



ETUDE CYTOGENETIQUE DES ANOMALIES CHROMOSOMIQUES PAR LA CHROMATINE DE BARR ET LE CARYOTYPE AU SERVICE D'HISTOLOGIE-EMBRYOLOGIE ET CYTOGENETIQUE DE DAKAR: A PROPOS DE 100 CAS

GUEYE MAME VENUS^{1,2}, FAYE OUMAR^{1,2}, NDIAYE ARAME^{1,3}, DIOP NDIAGA^{1,2}, DIALLO ABDOULAYE SEGA^{1,2}, DIALLO MAMA SY^{1,2}

1- Laboratoire de cytologie clinique, cytogénétique, biologie de la reproduction et du développement humain, unité de cytogénétique, Hôpital Aristide Le Dantec, Dakar

2- Laboratoire Histologie-Embryologie, Département de Biologie et explorations fonctionnelles, Faculté de Médecine, Pharmacie et d'Odontologie, Université Cheikh Anta Diop, Dakar

3- Département de Biologie animale, Faculté des Sciences et Techniques, Université Cheikh Anta Diop, Dakar

Auteur contact : Mame Vénus GUEYE, Laboratoire Histologie-Embryologie, Département de Biologie et d'explorations fonctionnelles, Faculté de Médecine, Pharmacie et d'Odontologie, Université Cheikh Anta Diop, BP 5005 Dakar-Fann. Tél. (00221) 776410416 / 706064461, e-mail : mavenus9@hotmail.com

RESUME

L'analyse des chromosomes est une composante importante du diagnostic et de l'évaluation des désordres génétiques. Approximativement 1000 syndromes chromosomiques influant sur la morbidité et la mortalité de l'espèce humaine ont été répertoriés. Les objectifs de cette étude étaient de déterminer les causes les plus fréquentes d'indication d'analyses cytogénétiques, le sexe chromatinien des patients mais aussi les anomalies chromosomiques les plus rencontrées au caryotype. Il s'agissait d'une étude rétrospective de septembre 2000 à décembre 2012 et prospective d'août 2013 à octobre 2014, dans les laboratoires d'histologie, embryologie et cytogénétique de l'université Cheikh Anta Diop de Dakar et de l'hôpital Aristide Le Dantec. Tous les patients référés pour test chromatinien de BARR et/ou Caryotype ont été inclus. Nous avons recueilli en même temps certains paramètres épidémiologiques et cliniques. Parmi les patients, 53% étaient déclarés féminin à l'état civil, 40% déclarés masculin, 7% avaient un sexe d'état civil non déterminé. Sur 31% des bulletins l'ambiguïté sexuelle était l'indication. L'âge moyen de consultation était de 8,82 ans. 90% étaient envoyés pour une suspicion d'anomalie gonosomique et 10% pour une suspicion d'anomalie autosomique. 45% avaient un sexe chromatinien masculin, 39% un sexe chromatinien féminin, 15% avait un taux intermédiaire et un patient n'a pas bénéficié du test. 36% des patients ont bénéficié du caryotype et parmi eux, 41,67% avaient une formule 46,XY ; 38,89% une formule 46,XX ; 11,11% présentaient une trisomie 21 ; 2,78% une trisomie 13 ; 5,56% avait une formule en mosaïque. Les techniques cytogénétiques sont importantes pour l'identification correcte d'une variété de syndrome. A défaut du caryotype, le test chromatinien de Barr peut être d'un apport utile.

Mots clés : chromosomes – anomalies du développement sexuel - trisomie 21- trisomie 13 - corpuscule de Barr

ABSTRACT

Chromosome analysis is an important component of diagnosis and evaluation of genetic disorders. About 1000 chromosomal syndromes affecting the morbidity and mortality of the human species were listed. The objectives of this study were to identify the most common causes indication cytogenetic analysis, the sex chromatin of the patients but also the chromosomal abnormalities most encountered in karyotype. This was a retrospective study from September 2000 to December 2012 and prospective study from August 2013 to October 2014, in the laboratories of histology, embryology and cytogenetics at University Cheikh Anta Diop of Dakar and Aristide Le Dantec hospital. All patients referred for BARR Body test and / or karyotype have been included. We gathered together some epidemiological and clinical settings. Of the patients, 53% were reported female in civil status, 40% reported male, 7% were of undetermined sex civil status. On 31% of ballots, sexual ambiguity was the indication. The average age of consultation was 8.82 years. 90% were sent for gonosomal suspected abnormality and 10% for a suspected autosomal anomaly. 45% had a male sex chromatin profile, 39% female sex chromatin profile, 15% had an intermediate rate and one patient did not do the test. 36% of patients had done karyotype and of these, 41.67% had a formula 46, XY; 38.89% a formula 46, XX; 11.11% had trisomy 21; 2.78% trisomy 13; 5.56% had mosaicism. Cytogenetic techniques are important for the correct identification of a variety syndrome. If karyotype isn't available, the research of Barr body can be a useful contribution.

Key words: chromosomes – disorders of sex development - trisomy 21 - trisomy 13 - Barr body

INTRODUCTION

L'analyse des chromosomes est une composante importante du diagnostic et de l'évaluation des désordres génétiques, incluant les anomalies congénitales, les retards de développement psychomoteur [1-6], les syndromes dysmorphiques. Approximativement 1000 syndromes chromosomiques influant sur la morbidité et la mortalité de l'espèce humaine ont été répertoriés [6]. Les anomalies chromosomiques affectent environ 7,5% de toutes les conceptions ; cependant la plupart de ces anomalies conduit à un avortement spontané et la fréquence de survie est de 0,6% [5,7]. L'augmentation des connaissances sur l'implication des anomalies chromosomiques dans certaines maladies entraînant un retard mental, un syndrome dysmorphique ou une infertilité a généré une augmentation de la demande des études cytogénétiques [3]. Cela a conduit à l'identification de beaucoup d'anomalies chromosomiques.

Les techniques les plus utilisées dans notre service d'histologie-embryologie et cytogénétique sont le test chromatinien BARR et le caryotype conventionnel. Ainsi, dans notre étude, nous déterminerons les motifs les plus fréquents d'indication d'analyses cytogénétiques mais également par ces techniques, les types d'anomalies les plus fréquemment rencontrés dans notre service d'histologie-embryologie et cytogénétique de l'université Cheikh Anta Diop et son antenne hospitalière de l'hôpital Aristide Le Dantec de Dakar,

MATERIELS ET METHODES

Cadre d'étude

Notre travail a été réalisé aux laboratoires d'histologie embryologie et cytogénétique de l'université Cheikh Anta Diop de Dakar et au niveau de son antenne hospitalière du centre hospitalier universitaire Aristide Le Dantec.

Malades

Notre étude porte sur un échantillon de 100 patients, tous des négro-africains vivant au Sénégal sur la période de septembre 2000 à Octobre 2014. Le critère d'inclusion était l'inscription : chromatine sexuelle, chromatine de BARR, test chromatinien de BARR et/ou caryotype sur les bulletins de référence. Nous avons en même temps colligé divers paramètres dont le service de référence, l'âge de consultation, le motif de référence, le sexe déclaré au service d'état civil.

Il s'agissait d'une étude rétrospective de septembre 2000 à Août 2013 et prospective d'Août 2013 à octobre 2014. Les 100 patients,

les 2 sexes confondus, ont bénéficié soit du Test chromatinien de BARR, soit du Caryotype, soit des deux.

Pour le **test chromatinien de BARR** nous avons procédé à une cytoplasmolyse à l'acide chlorhydrique normal (HCL.N) à 56°C de cellules épithéliales de la muqueuse jugale ; après une série d'hydratation et de déshydratation à l'alcool et à l'eau distillée, nous avons fait une coloration de GUARD avant d'examiner à l'immersion deux cents (200) noyaux inter-phasiques.

Pour le **caryotype standard** nous avons procédé à une culture de 0,5 ml sang veineux dans un milieu RPMI pendant 3jours, puis au blocage par la colchicine, ensuite au choc hypotonique avec le chlorure de potassium, à la fixation par le Carnoy 1, à l'étalement, la dénaturation par la Trypsine, la coloration au Giemsa et à l'analyse des mitoses avec le logiciel **Leica CW4000**.

RÉSULTATS

En moyenne nous recevions 6,67 patients par an avec un maximum de 28 patients durant la période de janvier à novembre 2014.

L'âge moyen de consultation était de 8,82 ans. Cependant la classe d'âge majoritaire était celle des nourrissons (figure1).

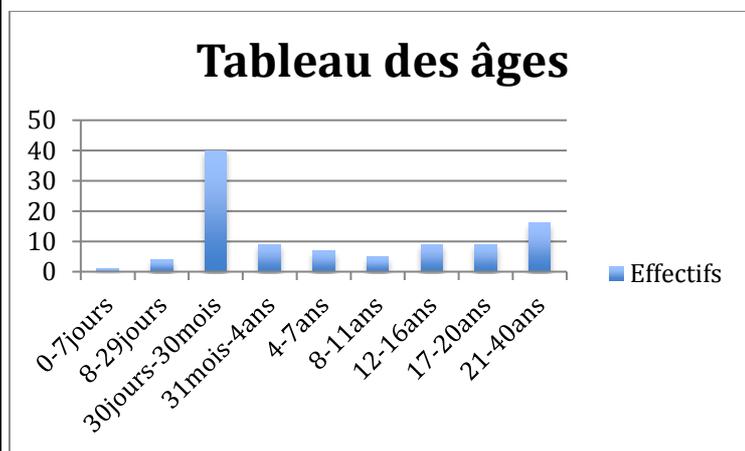


Figure 1 : La répartition des patients selon l'âge de référence

53% des patients étaient déclarés féminin à l'état civil, 40% déclarés masculin, 7% avaient un sexe d'état civil non déterminé.

Dans 54% des cas, les patients nous venaient de la pédiatrie et majoritairement (47%) du Centre Hospitalier National d'Enfants Albert Royer (CHNEAR). Cependant nous recevons des patients des principales structures hospitalières de Dakar comme l'Hôpital Aristide Le

Dantec (20%) ou le Centre Abass NDAO (6%). Les patients nous viennent également d'autres régions du Sénégal comme Saint Louis (3%), Thiès (3%), Louga (2%). A part la pédiatrie les autres spécialités qui nous envoyaient des patients étaient la chirurgie pédiatrique (15%), la gynécologie (14%), l'urologie (10%), la médecine interne (6%), l'hématologie (1%).

Sur les bulletins que nous recevions, 90% des patients étaient envoyés pour une anomalie du développement sexuel (ADS) avec comme principal motif (31%) inscrit sur les bulletins « Ambiguïté sexuelle ». cependant des motifs aussi nombreux que variés (hypertrophie clitoridienne 8%, suspicion de pseudohermaphrodisme féminin 2%, aménorrhée primaire 8%, impubérisme/retard pubertaire/absence de caractères sexuels secondaires 5%, gynécomastie 3%, coalescence des petites lèvres, suspicion d'hyperplasie congénitale des surrénales 1%, syndrome malformatif 4%, Prader I 1%, Prader II 1%, Prader III 2%, hypospadias 5%, micropénis 2%, dyspareunie 1%, infertilité 2%, cryptorchidie 7%, exploration génétique 1%, aménorrhée secondaire 2%, hypogonadisme/retard mental 1%, retard staturo-pondéral/troubles urinaires 1%, Pilosité précoce 1%) sont notés sur les bulletins.

Sur 10% des bulletins, les patients étaient envoyés pour une suspicion d'anomalie autosomique (trisomie 21, trisomie 13, retard staturo-pondéral, retard mental, leucémie aigue lymphoïde, maladie de Hirschprung) avec majoritairement une suspicion de la trisomie 21(5%).

Concernant les antécédents familiaux des patients, la consanguinité des parents était retrouvée chez 41% des patients. Les autres antécédents familiaux étaient à type de décès à bas âge dans la fratrie, d'hypospadias dans la fratrie, de notion d'avortement chez la mère, de prise de médicaments traditionnels de la mère durant le premier trimestre de la grossesse, de présence d'anomalie du dévelop-

pement sexuel dans la fratrie de certains patients.

Concernant les patients qui ont bénéficié du test chromatinien de BARR, les résultats ont été répartis en 3 groupes selon le taux de corpuscule de BARR (**figure 2**) : ceux ayant un taux inférieur ou égal à 5% classés dans le sexe chromatinien masculin, ceux ayant un taux supérieur ou égal à 15% classés dans le sexe chromatinien féminin et ceux ayant un taux intermédiaire un compris entre 5 et 15%.

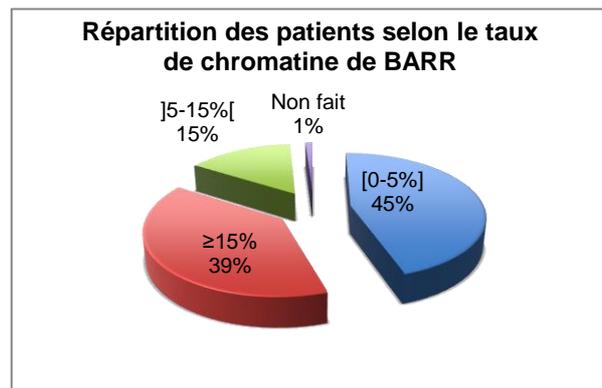


Figure 2: La répartition des patients selon le taux de chromatine de BARR

Les résultats du caryotype sont répertoriés dans le tableau I.

Tableau I : Répartition des patients selon le formule chromosomique

Résultats caryotype	Effectifs	Pourcentage
46,XX	15	15
46,XY	14	14
Mosaïque	02	2
47,XX+21	02	2
47,XY+21	02	2
47,XY+13	01	1
Non fait	64	64
total	100	100

Dans le tableau II nous avons comparé les résultats du test chromatinien avec le sexe d'état civil des patients.

Tableau II : Tableau comparatif de la répartition des patients selon le sexe déclaré et le sexe chromatinien retrouvé

Sexe	Sexe Chromatinien			Total	
	Féminin	Masculin	Intermédiaire		
Sexe déclaré	Féminin	30	16	8	53
	Masculin	7	29	4	40
	N.D	3	1	3	7
Total	40	45	15	100	

N.D= Non Déterminé

Par ailleurs il y'a eu une discordance entre le sexe d'état civil et le sexe chromosomique chez 4 malades soit 11,11% des cas, mais également entre les sexes chromatinien et chromosomique chez 2 patients soit 5,55%.

DISCUSSION

Dans notre étude en moyenne 6,67 malades consultent par an pour une analyse cytogénétique, répartis entre le test chromatinien de Barr et le caryotype, avec un maximum de 28 malades en 2014, c'est à dire depuis que le service dispose du caryotype. Ce qui nous pousse à penser que la prévalence des anomalies chromosomiques est plus élevée mais que du fait de l'absence du caryotype dans notre service jusqu'en 2013, les malades ne nous étaient référés.

L'âge moyen de consultation était de 8,82ans avec des extrêmes de 4jours à 40ans avec un pic situé dans la période de nourrisson avec 40% des patients qui sont reçus durant cette période; ce résultat est proche de celle obtenue par **Alao MJ. et al au Bénin**[8] qui a trouvé 42% de nourrissons.

Ainsi l'âge moyen est inférieur à celui trouvé par **Balkan M. et al**[9] en Turquie où la moyenne d'âge est 14,3ans, mais également à celle de **Al Husein M. et al.** [3] qui a également trouvé une moyenne de 14,3 ans dans une étude en Arabie saoudite et **Santos CB et al**[10] qui, au Brésil, ont trouvé une moyenne d'âge de 11,5ans. Cependant notre moyenne se trouve dans la grande enfance (7-11ans), période décrite par **Milunsky** [11] comme étant la période où le taux de consultation pour une suspicion d'anomalie chromosomique double du fait d'un retard d'expression ou de diagnostic de certaines anomalies. Toujours selon lui, 3 à 4% des naissances sont associées à une malformation congénitale, un retard mental, ou un désordre génétique, ce taux pouvant doubler vers l'âge de 7-8 ans à cause du retard d'expression ou de diagnostic de certains désordres

génétiques. Par contre notre moyenne paraît cependant élevée si on considère que la majorité de nos patients nous sont envoyés pour une suspicion d'anomalie sexuelle et que pour ces pathologies à défaut d'un diagnostic anténatal, l'âge idéal de consultation doit être la période néonatale telle que le décrit la plupart des études faites sur ces pathologies[12,13,14]

Il apparaît dans notre étude que le sexe féminin est déclaré dans la majorité des cas avec sexe ratio de 1,32 là où **Alao et al** retrouve une prédominance masculine (57,89%). **Santos CB et al**[10] dans une étude au Brésil trouve une tendance plus proche de notre étude avec des taux de 54% pour le sexe féminin et 46% pour le sexe masculin avec un sexe ratio égal à 1,17 en faveur du sexe féminin.

Chez 7% de nos patients, nous ne sommes pas arrivés à préciser le sexe déclaré : 2 patients nous sont parvenus avec des bulletins sans sexe déclaré, 5 avaient reçu un nom neutre et n'étaient pas encore déclarés au service d'état civil pour des raisons d'omale du développement sexuel.

Les motifs que nous avons répertoriés sont les mêmes que ceux retrouvés dans beaucoup d'études cytogénétiques[1-6][8-11]. Cette pléiade de motif de référence pousse **Al husein et al**[3] à affirmer que l'augmentation des connaissances concernant l'importance de l'implication des anomalies chromosomiques dans beaucoup de pathologies, fait que la demande des études cytogénétiques a augmenté permettant ainsi de reconnaître plusieurs anomalies chromosomiques qui

étaient méconnues. Il affirme également que certains cliniciens réfèrent des patients pour une exploration cytogénétique avant même d'avoir préconisé des examens complémentaires pouvant être moins coûteux et plus rapides, mais aussi que dans certaines circonstances les patients sont référés afin d'exclure l'association d'une anomalie chromosomique.

Dans notre étude 90% de nos patients nous sont envoyés pour une suspicion d'anomalies du développement sexuel et 10% pour des anomalies autosomiques alors que **Balkan M. et al.[9]** dans une étude en Turquie ont trouvé que 84,8% des malades étaient envoyés pour une suspicion de syndrome de Down et parmi les anomalies chromosomiques 17,6% présentaient des anomalies gonosomiques dont le syndrome de Klinefelter était le plus fréquent et 82,4% des anomalies autosomiques dont le syndrome de Down était le plus fréquent. Cette supériorité des anomalies de la différenciation sexuelle dans notre étude pouvant s'expliquer par le fait que le test chromatinien de Barr a été pendant longtemps le seul examen cytogénétique dont nous disposions limitant ainsi les indications. En outre, ces pathologies peuvent entrer dans le cadre de syndromes polymalformatifs tel que le décrivent **Dincsoy MY et al.[15]** et **Verloes A. et al.[16]**.

Concernant les antécédents, la consanguinité est retrouvée dans 41% des cas et parmi ceux qui présentaient une consanguinité des parents, 34,15% avaient une anomalie des tests cytogénétiques. Nos résultats sont élevés comparés à ceux de **Aruna N. et al.[17]** qui, dans une étude sur l'influence de la consanguinité sur les anomalies chromosomiques en Inde, avaient trouvé une notion de consanguinité chez 29,14% des patients qu'ils avaient reçus pour une suspicion d'anomalies chromosomiques ; la présence de consanguinité étaient notée dans 17% des cas d'anomalies chromosomiques dont 81,1% avec des anomalies de nombre et 18,9% des anomalies de structure.

Concernant le test chromatinien de Barr, le sexe chromatinien féminin est retrouvé chez 39% des patients, le sexe chromatinien masculin dans 45% et un taux intermédiaire est retrouvé dans 15%. La chromatine de BARR est une composante du noyau des cellules présent chez les femelles mammifères et correspond selon **Lyon MF. [18]** à l'inactivation du deuxième chromosome X et

signe ainsi d'une manière générale le sexe féminin; ce qui explique que le test chromatinien de Barr a été utilisé pendant longtemps comme test de féminité. Cependant le test chromatinien de Barr ne permet qu'un diagnostic de présomption sur les anomalies des chromosomes sexuels, car sa présence ou son absence peut correspondre à plusieurs formules chromosomiques, raison pour laquelle il a été abandonné dans plusieurs pays. Ainsi en aucun cas on ne doit se contenter de la seule recherche du corpuscule de Barr dans les anomalies sexuelles; l'étude cytogénétique doit toujours comporter un caryotype, toutefois il peut être très utile et peut constituer un élément d'orientation dans le diagnostic des anomalies du développement sexuel, surtout dans nos pays sous développés où le manque de moyens constitue un frein au diagnostic.

36% des malades ont pu bénéficier du caryotype. Parmi ces patients 15 (41,67%) avaient une formule 46,XY ; 14 (38,89%) une formule 46,XX ; 4 (11,11%) présentaient une trisomie 21 ; 1 (2,78%) une trisomie 13 ; 2 (5,56%) avait une formule en mosaïque. Ces résultats sont superposables à la majeure partie des études réalisées car, le plus souvent, les trisomies sont au premier plan des affections chromosomiques, tel que le décrivent **Goud MT et al.[6]** dans une étude sur l'incidence des anomalies chromosomiques au Sultanat d'Oman avec les résultats suivants : trisomie 21 (21,7%), la trisomie 18(1,8%), et la Trisomie 13(1,1%), les aberrations des chromosomes sexuels (2,8%).

Notre étude ne nous a pas permis de détecter certaines anomalies de structures notamment les microdélétions et réorganisations structurales chromosomiques. Cependant, beaucoup d'études ont démontré que les anomalies de nombre étaient les plus fréquentes comme le confirment **Santos et al.** qui trouvent 82% pour les anomalies de nombre et 18% pour les anomalies de structure ; **Balkan et al.** trouvent 80% d'anomalies de nombre et 20% d'anomalies structurales. Cela nous permet d'affirmer même s'il est possible de passer à côté de certaines anomalies chromosomiques de structure telles que les microdélétions, nous avons cependant réussi à poser le diagnostic des principales anomalies chromosomiques.

CONCLUSION

Même si les techniques cytogénétiques peuvent être parfois fastidieuses, elles sont très importantes pour l'identification correcte d'une variété de syndrome. En Afrique les re-

cherches dans ce domaine sont très limitées du fait du manque de moyen.

Au Sénégal, notre service est la seule structure publique capable de réaliser ces tests cytogénétiques pendant que les structures privées envoient les prélèvements à de partenaires étrangers. Pendant longtemps le seul test dont nous disposions était le test chromatinien de Barr mais depuis 2013 nous avons réussi à faire du caryotype une technique de routine. Cependant, la réussite d'un diagnostic cytogénétique peut être améliorée par l'utilisation de techniques plus poussées telles que l'hybridation en fluorescence et d'autres techniques de génétique moléculaire.

REFERENCES

1. Méhes K, Bajnóczky K. Incidence of major chromosomal abnormalities. *Clin Genet.* 2008 Apr 23;19(1):75–6.
2. Milia A, Cardia S, Aste A, Santucci S, Genazzani AR, Mameli M. Cytogenetic study on 282 patients with suspected chromosomal aberration. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 1984 Nov;18(4):207–10.
3. Al Husain M, Zaki OK. A Survey of 1,000 Cases Referred for Cytogenetic Study to King Khalid University Hospital, Saudi Arabia. *Hum Hered.* 1999;49(4):208–14.
4. Kim S, Jung S, Kim H, Moon H, Lee J. Chromosome Abnormalities in a Referred Population for suspected Chromosomal Aberrations: A Report of 4117 cases. *J Korean Med Sci.* 1999;14:373–6.
5. Duarte A., Cunha E, Roth J., Ferreira FL., Garcias G., Martino-Roth M. Cytogenetics of genetic counseling patients in Pelotas, Rio Grande do Sul, Brazil. *Genet Mol Res.* 2004;3(3):303–8.
6. Goud MT, Al-Harassi SA, Al-Salmani KK, Al-Busaidy SM, Rajab. Incidence of chromosome abnormalities in the sultanate of Oman. 2005;26(12):1951–7.
7. Connor JM, Ferguson-Smith MA. Essential medical genetics: Fourth edition. *Jpn J Hum Genet.* 1994 Dec;39(4):453–453.
8. Alao MJ, Gangbo F, Laleye A, Darboux R, Ayivi B. Génétique Clinique dans le Service de Pédiatrie et de Génétique Médicale du Centre National Hospitalier et Universitaire de Cotonou : Etat des Lieux et Perspectives. *Clin Mother Child Health.* 2011;8:1–5.
9. Balkan M, Akbas H, Isi H, Oral D, Turkyilmaz A, Kalkanli S, et al. Cytogenetic analysis of 4216 patients referred for suspected chromosomal abnormalities in Southeast Turkey. *Genet Mol Res.* 2010;9(2):1094–103.
10. Santos CB, Boy RT, Santos JM, Silva MPS, Pimentel MMG. Chromosomal investigations in patients with mental retardation and/or congenital malformations. *Genet Mol Biol.* 2000 Dec;23(4):703–7.
11. Milunsky A, editor. Genetic disorders and the fetus: diagnosis, prevention, and treatment. 5th ed. Baltimore: Johns Hopkins University Press; 2004. 1224 p.
12. Houk CP, Lee PA. Consensus Statement on Terminology and Management: Disorders of Sex Development. *Sex Dev.* 2008;2(4-5):172–80.
13. Lee PA, Houk CP, Ahmed SF, Hughes IA, in collaboration with the participants in the International Consensus Conference on Intersex organized by the Lawson Wilkins Pediatric Endocrine Society and the European Society for Paediatric Endocrinology. Consensus Statement on Management of Intersex Disorders. *PEDIATRICS.* 2006 Aug 1;118(2):e488–e500.
14. Kim KS, Kim J. Disorders of Sex Development. *Korean J Urol.* 2012;53(1):1.
15. Dincsoy MY, Salih MAM, Al-Jurayyan N, Al Saadi M, Patel PJ. Multiple congenital malformations in two sibs reminiscent of hydroletharus and pseudotrisomy 13 syndromes. *Am J Med Genet.* 1995;56(3):317–21.
16. Verloes A, Ayme S, Gambarelli D, Gonzales M, Le Merrer M, Mulliez N, et al. Holo-prosencephaly-polydactyly ('pseudotrisomy 13') syndrome: a syndrome with features of hydroletharus and Smith-Lemli-Opitz syndromes. A collaborative multicentre study. *J Med Genet.* 1991 May 1;28(5):297–303.
17. Aruna N, Rajangam S, Amudha S. Consanguinity and chromosomal abnormality. *Indian J Hum Genet.* 2005;11(2):108.
18. Lyon MF. Sex Chromatin and Gene Action in the Mammalian X-Chromosome. *Am J Hum Genet.* 1962 Juin;14(2):135–48.