

En conclusion

L'entose se caractérise par l'invasion d'une cellule par une autre menant à la destruction de la cellule internalisée. Ce processus est observé *in vivo* dans des échantillons provenant de patients atteints de cancer et semble ralentir la croissance de la masse tumorale *in vitro*. Cependant les questions de la régulation de l'entose et son impact sur la croissance tumorale *in vivo* restent ouvertes. ♦

Entosis, a cell death process related to cell cannibalism between tumor cells

RÉFÉRENCES

1. Jacobson MD, Weil M, Raff MC. Programmed cell death in animal development. *Cell* 1997 ; 88 : 347-54.
2. Frisch SM, Francis H. Disruption of epithelial cell-matrix interactions induces apoptosis. *J Cell Biol* 1994 ; 124 : 619-26.
3. Codogno P. Les gènes ATG et la macro-autophagie. *Med Sci (Paris)* 2004 ; 20 : 734-6.
4. Debnath J, Baehrecke EH, Kroemer G. Does autophagy contribute to cell death? *Autophagy* 2005 ; 1 : 66-74.
5. Mailleux AA, Overholtzer M, Schmelzle T, et al. BIM regulates apoptosis during mammary ductal morphogenesis, and its absence reveals alternative cell death mechanisms. *Dev Cell* 2007 ; 12 : 221-34.
6. Overholtzer M, Mailleux AA, Mounieim G, et al. A nonapoptotic cell death process, entosis, that occurs by cell-in-cell invasion. *Cell* 2007 ; 131 : 966-79.
7. Fadok VA, Bratton DL, Rose DM, et al. A receptor for phosphatidylserine-specific clearance of apoptotic cells. *Nature* 2000 ; 405 : 85-90.
8. Monks J, Rosner D, Geske FJ, et al. Epithelial cells as phagocytes : apoptotic epithelial cells are engulfed by mammary alveolar epithelial cells and repress inflammatory mediator release. *Cell Death Differ* 2005 ; 12 : 107-14.
9. Chimini G. Le récepteur des phosphatidylsérines, une arlésienne qui nous surprend toujours. *Med Sci (Paris)* 2004 ; 20 : 501-2.
10. Arthur WT, Noren NK, Burrige K. Regulation of Rho family GTPases by cell-cell and cell-matrix adhesion. *Biol Res* 2002 ; 35 : 239-46.
11. Abodie WT, Dey P, Al-Hattab O. Cell cannibalism in ductal carcinoma of breast. *Cytopathology* 2006 ; 17 : 304-5.
12. Lugini L, Matarrese P, Tinari A, et al. Cannibalism of live lymphocytes by human metastatic but not primary melanoma cells. *Cancer Res* 2006 ; 66 : 3629-38.

NOUVELLE

Origine cellulaire des tumeurs d'Ewing Un coin de voile est levé

Franck Tirode, Karine Laud-Duval, Olivier Delattre

Inserm U830, Institut Curie,
26, rue d'Ulm, 75248 Paris, France.
olivier.delattre@curie.fr

> La tumeur d'Ewing, seconde tumeur de l'os par ordre de fréquence chez les adolescents et les jeunes adultes, présente une translocation chromosomique caractéristique fusionnant la partie 5' du gène *EWS* à la partie 3' d'un membre de la famille ETS. La fusion la plus commune, *EWS-FLI-1*, résulte d'une translocation entre les chromosomes 11 et 22 [1]. Le rôle causal de cette fusion dans le développement tumoral a été clairement documenté. La compréhension des mécanismes intimes de cette transformation cellulaire repose très schématiquement d'une part sur l'éluclaidation du rôle biologique de la protéine *EWS-FLI-1*, et en particulier sur l'identification des principaux gènes cibles de ce facteur de transcription aberrant, et d'autre part sur la caractérisation précise du contexte cellulaire au sein duquel s'exerce cet effet.

Nature de la cellule cible à l'origine des tumeurs d'Ewing : les multiples hypothèses

D'un point de vue histologique, ces tumeurs sont caractérisées par de petites cellules rondes indifférenciées, possédant un petit cytoplasme, intriquées dans un stroma intercellulaire épars. Ces caractéristiques phénotypiques sont peu informatives sur la cellule à l'origine des tumeurs. Il y a 86 ans, James Ewing, auteur de la première description de cette tumeur [2], proposait une origine endothéliale. Depuis lors, plusieurs hypothèses alternatives ont été proposées. L'hypothèse neurale est fondée sur l'observation que la fusion *EWS-FLI-1* caractérise certes des tumeurs très indifférenciées mais aussi des tumeurs neuroectodermiques primitives qui expriment des marqueurs spécifiques du tissu neural. De plus,

des cellules d'Ewing cultivées *in vitro* en présence d'une combinaison de facteurs de différenciation spécifique, forment des structures semblables à des neurites et expriment certains marqueurs caractéristiques de la lignée neurale [3, 4]. Une autre hypothèse, fondée sur l'expression par les cellules d'Ewing de certaines protéines des jonctions serrées (comme ZO-1 ou la claudine) évoque une origine cellulaire épithéliale [5]. Enfin, des études récentes menées chez la souris ont soulevé l'hypothèse mésenchymateuse. L'équipe de Suzan Backer a ainsi pu mettre en évidence que l'expression d'*EWS-FLI-1* dans des cellules stromales osseuses bloquait leur différenciation terminale dans les voies adipocytaire et ostéocytaire [6]. Puis les équipes de Robert Ilaria et d'Ivan Stamenkovic ont montré que des cellules stromales osseuses exprimant *EWS-*



FLI-1 de façon stable induisent chez la souris des tumeurs très semblables aux tumeurs d'Ewing humaines [7, 8]. Si ces études ne démontrent pas l'origine mésenchymateuse des tumeurs d'Ewing, elles n'en indiquent pas moins que ce contexte cellulaire est permissif à la transformation par le gène de fusion.

Une stratégie : inhiber le transcrit de fusion pour démasquer la cellule d'origine

De notre côté, nous avons fait l'hypothèse qu'une cellule d'Ewing dans laquelle *EWS-FLI-1* est inhibée pourrait retrouver les caractéristiques de son type cellulaire d'origine et récupérer une capacité de réponse à certains programmes de différenciation [9]. Afin d'inhiber *EWS-FLI-1* nous avons développé un modèle de cellules d'Ewing exprimant un shARN spécifique du transcrit de fusion et inducible par la doxycycline. Ce système

permet une extinction à long terme de l'expression d'*EWS-FLI-1*. Le profil d'expression génétique de ces cellules, exprimant ou non *EWS-FLI-1*, ainsi que celui de tumeurs d'Ewing ont été comparés aux profils de nombreux tissus normaux, dérivés en particulier du mésenchyme. Il apparaît qu'*EWS-FLI-1* module l'expression de nombreux gènes associés à la lignée mésenchymateuse et en particulier aux cellules souches mésenchymateuses (CSM). Les cellules souches mésenchymateuses sont encore relativement peu caractérisées mais sont généralement isolées par leur capacité à adhérer au plastique et surtout par leur capacité de différenciation en adipocytes, chondrocytes, ostéocytes et cellules stromales médullaires¹. Nous avons donc cherché

¹ Ce qui est souvent défini fonctionnellement par la capacité qu'ont ces cellules à promouvoir la prolifération et la différenciation de cellules souches et de progéniteurs hématopoïétiques *in vitro* en culture à long terme.

si des cellules d'Ewing, dans lesquelles le transcrit de fusion *EWS-FLI-1* a été inhibé, et traitées par les combinaisons de facteurs de différenciation adéquates, pouvaient se différencier dans ces lignées caractéristiques de tissus mésenchymateux. Effectivement, l'inhibition d'*EWS-FLI1* dans des cellules cultivées en présence de molécules stimulant la différenciation adipocytaire conduit à une expression forte de trois protéines typiques de cette lignée (*PPAR γ 2*, *FABP4* et *LPL*) ainsi qu'à l'apparition de vésicules lipidiques visualisables par un marquage positif à l'Oil-Red-O. De la même façon, l'expression de trois marqueurs ostéocytaires (*SPP1* ou anciennement ostéopontine, *ALPL*, phosphatase alcaline, et *RUNX2*) ainsi qu'un marquage positif à la réaction de Von-Kossa² sont obtenus lorsque ces cellules d'Ewing dont le transcrit *EWS-FLI-1* est inhibé sont cultivées en présence du cocktail de différenciation ostéocyttaire. Nous avons ensuite analysé par cytométrie en flux l'expression de différents marqueurs de surface habituellement utilisés pour isoler les cellules souches mésenchymateuses. L'expression de CD44, CD59, CD73 (ecto 5' nucléotidase), CD29 (chaîne β 1 des intégrines) et CD54 (ICAM-1) est effectivement induite par l'inhibition d'*EWS-FLI-1*. CD90 (Thy1), CD105 (endogline) et CD166 (ALCAM) sont quant à eux exprimés mais non modulés par *EWS-FLI1*. L'ensemble de nos résultats suggère très fortement que l'inhibition de la protéine de fusion permet aux cellules d'Ewing de retrouver un phénotype originel de type cellule souche mésenchymateuse.

Conclusion

Cette origine cellulaire permet de mieux comprendre la localisation des tumeurs d'Ewing au niveau des os et

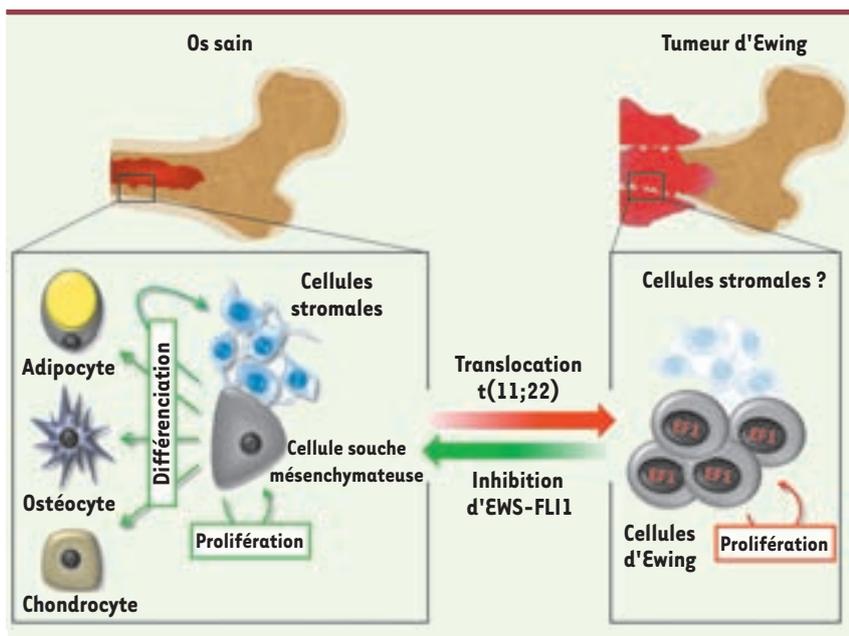


Figure 1. Mécanismes de la transformation par *EWS-FLI* d'une cellule souche mésenchymateuse.

Dans un os sain, les cellules souches mésenchymateuses sont capables à la fois d'autorenouvellement et de différenciation dans divers tissus. Suite à la survenue d'une translocation t(11 ; 22) et à l'expression d'une protéine *EWS-FLI-1*, cette cellule souche mésenchymateuse, devenue cellule d'Ewing, est bloquée dans sa différenciation terminale et prolifère rapidement. En inhibant l'expression d'*EWS-FLI-1* dans les cellules d'Ewing, on restaure le phénotype mésenchymateux, ces cellules devenant à nouveau capables de se différencier.

² La coloration de Von Kossa révèle des sels de calcium (phosphate, carbonate, sulfate, oxalate) ici témoin de la minéralisation, en leur substituant un cation métallique lourd le nitrate d'argent que l'on visualisera après réduction en argent métallique noir.

des tissus mous, deux sources majeures de cellules souches mésenchymateuses. Il est intéressant de souligner que la protéine de fusion EWS-FLI1 réprime la transcription de plusieurs protéines inhibitrice de la voie IGF1 (*insulin growth factor 1*) de type IGFBP (*IGF binding protein*) et potentialise ainsi cette voie de signalisation [10] qui semble jouer un rôle majeur dans l'équilibre entre ces cellules souches et leur niche. De manière intéressante, une étude récente indique que la première vague de cellules mésenchymateuses proviendrait de cellules de la crête neurale [11], ce qui pourrait réconcilier les hypothèses neurales et mésenchymateuses quant à l'origine des cellules d'Ewing. Ces résultats devraient permettre de développer des modèles cellulaires

plus pertinents et d'accélérer le développement d'un modèle murin de cette tumeur. Ils constituent également une donnée essentielle pour l'identification et la caractérisation des cellules souches cancéreuses. ♦

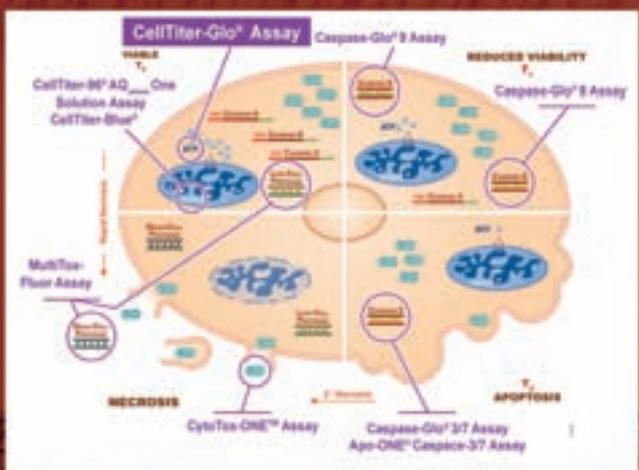
Mesenchymal stem cell is the target of transformation in Ewing tumor

RÉFÉRENCES

1. Delattre O, Zucman J, Plougastel B, et al. Gene fusion with an ETS DNA-binding domain caused by chromosome translocation in human tumours. *Nature* 1992; 359 : 162-5.
2. Ewing J. Diffuse endothelioma of bone. *Proc New York Pathol Soc* 1921; 21 : 17-24.
3. Noguera R, Navarro S, Peydro-Olaya A, Llombart-Bosch A. Patterns of differentiation in extrasosseous Ewing's sarcoma cells. An *in vitro* study. *Cancer* 1994; 73 : 616-24.
4. Cavazzana AO, Miser JS, Jefferson J, Triche TJ. Experimental evidence for a neural origin of Ewing's sarcoma of bone. *Am J Pathol* 1987; 127 : 507-18.
5. Schuetz AN, Rubin BP, Goldblum JR, et al. Intercellular junctions in Ewing sarcoma/primitive neuroectodermal tumor: additional evidence of epithelial differentiation. *Mod Pathol* 2005; 18 : 1403-10.
6. Torchia EC, Jaishankar S, Baker SJ. Ewing tumor fusion proteins block the differentiation of pluripotent marrow stromal cells. *Cancer Res* 2003; 63 : 3464-8.
7. Riggi N, Cironi L, Provero P, et al. Development of Ewing's sarcoma from primary bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells. *Cancer Res* 2005; 65 : 11459-68.
8. Castellero-Trejo Y, Eliazar S, Xiang L, et al. Expression of the EWS/FLI-1 oncogene in murine primary bone-derived cells Results in EWS/FLI-1-dependent, ewing sarcoma-like tumors. *Cancer Res* 2005; 65 : 8698-705.
9. Tirode F, Laud-Duval K, Prieur A, et al. Mesenchymal stem cell features of ewing tumors. *Cancer Cell* 2007; 11 : 421-9.
10. Prieur A, Tirode F, Cohen P, Delattre O. EWS/FLI-1 silencing and gene profiling of Ewing cells reveal downstream oncogenic pathways and a crucial role for repression of insulin-like growth factor binding protein 3. *Mol Cell Biol* 2004; 24 : 7275-83.
11. Takashima Y, Era T, Nakao K, et al. Neuroepithelial cells supply an initial transient wave of MSC differentiation. *Cell* 2007; 129 : 1377-88.

VIABILITÉ CELLULAIRE ET APOPTOSE





CellTiter-Glo® Assay
Caspase-Glo® 9 Assay
Caspase-Glo® 8 Assay
Caspase-Glo® 3/7 Assay
Apo-Glo® Caspase-3/7 Assay
Cytotox ONE™ Assay
MultiTox Floor Assay
CellTiter-BE™ Assay
One Solution Assay
CellTiter-Blue

REduced Viability
NECROSIS
APOPTOSIS

Ils ont choisi. Et vous ?

Le plus efficace pour mesurer l'ATP cellulaire :

CellTiter-Glo®

- ▶ **Signal stable !**
Lecture du signal luminescent pendant plusieurs heures.
- ▶ **Ultra sensible et rapide !**
Détection à partir de 10 cellules en 10 minutes.
- ▶ **Une seule étape !**
Directement sur cellules en culture.

www.promega.com/pagu-de ou au 0 800 488 000



Ateliers de formation 2008

Renseignements et inscriptions :
Ateliers de formation Inserm
101, rue de Tolbiac
75654 Paris Cedex 13
Tél. : 33 (0)1 44 23 62 04 — Fax : 33 (0)1 44 23 62 93
ateliers@tolbiac.inserm.fr

Inserm



Institut national
de la santé et de la recherche médicale

■ Atelier de formation n° 186

Méthodes d'imagerie fonctionnelle *in vivo* : de la molécule à la cellule

Organisateurs : Angela Giangrande, Michel Labouesse (IGBMC, Strasbourg)

Phase I • Le point sur...
5-6 juin 2008 • Saint-Raphaël

Objectifs • La microscopie, qui représente une approche essentielle en biologie du développement et en neurobiologie, a connu au cours de la décennie passée une véritable révolution. Révolution technologique, avec la mise au point de microscopes, caméras et systèmes d'acquisition de plus en plus performants. Révolution dans les approches, avec l'apparition de protéines fluorescentes chaque jour plus nombreuses et l'utilisation d'une palette d'approches basées sur les propriétés de ces protéines (FRAP, FRET, FLIM, FCS, FSM, etc...). Les principales innovations en microscopie sont à mettre à l'actif des physiciens et des biologistes cellulaires utilisant des cellules en culture. Leur adaptation reste un défi chez des organismes vivants, en raison des conditions spécifiques de culture pour maintenir en vie, des problèmes d'accessibilité, de phototoxicité, d'auto-fluorescence, des mouvements naturels. L'objectif premier sera d'illustrer les stratégies et techniques les plus performantes pour visualiser un processus biologique dans ses aspects dynamiques chez un organisme vivant, qu'il s'agisse de visualiser l'expression de gènes, le transport de molécules ou particules, la migration de cellules, le réarrangement des jonctions, la division cellulaire, les vagues calciques. Un autre objectif sera de rappeler quelles sont les principales techniques disponibles en microscopie, leurs limitations, les évolutions prévisibles, et de faire le point sur les méthodes permettant de s'affranchir des contraintes propres à chaque modèle animal.

Public • Les biologistes du développement (au sens large), les biologistes cellulaires travaillant principalement avec un système modèle, les neurobiologistes intéressés par les événements subcellulaires, et plus généralement tous ceux qui seraient tentés de savoir quelles sont les possibilités offertes en terme d'imagerie par les systèmes modèles.

Les conférences seront données en anglais.

Nombre maximum de participants : 80.

Programme • Imagerie calcique, expression des gènes *in utero*, migration cellulaire, transport de particules riboprotéiques, visualisation de vésicules, mouvement de récepteurs dans la membrane plasmique, réorganisation du cytosquelette, imagerie calcique. Culture *ex vivo* et culture d'explants, FRAP, FRET, imagerie rapide, microscopie confocale par spinning disque, bio-senseur, quantum dots, multiphoton.

Phase II • Maîtrise technique

15-19 septembre 2008 • Strasbourg – Novembre/Décembre 2008 • Paris

Programme • **Strasbourg** : time-lapse sur embryons et larves *Drosophila* et *C. elegans*, démonstration de montage et de préparation de pupes. **Paris** : time-lapse sur embryons souris *ex-utero*.

Sélection • 12 participants seront sélectionnés parmi les participants de la phase I.

Avec la participation de • Claude Antony (Heidelberg, Allemagne), Jérôme Collignon (Paris, France), Ilan Davis (Edinburgh, UK), Leanne Godinho (Munich, Allemagne), Stephan Thiberge (Princeton, USA), Thomas Lecuit (Marseille, France), Erez Raz (Göttingen, Allemagne), William Schafer (Cambridge, UK), Marcos Gonzalez-Gaitan (Genève, Suisse), Stephan Sigrist (Göttingen, Allemagne), Antoine Triller (Paris, France), Jean-Luc Vonesch (Strasbourg, France), Cornelius Weijer (Dundee, UK), Joachim Wittbrodt (Heidelberg, Allemagne).

Date limite d'inscription : 4 avril 2008