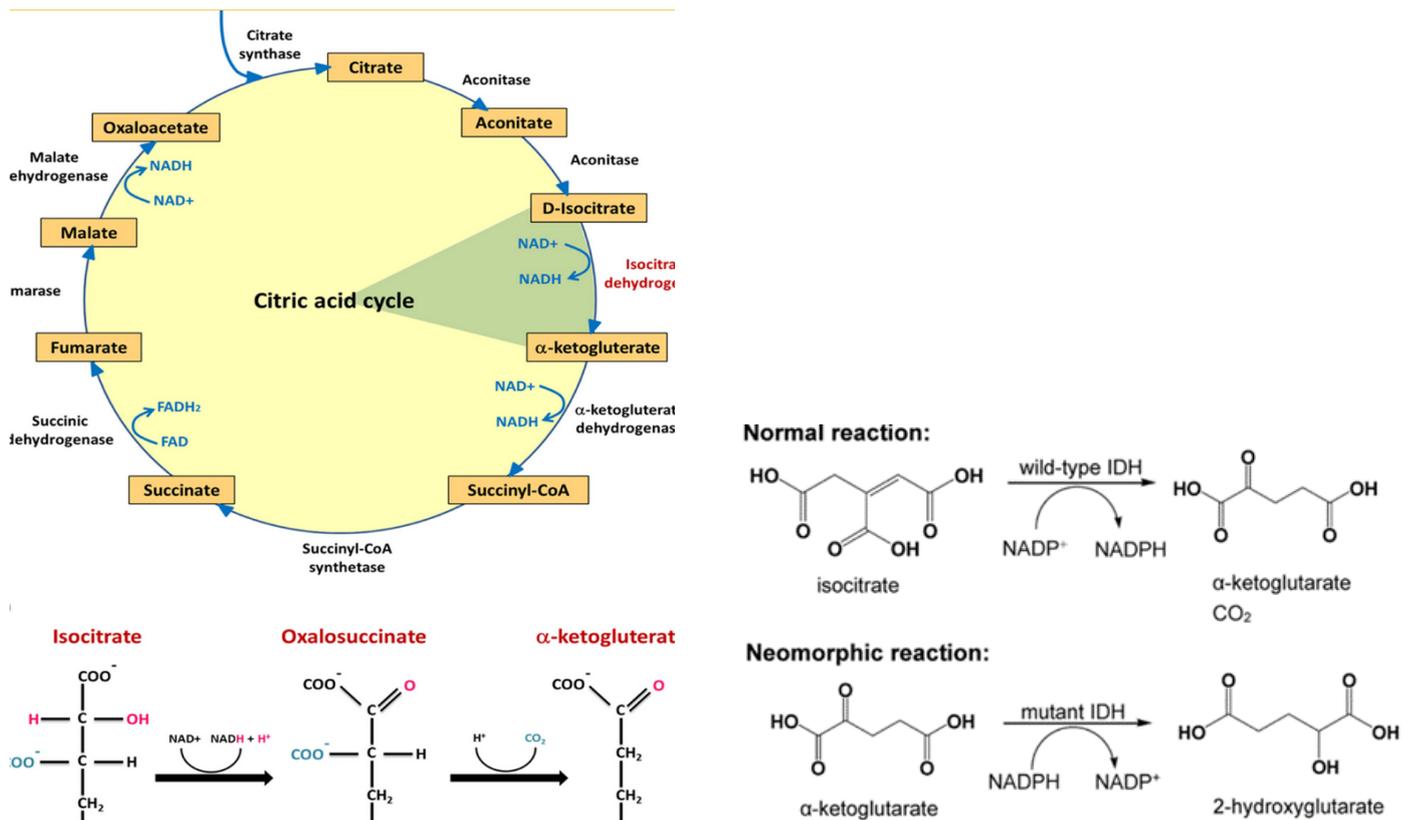


Figure 48. L'IDH2 mutée converti préférentiellement l' α -CG, conduisant à l'accumulation du 2-HG

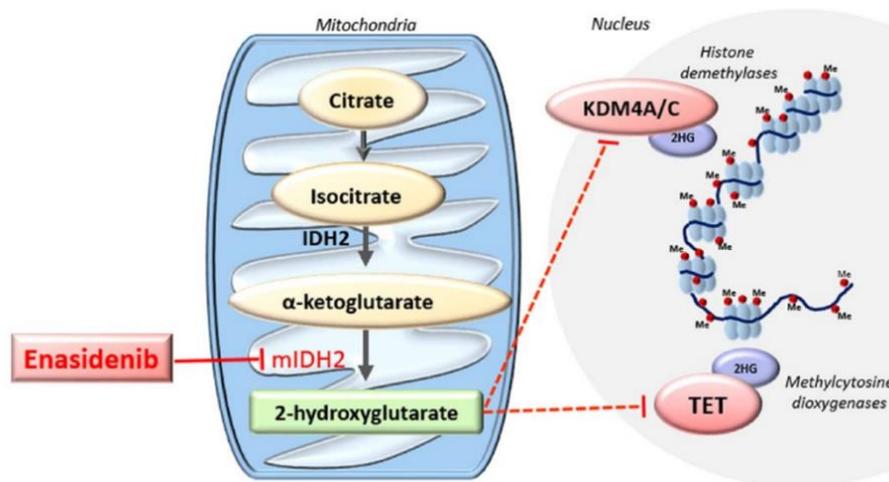


Figure 49. Mécanisme d'action de l'énasidenib

L'oncogénicité du D-2-HG provient de son analogie structurale avec l' α -CG, agissant comme un inhibiteur compétitif des enzymes dépendantes de ce substrat. Dans les conditions physiologiques, le D-2-HG est produit en très faible quantité et est rapidement métabolisé puis excrété de l'organisme, ne s'accumulant généralement pas de manière significative. L'accumulation de D-2-HG dans les cellules cancéreuses perturbe alors plusieurs processus cellulaires essentiels, dont la méthylation de l'ADN, la différenciation cellulaire et la réparation de l'ADN. Ces altérations contribuent au développement et à la progression du cancer en favorisant la croissance incontrôlée des cellules cancéreuses et en entravant leur saine maturation. (170) (171) (172)

L'énasidenib se lie donc à l'IDH2 mutée et rétablit partiellement sa fonction oxydative originelle, contribuant ainsi à rétablir la conversion de l'isocitrate en α -CG. En inhibant ainsi l'activité de l'IDH2 mutée, l'énasidenib corrige le métabolisme cellulaire (en réduisant les niveaux de 2-HG), favorisant ainsi la différenciation en cellules matures fonctionnelles des cellules érythroïdes. Chez les patients atteints de LAM présentant une mutation de l'IDH2, l'énasidenib a démontré sa capacité à réduire les niveaux sanguins de 2-HG, le pourcentage de blastes dans la moelle osseuse et à accroître le pourcentage de cellules myéloïdes matures, contribuant ainsi à ralentir la progression de la maladie. (169)

Cependant, depuis le 1er mai 2022, l'initiation du traitement par IDHIFA® n'est plus recommandée en raison d'un grave effet secondaire susceptible de provoquer un syndrome de différenciation. Ce syndrome, potentiellement mortel, survient chez environ 12 % des patients atteints de LAM avec mutation-IDH2, en rechute ou réfractaire, traités par ce médicament. Les manifestations les plus couramment observées dans ce syndrome comprennent la dyspnée, une fièvre inexpliquée, des infiltrats pulmonaires et une hypoxie, pouvant se manifester des mois après le début du traitement et pouvant ressembler aux signes observés lors de la progression des néoplasmes myéloïdes. Il est donc impératif de reconnaître ce syndrome de différenciation et de le prendre en charge rapidement (généralement par une corticothérapie systémique). (173) Toutefois, à l'heure actuelle, l'énasidenib est disponible sous le statut d'"autorisation d'accès compassionnel" (AAC), la prescription est désormais réservée aux médecins spécialisés en hématologie et aux médecins compétents en pathologies hématologiques. (168) (Etude clinique en annexe).

d) Potentiels effets de l'énasidenib dans l'érythropoïèse ex vivo

Des études cliniques ont révélé des effets inattendus de l'énasidenib chez des patients atteints de LAM, se traduisant par un accroissement de l'hémoglobinémie et une indépendance vis-à-vis des transfusions sanguines et, chez plus de la moitié des patients traités avec ce médicament, des améliorations ont été constatées dans leurs taux sanguins globulaires périphériques. Le mécanisme sous-jacent à ce phénomène reste inconnu mais suscite un grand intérêt clinique, étant donné la forte dépendance transfusionnelle et les complications liées à l'anémie, généralement observées chez les patients atteints de LAM et d'autres cancers. (6) (9)

À la suite de ces observations, Ritika DUTTA et son équipe, ont entrepris de comprendre comment l'énasidenib pouvait favoriser une hématopoïèse normale, indépendamment de son impact sur la différenciation des blastes dans les LAM. Il est établi que cette molécule inhibe l'ABCG2 (membre 2 de la sous-famille G de la cassette de liaison à l'ATP), un transporteur hautement exprimé dans les progéniteurs érythroïdes et responsable de l'efflux de la protoporphyrine IX (PPIX), précurseur direct de l'hème. (174) (175) Cette inhibition induirait l'accumulation de PPIX, augmentant ainsi la disponibilité en hème au sein de la mitochondrie, stimulant ainsi potentiellement la synthèse d'hémoglobine. Étant donné que le rythme des divisions cellulaires est corrélé à la quantité d'hémoglobine intracellulaire, ce mécanisme pourrait alors favoriser la prolifération cellulaire.

Ces mécanismes pourraient, en ce sens, contribuer à promouvoir la différenciation érythroïde. L'objectif de ce travail est de savoir si l'ajout de cette molécule dans les protocoles de production des GR ex vivo pourrait en augmenter ou pas le rendement.

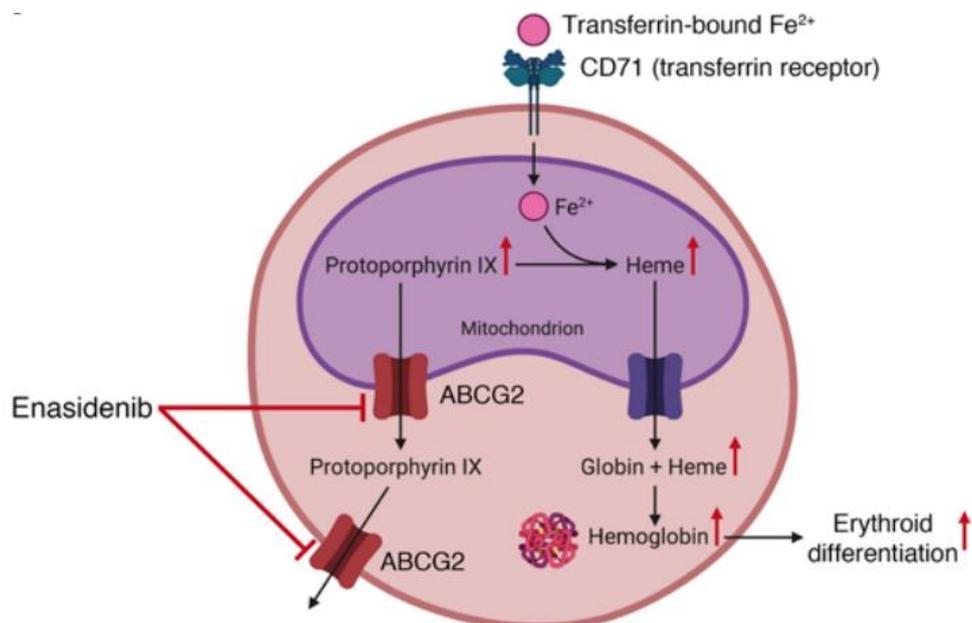


Figure 50. Effet de l'énasidenib sur la différenciation érythroïde (illustré par Ritika DUTTA et al)

II. Matériel et méthode

Afin d'étudier l'influence de la molécule d'énasidenib sur des cultures de cellules CD34+ *in vitro*, il est nécessaire de constituer une réserve optimale en CSH. Pour cela, le sang placentaire constitue la source privilégiée.

II.1. Isolement des cellules CD34+

II.1.1. Processus de sélection des cellules CD34+

Les cellules CD34+ sont représentées majoritairement par les CSH et les progéniteurs. Ces cellules, issues du sang placentaire, sont recueillies plus précisément, lors de l'accouchement, sur la veine du cordon ombilical. Afin de pouvoir réaliser ce prélèvement, un consentement écrit est obtenu en amont auprès de la patiente. Ces poches de sang sont ensuite adressées au service ITC de l'EFS, où un échantillon de sang placentaire est adressé au contrôle qualité (CQ) afin de connaître la qualité du potentiel médicament. Les "critères qualité" retenus sont :

- un **volume > 70 ml**
- une **quantité de cellules souches exprimant le CD34 > 2.10⁶ au total**, avant conservation.

Si les critères qualité sont remplis, les poches de sang sont miniaturisées et congelées en cuve d'azote liquide, à des fins thérapeutiques ultérieures.

Cependant, près de 2/3 des prélèvements de sang de cordon réalisés dans des conditions pourtant optimales, chez des parturientes, sont invalidés du fait qu'ils ne répondent pas à ces critères de qualité (problème de volume, quantité de cellules souches insuffisante...). Les poches ne respectant pas donc ces critères du réseau français de sang placentaire sont adressées au service de Recherche & Développement de l'EFS (autorisation du ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche : DC-2018-3143), afin d'en isoler les cellules souches (CS). Afin d'assurer la traçabilité de ces poches ; le numéro du don, l'heure, la date du prélèvement et le poids de la poche sont inscrits dans un fichier informatique de l'EFS.

Les cellules exprimant le CD34 sont sélectionnées à l'aide d'un tri immunomagnétique (MiniMACS, Miltenyi). Pour cela, une colonne magnétique permet la rétention des cellules CD34+ préalablement couplée à des billes magnétiques. Cette colonne est constituée de 2 parties, un aimant de forte attraction (Midi MACS™ patent pending) et un support associé (MACS™ Multistand). Une seconde colonne (LS columns Miltenyibiotec™), associée à un filtre de pré-séparation de 30microns (retenant les impuretés), permet la rétention des cellules. Ces billes magnétiques, couplées à des anticorps, vont se fixer spécifiquement sur les récepteurs CD34 à la surface cellulaire. Les cellules positives exprimant le marqueur membranaire CD34, couplées aux billes magnétiques, vont être retenues dans la colonne aimante par phénomène d'aimantation. N'étant pas retenues, les cellules négatives au marqueur CD34 seront éluées et quitteront la colonne en tête. En dernières, les cellules positives au marqueur CD34+ sortiront de la colonne après avoir actionner le piston permettant l'éluion finale. Afin d'augmenter la pureté de l'échantillon, cette étape est renouvelée une seconde fois.

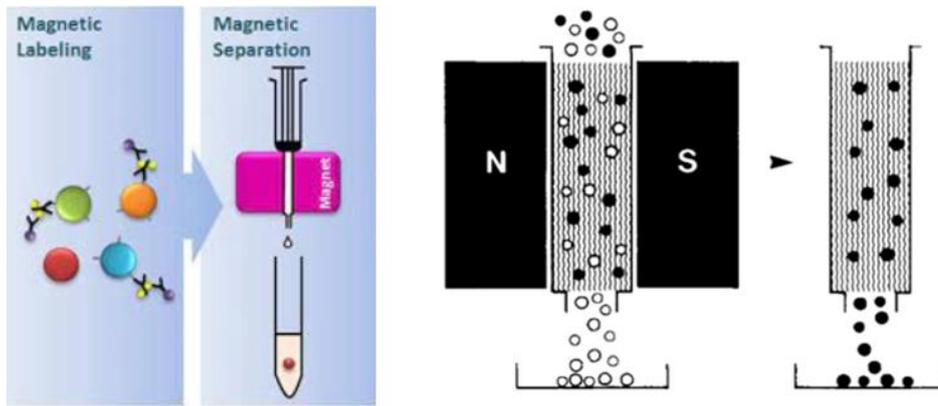


Figure 51. Sélection immunomagnétique des cellules CD34+

Cette sélection spécifique des cellules CD34+, à partir d'unité(s) de sang placentaire (USP), est réalisée de la manière suivante :

En amont, préparation du tampon de sélection TS (PBS 487mL + EDTA 5mL à 200nM + Albumine humaine 12,5mL à 20%) équilibré à pH 7,5.

La séparation des cellules mononucléées sur FICOLL constitue la première étape, pour cela il est nécessaire de :

- Désinfecter la tubulure, la clamer puis la couper
- Répartir 1 USP dans 4 tubes de 50mL
- Ajouter 10mL de PBS par tube de 50mL
- A l'aide d'une seringue de 30mL munie d'une paille stérile, déposer lentement 12mL de la solution de Ficoll au fond des tubes
- Centrifuger 23min à 320G et à 20°C sans frein

Après cette centrifugation, différentes couches sont visibles dans le tube à fond conique, de haut en bas :

1. *le plasma, représentant les ¾ supérieurs du tube*
2. ***l'anneau constitué de cellules mononucléées (CMN)***
3. *la solution de Ficoll, en-dessous de l'anneau de CMN*
4. *le culot de GR et cellules polynucléaires, au fond du tube*

Cette séparation permet donc de recueillir les CMN situées à l'interface Ficoll/plasma, réalisée à l'aide d'un Pip-Aid® et d'une pipette de 10mL.

- Eliminer ensuite une partie du surnageant (jusqu'à 30/35mL) et récupérer l'anneau de CMN dans 2 nouveaux tubes de 50mL. Compléter si besoin avec TS qsp 50mL. (attention, étape critique car délicate)
- Centrifuger 10min à 320G et à 4°C
- Eliminer le surnageant à la pipette (garder le culot)
- Ajouter 20µL de DNase sur chaque culot, avec 2mL de TS
- Réunir les culots dans un seul tube. Rincer chaque tube avec du TS et remplir le tube qsp 50mL
- Réaliser une numération des CMN à l'acide acétique (dilution 1/200 : 1/10^{ème} puis 1/20^{ème})
- En parallèle, centrifuger 10min à 320G et à 4°C
- Eliminer le surnageant

Puis, dans un second temps, nous cherchons à isoler les cellules CD34+, à l'aide des étapes suivantes :

- Ajouter 20µL de DNase (par USP) sur le culot, agiter afin de remettre en suspension les cellules
- Compléter avec 500µL de TS pour 10⁸ cellules
- Ajouter 100µL de Tégéline pour 2x10⁸ cellules. La Tégéline permet de saturer les récepteurs non spécifiques
- Homogénéiser et incuber 15min à TA
- Ajouter 100µL de Microbeads (StemCell EasySep™ Human Cord Blood CD34 Positive Selection Kit II) pour 2x10⁸ cellules
- Incuber 30min, sous agitation à +4°C
- Laver les cellules marquées avec du TS QSP 50mL
- Centrifuger 10min à 4°C 320G
- Avec une colonne LS, placer l'aimant ergot vers soi et placer un préfiltre jaune dessus
- Placer un tube sous la colonne afin de récupérer la fraction négative (cellules non couplée aux billes magnétiques)
- Mouiller la colonne avec quelques mL de TS
- Aspirer le surnageant des cellules centrifugées
- Rajouter 40µL de DNase et resuspendre
- Suspendre 5mL de TS pour 10⁸ cellules afin d'être assez dilué
- Eluer les cellules dans la colonne LS
- Réaliser 3 lavages successifs avec 3mL de TS
- Placer un tube stérile sous la colonne LS, y déposer 5mL de TS. Pousser fermement le piston afin d'éluer les cellules CD34+
- Afin d'augmenter la pureté, mouiller une 2nd colonne avec 3mL de TS

- Déposer les cellules dans la 2nd colonne et réaliser 3 lavages avec 3mL de TS
- Sortir la colonne et pousser fermement le piston pour éluer les cellules CD34+ avec 5mL de milieu de congélation SVF
- En parallèle, un échantillon de la suspension de cellules CD34+ est adressé au service CQ pour analyses quantitative et qualitative, afin de connaître ; la concentration, la viabilité et la pureté des cellules CD34+
- Réaliser une numération cellulaire au Bleu de Trypan pour répartition dans cryotubes
- Centrifuger et répartir en proportion 50/50 dans les cryotubes avec la solution SVF + DMSO, agiter et déposer goutte à goutte les cellules. Les cryotubes congelés contiennent environ 500 000 cellules CD34+.

Les cellules fraîchement isolées peuvent être mises en culture à la suite de cette étape d'isolement, ou dans le cas d'une utilisation ultérieure, congelées en cuve d'azote à -210°C. Au cours de ces travaux, seules des cellules CD34+ décongelées ont été employées afin de réaliser les diverses séries de manipulation.

II.1.2. Conservation des cellules CD34+

En biothèque, les cryotubes sont dans un premier temps entreposés à une température de -80°C, pendant 24 heures (afin d'assurer une congélation progressive), puis finalement rangés dans les cuves d'azote liquide à -210°C.

Afin d'assurer une congélation optimale, les cellules CD34+ sont introduites dans des cryotubes avec une solution cryoprotectrice SVF + DMSO à 20%. Lorsque les cellules sont exposées à des températures très basses, il y a un risque de formation de cristaux de glace à l'intérieur des cellules, pouvant endommager les structures cellulaires. Le DMSO, solvant organique, agit alors comme agent cryoprotecteur en réduisant la formation de glace et en minimisant les dommages cellulaires associés.

II.1.3. Etapes préliminaires aux protocoles de cultures cellulaire

Les étapes préliminaires sont identiques aux 3 protocoles d'érythropoïèse ex vivo employés à travers cette étude. Cela inclut les étapes de : décongélation, lavage et mise en culture des cellules CD34+. La composition du milieu et la durée des cultures cellulaires varient entre ces 3 protocoles.

Les différentes manipulations sont réalisées en conditions stériles, sous Poste de Sécurité Microbiologique (PSM). Les tubes à fond conique de 50mL en polypropylène (Falcon®) permettent la centrifugation (Heracus Multifuge X3R Thermo Scientific™) des cellules lors de leur décongélation.

Lors de la décongélation des cellules CD34+, le transport des cryotubes des cuves d'azote liquide jusqu'au laboratoire s'effectue dans des boîtes spécifiques contenant de l'éthanol. Les

cryotubes sont ensuite placés au bain-marie à 37°C pendant quelques secondes. Quand il reste seulement un tout petit glaçon, nous pouvons débiter les manipulations sous PSM (après nettoyage et décontamination de ce dernier). Le contenant de l'échantillon est aspiré et placé dans un tube Falcon de 50mL, à l'aide d'un Pipet-Aid™ et d'une pipette en plastique. A l'aide d'une seringue en plastique et d'une aiguille, 30mL d'albumine (4g/L) sont délicatement déposés afin de nettoyer les cellules fraîchement décongelées. De légères agitations du Falcon sont nécessaires, en même temps que l'albumine est délicatement versée sur la solution contenant cellules, dans le but de neutraliser le DMSO présent lors de la congélation. En effet, le DMSO peut être toxique et la présence résiduelle de ce solvant peut avoir des effets négatifs sur la viabilité et la fonction des cellules après la décongélation. Un cycle de centrifugation (10 min à 320G) permet de conclure le lavage des cellules. Après élimination du surnageant, une numération cellulaire est réalisée en cellules de Malassez afin de connaître la quantité réelle de cellules après décongélation. Une perte cellulaire est à prévoir au cours de l'étape de décongélation, d'environ 30%.

II.2. Protocoles d'érythropoïèse ex vivo

Les cellules CD34+ sont mises en culture, par répartition équitable en flasques de 25 cm³, selon 3 protocoles d'érythropoïèse *ex vivo*. Les concentrations initiales de cellulesensemencées à J0 sont : 10 000 cellules/mL, 25 000 cellules/mL ou 50 000 cellules/mL.

II.2.1. Protocole court (PC)

Nous proposons, ici, un protocole d'expansion de CSH issues de sang de cordon dans un milieu défini et sans stroma, reposant sur une l'addition séquentielle de facteurs de croissance. (176)

La composition du milieu de culture de ce protocole court est la suivante :

Mdc IMDM + 200µL d'Héparine + 438,5mg de NaCl + 5,5mg de Na₂HPO₄ + 1mg de NaH₂PO₄ + 50mL d'eau stérile + 165mg d'Holotransferrine + 8mg de FeCl₃ + 5mL de HCl 5mmol + 5mg d'insuline + 25mL de Plasma humain 5% + 10mL de Glutamine 200mM

Tableau 2. Concentrations finales des cytokines du PC

Cytokines	Cf
SCF	100 ng/ml
Il3	5 ng/ml
EPO	3 UI/ml
HC	10 ⁻⁶

Ce protocole est caractérisé par 3 phases distinctes :

- **La phase I**, qui correspond à **l'amplification des progéniteurs primitifs et l'apparition des précurseurs**, s'étend de J0 à J7 ;

A J0, dans une flasque de 25 cm³, 10 000 cellules sontensemencées par millilitre, avec 5mL de milieu de culture, soit un total de 50 000 cellulesensemencées par condition. La condition contrôle, ou CTL, est comparée à la condition Ena1, dans laquelle l'énasidenib est présente au cours de la phase I.

Cette première phase est caractérisée par une dilution au 4^{ème} jour de la culture, afin d'empêcher l'épuisement du mdc qui ralentirait la croissance des cellules. Un facteur de dilution de 1/5^{ème} est normalement appliqué, soit 1mL de milieu de la flasque d'origine remis en suspension avec 4mL de milieu fraîchement préparé dans une nouvelle flasque de 25 cm³. Cependant, il arrive que les cellules érythroïde ne se développe pas correctement durant ces 4 premiers jours, nécessitant alors l'application d'un facteur correctif de 2/5^{ème}. Cela se traduit de la manière suivante, si à J4, la concentration cellulaire est inférieure à 20 000 cellules/mL, traduisant une absence de doublement de la population cellulaire après 4 jours de culture, alors ce facteur de 2/5^{ème} est appliqué.

En pratique, pour 10mL de mdc ; 100µL d'Hydrocortisone (HC), 10µL de SCF, 3µL d'Erythropoïétine (EPO) et 5µL d'Interleukine-3 (IL3) sont ajoutés et homogénéisés avec le milieu de culture IMDM. Le pH du milieu est ajusté à 7,3 [+/- 0,1] avec l'acide HCl à 0,1N, afin de mimer les conditions physiologiques du sang. Enfin, le milieu est stérilisé par filtration (diamètre des pores à 0,2µm).

- **La phase II** correspond à **la différenciation des précurseurs**, et s'étend de J7 à J11 ;

A J7, après avoir réalisé un lavage des cellules au PBS (10mL par flasque) suivi d'un cycle de centrifugation (10min à 4°C et 320G), celles-ci sontensemencées en plaque (12 puits de 2mL) à une concentration maximale de 100 000 cellules/mL. De nouvelles conditions s'ajoutent durant cette deuxième phase ; la flasque CTL se divise de manière équitable afin de donner les conditions suivantes : un puit CTL et un puit Ena2, dans lequel l'énasidenib est ajouté au cours de la phase 2 seule. La flasque Ena1 est réparti afin de donner un puit Ena1 (condition inchangée) et un puit Ena1/2, où les cellules érythroïdes sont encore exposées à la molécule d'énasidenib au cours de cette deuxième phase.

Le SCF et l'EPO sont ajoutées en phase II, à la même concentration qu'en phase I.

- **La phase III**, correspondant à **l'énucléation des réticulocytes**, s'étend de J11 à J15/18 ;

A J11, après avoir réalisé un lavage des cellules au PBS (4mL par puit), suivi d'un cycle de centrifugation (10min à 4°C et 320G), celles-ci sontensemencées dans une nouvelle plaque (12 puits de 2mL) à une concentration maximale de 1 000 000 cellules/mL.

Seule l'EPO est ajoutée au cours de cette phase III.

Le milieu de culture est renouvelé aux jours ; J4, J7, J11 et J15.

En résumé, voici les cytokines ajoutées au cours des 3 phases de ce protocole court :

-Phase I: SCF / IL-3 / EPO / HC

-Phase II: SCF / EPO

-Phase III: EPO

Tableau 3. Conditions expérimentales retrouvées en PC

Conditions	Phase I	Phase II	Phase III
1 (ctrl)	⊖	⊖	⊖
2	Ena 10 μ M	⊖	⊖
3	Ena 10 μ M	Ena 10 μ M	⊖
4	Ena 10 μ M	Ena 10 μ M	Ena 10 μ M
5	⊖	Ena 10 μ M	⊖

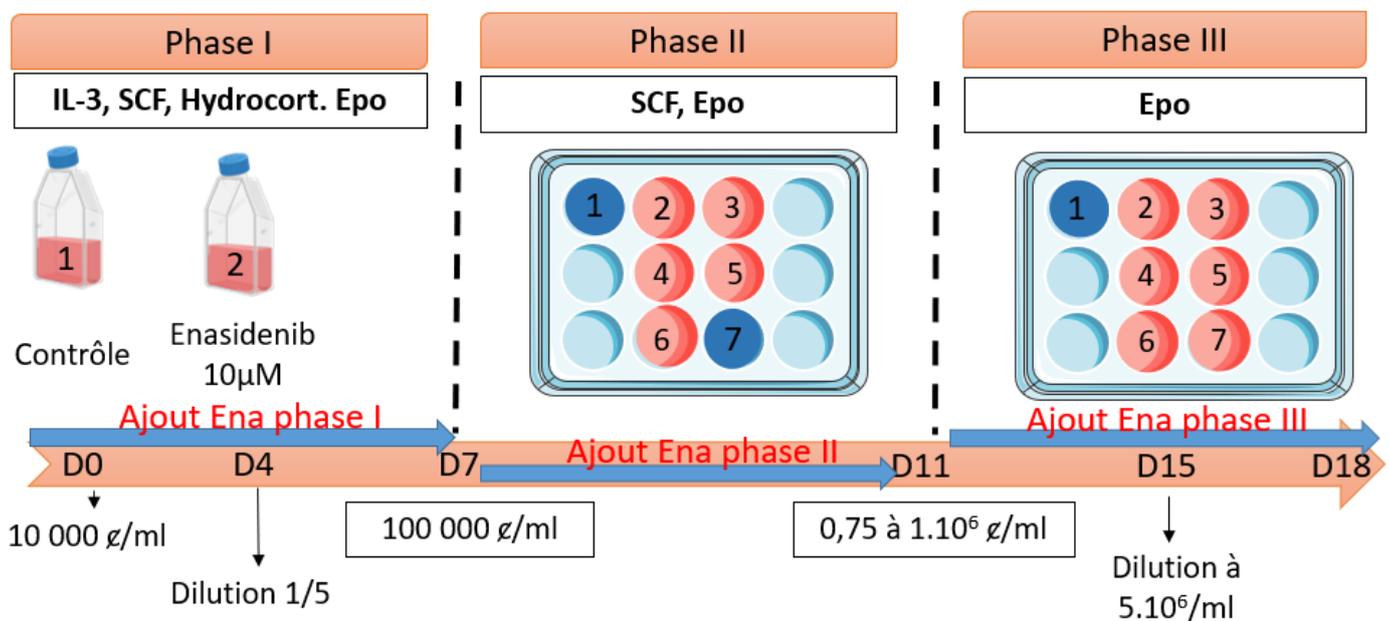


Figure 52. Chronologie des étapes retrouvées en PC

II.2.2. Protocole long

Le protocole long (PL) est caractérisé par la coculture avec des cellules souches mésenchymateuses (CSM), à partir du onzième jour de culture. En effet, au cours de ce protocole une partie du microenvironnement médullaire est reconstituée à l'aide des CSM. Ces cellules stromales jouent un rôle déterminant dans la sécrétion de facteurs solubles de régulation et des différents constituants de la matrice extracellulaire. Les contacts intercellulaires et les facteurs solubles, activateurs ou inhibiteurs, sont des éléments clés de la régulation de l'érythropoïèse. (177)

Les conditions CTL et Ena1 sont les deux conditions testées au cours de ce protocole.

Tableau 4. Conditions expérimentales retrouvées en PL

Conditions	Phase I	Phase II	Phase III
1 (ctrl)	⊘	⊘	⊘
2	Ena 10μM	⊘	⊘

Les cytokines ajoutées au cours des 2 premières phases de PL sont identiques à celles de PC.

Tableau 5. Concentrations finales des cytokines en PL

Cytokines	Cf
SCF	100 ng/ml
Il3	5 ng/ml
EPO	3 UI/ml
HC	10 ⁻⁶

Le PL se décline également en 3 phases, cependant, la durée des différentes phases est prolongée du fait de la coculture avec les CSM. Afin de rendre les 3 protocoles comparables entre eux au cours de ces travaux, la culture cellulaire s'achève au quinzième jour avec ce protocole.

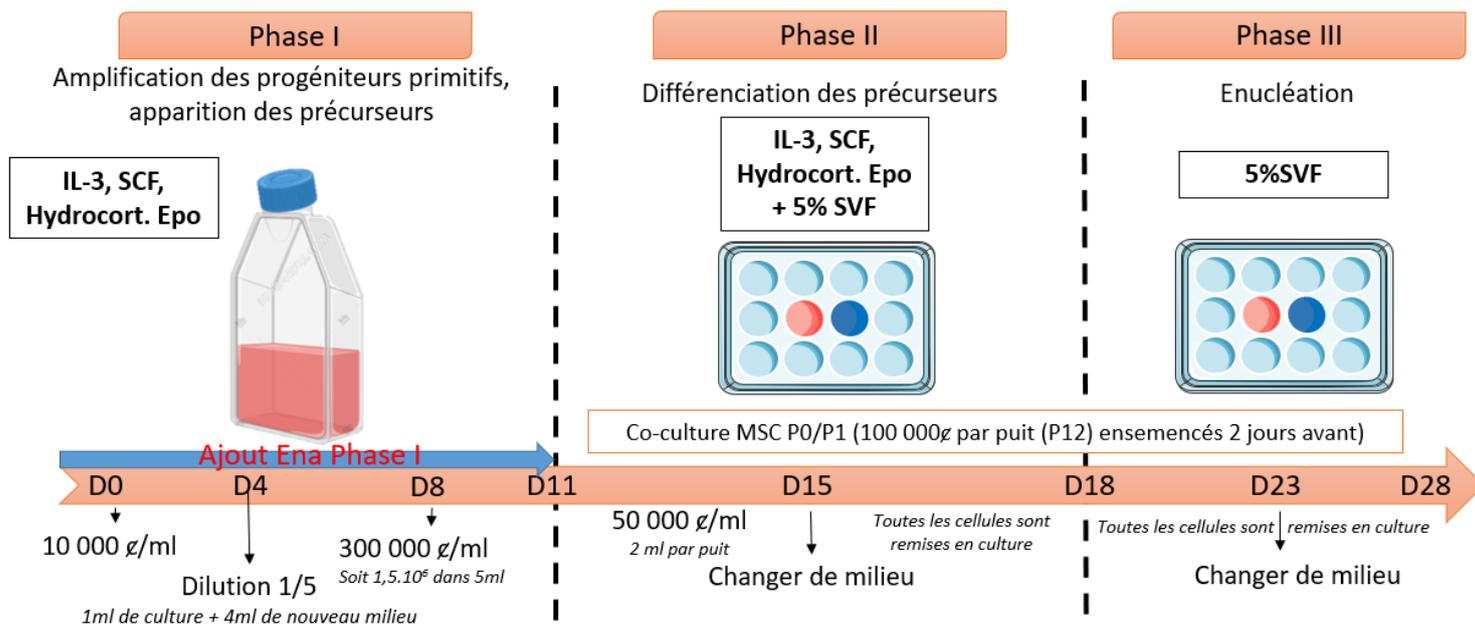


Figure 53. Chronologie des phases en PL

En PL, le milieu de culture est préparé de la manière suivante :

Tableau 6. Protocole de préparation du milieu de culture avec le protocole long

	Produit	Fournisseur	Référence	stockage	Volume
1	IMDM w/o L-Glutamine	Pan Biotech	F0465	4°C	QSP 500 ml
2	L-Glutamine 200mM	Invitrogen / life technologies	25030-024	-20°C	10 ml
3	Pénicilline et Streptomycine 5000 U/ml	Invitrogen / life technologies	15070-022	-20°C	5 ml
4	HSA 20%	LFB, Vialebex	564469-9	4°C	25 ml
5	Inositol 4mg/ml en IMDM	Sigma (poudre)	I5125	Température Ambiante (TA)	5 ml
6	Acide Folique 1ml/ml en IMDM	Sigma (poudre)	F7876	TA	5 ml
7	Holo-Transferrin 15mg/ml dans sol 1	Sigma (poudre)	T4132	4°C	4 ml
8	Insuline 1mg/ml dans HCl 5mM	Sigma (poudre)	I6634	-20°C	5 ml
9	Nitrate de Fer 0,018mg/ml H ₂ O	Sigma (poudre)	F8508	TA	2,5 ml

10	Sulfate de Fer 0,18mg/ml H ₂ O	Sigma (poudre)	F8633	TA	2,5 ml
11	Monothioglycerol 0,16M en IMDM	Sigma (liquide)	M1753	4°C	500 µl
Préparation solution 7	Solution 1 pour préparation Transferrin	NaCl 150 mM	Ajusté à pH 7,5	+ 340µl de FeCl ₃ 10mM	
		Na ₂ HPO ₄ 0,8mM			
		NaH ₂ PO ₄ 0,2mM			
	Solution de FeCl ₃ 10mM	22mg FeCl ₃ + 13,7 ml HCl 1mM			
Préparation solution 9	Dilution intermédiaire au 1/100	exemple : Pesé 1,8 mg	+1 ml Eau distillé	+ dilution 1/100 en IMDM	(50µl + 4950µl)
Préparation solution 10	Dilution intermédiaire au 1/100	exemple : Pesé 18 mg	+1 ml Eau distillé	+ dilution 1/100 en IMDM	(50µl + 4950µl)

Le mdc est également ajusté à pH 7,3 [+/-0,1] et stérilisé par filtration (diamètre pore à 0,2µm).

II.2.2.1. Cellule Souche Mésenchymateuse (CSM)

Chez l'adulte, les CSM présentent la capacité de transiter temporairement dans la circulation périphérique en quantités très limitées (178) et sont aisément isolables à partir des filtres de déleucocytation. (179)

Ces cellules sont retenues grâce à leur propriété d'adhérence, obtenues à la suite de ponctions médullaires chez les patients. Les CSM sont alors récoltées sur filtre, lors du processus de filtration de la moelle osseuse (étape réalisée par le laboratoire de thérapie cellulaire). Afin d'obtenir les CSM, ces filtres, récupéré par la recherche, sont manipulés dans le sens inverse de la filtration. Au cours de la culture cellulaire, ces cellules sont reconnaissables car elles adhèrent au fond des puits. Les CSM manipulées sont au stade P0 ou P1 (0 Passage ou 1^{er} Passage), le repiquage reflétant le réensemencement des cellules, cela signifie qu'elles n'ont pas encore été « repiquées » (ou repiqué une seule fois). En effet, lorsque les CSM arrivent à confluence, elles ne disposent plus d'assez de nutriments, ni d'espace, afin de poursuivre une croissance optimale. Il est alors nécessaire de les réensemencer dans une nouvelle flasque, pour que ces dernières poursuivent un développement sain. Pour ce faire, dans une flasque T75, 5mL de trypsine sont ajoutés, pendant 10min à l'incubateur (37°C et 5% de CO₂), afin de détacher les CSM du fond de la flasque.

Les CSM sont décongelées et mises en culture en amont, à J8 du PL, afin de disposer d'une concentration suffisante en début de phase II (100 000 cellules par puit).

Le milieu de culture des CSM est constitué de : Mdc alpha MEM + SVF (10%) + 100 ng/mL Pénicilline Streptomycine 2 mM Glutamine + betaFGF à 1 ng/mL

II.2.2.2. Coculture des CSM

La coculture des cellules érythroïdes avec les CSM débute en phase II, à partir de J11. Délicatement, pour ne pas compromettre l'adhérence des CSM, le milieu RPMI est aspiré, et le PBS est employé afin de nettoyer les cellules. Enfin, les cellules érythroïdes sont ajoutées dans les puits avec leur milieu de culture respectif.

II.2.3. Protocole SP2

Ce milieu de culture provient de l'étude de Ritika Dutta et al, (180) obtenu en ajoutant un supplément. Le milieu est préparé extemporanément à partir du milieu StemSpan SFEM II (STEMCELL™ Technologies), complété avec ; 1X Penicilline Streptomycine (P/S, Gibco) et 1X StemSpan Erythroid Expansion Supplement. Ce dernier est composé de : recombinant human stem cell factor (SCF), recombinant human interleukin 3 (IL-3), recombinant human erythropoietin (EPO) à des concentrations gardées confidentielles par la société.

Au cours ce protocole SP2, les cytokines précédemment employées au cours des protocoles PC et PL ne sont pas ajoutées car le supplément contient déjà les stimulants nécessaires.

Tableau 7. Concentrations des suppléments ajoutés en protocole SP2

suppléments	Cf
StemSpan Erythroid Expansion Supplement	10 μ L/mL
PenicillinStreptomycin	1 μ L/mL

Tableau 8. Conditions expérimentales retrouvées en protocole SP2

Conditions	Phase I	Phase II	Phase III
1 (ctrl)	⊖	⊖	⊖
2	Ena 10μM	⊖	⊖

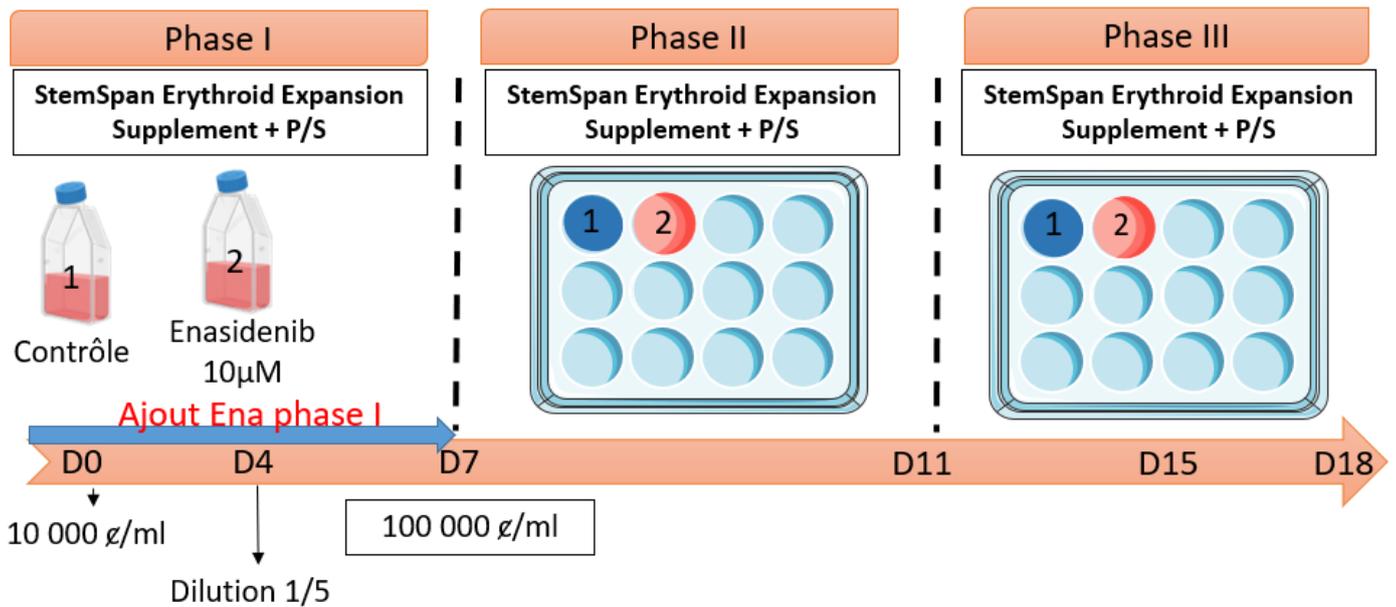


Figure 54. Chronologie du protocole SP2

II.2.4. Ajout de l'énasidenib

L'énasidenib (Chemietek, Indianapolis) est dilué à la concentration de 1000UI/10mM dans 1mL de DMSO (Réf : TA-T2346-1ML). Cette molécule est ajoutée à la concentration finale de **10μM**, afin de mimer les conditions retrouvée dans l'étude de Ritika Dutta et al (6). Après ajout de cette dernière, l'homogénéisation du milieu est réalisée à l'aide d'une pipette.

Au cours de ces 3 protocoles de culture ex vivo, la condition Contrôle (CTL) est comparée à la condition énasidenib en phase 1 (Ena1). La molécule peut également être introduite au cours d'autres phases, telles qu'en phase 2 (Ena2), ou en phase 1 et 2 (Ena12).

Les flasques de culture de 25 cm³, et les plaques de 6, 12 et 24 puits sont placées en incubateur (Binder ®), à 37°C sous une concentration de 5% en CO₂.

II.3. Etude de la prolifération cellulaire

La prolifération reflète l'expansion cellulaire, correspondant à la multiplication des cellules dans leurs conditions de culture. Il est possible d'étudier cette dernière grâce aux numérations cellulaires réalisées à l'aide du bleu de Trypan. La viabilité est étudiée par marquage réalisé au 7-AAD et à l'Annexine5/IP. L'histoire proliférative, quant à elle, est suivie à l'aide d'un marquage réalisé au CFSE.

II.3.1. Etude de la viabilité au bleu de Trypan

La coloration des cellules érythroïdes est réalisée au Bleu de Trypan concentré à 0,4% (StemCell TM Technologies #07050) et la numération des cellules vivantes, sous microscope (BH2 OLYMPUS®), au grossissement x200.

Les cellules mortes, apparaissant bleues, ne sont pas prises en compte lors de la réalisation des numérations cellulaires.

Le bleu de Trypan nous permet de réaliser les numérations en cellule de Malassez, permettant ainsi d'obtenir la concentration cellulaire théorique associée aux différents jours de culture.

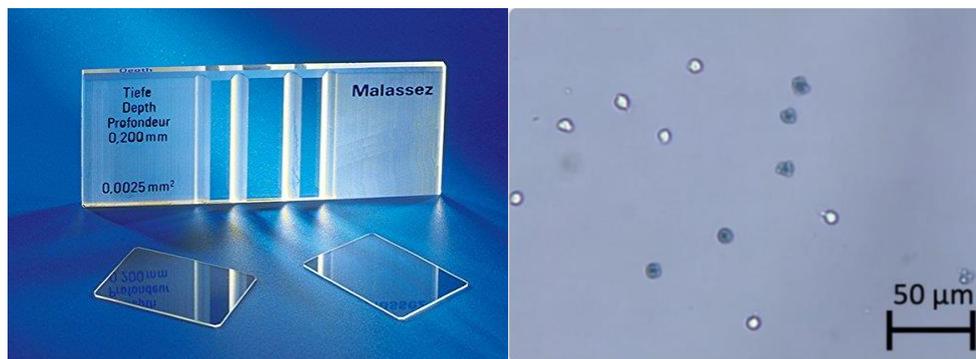


Figure 55. Numération cellulaire en cellules de Malassez, après coloration au bleu de Trypan (grossissement x200)

II.3.2. Marquage au 7-AAD

Le marquage au 7AAD, ou 7-aminoactinomycine D, témoigne de la viabilité des cellules dans leurs conditions de culture. Cette molécule s'intercale entre les paires de bases GC de l'ADN, formant des complexes 7-AAD/ADN qui peuvent être excités par un laser d'une longueur d'onde de 488 nm et possèdent des maxima d'émission de 647 nm. Cet agent ne pénètre pas dans les cellules saines, seules les cellules dont l'intégrité de la membrane plasmique est compromise sont marquées, permettant ainsi la détection des cellules mortes ou en phase d'apoptose tardive.

II.3.3. Marquage à l'Annexine-V / Iodure de Propidium

L'annexine-V (A5) est une protéine qui possède une forte affinité pour la phosphatidylsérine (PS), ce phospholipide présent au niveau de membrane plasmique, localisé plus précisément du côté intracellulaire chez la cellule saine. Au cours de l'apoptose, la PS se retrouve exposée à l'extérieur de la cellule permettant à l'annexine-V de s'y fixer.

Ce test est complété par l'addition d'un agent intercalant, l'iodure de propidium (IP), qui ne pénètre dans les cellules que lorsque la membrane plasmique est altérée, c'est-à-dire en phase tardive d'apoptose, ou lors de la nécrose.

La fluorescence de l'IP est analysée sur le canal de la Phycoérythrine (PE). L'annexine-V est couplée quant à elle à l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC). Les fluorochromes sont excités avec un laser de longueur d'onde à 488 nm pour le FITC et le PE. La fluorescence d'émission est détectée à 520 nm pour le FITC, et à 580 nm pour le PE.

En cytométrie en flux, les cellules en nécrose sont distinguées de celles en apoptose selon les critères suivants :

- **A5- / IP-** → cellule vivante ;
- **A5- / IP+** → débris nucléaires ;
- **A5+ / IP-** → phase précoce d'apoptose ;
- **A5+ / IP+** → phase tardive d'apoptose et ou nécrose. (181)

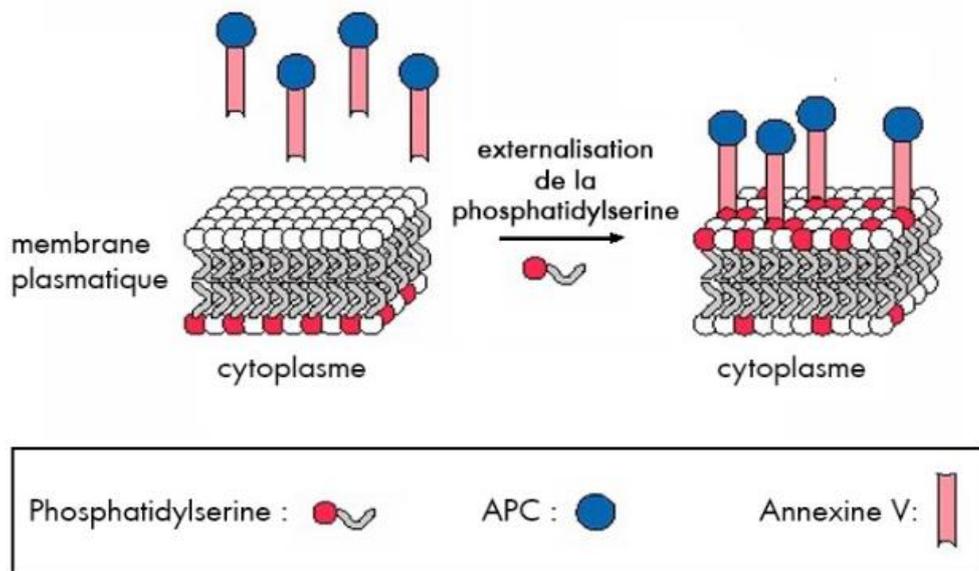


Figure 56. Principe du marquage par l'annexine-V de la phosphatidylsérine externalisée

Au cours de cette expérience, des **concentrations croissantes d'énasidenib** ont été testées, afin de connaître le potentiel effet toxique sur les cellules érythroïdes :

-Ena à **10 μ M**

-Ena à **20 μ M**

-Ena à **30 μ M**

Les contrôles ont été réalisés pour chaque condition, de la manière suivante :

- un contrôle négatif constitué de cellules non marquées (NM), soit : 10 000 cellules sans ajout d'A5 ou d'IP

- un contrôle positif à l'IP (C+ IP), soit : 10 000 cellules avec ajout de l'intercalant IP seul

- un contrôle positif à l'Annexine-5 (C+ A5), soit : 10 000 cellules avec ajout de l'A5 seule

Le tube d'intérêt est marqué de la manière suivante :

- double marquage (double +), soit : 50 000 cellules avec ajout d'A5 et d'IP

Soit un total de 4 tubes par condition.

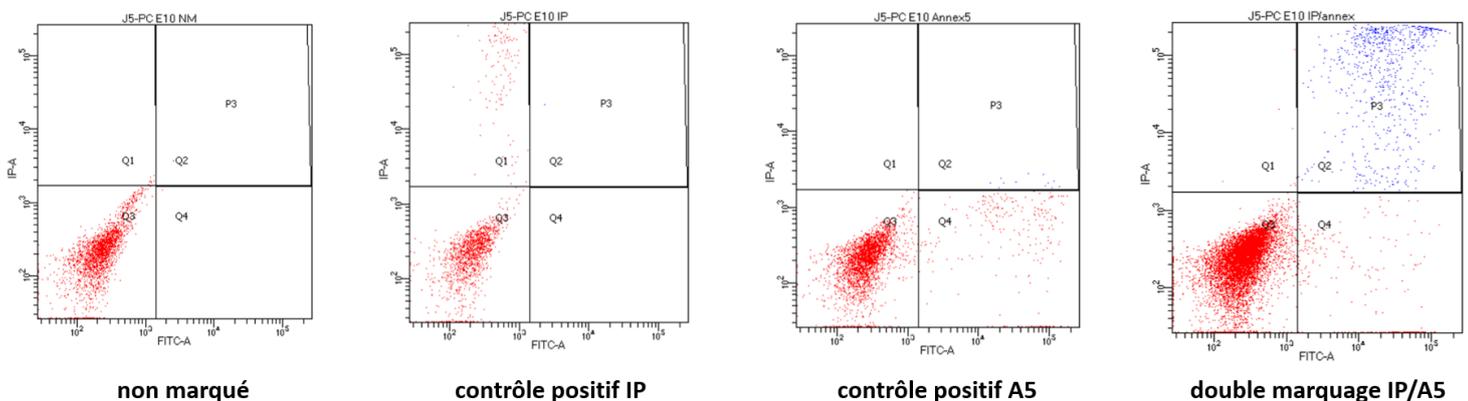


Figure 57. Marquage A5/IP de la condition Ena1 à 10 μ M, avec contrôles associés (NM, IP+, A5+) à J5 du PC.

Le marquage à l'Annexine-5 est représenté sur l'axe des abscisses par « FITC-A » (son fluorochrome de couplage), et en ordonné l'IP.

II.3.4. Multiplication cellulaire

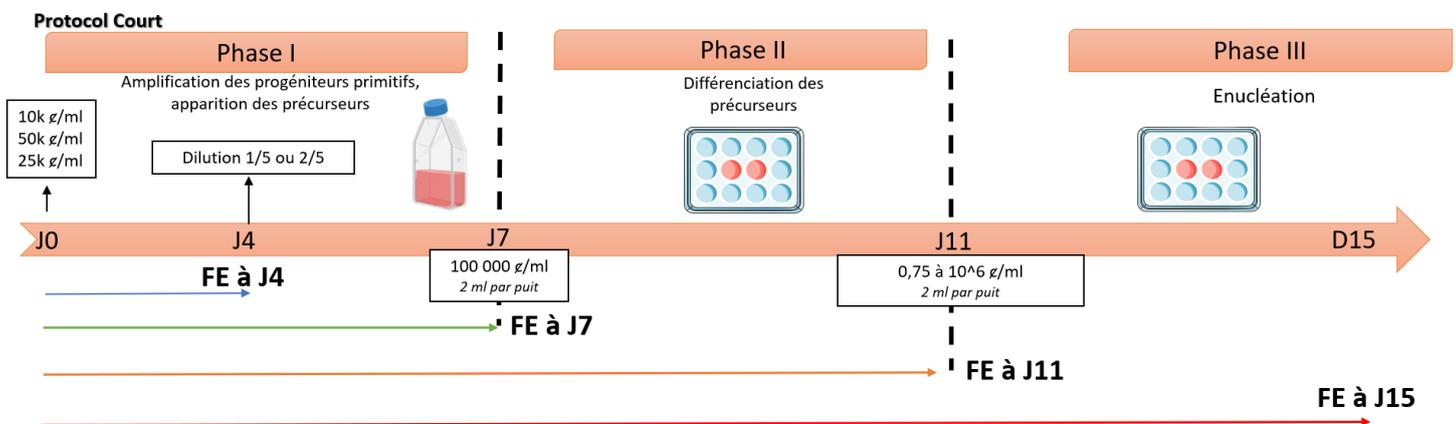
La réalisation de la numération cellulaire permet d'aboutir au calcul du taux d'expansion (ou Facteur d'Expansion). Le taux d'expansion, pour un jour donné, se calcule de la manière suivante :

$$\text{Taux d'Expansion (ou FE) au Jour J} = \frac{\text{Nombre total de cellules au Jour J}}{\text{Nombre total de cellules au Jour 0}}$$

La numération cellulaire est réalisée aux différents jours de culture ; J4, J7, J11, J15, J18.

Sachant la dilution réalisée à J4, afin qu'obtenir la croissance cellulaire théorique à J7, il est nécessaire de multiplier la concentration cellulaire à J7 par 5 ou 2,5 (dilution 1/5^{ème} ou 2/5^{ème} respectivement). De plus, il est important de prendre en compte les concentrations cellulaires réensemencées aux différentes étapes, telles qu'à J7 et J11 (et parfois J15). Par exemple en PC, 100 000 cellules/mL à J7 et entre 750 000 à 10⁶ cellules/mL à J11 sont réensemencées à chaque étape.

Voici la méthode afin de parvenir aux Facteurs d'Expansions (FE), calculés aux différents jours de culture en PC ;



Calculs des Facteurs d'Expansions (FE): Q = Quantité cellulaire et C = concentration cellulaire

-FE à J4= Qj4/Qj0

-FE à J7= FE à j4 x FE entre j4 et j7

-FE à J11= FE à j7 x (Cj11/Censemencée à j7)

-FE à J15= FE à j11 x (Cj15/Censemencée à j11)

Figure 58. Méthode de calculs des FE aux différents jours en PC

II.3.5. Histoire proliférative, marquage au CFSE

Le kit de prolifération cellulaire CFSE (CarboxyFluorescéine Succinyl Ethanolamine) CellTrace™ (Invitrogen™ C34570) a été employé afin de réaliser le marquage *in vitro* des cellules érythroïdes, afin de tracer plusieurs générations cellulaires, lors de l'analyse par cytométrie en flux. Lors de l'incubation avec les cellules, le CFSE traverse facilement la membrane plasmique et se lie de façon covalente à toutes les amines libres à l'intérieur des cellules. (182) A chaque division cellulaire, l'intensité de la fluorescence est divisée par 2 jusqu'à ce que la fluorescence résiduelle se confonde avec l'autofluorescence naturelle des cellules.

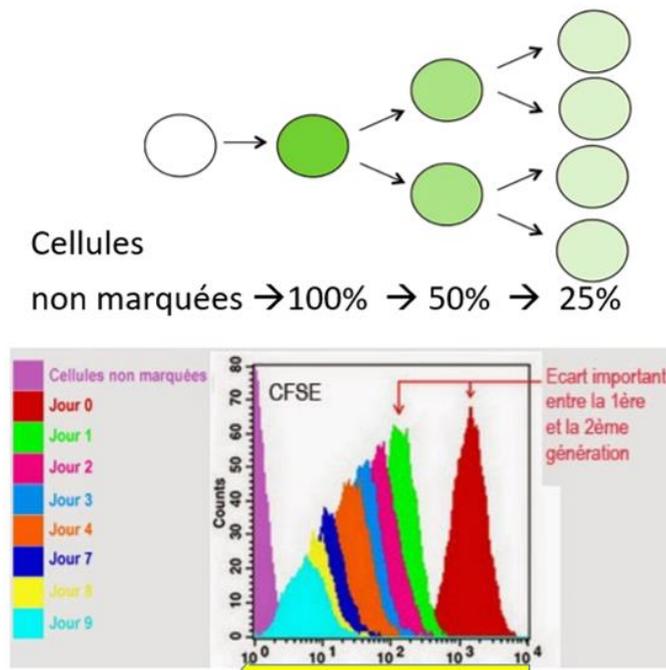


Figure 59. Principe du marquage au CFSE

Le marquage des cellules érythroïdes au CFSE est réalisé de la manière suivante : (Concentration initiale à 10mM)

- Diluer la concentration initiale de CFSE à 0.1 μM dans le PBS
- Réaliser le marquage cellulaire avec 1mL de la solution précédemment préparée pour 1×10^6 cellules
- Incuber 30 minutes dans l'incubateur à 37°C. Réaliser des agitations toutes les 5 minutes.
- Laver les cellules deux fois 2 avec 5mL de PBS
- Réaliser les acquisitions sur le cytomètre

A J0, en parallèle de la mise en culture des cellules CD34+, est réalisé l'incubation des cellules avec le CFSE, pendant 30min à l'incubateur, afin d'assurer correctement la liaison du fluorochrome à l'intérieur des cellules. Ensuite, à l'aide du cytomètre, la fluorescence de référence est mesurée, correspondant à une intensité de 100%. Des cellules, provenant du même échantillon mère, ont étéensemencées dans des puits adjacents afin de mesurer l'autofluorescence des cellules, en absence de fluorochrome. Enfin, les cellules (marquées et non marquées) sont mises en culture dans les mêmes conditions.

La lecture de la fluorescence est obtenue par cytométrie en flux à la longueur d'onde de 488 nm (analysée sur le canal du FITC).

II.4. Etude de la différenciation cellulaire

La différenciation cellulaire, étudiée par cytométrie en flux (à l'aide du logiciel DIVA), permet de suivre l'évolution de 2 principaux marqueurs membranaires ; **le CD71 et la GPA**. La différenciation cellulaire s'étudie également à l'aide de l'étude des CFC (Colony Forming Cell) permettant de remonter aux BFU-E et CFU-E originelles. La présence d'hémoglobine, ainsi que l'étude de l'aspect cytologique, faisant suite à la coloration au MGG, contribuent également à caractériser l'évolution de la différenciation des cellules CD34+, réalisés au dernier jour de la culture in vitro.

II.4.1. Phénotype CD71/GPA

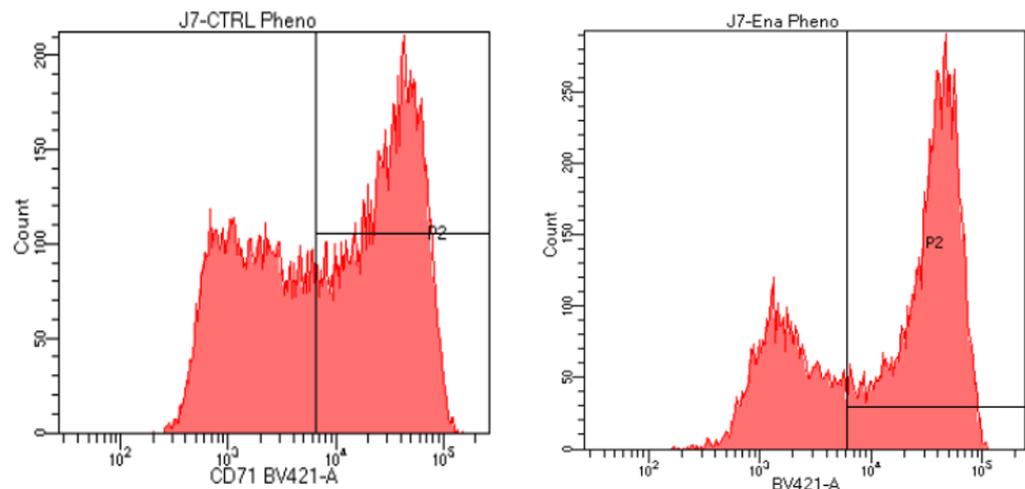
Afin de suivre la différenciation cellulaire, 50 000 cellules sont prélevées pour le marquage positif (avec anticorps) et 30 000 cellules constituent le témoin négatif. Ce contrôle négatif correspond aux cellules non marquées par les 2 anticorps (Non Marquées ou NM).

II.4.1.1. Etude de l'intensité moyenne de fluorescence (MFI) du CD71 et % CD71 "high"

Pour rappel, le marqueur CD71, ou récepteur à la transferrine, est un marqueur précoce et temporaire, absent des cellules matures. Il est donc essentiel de suivre l'évolution de son expression au cours de la différenciation érythroïde. L'anticorps anti-CD71, de type IgG1 provenant de la souris (Beckman Coulter), est employé à une concentration de 1 mg/mL. Ce marqueur est couplé au fluorochrome BV421, détecté par le cytomètre.

Nous avons cherché à exprimer l'intensité moyenne de fluorescence (MFI) du CD71, représentant la densité de récepteurs CD71 présents à la surface des cellules érythroïdes étudiées. Ce marqueur reflète les besoins cellulaires en fer car, plus une cellule exprime de récepteurs à la transferrine à la surface de sa membrane plasmique, plus son besoin en fer est important, permettant ainsi la synthèse d'hémoglobine. La MFI du CD71 est étudiée au sein de la proportion de cellules CD71 considérées « high ».

- Méthode pour déterminer la MFI (en UA), déterminée sur les cellules positives au CD71 :

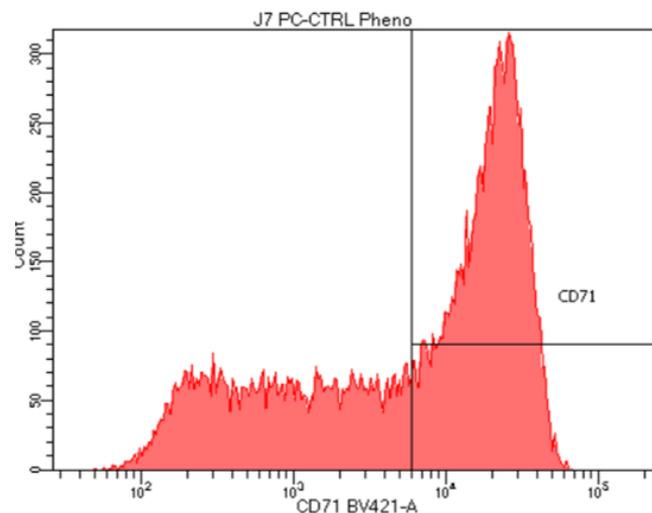


MFI CD71:

CTL = 30500 UA

Ena = 38200 UA

- Seuil utilisé pour déterminer le % de cellules positives, ou CD71 « high » :



Valeur seuil CD71 « high » = 6000 UA

Dans la pratique : un culot de 50 000 cellules est resuspendu dans 50µL de PBS + 1µL d'Ac anti-CD71 + 1µL d'Ac anti-GPA. Le marquage est réalisé à l'abri de la lumière pendant 15min. Les cellules sont ensuite lavées avec 2mL de PBS par tube, suivi d'un cycle de centrifugation, avant d'être analysées au cytomètre.

II.4.1.2. Marqueur de la GPA

Le second marqueur analysé, la **GPA ou Glycophorine A**, est une protéine transmembranaire synthétisée vers le stade de proérythroblaste, et demeure présente sur la membrane plasmique du GR mature.

L'anticorps anti-GPA, de type IgG2b (ABCAM™) monoclonal (YTH89.1), provenant du rat, est employé à une concentration initiale de 0.1 mg/mL. Cet Ac est couplé au fluorochrome FITC détecté par l'appareil.

II.4.1.3. Suivi du couple CD71/GPA

Le suivi du couple CD71/GPA permet de suivre l'état de différenciation des cellules. On rappelle la chronologie suivie par ce couple phénotypique :

CD71 + / GPA - → CD71 + / GPA + → CD71 - / GPA +

Les anticorps employés, précédemment mentionnés, permettent donc de suivre l'évolution de ce couple phénotypique, par lecture au cytomètre. Les marquages sont réalisés aux différents jours de culture : J7, J11, J15 et J18.

II.4.2. CFC étude clonogénique

Les cellules sontensemencées en nombre défini sur méthylcellulose, avec ou sans addition d'EPO, en vue de leur différenciation. L'incubation est réalisée sous atmosphère humide à 37°C et 5% de CO₂. La numération des CFC est réalisée après **7 jours (pour les CFU-E) et 14 jours (pour les BFU-E)** d'incubation. Deux types de méthyl cellulose (StemCell™ Technologies) ont permis de réaliser cela :

La méthyl cellulose **H4034** permet de mettre en évidence les progéniteurs **BFU-E**, mais aussi les CFU-GM et les CFU-GEMM. Seules les BFU-E sont analysées, reconnaissables à leur aspect de colonies « éclatées » (burst).

Et la méthyl cellulose **H4330**, supplémentée en EPO, permet de mettre en évidence les progéniteurs **CFU-E**. Ces colonies sont caractérisées par un aspect rougeâtre, lié à la présence d'hémoglobine. Cette gélose favorise également la croissance des colonies CFU-GM (blanches), non prises en compte.

Pour la gélose H4034, l'ensemencement est réalisé à J0 en condition contrôle (CTL), et à J4 et J7 pour les conditions CTL et Ena1. Pour la gélose H4330, l'ensemencement est réalisé à J4 et J7 pour les 2 conditions.

Tableau 9. Quantité de cellules à ensemercer à J0, J4 et J7

Ensemencement des CFC		
J0	J4	J7
200g	50g	150g
+ 1ml Méthyl	+ 250µL Méthyl	
Boite de pétri	P24	P24

Enfin, il est possible de calculer la concentration de CFU/mL, à partir du nombre de CFU/puits:

$$\text{CFU/mL} = \frac{\text{moyenne nombre de CFU par puits} \times 1000}{\text{Volume ensemençé}}$$

Les colonies sont dénombrées sous microscope Nikon®.

II.4.3. Hémoglobinisation

La présence d'hémoglobine synthétisée dans les cellules est recherchée visuellement (test qualitatif), à J15 et J18. Cette étape est réalisée après un cycle de centrifugation (10min à 14G, à 16°C) des cellules. Environ 3 millions de cellules, de chaque condition, sont sélectionnées et déposées dans un tube Eppendorf de 1,5mL. L'hémoglobine est reconnaissable, au fond des cônes, par la présence d'un culot rougeâtre.

II.4.4. Coloration au May Grunwald Giemsa (MGG) et aspect cytologique

Cette étape réalisée à la fin de la culture cellulaire, permet : d'identifier les précurseurs, de visualiser l'aspect des cellules et de réaliser un dénombrement des différents stades cellulaires présents.

La concentration cellulaire déposée dans les porte-lames, avant centrifugation, est d'environ **500 000 cellules/Eppendorf**. Le cycle de centrifugation est réalisé pendant 10 min à 200 rpm.

Les lames sont ensuite colorées au MGG (Merck, Darmstadt), par la technique de coloration par bains, réalisée sous hotte à filtration. Voici comment est réalisée cette étape :

- Remplir les bacs de coloration :
 - Bac 1** : May Grunwald pur
 - Bac 2** : Solution tampon 7,2

-**Bac 3** : 200mL de Giemsa dilués au 1/20^{ème} dans la solution tampon (10mL de colorant + 190mL)

-**Bac 4** : Utiliser pour le rinçage des lames

- Disposer les lames sur le porte-lame
- Plonger les lames dans le Bac 1 de May Grunwald pendant **3min**
- Plonger les lames dans le Bac 2 de solution tampon pendant **1min**
- Plonger les lames dans le Bac 3 de Giemsa pendant **10 min**
- Rincer rapidement les lames avec la pissette d'eau tamponnée pendant 10secondes
- Sortir les lames du porte-objet et laisser sécher

Les lames colorées au MGG sont ensuite observées sous microscope, au grossissement X500 ou X1000 (+ huile à immersion). Les clichés sont réalisés à même l'objectif, avec un smartphone (iPhone XR Apple®), permettant la réalisation des numérations cellulaires. Le logiciel Paint® (Microsoft®) autorise l'application d'un code couleur afin d'identifier les différents stades cellulaires observés. Les cellules sont regroupées en cellules aux « stades précoces », correspondant aux proérythroblastes et érythroblastes basophiles. Les cellules en « stades intermédiaires » regroupent les polychromatophiles et les érythroblastes acidophiles. Enfin, les cellules au stade « tardif » correspondent aux hématies. Le comptage cellulaire est réalisé sur un total de 300 cellules par condition, puis converti en pourcentage, afin d'avoir le reflet des diverses proportions cellulaires propres à chaque condition. Le comptage est réalisé à J18, sur 2 séries, avec protocole court. (n=2)

II.5. Différenciation érythroïde en fonction de la prolifération cellulaire associée

Dans un dernier temps, les données récoltées précédemment, lors de la multiplication cellulaire et de la différenciation érythroïde, sont analysées ensemble. Cette étape permet d'évaluer la différenciation cellulaire, en tenant compte de la prolifération associée. Afin d'avoir le reflet de la quantité totale théorique de cellules, à chaque jour et pour chaque condition, les Facteurs d'Expansions (FE), calculés dans la partie sur « la multiplication cellulaire », sont recueillis. Ces derniers sont ensuite multipliés par la quantité de cellulesensemencées initialement à chaque étape.

Par exemple : Pour la condition contrôle à J7, FE = 24, et 50 000 cellules ont étéensemencées à J0, alors nous multiplions 24 x 50 000, soit environ 1 200 000 cellules, théoriquement présentes à J7 dans la flasque contrôle. *Le FE nous affranchit de certains calculs car, étant le rapport des concentrations cellulaires ; celle du jour correspondant rapportée sur celle correspondante à l'ensemencement réalisé à l'étape précédente.* Sans les FE, le calcul est : à J7 de la condition contrôle 48 000 cellules sont présentes par mL. Or, si on veut obtenir la quantité de cellules totale en tenant compte de la dilution, il faut multiplier 48 000 par 5, dans le cas d'une dilution de 1/5^{ème} réalisée à J4. Avec 5mL de milieu par flasque, le calcul revient à réaliser l'opération suivante : 48 000 (concentration cellulaire à J7) x 5 (facteur de dilution à J4) x 5 (mL de flasques) = 1 200 000 cellules totales à J7 pour la condition contrôle. Il est

préférable de réaliser les calculs en tenant compte des FE, les multipliant ensuite par la quantité totale de cellules ensemencées à l'étape précédente.

Dans un second temps, pour avoir le reflet de la différenciation cellulaire, le **% de cellules CD71+ / GPA+** (double positives) est sélectionné, reflétant un engagement avancé dans la lignée érythroïde. Les stades érythroïdes CD71+/GPA+ regroupent l'érythroblaste basophile, le polychromatophile et l'érythroblaste acidophile.

Enfin, dans un dernier temps, afin de connaître la différenciation érythroïde en fonction de la prolifération cellulaire, la quantité de cellules présentes à J7 (J11 et J15) est multipliée par le % de cellules (CD71+/GPA+) correspondant respectivement au jour associé.

II.6. Statistiques

Les moyennes sont calculées pour $N \geq 2$, les écart-types (ET) associés pour $N \geq 3$ sont représentés par des barres sur les graphiques. N représente une série de manipulation, soit : une quantité de cellules CD34+ ensemencées en condition contrôle, versus en condition Ena, suivie sur une certaine période.

Concernant la prolifération cellulaire, les histogrammes représentent l'expansion cellulaire au cours du temps (à J4, J7, J11, J15 et J18). Les EF, sur l'axe des ordonnées, sont représentés en \log_{10} .

Le risque de première espèce α est fixé à 5%, correspondant au risque de rejeter l'hypothèse H_0 à tort. Il représente la probabilité qu'un effet observé soit lié au hasard.

La significativité statistique ($p < 0,05$) des différences observées est représentée par une * sur les graphiques.

Le test de Wilcoxon, non paramétrique et adapté aux données appariées, est employé afin de connaître la significativité des résultats obtenus. Ce test est adapté pour les petits échantillons ($N < 30$), pour des variables qui suivent des lois inconnues et ne fait aucune hypothèse sur la distribution des données. Ce test est réalisé en bilatéral afin de comparer les deux groupes appariés, et l'hypothèse nulle correspond à : « la prolifération/différenciation cellulaire en condition Ena est différente de celle retrouvée en condition contrôle ».

Justification du recours à un test statistique réalisé en « apparié » :

Les cellules CD34+ des différentes conditions proviennent toutes du même échantillon initial, pour chaque série d'expérimentation, justifiant ainsi la réalisation d'un test statistique en apparié. Même si ces cellules ne sont pas appariées individuellement en paires, elles sont considérées comme appariées du fait de leur origine commune dans l'échantillon initial ou USP (Unité de Sang Placentaire). Il est important de noter que le recours à un test apparié dans ce contexte repose sur l'hypothèse que les cellules proviennent d'une USP et que les différences observées entre les cellules soumises à différentes conditions ne sont alors pas attribuables à des facteurs autres que les conditions elles-mêmes.

L'objectif du test de Wilcoxon, appliqué sur des échantillons appariés, est d'évaluer les différences entre les mesures observées sur des cellules avant et après leur exposition à l'énasidenib à différents moments, afin de comprendre l'impact de ce traitement sur la croissance des cellules érythroïdes. Bien que ce test soit généralement robuste et adapté à de nombreuses situations, il présente néanmoins certaines limites à prendre en compte.

Premièrement, le test de Wilcoxon peut manquer de puissance statistique, surtout lorsque les échantillons sont de petite taille ($n < 30$), ce qui rend plus difficile la détection de différences significatives, notamment si ces différences sont subtiles. De plus, contrairement à certains tests paramétriques, le test de Wilcoxon ne fournit pas directement une estimation de l'intensité de l'effet, se contentant d'indiquer la présence ou non d'une différence sans quantifier cette différence.

En outre, il est important de souligner que le test de Wilcoxon est souvent moins puissant (donc moins précis) que les tests paramétriques, tel que le test t de Student, notamment dans le cas d'échantillons appariés ($n > 30$), affectant sa capacité à détecter des différences.

Pour pallier ces limitations et obtenir une évaluation plus complète, une analyse de variance (ANOVA) à deux facteurs, prenant en compte les variables "traitement" et "temps", est réalisée en complément. L'ANOVA permet d'évaluer l'effet global du traitement sur l'ensemble des groupes et des moments de culture. Cependant, elle ne permet pas d'identifier spécifiquement quels groupes diffèrent les uns des autres. C'est pour cette raison que la correction de Bonferroni est appliquée en complément, offrant un moyen de contrôler le taux d'erreur global tout en facilitant les comparaisons multiples entre les différents groupes.

En combinant l'utilisation de tests paramétriques et non paramétriques, comme l'ANOVA et le test de Wilcoxon, cette approche mixte renforce la robustesse des résultats. La convergence de conclusions similaires entre ces deux types de tests accroît la confiance dans les résultats de l'étude, offrant ainsi une perspective plus complète sur l'impact du traitement sur la croissance cellulaire.

Logiciel statistique : **Graph Pad Prism 8.0.2** ®

III. Résultats

III.1. Etude de la toxicité de l'énasidenib

III.1.1. Marquage au 7-AAD

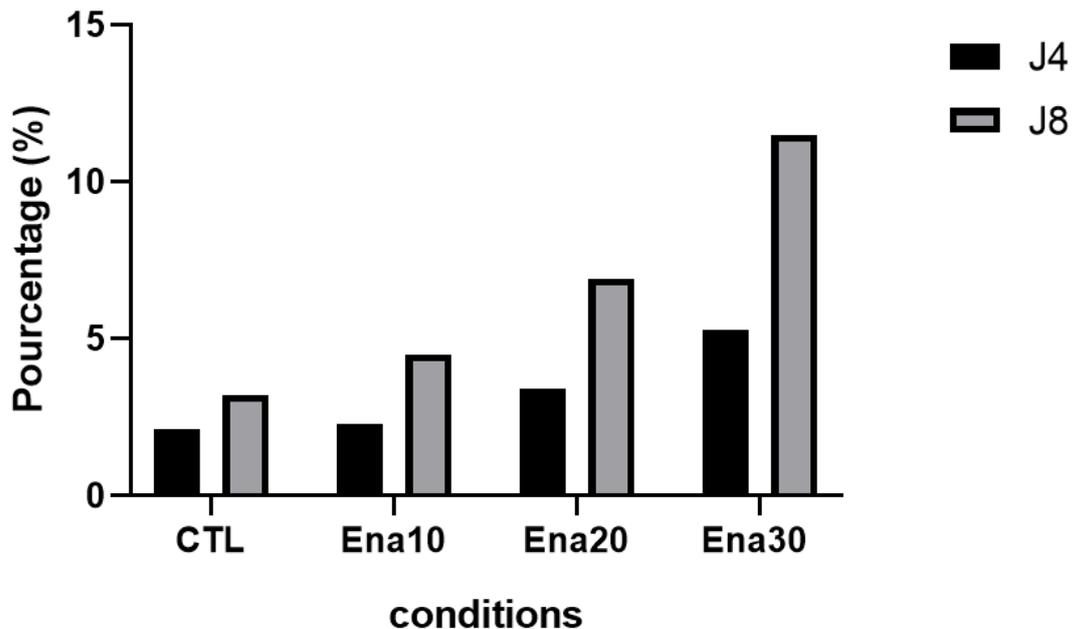


Figure 60. Etude de la toxicité de l'énasidenib, en concentration croissante, révélée au 7-AAD. En PC (n=1, marquage réalisé à J4 et J8)

Nous remarquons que le fait d'exposer les cellules érythroïdes, au cours de la première semaine de culture, à des concentrations croissantes d'énasidenib, augmente également la mortalité cellulaire de manière proportionnelle (effet dose-dépendant). La mortalité cellulaire semble s'accroître avec la concentration d'énasidenib, et de plus, avec la durée de la culture. Pour une concentration d'énasidenib à 10 μ M, la mortalité est proche de celle observée en condition contrôle à J4 et J8 du PC. Cependant, pour les conditions à 20 μ M et 30 μ M, nous remarquons un effet visible à J4, caractérisé par un taux de mortalité environ 2 fois plus élevé que celle retrouvée en condition contrôle.

Lors du suivi de la mortalité cellulaire au 7-AAD, selon les protocoles long (PL) et SP2, nous pouvons remarquer les résultats suivants :

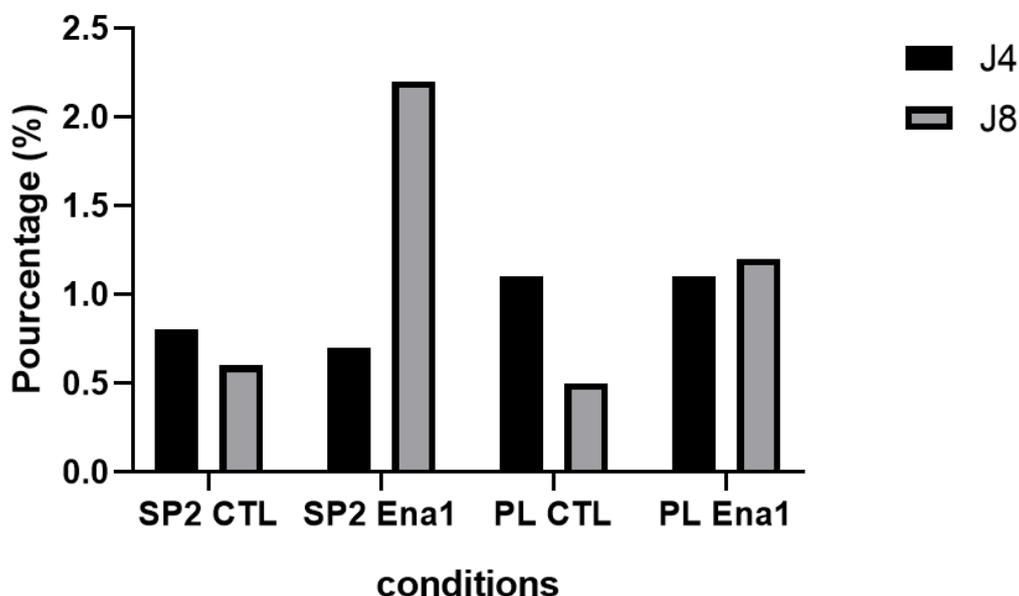


Figure 61. Etude de la toxicité de l'énasidenib au 7-AAD, avec le protocole long et SP2 (% de mortalité) (n=1, étude à J4 et J8, C0=50 000 cellules/mL)

A J4 et J8 du protocole long et SP2, la mortalité cellulaire retrouvée pour la condition énasidenib à 10µM est équivalente (inférieure à 2%) à celle de la condition contrôle.

Nous pouvons considérer que, lorsque l'exposition des cellules au médicament est réalisée au cours de la première semaine de culture, avec les protocoles court, long et SP2, **la molécule d'énasidenib à la concentration de 10µM, n'augmente pas de manière significative la mortalité des cellules érythroïdes.**

III.1.2. Marquage Annexine-V / Iodure du Propidium

Le signal correspondant à l'Annexine-5 (A5) est représenté sur l'axe des abscisses par « FITC-A » (son fluorochrome de couplage) et en ordonné est représenté l'IP.

On rappelle que les cellules positives à l'Annexine-5 seule sont retrouvées en situation d'apoptose précoce, tandis que les cellules doublement positives à l'A-5 et l'IP sont retrouvées en situation de nécrose ou d'apoptose tardive. Les cellules vivantes, doublement négatives, sont retrouvées dans le cadran inférieur gauche du cytogramme.

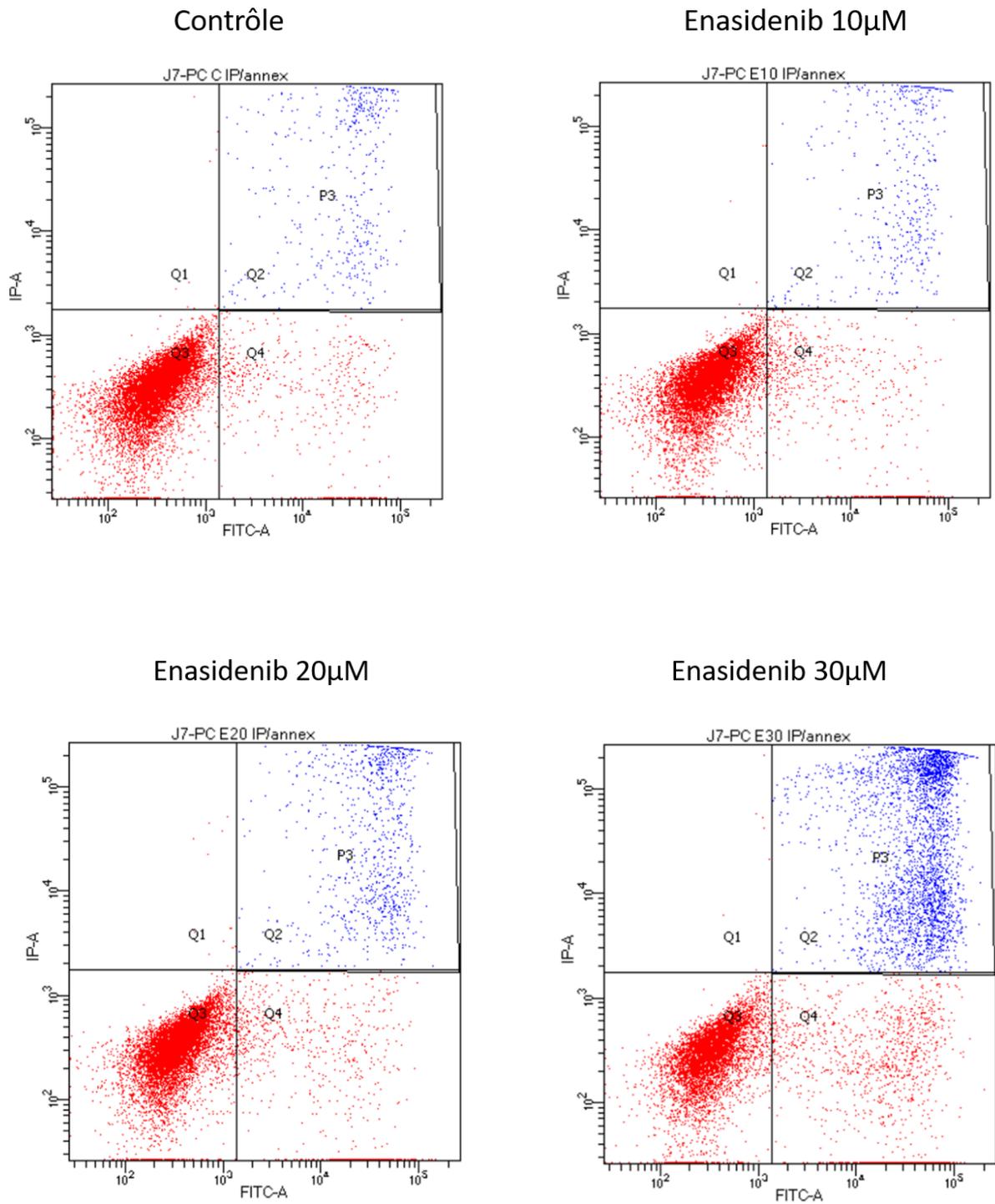


Figure 62. Cytogrammes de mortalité cellulaire par marquage A5/IP à J7, en PC. Conditions contrôle vs Ena1 aux concentrations de 10 μ M, 20 μ M, et 30 μ M (n=1)

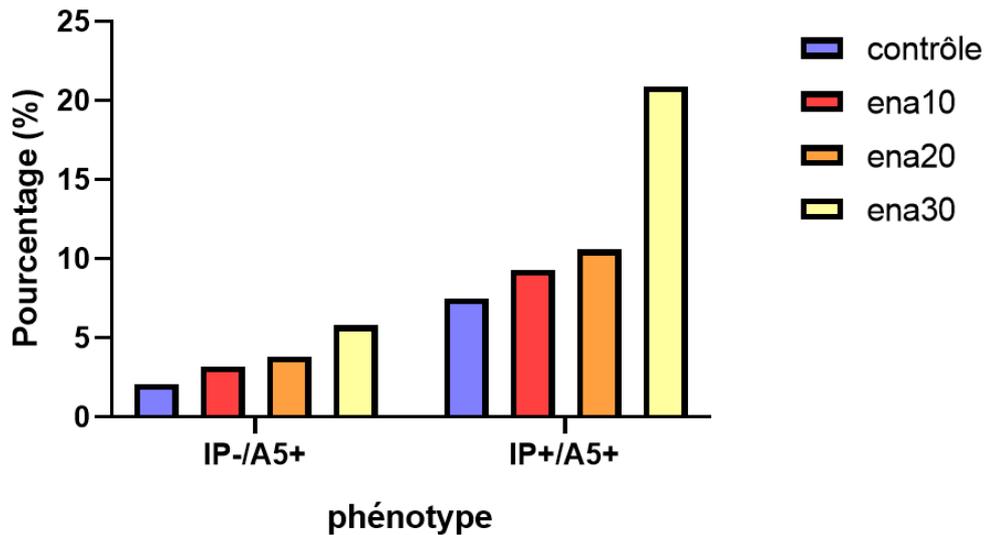


Figure 63. étude de la mortalité cellulaire, en concentrations croissantes d'énasidenib. Marquage à l'A5/IP à J5 en PC (n=1)

A J5 du PC, nous pouvons observer un effet dose-dépendant, plus la concentration d'énasidenib augmente, plus la mortalité cellulaire s'intensifie également. Les pourcentages de cellules en apoptose précoce et en nécrose pour la condition Ena 10 μ M sont légèrement supérieurs par rapport à la condition contrôle. Pour une concentration de 30 μ M nous pouvons remarquer un pourcentage de cellules en nécrose presque trois fois supérieur à celle retrouvée en condition contrôle.

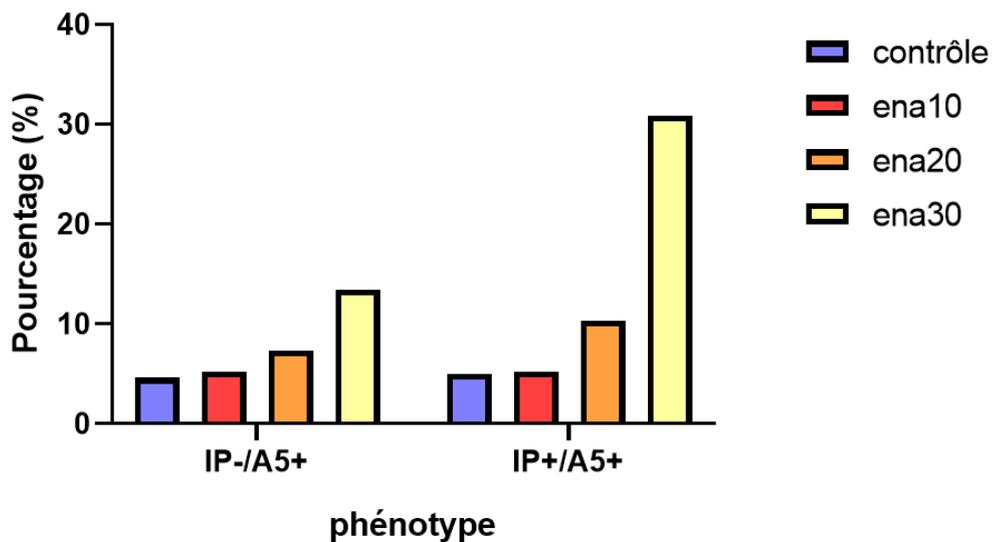


Figure 64. étude de la mortalité cellulaire en PC, en concentrations croissantes d'énasidenib. marquage à l'A5/IP, à J7 (n=1)

A J7 du PC, nous pouvons constater des résultats similaires pour les conditions CTL et Ena10µM, concernant le pourcentage de cellules en nécrose et en apoptose précoce. Comparé au CTL, le pourcentage de cellules nécrotiques en condition Ena 20µM est environ deux fois plus élevé. Concernant la condition Ena 30µM, le taux de cellules en nécrose est environ six fois plus élevé par rapport à la condition CTL (et trois fois plus élevé concernant l'apoptose précoce).

D'après les résultats précédents, nous pouvons remarquer que l'ajout d'énasidenib à une concentration de 10µM, au cours de la première semaine de culture, n'augmente que très légèrement la quantité de cellules mortes, en nécrose et en apoptose précoce/tardive, par rapport à une condition sans exposition au médicament. Cependant, **au-delà de cette concentration de 10µM, la molécule est trop toxique pour la croissance des cellules érythroïdes en culture, avec jusqu'à 30% de cellules nécrotiques retrouvés à J7 pour une concentration de 30µM.**

III.2. Etude de la prolifération cellulaire

Afin d'étudier la prolifération des cellules CD34+, les **facteurs d'expansion (FE)** sont calculés aux différents jours de la culture in vitro ;

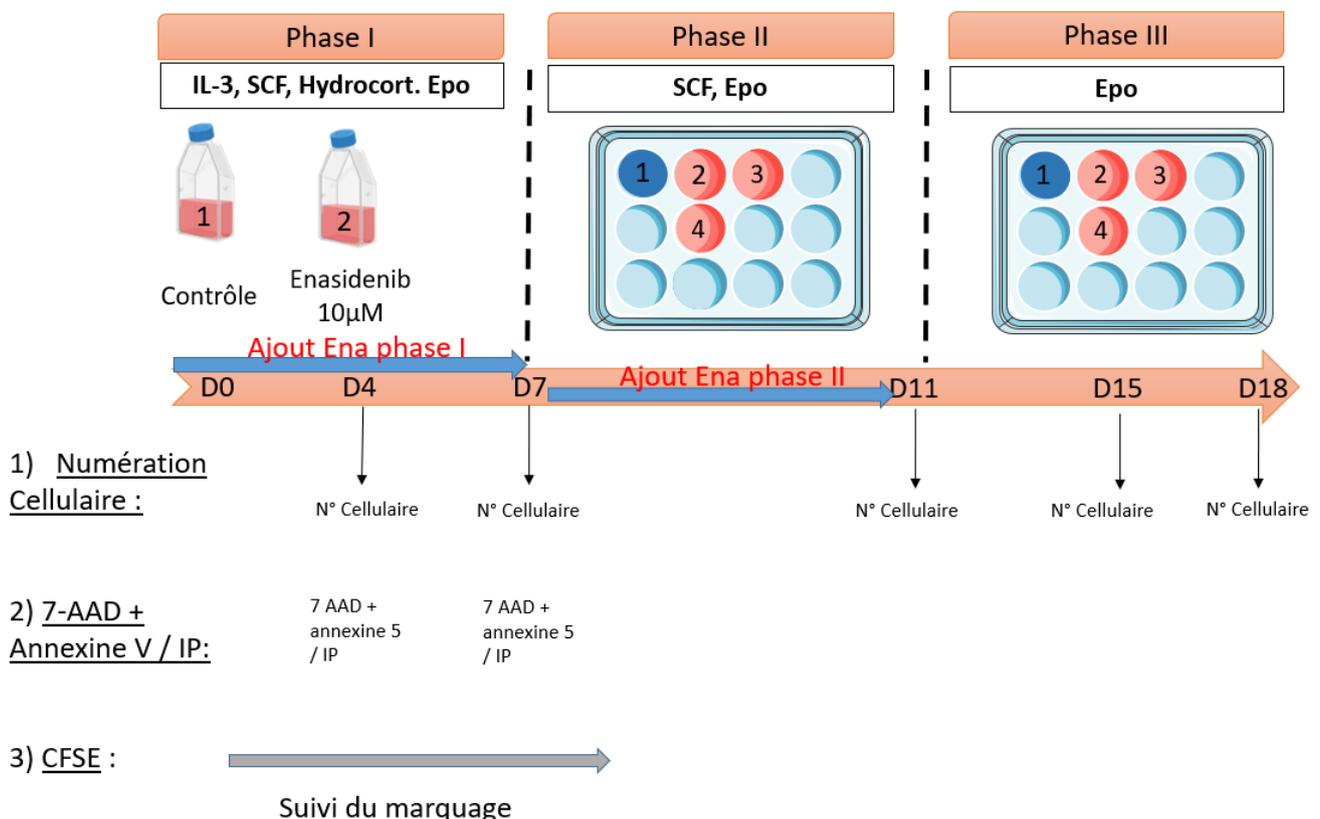


Figure 65. Tests évaluant la prolifération érythroïde, réalisés aux différents jours de la culture in vitro

III.2.1. Multiplication cellulaire

La majorité des expériences ont été réalisées avec une concentration initiale C0 de 10 000 cellules/mL. Afin de mimer les conditions de culture du protocole de Giarratana et al, (176) une concentration initiale plus importante C0= 50 000 cellules/mL a été testée. Une concentration initiale intermédiaire a également été employée, soit C0= 25 000 cellules/mL.

Comme on pourra le voir, l'amplification des cellules dès le début de la culture présente de grandes variations entre les différentes expériences. Ces variations peuvent être dues aux variations inhérentes à la pratique expérimentale (pureté, décongélation ...) mais également aux variations inter-échantillons (c'est à dire entre les individus nouveaux nés, car ici on n'utilise pas de lignées cellulaires). En effet, il faut rappeler que les populations cellulaires concernées, même si elles sont toutes triées selon un critère unique et commun (l'expression du CD34), sont hétérogènes et composées d'une proportion majoritaire mais variable de cellules progénitrices différemment engagées dans chaque lignée de différenciation hématopoïétique. La composition de ces cellules peut être influencée par des facteurs génétiques (sexe...), mais aussi au déroulement de la grossesse (poids, état physiologique de la mère...) et de l'accouchement et le stress qu'il induit pour la mère et le nouveau-né. de ce fait les différentes expériences ont d'abord été analysées séparément puis ensemble.

III.2.1.1. Avec le protocole court

a) C0=10 000cellules/mL et dilution J4 1/5^{ème}

Les Facteurs d'Expansions (FE) ont été calculés à J4, J7, J11, J15 et J18. Nous présentons ici, les manipulations qui ont le plus poussé soit un facteur de dilution appliqué à J4 de 1/5^{ème}.

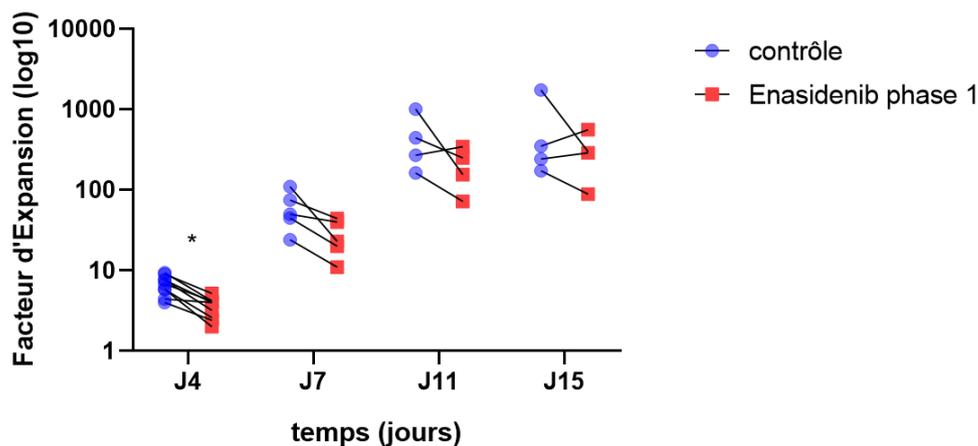


Figure 66. Expansion cellulaire en PC (suivie sur 15 jours de culture, n=9, avec C0=10 000/mL et une dilution réalisée à J4 de 1/5^{ème}, condition contrôle vs énasidenib en phase 1. Les FE ont été calculés en prenant le rapport entre la concentration cellulaire au jour J divisé par la concentration cellulaire obtenue à l'étape précédente. Certaines contaminations des plaques de culture expliquent le plus faible nombre de points en fin de protocole

D'après l'observation de ces résultats, l'expansion érythroïde en condition Ena1 n'est significativement pas différente de celle retrouvée en condition contrôle, sur l'ensemble des 15 jours de culture in vitro (test de Wilcoxon, au seuil de 5%). Cependant, d'après l'histogramme il semble exister une certaine tendance, c'est-à-dire que l'expansion érythroïde, lorsque les cellules sont exposées à la molécule, semble être inférieure sur l'ensemble de la culture cellulaire. Cette tendance est confirmée par le test de Bonferroni sur les valeurs propres au J4 (ANOVA, p-value=0,03, représentée par une * sur le graphique). Donc en début de protocole, l'exposition à l'énasidenib diminue significativement la prolifération érythroïde lorsque C0=10 000 cellules/mL et pour un facteur de dilution appliqué à J4 de 1/5^{ème}, par rapport à la condition contrôle.

b) C0=10 000cellules/mL et toutes dilutions J4 (1/5^{ème} et 2/5^{ème})

Nous présentons ici toutes les manipulations, y compris celles qui ont moins bien poussé, d'où l'application d'un facteur de dilution à J4 de 2/5^{ème}.

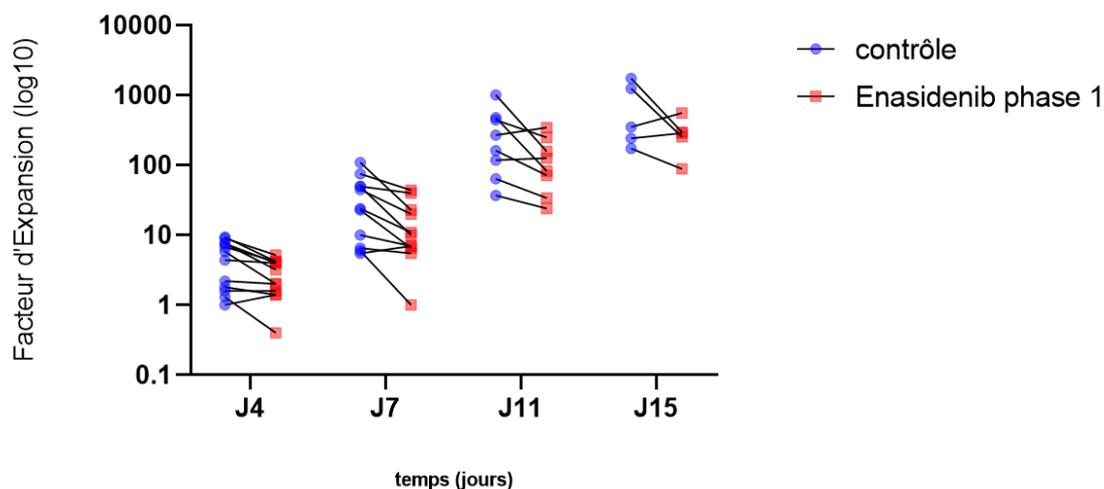


Figure 67. Expansion cellulaire en PC (suivie sur 15 jours de culture, n=13, avec une concentration initiale C0=10 000/mL et les dilutions réalisées à J4 de 1/5^{ème} (n=8) et 2/5^{ème} (n=5). Conditions contrôle vs énasidenib en phase 1 (J0 à J7)

D'après ces résultats, la même tendance semble se dégager que précédemment soit, une prolifération cellulaire qui semble inférieure en condition Ena1 comparée à celle observée en condition contrôle. Cependant, en ajoutant les résultats provenant de cultures cellulaires caractérisées par un facteur de dilution à J4 de 2/5, l'effet significatif retrouvé à J4 par le test de Bonferroni ne l'est plus. L'effet négatif de l'énasidenib n'est plus visible avec les cultures qui ont moins poussé. **L'énasidenib ne diminue significativement pas la prolifération cellulaire en PC, lorsque C0=10 000 cellules/mL, lorsqu'elle est ajoutée au cours de la première semaine de culture.** (p-value = 0,125 avec le test de Wilcoxon)

c) Toutes contractions initiales C0 et dilutions réalisées à J4

Ces résultats représentent toutes les cultures cellulaires réalisées selon le protocole court, (toutes C0 et dilutions réalisées à j4). Voici les résultats obtenus :

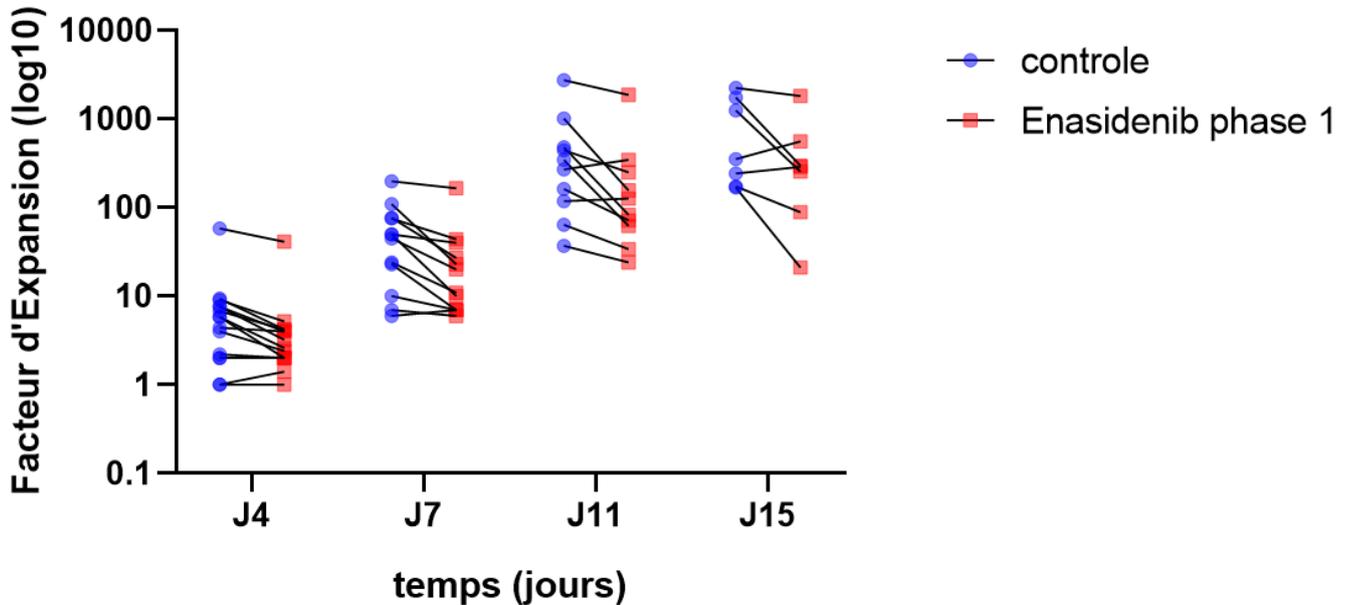


Figure 68. Expansion cellulaire avec le PC (n=16, toutes concentrations initiales C0 = 10 000 cellules / mL (n=13), 25 000 cellules / mL (n=1), et 50 000 cellules / ml (n=2) et les 2 facteurs de dilutions (1/5ème (n=9) et 2/5ème (n=7)) appliqués à J4.)

Nous pouvons remarquer que l'exposition des cellules CD34+ à l'énasidenib au cours des 7 premiers jours de culture n'augmente significativement pas la prolifération cellulaire par rapport au témoin (test de Wilcoxon). (FE médian contrôle = 313 et FE médian Ena1= 167)

Nous avons pu observer pour la condition avec C0= 50 000cellules/mL un phénomène d'épuisement du milieu, c'est-à-dire que la croissance des cellules ne s'effectuait pas de manière optimale. La multiplication cellulaire était reflétée par des FE très faibles à J4 et J7. En prenant en compte ces résultats, on se rend bien compte que les FE obtenus à J4 sont diminués par rapport aux cultures qui ont mieux poussées.

Ces résultats indiquent qu'un effet négatif de l'énasidenib est observée avec le PC à J7 sur la croissance cellulaire avec les conditions associées avec une multiplication importante des cellules.

III.2.1.2. Protocole long

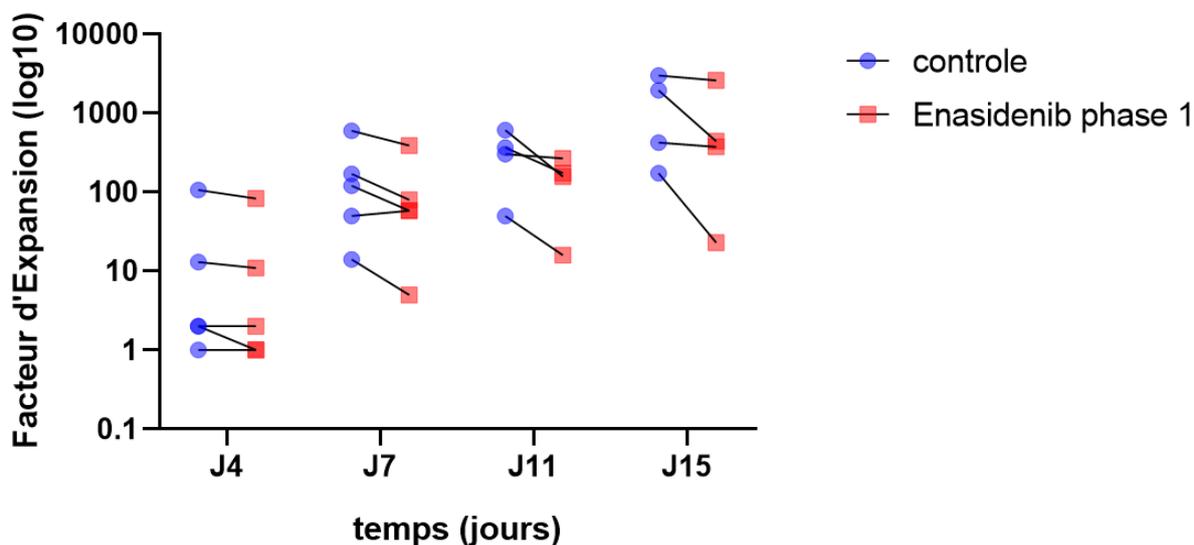


Figure 69. Expansion cellulaire retrouvée **en PL** (FE représentés en log10. Toutes concentrations initiales C0 et dilutions réalisées à J4, n=5). Pour les expériences menées selon le protocole long, on rappelle que la coculture des CSM est réalisée à partir du 11ème jour de culture. Ces résultats représentent l'analyse de toutes les cultures cellulaires menées **selon le protocole long, toutes C0 et dilutions** à J4; C0=10 000 cellules/mL (N=1) , C0=25 000 cellules/mL (N=1) , et C0=50 000 cellules/mL (N=3) et facteurs de dilutions réalisés à J4 ; dilution de 1/5ème (N=2) et dilution de 2/5ème (N=3))

D'après les résultats, au cours du protocole long, nous observons que la prolifération cellulaire en condition Ena1 ne diffère significativement pas de celle retrouvée pour la condition contrôle.

III.2.1.3. Protocole SP2

Il est essentiel de prendre en considération une limite importante rencontrée avec le protocole SP2. En effet, les cellules en condition SP2 demeuraient en flasque entre J7 et J14, conformément à la publication de Ritika Dutta. Aucun lavage des cellules n'est effectué au cours de cette période. Mise en évidence au bleu de Trypan, une mortalité importante est observable à J15, ayant pour conséquence d'introduire un potentiel biais dans la réalisation de la numération cellulaire théorique et l'obtention des FE correspondants.

- Protocole SP2 à Jour 15 ☒ mortalité importante +++

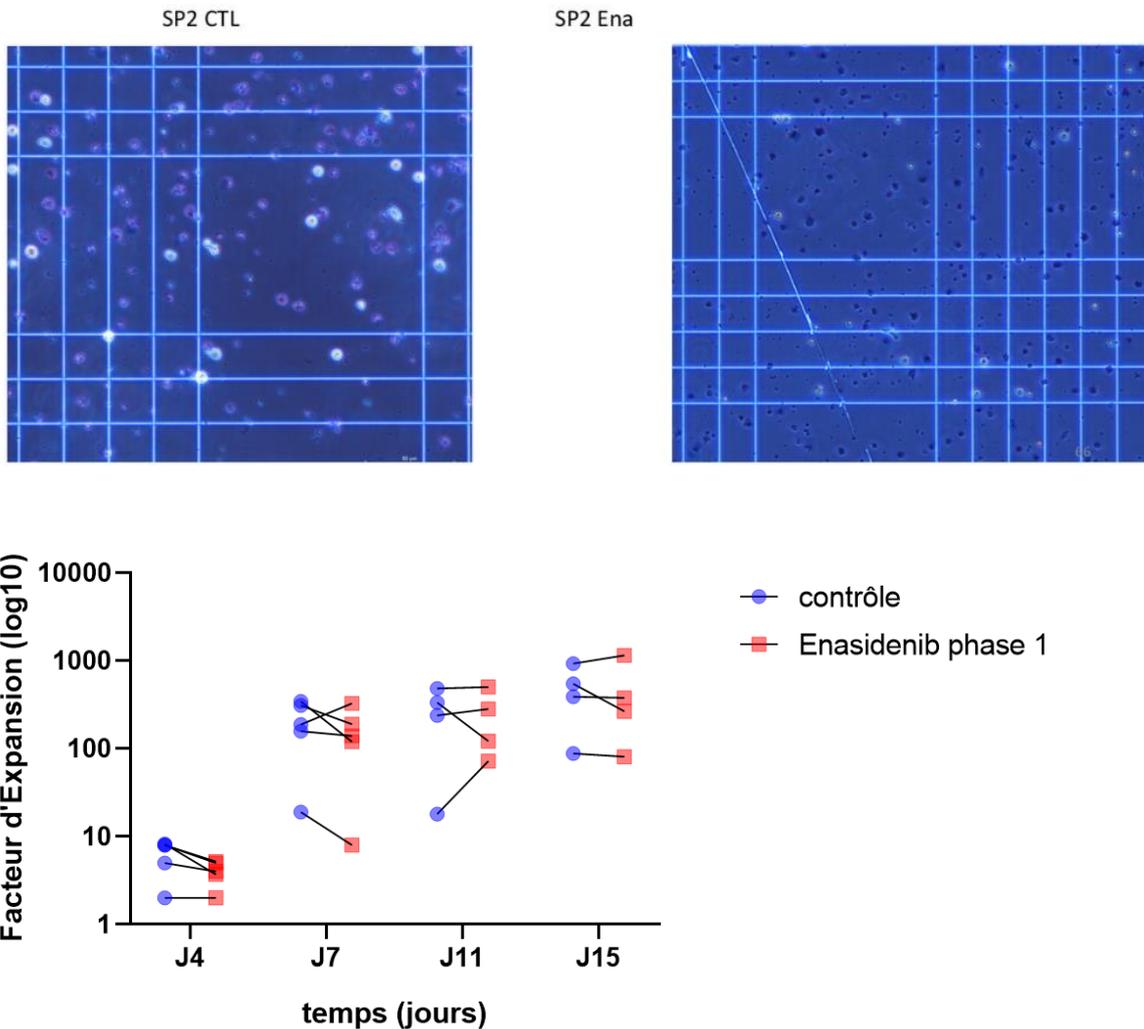


Figure 70. Expansion cellulaire avec le **protocole SP2**. (EF représentés en log10, toutes concentrations initiales C0 et dilutions, n=5). Ces résultats représentent l'analyse de l'ensemble des cultures cellulaires menées **selon le protocole SP2, toutes C0 et dilution** ; C0=10 000 cellules/mL (N=2) , C0=25 000 cellules/mL (N=1) , et C0=50 000 cellules/mL (N=2), ainsi que les 2 facteurs de dilutions réalisés à J4, 1/5ème (N=4) et 2/5ème (N=1), analysés ensemble

D'après l'analyse de ces résultats, nous n'observons aucun effet de la molécule d'énasidenib lors de son ajout avec le protocole SP2. C'est-à-dire que cette molécule ne semble pas augmenter, ni diminuer, la prolifération des cellules CD34+.

En résumé, d'après l'étude de l'expansion cellulaire à travers 3 protocoles de culture in vitro (PC , PL et SP2), nous remarquons que la prolifération érythroïde en condition Ena1 n'est significativement pas amplifiée comparée à celle de la condition témoin. En effet, cette molécule ne semble pas accroître la multiplication des cellules, au contraire, nous observons une différence significative à J4, où l'énasidenib à 10µM **l'expansion cellulaire semble réduite** par rapport au contrôle (retrouvé en PC avec une C0= 10 000 cellules/mL et une

dilution réalisée à J4 de 1/5^{ème}). Cet effet n'est plus significatif lorsque la concentration initiale C0 augmente, probablement en lien avec l'effet de saturation observé dans le milieu de culture. En présence d'un plus grand nombre de cellules en flasque, ces dernières disposent de moins d'espace afin de se diviser de manière appropriée, pouvant ainsi limiter leur capacité à réagir à l'énasidenib.

III.2.2. Etude de l'histoire proliférative, marquage au CFSE

Cette première représentation graphique représente toutes les conditions (CTL, Ena10/20/30) confondues, afin d'avoir une vue d'ensemble de l'effet d'une exposition à une concentration croissante en énasidenib (10, 20, et 30 μ M) ;

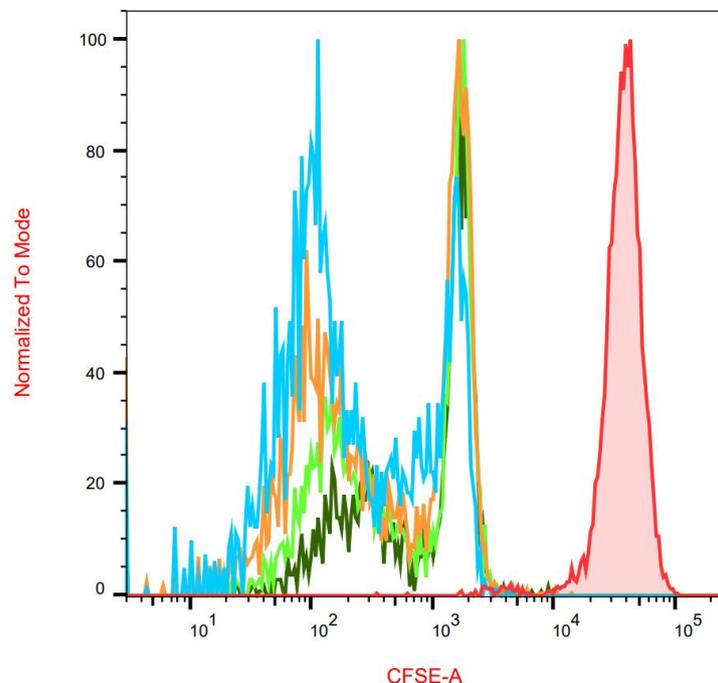


Figure 71. Histoire proliférative suivi en marquage CFSE entre J0 et J4. (PC n=1, Suivi du marquage **CFSE entre J0 et J4, en protocole court**). Toutes les conditions sont représentées ensemble sur cette figure. En bleu ciel, la condition contrôle, en jaune la condition Ena10 μ M, en vert clair la condition Ena20 μ M et en vert foncé la condition Ena30 μ M. En rouge, le J0 commun à toutes les conditions.

Le signal se décale vers la gauche, la condition contrôle en bleu cyan semble plus avancée par rapport aux autres conditions. La hauteur du pic de gauche est plus importante par rapport aux autres. Celle du pic de droite semble diminuée par rapport aux conditions avec exposition, mettant en évidence 2 populations cellulaires, mais qui semble retardée pour les conditions avec exposition au médicament.

Afin d'observer ce phénomène plus précisément, ci-après, les graphiques ont été représenté individuellement afin d'avoir une meilleure compréhension du phénomène observé.

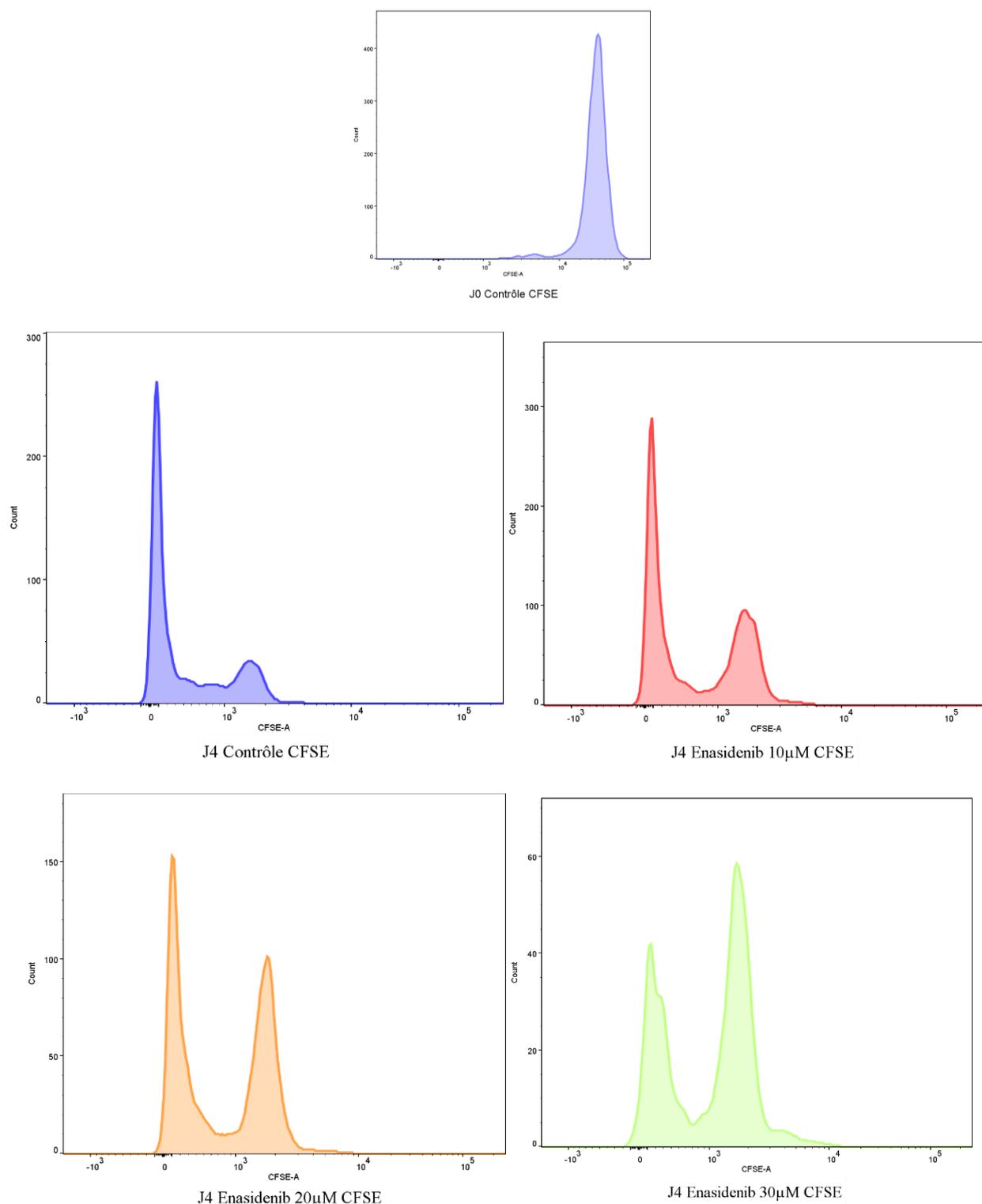


Figure 72. Histoire proliférative suivie en marquage CFSE entre J0 et J4. (PC n=1, Suivi du marquage CFSE entre J0 et J4, avec le protocole court ; Contrôle (bleu) vs Ena10 (rouge) / Ena20 (orange) / Ena30 μ M (vert) ajoutés au cours de la phase 1

Avec les divisions cellulaires, le signal CFSE se décale vers la gauche sur l'axe des abscisses par diminution de la quantité de marqueur par cellule. D'après la figure ci-dessus, T0 réalisé à J0 de la culture, correspond au signal commun à toutes les conditions. Une seconde mesure de la quantité de CFSE contenue dans les cellules érythroïdes a été réalisée à J4 du PC. Nous pouvons observer que la distribution de la courbe représentant la condition contrôle est composée de 2 pics, ou populations cellulaires, reflétant leur état de prolifération à J4. En condition contrôle, la population cellulaire la plus abondante est celle qui a le plus proliféré. En présence d'énasidenib, une diminution de cette fraction cellulaire de faible fluorescence correspondant au plus grand nombre de divisions est observée dès la concentration de 10µM, et avec un effet dose dépendant.

En résumé, ces résultats viennent confirmer les résultats précédents : à savoir que les concentrations de 20 et 30 µM ont un effet très marqué sur les cultures et la concentration d'énasidenib de 10 µM ralentie l'expansion cellulaire, au cours de la première semaine de culture des cellules CD34+ avec le protocole court.

III.3. Etude de l'effet de l'énasidenib sur la différenciation érythroïde

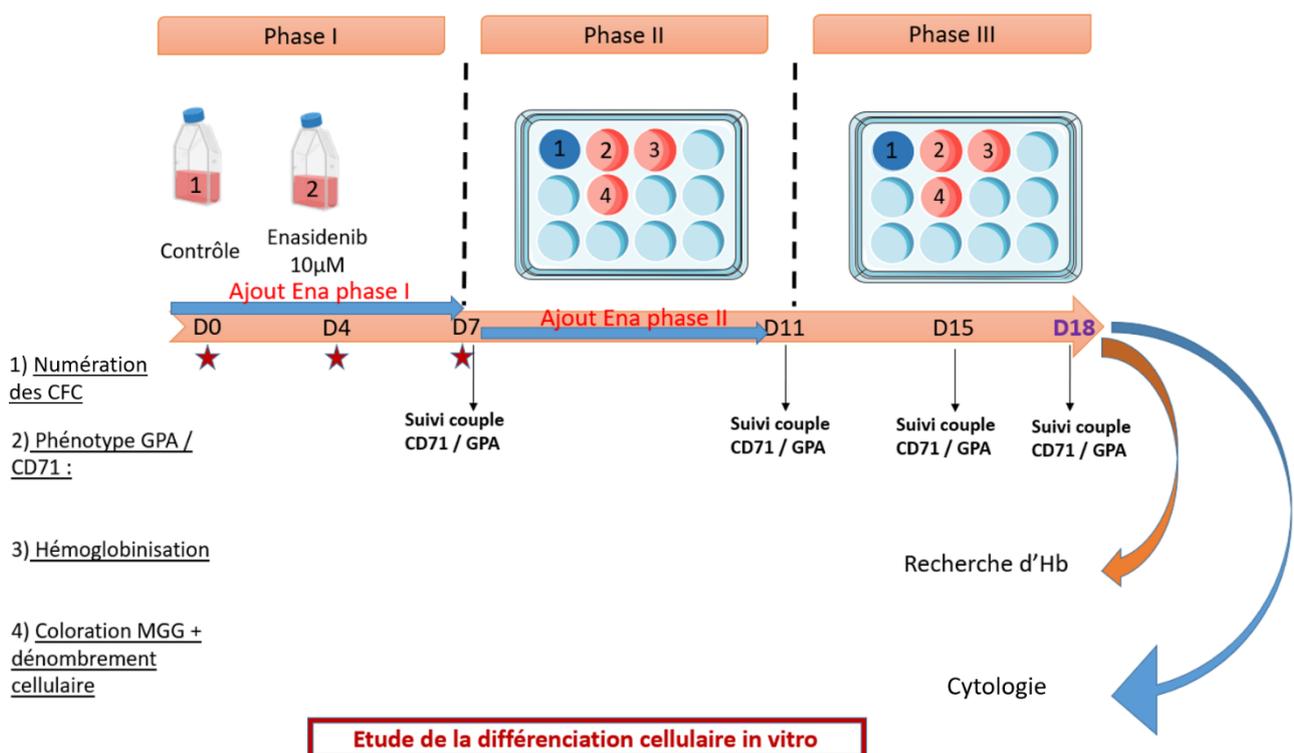


Figure 73. Protocole expérimental d'étude de la différenciation érythroïde

Afin d'étudier la différenciation érythroïde ; l'évolution du couple phénotypique CD71/GPA est analysé par CMF à J7, J11, 15 et J18. La numération des CFC est réalisée à J7 et J14 (représentée par une étoile rouge sur le schéma ci-dessus). La présence d'hémoglobine,

recherchée visuellement, et l'examen cytologiques sont réalisés au dernier jour de la culture (à J18, sur lame préalablement colorée au MGG).

Pour rappel la chronologie de l'expression de ces marqueurs par les cellules au cours de la différenciation érythroïde est la suivante :

CD71 + / GPA - → CD71 + / GPA + → CD71 - / GPA +

III.3.1. Expression du CD71

III.3.1.1. MFI (Mean Fluorescence Intensity) du CD71

a) Avec le protocole court

Avec le protocole court, la MFI CD71 correspondante aux cellules CD71 « high » est représentée avec, les moyennes (+écart-types) représentées en diagramme et le second graphique correspond à la condition représentation en points-reliés de la condition contrôle associée à la condition énasidenib en phase 1 au cours de la manipulation.

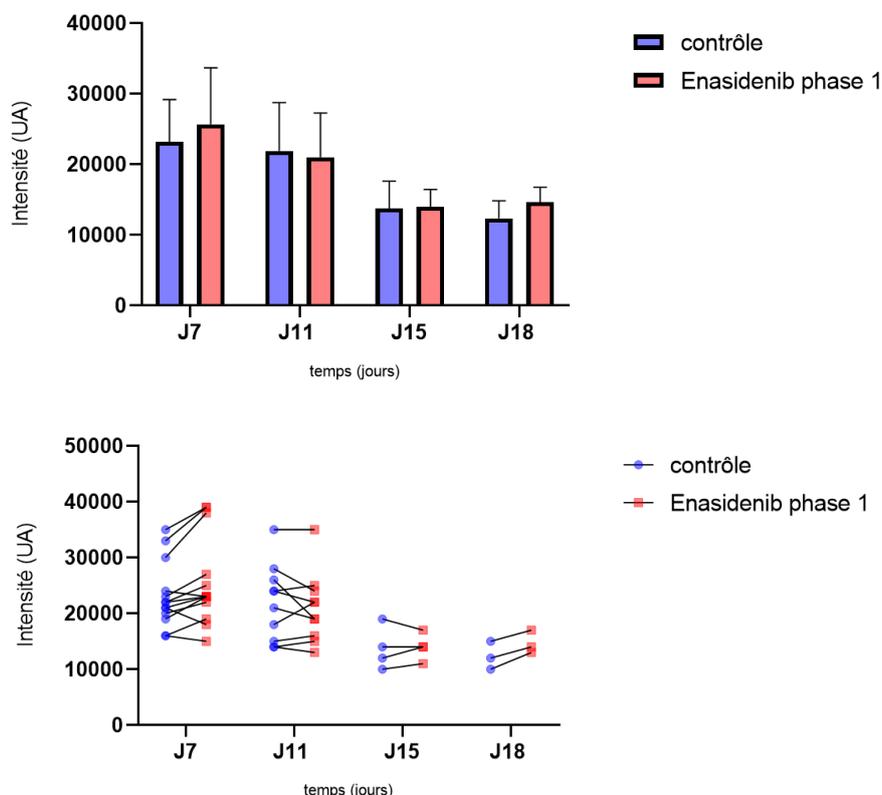


Figure 74. **MFI CD71** en PC (n=13 à J7, n=10 à J11, n=4 à J15 et n=3 à J18. Les séries de manipulations ont des temps de culture différents, certaines ont été interrompues avant la fin théorique du protocole)

Nous observons que l'expression du CD71 semble atteindre un maximum dès J7, et tend ensuite à diminuer pour les 2 conditions. Cependant, malgré le fait que nous observons une certaine tendance, l'exposition à l'énasidenib en phase 1 du PC, n'accroît pas de manière significative la densité des récepteurs à la transferrine présents à la surface des cellules érythroïdes. (effets non-significatifs (ns) avec les tests de Wilcoxon et l'Anova)

b) Avec le protocole SP2

L'étude de la MFI du CD71, avec le protocole SP2, permet d'observer les résultats suivants :

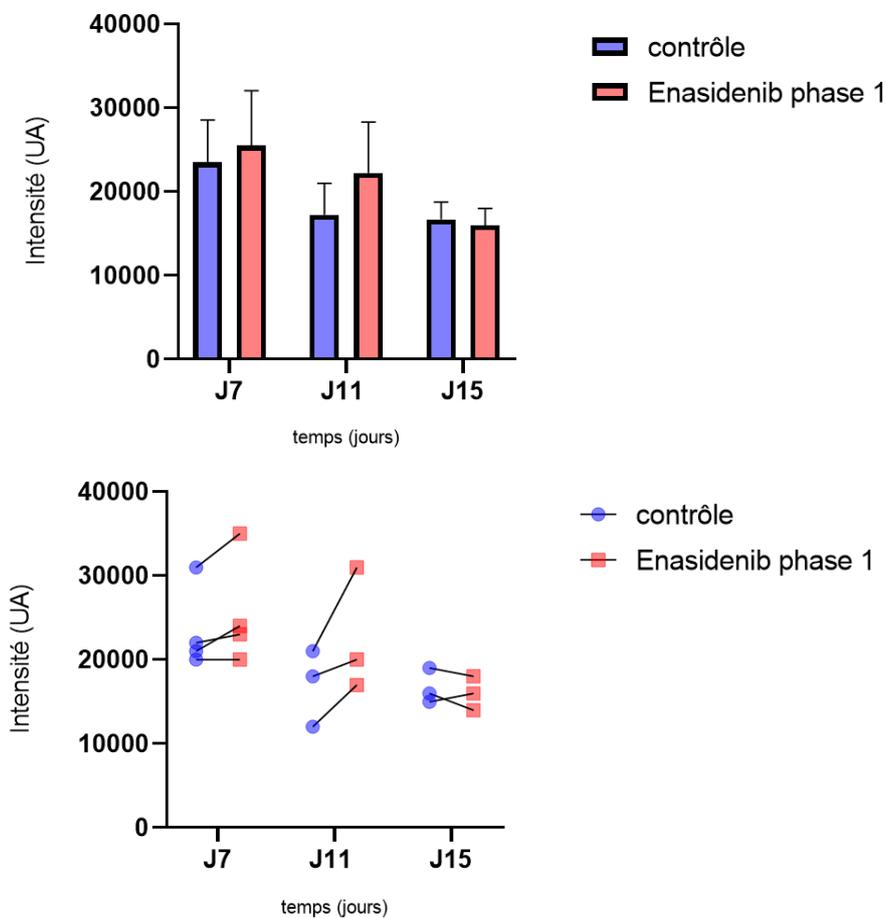


Figure 75. MFI CD71 en SP2 (n=4 à J7, n=3 à J11 et à J15. Une série de manipulations a été interrompue à J7)

Avec le protocole SP2, lorsque les cellules sont exposées au médicament au cours de la première semaine de culture, la Mean CD71 pour la condition Ena1 semble être accrue par rapport au contrôle, correspondant à une densité de récepteurs à la transferrine amplifiée. Cependant, cette tendance n'est statistiquement pas significative, au regard des tests de Wilcoxon et l'Anova.

c) Avec le protocole long

L'étude de la MFI du CD71, avec le protocole long, permet d'observer les résultats suivants :

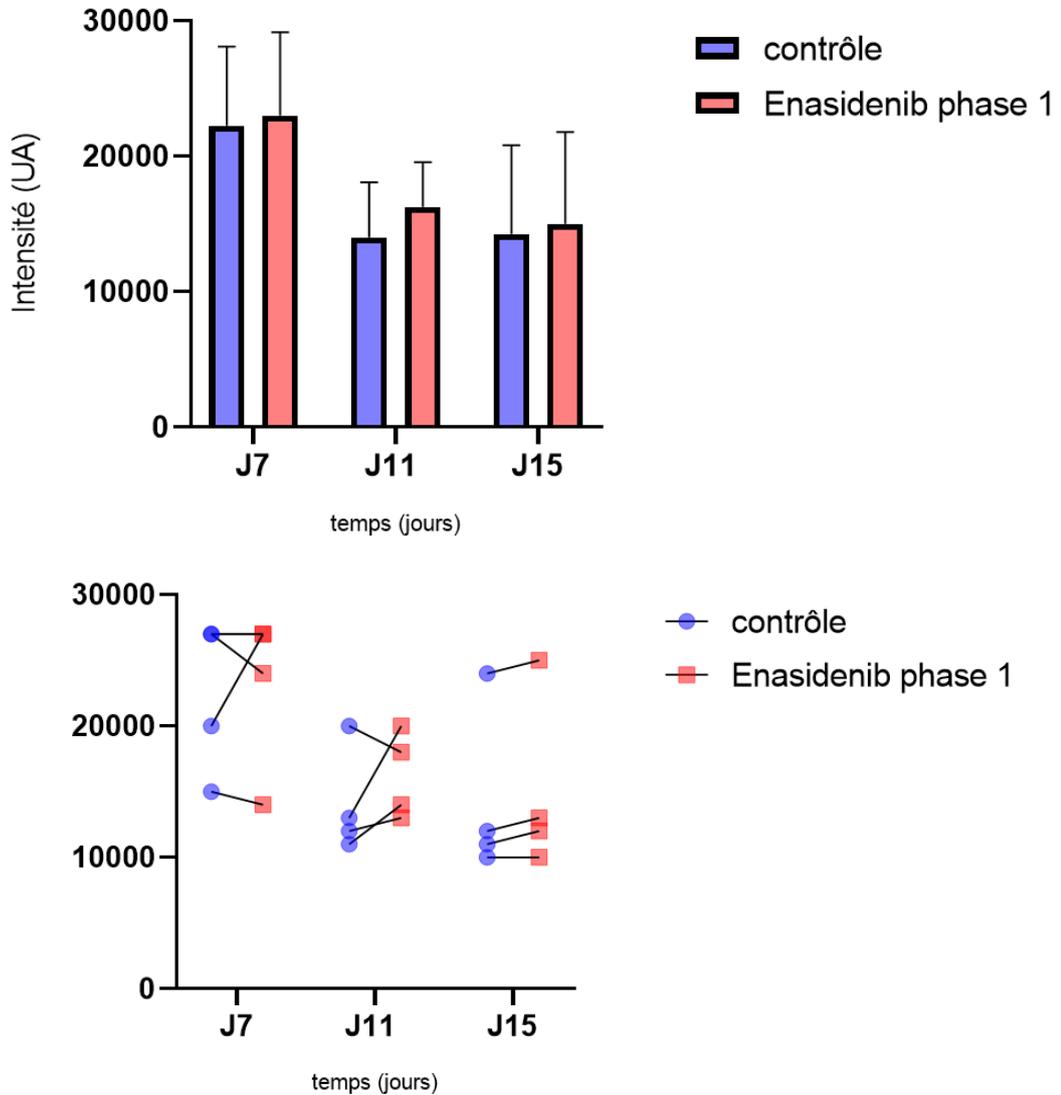


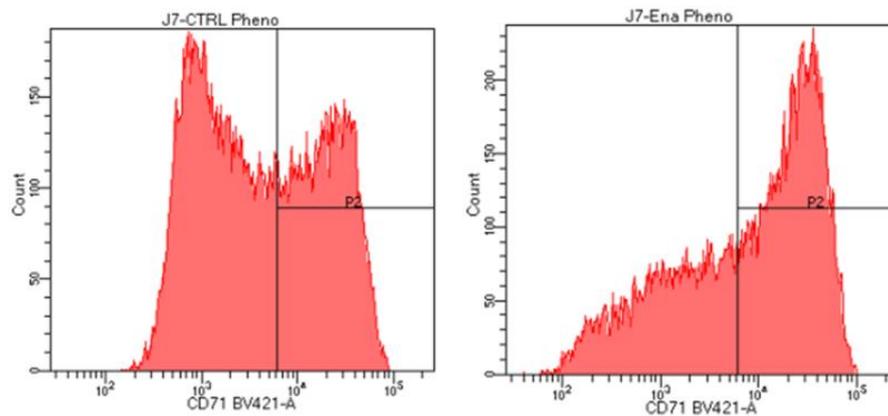
Figure 76. MFI CD71 en PL. en abscisse le temps en jours et en ordonnée l'intensité d'expression en UA (N=4, n=2 C0=50 000 cellules/mL, n=1 C0=25 000cellules/mL et n=1 C0=10 000cellules/mL)

Pour les cultures selon le protocole long, on ne note pas de différence significative, mais cette conclusion est certainement fragile du fait du nombre d'expérimentations.

III.3.1.2. Pourcentage de cellules exprimant fortement le CD71 (CD71 « high »)

a) Avec le protocole court

Pour la condition **C0= 10 000 cellules/mL** et un facteur de dilution à J4 de **1/5^{ème}**, nous observons l'évolution de la quantité de cellules exprimant fortement le marqueur CD71 (une expression d'intensité environ égale à 6×10^3 du marqueur CD71, sur l'axe des abscisses, caractérise une cellule CD71 « high ») :



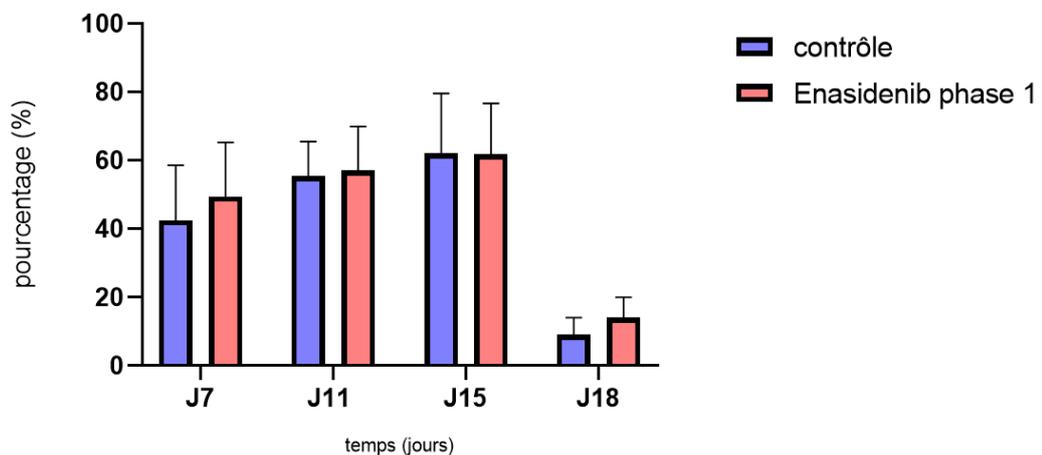
- % cellules CD71 « high » à J7 :

CTL = 41 %

Ena1 = 62 %

Figure 77. pourcentage des cellules exprimant fortement le CD71 en condition contrôle vs Ena1 selon le protocole court

D'après les résultats du cytomètre, nous observons un pourcentage de cellules CD71 « high » à 62% pour la condition Ena1 vs 41% pour le contrôle.



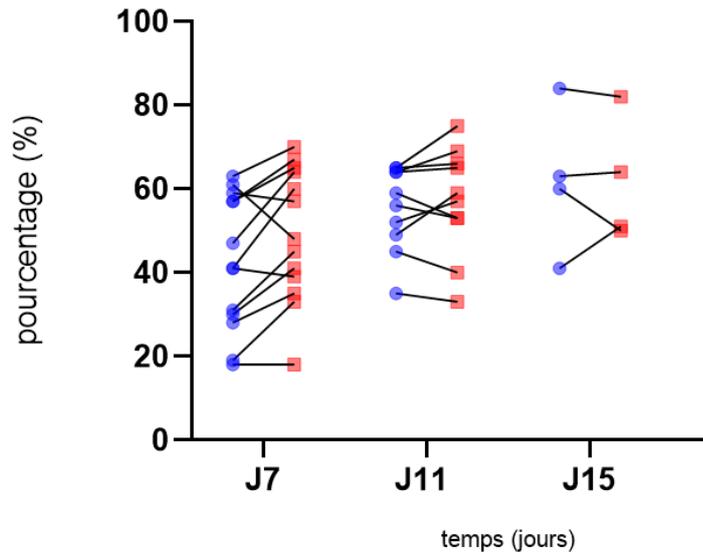
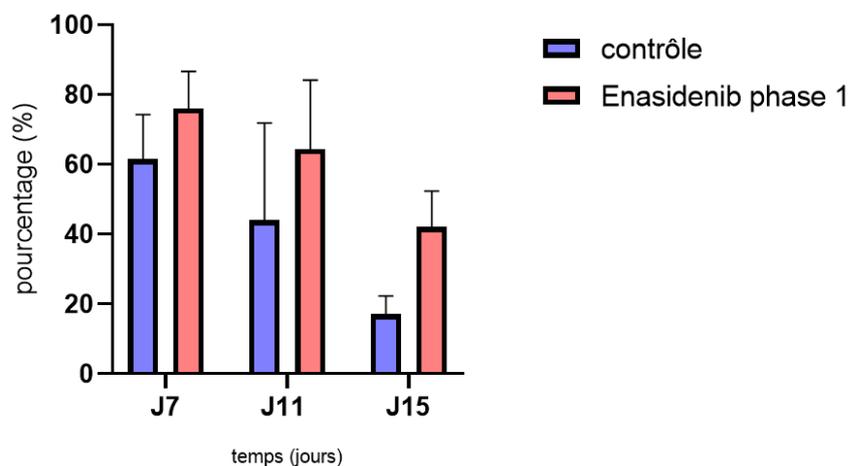


Figure 78. % de cellules CD71 "high" en PC (N=12, toutes C0 et dilution 1/5ème à J4. n=10 à J7, n=9 à J11 et n=4 à J15, certaines séries de manipulations ont été interrompues à J7 et d'autres à J11)

Pour les 2 conditions nous observons un accroissement du pourcentage de cellules érythroïdes CD71 « high » jusqu'à J15. En revanche, avec le protocole court, l'exposition des cellules à l'énasidenib, au cours de la première semaine de culture, n'augmente pas de manière significative le pourcentage de cellules exprimant fortement le récepteur à la transferrine. (ns)

b) Avec le protocole SP2

D'après les résultats de la figure précédente, nous remarquons un % de cellules CD71 « high » à 70% avec la condition Ena1 vs 51% avec la condition contrôle. Les valeurs semblent plus importantes avec ce protocole SP2 comparé au PC.



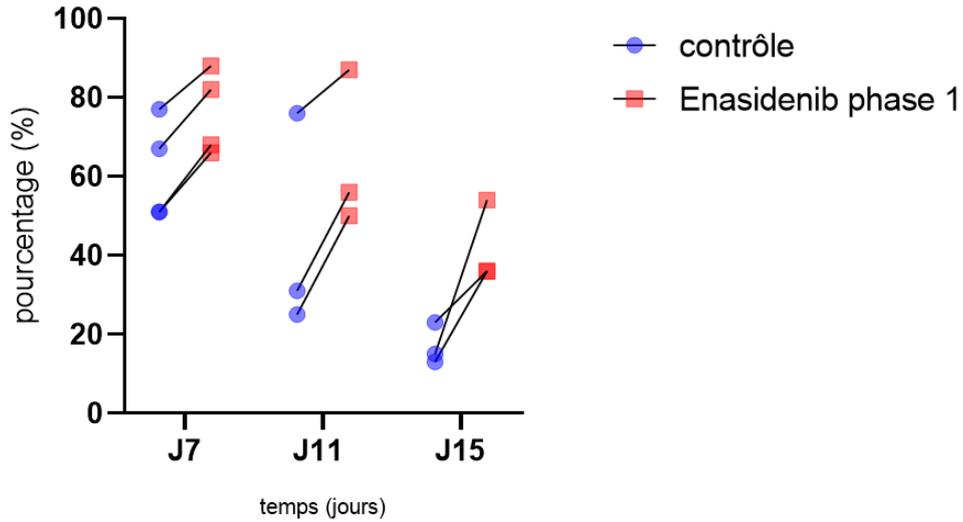
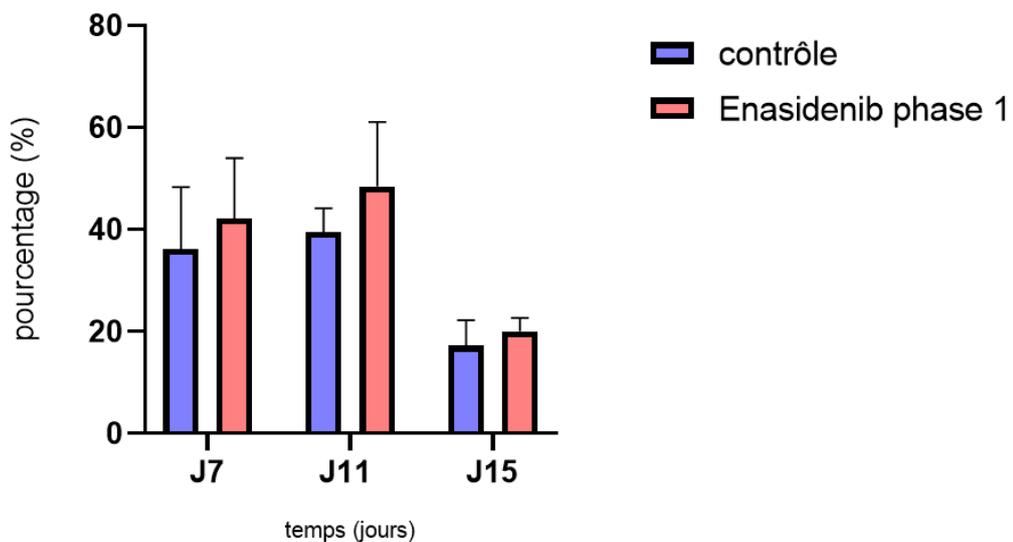


Figure 79. %CD71 « high » avec le protocole SP2 (n=4 à J7, n=3 à J11 et J15)

D'après ces résultats, l'exposition à la molécule d'énasidenib en phase 1, avec le protocole SP2 n'augmente significativement pas la proportion de cellules exprimant fortement le récepteur à la transferrine à J7. (p-value à J11 test de Bonferroni = 0,1)

Cependant, nous observons un effet plus prononcé avec ce protocole SP2 par rapport au protocole court. En effet, le % de cellules CD71 high à J7 est plus élevé par rapport au PC, mais la MFI est équivalente, voire plus faible, notamment à J11. Cette effet pourrait être attribuée à une différenciation érythroïde accélérée avec le supplément.

c) Avec le protocole long



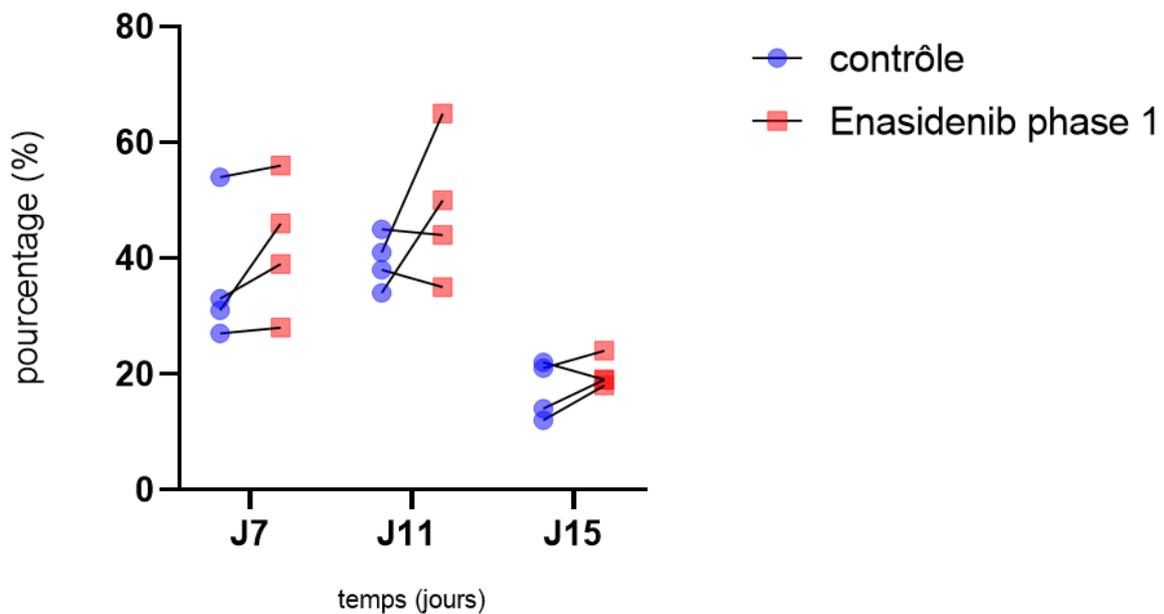


Figure 80. **pourcentage de cellules érythroïdes CD71 « high »** avec PL (N=4, n=2 C0=50 000 cellules/mL, n=1 C0=25 000cellules/mL et n=1 C0=10 000cellules/mL)

Avec le protocole long, bien qu'il semble se dégager une tendance allant dans le sens d'un accroissement, l'ajout de la molécule d'énasidenib au cours de la première semaine de culture n'augmente significativement pas le % de cellules érythroïdes CD71 « high ».

En résumé, exposer les cellules érythroïdes à l'énasidenib semble accroître l'intensité d'expression du CD71, les cellules exprimeraient davantage de récepteurs CD71 à la surface membranaire (ou plus intensément). La molécule semble ainsi accélérer l'acquisition du récepteur à la transferrine. (effet ns)

III.3.2. Evolution du phénotype CD71/GPA

III.3.2.1. Evolution des Couples (CD71+/ GPA-) et (CD71+/GPA+) (low, mid, high)

a) Avec le protocole court

- Ena1 vs Contrôle : C0=10 000 cellules / mL et dilution à J4 2/5^{ème}

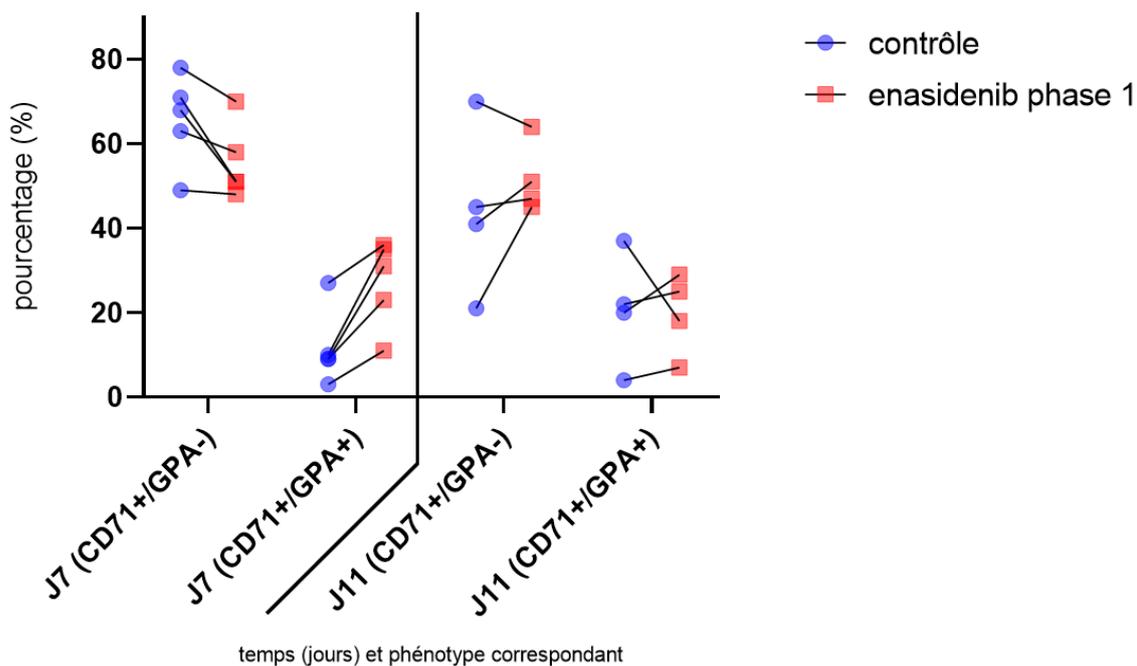


Figure 81. % de cellules (CD71+/GPA-) et (CD71+/GPA+), à J7 et J11 avec le PC C0 = 10000 cellules/mL et dilution J4 = 2/5ème (n=5 à J7, n=4 à J11)

Avec le protocole court, l'acquisition du phénotype CD71+/GPA+ semble être accélérée lorsque les cellules érythroïdes sont exposées à l'énasidenib au cours de la première semaine de culture. En effet, nous remarquons qu'à J7 le % de cellules CD71+/GPA+ est plus important en condition Ena1 par rapport au contrôle. Cependant, les 2 tests statistiques n'ont pas permis de mettre en évidence un effet significatif de la molécule sur cette différenciation érythroïde.

Le pourcentage de cellules érythroïdes CD71-/GPA+, stade mature terminal, est encore négligeable à J7 et J11. Ainsi que les cellules CD71-/GPA- (de l'ordre de 0%)

- Ena1 vs Contrôle : C0=10 000 cellules / mL et dilution J4 1/5ème :

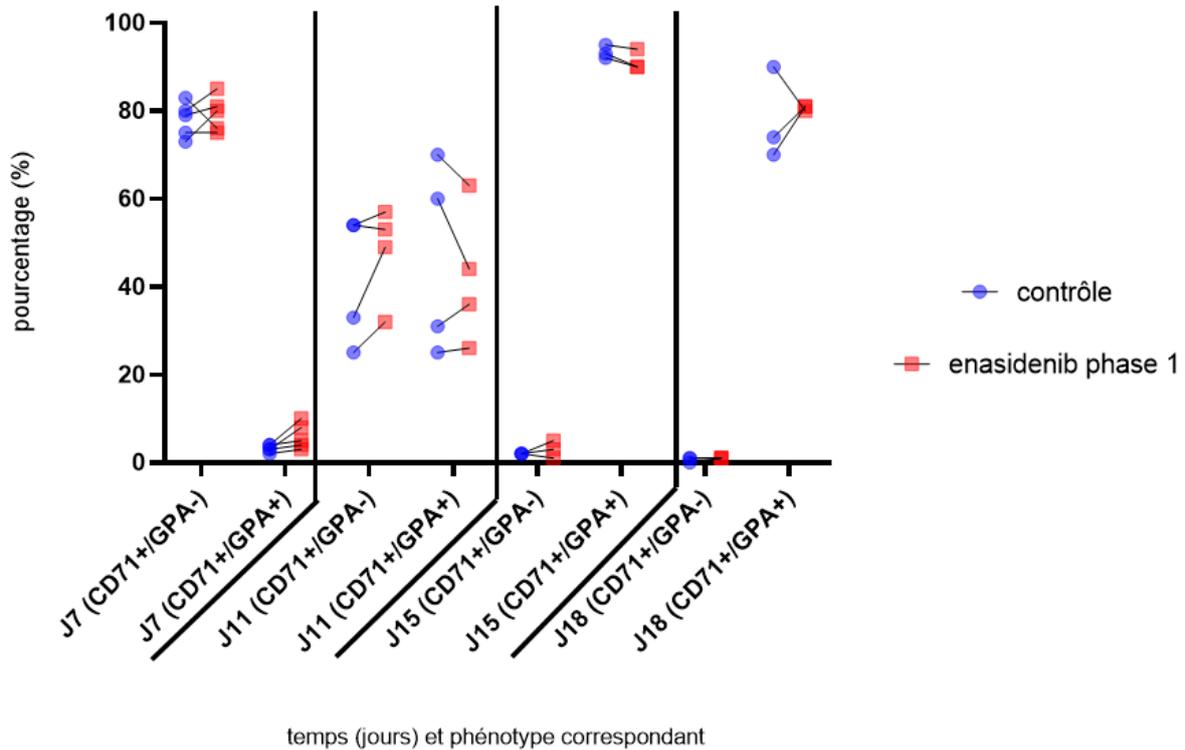
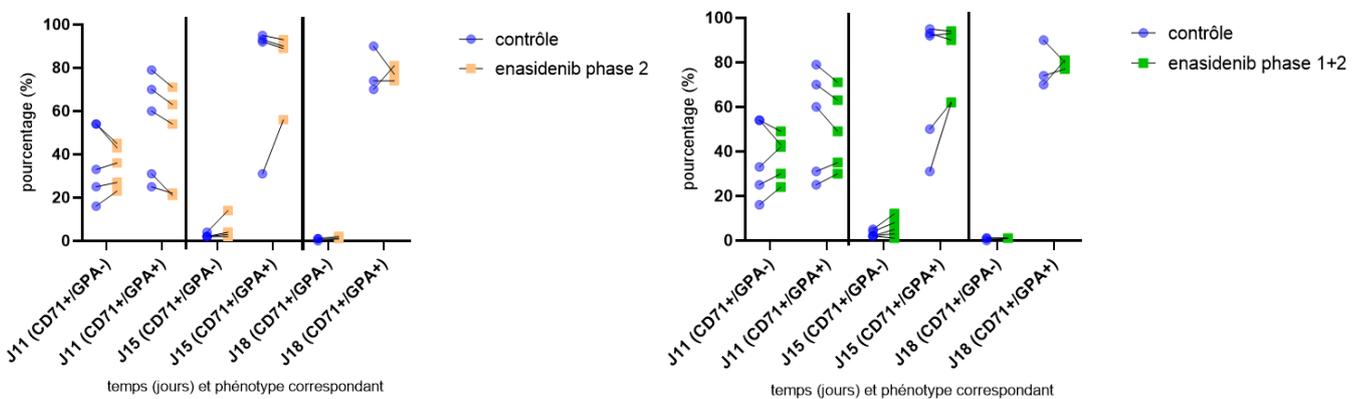


Figure 82. % de cellules (CD71+/GPA-) et (CD71+/GPA+), à J7, J11, J15 et J18 avec le PC C0 = 10 000 cellules / mL et dilution J4 = 1/5^{ème} (n=5 à J7, n=4 à J11 et J15 et n=3 à J18)

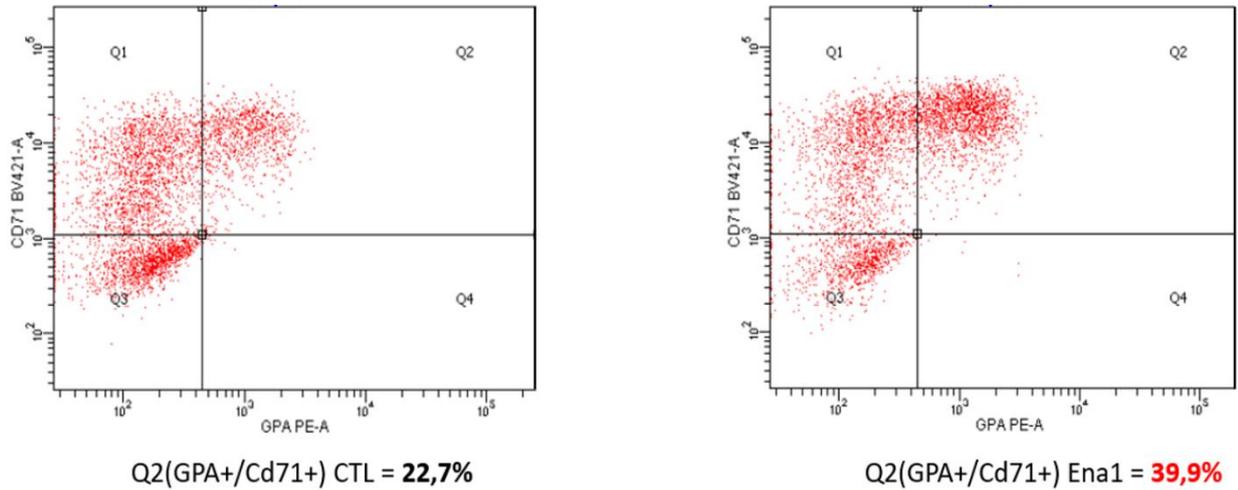
Nous remarquons que les cultures les plus diluées (1/5^{ème}) et qui ont donc le plus poussé sont celles qui sont les plus engagées : % de CD71 plus élevé, et à J11 acquisition de la GPA avec 100% de CD71+/GPA+ à J15. Pour C0 = 10 000 cellules / mL et une dilution réalisée à J4 de 1/5^{ème}, l'énasidenib n'accélère significativement pas la différenciation érythroïde (test de Wilcoxon). Il semble cependant se dégager une tendance allant dans le sens d'une augmentation du % de cellules (CD71+/GPA+) à J7, comme si l'énasidenib stimulation l'acquisition de la GPA également.

○ Conditions Ena en phase 2, et Ena en phase 1+2 :



On observe l'expression de la GPA qui s'intensifie au cours du temps. Lorsque la molécule est ajoutée au cours de la première semaine de culture, il semblerait que l'acquisition du phénotype CD71+/ GPA+ soit accélérée, avec un effet plus prononcé à J7.

b) Avec le PL



A J11 du PL, nous pouvons remarquer une proportion plus importante de cellules GPA+/CD71+ (cadran supérieur droit) en condition Ena1 par rapport au contrôle.

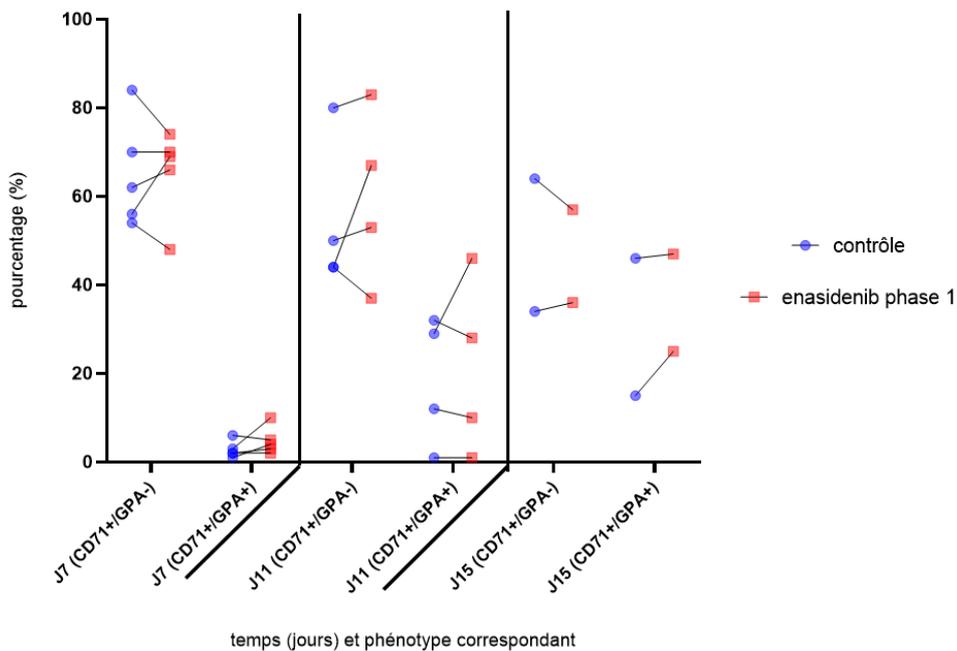


Figure 83. % de cellules (CD71+/GPA-) et (CD71+/GPA+) à J7 et J11 avec le protocole long (n=5 à J7, n=4 à J11 et n=3 à J15, toutes C0 et dilutions)

En PL, l'acquisition du phénotype CD71+/GPA+ n'est significativement pas accélérée lors de l'ajout de l'énasidenib en phase 1. (p-value test de Wilcoxon = 0,15)

c) Avec le protocole SP2

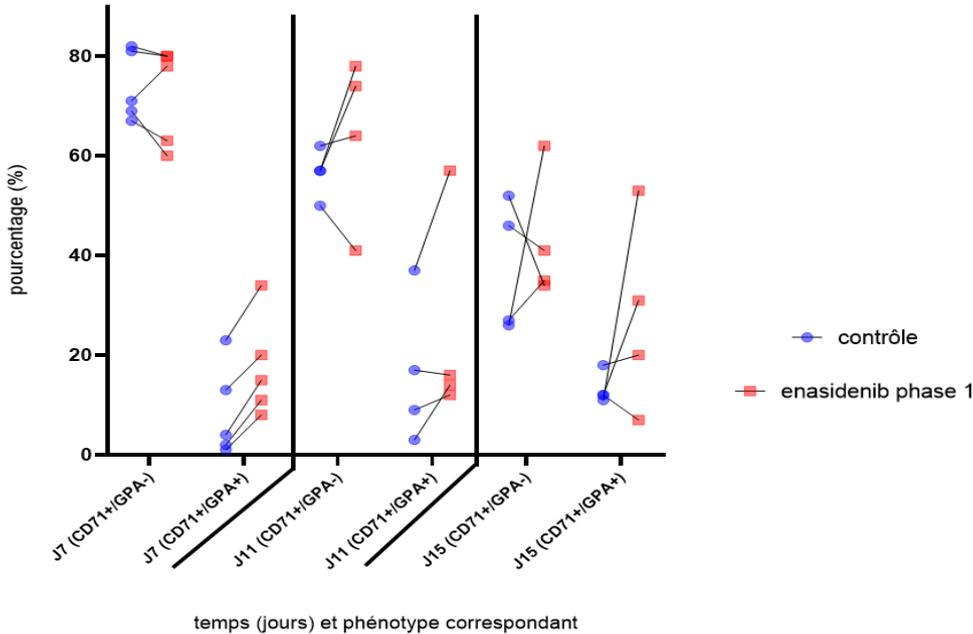
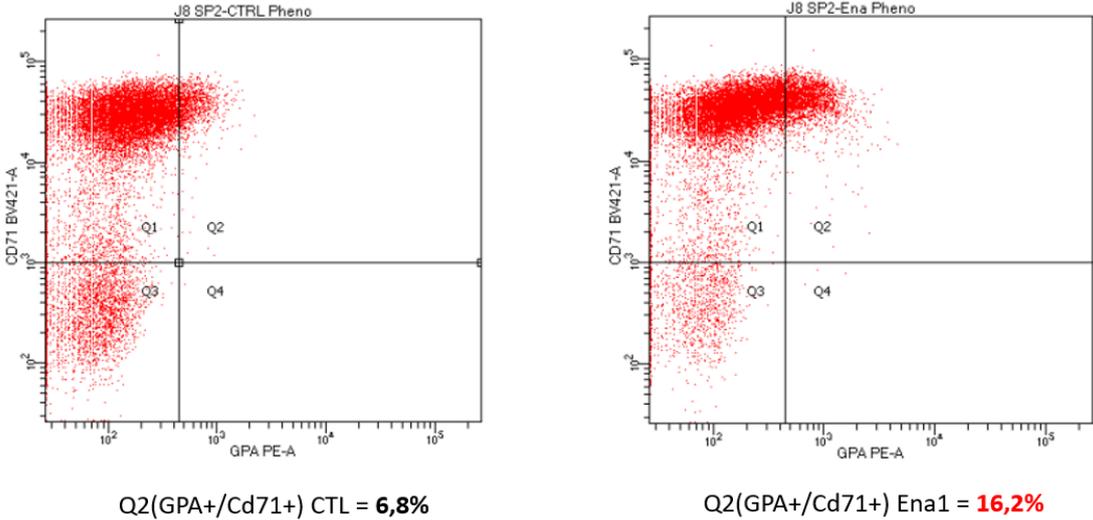


Figure 84. %(CD71+/GPA-) et %(CD71+/GPA+) à J7 et J11 avec le protocole SP2 (n=5 à J7 et n=4 à J11 et J15, toutes C0 et dilutions)

Avec le protocole SP2, à J7 et J11, la différence entre le contrôle et la condition Ena1 est très proche de la significativité malgré le faible effectif pour l'acquisition du phénotype CD71+/GPA+ (p-value = 0,06 avec le test de Wilcoxon)

III.3.2.2. Couple CD71-/GPA+

Ce couple phénotypique est traité à part car cela engendrerait beaucoup d'informations sur les graphiques, rendant les figures illisibles. De plus, seul le protocole court a permis d'étudier en détail l'évolution à J18.

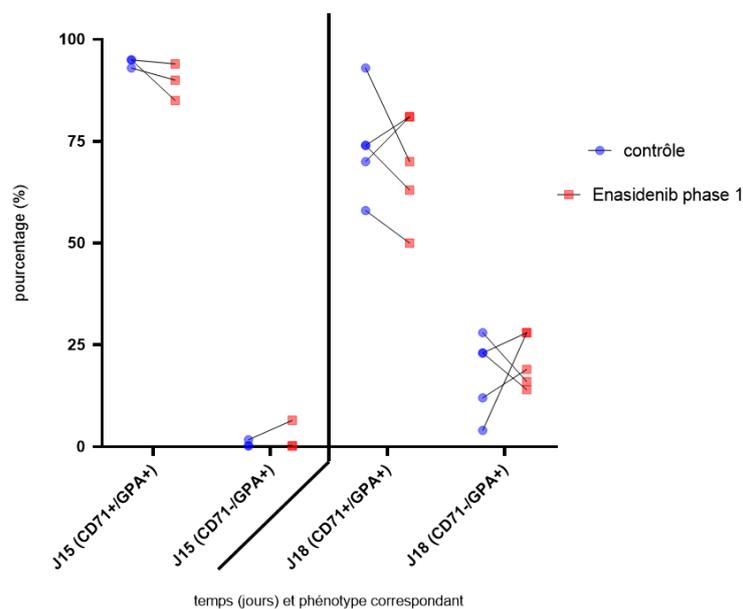


Figure 85. évolution du phénotype (CD71-/GPA+) à J15 et J18 en PC (n=5, C0=10 000/mL et dilution 1/5))

D'après ces résultats la molécule d'énasidenib ne permet pas d'accélérer significativement l'acquisition du phénotype mature final CD71-/GPA+.

III.3.3. Différenciation érythroïde en fonction de la prolifération cellulaire associée

Dans un dernier temps, nous avons souhaités comparer entre les protocoles, via les résultats précédents, la quantité totale de cellules différenciées. Pour ce faire, ce paramètre est calculé à partir du pourcentage de cellules CD71+/GPA+ et de la quantité de cellules à J7, J11, J15 et J18. Ce phénotype est le plus représenté au cours des protocoles (en comparaison avec le phénotype terminal CD71- qui est absent de la plupart des manipulations jusqu'à J15) et correspondant à une maturation intermédiaire.

a) Avec le protocole court

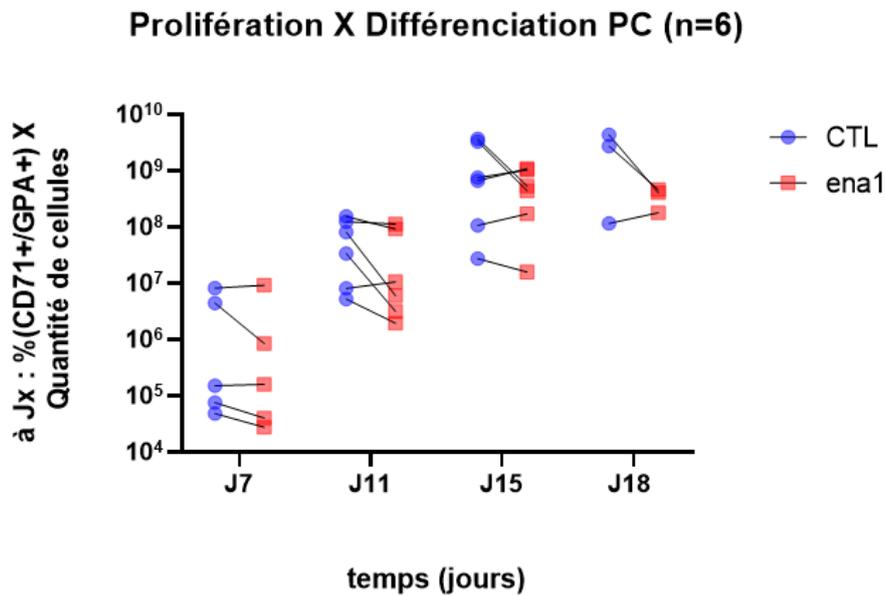


Figure 87. Nombre de cellules CD71+ GPA+

Avec le PC, la différenciation érythroïde en fonction de la prolifération cellulaire associée n'est significativement pas inférieure à la condition contrôle. Cela signifie qu'une prolifération moins importante en condition Ena1 par rapport au CTL, s'accompagne d'une plus grande différenciation des cellules érythroïdes.

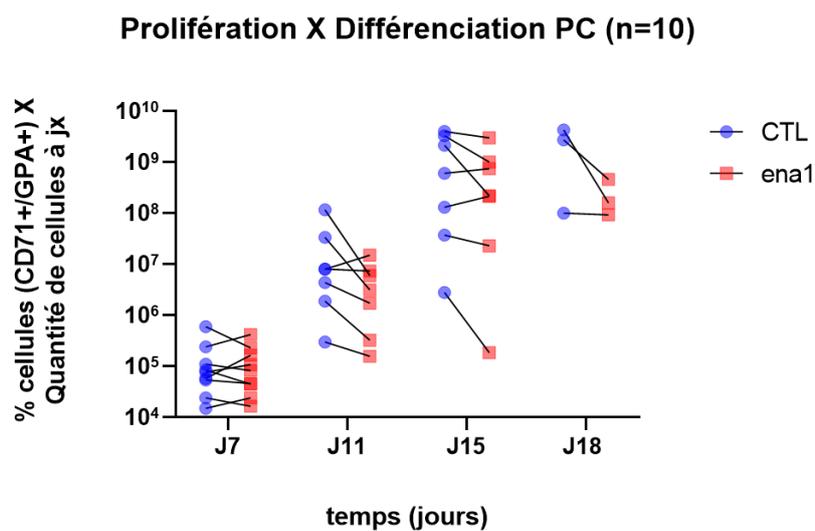


Figure 88. Nombre de cellules CD71+ GPA+ avec le PC ((n=10) toutes conditions confondues (C0 et facteurs de dilution))

b) Avec le protocole long

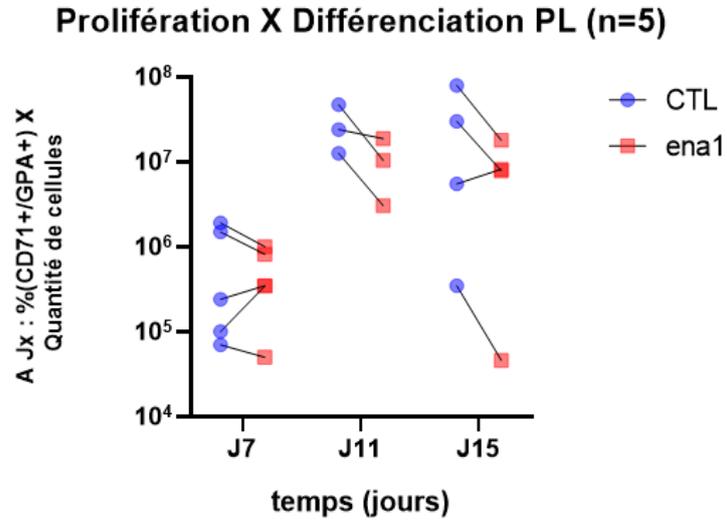


Figure 89. Nombre de cellules CD71+ GPA+ en PL

En PL, le nombre de cellules CD71+ GPA+ n'est significativement pas augmentée en condition Ena1 par rapport au CTL.

c) Avec le protocole SP2

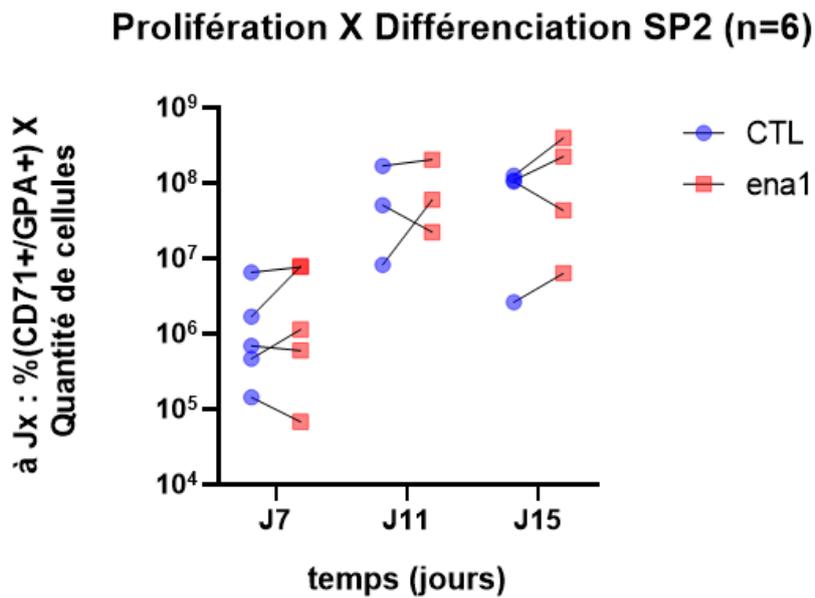


Figure 90. Nombre de cellules CD71+ GPA+ (protocole SP2)

Avec le protocole SP2, le Nombre de cellules CD71+ GPA+ n'est significativement pas augmentée en condition Ena1 comparé au contrôle.

III.3.4. Etude du potentiel clonogénique

III.3.4.1. Numération des BFU-E

a) Avec le procotole court

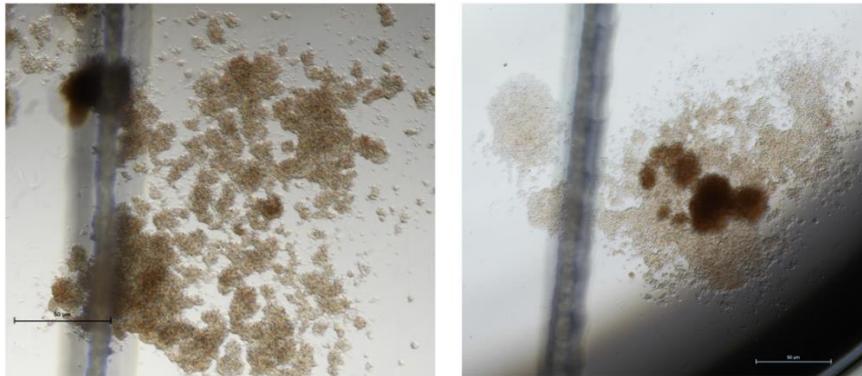


Figure 91. BFU-E à J4 avec le PC, conditions contrôle (gauche) et Ena1 (droite)

Sur gélose H4034, la numération des BFU-E est réalisée quatorze jours après l'ensemencement cellulaire (à J4 et J7 de la culture).

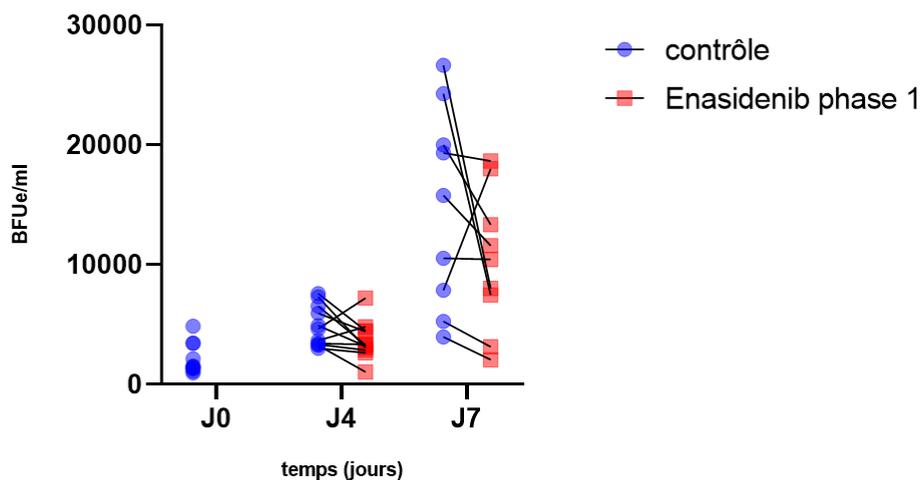


Figure 92. **BFU-E/ml avec le protocole court.** Les résultats sont obtenus pour C0=10 000 cellules/mL (N=11) et pour les 2 facteurs de dilutions réalisés à J4, 1/5ème (N=6) et 2/5ème (N=5). La lecture est effectuée 14 jours après ensemencement

Avec le PC, la molécule d'énasidenib ne diminue significativement pas la quantité de BFUe au cours du temps (p-value=0,1 à J7 avec le test de Bonferroni), une tendance se dégage dans ce sens.

b) Avec le protocole long

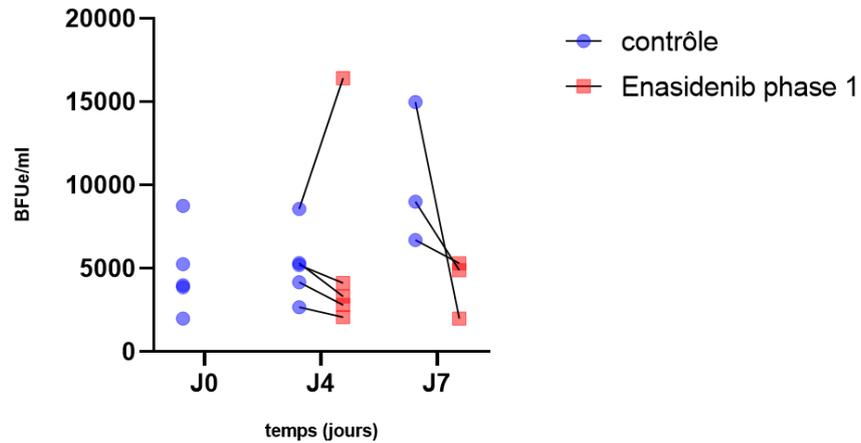


Figure 93. **BFU-E/ml avec le protocole long.** (N=5, C0=10 000 cellules/mL n=2, C0=25 000 cellules/mL n=1, et C0=50 000 cellules/ mL n=2)

La molécule d'énasidenib ne diminue significativement pas la quantité de BFU-E avec le protocole long, (p-value = 0,2 à J7 avec le test de Bonferroni) même si on peut noter une tendance dans ce sens.

c) Avec le protocole SP2

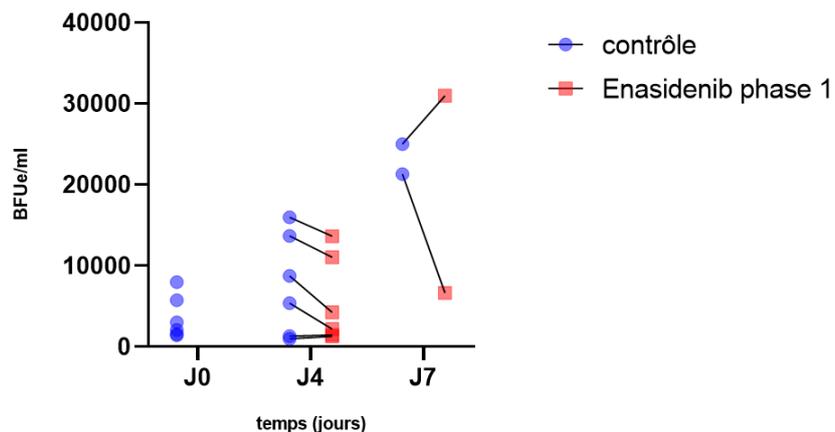


Figure 94. BFUe/mL avec le protocole SP2 (N=7, C0=10 000 cellules/mL n=4, C0=25 000 cellules/mL n=1, et C0=50 000 cellules/ mL n=2)

En protocole SP2, malgré des perdus de vue, nous n'avons pas réussi à démontrer que l'énasidenib diminuait significativement le nombre de BFUe par rapport à la condition contrôle.

III.3.4.2. Numération des CFU-E

Sur gélose H4330, la numération des CFU-E est réalisée sept jours après l'ensemencement cellulaire (à J4 et J7 de la culture cellulaire). Cette gélose contient l'EPO afin d'assurer uniquement la croissance des CFU-E, les progéniteurs les plus tardifs.

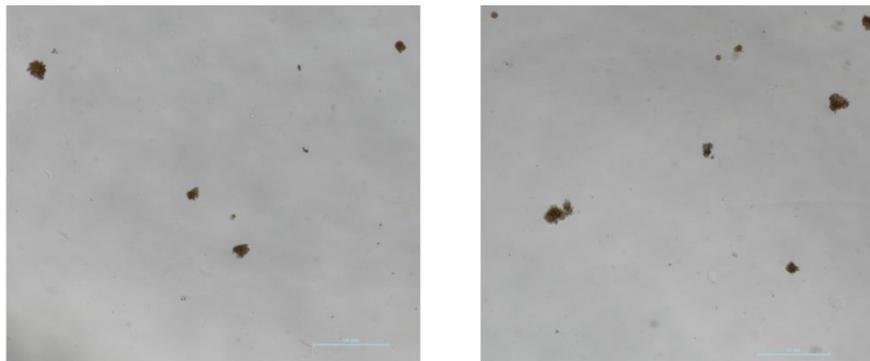


Figure 95. CFU-E au microscope (Gx200) en condition contrôle (gauche) et Ena1 (droite) en PC

a) Avec le protocole court

En PC, la lecture à J7 des CFU-E a été effectuée en parallèle de la numération des BFU-E, permettant d'obtenir les résultats suivants :

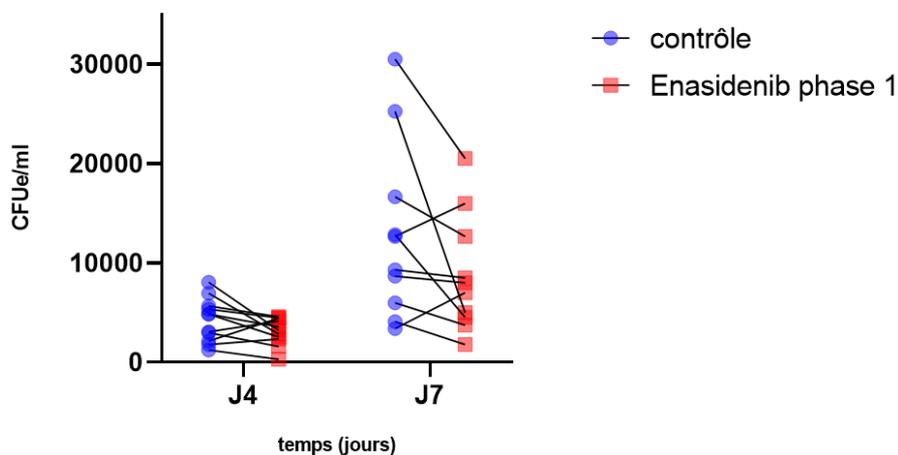


Figure 96. CFU-E/ml avec le protocole court. (N=10) C0=10 000 cellules / mL et pour les 2 facteurs de dilutions réalisés à J4, 1/5ème (N=6) et 2/5ème (N=4). La lecture est effectuée 7 jours après ensemencement

Bien qu'il semble se dégager une tendance allant dans le sens d'une atténuation, avec le PC, l'énasidenib ne diminue significativement pas le nombre de CFUe. (p-value = 0,18 à J7 avec le test de Bonferroni)

b) Avec le protocole long

Avec le PL, la lecture à J7 des CFU-E a été réalisée sur cultures indépendantes et a permis d'obtenir les résultats suivants :

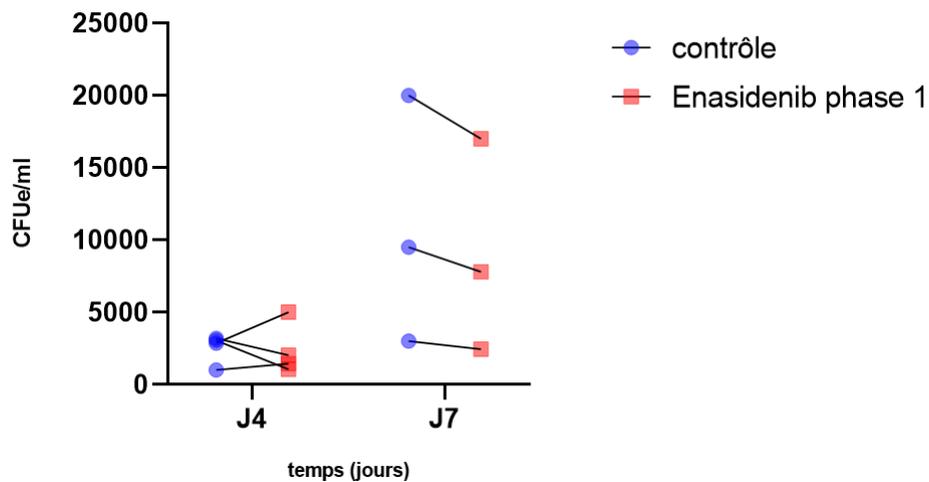


Figure 97. CFU-E/ml avec le protocole long (N=4, CFU-E/ml, toutes concentrations et dilutions)

Avec le protocole long, l'énasidenib ne diminue significativement pas la quantité de CFUe comparé à la condition contrôle.

c) Avec le protocole SP2

En protocole SP2, la lecture à J7 des CFU-E, réalisées sur cultures indépendantes et a permis d'obtenir les résultats suivants :

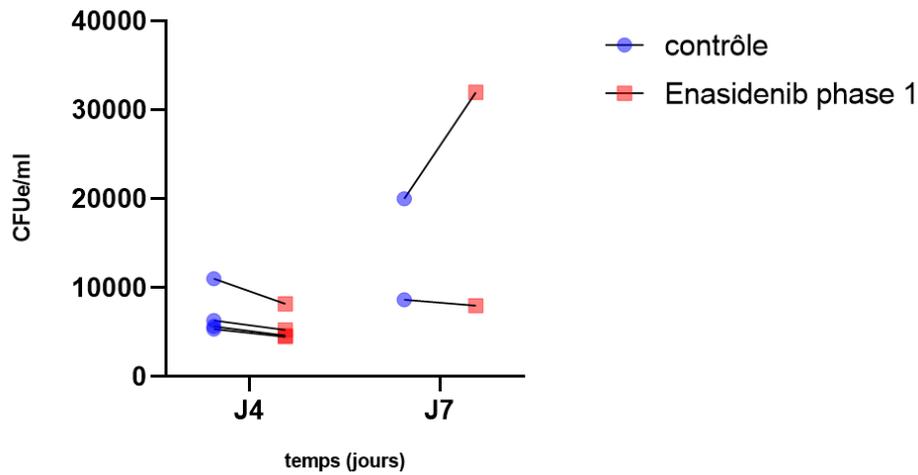


Figure 98. CFUe/mL avec le protocole SP2 (N=4, C0=10 000 cellules/mL n=2, C0=25 000 cellules/mL n=1, et C0=50 000 cellules/ mL n=1)

Avec le protocole SP2, l'énasidenib ne diminue significativement pas la quantité de CFUe comparé au contrôle.

III.3.5. Hémoglobinisation

La présence d'hémoglobine (Hb) a été recherchée visuellement au quinzième jour de culture, avec les différents protocoles : en PC (n=3), en PL (n=1) et avec le protocole SP2 (n=1) :

3 millions de cellules ont été prélevées par conditions. Après centrifugation (10min à 14G, à 16°C), nous observons la présence d'un culot rougeâtre au fond des cônes et retrouvé pour toutes les conditions ; CTL, Ena1, Ena2 et Ena12.

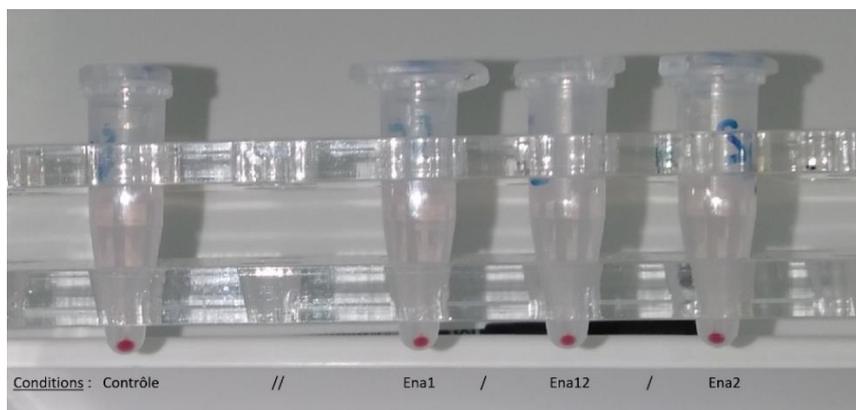


Figure 99. **Culots cellulaires mettant en évidence l'hémoglobine** à J15 du PC. (N=3) les 4 conditions sont représentées (CTL/Ena1/Ena12/Ena2)

Avec le protocole court, la molécule d'énasidenib n'empêche donc pas la production d'hémoglobine par les cellules érythroïdes. Pour les conditions Ena1, Ena2 et Ena12, l'ajout de la molécule à différents temps ne semble pas inhiber le processus d'hémoglobinisation au sein de la lignée érythroïde. Néanmoins, une analyse plus fine nécessiterait des dosages quantitatifs qui seraient plus précis et une étude approfondie de la constitution de l'Hb. Ces résultats sont à mettre en relation avec l'examen cytologique des cellules en culture (ci-après).

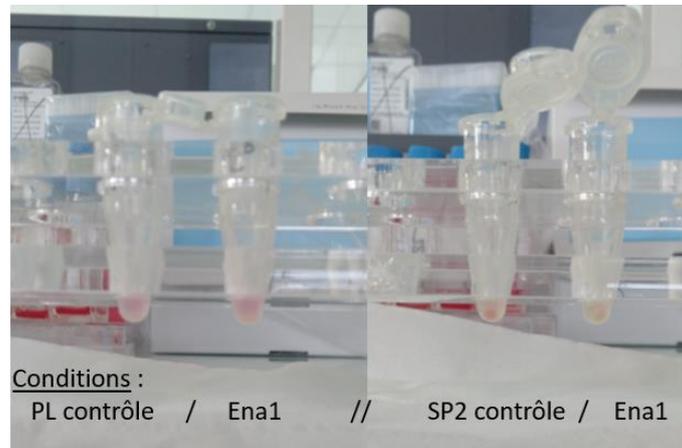


Figure 100. Culots érythrocytaire en PL vs SP2 à J15 (n=1)

Nous remarquons qu'en PL la formation d'Hb n'a pas encore eu lieu à J15, étape encore trop précoce dans le cadre de ce protocole. En revanche avec le protocole SP2, nous distinguons des culots rouges dans les deux conditions Ena1 et CTL. Les milieux de culture SP2 et PC sont alors à favoriser afin d'obtenir une hémoglobinisation.

III.3.6. Analyse cytologique des cellules en culture

a) Avec le protocole court

Au dernier jour du protocole (J18), **500 000 cellules** environ ont été prélevées par condition, afin d'être analysées. Ces dernières sont placées dans un système porte-lame avant centrifugation (10 min à 200 rpm) avec cytospin. La coloration au MGG ensuite réalisée permet d'observer les cellules sous microscope à immersion (Gx500 ou Gx1000 + huile à immersion). Les clichés réalisés sont les suivants :

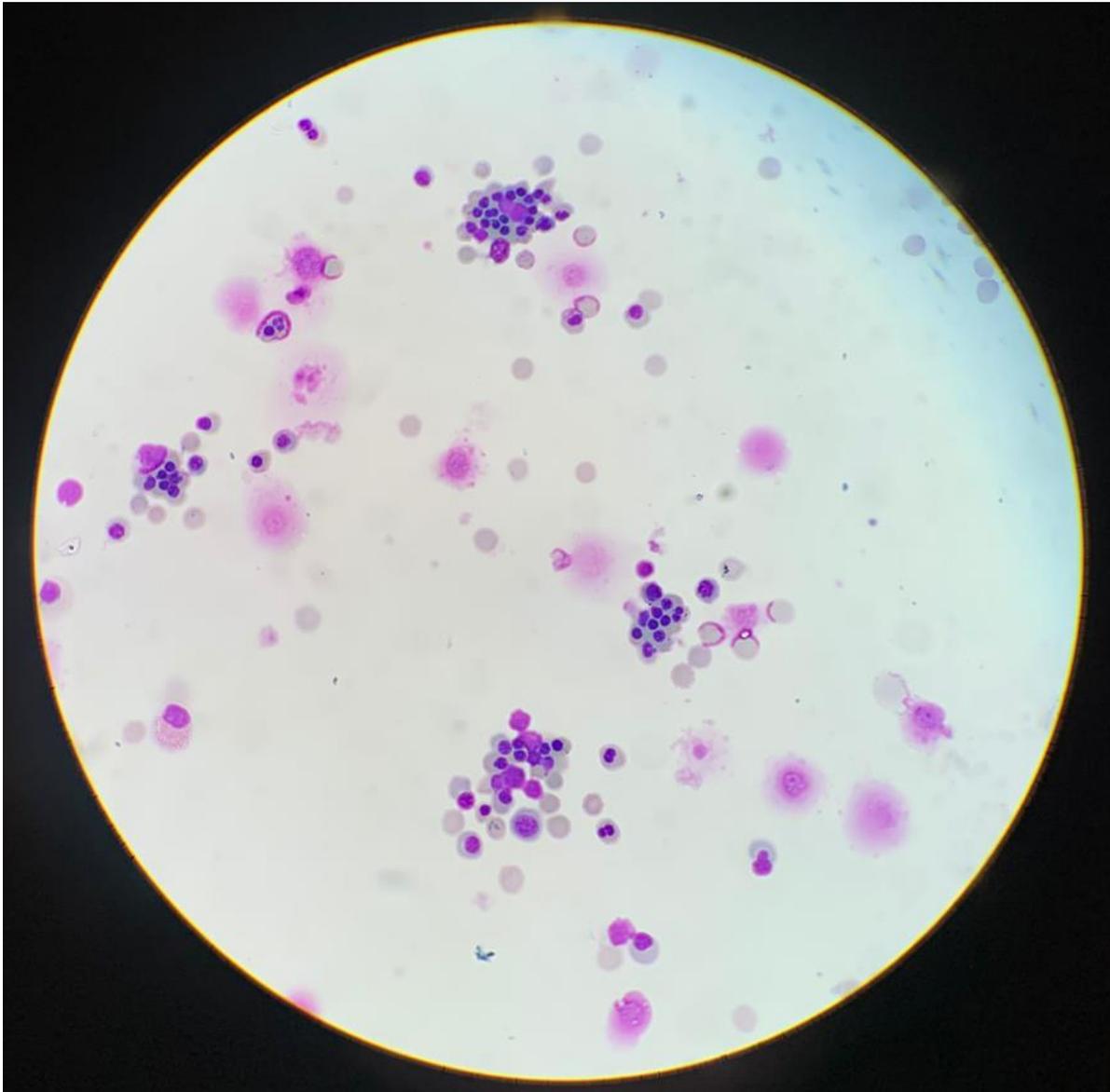


Figure 101. **Lame colorée au MGG** à J18 du PC en condition **CTL** (Gx500)

Nous observons une majorité d'érythroblastes acidophiles, de plus au niveau des précurseurs nous pouvons observer la présence de tous les stades cellulaires, ainsi que des cellules anucléées hémoglobinisées, correspondant aux hématies. Par ailleurs, nous pouvons remarquer l'agglomération d'érythroblastes en amas, mimant potentiellement le processus physiologique retrouvé au sein de la moelle osseuse (îlots érythroblastiques).

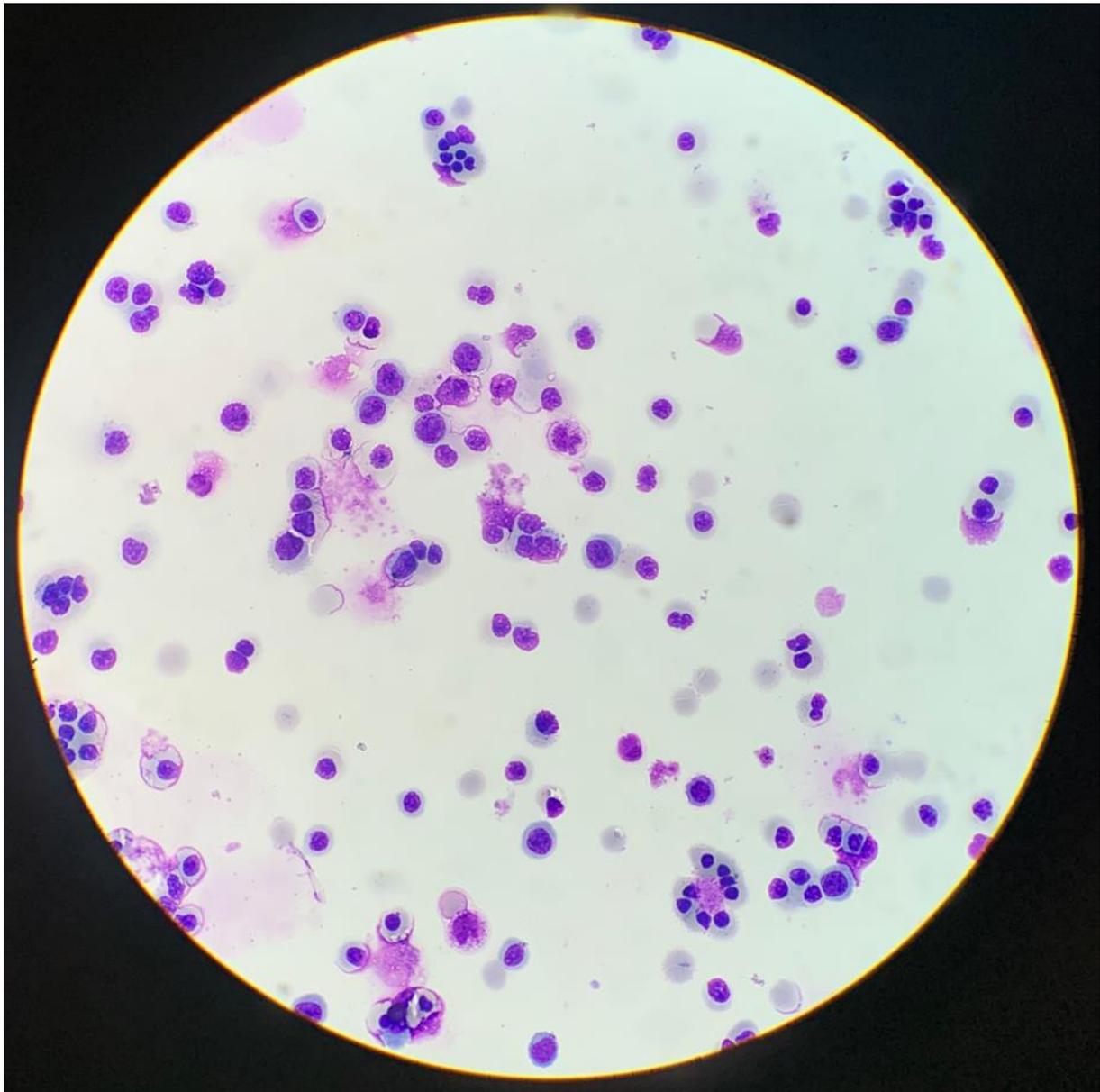


Figure 102. **Lame colorée au MGG** à J18 du PC, condition **Ena1** (Gx1000+ huile)

A J18 en condition Ena1, nous pouvons également remarquer la présence de tous les stades de précurseurs au dix-huitième jour de la culture cellulaire. Nous constatons également que la formation d'hématies anucléées (apparaissant en gris) n'est pas inhibée lorsque les cellules sont exposées à la molécule durant les 7 premiers jours de culture in vitro.

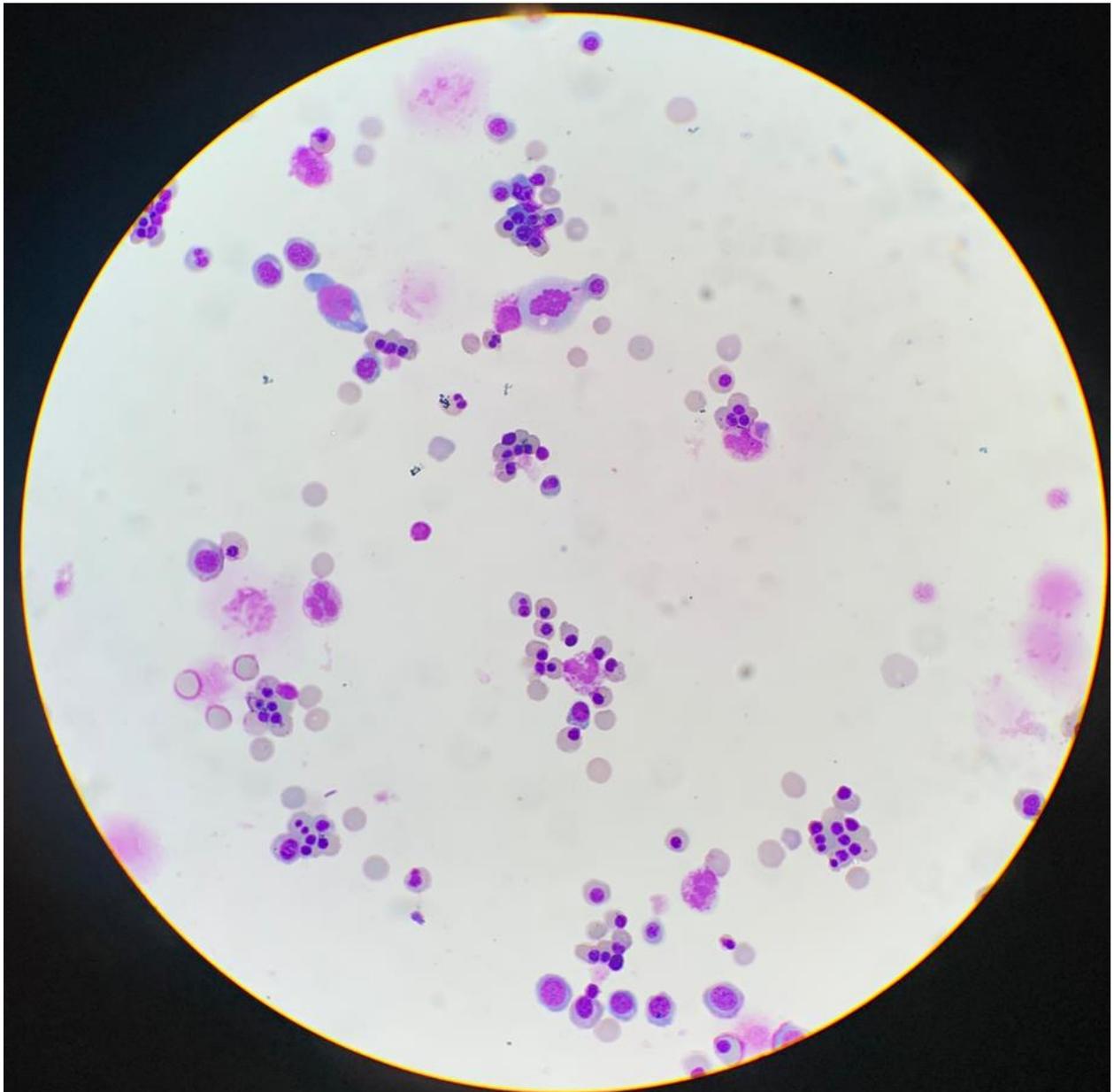


Figure 103. Lame sous microscope **colorée au MGG**, à J18 du PC en condition **Ena2** (Gx500 + huile)

Avec la condition Ena2, nous pouvons également remarquer la présence de tous les stades de précurseurs. La formation d'hématies anucléées n'est pas non plus inhibée lorsqu'on ajoute l'énasidenib entre J7 et J11.

Une numération cellulaire est réalisée ensuite à l'aide du logiciel Paint®. Un code couleur est appliqué pour les différents stades cellulaires, 300 cellules sont comptées par condition et les cellules mortes ne sont pas prises en compte.

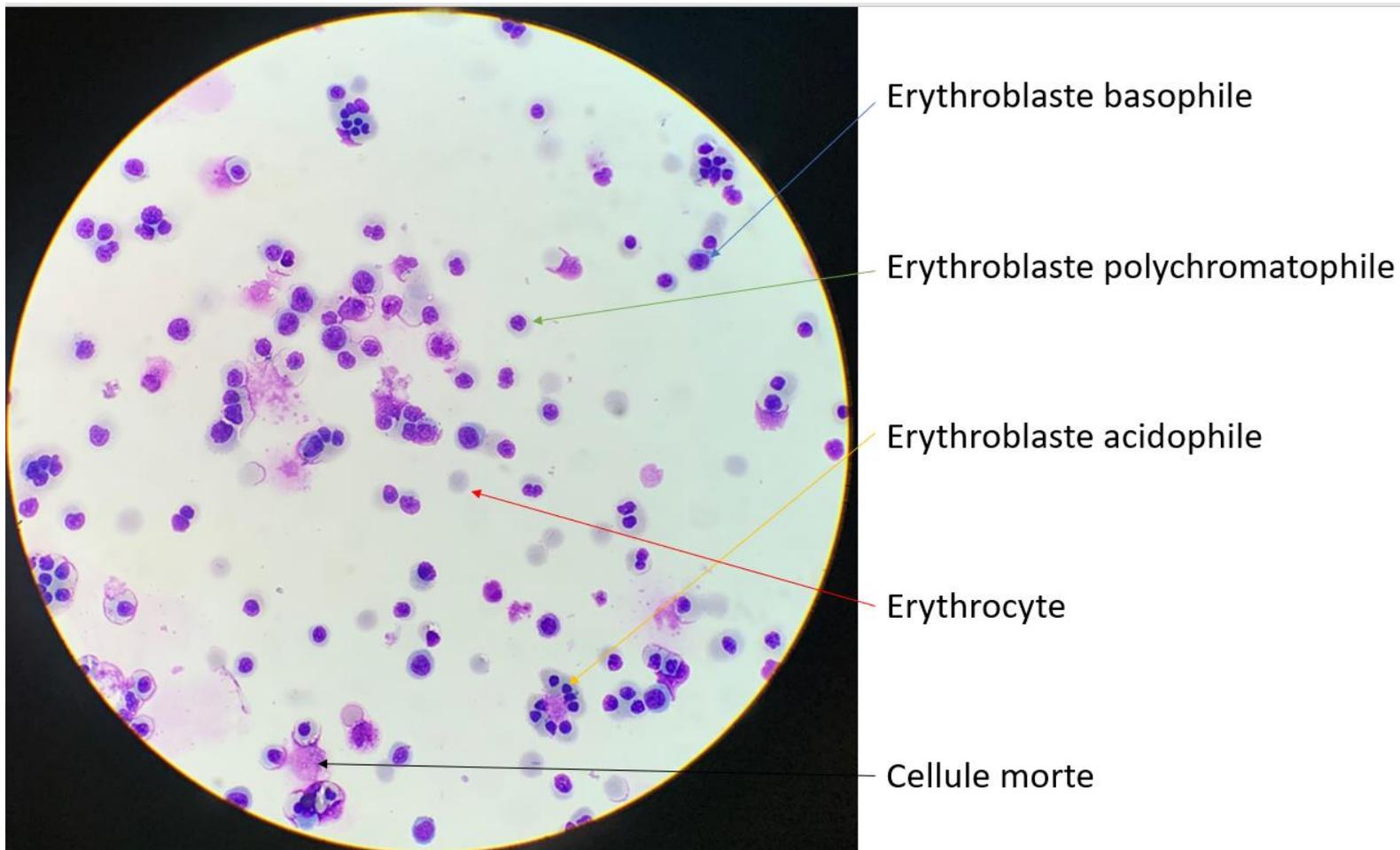


Figure 104. Lame sous microscope colorée au MGG, à J18 avec le protocole court, condition Ena1 (Gx1000 + huile à immersion). **Méthode de comptage des cellules**

Le code couleur est appliqué de la manière suivante :

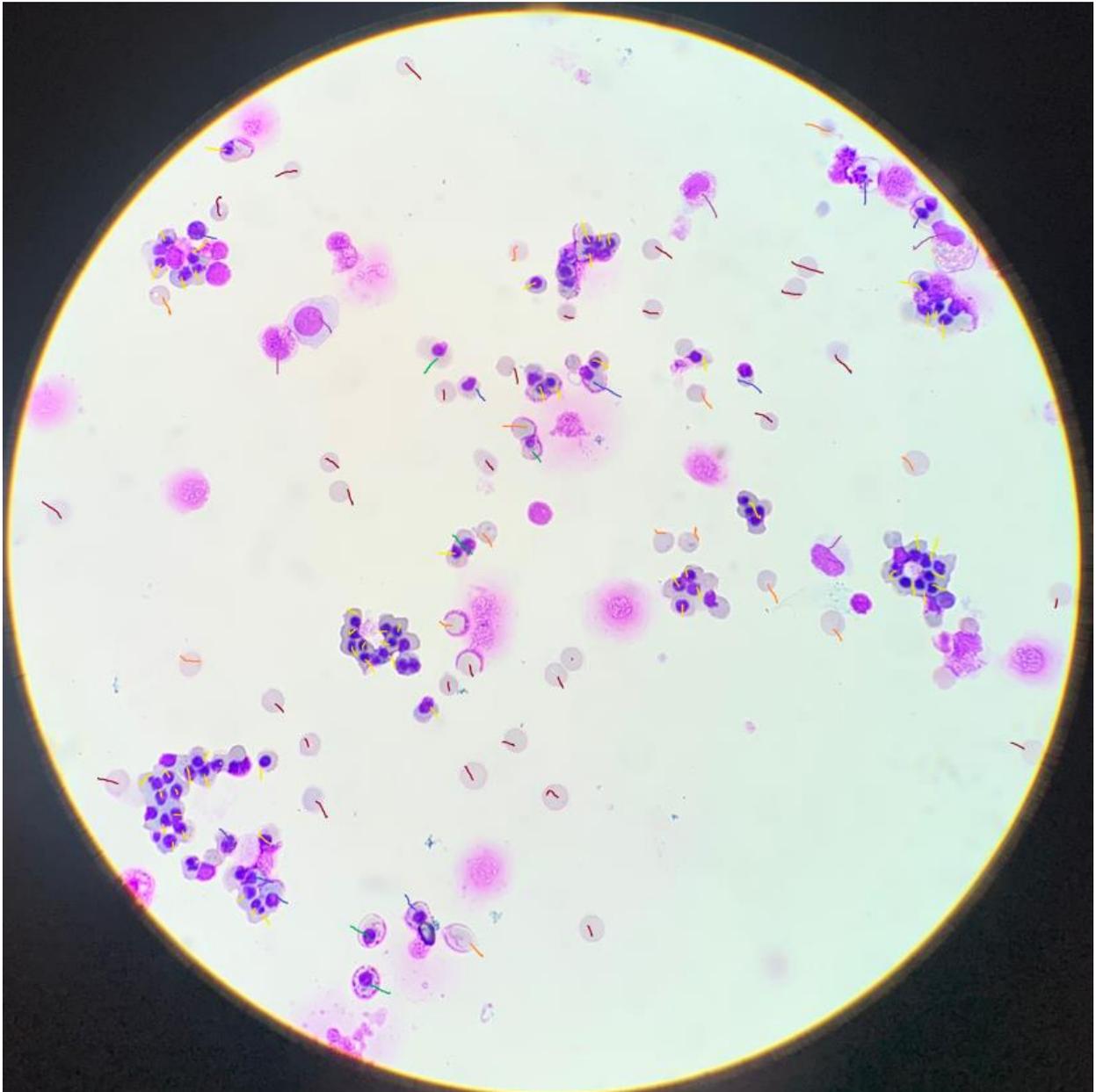


Figure 105. Lame en condition contrôle (grossissement x500) avec le logiciel Paint

Code couleur :

Violet : proérythroblaste

Bleu : érythroblaste basophile

Vert : érythroblaste polychromatophile

Jaune : érythroblaste acidophile

Rouge : érythrocyte

Série 1, avec le protocole court :

Conditions\stades cellulaires	Proérythroblaste	Erythroblaste basophile	Erythroblaste polychromatophile	Erythroblaste acidophile	Erythrocyte
Contrôle	2,1	11,4	5,1	45,6	35,7
Ena1	1,6	25,7	14,7	33,1	24,9
Ena2	2,7	21,8	6,5	35,5	33,5

Conditions\stades cellulaires	stades précoces (PEB+EBB)	stades intermédiaires (EBP + EBA)	Stades tardifs (GR)
Contrôle	13,5	50,7	35,8
Ena1	27,3	47,8	24,9
Ena2	24,5	42	33,5

Série 2, avec le protocole court :

Conditions\stades cellulaires	Proérythroblaste	Erythroblaste basophile	Erythroblaste polychromatophile	Erythroblaste acidophile	Erythrocyte
Contrôle	4,7	12,7	6,5	41,3	34,8
Ena1	3,6	9,7	7,2	43,5	36
Ena2	7,2	15,5	12,3	32,3	32,7

Conditions\stades cellulaires	stades précoces (PEB+EBB)	stades intermédiaires (EBP + EBA)	Stades tardifs (GR)
Contrôle	17,4	47,8	34,8
Ena1	13,3	50,7	36
Ena2	22,7	44,6	32,7

Après avoir effectué des comptages sur trois lames pour chaque condition à un grossissement de x500, les résultats obtenus sont les suivants (n=2) : Les pourcentages ont été calculés par rapport au nombre total de cellules comptées.

Pour une moyenne totale (**n=2**) :

Conditions\stades cellulaires	stades précoces	stades intermédiaires	Stades tardifs
Contrôle	15,5	49,3	35,3
Ena1	20,3	49,3	30,5
Ena2	23,6	43,3	33,1

Avec le protocole court, nous pouvons remarquer une proportion plus importante de cellules aux stades tardifs en condition contrôle comparées aux conditions Ena1 et Ena2. (effet ns)

b) Avec le protocole SP2

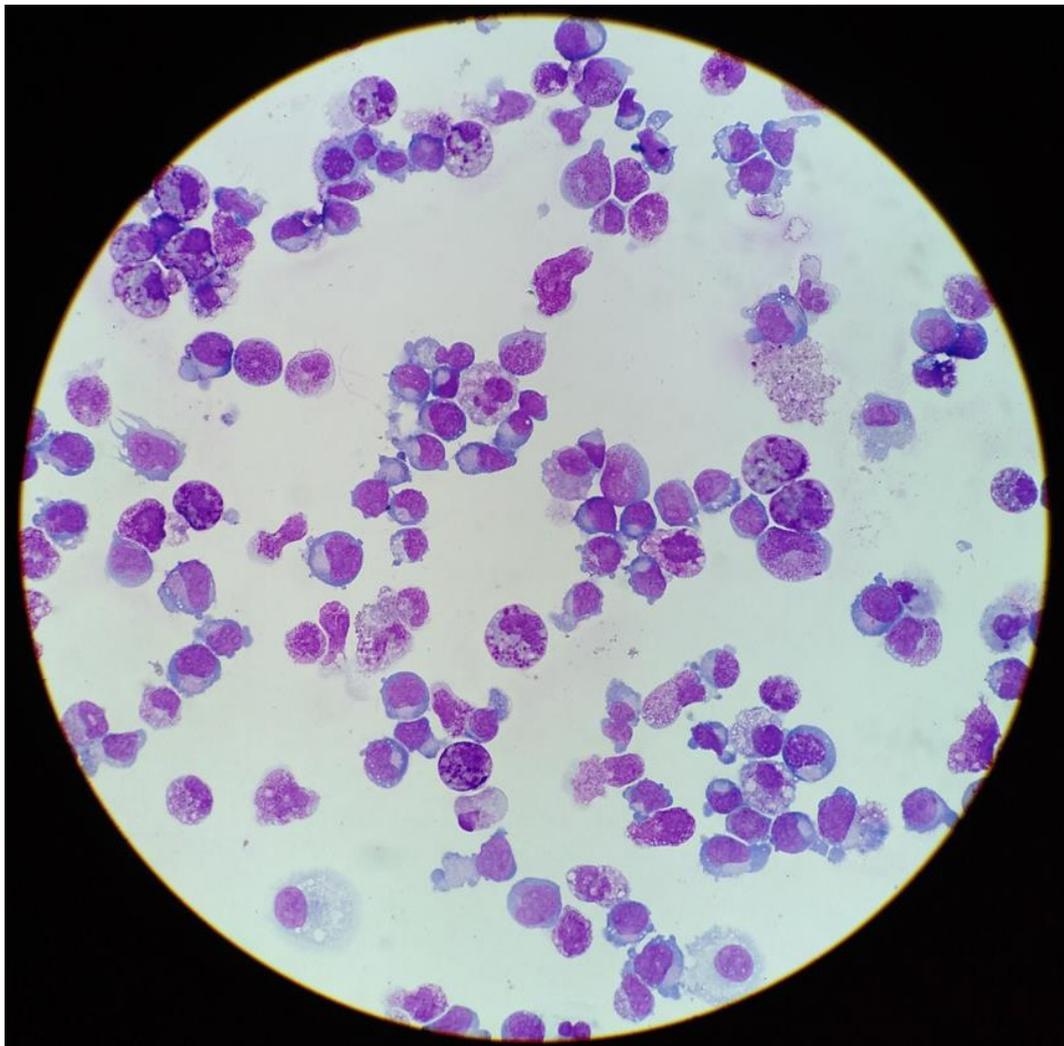


Figure 106. Lame colorée au **MGG**, en condition **contrôle** à J18, avec le **protocole SP2**

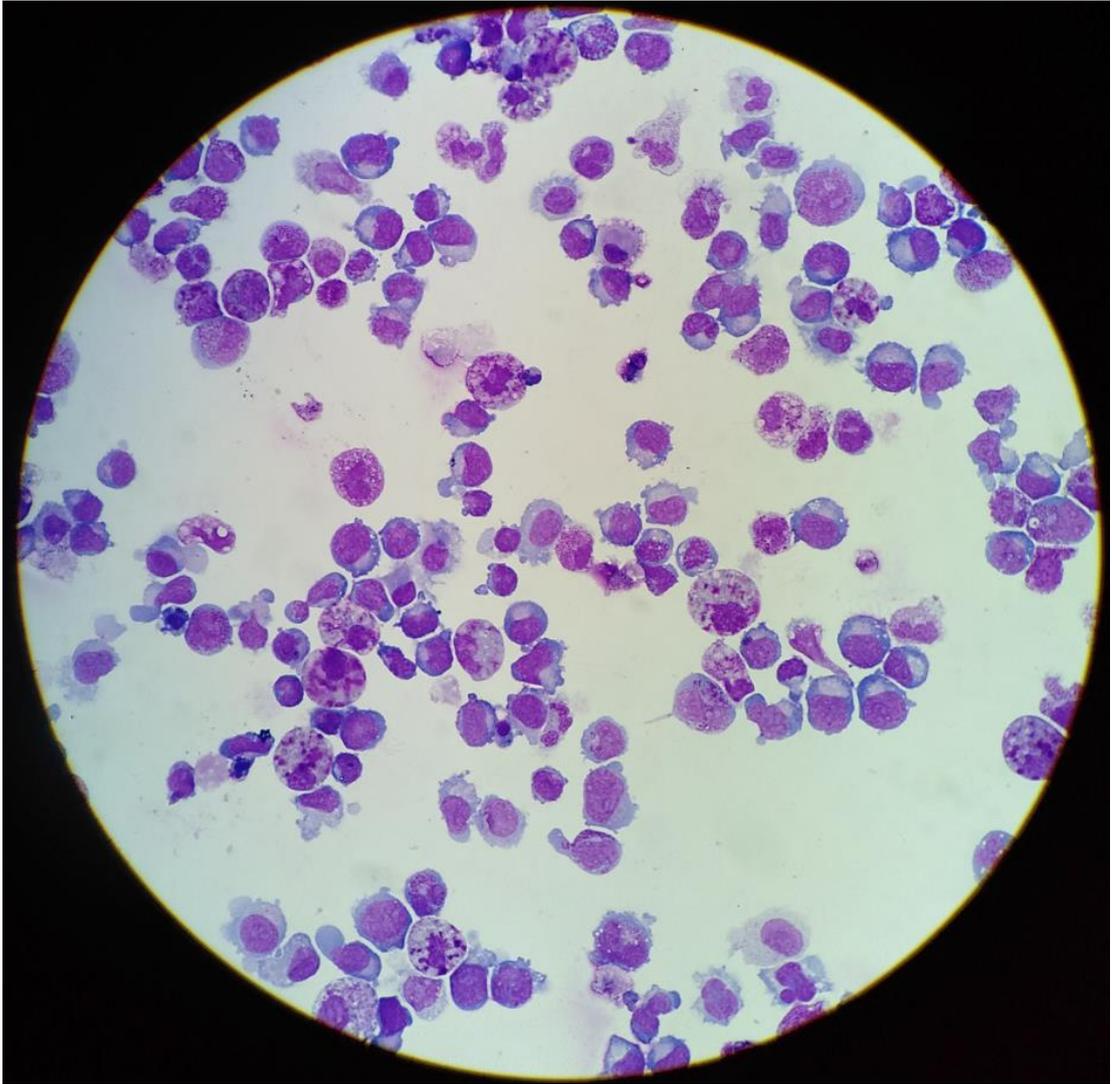


Figure 107. Lame colorée au **MGG**, en condition **Ena1** à J18, avec le **protocole SP2**

Avec le protocole SP2, les précurseurs obtenus sont plus immatures (beaucoup plus de proérythroblastes et d'érythroblastes basophiles, quasi-absence d'érythroblaste acidophiles et d'hématies), comparées aux cellules produites avec le protocole court.

IV. Discussion

En synthèse des résultats que nous venons de présenter, il apparaît que de manière générale, l'énasidenib appliqué à l'érythroïèse ex vivo, selon trois protocoles de culture différents (PC, PL et SP2), entraîne certains effets sur la différenciation érythroïde des cellules CD34+.

L'énasidenib à 10 μM n'augmente pas de manière significative la proportion de cellules mortes au cours de la culture. Cependant, à une concentration plus élevée, on observe un accroissement conséquent de la mortalité cellulaire par rapport à la condition témoin. Il convient de noter que ces résultats concordent avec ceux de Ritika Dutta et al., qui rapportent également une absence de toxicité sur les cellules érythroïdes retrouvée avec une concentration d'énasidenib de 10 μM (avec $n = 4$).

La question de savoir si l'emploi de l'énasidenib dans l'érythroïèse ex vivo sur cellules saines présente une limitation, mérite d'être approfondie. En effet, l'énasidenib est un agent anticancéreux efficace à une concentration donnée, et au-delà d'un certain seuil, il peut devenir toxique pour la survie et la prolifération cellulaire. Il est important de noter que ce médicament est actuellement dispensé dans le traitement de certaines formes de leucémie myéloïde aiguë, caractérisées par des mutations IDH2. Le mécanisme d'action de cette molécule réside dans l'inhibition de la prolifération cellulaire, permettant de rétablir une différenciation physiologique des cellules pathologiques. Cet effet thérapeutique est en partie due, on le rappelle, à la réduction de la synthèse excessive de 2-hydroxyglutarate (2-HG) par les cellules leucémiques porteuses de la mutation IDH2.

Cependant, l'application de l'énasidenib aux cellules saines doit être examinée sous un nouvel angle, car ces dernières ne présentent généralement pas de mutation de l'enzyme IDH2. Par conséquent, il n'y a pas de production excessive de 2-HG dans ces cellules. Cela soulève alors la question de savoir si l'utilisation de cette molécule à des concentrations non toxiques, dans le cadre érythroïèse ex vivo, sur cellules saines, limiterait son emploi.

Afin d'approfondir cette question, il est intéressant de se référer aux études apportant des arguments réfutant cette potentielle limitation, telles que celle menée par Ritika Dutta. Les niveaux de D-2-HG ont été mesurés au sein des progéniteurs érythroïdes en différenciation et il a été constaté que, « conformément à ce qui était attendu pour les cellules souches hématopoïétiques normales, le D-2-HG n'était pas présent à des niveaux détectables dans les conditions traitées au DMSO ou à l'énasidenib. De plus, l'ajout d'un dérivé perméable aux cellules du D-2-HG à des concentrations différentes n'a affecté en rien la capacité de l'énasidenib à augmenter la proportion de cellules CD71+/GPA+. » Cette expérience suggère que cette molécule n'intervient pas directement sur le 2-HG afin d'accélérer la différenciation in vitro.

De plus, les résultats de Ritika et al. indiquent que l'énasidenib augmente la différenciation érythroïde indépendamment des mutations IDH2, car « une augmentation significative du pourcentage de cellules érythroïdes CD71+ GPA+ se produit, même au sein des cellules ne présentant pas ces mutations. Cependant, il convient de noter que les taux de différenciation étaient moindres en absence de cette enzyme », les cellules érythroïdes ont donc besoin d'IDH2 afin de se différencier de manière optimale. L'effet de l'énasidenib semble être indépendant des mutations IDH2, bien que l'IDH2 semble jouer un rôle important dans la différenciation érythroïde.

En conclusion de l'étude portant sur la toxicité cellulaire, la question du recours à l'énasidenib dans le processus de l'érythroïèse ex vivo sur cellules saines est complexe et mérite une approche plus approfondie. Il semble que des **concentrations inférieures ou égales à 10µM devraient être privilégiées** afin d'éviter un éventuel effet toxique qui perturberait la croissance optimale des cellules produites ex vivo.

- **Concernant la prolifération cellulaire ;**

L'analyse des **facteurs d'expansion (FE)** a révélé que l'énasidenib ne provoque pas d'accroissement de l'expansion érythroïde lorsque cette molécule est ajoutée dans le milieu au cours de la première semaine de culture. Au contraire, à J4, avec les protocoles PC et PL, un ralentissement de la prolifération érythroïde a été observé dans ces conditions d'exposition.

Plus précisément, avec le protocole PC et une concentration initiale de 10 000 cellules/mL, l'exposition à l'énasidenib à 10 µM a entraîné un ralentissement significatif de la prolifération érythroïde par rapport à la condition témoin. Par la suite, les proliférations cellulaires des deux conditions ont montré une tendance à se rapprocher dans le temps, suggérant que l'exposition précoce des cellules souches, à une molécule anticancéreuse, ralentit les divisions dans les phases précoces de l'érythroïèse en culture.

Cependant, lorsque nous regroupons les résultats obtenus en utilisant le protocole PC, que ce soit avec différentes valeurs de C0 ou des facteurs de dilution appliqués à J4, nous n'observons plus de réduction significative de la prolifération cellulaire avec l'exposition à la molécule à 10 µM. Cette diversité de conditions prises en compte (concentration et dilution) est à l'origine de difficultés d'interprétation des résultats, et ceci est en lien avec les variations inter-échantillons en termes de culture cellulaire. Les facteurs d'amplification sont très variables et il est possible que l'effet de l'énasidenib soit visible ou pas selon que l'amplification est importante ou pas. Par conséquent, la comparaison appariée ne suffit pas à mettre en évidence une différence.

Lorsque la concentration initiale (C0) est fixée à 50 000 cellules/mL, correspondant à la concentration cellulaire initiale mentionnée dans la publication de Ritika Dutta, un phénomène de "saturation" est observable dans nos expériences, indiquant une croissance cellulaire médiocre, potentiellement liée à « l'épuisement du milieu ». Non retrouvé dans l'article car, le supplément a été ajouté plus tard, à J4 de la culture « Les cellules ont été étalées à une densité initiale de 50 000 cellules/mL et le milieu supplémentaire a été ajouté au quatrième jour de culture », et les cellules étaient cultivées en condition physioxique : « les cellules dans des conditions hypoxiques ont été cultivées dans une chambre hypoxique à trois gaz (37°C, 5 % de CO2, 2 % d'O2, 5 % de N2). »

Cependant, ce ralentissement de la prolifération semble moins évident avec le protocole SP2, où l'ajout de la molécule ne semble pas entraîner de frein à la multiplication cellulaire, contrairement aux deux autres protocoles. Sous ce même protocole, il a été remarqué que la moyenne des facteurs d'expansion (FE) à certains jours pouvait parfois dépasser ceux de la condition contrôle. En revanche, avec le protocole PL, la molécule semble ne pas influencer la prolifération des cellules, étant donné que les étapes précoces sont prolongées par rapport aux protocoles SP2 et PC. Il convient également de noter que les manipulations ont été réalisées pour n=4 avec les protocoles PL et SP2. La puissance statistique de l'étude pourrait être accrue en reproduisant ces expériences un plus grand nombre de fois, contribuant à renforcer la validité des résultats obtenus.

Avec le protocole court, le suivi de l'évolution de la prolifération, réalisé à l'aide du **marquage au CFSE**, a permis de confirmer cette tendance, indiquant une diminution de la prolifération érythroïde lors de l'exposition à la molécule, de manière dose dépendante. Il est possible que cet effet antiprolifératif soit de même origine que celui qui est observé et utilisé pour le traitement des LAM.

Cependant, il convient de noter que cette expérience n'a été réalisée qu'une fois (n=1), ne disposant pas d'une puissance statistique suffisante afin d'établir la significativité de cet effet observé. Il serait donc pertinent de la répéter plusieurs fois afin de confirmer ces résultats.

Non évoquée dans l'article, un résultat manquant dans l'article de Ritika Dutta et al. est à l'évidence l'absence de précision concernant l'effet de l'énasidenib sur la prolifération cellulaire. Aucune information n'est fournie quant à savoir si cette molécule, bien qu'elle puisse stimuler la différenciation cellulaire, a un impact sur la multiplication des cellules, ce qui pourrait éventuellement augmenter le rendement final. Cette absence d'informations est clairement due au fait que les auteurs ne se proposaient pas d'explorer un éventuel effet sur la production des hématies ex vivo. En revanche, nos résultats réfutent leur proposition que cette molécule puisse éviter les transfusions en stimulant l'érythropoïèse autologue des patients.

En examinant le **potentiel clonogénique**, c'est-à-dire la formation de colonies CFU/BFU, des cellules érythroïdes exposées à l'énasidenib, nous constatons que cet agent n'exerce pas d'influence significative sur la formation de colonies érythroïdes dans les protocoles PC et PL. Au contraire, avec ces protocoles, une tendance à la diminution des précurseurs érythroïdes est observée par rapport à la condition contrôle, bien que cette diminution ne soit pas statistiquement significative. Néanmoins, les résultats obtenus avec le protocole SP2 indiquent que le nombre de colonies formées est comparable entre les deux conditions, ce qui concorde avec les conclusions de l'étude de Dutta et al : « l'énasidenib n'a pas augmenté le nombre de colonies BFU-E ou CFU-E dans les tests de formation de colonies (Figure 3A et Figure supplémentaire 9), ni le pourcentage de progéniteurs BFU-E et CFU-E dans le liquide. »

Pour résumer l'étude de la toxicité et de la prolifération cellulaire, nos résultats ont permis de démontrer que l'énasidenib, à une concentration de 10 µM, n'augmentait pas le rendement final en cellules rouges produites ex vivo. Il a été observé que cette molécule a tendance à réduire ou ralentir la croissance cellulaire, en particulier lorsqu'elle est exposée en début de protocole.

Par ailleurs, il est essentiel d'apporter **quelques précisions** :

- Le protocole court d'expansion (PC) est complété avec des facteurs de croissance (SCF, EPO, IL-3, HC) couramment disponibles sur le marché en tant que molécules de grade clinique. Cette combinaison de cytokines a déjà fait ses preuves en termes d'induction de l'expansion des greffons. Cependant, il convient de noter que ce cocktail cytokinique diffère de ceux employés dans les protocoles retrouvés dans la littérature, comme ceux élaborés par Luc DOUAY et Marie-Christine GIARRATANA. L'ajout d'HC a été introduite, et semble atténuer les taux d'amplification cellulaires, par rapport à ce qui est observé dans la littérature. Il convient de noter que, par rapport au protocole de Ritika Dutta, l'ajout d'HC a été également inclus avec les protocoles PC et PL.

- Il est important de noter que la molécule d'énasidenib est solubilisée dans du DMSO. Ce dernier a été employé en tant que contrôle négatif, dans l'étude menée par Ritika Dutta et al., afin d'évaluer l'influence potentielle de ce diluant sur le développement des cellules érythroïdes.
- Les cellules en condition SP2 demeuraient en flasque entre J7 et J14, conformément à la publication de Ritika Dutta, sans réaliser de lavage cellulaire, cela se traduisant par une mortalité importante observable à J15 dans nos expériences. Nous sommes en mesure de nous demander si leurs résultats obtenus avec ce protocole SP2 comportent un biais du fait de cette mortalité

- Concernant la **différenciation érythroïde** :

L'analyse du phénotype (CD71/GPA) a permis de révéler que l'exposition des cellules érythroïdes à l'énasidenib en phase 1 n'influçait pas de manière significative l'acquisition du marqueur membranaire CD71 et ce, avec les trois protocoles de culture. Toutefois, une tendance pourrait être tout de même retenue, laissant suggérer une acquisition plus rapide de ce même récepteur à la transferrine. Cependant, en raison de la puissance limitée de notre test statistique, cette augmentation n'a pas été démontrée de manière significative

Par ailleurs, il a été constaté que l'acquisition de la GPA était accélérée lors de l'exposition des cellules à l'énasidenib au cours de la phase 1, permettant ainsi d'obtenir plus rapidement le phénotype CD71+/GPA+.

De ce fait, nos résultats corroborent ceux de Dutta et al, qui suggèrent que l'énasidenib agit sur des populations cellulaires déjà avancées en maturité. En effet, notre étude montre que l'énasidenib n'a pas d'effet significatif au cours des quatre premiers jours de culture.

L'article de Dutta et al note que l'inhibition du CD71 par un inhibiteur (ferristatine II), réduit de manière dose-dépendante la différenciation médiée par l'énasidenib. Ces observations suggèrent que l'énasidenib agit sur les progéniteurs érythroïdes CD71+ afin d'accélérer la différenciation vers un stade avancé. Selon les résultats de notre étude, l'énasidenib ne semble pas avoir d'effet significatif sur le CD71 lui-même (malgré de fortes tendances), soulevant la possibilité d'un mécanisme à double action de cette molécule, agissant à la fois sur le CD71 et sur la GPA.

En résumé, notre étude suggère que l'énasidenib, à une concentration de 10 µM, n'influence pas de manière très significative l'acquisition du CD71 mais semble accélérer l'acquisition de la GPA.

En ce qui concerne l'acquisition du phénotype intermédiaire **CD71+/GPA+**, nos résultats concordent avec ceux exposés dans l'étude de Dutta et al, suggérant que l'énasidenib facilite une acquisition plus rapide de ce phénotype. Leurs résultats mentionnent que « l'énasidenib a augmenté la différenciation érythroïde à un stade avancé après 8 jours, avec une augmentation du pourcentage de GPA, soit une augmentation de 3,7 fois, ainsi qu'une augmentation du pourcentage de Band-3+. » Bien que la molécule Band-3 ne fasse pas l'objet d'une étude dans notre recherche, nous avons observé un effet similaire de la molécule favorisant l'acquisition plus rapide de la GPA.

Une question intéressante serait de savoir si l'ajout de fer à des concentrations optimales permettrait de compléter ce phénomène d'accélération de la différenciation cellulaire. En effet, l'augmentation de l'expression du CD71, le récepteur de la transferrine, suggère que les cellules seraient capables de capturer davantage de fer, favorisant ainsi la synthèse accélérée de l'hémoglobine et, par conséquent, une différenciation plus rapide. Cette hypothèse est en accord avec le mécanisme d'action de l'énaïdenib décrit dans l'article de Dutta et al. Toutefois, des études supplémentaires sont nécessaires afin d'évaluer plus précisément l'impact de l'ajout de fer sur la différenciation cellulaire en présence d'énaïdenib.

De plus, il a été démontré que l'exposition des cellules érythroïdes à l'énaïdenib en culture in vitro n'a pas n'altérée **la synthèse de l'hémoglobine observée au 18^{ème} jour de culture**. Il est important de noter que nos résultats présentent des divergences partielles par rapport à ceux de Ritika Dutta et al, qui suggèrent une différence significative en termes de synthèse d'Hb entre le contrôle négatif et la condition exposée à l'énaïdenib. Leurs observations signalent une augmentation de la production d'Hb et des caractéristiques morphologiques de maturation érythroïde accrue. Dans notre étude, en revanche, nous n'avons pas observé de différences visuelles significatives, sans doute du fait du caractère non quantitatif de notre test. Avec les protocoles SP2 et PC, nous avons constaté une synthèse d'Hb pour toutes les conditions exposées à l'énaïdenib, notamment Ena1, Ena12 et Ena2, suggérant que cette molécule ne perturbe pas la production d'Hb avec ces protocoles. Cependant, à J18 avec PL, aucune trace d'Hb n'a été observée, probablement en raison de la précocité du stade de développement des cellules à cette étape (correspondant seulement à la fin de la phase 2).

Une autre considération essentielle liée au protocole SP2 concerne son coût, notamment en ce qui concerne le supplément, coûtant plus de 500 euros pour 1 millilitre seulement de supplément, représentant un investissement important

Au terme de l'analyse cytologique des lames, après coloration au MGG au dernier jour du protocole court, Il est important de noter que cette analyse n'a pas été réalisée dans l'étude de Dutta et al., qui ne se penche pas sur les stades cellulaires obtenus le dernier jour de la culture. De notre côté, nous avons pu constater qu'avec le protocole court (PC), la condition Ena1 semble présenter un nombre supérieur de cellules aux stades immatures par rapport à la condition contrôle.

Enfin, d'un point de vue **statistique**, il est pertinent d'interroger l'absence de résultats significatifs malgré la présence de tendances apparentes, ce constat peut être attribué à diverses limitations statistiques rencontrées au cours de l'étude.

En premier lieu, la principale limite du test de Wilcoxon en apparié réside dans le calcul d'une valeur de rang impliquant la prise en compte de la moyenne entre chaque condition. Cette approche limite la possibilité d'une analyse approfondie des valeurs observées pour chaque jour, restreignant ainsi la visibilité sur l'évolution des données au fil du temps. De surcroît, ce test ordonne les observations en rangs sans considération pour la magnitude exacte des différences entre les paires appariées, entraînant ainsi une perte d'information significative, particulièrement lorsque la quantification précise de la prolifération ou de la différenciation cellulaires est cruciale. Enfin, le test de Wilcoxon évalue si les distributions des paires appariées sont égales, sans prendre en compte la direction des changements. De ce fait, il ne permet pas de discerner si les valeurs ont augmenté ou diminué au fil du temps.

Afin surmonter ces limitations, l'emploi d'une analyse de variance à deux facteurs, complétée par le test de Bonferroni, offre une meilleure compréhension des variations dans le temps tout en tenant compte de l'influence de différents paramètres.

En ce qui concerne la significativité du test de Wilcoxon, augmenter la taille de l'échantillon peut accroître sa puissance. Une autre approche consiste à réduire le niveau de signification du test, passant par exemple d'un risque α de 0,05 à 0,1, augmentant ainsi la probabilité de rejeter l'hypothèse nulle. Par exemple, une probabilité de $0,05 < 0,0625 < 0,1$ serait significative au seuil de 10%, indiquant qu'il y a plus de 90% de chances que l'augmentation observée de l'expression du CD71 "high" liée à l'exposition à l'Enasidenib (entre J0 et J7) ne soit pas due au hasard.

De plus, il est essentiel de prendre en compte la variabilité interindividuelle au sein des différents échantillons de cellules CD34+, des écarts significatifs ont en effet été observés au niveau de la croissance cellulaire. La réduction de la variabilité peut être obtenue en regroupant les cellules, c'est-à-dire en les combinant à partir de plusieurs USP en une seule unité. Cette approche permet de minimiser l'impact des variations individuelles et d'obtenir des données plus homogènes.

En synthétisant les observations faites au cours de cette étude, il apparaît que l'énasidenib induit au cours des protocoles d'érythropoïèse in vitro une réduction de la prolifération cellulaire, notamment pendant la période d'exposition la plus précoce à la molécule, tout en favorisant simultanément une différenciation accrue dans les stades les plus tardifs. Ces conclusions concordent avec les résultats rapportés dans l'article de Dutta et al. et sont en cohérence avec les observations cliniques réalisées lors de l'emploi de ce médicament.

V. Conclusion & Perspectives

Dans les conditions expérimentales employées, nous n'avons pas d'arguments en faveur de l'utilisation de cette molécule afin d'optimiser la production d'hématies ex vivo, ou en clinique pour stimuler in vivo l'érythropoïèse comme Dutta et al le suggèrent, en raison d'un effet antiprolifératif à faible dose et d'un effet toxique à plus forte dose

Les équipes qui s'intéressent de près à la production d'hématies ex vivo pourraient éventuellement chercher à exploiter l'effet promoteur de la différenciation en fin de protocole, afin de réduire le temps de production, sans avoir à payer le prix de la diminution de prolifération en début de culture. La confirmation de ces résultats en faisant varier d'autres paramètres (notamment la concentration d'oxygène) pourrait être également menée.

- Afin d'approfondir la compréhension de l'influence de l'énasidenib sur la synthèse d'**hémoglobine**, il serait opportun d'effectuer des analyses tant qualitatives que quantitatives de l'hémoglobine présente au sein des cellules exposées à l'énasidenib, comparativement à celles de la condition contrôle. Cette approche permettrait d'établir si l'hémoglobine synthétisée en présence de l'énasidenib est fonctionnelle. De surcroît, une exploration plus approfondie du type d'hémoglobine intracellulaire serait pertinente, étant donné que les cellules CD34+ du sang placentaire renferment principalement de l'hémoglobine fœtale (HbF). Ces analyses contribueraient à évaluer l'impact de l'énasidenib sur la production d'hémoglobine et à mettre en lumière d'éventuelles variations qualitatives ou quantitatives.
- L'influence de **différentes concentrations d'oxygène**, en utilisant la technologie Biospherix, peut également permettre d'étudier les aptitudes des cellules à se diviser ou à se différencier. Il est essentiel de souligner que la différenciation induite par l'énasidenib pourrait expliquer pourquoi la prolifération ne s'élève pas nécessairement à des niveaux supérieurs à ceux du contrôle. La capacité des cellules à s'engager vers le renouvellement ou la différenciation est influencée par ces conditions particulières. En combinant l'effet de l'énasidenib avec des niveaux d'oxygène bas, des concentrations d'O₂ comprises entre 1,5% et 5%, par exemple, favoriseraient une activation modérée et régulée de la prolifération cellulaire, par renouvellement des progéniteurs. (190)
- Une approche prometteuse pour potentialiser la différenciation érythroïde consisterait à envisager **l'ajout de fer**. Fondée sur l'hypothèse selon laquelle l'énasidenib, en inhibant l'ABCG2, pourrait conduire à une accumulation de protoporphyrine IX (PPIX), favorisant ainsi une production accrue d'hémoglobine. Afin de vérifier cette hypothèse, l'ajout de fer à des concentrations optimales pourrait être envisagé, offrant aux cellules les moyens de synthétiser l'hémoglobine plus rapidement, et par conséquent, de favoriser une différenciation plus rapide.

- L'étude **du protéome et du transcriptome** peut également être envisagée dans le but de comprendre les modulations de protéines et de transcrits. Des prélèvements de cellules érythroïdes, à différents moments après l'ajout d'énasidenib, seront effectués. Les résultats seront confirmés par western blot et RTqPCR en fonction des données obtenues lors de ces analyses.

En somme, cette étude ouvre la voie à de futures recherches visant à mieux comprendre les mécanismes moléculaires et cellulaires sous-jacents à l'action de l'énasidenib sur la prolifération et la différenciation des cellules érythroïdes, ouvrant ainsi des perspectives pour des applications potentielles en médecine régénérative et en production de globules rouges ex vivo.

VI. Bibliographie

1. Haute Autorité de Santé. *Recommandation de Bonnes Pratiques : Transfusion de globules rouges homologues : produits, indications*. . France , Novembre 2014.
2. LAUREANO Marissa, CLARKE Gwen, T. S. YAN Matthew. How do I provide rare red cells to patients? *Transfusion*, (2022), Vol. 63, 4, (670-678), 10.1111/trf.17171.
3. EFS. tout savoir sur les sangs rares. [En ligne] don de sang , 28 12 2021. <https://dondesang.efs.sante.fr/articles/tout-savoir-sur-les-sangs-rares>.
4. DOUAY Luc, NEILDEZ-NGUYEN Thi My Anh. Production massive de précurseurs de globules rouges in vitro vers un nouveau produit sanguin labile ? *Med Sci (Paris)*. Vol. 18 5 (2002) 559-562, DOI: <https://doi.org/10.1051/medsci/2002185559>.
5. TARNG DC, HUANG TP, WEI YH. Erythropoietin and iron: the role of ascorbic acid. *Nephrol Dial Transplant*. 2001, Vol. 16 Suppl 5:35-9. doi: 10.1093/ndt/16.suppl_5.35. PMID: 11509682.
6. DUTTA R, ZHANG TY, MAJETI R. Enasidenib drives human erythroid differentiation independently of isocitrate dehydrogenase 2. *The Journal of Clinical Investigation*, . 2020 Apr , Vol. Vol. 1;130(4):, pp.1843–1849., <https://doi.org/10.1172/JCI133344>.
7. EEA Clinical Trial. *A Study of Ivosidenib or Enasidenib in Combination With Induction Therapy and Consolidation Therapy, Followed by Maintenance Therapy in Patients With Newly Diagnosed Acute Myeloid Leukemia or Myelodysplastic Syndrome EB2, with an IDH1 or IDH2 Mutations*. National Competent Authority: Netherlands - Competent Authority, : s.n., 2019-03-01. . ClinicalTrials.gov ID NCT03839771 EudraCT Number:2018-000451-41..
8. RAFFOUX E., DE BOTTON S. Inhibiteurs d'IDH : mécanismes d'action et résultats thérapeutiques. *Onco-Hématologie*. septembre-octobre 2018, Vol. XIII, n° 5.
9. Institut national du Cancer. *Étude HOVON150AML : étude de phase 3, randomisée évaluant un traitement énasidénib en association avec une chimiothérapie, chez des patients ayant une leucémie aiguë myéloïde (LAM) ou un syndrome myélodysplasique ave mutation IDH2 non encore traités*. multicentrique - Europe Date de publication : 09/07/2020. . um enregistrement : RECF4111.
10. TRIMOREAU F., PRALORAN V. Hématopoïèse et sa régulation. *In : Hématologie clinique et biologique* . ed. par Gérard SEBAHOUN., Rueil-Malmaison: Amette, 2005., - 578p.
11. AUBOURDOLLE. V *Hématologie*. Rueil-Malmaison: Groupe Liaisons Santé, 2000. -3, 301p.- (Le Moniteur Internat).
12. RICHMOND T.D., CHOCHAN M., and BARBER D.L. Turning cells red: signal transduction mediated by erythropoietin. *Trends Cell Biol.* (2005). Vol. 15, 146–155.
13. CORVOL Pierre *Communication scientifique: Bull. Acad. Natle Méd.* Paris : séance du 5 février 2008. 192, no 2, 289-302.
14. VIALLAT Annie, DUPIRE Jules, SOCOL Marius. La dynamique des globules rouges sous écoulement : Une signature de leurs propriétés viscoélastiques. *Med Sci (Paris)*. (2013), pp. Vol. 29, N° 5 ; p. 468-470 ; DOI : 10.1051/medsci/2013295008.

15. LENORMAND Guillaume. Thèse de Doctorat de l'Université Paris V : *Élasticité du squelette du globule rouge humain, une étude par pinces optiques*. Paris : Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2001. HAL Id: tel-00001250..
16. DELAUNAY J., BOIVIN P. Le squelette du globule rouge. *La Recherche*. 1990.Vol. 223(21): 845-582.
17. SALMON Charles. Les Groupes sanguins chez l'homme. 2e éd. rev. et complétée. Paris Milan Barcelone : Masson. 1991. ISBN 2-225-81865-7.
18. CHIARONI J., FERRERA V., DETTORI F. Groupes sanguins érythrocytaires. *EMC* . ISSN 1155-1984, 2005, [http://dx.doi.org/10.1016/S1155-1984\(05\)34390-1](http://dx.doi.org/10.1016/S1155-1984(05)34390-1).
19. REID Marion E., LOMAS-FRANCIS Christine, OLSSON Martin L. ABO Blood Group System. *The Blood Group Antigen FactsBook (Third Edition)*. 2012, pages 27-51, ISBN 9780124158498, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-415849-8.00003-X>.
20. GUEYE Fatou. Thèse de Doctorat : *Drépanocytose et polymorphismes génétiques : épidémiologie, prédiction de gravité et stress-oxydant*. Université de Lyon; Université Cheikh Anta Diop (Dakar) : Biochimie, Biologie Moléculaire. 2019. NNT : 2019LYSE1044 . tel-02310645 .
21. JOMOKA K, MAKOVA M, ALOMAR SY. Essential metals in health and disease. *Chem Biol Interact*. 1; 2022 Nov , Vol. 367:110173. doi: 10.1016/j.cbi.2022.110173. Epub 2022 Sep 22. PMID: 36152810.
22. NAKAMURA T, NAGURO I, ICHIJO H. Iron homeostasis and iron-regulated ROS in cell death, senescence and human diseases. *Biochim Biophys Acta Gen Subj*. 1863, 2019 Sep, Vol. (9):1398-1409. doi: 10.1016/j.bbagen.2019.06.010. Epub 2019 Jun 20. PMID: 31229492.
23. ZHANG AS Molecular mechanisms of normal iron homeostasis. *ASH educational program*, .2009:Vol. 207-212.
24. ANDREWS NC. Forging a field: the golden age of iron biology. *Blood* 2008 Vol.112:219-230.
25. DELOUGHERY TG. Iron Deficiency Anemia. *Med Clin North Am*. 101, 2017 Mar; , Vol. 1(2):319-332. doi: 10.1016/j.mcna.2016.09.004. Epub 2016 Dec 8. PMID: 28189173.
26. LEVY J. E., JIN O., FUJIWARA Y., Transferrin receptor is necessary for development of erythrocytes and the nervous system. *Nat Genet*. 1999, Vol. Vol. 21(4) 396-399, <https://doi.org/10.1038/7727>.
27. XIAO X, MOSCHETTA GA, XU Y, Regulation of iron homeostasis by hepatocyte TfR1 requires HFE and contributes to hepcidin suppression in β -thalassemia. *Blood*. 26; 2023 Jan, Vol. 141(4):422-432. doi: 10.1182/blood.2022017811. PMID: 36322932; PMCID: PMC9936306.
28. BRISSOT P, BERNARD DG, BRISSOT E. Rare anemias due to genetic iron metabolism defects. *Mutat Res Rev Mutat Res*. 2018 Jul-Sep; Vol. 777:52-63. doi: 10.1016/j.mrrev.2018.06.003. Epub 2018 Jun 22. PMID: 30115430.
29. VOGT AS, ARSIWALA T, MOHSEN M. On Iron Metabolism and Its Regulation. *Int J Mol Sci*. 2021 Apr , Vol. 27;22(9):4591. doi: 10.3390/ijms22094591.

30. POOLE J. Red cell antigens on band 3 and glycophorin A. *Blood Rev.* 2000 Mar; Vol. 14(1):31-43. doi: 10.1054/blre.1999.0124. PMID: 10805259.
31. EDWIN H., MORTON A., MADOFF O. The Contribution of Sialic Acid to the Surface Charge of the Erythrocyte. *Journal of Biological Chemistry.* 1962 Vol. Volume 237, Issue 6, Pages 1992-2000, [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)73972-6](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)73972-6).
32. CARTRON J.P., ROUGER P. L'agglutination des globules rouges, *Revue Française de Transfusion et Immuno-hématologie*, 979, Vol. Volume 22, Issue 3, Pages 277-299, [https://doi.org/10.1016/S0338-4535\(79\)80005-7](https://doi.org/10.1016/S0338-4535(79)80005-7).
33. SEBAHOUN G., *Érythropoïèse*. Rueil-Malmaison: Arnette, Hématologie clinique et biologique / ed. par Gérard SEBAHOUN., 2005.
34. SIEMS WG, SOMMERBURG O, GRUNE T. Erythrocyte free radical and energy metabolism. *Clin Nephrol.* 2000 Feb; Vol. 53(1 Suppl):S9-17. PMID: 10746800.
35. MULQUINEY PJ, KUCHEL PW. Model of 2,3-bisphosphoglycerate metabolism in the human erythrocyte based on detailed enzyme kinetic equations: equations and parameter refinement. *Biochem J.* 1999 Sep Vol. 15;342 Pt 3(Pt 3):581-96. PMID: 10477269; PMCID: PMC1220499.
36. Morphologie érythrocytaire (partie 2) : anomalies de forme des GR. *HématoCell.* [En ligne] septembre 2012. <https://hematocell.fr/morphologie-des-hematies-sur-frottis-sanguin-et-principales-anomalies/morphologie-erythrocytaire-partie-2-anomalies-de-forme-des-gr>.
37. BARDAKJIAN-LICHAUD J. Bonnes pratiques de l'étude de l'hémoglobine. *Ann Biol Clin.* 2003; Vol. 61:401-409.
38. BOSSI D, GIARDINA B. Red cell physiology. *Mol Aspects Med.* 1996 Apr Vol. 17(2):117-28. doi: 10.1016/0098-2997(96)88343-9. PMID: 8813714.
39. MAO Y, PENG T, SHAO F. Molecular evolution of the hemoglobin gene family across vertebrates. *Genetica.* 2023 Jun; Vol. 151(3):201-213. doi: 10.1007/s10709-023-00187-9. Epub 2023 Apr 17. PMID: 37069365.
40. VIPRAKASIT V, EKWATTANAKIT S. Clinical Classification, Screening and Diagnosis for Thalassemia. *Hematol Oncol Clin North Am.* 2018 Apr; Vol. 32(2):193-211. doi: 10.1016/j.hoc.2017.11.006. PMID: 29458726.
41. TAHER AT, WEATHERALL DJ, CAPPELLINI MD. Thalassaemia. *Lancet.* 2018 Jan , Vol. 13;391(10116):155-167. doi: 10.1016/S0140-6736(17)31822-6. Epub 2017 Jul 31. PMID: 28774421.
42. INRS. *Monoxyde de carbone Fiche Toxicologique n°47*. INRS , Avril 2021. Numéro CE 211-128-3.
43. ZENGIN S, YILMAZ M, AI B. Therapeutic red cell exchange for severe carbon monoxide poisoning. *J Clin Apher.* 2013 Oct; Vol. 28(5):337-40. doi: 10.1002/jca.21282. Epub 2013 Jun 8. PMID: 23749385.
44. BRUNO S, BONACCIO M, BETTATI S. High and low oxygen affinity conformations of T state hemoglobin. *Protein Sci.* 2001 Nov; Vol. 10(11):2401-7. doi: 10.1110/ps.20501. PMID: 11604545; PMCID: PMC2374069.

45. OTSUKA J, KUNISAWA T. Conformational change and cooperative ligand binding in hemoglobin. *Adv Biophys.* 1978; Vol. 11:53-92. PMID: 27956.
46. SHIBAYAMA N. Allosteric transitions in hemoglobin revisited. *Biochim Biophys Acta Gen Subj.* 2020 Feb Vol. 1864(2):129335. doi: 10.1016/j.bbagen.2019.03.021. Epub 2019 Apr 2. PMID: 30951803.
47. SHIBAYAMA N, SUGIYAMA K, TAME JR. Capturing the hemoglobin allosteric transition in a single crystal form. *J Am Chem Soc.* 2014 Apr , Vol. 2;136(13):5097-105. doi: 10.1021/ja500380e. Epub 2014 Mar 24. PMID: 24635037.
48. HASHEMI Z, EBRAHIMZADEH MA. Hemoglobin F (HbF) Inducers; History, Structure and Efficacies. *Mini Rev Med Chem.* 2022 Vol. 22(1):52-68. doi: 10.2174/1389557521666210521221615. PMID: 34036918.
49. REES DC., Hemoglobin F and hemoglobin E/beta-thalassemia. *J Pediatr Hematol Oncol.* 2000 Nov-Dec; Vol. 22(6):567-72., doi: 10.1097/00043426-200011000-00025. PMID: 11132232.
50. KLINKEN Peter Red blood cells. *Int J Biochem Cell Biol.* 2002 Dec; Vol. 34(12):1513-8. doi: 10.1016/s1357-2725(02)00087-0. PMID: 12379271.
51. GUVEN G, HILTY MP, INCE C. Microcirculation: Physiology, Pathophysiology, and Clinical Application. *Blood Purif.* 49(1-2): 2020; Vol. Vol. 143-150., doi: 10.1159/000503775. Epub 2019 Dec 18. PMID: 31851980; PMCID: PMC7114900.
52. BENEDIK PS, HAMLIN SK. The physiologic role of erythrocytes in oxygen delivery and implications for blood storage. *Crit Care Nurs Clin North Am.* 2014 Sep; Vol. 26(3):325-35. doi: 10.1016/j.ccell.2014.04.002. PMID: 25169686.
53. LOPES DE ALMEIDA JP, OLIVEIRA S, SALDANHA C. Erythrocyte as a biological sensor. *Clin Hemorheol Microcirc.* 2012, Vol. 51(1):1-20. doi: 10.3233/CH-2011-1512.
54. GLADWIN MT., Role of the red blood cell in nitric oxide homeostasis and hypoxic vasodilation. *Adv Exp Med Biol* 2006; Vol. 588:189-205.
55. ZHAO Y, WANG X, NOVIANA M, Nitric oxide in red blood cell adaptation to hypoxia. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai).*2018 Jul, Vol. 1;50(7):621-634.
56. DZIERZAK E, PHILIPSEN S. Erythropoiesis: development and differentiation. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2013 Apr Vol. 1;3(4):a011601. doi: 10.1101/cshperspect.a011601. PMID: 23545573; PMCID: PMC3684002.
57. HERMINE O., ZERMATI y. Régulation de l' érythropoïèse. *Hématologie.*, 2001, Vol. n° spécial 7, 7-11.
58. LEVY J.-P., VARET 8., CLAUVEL J.-P. *Hématologie et transfusion.* Paris Masson 2001. 388p.- (Abrégés connaissances et pratique).
59. ROYER B., AROCK M. Utilisations thérapeutiques des facteurs de croissance 1. Érythropoïétine et thrombopoïétine. *Ann. Biol. Clin.* 1998, Vol. 56, 2, 143-152.
60. VAINCHENKER W. Les cellules souches hématopoïétique . *Thérapie.* 2001, Vol. 56, 4,379-381.
61. BONNET B. Haematopoietic stem cells. *J Pathol.* 2002 Vol. 197(4):430-40.

62. SZILVASSY SJ, NICOLINI FE, EAVES CJ. Quantitation of murine and human hematopoietic stem cells by limiting-dilution analysis in competitively repopulated hosts. *Methods Mol Med.* 2002; Vol. 63:167-87.
63. SPANGRUDE GJ, HEIMFEL S, WEISSMAN IL. Purification and characterization of mouse hematopoietic stem cells. *Science.* 1988; Vol. 241(4861):58-62.
64. GUYOTAT D. Cellules souches hématopoïétiques. *Transfus. Clin. BioL, IQ,* 2003, Vol. 206-208.
65. LEPORIER M. *Hématologie.* Paris: InterMed, 1999. - 414p.
66. COULOMB EL L., PONDARRE C., BENNACEUR A. *Cellules souches hématopoïétiques Bull.* Paris : Acad. Natle. Med., 2000. 184, 6, 1201-1212.
67. COMAZZETTO S, SHEN B, MORRISON SJ. Niches that regulate stem cells and hematopoiesis in adult bone marrow. *Dev Cell.* 2021 Jul , Vol. 12;56(13):1848-1860. PMID: 34146467; PMCID: PMC8282762 doi: 10.1016/j.devcel.2021.05.018. Epub 2021
68. MAYANI H., A glance into somatic stem cell biology: basic principles, new concepts, and clinical relevance. *Arch Med Res.* 2003; Vol. 34(1):3–15.
69. BRADLEY TR, METCALF D. The growth of mouse bone marrow cells in vitro. *Aust J Exp Biol Med Sci.* 1966; Vol. 44(3):287-99.
70. METCALF D. Hemopoietic colonies: in vitro cloning of normal and leukemic cells. . *Recent Results Cancer Res.* 1977; Vol. (61): 1-227.
71. GREGORY C.J., EAVES A.C. Human marrow cells capable of erythropoietic differentiation in vitro: definition of three erythroid colony responses. *Blood .* 1977, Vol. 49, 855–864.
72. GREGORY CJ. Three stages of erythropoietic progenitor cell differentiation distinguished by a number of physical and biologic properties. *Blood .* 1978 , Vol. 51, 527–537.
73. SEBAHOUN. G. Erythopoïèse . *Hématologie clinique et biologique . /* ed. par Gérard SEBAHOUN., 2005., Vol. Rueil-Malmaison: Arnette,, 578p.
74. CASADEVALL N., VAINCHENKER W. L'érythropoïèse et sa régulation. *Rey. Prat.* 1993, Vol. 11, II, 1335-1340.
75. AUBOURDOLLE V. *Hématologie.* Rueil-Malmaison: Groupe Liaisons Santé, (Le Moniteur Internat), 2000. -3-301p.
76. MARTINI FH, TIMMONS MJ, TALLITSCH RB. *Human Anatomy.* San Francisco : 7th ed. Pearson Benjamin Cummings , 2012.
77. YOUNG B, O'DOWD G, WOODFORD P (eds.). *Wheaters's Functional Histology.* s.l. : 6th ed. Churchill Livingston, 2014.
78. UK., Cancer Research. Cancer, the Blood and Circulation. *Cancer Research UK;* . [Enligne]2014:<http://www.cancerresearchuk.org/about-cancer/what-is-cancer/body-systems-and-cancer/cancer-the-blood-and-circulation>.
79. BESSIS M. Erythroblastic island, functional unity of bone marrow. *Rev Hematol.* 1958;Vol. 13:8–11.

80. HANSPAL M., HANSPAL J.S. The association of erythroblasts with macrophages promotes erythroid proliferation and maturation: a 30-kD heparin-binding protein is involved in this contact. *Blood*, Nov 1994, Vol. 15;84(10):3494-504, PMID:7949103.
81. SADAHIRA Y, YOSHINO T, MONOBE Y. Very late activation antigen 4-vascular cell adhesion molecule 1 interaction is involved in the formation of erythroblastic islands. *J Exp Med*. 1995; Vol. 181:411–415.
82. HAMAMURA K, MATSUDA H, TAKEUCHI Y,. A critical role of VLA-4 in erythropoiesis in vivo. *Blood*. 1996; Vol. 87:2513–2517.
83. QIU LB, DICKSON H, CROCKER PR. Extruded erythroblast nuclei are bound and phagocytosed by a novel macrophage receptor. *Blood*. 1995, Vol. 85:1630–1639.
84. MANWANI D, BIEKER JJ. The erythroblastic island. *Curr Top Dev Biol*. 2008, Vol. 82:23-53.doi:10.1016/S0070-2153(07)00002-6.PMID: 18282516; PMCID: PMC3234703.
85. CHASIS JA, MOHANDAS N. Erythroblastic islands: niches for erythropoiesis. *Blood*. . 2008 Aug, Vol. 1;112(3):470-8., doi: 10.1182/blood-2008-03-077883.
86. AVIGDOR A, DAR A, PELED A, CD44 and hyaluronic acid cooperate with SDF-1 in the trafficking of human CD34+ stem/progenitor cells to bone marrow. *Blood*. 2004; , Vol. 103(8):2981-9.
87. BAEK EJ, KIM HS, In vitro clinical-grade generation of red blood cells from human umbilical cord blood CD34+ cells. *Transfusion*. 2008 Oct, Vol. 48(10):2235-45.,
88. COURTOIS G., COULON S. BELAID Z. L'érythropoïèse tardive : une mort avortée ? *Hématologie* (2007) Vol. 13, 400–408.
89. MUTA K., KRANTZ S.B., DAI C.H. Stem cell factor retards differentiation of normal human erythroid progenitor cells while stimulating proliferation *Blood*. (1995). Vol. Vol. 86, 572–580.
90. MCNIECE I.K., LANGLEY K.E., ZSEBO K.M. Recombinant human stem cell factor synergises with GM-CSF, G-CSF, IL-3 and epo to stimulate human progenitor cells of the myeloid and erythroid lineages. *Exp. Hematol*. (1991). Vol. 19, 226–231.
91. MUTA, K., KRANTZ S.B.. Distinct roles of erythropoietin, insulin-like growth factor I, and stem cell factor in the development of erythroid progenitor cells. *J. Clin. Invest*. .1994. Vol. 94, 34–43.
92. CORAZZA F. La régulation de l' érythropoïèse : acquisitions récentes et incertitudes actuelles. *Rev. Méd. Brux*. 1990 Vol. li, 4, 109-117.
93. KOURY MJ, SAWYER ST, BRANDT SJ. New insights into erythropoiesis. *Curr Opin Hematol*. 2002 Mar, Vol. 9(2):93-100. doi: 10.1097/00062752-200203000-00002.
94. QUESNIAUX VF, CLARK SC, TURNER. Interleukin-11 stimulates multiple phases of erythropoiesis in vitro. *Blood*. 1, 1992 Sep, Vol. 80(5):1218-1223., PMID: 1381240.
95. KUCIA M, RECA R, ZHANG J. CXCR4-SDF-1 signalling, locomotion, chemotaxis and adhesion. *J Mol Histol*. 2004 Mar; Vol. 35(3):233-45., doi:10.1023/b
96. PELED A, KOLLET O, PETIT I, The chemokine SDF-1 activates the integrins LFA-1, VLA-4, and VLA-5 on immature human CD34(+) cells: role in

- transendothelial/stromal migration and engraftment of NOD/SCID mice. *Blood*. 2000; Vol. 95(11): 3289-96.
97. VOERMANS C, KOOI ML, RODENHUIS S. In vitro migratory capacity of CD34+ cells is related to hematopoietic recovery after autologous stem cell transplantation. *Blood*. 2001; Vol. 97(3): 799-804.
98. REIMOND AM. TNFalpha as therapeutic target: new drugs, more applications. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy*. 2002; Vol. 1(4):, 377-92.
99. HATZFELD JA, MONIER MN, HATZFELD A. Control of hematopoietic stem/progenitor cell fate by transforming growth factor-beta. *Oncol Res* . 2003; Vol. 13(6-10):, 445-53.
100. KIM SJ, LETTERIO J. Transforming growth factor-beta signaling in normal and malignant hematopoiesis. *Leukemia*. 2003; Vol. 17(9): 1731-7.
101. DI NICOLA M, CARLO-STELLA C, MAGNI M. Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. *Blood*. 2002 Vol. 99(10), 3838-43.
102. MIYAGAWA S., SATO T., UEDA K. Insulin and insulin-like growth factor I support the proliferation of erythroid progenitor cells in bone marrow through the sharing of receptors. *Br. J. Haematol.* (2000), Vol. 109, 555–562.
103. BAUER A., SCHUTZ G., BEUG H. The glucocorticoid receptor is required for stress erythropoiesis. *Genes Dev.* (1999). Vol. 13, 2996-3002.
104. RITSUKO Shimizu, CECELIA Trainor. GATA-1 Self-association Controls Erythroid Development in Vivo. *Journal of Biological Chemistry*. 2007, Vol. 282, Issue 21
105. KOURY MJ, GRABER SE *Erythropoietin messenger RNA levels in developing mice and transfer of 125I-erythropoietin by the placenta*. *J. Clin. Invest.* (1988). Vol. 82, 154–159.
106. DALLE B., HENRI A., BEUZARD y. Gène de l' érythropoïétine: régulation et intérêt thérapeutique. *Hématol. Cell. Therap.* 39, 1997, Vol. 2, 109-113.
107. RICHMOND T.D., CHOCHAN, M. Turning cells red: signal transduction mediated by erythropoietin. *Trends Cell Biol.* 12 (2005). Vol. 15, 146–155.
108. CASADEVALL N. *Physiologie de l'érythropoïétine et utilisation thérapeutique* Ann. Pharm. Fr., 1996, 54,4, 151-156.
109. SPIVAK J.L. The anaemia of cancer: death by a thousand cuts. *Nat. Rev. Cancer.* (2005), Vol. 5,, 543–555.
110. HERMINE O., ZERMATI Y. Régulation de l' érythropoïèse. *Hématologie*. 2001, Vol.n° spécial 7, 7-11.
111. MIYAKE T., KUNG, C.K. Purification of human erythropoietin. *J. Biol. Chem.* (1977). , Vol. 252, 5558–5564.
112. STORRING P.-L., TIPLADY R.-J., GAINES DAS R.-E. Epoetin alfa and beta differ in their erythropoietin isofonn compositions and biological properties. *Br. J. Haematol.* 1998, Vol. 100, I, 79-89.

113. GOTO M., AKAI K., MURAKAMI A. Production of recombinant human erythropoietin in mammalian cells : host -cell dependency of the biological activity of the cloned glycoprotein. *Biotechnology* 1988 Vol. 2, 67-71.
114. EGRIE. The cloning and production of recombinant human erythropoietin. *Pharmacotherapy*, IQ (2 Pt 2), 3S-8S, 1990, .
115. KHODAEI M, GROTHE HL. Athletes at High Altitude. *Sports Health*. 8(2):126-32, 2016 Mar-Apr;doi: 10.1177/1941738116630948.
116. BAILEY DM, DAVIES B. Physiological implications of altitude training for endurance performance at sea level: a review. *Br J Sports Med*. 1997 Sep Vol. 31(3):183-90. doi: 10.1136/bjism.31.3.183. PMID: 9298550; PMCID: PMC1332514.
117. SIMON KC, KEITH B. The role of oxygen availability in embryonic development and stem cell function. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2008; Vol. 9(4):285-96.
118. WILD JM, FICHELE S, PALEY MN, 3D volume-localized pO₂ measurement in the human lung with ³He MRI. *Magn Reson Med* . 2005; Vol. 53(5):1055-64.
119. MIK EG, RAAT NJ, INCE C. Quantitative determination of localized tissue oxygen concentration in vivo by two-photon excitation phosphorescence lifetime measurements. *J Appl Physiol*. 2004; , Vol. 97(5):1962-9.
120. NDUBUIZU O, LAMANNA JC. Brain tissue oxygen concentration measurements. . *Antioxid Redox Signal*. 2007 Aug;Vol. 9(8):1207-19. doi: 10.1089/ars.2007.1634.
121. YU DY, CRINGLE SJ. Retinal degeneration and local oxygen metabolism. *Exp Eye Res*. 2005; Vol. 80(6):745-51.
122. CHOW DC, MILLER WM. Modeling pO₂ distributions in the bone marrow hematopoietic compartment. *Krogh's model. Biophys J*. 2001; Vol. 81(2):675-84.
123. NILSSON SK, JOHNSTON HM, COVERDALE JA. Spatial localization of transplanted hemopoietic stem cells: Inferences for the localization of stem cell niches. *Blood*. 2001., Vol. 97: 2293–2299.
124. IVANOVIC Zoran. Hypoxia or in situ normoxia: The stem cell paradigm. *J. Cell. Physiol*. 2009b; Vol. 219(2): 271-275.
125. HAMMOUD M, VLASKI M, LAFARGE X. Combination of low O₂ concentration and mesenchymal stromal cells during culture of cord blood CD34(+) cells improves the maintenance and proliferative capacity of hematopoietic stem cells. *J Cell Physiol*. 2012 Jun, Vol. ;227(6): 2750-8.
126. VLASKI M, LAFARGE X, IVANOVIC Z. Low oxygen concentration as a general physiologic regulator of erythropoiesis beyond the EPO-related downstream tuning and a Low oxygen concentration as a general physiologic regulator of erythropoiesis beyond the EPO-related downstream tuning and a tool fo. *the optimization of red blood cell production ex vivo. Experimental Hematology*. Elsevier, 2009, Vol.;37, :573–584.
127. YOON-YOUNG Jang, SAUL J. A low level of reactive oxygen species selects for primitive hematopoietic stem cells that may reside in the low-oxygenic niche. *Blood*. 2007, Vol. 110 (8):, 3056–3063.

- 128.CLOTTE E. Le facteur induit par l'hypoxie HIF-1 : régulation, implication dans la carcinogenèse et cible thérapeutique anti-cancer. *Bull. Cancer*, 2005 , Vol. 92, 2,119-127.
- 129.JEWELL, U.R., SCHEIND A., BAUER C.. Induction of HIF-1alpha in response to hypoxia is instantaneous. *FASEB J* 2001 Vol. 15, , 1312–1314.
- 130.WANG GL, Characterization of hypoxia-inducible factor 1 and regulation of DNA binding activity by hypoxia. *J Biol Chem*. 1993; Vol. 268(29):21513-8.
- 131.SEMENZA GL. Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat Rev Cancer*. 2003 Oct; Vol. 3(10):721-32.
- 132.GOTHIE Emmanuel, POUYSSEGUR Jacques HIF-1 : régulateur central de l'hypoxie. *Med Sci* . (Paris) 2002, Vol. 18 (1) 70-78, DOI: 10.1051/medsci/200218170.
- 133.PEYSSONNAUX C., Les facteurs de transcription HIF: régulateurs clés du métabolisme du fer?. *Med Sci (Paris)*. 2008 Feb; Vol. 24(2):137-8, doi: 10.1051/medsci/2008242137.
- 134.BEAUMONT C, CANONNE-HERGAUX François. Erythrophagocytosis and recycling of heme iron in normal and pathological conditions; regulation by hepcidin. *Transfusion clinique et biologique : journal de la Société française de transfusion sanguine*. 2005
- 135.AIME-GENTY N. *Le sang, dictionnaire encyclopédique*. Paris Vuibert, 1999.- 223p.
- 136.AUBOURDOLLE V. *Hématologie*. Rueil-Malmaison: Groupe Liaisons Santé : (Le Moniteur Internat), 2000. -3, 301p.
- 137.DEXTER TM, TESTA NG, Molecular and cell biologic aspects of erythropoiesis in long-term bone marrow cultures. *Blood*.1981 Oct, Vol. ;58(4):699-707,
- 138.MALIK P, FISHER TC, BARSKY LL, An in vitro model of human red blood cell production from hematopoietic progenitor cells. *Blood*. 1998; Vol. 91 : 2664–71.
- 139.NEILDEZ-NGUYE TM, MARDEN MC, et al. Human erythroid cells produced ex vivo at large scale differentiate into red blood cells in vivo. *Nature Biotechnology*. 2002 May, Vol. 20(5):467-472. DOI: 10.1038/nbt0502-467. PMID: 11981559.
- 140.DOUAY Luc, GIARRATANA Marie-Catherine. Génération in vitro de globules rouges humains matures et fonctionnels : un modèle d'étude aux perspectives multidisciplinaires,. *Bulletin de l'Académie Nationale de Médecine*,. 2005, , Vol. 189, Issue 5, Pages 903-915,, ISSN 0001-4079, [https://doi.org/10.1016/S0001-4079\(19\)33517-4](https://doi.org/10.1016/S0001-4079(19)33517-4).
- 141.GIARRATANA MC, ROUARD H, DOUAY L. Proof of principle for transfusion of in vitro-generated red blood cells. *Blood*. 2011 Nov 10. Vol. 118(19):5071-9.
- 142.SHAO L, LI H, Reactive oxygen species and hematopoietic stem cell senescence. *Int J Hematol*. 2011 Jul; Vol. 94(1):24-32, doi: 10.1007/s12185-011-0872-1.
- 143.ZHOU D, SHAO L, SPITZ DR. Reactive oxygen species in normal and tumor stem cells. *Adv Cancer Res*. 2014;Vol. 122:1-67.doi: 10.1016/B978-0-12-420117-0.00001-3.

- 144.FAN J, CAI H, TAN WS. Role of the plasma membrane ROS-generating NADPH oxidase in CD34+ progenitor cells preservation by hypoxia. *J Biotechnol.* . 2007; , Vol. 130 (4): 455-62.
- 145.FAN J, CAI H, YANG S, Comparison between the effects of normoxia and hypoxia on antioxidant enzymes and glutathione redox state in ex vivo culture of CD34(+) cells. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol.* 2008; Vol. 151(2):153-8.
- 146.PRIETO-BERMEJO R,. Reactive oxygen species in haematopoiesis: leukaemic cells take a walk on the wild side.*J Exp Clin Cancer Res.* 2018 Jun 26; Vol. 37(1):125
- 147.BIGARELLA CL. tem cells and the impact of ROS signaling. *Development.* 2014 Vol141(22):4206-18. doi: 10.1242/dev.107086. PMID: 25371358; PMCID: PMC4302918.
- 148.ROMO-GONZALEZ R. Reactive Oxygen Species and Metabolism in Leukemia: A Dangerous Liaison. *Front Immunol.* 2022 Jun 9;, Vol. 13:889875. doi: 10.3389/fimmu.2022.889875. PMID: 35757686; PMCID: PMC9218220.
- 149.IVANOVIC Z, BELLOC F, DELLO SBARBA P. Hypoxia maintains and interleukin-3 reduces the pre-colony-forming cell potential of dividing CD34(+) murine bone marrow cells. *Exp Hematol.* 2002;, Vol. 30(1): 67-73.
- 150.DOS SANTOS F, ANDRADE PZ, BOURA JS,. Ex vivo expansion of human mesenchymal stem cells: a more effective cell proliferation kinetics and metabolism under hypoxia. *J Cell Physiol* 2010; Vol. 223(1):27-35.
- 151.JIN Y, KATO T, FURU M,. Mesenchymal stem cells cultured under hypoxia escape from senescence via down-regulation of p16 and extracellular signal regulated kinase. *Biochem Biophys Res Commun.* 2010; , Vol. 391(3):1471-6.
- 152.BERTRAM C, HASS R. Cellular responses to reactive oxygen species-induced DNA damage and aging. *Biol Chem.* 2008 Mar;389(3):211-20, doi: 10.1515/BC.2008.031.
- 153.VLASKI Marija, LAFARGE Xavier, IVANOVIC Zoran. Low oxygen concentration as a general physiologic regulator of erythropoiesis beyond the EPO-related downstream tuning and a tool for the optimization of red blood cell production ex vivo. *Experimental Hematology.* 2009, Vol. 37:, 573–584.
- 154.CIPOLLESCHICi MG. Severe hypoxia enhances the formation of erythroid bursts from human cord blood cells and the maintenance of BFU-E in vitro. *Exp Hematol.* 1997; Vol. 25:, 1187–1194.
- 155.SIMSEK T, KOCABAS F, ZHENKG J, The distinct metabolic profile of hematopoietic stem cells reflects their location in a hypoxic niche.*Stem Cell.* 2010 Vol. 7(3):380-90.
- 156.KUBOTA Y, TAKUBO K, SUDA. Bone marrow long label-retaining cells reside in the sinusoidal hypoxic niche.*Biochem Biophys Res Commun.* 2008;Vol. 366(2):335-9.
- 157.CHRISTAKI EE, Ex vivo generation of transfusable red blood cells from various stem cell sources: A concise revisit of where we are now. *Transfus Apher Sci.* . 2019 Feb; Vol. 58(1):108-112. doi: 10.1016/j.transci.2018.12.015. Epub 2018 Dec 31.
- 158.MARTELLO G, SMITH A. The nature of embryonic stem cells. . *Annu Rev Cell Dev Biol.*2014,Vol;30:647-75.doi:10.1146/annurev-cellbio-100913-013116.
- 159.OKANO H,.PS cell technologies: significance and applications to CNS regeneration and disease. *Mol Brain.* 2014 Mar, Vol. 31;7:22. , doi: 10.1186/1756-6606-7-22.

160. MUNGENAST AE, SIEGERT S, TSAI LH. Modeling Alzheimer's disease with human induced pluripotent stem (iPS) cells. *Mol Cell Neurosci*. 2016 Jun, Vol. 73:13-31. doi: 10.1016/j.mcn.2015.11.010. Epub 2015 Dec 4. PMID: 26657644; PMCID: PMC5930170.
161. Registre France Greffe de Moelle. *Agence Biomédecine* . [En ligne] Bénédicte Vincent / Fabienne Tong, 28 09 2006 <https://www.agence-biomedecine.fr/Registre-France-Greffe-de-Moelle#>.
162. DEOTARE U, COUBAN S. G-CSF-primed bone marrow as a source of stem cells for allografting: revisiting the concept. *Bone Marrow Transplant*. 2015 Sep; Vol. 50(9):1150-6. , doi: 10.1038/bmt.2015.80. Epub 2015 Apr 27. PMID: 25915812.
163. GURMAN G, KAHVECI G, AKAN H I, et al. Allogeneic peripheral blood stem cell transplantation as a second transplant for severe aplastic anemia. *Bone Marrow Transplant*. 1995; Vol. 15(3):485-6.
164. BARON F, STORB R, LITTLE MT. Hematopoietic cell transplantation: five decades of progress. *ArchMed Res*. 2003 Vol. 34(6):528-44.
165. EAVES CJ. Peripheral blood stem cells reach new heights. *Blood*. 1993; Vol. 82(7):1957-9.
166. LOCATELLI F, ROCHA V, CHASTANG C, Factors associated with outcome after cord blood transplantation in children with acute leukemia. *Blood*. Eurocord-Cord Blood Transplant Group, 1999; Vol. 93(11):3662-71.
167. LIN J, ZENG J, SUN W Colloidal Self-Assembled Patterns Maintain the Pluripotency and Promote the Hemopoietic Potential of Human Embryonic Stem Cells. *Front Cell Dev Biol*. 2021 Nov 16 Vol. 9:771773. doi: 10.3389/fcell.2021.771773.
168. Agence National de Sécurité du Médicament et des Produits de Santé. IDHIFA . ANSM . 19 09 2023. <https://ansm.sante.fr/tableau-acces-derogatoire/idhifa#..>
169. Celgene Corporation. *MONOGRAPHIE DE PRODUIT* . Mississauga (Ontario) 2019.
170. XU W, YANG H Oncometabolite 2-hydroxyglutarate is a competitive inhibitor of α -ketoglutarate-dependent dioxygenases. *Cancer Cell*. 2011 Jan Vol. 18;19(1):17–30.
171. FERRET Yann. Impact pronostique de la maladie résiduelle par quantification des mutations d'IDH1/2 Impact pronostique de la maladie résiduelle par quantification des mutations d'IDH1/2. *Sciences pharmaceutiques*. 2016., dumas-01401995.
172. RAFFOUX E., DE BOTTON S. edimark., 10 2018. [https://www.edimark.fr/correspondances-onco-hematologie/inhibiteurs-idh-mecanismes-action-resultats-therapeutiques. .](https://www.edimark.fr/correspondances-onco-hematologie/inhibiteurs-idh-mecanismes-action-resultats-therapeutiques.)
173. AMIR T., FATHI MD Number 8 Differentiation Syndrome Associated With Enasidenib. *Boston : JAMA Oncology* August 2018, Vol. 4
174. ZHOU S, ZONG Y, NEY PA. Increased expression of the Abcg2 transporter during erythroid maturation plays a role in decreasing cellular protoporphyrin IX levels. *Blood*. 2005, Vol. 105(6):2571–2576.
175. KOBUCHI H., Mitochondrial localization of ABC transporter ABCG2 and its function in 5-aminolevulinic acid-mediated protoporphyrin IX accumulation. *PLoS One*. 2012; Vol. 7(11), e50082.

176. GIARRATANA MC, Proof of principle for transfusion of in vitro-generated red blood cells: *Blood*. 2011 Nov 10, Vol. 118(19):5071-9., doi: 10.1182
177. VERFAILLIE CM. Soluble factor(s) produced by human bone marrow stroma increase cytokine-induced proliferation and maturation of primitive hematopoietic progenitors while preventing their terminal differentiation. *Blood*. 1993, Vol. 82 2045-2053.
178. UDOMSAKDI C, REID DS, EAVES AC Characterization of primitive hematopoietic cells in normal human peripheral blood. *Blood*. 1992; Vol. 80(10): 2513-21.
179. IVANOVIC Z, MORGAN DA, HERMITTE F, Whole-blood leuko-depletion filters as a source of CD 34+ progenitors potentially usable in cell therapy. *Transfusion*. 2006; , Vol. 46(1):118-25.
180. DUTTA Rikita, ZHANG TY, MAJETI R. Enasidenib drives human erythroid differentiation independently of isocitrate dehydrogenase 2. *he Journal of Clinical Investigation*. 2020 Avr, Vol. 1;130(4) 1843–1849, <https://doi.org/10.1172/JCI133344>. PMID: 31895700; PMCID: PMC7108889.
181. VERMES V. *A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V*. *J. Immunol*, (1995)., Vol. Methods 184, 39–51.
182. <https://www.fishersci.fr/shop/products/celltrace-cfse-cell-proliferation-kit-flow-cytometry-2/15598431>. *fishersci*. [En ligne] maj 2022.
183. LEVY J. E., JIN O, KUO, F., Transferrin receptor is necessary for development of erythrocytes and the nervous system. *Nat Genet*. 1999, Vol. 21(4) 396-399, <https://doi.org/10.1038/7727>.
184. Morphologie érythrocytaire (partie 2) : anomalies de forme des GR. *Hematocell*. [En ligne] septembre 2012. <https://hematocell.fr/morphologie-des-hematies-sur-frottis-sanguin-et-principales-anomalies/morphologie-erythrocytaire-partie-2-anomalies-de-forme-des-gr>.
185. <https://www.hematocell.fr/index.php/enseignement-de-lhematologie-cellulaire/globules-rouges-et-leur-pathologie/26-physiologie-du-globule-rouge>. Physiologie du globule rouge . *Hematocell*. [En ligne] université d'Angers, octobre 2011. <https://hematocell.fr/globules-rouges-et-leur-pathologie/physiologie-du-globule-rouge>.
186. MESLIER, UFR SANTE. Transport des gaz dans le sang. *Université Anger*. UE21 , 2019-2020. <https://p1.asso2atp.fr/wp-content/uploads/2019/10/UE21-Meslier-CAD-2-Transport-des-gaz-dans-le-sang.pdf>. © ASSOCIATION 2ATP.
187. COURTOIS G, DUSSIOT M, COULON S. *L'érythropoïèse tardive : une mort avortée ?*: *Hématologie* , (2007). , Vol. 13, 400–408.
188. MUTA K, DAI CH, BONDURANT MC *Stem cell factor retards differentiation of normal human erythroid progenitor cells while stimulating proliferation*. 572–580., *Blood* , (1995). , Vol. 86, .
189. KOURY MJ, New insights into erythropoiesis. *Curr Opin Hematol*. 2002 Mar; Vol. 9(2):93-100. , doi: 10.1097/00062752-200203000-00002. PMID: 11844990.

190. MIYAGAWA S, SATO T, UEDA K. Insulin and insulin-like growth factor I support the proliferation of erythroid progenitor cells in bone marrow through the sharing of receptors. *Br. J. Haematol.* (2000), Vol. 109, 555–562.
191. BAUER A., TRONCHE F., WESSELY O. The glucocorticoid receptor is required for stress erythropoiesis. *Genes Dev.* (1999). Vol. 13, 2996-3002.
192. MURPHY MJ Jr, LORD BI. Hematopoietic stem cell regulation. Acute effects of hypoxic-hypoxia on CFU kinetics. *Blood.* 1973, Vol. 42(1): 81-7.
193. VLASKI Marija, LAFARGE Xavier, IVANOVIC Zoran. Low oxygen concentration as a general physiologic regulator of erythropoiesis beyond the EPO-related downstream tuning and a tool for the optimization of red blood cell production ex vivo. *Experimental Hematology* . 2009, Vol. 37:, 573–584.
194. CIPOLLESCHI Cipolleschi Severe hypoxia enhances the formation of erythroid bursts from human cord blood cells and the maintenance of BFU-E in vitro. *Exp Hematol.* 1997; Vol.25: 1187–1194.
195. NG T, MARX G, Recombinant erythropoietin in clinical practice. *Postgrad Med J* , (2003). Vol. 79(933), 367–376.
196. JANSSEN-CILAG, Laboratoires. *Eprex' : Érythropoïétine humaine recombinante.* 1992; 67p.
197. DEICHER R., HORL W. Differentiating factors between erythropoiesis-stimulating agents. *Drugs* . 2004, Vol. 64,5,499-509.
198. TOPF JM. CERA: third-generation erythropoiesis-stimulating agent. . *Expert Opin Pharmacother.* 2008 Apr; Vol. 9(5):839-49., doi: 10.1517/14656566.9.5.839.
199. SCHMID H., Methoxy polyethylene glycol-epoetin beta for the treatment of anemia associated with chronic renal failure. *Expert Rev Hematol.* 2016 Jan; Vol. 9(1):5-20., doi: 10.1586/17474086.2016.1112734. Epub 2015 Nov 17. PMID: 26573694.
200. HAS (Haute Autorité de Santé) - Commission de la Transparence. *AFSSAPS : Examen du dossier des spécialités inscrites pour une durée de 5 ans par arrêté du 27 mai, 6 octobre 2010. Code ATC : B03XA02.*
201. ELIASSON E. The hematopoietic stem cell niche: low in oxygen but a nice place to be. *J Cell Physiol.* 2010 Jan; Vol. 222(1):17-22. doi: 10.1002/jcp.21908.
202. IVANOVIC Zoran, HERMITTE F, BRUNET DE LA GRANGE P., Simultaneous maintenance of human cord blood SCID-repopulating cells and expansion of committed progenitors at low O2 concentration (3%). *Stem Cells.* 2004b; Vol. 22(5):716-24.

VII. Annexes

Annexe 1. Parcours du don de sang placentaire

Parcours du don de sang placentaire



1 Je consulte mon gynécologue-obstétricien ou ma sage-femme qui m'informe.



2 Je réfléchis et je donne mon consentement.



3 J'accouche.



4 Le sang placentaire est prélevé après la naissance de mon enfant.



5 Le sang prélevé est transporté dans les 24 h vers les centres de conservation.



6 Le prélèvement est pesé et la quantité de cellules souches est mesurée.



7 Un examen post-natal est réalisé pour le nouveau-né, un entretien médical et un prélèvement sanguin sont effectués pour la mère.



8 Le prélèvement est alors définitivement validé et enregistré dans le registre France Greffe de Moelle.



9 Le sang placentaire est conservé jusqu'à ce qu'un malade en ait besoin.



10 Le malade est greffé.



11 J'ai peut-être sauvé une vie.

Enasidenib drives human erythroid differentiation independently of isocitrate dehydrogenase 2

Ritika Dutta,^{1,2} Tian Yi Zhang,^{1,2} Thomas Köhnke,¹ Daniel Thomas,¹ Miles Linde,¹ Eric Gars,¹ Melissa Stafford,¹ Satinder Kaur,¹ Yusuke Nakauchi,¹ Raymond Yin,¹ Armon Azizi,¹ Anupama Narla,³ and Ravindra Majeti^{1,2}

¹Department of Medicine, Division of Hematology, Cancer Institute, and Institute for Stem Cell Biology and Regenerative Medicine, Stanford University, Stanford, California, USA. ²Stanford School of Medicine, Stanford, California, USA. ³Department of Pediatrics, Division of Hematology/Oncology, Stanford University, Stanford, California, USA.

Cancer-related anemia is present in more than 60% of newly diagnosed cancer patients and is associated with substantial morbidity and high medical costs. Drugs that enhance erythropoiesis are urgently required to decrease transfusion rates and improve quality of life. Clinical studies have observed an unexpected improvement in hemoglobin and RBC transfusion-independence in patients with acute myeloid leukemia (AML) treated with the isocitrate dehydrogenase 2 (IDH2) mutant-specific inhibitor enasidenib, leading to improved quality of life without a reduction in AML disease burden. Here, we demonstrate that enasidenib enhanced human erythroid differentiation of hematopoietic progenitors. The phenomenon was not observed with other IDH1/2 inhibitors and occurred in IDH2-deficient CRISPR-engineered progenitors independently of D-2-hydroxyglutarate. The effect of enasidenib on hematopoietic progenitors was mediated by protoporphyrin accumulation, driving heme production and erythroid differentiation in committed CD71⁺ progenitors rather than hematopoietic stem cells. Our results position enasidenib as a promising therapeutic agent for improvement of anemia and provide the basis for a clinical trial using enasidenib to decrease transfusion dependence in a wide array of clinical contexts.

Introduction

Acute myeloid leukemia (AML) remains one of the most difficult cancers to treat, with a low cure rate (~25%) and a 5-year survival rate of 28% (1, 2). High-throughput sequencing of AML patient samples has identified mutations, including FMS-like tyrosine kinase 3 (*FLT3*) and isocitrate dehydrogenase 1/2 (*IDH1/IDH2*), for which targeted therapies have been developed. Enasidenib is an FDA-approved, first-in-class agent that preferentially inhibits IDH2-mutant activity and reduces levels of the oncometabolite D-2-hydroxyglutarate (D-2-HG), allowing for differentiation of IDH2-mutated blasts (3–5). Patients with IDH2-mutant AML demonstrated promising clinical responses with enasidenib, leading to its FDA approval in 2017 for IDH2-mutant AML. Notably, patients who did not develop objective responses also derived clinical benefit from enasidenib. Most strikingly, more than 50% of enasidenib-treated patients who did not demonstrate a decrease in their blast count exhibited improvements in their peripheral blood counts and reached RBC transfusion independence (6). The mechanism underlying this phenomenon is unknown, but is of great clinical interest given the high transfusion-dependence and anemia-associated complications universally associated with AML and other cancers (7). Thus, we sought to investigate how enasidenib drives normal hematopoiesis independent of its effects on AML blast differentiation to improve quality of life and reduce morbidity in cancer-related anemia.

Conflict of interest: RM is a founder, equity holder, and board member of Forty Seven Inc. **Copyrights** © 2020, American Society for Clinical Investigation. **Submitted:** September 16, 2019; **Accepted:** December 23, 2019; **Published:** March 3, 2020. **Reference information:** *J Clin Invest.* 2020;130(4):1843–1849. <https://doi.org/10.1172/JCI133344>.

Results and Discussion

We first investigated the effects of enasidenib on normal erythroid differentiation of CD34⁺ hematopoietic stem and progenitor cells (HSPCs) isolated from umbilical cord blood (CB-CD34⁺), and identified enhanced differentiation, indicated by an increase in the percentage of CD71⁺GPA⁺ cells after culture with EPO, SCF, and IL-3 (erythroid differentiation culture [EDC]) for 8 days (Figure 1A left panel; and Supplemental Figure 1, A and B; supplemental material available online with this article; <https://doi.org/10.1172/JCI133344DS1>). CB-CD34⁺ cells from different donors had a wide range of baseline differentiation capacity. Enasidenib was especially effective at increasing differentiation in CB-CD34⁺ cells that had lower baseline differentiation capacity (<40% CD71⁺GPA⁺), with a 2.5-fold increase in the proportion of differentiated cells compared with control (Figure 1A, middle and right panels). Enasidenib increased both the proportion and total number of CD71⁺GPA⁺ cells (Figure 1, A and B) without any decrease in cell viability (Supplemental Figure 2). This increase in erythroid differentiation was dose-dependent and observed at a range of doses from 1–25 μM (Figure 1C). Similar results were observed in CD34⁺ cells isolated from normal human bone marrow (Figure 1D and Supplemental Figure 1C), as well as in the IDH2-WT TF-1 erythroleukemic cell line (Supplemental Figure 1D and Supplemental Figure 4B). No increase in myeloid differentiation (percentage of CD33⁺CD14⁺) was observed in treated cells (Supplemental Figure 3), indicating that enasidenib selectively promotes erythroid differentiation. The enasidenib-mediated increase in percentage of CD71⁺GPA⁺ cells was dependent on EPO signaling and did not occur in the absence of the erythroid differentiation-promoting cytokines (Supplemental Figure 4). In the presence of EPO, enasidenib induced a gene expression signature character-

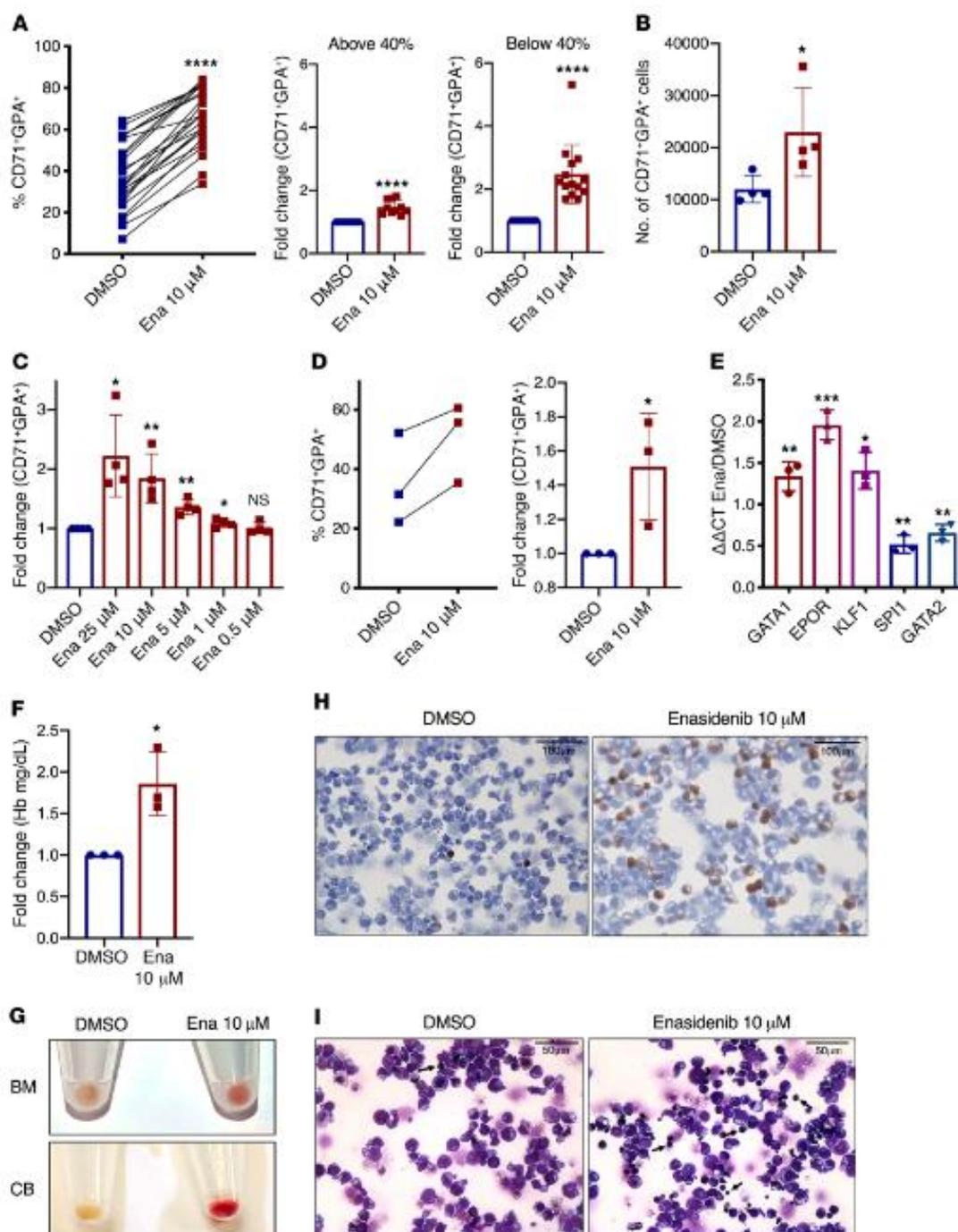


Figure 1. Enasidenib augments erythroid differentiation. (A) Proportion of CD71⁺GPA⁺ (%CD71⁺GPA⁺) cells after 8 days culture of CB-CD34⁺ cells in EDC with DMSO or 10 μM enasidenib (Ena) (left; n = 24 independent CB specimens). Fold change (FC) of percentage of CD71⁺GPA⁺ cells (DMSO = 1) cells with baseline differentiation capacity (%CD71⁺GPA⁺) of less than 40% (right; n = 14) or greater than 40% (middle; n = 10). (B) Number of CB-derived CD71⁺GPA⁺ cells at day 8 of EDC (n = 4). (C) Dose response of enasidenib, represented as FC of percentage of CD71⁺GPA⁺ cells (DMSO = 1) at day 8 of EDC (n = 4). (D) Proportion of CD71⁺GPA⁺ cells at day 8 of EDC of CD34⁺ cells from normal bone marrow (BM) (left; n = 3). FC of percentage of CD71⁺GPA⁺ cells (DMSO = 1) (right; n = 3). (E) qPCR detection of relative RNA expression of erythroid and myeloid transcription factors with enasidenib treatment compared with DMSO of CB-CD34⁺ cells at day 8 of EDC (DMSO = 1) (n = 3). (F) FC of hemoglobin in a colorimetric assay after 14 days in EDC (DMSO=1) (n = 3). (G) Representative cell pellets from normal BM (top panel) and CB (bottom panel) after 14 days in EDC (n = 3). (H) Representative image at day 8 of CB-CD34⁺ cells in EDC treated with DMSO or 10 μM enasidenib (n = 3) and stained with benzidine. (I) Representative image at day 8 of CB-CD34⁺ cells in EDC treated with DMSO or 10 μM enasidenib (n = 3) and stained with Wright-Giemsa. Arrows indicate maturing erythrocytes. Graphs represent mean ± SD. Statistical significance was calculated using unpaired 2-tailed t tests. *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001, ****P < 0.0001.

istic of maturing erythrocytes (8), with increased expression of *GATA1*, *EPOR*, and *KLFI1*, and decreased *SP1* and *GATA2* (Figure 1E and Supplemental Figure 4). Enasidenib-treated progenitor cells further demonstrated increased hemoglobin production (Figure 1, F-H) and morphologic characteristics of increased erythroid maturation, including decreased cell size and nuclear condensation (Figure 1I). Given the important role of HIF1 α in erythropoiesis and IDH1/2 mutant signaling pathways (9–11), we performed differentiation studies in hypoxic conditions and found that enasidenib also drives erythroid differentiation at lowered oxygen tension (Supplemental Figure 5).

The capacity to increase erythroid differentiation was unique to enasidenib in the class of IDH inhibitors, as AG-120 (a mutant IDH1 inhibitor), AGI-6780 (a mutant IDH2 inhibitor), and AG-881 (a dual mutant IDH1 and IDH2 inhibitor), did not exhibit the same effects at a range of doses from 1–10 μ M (Figure 2A). As expected, enasidenib, AGI-6780, and AG-881 completely suppressed D-2-HG in a THP-1 cell line overexpressing mutant IDH2-R140Q (Supplemental Figure 6, A and B). To explore whether the effect of enasidenib on erythroid differentiation was mediated through D-2-HG, we measured D-2-HG levels in the differentiating erythroid progenitors. As expected for normal HSPCs, D-2-HG was not present at detectable levels in either the DMSO or enasidenib-treated conditions (Figure 2B). Furthermore, addition of a cell-permeable derivative of D-2-HG (2R-octyl- α -hydroxyglutarate) at either 50 or 200 μ M did not affect the ability of enasidenib to increase the proportion of CD71⁺GPA⁺ cells (Figure 2C).

Because enasidenib has been demonstrated to show moderate inhibitory activity against WT IDH2 at high doses (3), we sought to determine whether the action of enasidenib on erythroid precursors was due to decreased activity of WT IDH2. IDH2 normally functions in the TCA cycle, converting isocitrate into α -ketoglutarate. Treatment of CD71⁺ and CD71⁺ erythroid precursors with enasidenib did not significantly alter levels of TCA cycle metabolites or affect flux through the TCA cycle, as measured by liquid chromatography–mass spectrometry (LC-MS) and isotope labeling (Supplemental Figure 7). This indicates that WT IDH2 activity was likely not inhibited at the concentration of enasidenib able to drive erythroid differentiation. To further probe the role of IDH2 in this activity of enasidenib, we used CRISPR-Cas9/AAV6 to knockout IDH2 in CB-CD34⁺ cells (Figure 2D and Supplemental Figure 8) (12). Genomic and protein-level disruption of IDH2 were confirmed by PCR detection of the AAV vector in the endogenous *IDH2* locus and Western blot analysis, respectively (Figure 2, E and F). IDH2-KO CB-CD34⁺ cells exhibited decreased baseline erythroid differentiation compared with control AAVS1-edited cells (Figure 2G). However, similar to WT CB-CD34⁺ cells, treatment of IDH2-KO CB-CD34⁺ cells with enasidenib still demonstrated a 3.4-fold increase in percentage of CD71⁺GPA⁺ erythroid cells compared with DMSO treatment (Figure 2H). These results indicate that enasidenib augments erythroid differentiation independently of both mutant and WT IDH2.

We next sought to identify the progenitor population that enasidenib acts on to drive erythroid maturation. Enasidenib did not increase the number of BFU-E or CFU-E colonies in colony-forming assays (Figure 3A and Supplemental Figure 9), nor did it increase the percentage of BFU-E and CFU-E progenitors in liq-

uid culture after 4 days (Figure 3B and Supplemental Figure 10A) (13). In contrast, enasidenib increased late-stage erythroid differentiation after 8 days (14), with increased percentage of GPA (3.7-fold) and increased percentage of Band-3⁺ (2.7-fold) (Figure 3C and Supplemental Figure 10B). As erythroid cells differentiate, they gain CD71 expression (CFU-E stage) and subsequently acquire GPA (erythroblast stage) (15–18). Consistent with the observation that enasidenib augments differentiation by acting on more mature erythroid progenitors, enasidenib treatment did not affect the percentage of CD71⁺GPA⁺ cells in the first 4 days of culture, but instead increased the percentage of CD71⁺GPA⁺ cells from day 5 onward (Figure 3D). Furthermore, at least 72 hours of treatment was required for increased differentiation, as wash-out of the drug before that time point resulted in no increase in erythroid differentiation (Figure 3E). Seventy-two hours of erythroid culture corresponds to the time point when CD71 expression is gained in differentiating erythroid cells in our assay, providing additional evidence that enasidenib does not have an effect before the acquisition of CD71 (Figure 3F). Treating sorted mature CD71⁺ erythroid progenitors with enasidenib increased erythroid differentiation compared with DMSO controls, whereas enasidenib treatment of CD71⁺ mid/low early erythroid progenitors showed no effect (Figure 3G and Supplemental Figure 1A). Inhibition of CD71, the transferrin receptor, by a small molecule inhibitor (ferristatin II) caused a dose-dependent decrease in enasidenib-mediated differentiation (Supplemental Figure 11). Together, these observations provide strong evidence that enasidenib acts on CD71⁺ erythroid progenitors to increase late-stage differentiation.

To further elucidate the mechanism of enasidenib-induced erythroid differentiation, we considered whether enasidenib might rapidly induce transcriptional changes in CD71⁺ cells. We conducted RNA-sequencing of sorted CD71⁺ erythroid progenitors treated with enasidenib or DMSO for 24 hours, a time point at which there were no observable erythroid progenitor differences between DMSO- and enasidenib-treated cells (Supplemental Figure 12A). RNA-seq analysis revealed limited transcriptional changes with early enasidenib treatment (Supplemental Figure 12, B and C), suggesting that enasidenib does not directly drive major transcriptional programs.

Given that CD71 is the transferrin receptor and allows for iron uptake into erythropoietic precursors, we hypothesized that enasidenib may affect erythroid differentiation through modulation of the heme biosynthesis pathway, as iron is a critical component of heme synthesis. Enasidenib is known to inhibit ATP binding cassette subfamily G member 2 (ABCG2) (19), a transporter highly expressed in erythroid progenitors that is responsible for efflux of protoporphyrin IX (PPIX), the direct precursor of heme, from the mitochondrion and the cytosol (20–22). Inhibition of ABCG2 by enasidenib might therefore lead to PPIX accumulation, potentially driving increased production of heme and hemoglobin synthesis, leading to increased erythroid differentiation. To explore this hypothesis, we first confirmed expression of ABCG2 on differentiating erythroid progenitors in our assay and observed no difference in ABCG2 expression between DMSO- and enasidenib-treated cells (Supplemental Figure 13). Consistent with previous data, enasidenib exhibited dose-dependent inhibition of ABCG2 activity in CHO cells expressing human ABCG2 (Figure 4A). Measurement of PPIX fluores-

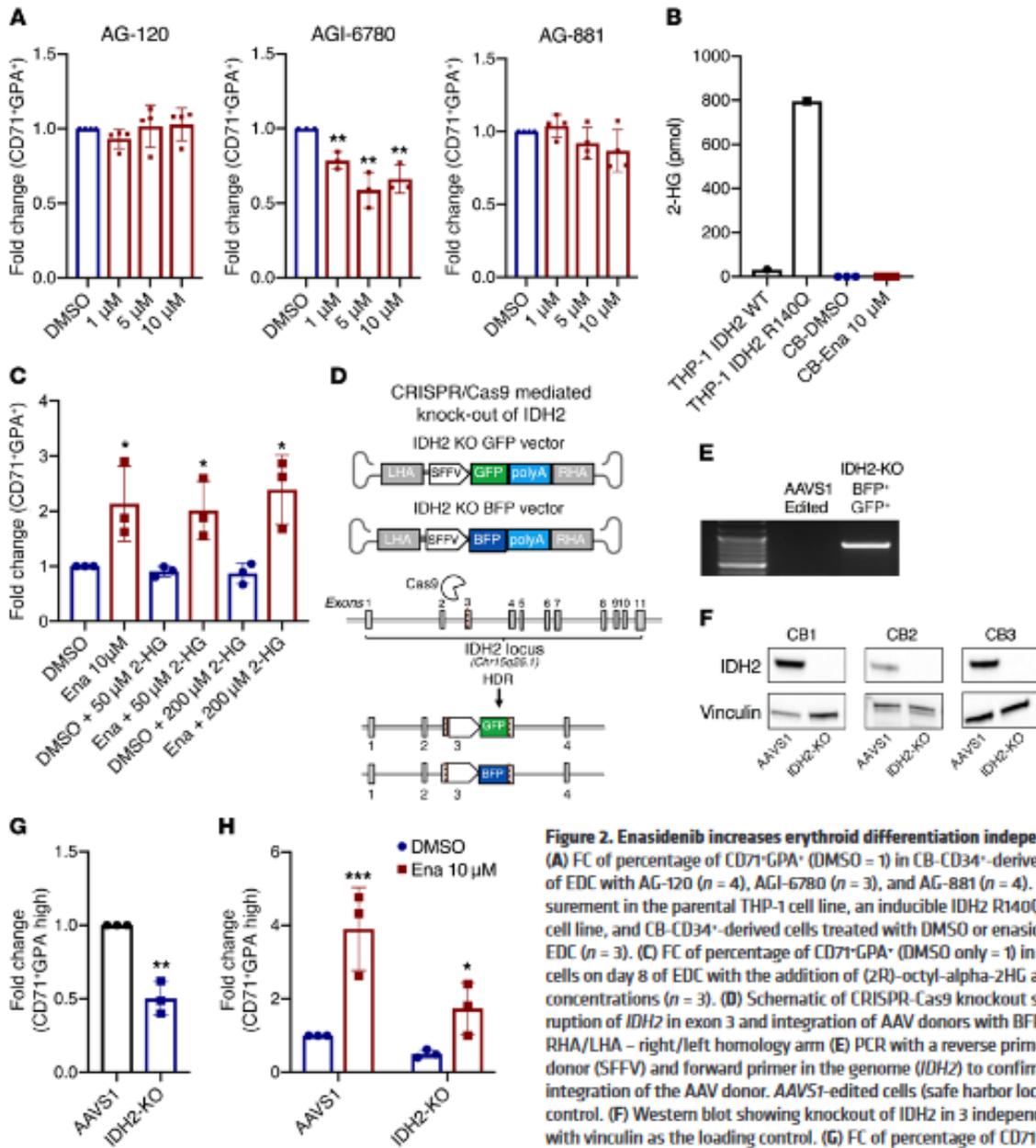


Figure 2. Enasidenib increases erythroid differentiation independently of IDH2. (A) FC of percentage of CD71⁺GPA⁺ (DMSO = 1) in CB-CD34⁺-derived cells on day 8 of EDC with AG-120 (*n* = 4), AGI-6780 (*n* = 3), and AG-881 (*n* = 4). (B) D-2-HG measurement in the parental THP-1 cell line, an inducible IDH2 R140Q mutant THP-1 cell line, and CB-CD34⁺-derived cells treated with DMSO or enasidenib for 8 days in EDC (*n* = 3). (C) FC of percentage of CD71⁺GPA⁺ (DMSO only = 1) in CB-CD34⁺-derived cells on day 8 of EDC with the addition of (2R)-octyl- α -2HG at the indicated concentrations (*n* = 3). (D) Schematic of CRISPR-Cas9 knockout strategy, with disruption of *IDH2* in exon 3 and integration of AAV donors with BFP or GFP reporters. RHA/LHA – right/left homology arm (E) PCR with a reverse primer in the AAV donor (SFFV) and forward primer in the genome (*IDH2*) to confirm site-specific integration of the AAV donor. AAVS1-edited cells (safe harbor locus) were used as control. (F) Western blot showing knockout of IDH2 in 3 independent CB samples, with vinculin as the loading control. (G) FC of percentage of CD71⁺GPA^{high} IDH2-KO cells at day 8 of EDC compared with AAVS1 control (AAVS1 = 1) (*n* = 3). (H) FC of percentage of CD71⁺GPA^{high} in AAVS1 and IDH2-KO cells treated with DMSO or enasidenib (AAVS1 DMSO = 1, with statistical comparisons made to each respective DMSO condition) (*n* = 3). Cells were gated on live, singlet, BFP-GFP⁺ before gating on CD71/GPA. Graphs represent mean \pm SD. Statistical significance was calculated using unpaired 2-tailed *t* tests. **P* < 0.05, ***P* < 0.01, ****P* < 0.001.

cence by flow cytometry (Figure 4B) and microscopy (Figure 4C) in CB-CD34⁺-derived erythroid progenitors revealed a 1.2-fold increase of PPIX fluorescence in enasidenib-treated cells compared with DMSO. Ultra-performance liquid chromatography (UPLC) measurement of PPIX showed a 6.1-fold increase in PPIX levels after enasidenib treatment (Figure 4D), along with increased hemin (FePPIX) and ZnPPIX (Figure 4E), a form of PPIX with incorporated zinc instead of iron. ZnPPIX formation is indicative

of excess PPIX and is seen in porphyrias with PPIX accumulation (23). This increased PPIX did not increase reactive oxygen species (Supplemental Figure 14A) or oxidative stress, as measured by the GSH/GSSG ratio (Supplemental Figure 14B). To determine if increased PPIX enhances erythropoiesis, we treated CB-CD34⁺ cells in EDC with 20 μ M Ko143, a potent ABCG2 inhibitor, and observed a similar increase in the percentage of CD71⁺GPA⁺ cells and PPIX fluorescence, as seen with enasidenib (Figure 4, F and G).

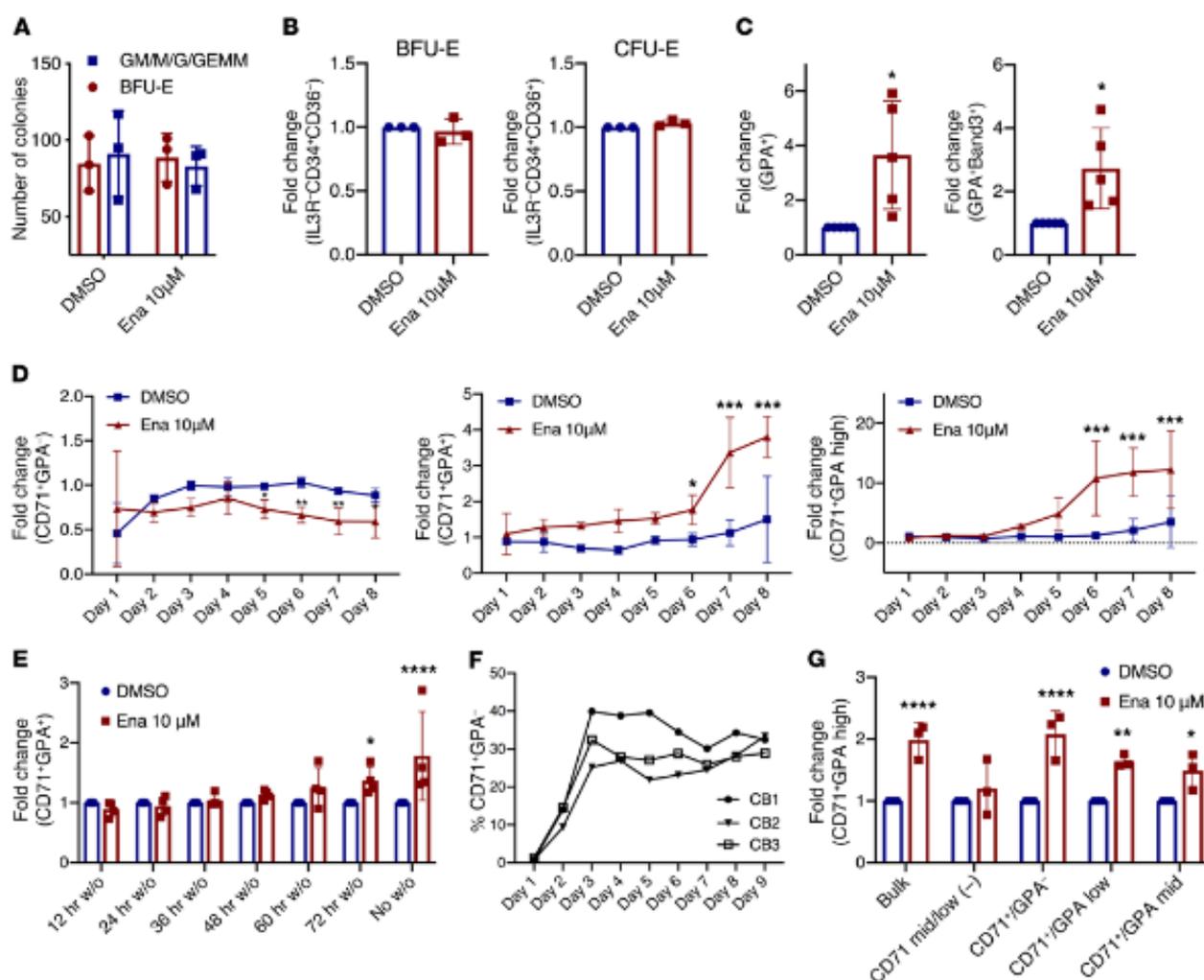


Figure 3. Enasidenib acts on mature CD71⁺ erythroid progenitors to increase differentiation. (A) Methycellulose colony forming assay of CB-CD34⁺ cells indicating the number of erythroid colonies (BFU-E) and myeloid colonies (GM/M/GEMM) observed with DMSO or enasidenib treatment after 14 days ($n = 3$). (B) FC of percentage of BFU-E (IL3R⁺CD34⁺CD36⁺) (middle) and percentage of CFU-E (IL3R⁺CD34⁺CD36⁺) (right) at day 4 of EDC (DMSO = 1) ($n = 3$). (C) FC of percentage of GPA⁺ (left) and percentage of GPA⁺Band3⁺ (right) at day 8 of EDC (DMSO = 1) ($n = 3$). (D) Time course of erythroid differentiation: FC of percentage of CD71⁺GPA⁺ (left), percentage of CD71⁺GPA⁺ (middle), and percentage of CD71⁺GPA⁺high (right) relative to untreated cells (not shown) ($n = 3$). (E) FC of percentage of CD71⁺GPA⁺ measured at day 8 of EDC, with DMSO or enasidenib washed out (w/o) of the culture at the indicated time points (DMSO = 1) ($n = 4$). (F) Timeline of the gain of CD71 expression (%CD71⁺GPA⁺) in 3 untreated CB samples. (G) Cells were sorted into CD71 mid/low, CD71⁺GPA⁺, CD71⁺GPA⁺low, and CD71⁺GPA⁺mid after 6 days of EDC, and then treated with DMSO or enasidenib for 4 days. FC of percentage of CD71⁺GPA⁺high (DMSO for each population = 1) ($n = 3$). Graphs represent mean \pm SD. Statistical significance was calculated using unpaired 2-tailed *t* tests. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$.

Intracellular heme (ferrous PPIX) drives transcriptional and translational programs that promote coordinated erythroid differentiation through multiple mechanisms, including modulation of Bach1 transcriptional activity and heme-regulated eIF2 α -kinase (HRI) kinase activity (24–26). Because heme is a strong driver of globin chain synthesis (25–27), we measured transcription of globin chain genes following treatment with enasidenib by quantitative PCR (qPCR) and observed a striking upregulation of all globin chains, including *HBA1/2* (23-fold), *HBB* (8-fold), *HBD* (4-fold), and *HBG1/2* (3.5-fold) (Figure 4H). These results support a model in which ABCG2 inhibition by enasidenib drives PPIX accumulation, leading to increased heme and hemoglobin produc-

tion in erythroid progenitors, thereby driving increased erythroid differentiation (Figure 4I).

Symptomatic anemia remains a major clinical problem in cancer patients regardless of mutational context, and contributes to decreased quality of life and increased morbidity. Anemia is also a significant side effect of cancer treatments, ranging from regimens of platinum-based chemotherapy and radiation to novel agents such as azacitadine and venetoclax (28, 29). Given that transfusion independence in cancer patients is associated with increased survival, drugs that improve normal hematopoiesis have great potential to reduce morbidity and mortality (30). In this study, we show that enasidenib, an FDA-approved therapy for treatment of

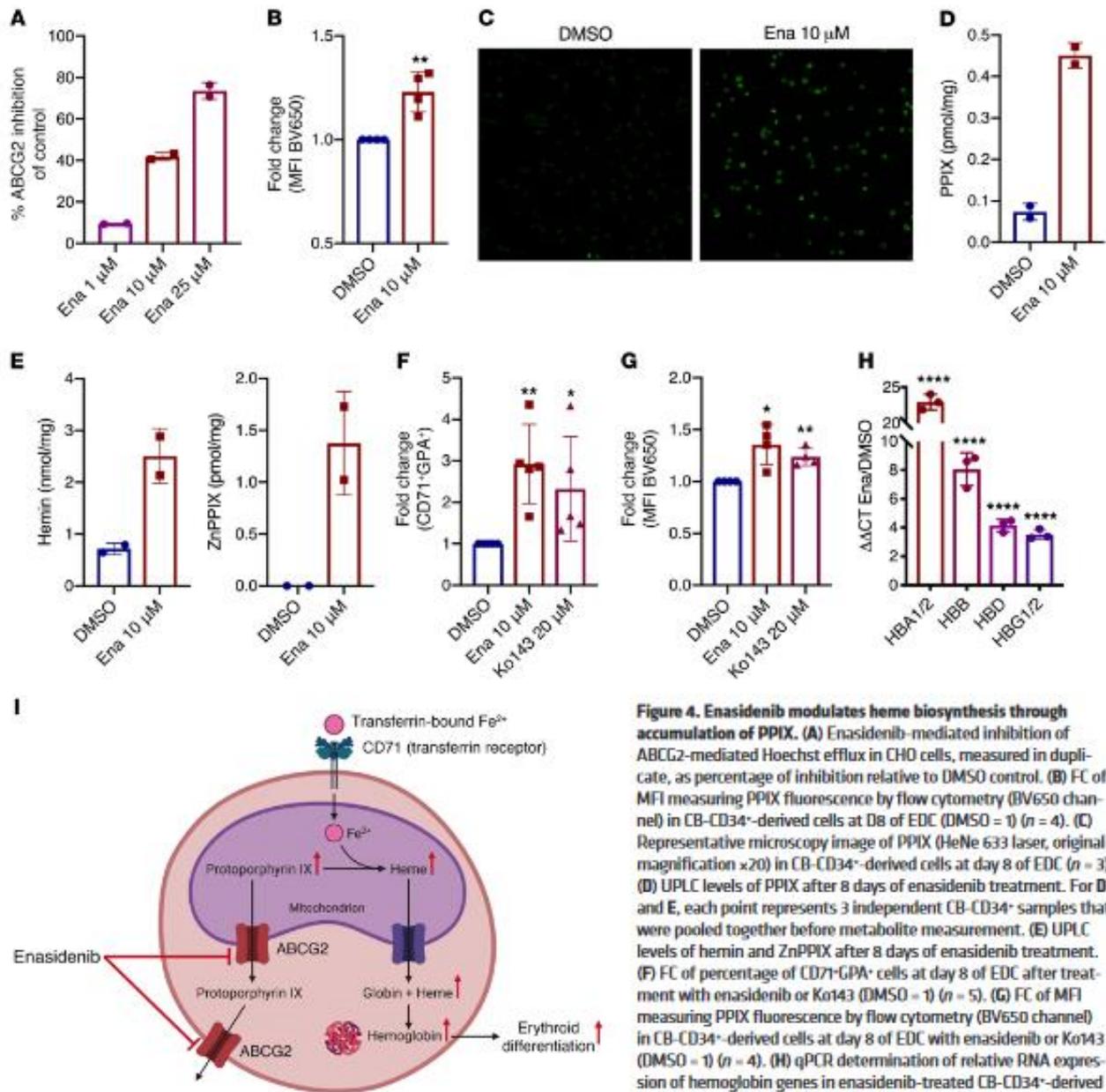


Figure 4. Enasidenib modulates heme biosynthesis through accumulation of PPIX. (A) Enasidenib-mediated inhibition of ABCG2-mediated Hoechst efflux in CHO cells, measured in duplicate, as percentage of inhibition relative to DMSO control. (B) FC of MFI measuring PPIX fluorescence by flow cytometry (BV650 channel) in CB-CD34⁺-derived cells at D8 of EDC (DMSO = 1) (n = 4). (C) Representative microscopy image of PPIX (HeNe 633 laser, original magnification ×20) in CB-CD34⁺-derived cells at day 8 of EDC (n = 3). (D) UPLC levels of PPIX after 8 days of enasidenib treatment. For D and E, each point represents 3 independent CB-CD34⁺ samples that were pooled together before metabolite measurement. (E) UPLC levels of hemin and ZnPPIX after 8 days of enasidenib treatment. (F) FC of percentage of CD71⁺GPA⁻ cells at day 8 of EDC after treatment with enasidenib or Ko143 (DMSO = 1) (n = 5). (G) FC of MFI measuring PPIX fluorescence by flow cytometry (BV650 channel) in CB-CD34⁺-derived cells at day 8 of EDC with enasidenib or Ko143 (DMSO = 1) (n = 4). (H) qPCR determination of relative RNA expression of hemoglobin genes in enasidenib-treated CB-CD34⁺-derived cells at day 8 of EDC (DMSO = 1) (n = 3). (I) Schematic of proposed model. Graphs represent mean ± SD. Statistical significance was calculated using unpaired 2-tailed t tests. *P < 0.05, **P < 0.01, ****P < 0.0001.

relapsed/refractory IDH2-mutant AML, drives erythroid differentiation in CD71⁺ erythroid precursors independently of IDH2 through modulation of PPIX homeostasis and hemoglobin production. These novel findings provide a mechanism explaining the previous clinical observations that enasidenib promotes increased hemoglobin levels and RBC transfusion independence in patients with AML, even when blast count is unchanged (6, 31). This study is the first to present evidence that enasidenib can potentially be repurposed to treat anemia in any clinical context with functional erythroid precursors. Thus, our results provide the groundwork for

a clinical trial using enasidenib for improving anemia and decreasing transfusion burden in a wide range of diseases.

Methods

See the Supplemental Material for the detailed experimental methods. *Study approval and data availability.* Cord blood and normal bone marrow samples were obtained according to protocols approved by the Administrative Panel on Human Subjects Research Institutional Review Board/Stem Cell Research Oversight Panel (IRB/SCRO) (Stanford IRB nos. 36560, 6453, 14839, and SCRO-291)

with informed consent. RNA-sequencing data are available through GEO (accession number GSE140108).

Author contributions

RD, TYZ, TK, DT, ML, EG, AN, and RM designed experiments. RD, TYZ, TK, DT, ML, EG, MS, SK, YN, and RY optimized and conducted experiments. RD, TK, AA, and RM analyzed data. RD and RM wrote the manuscript.

Acknowledgments

We acknowledge the Flow Cytometry Core of the Stanford Stem Cell Institute, the Binns Program for Cord Blood Research, the Stanford Neuroscience Microscopy Service (NIH NS069375),

the Iron and Heme Core facility at University of Utah (NIH NIDDK U54DK110858), and Amy Fan for her input. This work was supported by NIH grants (1R01CA188055, R01HL4436, and 1R01HL142637), the Stanford Ludwig Center for Cancer Stem Cell Research and Medicine, and the Leukemia and Lymphoma Society Scholar Award to RM. RD is supported by the Howard Hughes Medical Institute Medical Fellowship award and the Stanford Medical Scholars Program.

Address correspondence to: Ravindra Majeti, Lokey Stem Cell Research Building, Room G3005, 265 Campus Drive, Stanford, California 94305, USA. Phone: 650.721.6376; Email: rmajeti@stanford.edu.

- [No authors listed]. SEER Cancer Stat Facts: Acute Myeloid Leukemia. National Cancer Institute. <https://seer.cancer.gov/statfacts/html/amyl.html>. Accessed February 24, 2020.
- Shah A, Andersson TM, Rachtel B, Björkholm M, Lambert PC. Survival and cure of acute myeloid leukaemia in England, 1971-2006: a population-based study. *Br J Haematol*. 2013;162(4):509-516.
- Yen K, et al. AG-221, a first-in-class therapy targeting acute myeloid leukemia harboring oncogenic *IDH2* mutations. *Cancer Discov*. 2017;7(5):478-493.
- Thomas D, Majeti R. Optimizing next-generation AML therapy: activity of mutant *IDH2* inhibitor AG-221 in preclinical models. *Cancer Discov*. 2017;7(5):459-461.
- Stein EM, et al. Enasidenib in mutant *IDH2* relapsed or refractory acute myeloid leukemia. *Blood*. 2017;130(6):722-731.
- Stein EM, et al. Molecular remission and response patterns in patients with mutant-*IDH2* acute myeloid leukemia treated with enasidenib. *Blood*. 2019;133(7):676-687.
- Cannas C, et al. Transfusion dependency at diagnosis and transfusion intensity during initial chemotherapy are associated with poorer outcomes in adult acute myeloid leukemia. *Ann Hematol*. 2015;94(11):1797-1806.
- Ferreira R, Ohneda K, Yamamoto M, Philipsen S. GATA1 function, a paradigm for transcription factors in hematopoiesis. *Mol Cell Biol*. 2005;25(4):1215-1227.
- Koivunen P, et al. Transformation by the (R)-enantiomer of 2-hydroxyglutarate linked to EGLN activation. *Nature*. 2012;483(7390):484-488.
- Losman JA, et al. (R)-2-hydroxyglutarate is sufficient to promote leukemogenesis and its effects are reversible. *Science*. 2013;339(6127):1621-1625.
- Haase VH. Regulation of erythropoiesis by hypoxia-inducible factors. *Blood Rev*. 2013;27(1):41-53.
- Bak RO, Dever DP, Reinisch A, Cruz Hernandez D, Majeti R, Porteus MH. Multiplexed genetic engineering of human hematopoietic stem and progenitor cells using CRISPR/Cas9 and AAV6. *Elife*. 2017;6:e27873.
- Li J, et al. Isolation and transcriptome analyses of human erythroid progenitors: BPU-E and CFU-E. *Blood*. 2014;124(24):3636-3645.
- Hu J, et al. Isolation and functional characterization of human erythroblasts at distinct stages: implications for understanding of normal and disordered erythropoiesis in vivo. *Blood*. 2013;121(16):3246-3253.
- van Lochem EG, van der Velden VH, Wind HK, te Marvelde JG, Westerdaal NA, van Dongen JJ. Immunophenotypic differentiation patterns of normal hematopoiesis in human bone marrow: reference patterns for age-related changes and disease-induced shifts. *Cytometry B Clin Cytom*. 2004;60(1):1-13.
- Okumura N, Tsuji K, Nakahata T. Changes in cell surface antigen expressions during proliferation and differentiation of human erythroid progenitors. *Blood*. 1992;80(3):642-650.
- Chen K, Liu J, Heck S, Chasis JA, An X, Mohandas N. Resolving the distinct stages in erythroid differentiation based on dynamic changes in membrane protein expression during erythropoiesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(41):17413-17418.
- Mao B, et al. Early development of definitive erythroblasts from human pluripotent stem cells defined by expression of glycoporphin A/CD235a, CD34, and CD36. *Stem Cell Reports*. 2016;7(5):869-883.
- [No authors listed]. *IDH1FA* (enasidenib) drug information. FDA. https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2017/209606s0001-bl.pdf. Accessed January 28, 2020.
- Zhou S, Zong Y, Ney PA, Nair G, Stewart CF, Sorrentino BP. Increased expression of the *Abcg2* transporter during erythroid maturation plays a role in decreasing cellular protoporphyrin IX levels. *Blood*. 2005;105(6):2571-2576.
- Kobuchi H, et al. Mitochondrial localization of ABC transporter ABCG2 and its function in 5-aminolevulinic acid-mediated protoporphyrin IX accumulation. *PLoS One*. 2012;7(11):e50082.
- Jonker JW, et al. The breast cancer resistance protein protects against a major chlorophyll-derived dietary phototoxin and protoporphyria. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99(24):15649-15654.
- Sachar M, Anderson KE, Ma X. Protoporphyrin IX: the Good, the Bad, and the Ugly. *J Pharmacol Exp Ther*. 2016;356(2):267-275.
- Chen JJ. Translational control by heme-regulated eIF2 α kinase during erythropoiesis. *Curr Opin Hematol*. 2014;21(3):172-178.
- Tahara T, Sun J, Igarashi K, Taketani S. Heme-dependent up-regulation of the alpha-globin gene expression by transcriptional repressor Bach1 in erythroid cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004;324(1):77-85.
- Tahara T, et al. Heme positively regulates the expression of beta-globin at the locus control region via the transcriptional factor Bach1 in erythroid cells. *J Biol Chem*. 2004;279(7):5480-5487.
- Gross M, Rabinovitz M. Control of globin synthesis by heme: factors influencing formation of an inhibitor of globin chain initiation in reticulocyte lysates. *Biochim Biophys Acta*. 1972;287(2):340-352.
- Kuzur ME, Greco FA. Cisplatin-induced anemia. *N Engl J Med*. 1980;303(2):110-111.
- DiNardo CD, et al. Venetoclax combined with decitabine or azacitidine in treatment-naive, elderly patients with acute myeloid leukemia. *Blood*. 2019;133(1):7-17.
- Gavillet M, Noetzli J, Blum S, Duchosal MA, Spertini O, Lambert JF. Transfusion independence and survival in patients with acute myeloid leukemia treated with 5-azacytidine. *Haematologica*. 2012;97(12):1929-1931.
- Pollyea DA, et al. Enasidenib, an inhibitor of mutant *IDH2* proteins, induces durable remissions in older patients with newly diagnosed acute myeloid leukemia. *Leukemia*. 2019;33(11):2575-2584.

Serment De Galien

Je jure en présence de mes Maîtres de la Faculté et de mes condisciples :

- d'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement ;
- d'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement ;
- de ne jamais oublier ma responsabilité, mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine, de respecter le secret professionnel.

En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser les actes criminels.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères, si j'y manque.

Attention, ne supprimez pas le saut de section suivant (page suivante non numérotée)

Effets de l'énasidenib sur l'érythropoïèse ex vivo

Le groupe de Luc DOUAY a démontré que les globules rouges produits ex vivo conservent des propriétés fonctionnelles similaires après injection in vivo chez l'Homme (Giarratana et al. 2011). De nouveaux moyens d'améliorer le rendement et de diminuer la durée de la procédure ex vivo sont recherchés. L'enasidenib (Idhifa®), anticancéreux employé dans les leucémies aiguës myéloblastiques mutées IDH2, semblerait agir, in vitro, sur les progéniteurs érythroïdes CD71+ afin d'accroître la différenciation à un stade tardif. Les expériences sont réalisées avec des cellules CD34+ isolées d'unité de sang placentaire par sélection immuno-magnétique. Le modèle expérimental est une adaptation du modèle de culture de production ex vivo de globules rouges en 3 étapes (Vlaski et al 2009). La cytométrie en flux est employée afin de caractériser phénotypiquement la différenciation des différentes populations cellulaires au cours de la culture et des analyses complémentaires sont également réalisées, telles que l'étude de la prolifération cellulaire via l'amplification, la toxicité cellulaire et la recherche d'hémoglobine ainsi que l'étude de l'aspect cytologique sur lames sont réalisées. Il apparaît que l'énasidenib induit une réduction de la prolifération cellulaire, notamment pendant la période d'exposition à la molécule, tout en favorisant simultanément la différenciation érythroïde dans les phases tardives. Ces conclusions concordent avec les résultats rapportés dans l'article de Dutta et al. et sont en cohérence avec les observations cliniques réalisées lors de l'emploi de ce médicament. Dans les conditions expérimentales utilisées, nous n'avons pas d'arguments en faveur de l'utilisation de cette molécule afin d'optimiser la production d'hématies ex vivo, ou en clinique afin de stimuler in vivo l'érythropoïèse, en raison d'un effet antiprolifératif à faible dose et d'un effet toxique à plus forte dose.

Mots-clés : CSH, différenciation érythroïde, production ex vivo de GR, nouvelles molécules.

Effects of enasidenib on ex vivo erythropoiesis

Luc DOUAY's group demonstrated that red blood cells produced ex vivo retain similar functional properties after in vivo injection in humans (Giarratana et al. 2011). New ways to improve the yield and reduce the duration of the ex vivo procedure are being sought. Enasidenib (Idhifa®), an anticancer drug used in IDH2 mutated acute myeloblastic leukemia, appears to act, in vitro, on CD71+ erythroid progenitors to increase differentiation at a late stage. The experiments are carried out with CD34+ cells isolated from placental blood units by immuno-magnetic selection. The experimental model is an adaptation of the culture model for ex vivo production of red blood cells in 3 stages (Vlaski et al 2009). Flow cytometry is used to phenotypically characterize the differentiation of different cell populations during culture and additional analyzes are also carried out, such as the study of cell proliferation via amplification, cell toxicity and the search for hemoglobin as well as the study of the cytological appearance on slides are carried out. It appears that enasidenib induces a reduction in cell proliferation, particularly during the period of exposure to the molecule, while simultaneously promoting erythroid differentiation in the late phases. These findings are consistent with the results reported in the article by Dutta et al. and are consistent with clinical observations made during the use of this medication. Under the experimental conditions used, we have no arguments in favor of the use of this molecule to optimize the production of red blood cells ex vivo, or in the clinic to stimulate erythropoiesis in vivo, due to an antiproliferative effect at low doses and a toxic effect at higher doses.

Keywords : HSC, erythroid differentiation, ex vivo red blood cells production, new molecules.

