

## Des chromosomes sans fin : les chromosomes en anneau

Florence Pedeutour  
Claude Turc-Carel

Bien que rares, les chromosomes anormaux de forme circulaire, appelés anneaux chromosomiques, ont toujours été l'objet d'un grand intérêt. Leur structure particulière les rend instables lors des divisions cellulaires, entraînant un phénomène de mosaïque dynamique, lui-même cause d'une grande variabilité phénotypique. La structure en anneau est le résultat de la circularisation d'un chromosome à la suite d'une double délétion (une sur le bras court et une sur le bras long) et de la réunion des extrémités ainsi formées. Puis, le chromosome en anneau évolue au cours des divisions cellulaires, subissant des successions de duplications-délétions. Dans les affections constitutionnelles humaines, le chromosome en anneau peut remplacer un des chromosomes du complément diploïde normal ou bien être surnuméraire. Dans les tumeurs, les anneaux peuvent être formés selon ce modèle, mais ils sont souvent observés au sein de caryotypes très complexes, associés à d'autres anomalies. Ils peuvent, en outre, être polychromosomiques, donc pas toujours issus de la circularisation d'un chromosome unique.

### ADRESSES

F. Pedeutour: *praticien hospitalier*. C. Turc-Carel: *praticien hospitalier-professeur des universités*. Laboratoire de génétique chromosomique des tumeurs, UMR 6549-UNSA Cnrs, Faculté de Médecine, avenue de Valombrose, 06107 Nice Cedex 2, France.

### TIRÉS À PART

F. Pedeutour.

**T**his is a ring chromosome, because a ring chromosome would do this! C'est en 1930, à la lecture d'un article relatant des phénomènes de variabilité phénotypique associés à la perte d'un petit chromosome dans des cellules végétales, que Barbara McClintock imagina la possibilité théorique de la formation de chromosomes en anneau [1]. Elle apporta peu de temps après une preuve concrète de leur existence, et ses descriptions de l'évolution des anneaux au cours du cycle cellulaire du maïs *Zea Mays* ainsi que ses modèles théoriques res-

tent à la base des observations faites ultérieurement dans les maladies humaines. En 1962, Wang décrivit les cas de deux patients affectés d'un syndrome polymalformatif associé à un retard mental, et dont le caryotype présentait un chromosome en anneau [2]. Depuis, de nombreux cas cliniques et cytogénétiques ont été rapportés et chaque chromosome humain a été observé dans cette configuration particulière, avec une fréquence plus élevée pour les chromosomes 13 et 18 dans les syndromes constitutionnels [3]. A l'instar de beaucoup d'anomalies chromosomiques, l'exploration de la structure

génomique des anneaux a bénéficié de l'émergence des techniques d'hybridation fluorescente *in situ* (FISH), qui permettent la visualisation, à une échelle moléculaire de la constitution des chromosomes. Il est alors apparu que sous le terme d'anneau, on désignait en fait des chromosomes circulaires, d'apparence similaire lors de leur révélation par les techniques de coloration des bandes chromatidiennes, mais relevant en réalité de mécanismes variés et non pas toujours de la circularisation d'un chromosome unique après une double délétion (figure 1).

### Anneaux de structure composite : des résultats inattendus

L'analyse chromosomique de certaines tumeurs des tissus mous, plus particulièrement des liposarcomes du sous-type histologique bien différencié ou encore de la tumeur de Darier-Ferrand, montre la présence d'un ou plusieurs anneaux ou de grands chromosomes marqueurs en surnombre dans un caryotype dont les 46 autres chromosomes sont le plus souvent normaux. La présence d'un tel anneau surnuméraire semble être une caractéristique des tumeurs des tissus mous de malignité dite « intermédiaire ». On entend par là des tumeurs pouvant être agressives localement, mais ne produisant des métastases que de façon exceptionnelle et cela, tardivement au cours de l'évolution de la maladie. Nous avons utilisé les techniques de FISH afin d'identifier le contenu génomique de ces anneaux, ce que ne permettaient pas les techniques conventionnelles de coloration des bandes chromatidiennes (bandes R, bandes G). Les résultats obtenus par FISH furent surprenants puisqu'ils nous permirent de découvrir des anneaux complexes associant des séquences issues de plusieurs chromosomes. Dans le cas des liposarcomes bien différenciés, nous avons montré que le chromosome 12 est toujours impliqué dans la constitution de ces anneaux, mais nous avons également noté deux particularités [4]. Tout d'abord, le chromosome 12 est rarement le seul chromosome constituant de ces anneaux. Certains anneaux ou marqueurs montrent

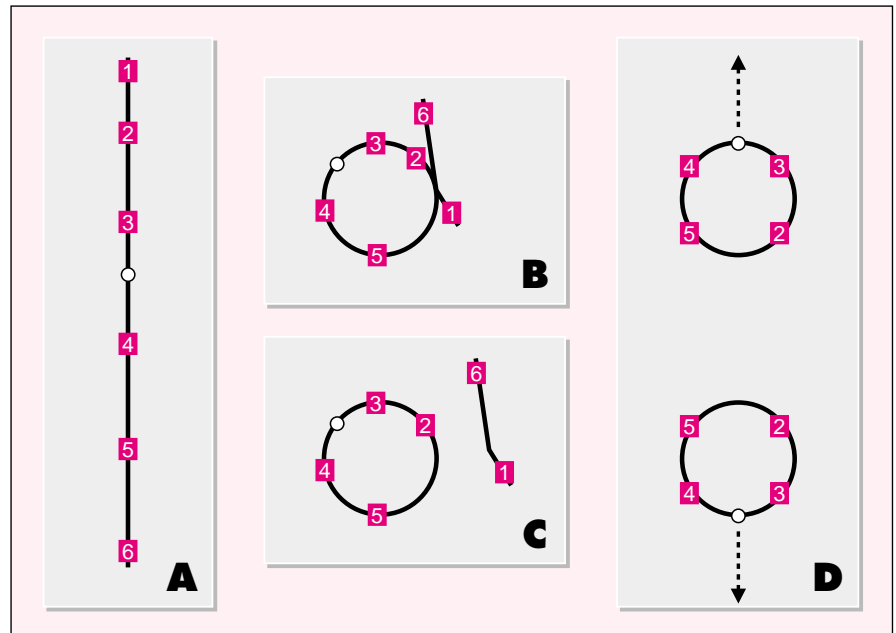


Figure 1. **Représentation schématique de la formation d'un chromosome en anneau d'après Lejeune [13].** Le chromosome, initialement sous forme linéaire (A) subit une double cassure, l'une sur le bras court (entre les segments 1 et 2) et l'autre sur le bras long (entre les segments 5 et 6) (B). L'élimination du segment 1-6 est suivie de la fermeture de l'anneau (C). L'anneau sera ensuite répliqué et chaque cellule fille héritera d'un exemplaire lors de la division cellulaire (D).

une composition particulièrement complexe, allant parfois jusqu'à associer 7 régions chromosomiques provenant respectivement de 5 chromosomes différents. Cela est d'autant plus étonnant que ces régions présentes sur l'anneau le sont aussi, à leur place normale, sur la paire chromosomique d'origine, sans altération apparente. L'autre particularité réside dans le fait que la recherche de la présence d'un centromère au moyen des techniques de coloration des bandes C ou encore par FISH avec des sondes centromériques  $\alpha$ -satellites, s'est toujours avérée négative (figure 2). La poursuite de l'étude montra que ces chromosomes étaient des vecteurs d'amplification. Ils portent de façon constante l'amplification du gène *MDM2*, parfois à de très nombreuses copies (jusqu'à 50). Cette amplification est le plus souvent accompagnée de celle d'autres gènes de la région 12q14. Les chromosomes en anneau des liposarcomes bien différenciés sont donc des structures polychromosomiques, comportant des altérations centromériques pouvant aller jusqu'à l'absence de centromère, tout en étant des vecteurs d'amplifi-

cation génomique. Ces chromosomes sont particulièrement curieux, puisqu'ils diffèrent du modèle tradi-

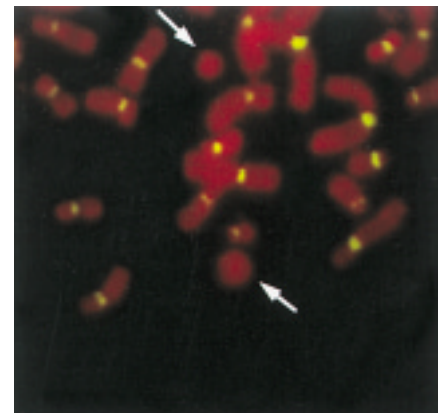


Figure 2. **Hybridation in situ fluorescente réalisée avec une sonde pan-centromérique biotinylée, marquant les séquences satellites de tous les chromosomes humains (Oncor) sur une métaphase d'un liposarcome bien différencié.** Les chromosomes sont contre-colorés par l'iodure de propidium et la sonde est révélée par la fluorescéine. Tous les chromosomes présentent un marquage au niveau des centromères, à l'exception des anneaux (flèches).

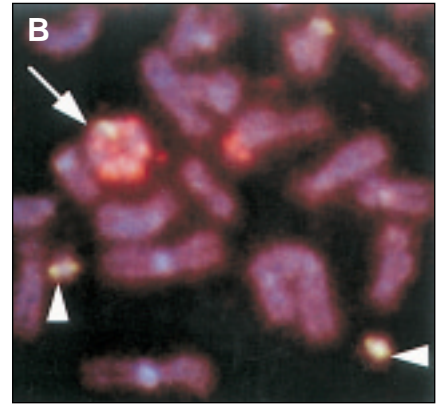
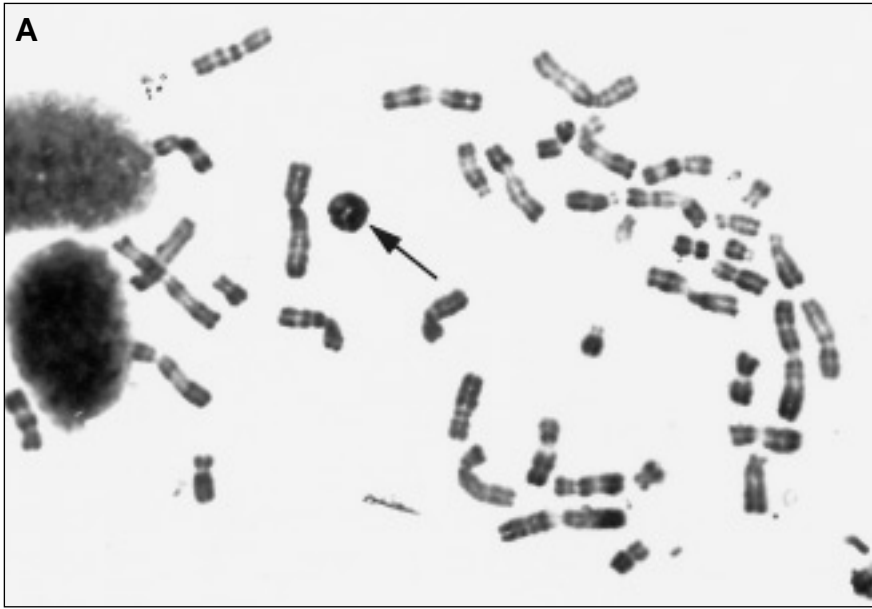


Figure 3. **Métaphases de la tumeur de Darier-Ferrand T91127.** La flèche indique le chromosome surnuméraire en anneau. A. Coloration des bandes chromosomiques R. B. Hybridation in situ fluorescente bicolore avec une sonde  $\alpha$ -satellite

marquant le centromère du chromosome 22 (signal vert) et la sonde D17S74 (signal rouge) normalement localisée sur le bras long du chromosome 17, en 17q23. Les têtes de flèche indiquent les deux chromosomes 22 normaux.

tionnel de l'anneau – chromosome unique circularisé – mais aussi des supports habituels de l'amplification génomique extra- ou intrachromosomiques tels que chromosomes double minutes\* ou régions colorées de façon homogène appelées hsr (*homogeneously staining regions*) (*m/s n° 4, vol. 12, p. 526*). Sur la base de ces résultats, nous avons cherché à identifier la nature des chromosomes surnuméraires en anneau d'une autre tumeur de malignité intermédiaire, la tumeur de Darier-Ferrand (ou *dermatofibrosarcoma protuberans*). L'utilisation combinée de sondes centromériques, de sondes de peinture chromosomique et d'hybridation génomique comparative montra que ces anneaux étaient dérivés du chromosome 22, comportant toujours le centromère de ce chromosome. Ils portent, en outre, une amplification modérée (2 à 5 copies) de séquences issues respectivement des régions 22q11-q13.1 et 17q23-qter [5] (*figure 3*). A la différence des anneaux des liposarcomes bien différenciés dans lesquels le chromosome 12 peut être associé à des partenaires variés, l'association entre les chromosomes 17 et 22 est régulière. La poursuite de notre étude révéla d'ailleurs

plusieurs cas de tumeurs de Darier-Ferrand, le plus souvent des tumeurs pédiatriques, comportant non pas des anneaux chromosomiques, mais des translocations t(17;22)(q22;q13). La translocation entraîne la fusion de deux gènes, *PDGFB* (codant pour le *platelet-derived growth factor  $\beta$* ) sur le chromosome 22 et *COL1A1* (codant pour le collagène 1A1) sur le chromosome 17 [6]. Cette fusion génique est également retrouvée au sein des anneaux. Les observations réalisées dans ces deux types d'anneaux des liposarcomes bien différenciés et des tumeurs de Darier-Ferrand soulevaient de nombreuses questions quant à leurs modes de formation respectifs. Nous avons tenté de répondre à certaines de ces interrogations en faisant une synthèse des modèles théoriques et des travaux consacrés à la mécanique particulière de réplication de ces chromosomes.

### Mécanique de la duplication des anneaux

#### Le modèle de duplication dans le maïs

C'est en produisant des plants de maïs porteurs d'une altération du gène *bm1* (*brown midrib*) localisé sur le chromosome 5 et dont la pigmentation

des tiges et des nervures présentait des anomalies que Barbara McClintock put élaborer les premiers concepts de la mécanique des chromosomes en anneau [7, 8]. L'obtention d'un zygote avec deux chromosomes 5 linéaires déficients pour le gène *bm1* et un chromosome 5 en anneau portant le gène non altéré, permit de produire des plants hétérozygotes dont la variéation (ici la répartition inégale des pigments) était corrélée à l'expression du gène *bm1* situé sur l'anneau. Les conséquences du comportement du chromosome en anneau pouvaient ainsi être suivies par l'observation des modifications de la pigmentation. Dans les plants portant des anneaux de différentes tailles, le profil de variéation était modifié, montrant une relation entre la taille de l'anneau et sa stabilité. Parallèlement aux données génétiques, McClintock étudia le comportement cytologique des anneaux et proposa un modèle expliquant leur instabilité (*figure 4*). Cette instabilité serait le résultat d'un échange de chromatides sœurs au sein d'un anneau monocentrique, entraînant la formation d'un anneau dicentrique à l'issue de la réplication. Lors de l'anaphase, les deux centromères du chromosome dicentrique migrent vers les pôles opposés, faisant subir aux chromatides des ten-

\* Chromosomes double-minute: petites boules chromatiniennes acentriques.

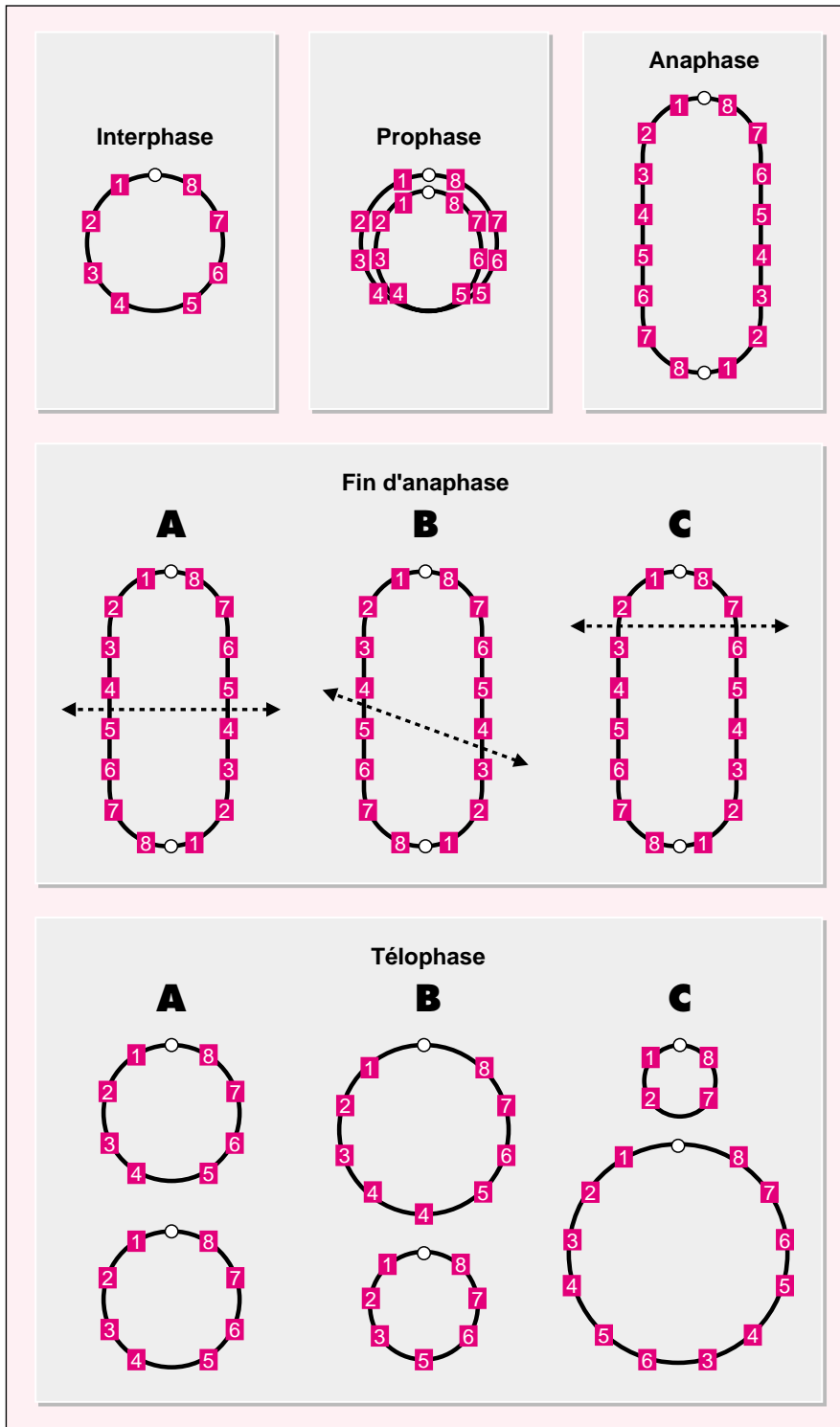


Figure 4. **Modèle théorique de la duplication et de la déstabilisation des chromosomes en anneau, d'après McClintock [8].** Après la réplication, il se produit un échange de chromatides sœurs qui entraîne la formation d'un chromosome dicentrique deux fois plus grand que l'anneau initial. Lors de l'anaphase, les centromères entament une migration vers les pôles opposés, et l'anneau subit des tensions entraînant des cassures. Les extrémités cassées se raboutent lors de la télophase pour reformer un anneau. Selon la position des cassures, on peut avoir restitution de l'anneau initial (A) ou formation d'anneaux de différentes tailles (B et C).

sions, puis des cassures. Lorsque les points de rupture sont symétriques, les cellules filles hériteront d'anneaux identiques et, dans le cas contraire, les anneaux seront différents, un gène donné étant présent en deux copies dans l'anneau migrant vers un pôle et absent dans l'anneau « frère ». Ce phénomène se perpétuant au fil des mitoses, un cycle « cassure-fusion-pont » (ou BFB pour *breakage-fusion-bridge*) se déclenchera, aboutissant à un excès de certaines séquences et à la perte d'autres séquences initialement présentes dans le chromosome original (figure 4).

### Du maïs à l'homme, toujours des mosaïques

Les anneaux et leur comportement aberrant ont également été étudiés de façon approfondie lors des mitoses et méioses de la mouche *Drosophila melanogaster* [9, 10]. Tjio et Levan les observeront ensuite dans des cellules tumorales murines, puis humaines [11, 12]. Chez l'homme, ce fut Lejeune qui développa les premiers modèles relatifs à leur mécanique et aux anomalies qui en découlaient [13]. Lejeune remarqua l'existence fréquente de mosaïques, c'est-à-dire la variabilité de la taille et du nombre des anneaux dans les différentes cellules étudiées chez un même patient. La variabilité de nombre peut être causée par des ségrégations défectueuses, dues au clivage tardif du centromère, entraînant la présence de deux anneaux dans une cellule fille et l'absence d'anneau dans l'autre. La variabilité de nombre ou de taille peut également être due à des remaniements de la structure des anneaux. L'absence d'anneau peut être occasionnelle ou, au contraire, s'observer dans une proportion importante de cellules. Les anneaux « perdus » par une cellule sont parfois observés sous la forme de micronucleus. La proportion de cellules « variantes », c'est-à-dire contenant un anneau différent de l'anneau primitif ou ne contenant pas d'anneau, peut subir, chez un même patient, des variations dues aussi bien aux modalités de culture *in vitro*, comme le nombre de passages en culture, qu'à des circonstances *in vivo*, telles que l'avance-

ment en âge du patient. Dans son modèle théorique de la duplication des anneaux, Lejeune insista particulièrement sur l'importance des échanges de chromatides sœurs. Comme dans le modèle de McClintock, un tel échange, source de tensions, puis de cassures et de recollements, permettrait d'expliquer les phénomènes de variation somatique des anneaux et, notamment, que les centromères des anneaux dicentriques soient toujours diamétralement opposés. Pathak et Sinha viendront contredire ce modèle par la suite en objectant que les centromères des chromosomes en anneau ne sont en fait pas invariablement équidistants [14]. Lejeune élaborera également un modèle mathématique selon lequel la probabilité pour un gène d'avoir été dupliqué ou, au contraire, exclus de l'anneau était fonction de sa distance par rapport au centromère. Les régions médianes de l'anneau, c'est-à-dire les plus éloignées du centromère, sont les plus sensibles à l'effet de délétion/duplication. D'après les analyses de McClintock et celles de Lejeune, la fréquence de ces phénomènes d'instabilité est corrélée à la taille des anneaux. Plus les anneaux sont grands, plus ils sont instables. Cette corrélation n'est pas retrouvée dans les résultats d'autres auteurs [15, 16] qui relient l'instabilité au contenu génique de l'anneau, et non pas à sa taille. Il est hautement probable que plusieurs paramètres sont susceptibles d'influencer la stabilité des anneaux et ces différents résultats sont sans doute complémentaires plutôt que contradictoires.

### Incidents mécaniques

Selon Lejeune, les échanges entre chromatides sœurs pouvant survenir en tout point de l'anneau provoqueraient des remaniements structuraux entraînant la genèse d'anneaux multicentriques instables. Lorsque plusieurs échanges, en nombre pair, de chromatides sœurs ont lieu, cela peut aboutir à la formation d'anneaux enclavés (tels les maillons d'une chaîne), selon le modèle d'un anneau de Moebius. L'exemple récent de l'étude par FISH après microdissection d'un petit anneau surnuméraire contenant trois régions normalement

non contiguës du chromosome 4 suggère qu'un anneau, à l'origine de grande taille, contenant la presque totalité d'un chromosome, puisse perdre la plupart de ses séquences à la suite d'un cycle de formation d'anneaux enclavés, dont les chromatides se seraient rompues, puis auraient refusionné, jusqu'à stabilisation [17]. Lorsque les échanges sont trop nombreux, des spiralisations peuvent se produire et les contraintes mécaniques imposées aux chromatides devenir telles que l'anneau se pulvérise. Une autre hypothèse a été avancée pour expliquer l'apparition d'un anneau pulvérisé: l'anneau resterait à la traîne des autres chromosomes lors de l'anaphase (décalage anaphasique) et formerait un micronucleus séparé [18]. Ce micronucleus, n'obéissant plus à la synchronisation du cycle cellulaire, entraînerait alors un phénomène de condensation chromosomique prématurée lors de la fusion avec un autre noyau entrant en mitose. L'anneau apparaîtra alors en un état de condensation différent des autres chromosomes [19]. Parmi les incidents mécaniques auxquels sont sujets les anneaux, il faut également citer leur transformation en forme linéaire, souvent décrite [3]. Il est vraisemblable que ces chromosomes soient des anneaux rompus lors de l'anaphase, et il n'a jamais été montré que ces formes puissent se stabiliser. Certains de ces chromosomes linéaires ont une taille supérieure à celle de l'anneau correspondant et proviennent, sans doute, de la rupture d'un anneau dicentrique ou tétracentrique [20].

### Les anneaux dans les syndromes constitutionnels

Dans les syndromes constitutionnels, les caryotypes, établis à partir de cultures de lymphocytes ou de fibroblastes cutanés, sont généralement simples, puisque des remaniements importants ont des conséquences létales. Lorsque le chromosome en anneau remplace un chromosome normal, son origine est directement connue et les conséquences cliniques et cytologiques étudiées en connaissance de cause. Lorsque l'anneau est surnuméraire, il peut être plus difficile à identifier. Les anneaux captivè-

rent l'intérêt des généticiens en raison de leur instabilité dans les préparations cytologiques mais, plus encore, par la variabilité de leur expression phénotypique. En 1969, F. Hecht les comparait à des sirènes: comme les créatures mythologiques, les anneaux sont beaux, de facture complexe, et leur apparence trompeuse peut entraîner l'observateur sur des voies périlleuses ! [21].

### Multiplécité des formes cytogénétiques et idiosyncrasie phénotypique

L'instabilité des anneaux et les ségrégations mitotiques défectueuses qui sont leur lot expliquent qu'il n'y ait pas de relation univoque entre l'origine chromosomique de l'anneau et les conséquences pathologiques, puisque certaines régions chromosomiques vont être monosomiques alors que d'autres parties du même chromosome seront plusieurs fois dupliquées, et tout cela dans un contexte de mosaïque cellulaire. On pourrait envisager théoriquement qu'il existe un équilibre génique global, puisque des séquences deviendront simultanément trisomiques dans l'une des cellules filles et monosomiques dans l'autre cellule fille lors de la division cellulaire. En réalité, la survie des différentes cellules filles n'est pas la même selon le déséquilibre génique qu'elle portent (les trisomies semblent moins létales que les monosomies). Certains des patients porteurs d'un anneau présentent d'importantes malformations associées à un profond déficit intellectuel et, paradoxalement, d'autres personnes chez lesquelles on observe un anneau apparemment similaire (au niveau cytologique) ne présentent pas de symptômes cliniques, ni même d'infertilité. Inversement, il a été remarqué des phénotypes similaires alors que les anneaux apparaissent différents. Les enfants porteurs d'un anneau transmis par un des parents peuvent avoir un phénotype différent de celui-ci. Il existe toutefois, à notre connaissance, au moins treize syndromes répertoriés spécifiques d'un anneau donné [3]. Mais, malgré les descriptions minutieuses à la fois cytogénétiques et cliniques rapportées dans les nombreuses publications concernant les anneaux,

il n'est pas toujours possible d'établir la relation génotype/phénotype comme cela est pratiqué pour les anomalies de structure telles que trisomies et monosomies totales ou partielles. Dans certains cas, on retrouve néanmoins des stigmates correspondant aux régions délétées, par exemple syndrome de Wolf-Hirschhorn\* (*m/s n° 4, vol. 8, p. 395*) et anneaux du chromosome 4, syndrome du cri du chat et anneaux du chromosome 5.

### **Le syndrome de l'anneau : Circularisation sans délétion ?**

Les anneaux ont une apparence cytogénétique extrêmement variée. Ils sont parfois de très petite taille et sont alors dénommés minute, micro ou minichromosomes. Au contraire, dans certains cas le chromosome en anneau paraît avoir la même taille que son homologue normal, la délétion de matériel chromosomique qui précède la circularisation telle que l'a décrite Lejeune n'étant pas visible [22]. L'étude sémiologique de patients porteurs de ce type d'anneaux apparemment non délétés a amené Cote *et al.* [28] à proposer la définition du « syndrome de l'anneau ». Sur le plan clinique, ce syndrome est caractérisé par un très grand retard de croissance, sans dysmorphie ni handicap mental notables. Le tableau de déficit de développement staturo-pondéral est indépendant du chromosome impliqué et serait dû à la perte cellulaire engendrée par l'élimination continue de cellules aneuploïdes non viables lorsque l'anneau est déstabilisé [22, 23]. Les cellules restantes ont un dosage génique normal, bien qu'un des chromosomes soit circularisé. Des observations minutieuses de tels chromosomes en anneau, réalisées à l'aide de diverses techniques telles que microscopie électronique, cytométrie de flux, haute résolution ou encore coloration argentique des organisateurs nucléolaires (AgNOR) ont apporté des arguments en faveur de l'hypothèse d'absence de délétion (ou d'une délétion seulement par-

tielle) de séquences télomériques [24-27]. Cela impliquerait un mécanisme de formation de l'anneau par fusion des séquences répétées télomériques du bras long avec celles du bras court, sans perte de matériel génétique. Cette hypothèse a été confortée par la mise en évidence par FISH de séquences télomériques (ou subtélomériques) sur des chromosomes en anneaux montrant que ces séquences peuvent persister malgré la « fermeture » du chromosome [28].

### **Anneaux « polychromosomiques »**

Les anneaux « polychromosomiques », c'est-à-dire composés de séquences provenant de chromosomes différents sont tout à fait exceptionnels dans les syndromes constitutionnels. La revue de la littérature ne nous a d'ailleurs permis de n'en trouver qu'un seul exemple. Cet anneau était engendré par la transmission d'une translocation paternelle. Alors que le père de l'enfant présentait une translocation équilibrée t(2;6), le proposant avait hérité du chromosome dérivé t(2;6) sous forme circularisée [29].

### **Chromosomes en anneau dans les cellules tumoraux**

Dans les tumeurs, la présence d'un chromosome en anneau est une anomalie peu fréquente, puisqu'on en a dénombré moins de 3% dans les 18000 caryotypes anormaux recensés dans la dernière mise à jour du « catalogue des aberrations chromosomiques dans les cancers » [30]. Ce pourcentage est essentiellement le reflet des anomalies rencontrées en onco-hématologie, puisque la description cytogénétique de ces tumeurs est mieux documentée que celle des tumeurs solides. L'étude des chromosomes en anneau des tumeurs avait été limitée non seulement par leur rareté mais par des difficultés techniques liées à la culture *in vitro* des cellules tumorales et à la qualité souvent médiocre de leurs métaphases. De plus, dans les caryotypes tumoraux arborant souvent déjà de multiples anomalies, les anneaux étaient plutôt perçus comme une bizarrerie supplémen-

taire liée à l'instabilité génomique des cellules tumorales que comme un marqueur spécifique d'une affection. Dans les tumeurs solides, les anneaux peuvent être rencontrés aussi bien dans des tumeurs bénignes, lipomes, léiomyomes utérins ou thymomes, que dans des tumeurs de plus mauvais pronostic, comme les histiocytomes fibreux malins pléiomorphes ou des cancers du sein. On les observe le plus fréquemment associés à des caryotypes comportant de nombreux autres remaniements. Certains anneaux sont des chromosomes uniques circularisés selon le mode proposé pour les anneaux constitutionnels. D'autres, au contraire, sont issus de remaniements plus complexes.

### **Anneaux et amplification génomique**

Les travaux consacrés à l'amplification génomique mentionnent principalement deux types de supports cytogénétiques des régions amplifiées. On distingue les formes extrachromosomiques circulaires, appelées épisomes lorsqu'elles sont submicroscopiques, ou double-minutes lorsqu'elles sont visibles bien que de petite taille, et les formes hsr linéaires intrachromosomiques. Nous avons vu que les anneaux des liposarcomes bien différenciés étaient des vecteurs d'amplification génomique. Il est probable, d'après les résultats apportés par l'hybridation génomique comparative qui montrent un excès de séquences de la région 12q13-15 associée à la présence des anneaux, que les anneaux surnuméraires des ostéosarcomes parostéaux portent également des amplifications [31]. Dans les lignées murines *in vitro* utilisées comme modèles de résistance à des médicaments cytotoxiques, il existe quelques exemples montrant des amplifications portées par des anneaux. Notamment, Windle *et al.* (La Jolla, CA, USA) utilisèrent une sonde fluorescente du gène *DHFR* (codant pour la dihydrofolate réductase) pour analyser la structure des amplicons dans la lignée CHO UA21 résistante au méthotrexate [32]. Lors des premiers passages, deux types d'amplifications extrachromosomiques furent observés. Un type était porté par des petits éléments (de type double-minutes)

\* Syndrome de Wolf-Hirschhorn: grave affection caractérisée par un faible poids de naissance et un retard de développement, des malformations telles que micro-encéphalie, fentes labiales et palatines.

arborant des signaux fluorescents contigus, et un autre type par des anneaux ou des grands éléments chromosomiques linéaires, sans constriction centromérique apparente, montrant des signaux fluorescents espacés largement et régulièrement. Disposant de cette information, et bien que quelquefois il soit malaisé d'attribuer à certains petits chromosomes circulaires le qualificatif de « petit anneau » ou de « grand double minute », la lecture de quelques observations plus anciennes permet d'interpréter rétrospectivement la présence probable d'amplifications dans certains anneaux. Par exemple, dans la lignée de neuroblastome NAP une majorité de cellules contient, soit des double-minutes, soit des hsr, alors que 3 à 5 % des cellules contiennent des anneaux de taille variable. Quant à la lignée LA-N-2, elle contient respectivement des double-minutes dans presque toutes les cellules et des hsr ou des anneaux dans 1 % à 2 % des cellules [33]. On peut également citer l'exemple d'une lignée murine dérivée de la lignée sarcomateuse SEWA dans laquelle la majorité des cellules contiennent des grands chromosomes marqueurs négatifs aux colorations centromériques des bandes C, alors qu'un cinquième des cellules environ contient des double-minutes et/ou des anneaux, également négatifs à la coloration des bandes C [34]. Dans toutes ces différentes lignées, les anneaux semblent donc être une forme occasionnelle d'amplification génomique et, bien que le passage d'une forme d'amplification à une autre, double-minute à hsr ou inversement, n'ait jamais été prouvé (pour revue, voir [35]), les anneaux pourraient parfois représenter une structure intermédiaire entre les différentes formes.

### Y a-t-il des anneaux acentriques ?

Dans le cas des anneaux observés dans les liposarcomes bien différenciés, nous avons vu que les marquages tant par les colorations en bandes C que par les sondes fluorescentes  $\alpha$ -satellites étaient toujours négatifs. Cela amène à s'interroger sur l'existence de centromères dans ces chromosomes. L'absence de détection par FISH de séquences a-

satellites ne signifie pas qu'il ne puisse pas en subsister suffisamment pour qu'elles assurent leur rôle dans la fonction centromérique, rôle qui n'est du reste pas encore élucidé mais qui est certainement important, comme le montrent les expériences de construction de minichromosomes artificiels humains (*m/s n° 8/9, vol. 13, p. 1066*) [36]. Dans l'hypothèse où ces séquences seraient totalement absentes, on ne peut pas exclure qu'il existe tout de même un centromère fonctionnel, d'autant plus qu'une constriction primaire (qui selon la définition cytogénétique indique le site d'attachement des chromatides sœurs) est le plus souvent bien visible. En outre, ces chromosomes sont relativement stables, à la différence des chromosomes double-minutes qui sont acentriques et sont facilement perdus au fil des divisions. Récemment, plusieurs cas de chromosomes anormaux stables ont été décrits dans des syndromes constitutionnels, dans lesquels il n'était pas non plus possible de détecter la présence de séquences  $\alpha$ -satellites. Il existerait alors un mécanisme de formation d'un néocentromère à partir de la réactivation d'un centromère latent [37]. Il est possible qu'un mécanisme analogue entre en jeu lors de la construction des chromosomes en anneau des liposarcomes bien différenciés. Il est également possible que des séquences  $\alpha$ -satellites péricentromériques aient été présentes aux stades précoces de la formation de ces chromosomes, et qu'elles aient été éliminées totalement ou en partie par la suite, ne laissant que le centromère fonctionnel (*figure 5*).

### Les associations télomériques ont-elles un rôle dans la formation des anneaux ?

Il est notable que les caryotypes des liposarcomes bien différenciés ont souvent une apparence faussement complexe en raison d'une fréquence élevée d'associations télomériques. Ces associations sont le plus souvent aléatoires, et pourraient avoir un rôle dans le processus de déclenchement de la formation des chromosomes marqueurs et des anneaux (*figure 5*). De nombreux travaux sont consacrés aux phénomènes d'érosion des télo-

mères, qui entraînent parfois des associations télomériques, notamment dans les néoplasies. Un des premiers cas décrivant des associations télomériques en pathologie humaine a été étudié lors de l'analyse cytogénétique des métaphases lymphocytaires d'une patiente atteinte du syndrome de Thiberge-Weissenbach (sclérodermie, calcinose, télangiectasie) [38]. Les images obtenues montraient dans une faible proportion de métaphases la présence simultanée d'anneaux et de très curieuses chaînes chromosomiques allant parfois jusqu'à associer, par les régions terminales, presque tous les chromosomes de la cellule pour n'en faire qu'un seul élément gigantesque. D'autres observations, faites lors de l'analyse de caryotypes tumoraux, suggèrent également qu'il puisse exister un lien entre associations télomériques et formation d'anneaux : dans un xanthoastrocytome pléiomorphe, des associations télomériques, respectivement entre les chromosomes 15 et 20 et les chromosomes 1 et 22, précèdent l'apparition de la formation d'anneaux de chromosomes 20 et 22 au cours de la récurrence [39]. De même, dans un astrocytome cérébelleux l'existence de clones possédant des associations télomériques entre les chromosomes 12 et 15, d'une part, et de clones possédant un anneau du 12, d'autre part, pourrait illustrer à nouveau la possibilité que l'association télomérique soit la première étape avant la formation de l'anneau [40]. La circularisation du chromosome pourrait être une façon de circonvenir à la carence des télomères.

### Anneaux polychromosomiques et translocations

Il existe à ce jour de nombreux exemples de tumeurs, aussi bien hématologiques que solides, dans lesquelles une translocation réciproque entre deux chromosomes induit une fusion de deux gènes avec production d'un transcrit chimérique, ou encore la dérégulation de l'expression d'un gène. Ces translocations se produisent par échanges de segments entre chromosomes linéaires, pourvus de leurs télomères et dans l'immense majorité des cas ces dérivés de la translocation sont présents à

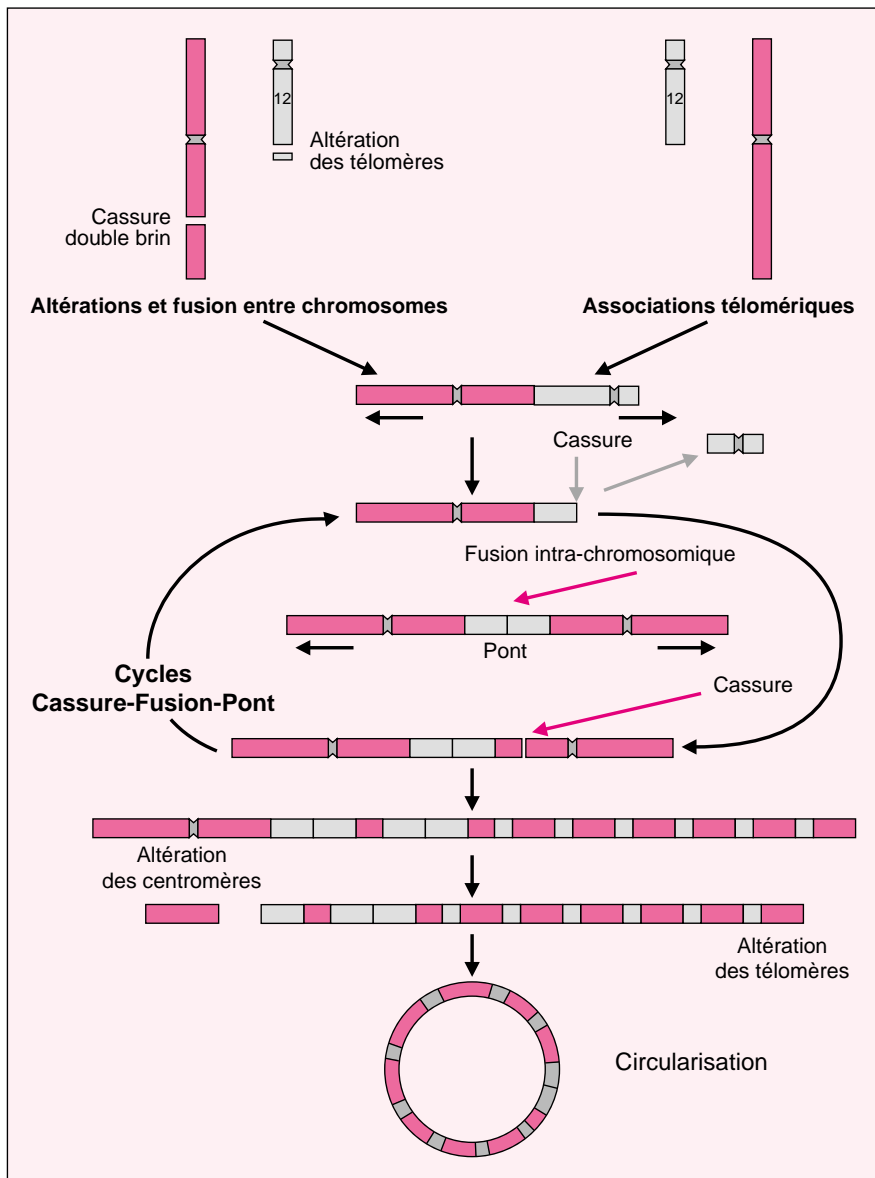


Figure 5. **Mécanisme hypothétique de formation des anneaux polychromosomiques, vecteurs d'amplification dans les liposarcomes bien différenciés.** Une fusion entre le chromosome 12 et un autre chromosome entraînerait la formation d'un chromosome dicentrique instable lors des divisions cellulaires. À ce stade, des associations avec un troisième, voire un quatrième chromosome pourraient également se produire. Un cycle de cassure-fusion-pont aboutirait à l'amplification de séquences et, en particulier, du gène MDM2 (normalement localisé en 12q14). Lors de ce cycle, la production d'altérations centromériques et télomériques aboutirait à la formation d'anneaux négatifs pour les marquages par les sondes centromériques.

un seul exemplaire chacun par cellule et remplacent leur homologue normal dans la paire chromosomique d'origine. Dans les tumeurs de Darier-Ferrand de l'enfant et dans une autre entité voisine, le fibrosarcome à cellules géantes, on observe une translocation entre un chromo-

sosome 22 et un chromosome 17 entraînant une fusion entre deux gènes situés respectivement sur chacun de ces chromosomes, *PDGFB* et *COL1A1* (figure 6). Cette fusion génique spécifique est également retrouvée dans les tumeurs de Darier-Ferrand de l'adulte, mais elle est

alors portée par des anneaux. Alors que dans le fibrosarcome à cellules géantes, il s'agit d'une simple translocation réciproque équilibrée, dans les tumeurs de Darier-Ferrand la fusion *PDGFB-COL1A1* a la particularité d'être toujours accompagnée d'un phénomène de surdosage de certaines séquences situées sur le chromosome 22 dérivé de la translocation. Ces séquences sont présentes sur la région proximale du bras long du chromosome 22, du centromère jusqu'à *PDGFB*, et sur la région distale du bras long du chromosome 17, à partir de *COL1A1*, jusqu'au télomère. Ces séquences sont en excès, soit parce que les dérivés de la translocation sont présents à plusieurs copies (cas pédiatriques), soit parce qu'elles sont présentes en plusieurs exemplaires sur l'anneau (figure 6). Il est à noter que le deuxième partenaire de la translocation, le chromosome 17 dérivé, est, lui, le plus souvent manquant. Il faut également remarquer que les cariotypes montrent en règle générale deux chromosomes 17 et deux chromosomes 22 normaux aux côtés des dérivés de la translocation. On pourrait donc supposer qu'une translocation réciproque équilibrée entre un chromosome 17 et un chromosome 22 soit l'événement primitif, suivi de la perte du chromosome 17 dérivé de la duplication d'un chromosome 17 normal et d'un chromosome 22 normal et (alternativement ou successivement), de la duplication du chromosome 22 dérivé et/ou de sa circularisation. Cela pourrait suggérer que la formation de la structure en anneau est une étape ultérieure à la translocation. Cette circularisation serait elle-même suivie d'une déstabilisation de l'anneau, entraînant des duplications de certaines séquences au sein de l'anneau au fil des mitoses selon le modèle de McClintock. L'amplification, même modérée, du produit de fusion semble apporter un avantage aux tumeurs de Darier-Ferrand. L'amplification d'un gène de fusion a déjà été décrite dans un cas de rhabdomyosarcome alvéolaire dans lequel la fusion génique spécifique *PAX7-FKHR* était portée par des chromosomes double-minutes [41]. On peut se demander alors si les anneaux des liposarcomes bien différenciés portent également des gènes



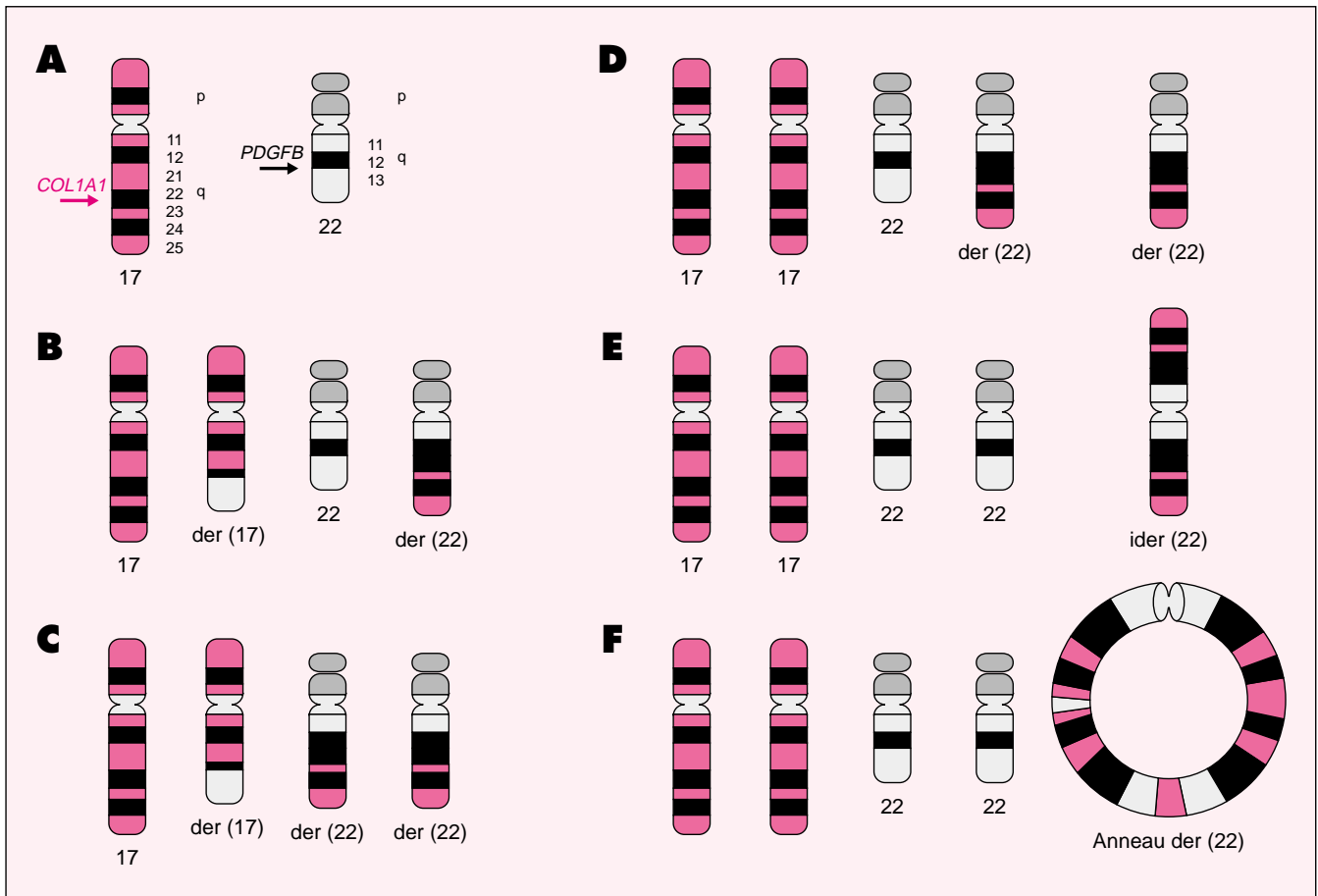


Figure 6. **Différents aspects des réarrangements chromosomiques des chromosomes 17 et 22 dans les tumeurs de Darier-Ferrand.** Dans tous les cas, on observe une fusion entre le gène PDGFB, normalement situé en 22q13.1 et le gène COL1A1, localisé en 17q22 [7]. **A.** Localisation des points de cassure sur les chromosomes 17 et 22. **B.** Translocation réciproque équilibrée t(17;22) dans un fibroblaste à cellule géante, forme juvénile de la tumeur de Darier-Ferrand. **C.** Cas de la tumeur de Darier-Ferrand d'un enfant T94796: on observe deux copies du chromosome 22 dérivé de la translocation, mais pas de chromosome 22 normal. **D.** Cas des tumeurs de Darier-Ferrand T951036 (enfant) et 2351 (adulte): on observe la présence de deux chromosomes der(22), mais pas de der(17). **E.** Tumeur de Darier-Ferrand T94850 (enfant): le chromosome surnuméraire portant la translocation est un isochromosome du der(22): deux copies du bras long du der(22) sont jointes par le centromère. **F.** Illustration du remaniement le plus fréquent dans les tumeurs de Darier-Ferrand de l'adulte: présence d'un chromosome en anneau surnuméraire. L'anneau figuré ici est une représentation schématique « moyenne » de nos différentes observations [5]. Le nombre de copies des séquences provenant respectivement des régions 22q11-q13 et 17q22-qter varie en réalité d'un cas à l'autre. La présence de la fusion génique sur l'anneau PDGFB-COL1A1 est, en revanche, constante.

chimériques. Ils sont constitués de régions variées du génome réparties selon une configuration « zébrée », faisant alterner des répétitions d'unités d'origine chromosomique différentes. La région 12q14, et plus particulièrement le gène *MDM2*, est toujours co-amplifiée avec d'autres régions chromosomiques. On ignore si ces différentes régions co-amplifiées sont simplement juxtaposées à 12q14 ou bien s'il existe des fusions géniques spécifiques aux limites des zones de jonction. Les récentes observations de Berner *et al.* [42]

montrant une amplification associée à un réarrangement du gène *HMGIC* dans des liposarcomes bien différenciés iraient en ce sens.

## Conclusion

Dès qu'ils ont pu être observés dans les préparations cellulaires, les chromosomes en anneau ont intrigué les cytogénéticiens. Il fut établi que leur structure circulaire engendrait une instabilité au fil des divisions cellulaires, elle-même source de variabilité phénotypique. Il était admis que les

anneaux provenaient de la circularisation d'un chromosome unique après une double délétion. Les techniques de FISH ont permis depuis quelques années d'approfondir les études cytogénétiques et nous renseignent mieux sur la structure moléculaire des anneaux. Dans le cas des anneaux constitutionnels, la FISH a apporté une grande aide à leur identification mais n'a pas remis en cause la validité des modèles théoriques établis antérieurement. Dans le cas des anneaux des cellules tumorales, les résultats furent beaucoup plus

surprenants. La première surprise fut due à la découverte de l'existence d'anneaux polychromosomiques. La deuxième surprise provint de l'apparente diversité des mécanismes engendrant ces structures circulaires. Par exemple, les anneaux des tumeurs de Darier-Ferrand, constitués de séquences provenant des chromosomes 17 et 22, sont les supports d'un gène de fusion chimérique *PDGFB-COL1A1*, remaniement spécifique de cette tumeur. Quant aux anneaux des liposarcomes bien différenciés, ils véhiculent une amplification du gène *MDM2*, parfois à de très nombreuses copies, et toujours en association avec d'autres régions non synténiques et en surnombre au sein d'un complément diploïde souvent normal. La nature de leurs altérations centromériques devra être identifiée. On peut s'interroger sur le déroulement des nombreuses étapes ayant abouti à la formation de structures aussi compliquées. Il reste surtout à élucider quels sont les avantages sélectifs que procurent à la cellule tumorale le maintien et la propagation de tels chromosomes. L'analyse de ces phénomènes ouvrira sans doute de nouvelles perspectives à notre connaissance de la mécanique chromosomique et des phénomènes d'instabilité génomique. Les chromosomes en anneau sont décidément des chromosomes sans fin... ■

#### Remerciements

Nous remercions sincèrement F. Hecht, P. Gaudray, M.P. Simon, S. Bekri et N. Sirvent pour leur aide et leurs suggestions lors de la rédaction de ce manuscrit, ainsi que R. Gratery pour la réalisation des figures.

#### RÉFÉRENCES

1. Fox Keller E. *A feeling for the organism. The life and work of Barbara McClintock*. New York: WH Freeman and Company, 1983.
2. Wang HC, Melnyk J, McDonald LT, Uchida IA, Carr DH, Goldberg B. Ring chromosomes in human being. *Nature* 1962; 195: 733-4.
3. Wyandt HE. Ring autosomes: identification, familial transmission, causes of phenotypic effects and *in vitro* mosaicism. In: Daniel A ed. *The cytogenetics of mammalian autosomal rearrangements*. New York: AR Liss, Inc., 1988: 667-95.
4. Pedoutour F, Suijkerbuijk RF, Forus A, Van Gaal J, Van de Klundert W, Coindre JM, Nicolo G, Collin F, Van Haelst U, Huffermann K, Turc-Carel C. Complex composition and co-amplification of *SAS* and *MDM2* in ring and giant rod marker chromosomes in well-differentiated liposarcoma. *Genes Chrom Cancer* 1994; 10: 85-94.
5. Pedoutour F, Simon MP, Minoletti F, Sozzi G, Pierotti M, Hecht F, Turc-Carel C. Ring chromosome 22 are low-level amplifiers of chromosome 17 and 22 sequences. *Cancer Res* 1995; 55: 2400-3.
6. Simon MP, Pedoutour F, Sirvent N, Grosgeorge J, Minoletti F, Coindre JM, Terrier-Lacombe MJ, Mandahl N, Craver RD, Blin N, Sozzi G, Turc-Carel C. (group 1); O'Brien K, Kedra D, Fransson I, Guillaud C, Dumanski J (group 2). Deregulation of the platelet-derived-growth factor B-chain *via* its fusion with the collagen gene (*COL1A1*) in dermatofibrosarcoma protuberans and giant-cell fibroblastoma. *Nature Genet* 1997; 15: 95-8.
7. McClintock B. Correlation of ring-shaped chromosomes with variegation in *Zea mays*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1932; 18: 677-81.
8. McClintock B. The association of mutants with homozygous deficiencies in *Zea mays*. *Genetics* 1940; 25: 542-71.
9. Morgan LV. A closed X chromosome in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 1933; 18: 250-79.
10. Sandler L. The mitotic mechanics of ring chromosomes in female *Drosophila melanogaster*. *Natl Cancer Inst Monogr* 1965; 18: 243-73.
11. Tjio HJ, Levan A. Chromosome analysis of three hyperdiploid ascites tumours of the mouse. *Lunds Univ Arsskr* 1954; N.F. Bd. 2, 50: 51p.
12. Levan A. Self-perpetuating ring chromosome in two human tumours. *Hereditas* 1956; 42: 366-72.
13. Lejeune J. De la duplication des structures circulaires. *Ann Genet* 1968; 11: 71-7.
14. Pathak S, Sinha AK. An alternative model for ring chromosome perpetuation in a human subject. *Ann Hum Genet* 1972; 35: 471-6.
15. Schwartz D. On the stability of a ring chromosome in maize. *Genetics* 1958; 43: 86-91.
16. Kistenmacher ML, Punnett HH. Comparative behavior of ring chromosomes. *Am J Hum Genet* 1970; 22: 304-18.
17. Fang YY, Eyre HJ, Bohlander SK, Estop A, McPherson E, Träger T, Riess O, Callen DF. Mechanisms of small ring formation suggested by the molecular characterization of two small accessory ring chromosomes derived by the chromosome 4. *Am J Hum Genet* 1995; 57: 1137-42.
18. Hoo J, Obermann U, Cramer H. The behavior of ring chromosome 13. *Humangenetik* 1974; 24: 161-71.
19. Sperling K, Rao PN. The phenomenon of premature chromosome condensation: its relevance to basic and applied research. *Humangenetik* 1974; 23: 235-58.
20. Niss R, Passarge E. Derivative chromosomal structures from a ring chromosome 4. *Humangenetik* 1975; 28: 9-23.
21. Hecht F. Ring 4 chromosome: ring autosomes, lorelei of clinical-karyotype correlation and deletion mapping. *Birth Defects* 1969; 5: 106-13.
22. Cote GB, Katsantoni A, Deligeorgis D. The cytogenetic and clinical implications of a ring chromosome 2. *Ann Genet* 1981; 24: 231-5.
23. Kosztolányi G. Does «ring syndrom» exist? An analysis of 207 case reports on patients with a ring autosome. *Hum Genet* 1987; 75: 174-9.
24. MacDermot KD, Jack E, Cooke A, Turleau C, Lindenbaum RH, Pearson J, Patel C, Barnes PM, Portch J, Crawford Md'A. Investigation of three patients with the «ring syndrom», including familial transmission of ring 5, and estimation of reproductive risks. *Hum Genet* 1990; 85: 516-20.
25. Sawyer JR, Rowe RA, Hased SA, Cunniff C. High resolution cytogenetic characterization of telomeric associations in ring chromosome 19. *Hum Genet* 1993; 91: 42-4.
26. Ledbetter D., Riccardi VM, Au WW, Wilson DP, Holmquist GP. Ring chromosome 15: phenotype, Ag-NOR analysis, secondary aneuploidy, and associated chromosome instability. *Cytogenet Cell Genet* 1980; 27: 111-22.
27. Yunis E, Leibovici M, Quintero L. Ring (15) chromosome. *Hum Genet* 1981; 57: 207-9.
28. Pezzolo A, Gimelli G, Cohen A, Lavagetto A, Romano C, Fogu G, Zuffardi O. Presence of telomeric and subtelomeric sequences at the fusion points of ring chromosomes indicates that the ring syndrome is caused by ring instability. *Hum Genet* 1993; 92: 23-7.
29. Maraschio P, Danesino C, Garau A, Saputo V, Vigi V, Volpato S. Three cases of ring chromosome 2, one derived from a paternal 2/6 translocation. *Hum Genet* 1979; 48: 157-67.
30. Mitelman F. *Catalog of chromosome aberrations in cancer*. New York: Alan Riss, 1991.
31. Szymanska J, Mandahl N, Mertens F, Tarkkanen M, Karaharju E, Knuutila S. Ring chromosomes in parosteal osteosarcoma contain sequences from 12q13-15: a combined cytogenetic and comparative hybridization study. *Genes Chrom Cancer* 1996; 16: 31-4.
32. Windle B, Draper BW, Yin Y, O'Gorman S, Wahl GM. A central role for chromosome breakage in gene amplification, deletion formation, and amplification integration. *Genes Dev* 1991; 5: 160-74.
33. Biedler JL, Ross RA, Shanske S, Spengler BA. Human neuroblastoma cytogenetics: search for significance of homogeneously staining regions and double minutes chromosomes. In: Evans ed. *Advances in neuroblastoma research*. New York: Raven Press, 1980: 81-96.

## RÉFÉRENCES

34. Levan A, Levan G, Mandahl N. Double minute and C-bandless chromosomes in a mouse tumor. In: Arrighi FE, Rao PN, Stubblefield E, eds. *Genes, chromosomes, and neoplasia*. New York: Raven Press, 1981; 223-51.
35. Debatisse M, Toledo F. Amplification génique, plasticité des génomes et oncogénèse. *Med Sci* 1995; 11: 1099-109.
36. Harrington JH, Van Bokkelen GV, Mays RW, Gustashaw K, Willard HF. Formation of de novo centromeres and construction of first-generation human artificial chromosomes. *Nature Genet* 1997; 15: 345-55.
37. Sart D (du), Cancilla MR, Earle E, Mao J, Saffery R, Tainton KM, Kalitsis P, Martyn J, Barry AE, Choo KH. A functional neocentromere formed through activation of a latent human centromere and consisting of non-alpha-satellite DNA. *Nature Genet* 1997; 16: 144-53.
38. Dutrillaux B, Croquette MF, Viegas-Péguignot E, Aurias A, Coget J, Couturier J, Lejeune J. Human somatic chromosome chains and rings. A preliminary note on end-to-end fusions. *Cytogenet Cell Genet* 1978; 20: 70-7.
39. Sawyer JR, Thomas EL, Roloson G, Chadduck WM, Boop F.A. Telomeric association evolving to ring chromosomes in a recurrent pleomorphic xanthoastrocytoma. *Cancer Genet Cytogenet* 1992; 60: 188-9.
40. Sawyer JR, Sammartino G, Husain M, Lewis JM, Anderson B, Boop FA. Ring chromosome 12 resulting from nonrandom telomeric associations with the short arm of chromosome 15 in a cerebellar astrocytoma. *Genes Chrom Cancer* 1993; 8: 69-73.
41. Weber-Hall S, McManus A, Anderson J, Nojima T, Abe S, Pritchard-Jones K, Shipley J. Novel formation and amplification of the PAX7-FKHR fusion gene in a case of alveolar rhabdomyosarcoma. *Genes Chrom Cancer* 1996; 17: 7-13.
42. Berner JM, Meza-Zepeda LA, Kools PFJ, Forus A, Schoenmakers EFPM, Van de Ven WJM, Fodstad O, Myklebost O. The *HMGIC* gene is amplified, rearranged and overexpressed in a subset of human sarcomas. *Oncogene* 1997; 14: 2935-45.

## Summary

### Endless chromosomes: ring chromosomes

Chromosomes are subject to a host of different types of numerical and structural abnormalities. All of these abnormalities involve linear chromosomes with arms capped by conventional telomeric repeat sequences except for ring chromosomes which are rare in humans. When constitutional, rings usually replace a rod chromosome. Rings have traditionally been ascribed to loss of both telomeres from a single chromosome with subsequent fusion of the broken ends to make the ring. New perspectives on rings have come from the analysis, using fluorescent in situ hybridization (FISH) and related techniques, of rings in solid tumors including well-differentiated liposarcomas and dermatofibrosarcoma protuberans (Darier-Ferrand tumors). Some of these rings are polychromosomal in origin and very complex in composition. It is clear that rings need not stem from a single chromosome nor arise by the traditional mechanism of formation. Further, it would appear that rings may serve unforeseen functions such as gene fusion and selective genomic amplification. Rings are truly endless chromosomes.