

**METHODES RECENTES D'IDENTIFICATION
DES CHROMOSOMES CHEZ L'HOMME**
(morphologie, autoradiographie, fluorescence et banding)
ET LEURS APPLICATIONS (*)

par

H. GALPERIN-LEMAÎTRE

(Université Libre de Bruxelles, Laboratoire de Génétique médicale,
Professeur F. Twiesselmann).

La cytogénétique humaine ayant pour objectif principal l'étude des aberrations chromosomiques et la recherche de leurs origines on comprend que leur identification est primordiale.

Rappelons d'abord quelques données générales. Dans les cellules humaines, comme dans toute cellule animale ou végétale, la réplication du matériel génétique se fait uniquement durant l'interphase. C'est une période relativement longue (10 à 15 h.) qui se situe entre deux divisions cellulaires. Durant la période de division les chromosomes s'individualisent, se condensent et deviennent clairement visibles à la métaphase. A ce moment ils s'orientent suivant la plaque équatoriale qui correspond au plan suivant lequel se fera la division. L'identification des chromosomes se fait sur cette plaque équatoriale.

Ce n'est qu'en 1956 que TJIO et LEVAN ont pu montrer que le nombre exact de chromosomes chez l'homme est de 46 et non de 47 ou 48 comme on le pensait jusque là ; c'est de ce moment que datent les progrès de la cytogénétique. Ceux-ci ont été rendus possibles par la mise au point de deux techniques : d'abord la technique de blocage de la division au stade métaphase par la colchicine, et surtout l'utilisation du choc hypotonique permettant une meilleure dispersion des chromosomes dans la plaque métaphasique.

(*) Communication présentée le 18 décembre 1972.

Pour permettre l'analyse des chromosomes, les cellules somatiques sont soumises à différents traitements :

1) Une culture est faite en présence de phytohémagglutinine: celle-ci stimule la division mitotique.

2) Les cellules sont ensuite soumises à l'effet de la colcémide. Celle-ci désorganise le fuseau et bloque ainsi la mitose au stade métaphase.

3) Un choc hypotonique disperse les chromosomes dans les plaques métaphasiques. Après fixation et étalement des cellules sur lame, les chromosomes sont colorés (stade important sur lequel nous reviendrons). Les métaphases sont photographiées au microscope. Ces photos agrandies sont découpées et les chromosomes sont classés.

Au cours de différentes réunions et notamment aux Conférences de Denver (1960), de Londres (1963) et enfin de Chicago en 1966, on a défini une classification morphologique des chromosomes humains par numéros et par groupes. L'identification des chromosomes peut se faire également par autoradiographie, méthode basée sur «l'asynchronisme» de la synthèse de DNA dans les chromosomes, par la fluorescence basée sur une fixation sélective de colorants fluorescents et par une méthode appelée «banding» ou «G banding» basée sur une fixation contrôlée du colorant Giemsa.

Morphologie

Un chromosome humain est composé de deux chromatides situées de part et d'autre d'un plan. Il est dit métacentrique si son centromère est médian, submétacentrique si son centromère est submédian, acrocentrique si son centromère est presque terminal. Dans ce dernier cas, les bras courts sont fréquemment porteurs de satellites. Ce sont de petits appendices reliés au chromosome par un filament.

Les autosomes sont classés du n° 1 au n° 22 en groupes de A à G, par ordre de grandeur décroissante en tenant compte de la position du centromère, les deux chromosomes sexuels ou hétérosomes conservant l'appellation qu'on leur donnait précédemment, soit X et Y (Fig 1). Ces groupes sont les suivants :

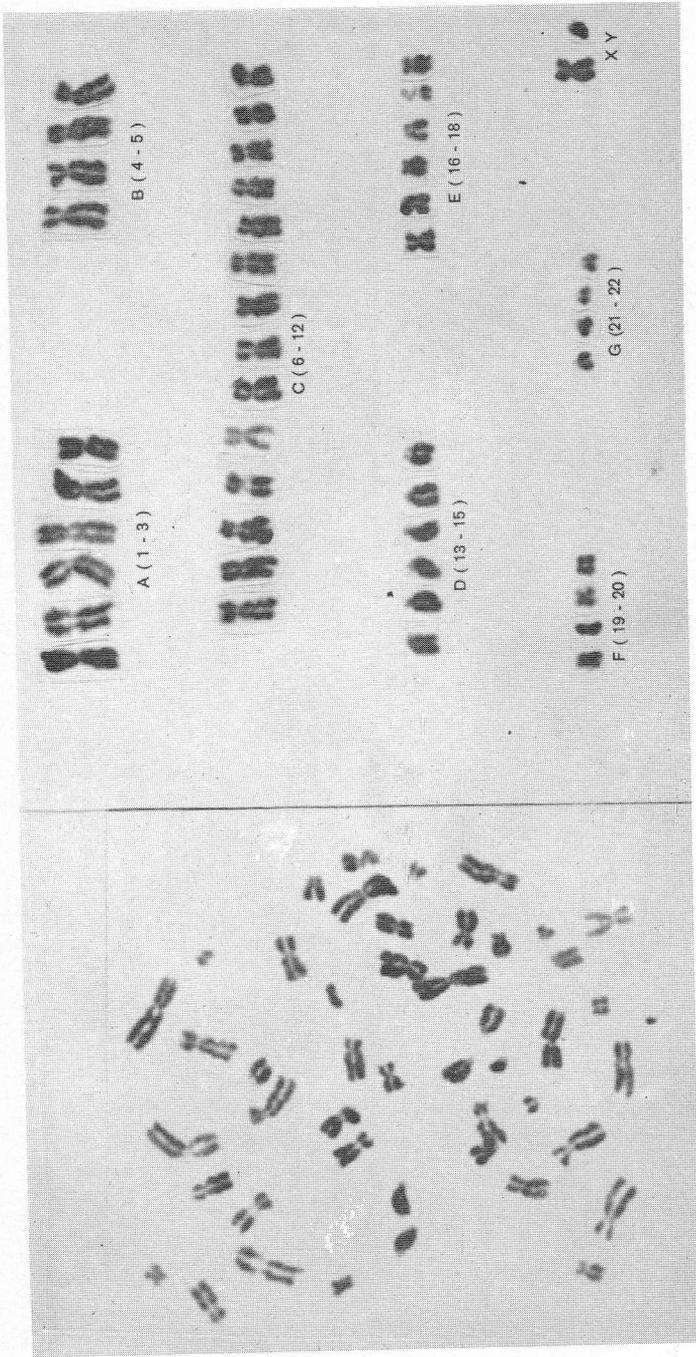


FIG. 1. — Caryotype d'homme normal (46, XY).

Groupe A : 1-3 : Grands chromosomes à centromère presque médian pour le 1 et le 3 et aux 2/3 à peu près pour le chromosome 2. Les trois chromosomes se distinguent facilement par leur taille et par la position du centromère. Le chromosome 1 porte parfois une constriction secondaire, proche du centromère, située sur les bras longs.

Groupe B : 4-5 : Grands chromosomes à centromère distal (à peu près au 1/4). Ces deux chromosomes sont difficiles à distinguer morphologiquement l'un de l'autre.

Groupe C : 6-12 : Chromosomes de taille moyenne à centromère submédian. Le chromosome X ressemble aux plus longs chromosomes de ce groupe, spécialement au chromosome 6 dont il se distingue difficilement.

Groupe D : 13-15 : Chromosomes de taille moyenne à centromère presque terminal, chromosome acrocentrique. Les six chromosomes peuvent porter des satellites sur les bras courts.

Groupe E : 16-18 : Chromosomes petits à centromère presque médian (chromosome 16) ou submédian (17-18). Le chromosome 16 porte parfois une constriction secondaire près du centromère, sur les bras longs.

Groupe F : 19-20 : Petits chromosomes à centromère quasi médian.

Groupe G : 21-22 : Très petits chromosomes acrocentriques, les quatre chromosomes peuvent porter des satellites sur les bras courts. Le chromosome Y ressemble à ces chromosomes tout en ayant les bras longs plus parallèles.

Les acrocentriques n'étant pas différenciables morphologiquement à l'intérieur d'un groupe, la CONVENTION DE DENVER (1960) proposait de les classer suivant l'importance des satellites s'ils en portent. Les essais de classification par cette méthode sont contestés depuis l'usage des autres techniques d'identification.

L'identification automatique des chromosomes basée sur la morphologie peut être réalisée au moyen d'un ordinateur. Cette analyse se fonde sur la traduction en données numériques de la description des caractéristiques structurelles des chromosomes, en termes de longueurs, de surfaces, de volumes et de densités.

Les images photographiques (négatifs) des métaphases étudiées sont explorées par balayage d'un faisceau lumineux et sont lues directement dans l'unité de mémoire d'un ordinateur. Le balayage de l'image se fait suivant une liste de termes décrivant les parties d'un objet particulier. En utilisant une description générale des différentes espèces de chromosomes il déterminera si un objet rencontré est un chromosome ou non, si oui, à quel type il appartient. Cette technique a été mise au point pour la première fois par LEDLEY (1966). On peut se demander si dans l'avenir, l'analyse automatique par ordinateur ne pourra détecter des aberrations chromosomiques nouvelles, telles des délétions que l'on ne pourrait discerner visuellement. Actuellement, l'appareil d'exploration est tellement coûteux que

cette méthode est peu utilisée (BUTLER and BUTLER, 1967 ; NEURATH and ENSLEIN, 1969).

Les autres méthodes d'identification reposent sur les propriétés des chromosomes, du DNA et de la chromatine.

Les chromosomes des cellules humaines contiennent principalement du DNA et des protéines basiques (les histones) et en quantité moindre du RNA et des protéines acides. Le DNA isolé des chromosomes a une structure typique en double hélice de Watson-Crick, les doubles hélices étant unies par les liens labiles, les liaisons «hydrogène»: c'est le DNA natif ou non dénaturé. Le DNA dénaturé résulte de la rupture de ces ponts hydrogène. Cette rupture a la propriété d'être réversible. Durant la réplication du DNA et durant la transcription en RNA les deux fibres de l'hélice se séparent.

Pour que les chromosomes ou segments de chromosomes soient capables de réplication, puissent servir de modèles pour la synthèse de RNA et intervenir de cette façon dans la synthèse protéique, ils doivent vraisemblablement se trouver sous une forme déroulée.

Rappelons que le terme «chromatine» est utilisé généralement pour désigner le matériel chromosomique dans n'importe quel état. Cependant il désigne souvent aussi le matériel génétique quand les chromosomes sont sous forme déroulée (non reconnaissable). L'euchromatine, terme moins souvent utilisé, désigne spécifiquement la chromatine déroulée. L'hétérochromatine désigne spécifiquement la chromatine condensée et spiralisée. Un modèle théorique de chromatine condensée a été proposé par BÄHR en 1970. Ce modèle représente une fraction d'une chromatide: les doubles hélices de DNA seraient disposées en spires secondaires, plus ou moins condensées, à l'intérieur des chromatides. Ceci permet peut-être d'imaginer mieux à quoi correspondent l'euchromatine déroulée et de ce fait génétiquement active et l'hétérochromatine condensée.

Durant l'interphase, seule une partie de la chromatine serait active, le reste se trouvant sous forme d'hétérochromatine jusqu'à la fin de la période S de synthèse de DNA, et ne pourrait de ce fait servir de modèle à la synthèse de RNA. C'est à la fin de la période S que ce DNA se répliquerait. L'hétérochromatine et l'euchromatine diffèrent donc par leur conformation physique et dans l'expression de leurs gènes, mais pas par leur contenu en DNA.

Autoradiographie (Fig. 2).

L'identification des chromosomes par autoradiographie est basée sur la mise en évidence localement de l'incorporation différente de thymidine radioactive dans le DNA chromosomique. Cette méthode est basée sur le fait que les chromosomes ou segments de chromosomes terminent la réplication du DNA à des intervalles de temps différents. Plusieurs auteurs avaient montré en effet que cette synthèse du DNA était asynchrone, non seulement d'un chromosome à l'autre, mais également d'un segment de chromosome à l'autre.

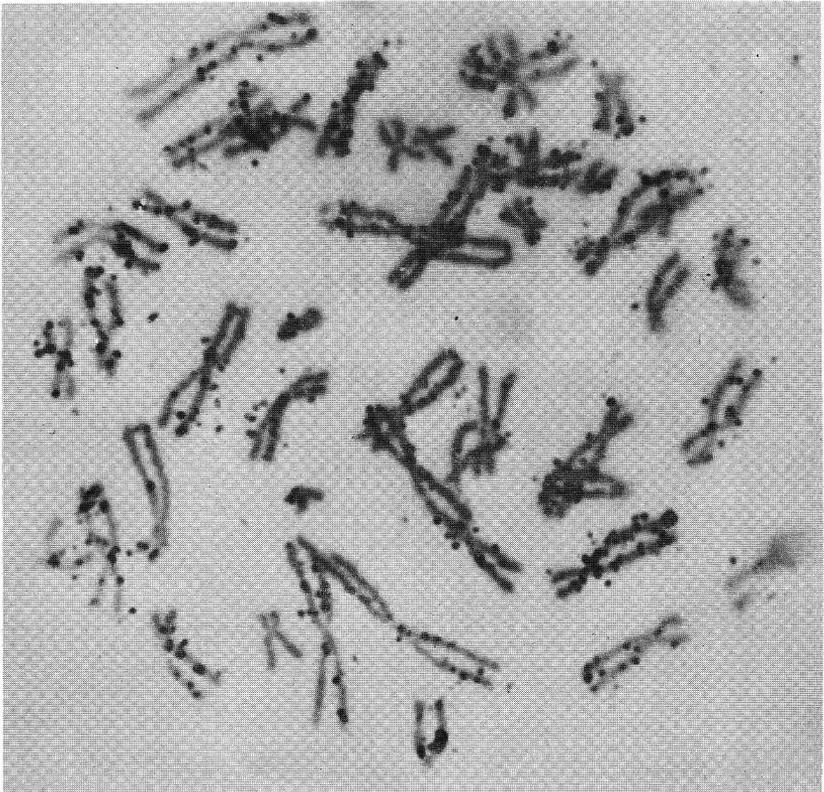


FIG. 2. — Image photographique, après révélation par la technique d'autoradiographie, d'une métaphase humaine dont les chromosomes ont incorporé de la thymidine radioactive.

Le cas le plus frappant est celui d'un des deux chromosomes X dans les cellules féminines : TAYLOR (1960) et MORISHIMA *et al.* (1962) ont montré que ce chromosome commence la synthèse de DNA après tous les autosomes. La réplication de ce chromosome X se fait alors plus rapidement et plus uniformément que celle des autres chromosomes ; ceci se traduit par un marquage intense sur toute sa longueur : de là, sa dénomination de X chaud sur lequel LYON a basé sa théorie d'un X inactif (LYON, 1961, 1962).

De nombreux travaux ont été faits pour essayer de caractériser les chromosomes par le «modèle dans le temps» suivant lequel ils terminent leur incorporation de thymidine tritiée dans leur DNA. Pratiquement, on ajoute la thymidine marquée à des temps déterminés avant arrêt de la culture. Les lames sont recouvertes d'émulsion photographique et développées, l'émulsion étant impressionnée localement par le rayonnement β du tritium (YUNIS *et al.*, 1964 a et b, 1965 ; GERMAN, 1964a, GERMAN *et al.*, 1966 ; GAVOSTO *et al.*, 1968, OCKEY, 1969).

Cependant d'après les travaux les plus récents, il semble qu'il n'est pas du tout évident que les autosomes homologues synthétisent le DNA de façon synchrone. Plusieurs travaux récents (MILLER *et al.*, 1966 ; SANDBERG *et al.*, 1968 ; DE CAPOA *et al.*, 1968 ; STEELE, 1969) montrent le contraire. Or on ne peut identifier les chromosomes par cette méthode, que si les homologues sont marqués suivant le même modèle. Cette méthode intéressante de soi semble de moins en moins pouvoir servir à l'identification des chromosomes.

Fluorescence

Les deux dernières méthodes, les plus récentes et les plus prometteuses, sont basées sur la fixation sélective de colorants sur les chromosomes. La méthode par fluorescence a été mise au point pour la première fois par CASPERSSON *et al.* en 1970. Ces auteurs arrivent à identifier les chromosomes en métaphase à l'aide de colorants fluorescents, notamment la quinacrine, qui a la propriété de se lier au DNA différemment suivant les chromosomes et suivant les segments de chromosomes. La distinction de ces bandes fluorescentes positives (fluorescentes) et négatives (non fluorescentes) se fait à la lumière UV. Vraisem-

blement, les bandes fluorescentes positives correspondent à l'hétérochromatine. Les photos obtenues permettent de distinguer les chromosomes appartenant à un même groupe : cependant l'inconvénient de la méthode consiste à devoir travailler en UV.

On peut doser également la fluorescence photoélectriquement par balayage en faisceau UV et obtenir une courbe caractéristique pour chaque chromosome, CASPERSSON *et al.* ont combiné cette méthode avec l'emploi de l'ordinateur.

Banding (Fig. 3)

Enfin la méthode la plus prometteuse, semble-t-il, est la méthode appelée pour le moment «banding» ou «G banding» ou encore par «dénaturation contrôlée», signalée pour la première fois en 1971. Le principe de la méthode est basé croit-on, dans l'état actuel des choses, sur une coloration différentielle de la chromatine et de l'hétérochromatine. Cette méthode a été trouvée accidentellement, puis mise au point expérimentalement, parallèlement dans différents laboratoires avec des variantes techniques. Celles-ci sont basées, pense-t-on actuellement, sur une dénaturation partielle préalable et contrôlée du DNA chromosomique suivie d'une coloration préférentielle au Giemsa. Rappelons que comme nous l'avons déjà dit, la dénaturation consiste à couper les ponts hydrogène entre les 2 hélices du DNA, cette dénaturation étant réversible.

Ces techniques sont dénommées suivant les laboratoires : méthode ASG par EVANS *et al.* (1971) et SUMMER *et al.* (1971), qui signifie traitement par l'Acide acétique des métaphases suivi de dénaturation Saline à 60° des DNA chromosomiques suivi alors de coloration au Giemsa en milieu tamponné ; méthode Dutrillaux, autre variante qui effectue la dénaturation contrôlée par la chaleur à pH neutre suivie de la coloration au Giemsa. D'autres variantes effectuent des dénaturations contrôlées en milieu basique (SCHNEDL, 1971). Une technique encore, donnant un «Giemsa banding» est obtenue par action préalable de la trypsine (DRETS and SHAW, 1971, WANG and FEDOROFF, 1972). On ne s'explique pas vraiment le mécanisme dans ce dernier cas puisque la trypsine n'attaque que les protéines.

En fait, le départ de tous ces travaux avait été donné par les

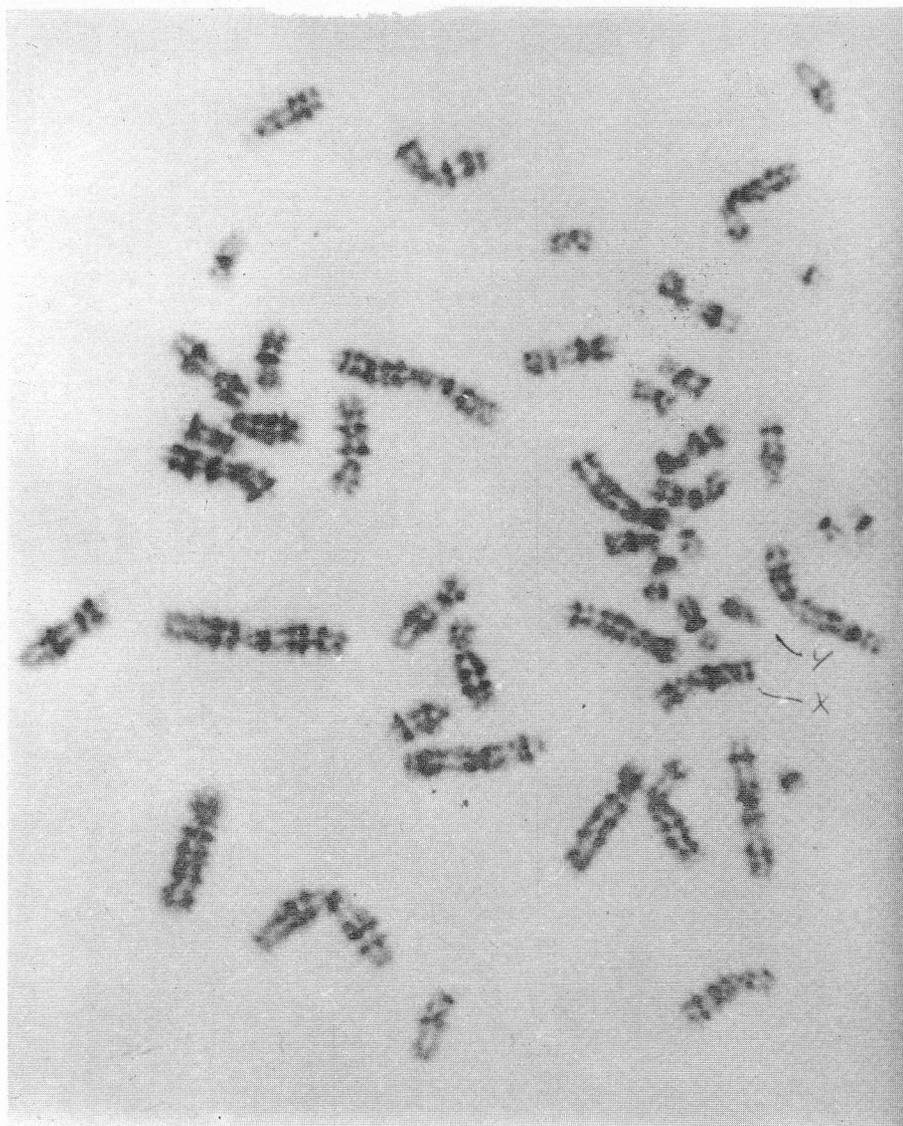


FIG. 3. — Image photographique d'une métaphase humaine colorée par une technique particulièrement réussie du «G banding».

Photo de H. J. Tjio, communication personnelle, nous l'en remercions.

travaux de ARRIGHI et HSU en 1971 sur les chromosomes humains. On sait que l'hétérochromatine constitutive située au niveau des centromères, correspond à des DNA répétitifs qui ont la propriété de se renaturer rapidement.

Arrighi et Hsu ont les premiers fait une coloration sélective de l'hétérochromatine constitutive au niveau des centromères en faisant d'abord une dénaturation alcaline totale suivie d'une renaturation très partielle à 60°, et d'une coloration, au Giemsa. Le Giemsa colorerait le DNA natif c'est-à-dire, dans ce cas-ci, le DNA renaturé. D'autres, voulant répéter ces travaux ont fait accidentellement des dénaturations plus ou moins fortes, sans renaturation. Ils ont obtenu des bandes qu'ils ont essayé de répéter en faisant, délibérément alors, des dénaturations contrôlées.

Un travail intéressant dans ce sens, étudie la cinétique de coloration au Giemsa en milieu basique (GAGNÉ *et al.*, 1971). Il montre d'abord une coloration des centromères, suivie d'une coloration en bandes, puis finalement une coloration totale. On arrive donc artificiellement dans les techniques de «banding» à mettre la chromatine dans un état tel que la coloration s'arrête au stade des bandes. Pratiquement on voit donc des régions foncées séparées par des régions claires tout au long des chromatides, caractéristiques de chaque paire de chromosomes ce qui permet l'identification à l'intérieur des groupes (Fig. 3). Il apparaît que les bandes correspondent en gros, aux régions fluorescentes trouvées par la technique de CASPERSSON *et al.*, que certains ont commencé à appeler d'ailleurs «Q banding» (quinacrine) par comparaison avec le «G banding» (Giemsa).

On constate que, dans les chromosomes moins contractés de la prométaphase on trouve de bien plus nombreuses bandes que dans les chromosomes plus condensés. Dans les chromosomes qui se contractent durant la mitose certaines de ces bandes très fines s'unissent pour donner des bandes plus larges. Mais de toute façon, même dans les chromosomes contractés, on discerne de plus nombreuses bandes que dans la méthode à la fluorescence.

Jusqu'à présent on n'a pas de véritable explication de ce qui se passe au niveau moléculaire dans ces techniques de «G banding». Comme nous l'avons mentionné on pense qu'il y aurait

dénaturation préalable et contrôlée du DNA chromosomique, le colorant Giemsa se fixant alors préférentiellement sur le DNA non dénaturé. On peut s'attendre alors à ce que le DNA déroulé, donc l'euchromatine, puisse être plus facilement atteinte par la dénaturation que la chromatine condensée ou hétérochromatine. L'hétérochromatine serait alors plus colorable puisque non dénaturée. On pense donc que dans cette méthode les bandes les plus colorées sur les chromosomes correspondraient aux régions hétérochromatiques, les bandes moins colorées aux régions euchromatiques.

Crick a proposé en 1971 un modèle théorique général pour les chromosomes des organismes supérieurs. Ces très intéressantes hypothèses sont beaucoup discutées actuellement. Son modèle suggère que le DNA chromosomique se compose d'une partie globulaire, correspondant aux bandes, de l'ordre de 80 % et d'une partie qu'il nomme fibreuse, correspondant aux interbandes (20 %). Il postule que seul le DNA fibreux code pour les protéines, le DNA globulaire lui, étant le site de contrôle (Fig. 4). Ce modèle implique que chaque groupe génétique complémentaire est contenu dans soit une interbande (codant)

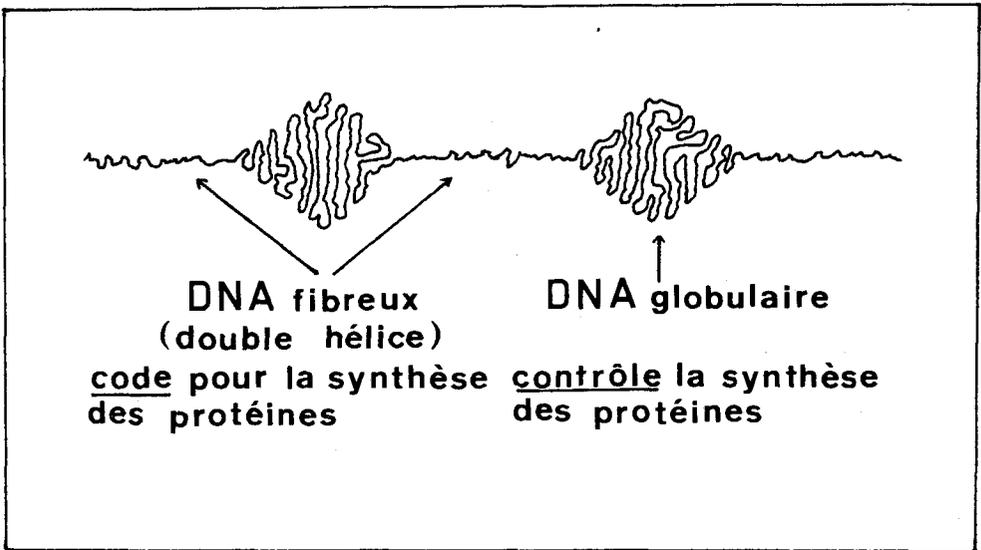


FIG. 4. — Représentation schématique de la structure générale du DNA dans une chromatide d'organisme supérieur, proposée par F. Crick.

plus une bande (contrôle), soit une interbande plus une partie des bandes de part et d'autre de cette interbande. Ceci correspond bien, nous semble-t-il, aux idées d'hétérochromatine condensée constituante des bandes et ne pouvant servir de modèle, et à l'euchromatine déroulée constituante des interbandes et pouvant servir de modèle, parce que déroulée. Jusque là on pensait que les bandes correspondaient à la partie codante, ce qui était difficile à concilier avec la notion d'hétérochromatine et d'euchromatine.

Dans un avenir proche on peut espérer avoir des cartes détaillées des chromosomes humains par ces méthodes de banding. Chez la Drosophile, la carte détaillée des bandes avait été établie sur les chromosomes géants des glandes salivaires déjà depuis 1962 (BEERMAN, 1962).

En outre, la cytogénétique humaine ayant pour but principal l'étude des aberrations chromosomiques, leur identification est importante. Les aberrations chromosomiques peuvent être des aberrations de nombre ou de structure. Les aberrations de nombre résultant d'une non-disjonction (deux chromosomes au lieu de se séparer au moment de l'anaphase pour migrer chacun vers un pôle opposé, restent accrochés et migrent vers un même pôle) sont faciles à mettre en évidence. En revanche les aberrations de structure, telles les translocations, provenant de l'accolement bout à bout de 2 chromosomes ou de 2 morceaux de chromosomes, les délétions ou les fragments supplémentaires sont beaucoup plus difficiles à mettre en évidence et surtout à identifier. C'est là où la technique du «banding» s'avère particulièrement utile.

Signalons encore une application très intéressante de cette technique aux théories de l'évolution.

Rappelons que Robertson avait émis en 1916 déjà une théorie de l'évolution basée sur des fusions centriques des acrocentriques, le matériel génétique restant constant mais le nombre de chromosomes diminuant. Se basant sur ces hypothèses CHIARELLI (1962), HSU et BENIRSCHKE (1967) et RUFFIÉ *et al.*, (1970) avaient précédemment déjà comparé morphologiquement les chromosomes humains aux chromosomes de chimpanzés par des

techniques de coloration classique, sans topographie de bandes. Limitées par la technique, les comparaisons ne pouvaient être qu'approximatives. TURLEAU et DE GROUCHY (1972 a et b), appliquant les techniques de banding aux chromosomes humains (46 chromosomes) et à ceux de chimpanzés (48 chromosomes), ont pu, par des remaniements chromosomiques simples, fournir des mécanismes évolutifs possibles pour passer du chimpanzé (48) à l'homme (46).

Ces auteurs ont montré à l'aide du banding que les chromosomes humains 3, 6, 7, 8, 10, 11, 13, 14, 16, groupes F et G ont des homologues satisfaisants chez le chimpanzé. Pour les autres chromosomes, ils ont pu trouver des homologues en faisant subir certains remaniements aux chromosomes de chimpanzé : notamment une fusion centrique de deux acrocentriques du chimpanzé donne un homologue du chromosome 2 humain, et quatre inversions péricentriques donnent une bonne homologie entre quatre chromosomes de chimpanzé et les chromosomes 4, 5, 12 et 17 de l'homme.

Ainsi, on peut penser que le banding pourra suggérer de nombreux autres remaniements chromosomiques qui auraient pu intervenir dans l'évolution des espèces.

Remerciements

Je tiens à remercier le professeur F. TWIESELMANN pour ses conseils toujours judicieux, Monsieur A. LEGUEBE et Madame S. VRYDAGH-LAOREUX pour la lecture critique du texte.

BIBLIOGRAPHIE

- ARRIGHI, F. E. and HSU, T. C.
1971 Localisation of heterochromatin in human chromosome.
Cytogenetics, **10** : 81-86.
- BAHR, G. F.
1968 Human chromosome fibers. Considerations of DNA protein packing and of looping patterns.
Exptl Cell Res., **62** : 39-49.
- BEERMAN, W.
1962 *Protoplasmatologia*.
4^e éd., Berlin, Springer Verlag.
- BUTLER, J. W. and BUTLER, M. K.
1967 Computer analysis of photographic images.
Nucleonics, **25** : 44-51.

- CASPERSSON T., ZECH, L. and JOHANSSON, C.
 1970a Differential binding of alkylating fluorochromes in human chromosomes.
Exptl Cell. Res., **60** : 315-319.
 1970b Quinacrine mustard-fluorescence of human chromosomes 4, 5 and X.
Exptl. Cell. Res., **61** : 474-475.
 1970c Analysis of human metaphase chromosome set by aid of DNA binding fluorescent agents.
Exptl. Cell. Res., **62** : 490-492.
- CHIARELLI, B.
 1962 Comparative morphometric analysis of the Primate chromosomes ;
 1° The chromosomes of the anthropoid apes and of man.
Caryologia, **15** : 99-121.
- CHICAGO CONFERENCE.
 1966 Standardization in human cytogenetics. Birth defects, original article series 2, 2.
 New-York, The National Foundation — March of Dimes.
- CONVENTION DE DENVER.
 1960 A proposed standard system of nomenclature of human mitotic chromosomes.
Ann. Genet., **1** : 35-38.
- CRICK, F.
 1971 General model for the chromosome of higher organisms.
Nature, **234** : 25-27.
- DE CAPOA, A., MILLER, D. A., MILLER, O. J. and BREG, W. R.
 1968 Asynchronous DNA replication and discordant length of homologous autosomes demonstrated by the use of markers.
Nature, **220** : 264-266.
- DRETS, M. E. and SHAW, M. W.
 1971 Specific banding patterns of human chromosomes (heterochromatin — Giemsa stain — chromosomebands).
Proc. natn. Acad. Sci. USA, **68** : 2073-2077.
- DUTRILLAUX, B. et LEJEUNE, J.
 1971 Sur une nouvelle technique d'analyse du caryotype humain.
C. R. Ac. Sci. Paris, **272** : 2638-2640.
- EVANS, H. J., BUCKTON, K. E. and SUMNER, A. T.
 1971 Cytological mapping of human chromosomes: results obtained with quinacrine fluorescence and the acetic-saline Giemsa techniques.
Chromosoma, **35** : 310-325.
- GAGNE, R., TANGUAY, R., LABERGE, C.
 1971 Differential staining patterns of heterochromatin in man.
Nature, New Biology, **232** : 29-30.
- GAVOSTO, F., PEGORARO, L., MASERA, P. and ROVERA, G.
 1968 Late DNA replication pattern in human haemopoietic cells. A comparative investigation using a high resolution quantitative autoradiography.
Exptl. Cell Res., **49** : 340-358.

- GERMAN, J.
1964 The pattern of DNA synthesis in the chromosomes of human blood cells.
J. Cell Biol., **20** : 37-55.
1967 Autoradiographic studies of human chromosomes. A review. In :
Proc. Third Intern. Congr. of Human Genetics, Baltimore, John Hopkins
Press : 123-136.
- HSU, T. C. and BENIRSCHKE, K.
1967 An Atlas of mammalian chromosomes. I
Springer Verlag.
- LEDLEY, R. S. et F. H. RUDDLE.
1966 Chromosome analysis by computer.
Sci. Amer., **214** (4) : 40-46.
- LONDON CONFERENCE
1963 London conference on the normal human karyotype.
Cytogenetics, **2** : 264-268.
- LYON, M. F.
1961 Gene action in the X chromosome of the mouse (*Mus musculus* L.)
Nature, **190** : 372-373.
1962 Sex chromatin and gene action in the mammalian X-chromosome.
Am. J. hum. Genet., **14** : 135-148.
- MILLER, O. J., BREG, W. R., WARBURTON, D., MILLER, D. A., FIRSCHEIN, I. L. and
HIRSCHHORN, K.
1966 Alternative DNA replication patterns associated with long arm
length of chromosomes 4 and 5 in the «Cri du chat» syndrome.
Cytogenetics, **5** : 137-151.
- MORISHIMA, A., GRUMBACH, M. M. and TAYLOR, J. H.
1962 Asynchronous duplication of human chromosomes and the origin of
sex chromatin.
Proc. natn. Ac. Sci. USA, **48** : 756-763.
- NEURATH, P. W. and ENSLEIN, K.
1969 Human chromosome analysis as computed from arm lengths
measurements.
Cytogenetics, **8** : 337-354.
- OCKEY, C. H.
1969 Human chromosomes identification and the pattern of DNA
replication in fibroblasts from an XXY male. A quantitative
autoradiographic study of early and late synthesis.
Cytogenetics, **8** : 272-295.
- ROBERTSON, W. R. B.
1916 Chromosomes studies.
J. Morph., **27** : 179-332.
- RUFFIE, J., COLOMBIES, P., GINOUX-MOUNIE Ch. et CARLES-TROCHAIN E.
1970 Étude cytogénétique de 4 espèces de primates. Comparaison avec le
caryotype humain.
Ann. Genet., **13** : 3-6.

- SANDBERG, A. A., TAKAGI, N., SCHMIDT, M. L. and BROSS, I. D. J.
 1968 Chronology and pattern of human chromosome replication. IX. Metasynchronous DNA replication in homologs.
Cytogenetics, **7** : 298-332;
- SCHNEIDL, W.
 1971a Banding pattern of human chromosomes.
Nature, New Biol., **233** : 93-94.
 1971b Analysis of the human karyotype using a reassociation technique.
Chromosoma, **34** : 448-454.
- STEELE, M. W.
 1969 Autoradiography may be unreliable for identifying human chromosomes.
Nature, **221** : 1114-1116.
- SUMNER, A. T., EVANS, H. J. and BUCKLAND, R. A.
 1971 A new technique for distinguishing between human chromosomes.
Nature, New Biol., **232** : 31-32.
- TAYLOR, J. H.
 1960 Asynchronous duplication of chromosomes in cultured cells of chinese hamster.
J. Biophys. Biochem. Cytol., **7** : 455-463.
- TJIO, H. J. and LEVAN, A.
 1956 The chromosome number in man.
Hereditas, **42** : 1-6.
- TURLEAU, C. et DE GROUCHY, J.
 1972a Caryotypes de l'homme et du chimpanzé, comparaison de la topographie des bandes. Mécanismes évolutifs possibles.
C. R. Acad. Sci. Paris, **274D** : 2355-2357.
 1972b Entre le chimpanzé et l'homme : l'évolution des chromosomes.
La Recherche, **26** : 779-782.
- WANG, H. C. and FEDOROFF, S.
 1972 Banding in human chromosomes treated with trypsin.
Nature, New Biol., **235** : 52-54.
- YUNIS, J. J., HOOK, E. B. and MAYER, M.
 1964a Deoxyribonucleic-acid replication pattern of trisomy D1.
Lancet, **2** : 935-937.
 1964b Deoxyribose-nucleic-acid replication pattern of trisomy 18.
Lancet, **2** : 286-287.
- YUNIS, J. J.
 1965 Interphase deoxyribonucleic acid condensation, late deoxyribonucleic acid replication, and gene inactivation.
Nature, **205** : 311-312.

Adresse de l'auteur : U.L.B., Faculté de Médecine,
 Laboratoire de Génétique humaine,
 rue aux Laines, 97,
 B 1000 Bruxelles (Belgique).