

APPLICATIONS DES TECHNIQUES D'IDENTIFICATION CHROMOSOMIQUE (*)

par M. DEMINATTI (**) et J.-B. SAVARY

INTRODUCTION

L'introduction des techniques d'identification chromosomique (9) a permis un nouvel essor à la Cytogénétique humaine. En effet, ces techniques font apparaître sur les chromosomes des bandes chromatiques caractéristiques après coloration soit par un fluorochrome (4), soit après un traitement enzymatique (13-22), alcalin (12), salin (21) ou thermique (14), ce qui permet une identification précise de chaque chromosome.

Ces techniques permettent :

- d'identifier un chromosome surnuméraire ;*
- d'identifier le ou les chromosomes impliqués dans un remaniement structural ;*
- d'étudier des caryotypes considérés par les méthodes classiques d'analyse, comme étant équilibrés.*

L'application de ces nouvelles techniques en Cytogénétique humaine est donc d'un intérêt pratique considérable puisqu'elles permettent d'affiner la relation génotype-phénotype. D'autre part, elles seront dans certaines conditions un outil précieux d'orientation du conseil génétique ; en effet, ces techniques permettent de préciser le caractère équilibré ou non équilibré d'une aberration chromosomique et donc d'en prévoir les conséquences au niveau de la descendance.

TECHNIQUES

1) La consultation génétique

Nos consultants sont hospitalisés pour des motifs divers ou venus en consultation externe.

Dans la mesure du possible, un interrogatoire précise le motif de consultation et renseigne sur les antécédents personnels et généraux et sur les particularités cliniques et biologiques.

Un arbre généalogique est établi sur lequel figurent les caractéristiques des membres de la fratrie, des ascendants et des collatéraux.

Après une étude du phénotype et une analyse biométrique du propositus, des frottis endobuccaux sont effectués afin d'étudier les chromatines sexuelles X et Y (8).

Ainsi est rapidement établie la formule gonosomique par l'examen du corpuscule de Barr qui traduit l'existence de 2 chromosomes X, et par l'examen du « corpuscule Y » par des techniques de fluorescence (19) qui traduit l'existence d'un chromosome Y.

Enfin, un prélèvement de sang périphérique total, suivi ou non d'une biopsie cutanée, est réalisé pour établir le caryotype.

(*) Travail réalisé avec la collaboration de MM. J.-L. LAI, X. DESBIENS, assistants et de Mlle N. JACQUELOOT, technicienne au C.N.R.S.

(**) Laboratoire de Cytogénétique, Faculté de Médecine, 1, place de Verdun, 59000 Lille Cedex.

2) Etude du caryotype

Les préparations chromosomiques sont obtenues selon les techniques classiques, après culture et choc hypotonique. 4 à 5 lames sont ainsi obtenues pour chaque cas.

— Une lame est colorée immédiatement au GIEMSA (pH 6,8) selon les méthodes courantes. 16 cellules sont photographiées dont deux sélectionnées servent à établir le caryotype.

— Une lame est utilisée pour une étude en fluorescence.

— Une lame est traitée selon la technique de SUMNER et coll. (21) pour des lames fraîchement préparées ou selon la technique de COMINGS et Coll. (5) pour des lames anciennes, ceci en vue d'obtenir les bandes G.

Le caryotype est alors établi en classant les chromosomes en fonction du nombre et de la répartition des bandes G obtenues sur chaque chromosome.

RÉSULTATS : INTÉRÊT DES TECHNIQUES D'IDENTIFICATION

1) Identification d'un chromosome surnuméraire

Certaines aberrations chromosomiques peuvent être soupçonnées au seul examen du phénotype des malades, mais seul le caryotype confirme le diagnostic. Ainsi la trisomie des chromosomes 8, 13, 18 ou 21 représente chacune une entité clinique bien établie. Le caryotype met en évidence l'existence d'un chromosome surnuméraire avec éventuellement une anomalie chromosomique associée, tandis que les techniques d'identification chromosomique précisent la nature du chromosome surnuméraire.

Dans le syndrome de DOWN-SEGUIN, il existe un chromosome G supplémentaire identifié comme étant un chromosome 21 (cf. fig. 3). Dans le syndrome d'EDWARDS le chromosome E surnuméraire est identifié comme étant un chromosome 18 (cf. fig. 2). Parmi les autres trisomies autosomiques, à l'heure actuelle, seule la trisomie 8 identifiée

par fluorescence ou dénaturation thermique (15) répond à une définition clinique précise. Ainsi seules les techniques d'identification chromosomique permettront une étude plus précise des aberrations chromosomiques où la relation génotype-phénotype reste incertaine.

2) Identification du ou des chromosomes dans les cas de remaniement structural

Si les techniques classiques d'analyse du génôme permettent la mise en évidence des aberrations chromosomiques, elles renseignent peu sur la nature et sur la constitution des remaniements chromosomiques structuraux. Aujourd'hui, les techniques d'identification rendent l'étude des remaniements structuraux plus précise.

Dans le syndrome du « cri du chat » (18), caractérisé par une délétion partielle du bras court d'un chromosome du groupe B (chromosomes 4 - 5), le nouvel échantillonnage technique a permis d'identifier le chromosome amputé comme étant un chromosome 5 (3) (cf. fig. 1) et d'établir définitivement la relation génotype - phénotype. Si les techniques d'identification chromosomique confirment le type d'une aberration décelée par les méthodes classiques, dans certains cas elles démontrent que l'interprétation initiale était erronée. En effet, dans la leucémie myéloïde chronique, une relation a été rapidement établie entre la présence d'un petit chromosome acrocentrique (chromosome ph. 1) et le caractère leucémique de l'affection. Les caractères morphologiques et cytologiques de ce chromosome spécifique de la leucémie myéloïde chronique laissaient supposer que cet élément correspondait à un chromosome 21 amputé d'une partie de son bras long. Les techniques d'identification chromosomique devaient infirmer cette hypothèse. CASPERSSON et Coll. (2) montraient grâce à un marquage par fluorescence que le chromosome ph. 1 correspondait à une portion de chromosome 22. Aujourd'hui, les autres techniques de mar-

quage confirment la nature du chromosome ph. 1 (cf. fig. 5).

Dans les cas de translocation réciproque, les chromosomes intéressés par le remaniement peuvent être identifiés, ce qui permet l'orientation du conseil génétique. Ainsi, avant les techniques d'identification, la découverte d'une fusion centrique entre 2 chromosomes du groupe D (chromosomes 13 - 14 - 15) laissait supposer 6 éventualités (10) :

- fusion entre 2 chromosomes 13,
- fusion entre 2 chromosomes 14,
- fusion entre 2 chromosomes 15,
- fusion entre 1 chromosome 13 et 1 chromosome 14,
- fusion entre 1 chromosome 13 et 1 chromosome 15,
- fusion entre 1 chromosome 14 et 1 chromosome 15.

L'identification des chromosomes remaniés par une fusion centrique (cf. fig. 8) permet de déterminer les types de gamètes produits chez les individus porteurs et donc d'en déduire les conséquences au niveau de la descendance. Un individu porteur d'une translocation entre 2 chromosomes 13 fournit des gamètes porteurs du remaniement, qui conduiront, s'ils sont fécondés par un gamète normal à des zygotes trisomiques 13. Par contre, une fusion centrique entre 1 chromosome 13 et 1 chromosome 14 conduit à des gamètes équilibrés et donc à des zygotes équilibrés. Le conseil génétique est alors considérablement précisé dans tous les cas de fusion centrique entre chromosomes acrocentriques. Il en est de même pour tous les autres types de translocations dont l'identification précise le caractère équilibré ou non équilibré du porteur, par exemple la trisomie 21 par translocation d'un chromosome 21 sur un chromosome 21 (cf. fig. 4).

L'étude des remaniements chromosomiques structuraux par les nouvelles techniques d'identification permet non seulement d'identifier les chromosomes

impliqués dans les remaniements, mais permet aussi d'établir une relation génotype - phénotype. En effet, la trisomie partielle du chromosome 9 correspond désormais à une entité clinique (20).

La comparaison des nouvelles données caryotypiques et des caractères cliniques devrait permettre d'isoler de nouveaux syndromes.

Si l'étude des aberrations structurales se trouve affinée par les méthodes d'identification, dans certains cas ces techniques ne font pas toute la lumière quant à la nature du remaniement particulièrement dans les cas d'isochromosome. Théoriquement, les isochromosomes sont des chromosomes médiocentriques dont les deux bras réunis au niveau du centromère sont homologues et identiques, car de même origine. Les techniques d'identification chromosomique appliquées à ces structures doivent donc permettre de retrouver au niveau des bras chromosomiques, un nombre et une répartition symétrique des bandes.

Les images observées confirment cette hypothèse (cf. fig. 6), néanmoins l'origine de ce chromosome anormal peut être discutée. En effet classiquement, il est admis que l'isochromosome résulte d'un accident mécanique affectant le centromère (7). Celui-ci au cours de la division, subit une disjonction transversale (cf. fig. 7 B), au lieu de la division longitudinale normale (cf. fig. 7 A). Le néochromosome est donc constitué de 2 portions homologues et identiques, réunies par le centromère. L'obtention d'un chromosome médiocentrique ressemblant à l'isochromosome peut également s'expliquer par une fusion centrique entre 2 chromosomes homologues. Par exemple, la fusion centrique entre 2 chromosomes 13 aboutit à la réalisation d'un chromosome médiocentrique dont les bras sont homologues mais non de même origine. Ainsi peut s'expliquer la formation de certains isochromosomes X pour les bras courts ou les bras longs. Les techniques d'identification mettent en évidence la symétrie

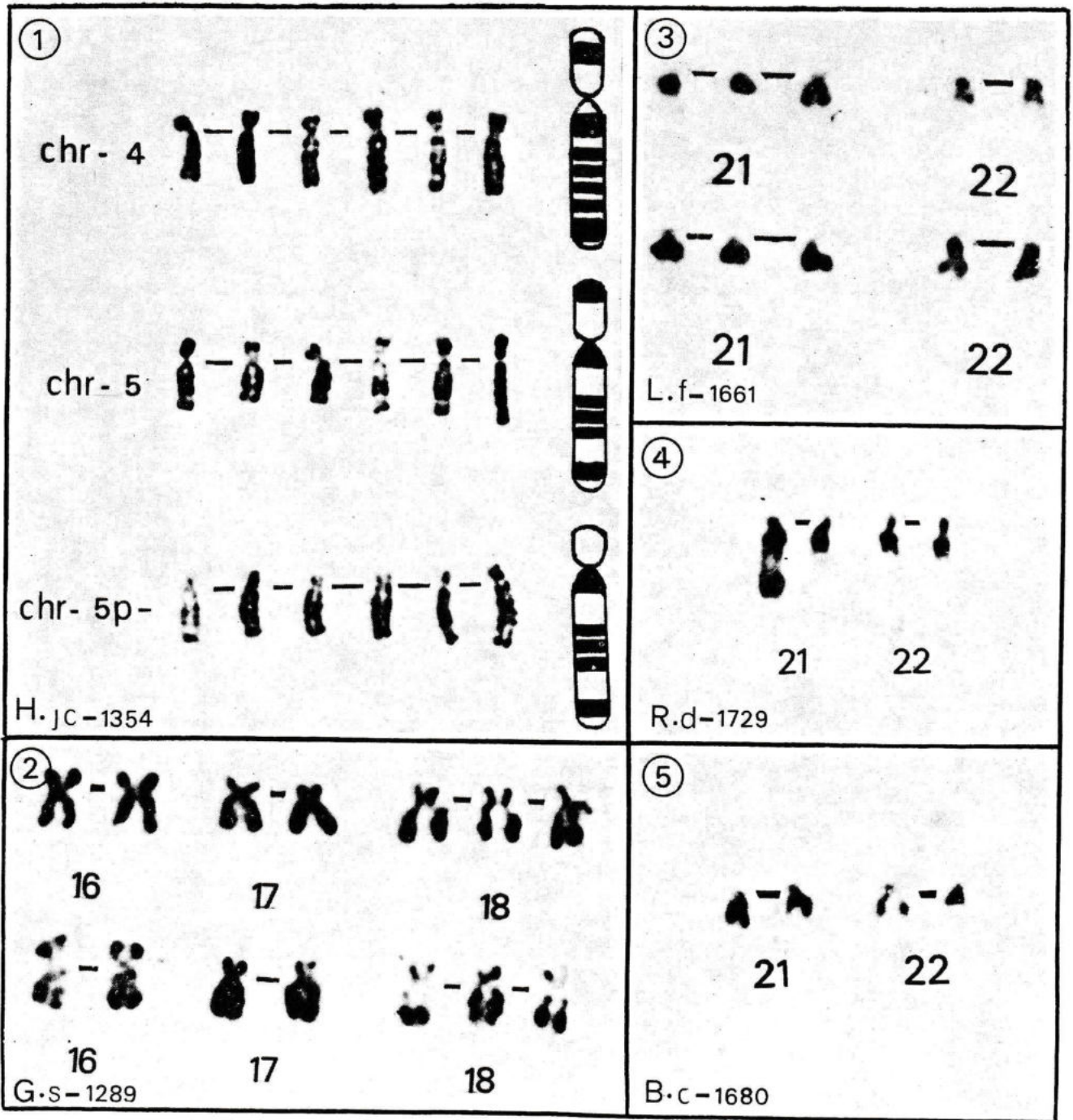


Fig. 1. — Identification par dénaturation saline du chromosome présentant une délétion partielle du bras court dans le syndrome du cri du chat : chromosome 5 p—

Fig. 2. — Identification par dénaturation saline du chromosome 18 surnuméraire dans le syndrome d'Edwards.

Fig. 3. — Identification par dénaturation saline du chromosome 21 surnuméraire dans le syndrome de Down-Seguin.

Fig. 4. — Mise en évidence par dénaturation saline d'une trisomie 21 par translocation d'un chromosome 21 sur un chromosome 21.

Fig. 5. — Identification par dénaturation saline du chromosome ph.1 comme étant un chromosome 22.

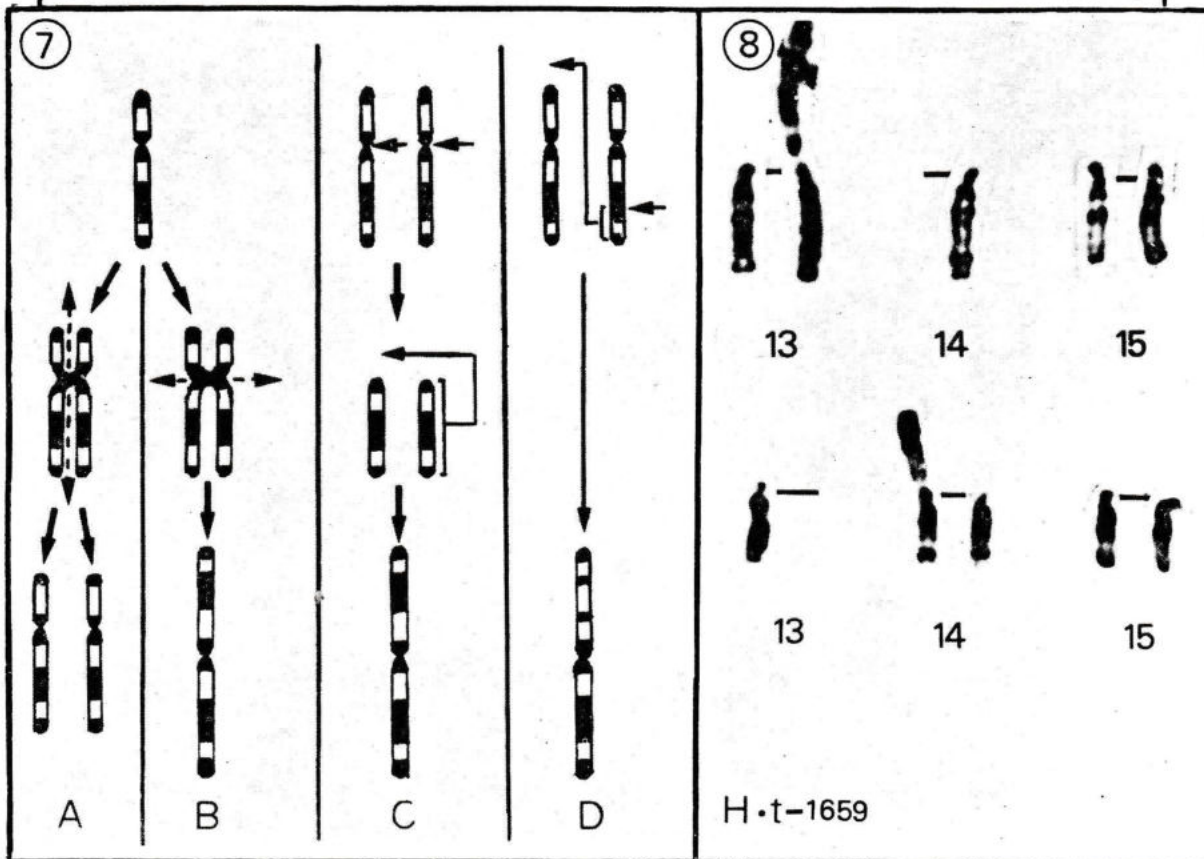
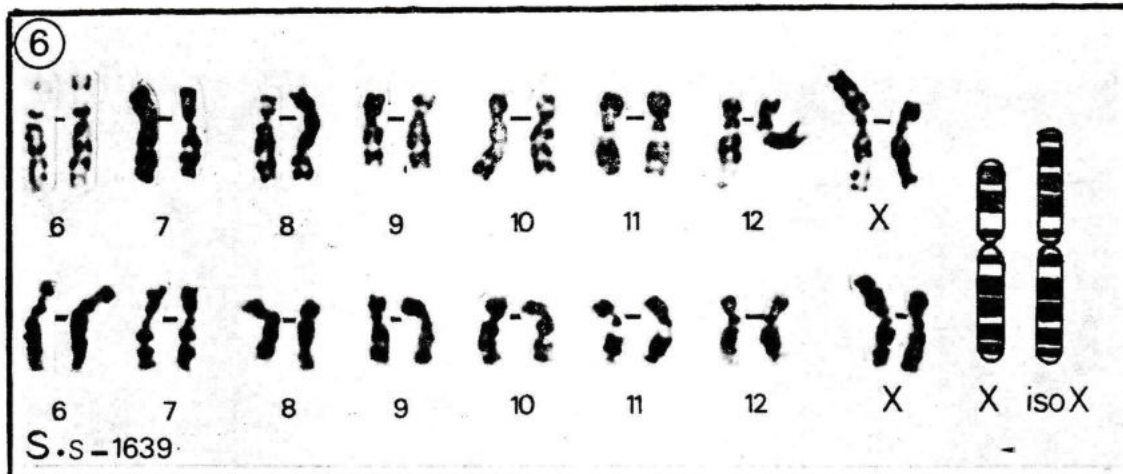


Fig. 6. — Identification par dénaturation saline d'un isochromosome X.

Fig. 7 A. — Schéma théorique de la disjonction longitudinale normale du centromère au cours de la mitose.

Fig. 7 B. — Schéma théorique de la formation d'un isochromosome par disjonction transversale du centromère au cours de la mitose. Le néochromosome est un chromosome médiocentrique dont l'analyse par les techniques d'identification met en évidence une répartition symétrique des bandes au niveau des bras chromosomiques qui sont de même origine.

Fig. 7 C. — Schéma théorique de l'obtention d'un chromosome médiocentrique par fusion centrique. Les bras du néochromosome sont homologues mais non de même origine. Les techniques d'identification mettent en évidence une répartition symétrique des bandes sur les bras chromosomiques.

Fig. 7 D. — Schéma théorique de l'obtention d'un chromosome médiocentrique par translocation d'un fragment chromosomique de longueur suffisante, intéressant deux chromosomes homologues. Les techniques d'identification chromosomique pourront mettre en évidence une répartition asymétrique des bandes entre les deux bras chromosomiques.

Fig. 8. — Identification par dénaturation saline d'un remaniement chromosomique structural. L'identification des chromosomes 13 et 14 remaniés dans une fusion centrique précise le conseil génétique. En effet, un tel remaniement est équilibré et donc les gamètes produits par l'individu porteur seront équilibrés.

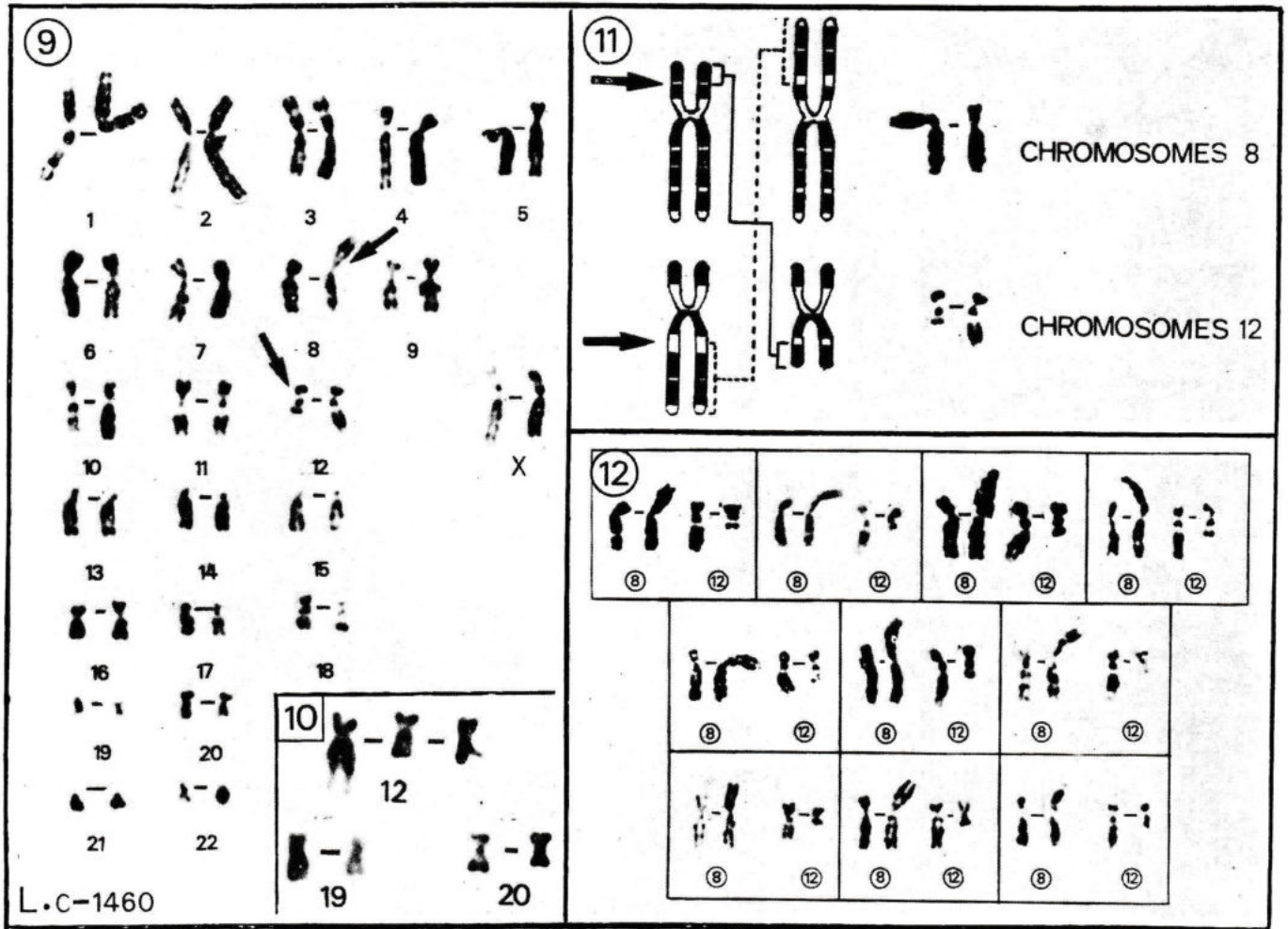


Fig. 9. — Cas d'une translocation familiale de type 8-12 découverte lors de la naissance d'un enfant polymalformé. La dénaturation saline ne met en évidence aucune différence quantitative ou qualitative entre le caryotype sur sang effectué chez le propositus, et le caryotype réalisé chez les ascendants et collatéraux phénotypiquement normaux bien que présentant le même remaniement (fig. 12).

Fig. 10. — L'étude des fibroblastes de l'enfant montre l'existence d'une trisomie partielle 12 confirmée par dénaturation saline, expliquant ainsi le syndrome malformatif du propositus.

Fig. 11. — Schéma explicatif de la translocation réciproque de type 8-12. L'échange réciproque de portions chromosomiques entre un chromosome 8 et un chromosome 12 conduit à 2 chromosomes anormaux mais le caryotype conserve son caractère équilibré.

des bandes mais ne permettent pas de préciser l'origine identique ou non des bras chromosomiques constituant l'isochromosome. La translocation d'un fragment chromosomique de longueur suffisante, intéressant 2 chromosomes homologues, peut conduire comme le montre la fig. 7 D) à la formation d'un chromosome médiocentrique. Il n'y a que dans cette dernière hypothèse que les techniques d'identification chromosomique pourront mettre en évidence une répartition asymétrique des bandes entre les 2 bras du chromosome néoformé.

3) Etude des caryotypes considérés comme équilibrés par les techniques classiques.

La présence d'un caryotype apparemment normal étudié par les techniques courantes de coloration des chromosomes (Giemsa, Acéto-Orcéïne) associé ou non à un syndrome malformatif pose un problème étiologique puisque certaines maladies bien stéréotypées ne présentent pas d'anomalie chromosomique. En fait, ces caryotypes dits normaux doivent être à nouveau examinés par les techniques d'identification qui pourraient éventuellement mettre en évidence une anomalie chromosomique non décelée par les techniques classiques d'analyse.

Dans les cas de caryotype équilibré, un remaniement de type échange réciproque de segments chromosomiques de même longueur entre 2 chromosomes non homologues, n'est pas mis en évidence par les méthodes classiques puisque l'accident ne modifie pas la morphologie des chromosomes impliqués, et l'anomalie ne peut être décelée que par les techniques d'identification qui mettront en évidence une différence dans le nombre ou la répartition des bandes entre les chromosomes remaniés et les chromosomes homologues normaux (17).

Dans les cas d'individus phénotypiquement normaux, l'existence d'un remaniement structural décelable par l'examen classique conduit à admettre

le caractère équilibré du remaniement. Les techniques d'identification précisent les chromosomes impliqués et le caractère équilibré du caryotype.

Le cas rapporté dans la fig. 9 concerne une translocation familiale de type 8-12. La découverte de cette anomalie chromosomique est consécutive à la naissance d'un enfant polymalformé. Or, la dénaturation des préparations chromosomiques, obtenues à partir du sang du propositus, n'a montré aucune différence qualitative ou quantitative entre le remaniement chromosomique de l'enfant malformé et le remaniement présent chez les ascendants et collatéraux (cf. fig. 12) qui pourtant sont phénotypiquement normaux. Ce résultat nous a conduit à réaliser d'autres investigations qui nous ont permis de déceler la cause exacte du syndrome malformatif du propositus, lequel ne pouvait s'interpréter seul par l'analyse du caryotype sur sang. L'étude des fibroblastes de l'enfant devait montrer l'existence d'une trisomie partielle 12 confirmée par dénaturation saline (cf. fig. 10).

CONCLUSIONS

Les techniques de marquage chromosomique sont d'un intérêt pratique considérable et sont devenues indispensables à toute étude cytogénétique.

La fluorescence intense du chromosome Y dans les cellules interphasiques, couplée à l'étude du corpuscule de Barr, permet une analyse rapide de la formule gonosomique des individus (6).

Dans les cellules métaphasiques, les bandes qu'elles font apparaître permettent une identification précise de chaque chromosome.

Analysées selon les nouvelles techniques, toutes les aberrations chromosomiques décelées par les méthodes classiques sont vérifiées, ce qui confirme la **relation génotype-phénotype** établie antérieurement. C'est ainsi que, parmi les anomalies numériques, les trisomies des chromosomes 8, 13, 18 ou

21, qui correspondent chacune à une entité clinique, sont vérifiées.

Parmi les anomalies structurales, les techniques établissent définitivement que la maladie « du cri du chat » correspond à un accident qui affecte un chromosome 5. Par contre, dans la leucémie myéloïde chronique, le marquage chromosomique démontre que le chromosome ph. 1 correspond à une portion de chromosome 22, ce qui infirme l'interprétation initiale qui considérait le chromosome ph. 1 comme un chromosome 21.

Il est probable que l'identification précise d'un chromosome surnuméraire ou d'une portion chromosomique supplémentaire, ainsi que l'identification des chromosomes remaniés dans le cas d'anomalies structurales, devraient permettre, en rassemblant les différentes données cliniques, une étude plus précise des aberrations où la relation génotype-phénotype reste incertaine, voire de déterminer de nouveaux syndromes.

Chez les sujets porteurs d'une aberration chromosomique, différents types d'investigations complémentaires sont également utilisées. En effet, les dosages biochimiques et l'étude enzymatique permettent de localiser certains gènes au niveau des chromosomes (16). Certaines trisomies autosomiques s'accompagnent d'une surproduction enzymatique due à un surdosage génique. A l'inverse, la perte de matériel chromosomique dans le cas d'anomalie structurale, peut entraîner une diminution de la production d'enzyme. Les résultats obtenus par dosages biochimiques et enzymatiques, comparés aux résultats fournis par les techniques d'identification chromosomique devraient permettre de mieux localiser au niveau des chromosomes certains loci qui contrôlent telle ou telle synthèse enzymatique.

Les techniques d'hybridation cellulaire contribuent également à la connaissance de la carte génique du chromosome. En effet, certains systèmes hybrides comme le système cellules humai-

nes - cellules de Hamster, se caractérisent par l'existence de variations enzymatiques faciles à mettre en évidence. Dans un tel système, des recombinaisons chromosomiques apparaissent tandis que les chromosomes humains disparaissent préférentiellement et progressivement. La détermination précise des chromosomes perdus, aujourd'hui possible par les nouvelles techniques d'identification ainsi que l'étude enzymatique du système hybride doivent permettre de mieux localiser au niveau des chromosomes les gènes responsables des variations enzymatiques constatées.

L'intérêt pratique du nouvel échantillonnage technique prédomine dans l'analyse des remaniements structuraux. Dans le cas de chromosome en anneau, de délétions partielles ou de translocation réciproque, les nouvelles techniques permettent d'apprécier le niveau des cassures responsables de tels remaniements. Une étude statistique du niveau de cassure parmi les différents types de remaniements pourrait mettre en évidence l'existence de zones fragiles au niveau des régions télomériques ou centromériques du chromosome, ce qui conduirait à démontrer que les cassures chromosomiques ne se produisent pas au hasard, mais dépendent de la structure du chromosome (11). L'identification des chromosomes remaniés permet de reconnaître le caractère équilibré ou non équilibré du remaniement puisque ces techniques identifient des portions chromosomiques surnuméraires ou absentes, et en indiquant le type et l'importance du remaniement chromosomique, elles deviennent un **moyen d'orientation du conseil génétique**. Les cas de fusion centrique entre chromosomes acrocentriques démontrent qu'elles permettent de déterminer les types de gamètes équilibrés ou non équilibrés chez les sujets porteurs d'un tel remaniement.

L'amniocentèse précoce permet à l'heure actuelle une étude caryotypique prénatale. L'application des techniques d'identification chromosomique aux

cultures de liquide amniotique précise le conseil génétique. En effet, la découverte d'une aberration chromosomique est un argument en faveur d'une éventuelle interruption de grossesse, dans la mesure où le caractère déséquilibré de l'aberration peut être prouvé. Néanmoins, le conseil génétique établi à partir de l'analyse du liquide amniotique reste incomplet, car le caryotype n'est établi qu'à partir d'un seul tissu, et il est donc impossible d'exclure toute possibilité de mosaïcisme.

La possibilité de découvrir dans un caryotype considéré comme normal, un remaniement passé jusqu'alors inaperçu fait que ces techniques d'identification chromosomique sont devenues obligatoires lors de toute étude cytogénétique sérieuse, ce qui permettrait de détermi-

ner un support étiologique pour certaines affections à caryotype normal.

Bien que l'espoir de minimiser les conséquences d'une aberration chromosomique reste inexistant, la cyto-génétique progresse. En effet, depuis la possibilité de conservation de lignées cellulaires ou de fragments tissulaires dans l'azote liquide (1), le matériel génétique est rapidement disponible. Les banques de caryotypes permettent donc, lors de l'apparition de nouvelles techniques plus précises d'identification chromosomique, d'étudier à nouveau les sujets à caryotype considéré comme normal ou anormal quelle que soit la rareté de l'anomalie. Les nouveaux résultats obtenus comparés aux données antérieures devraient permettre de mieux connaître les secrets de la pathologie chromosomique.

RÉSUMÉ

Dans ce travail, les auteurs soulignent l'intérêt de ces nouvelles techniques d'identification chromosomique, ainsi que leurs limites.

1° L'intérêt en est double : d'une part diagnostique permettant de mettre en évidence une aberration chromosomique ; d'autre part, pro-

nostique permettant de prévoir ses conséquences au niveau des gamètes.

2° Les limites de ces techniques sont dues à la connaissance imparfaite de la mécanique chromosomique qui ne permet pas d'élucider certains remaniements comme les isochromosomes par exemple.

BIBLIOGRAPHIE

- CARPENTIER S. et LEJEUNE J. — Banque de cellules diploïdes humaines à caryotypes anormaux. *Ann. Genet.*, 1970, **13**, 135-140.
- CASPERSSON T., GAHRTON G., LINDSTEN J., ZECH L. — Identification of the Philadelphia chromosome as a number 22 by quinacrine mustard fluorescence analysis. *Exp. Cell Res.*, 1970, **63**, 238-239.
- CASPERSSON T., LINDSTEN J., ZECH L. — Identification of the abnormal B group chromosome in the « cri du chat » syndrome by QM fluorescence. *Exp. Cell Res.*, 1970, **61**, 475-476.
- CASPERSSON T., ZECH L., JOHANSSON C. — Analysis of the human metaphase chromosome set by aid of DNA binding fluorescent agents. *Exp. Cell Res.*, 1970, **62**, 490-492.
- COMINGS D.-E., AVELINO E. — Mechanisms of chromosome banding. II Evidence that histones are not involved. *Exp. Cell Res.*, 1974, **86**, 202-206.
- COTTEEL P., COTTEEL S., SAVARY J.-B., DEMINATTI M. — Le diagnostic du sexe fœtal par amniocentèse : étude des chromatines sexuelles à partir des cellules amniotiques. *Comptes rendus de la Société Française de Gynécologie*, mars 1972, **3**, 207-212.
- DARLINGTON C.-D. — Misdivision and the genetics of the centromere. *J. Genet.*, 1939, **37**, 341-364.
- DEMINATTI M., SAVARY J.-B. — Cellules amniotiques humaines : étude des chromatines sexuelles X et Y. *Lille Médical*, 1971, **16**, 1101-1103.

9. DEMINATTI M., SAVARY J.-B. — Techniques actuelles d'identification chromosomique. *Revue de Cytologie clinique*, 1974, **7**, 25-31.
10. DEMINATTI M., VITSE M., BOULANGER J.-C., BULTEEL M.-F., BONIFACE M. — Le conseil génétique dans les cas de translocation familiale t (Dq : Dq) : à propos d'une observation. *Lille Médical*, 1970, **15**, 509-514.
11. DEMINATTI M., VITSE M., BOULANGER J.-C., KINE A., JACQUELOOT N. — Une observation de cassure d'un chromosome C. *Ann. Genet.*, 1971, **14**, 235-239.
12. DRETS M.-E., SHAW M.-W. — Specific banding patterns of human chromosomes. *Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.)*, 1971, **68**, 2073-2077.
13. DUTRILLAUX B., GROUCHY J. de, FINAZ C., LEJEUNE J. — Mise en évidence de la structure fine des chromosomes humains par digestion enzymatique (Pronase en particulier). *C.R. Acad. Sci. (Paris)*, 1971, 273-587.
14. DUTRILLAUX B., LEJEUNE J. — Sur une nouvelle technique d'analyse du caryotype humain. *C.R. Acad. Sci. (Paris)*, 1971, **272**, 2638-2640.
15. GROUCHY J. de, TURLEAU C., LEONARD C. — Étude en fluorescence d'une trisomie C mosaïque, probablement 8 : 46, XY/47, XY, ? 8 +. *Ann. Genet.*, 1971, **14**, 69-72.
16. JEROME H. — Des effets biochimiques de quelques chromosomes. *Ann. Genet.*, **7**, G 88-G 100.
17. LEJEUNE J., RETHORE M.-O., DUTRILLAUX B., MARTIN G. — Translocation 8-22 sans changement de longueur et trisomie partielle 8q. *Exp. Cell Res.*, 1972, **74**, 293-295.
18. MAILLARD E., PROVIS P., DEMINATTI M., FONTAINE G. — La maladie du cri du chat (à propos d'une observation). *La revue de pédiatrie*, 1970, **3**, 215-220.
19. PEARSON P.-L., BOBROW M., VOSA C.-G. — Technique for identifying Y chromosomes in interphase nuclei. *Nature*, 1970, **226**, 78-80.
20. RETHORE M.-O., LARGET-PIET L., ABO-NYI D., BOESWILLWALD M., BERGER R., CARPENTIER S., CRUVEILLER J., DUTRILLAUX B., LAFOURCADE J., PENNEAU M., LEJEUNE J. — Sur quatre cas de trisomie pour le bras court du chromosome 9. Individualisation d'une nouvelle entité morbide. *Ann. Genet.*, 1970, **13**, 217-232.
21. SUMNER A.-T., EVANS H.-J., BUCKLAND R.-A. — New technique for distinguishing between Human chromosomes. *Nature New Biology*, 1971, **232**, 31-32.
22. WANG H.-C., FEDOROFF S. — Banding in Human chromosomes treated with trypsin. *Nature New Biology*, 1972, **235**, 52-54.