

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la
Propriété Intellectuelle
Bureau international



(43) Date de la publication internationale
4 juin 2015 (04.06.2015)

WIPO | PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 2015/078997 A1

(51) Classification internationale des brevets :
C12Q 1/68 (2006.01)

(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/EP2014/075866

(22) Date de dépôt international :
27 novembre 2014 (27.11.2014)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :
13 61715 27 novembre 2013 (27.11.2013) FR

(71) Déposants : UNIVERSITE PAUL SABATIER TOULOUSE III [FR/FR]; 118 route de Narbonne, F-31062 TOULOUSE Cedex 9 (FR). CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE - CNRS [FR/FR]; 3 rue Michel Ange, F-75794 PARIS Cédex 16 (FR).

(72) Inventeur : BALARESQUE, Patricia; 23 rue de l'invention, F-31500 Toulouse (FR).

(74) Mandataire : CABINET PLASSERAUD; 52 rue de la Victoire, F-75440 Paris Cedex 09 (FR).

(81) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre de protection nationale disponible) : AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre de protection régionale disponible) : ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), européen (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publiée :

— avec rapport de recherche internationale (Art. 21(3))

(54) Title : METHOD AND KIT FOR DETERMINING THE SEX AND/OR GENETIC FOOTPRINT OF A PATIENT

(54) Titre : PROCEDE ET KIT POUR DETERMINER LE SEXE ET/OU L'EMPREINTE GENETIQUE D'UN SUJET

(57) Abstract : The present invention relates to a method for characterising a human or chimpanzee DNA sample, which includes a step of determining alleles of at least ten STR loci of the DNA sample, the loci being selected from the M2 group, wherein the M2 group consists of: Y-GATA-A10, DYS570, DYS549, DYS460, DYS442, DYS510, DYS541, DYS576, DYS513, DYS458, DYS481, DYS612, DYS444 and DYS533.

(57) Abrégé : La présente invention concerne un procédé pour caractériser un échantillon d'ADN humain ou de chimpanzé comprenant une étape de: détermination des allèles d'au moins 10 loci STR de l'échantillon d'ADN, les loci étant choisis dans le groupe M2, dans lequel: le groupe M2 consiste en : Y-GATA-A10, DYS570, DYS549, DYS460, DYS442, DYS510, DYS541, DYS576, DYS513, DYS458, DYS481, DYS612, DYS444 et DYS533.



WO 2015/078997 A1

DOMAINE DE L'INVENTION:

La présente invention concerne un procédé et un kit pour caractériser un échantillon d'ADN d'un sujet humain ou chimpanzé en vue de déterminer le sexe et/ou l'empreinte génétique de ce sujet.

5

ARRIERE-PLAN DE L'INVENTION:

Un profil génétique correspond à la combinaison spécifique de plusieurs marqueurs permettant d'identifier un individu grâce à son ADN. Il existe essentiellement deux grands types de marqueurs pour établir un profil génétique: les SNPs (Single Nucleotide Polymorphism), et les STR (Short Tandem Repeat ou microsatellites).

10

Un SNP correspond au changement d'une base en une autre à un endroit de la séquence ADN, par exemple un changement de A en C. Il se décline donc sous la forme de 2 allèles. Les SNP se caractérisent par un taux de mutation bas (2.1×10^{-6} mutation/génération/locus) en raison de la faible fréquence à laquelle surviennent ces mutations. Ce sont d'excellents outils phylogénétiques qui nous renseignent sur l'origine phylo-géographique d'un individu. Par contre, ils ne sont pas assez discriminants pour nous renseigner sur les relations existant entre des individus étroitement apparentés, excepté s'ils sont combinés en grand nombre (> 100aine de milliers au million).

15

Les STR sont quant à eux, très largement utilisés dans le cadre de recherche en paternité, d'affaires de viols ou de meurtres, et en recherche fondamentale afin de reconstruire l'histoire du peuplement humain. Ils possèdent, un fort pouvoir discriminant, en raison d'un taux de mutation élevé. Ce sont des unités répétées en tandem (ex. $[CA]_n$) qui mutent par gain ou perte d'une répétition, et se déclinent sous la forme de multiples états. Leur taux de mutation est plus ou moins élevé en fonction de leur taille, par exemple un CA_6 mutera moins rapidement qu'un CA_{15} . Ces différences de taux de mutation observées en fonction des motifs explique le large spectre de mutation de ces marqueurs (1.38×10^{-5} et 6.54×10^{-2} mut/gén/locus) et leur capacité à discriminer des individus plus ou moins apparentés. Si l'extrême mutabilité de certains loci ($>10^{-3}$) est très utile pour discriminer des individus proches génétiquement (frères, cousins), celle-ci ne permet pas d'obtenir une information robuste sur l'origine phylo-géographique d'un individu (comme il est possible de le faire avec des SNPs). De plus, cette hyper-mutabilité peut induire une « saturation mutationnelle » *i.e.* que lorsque un marqueur mute trop vite, les états intermédiaires de mutations ne sont pas toujours visibles – il en résulte un taux de mutation mal estimé et des indicateurs statistiques dérivés, approximatifs et peu robustes.

20

25

30

35

40

Idéalement, il faudrait pouvoir disposer, d'un outil complet, constitué de marqueurs ayant un taux de mutation faible, capables de donner une information « phylogénétique » sur les individus, et de marqueurs ayant un taux de mutation moyen ou élevé, capables de discriminer les individus même apparentés. Hors techniquement parlant, obtenir SNPs et STRs simplement via une même technique, même dans le cadre de séquençage NGS (next generation sequencing), qui permettent rarement d'extraire des empreintes STR très fiables et qui restent surtout relativement lourdes à utiliser en routine dans un laboratoire lambda.

En médecine légale et en recherche fondamentale, il existe un produit phare servant à établir un profil génétique masculin: le AmpF $\mathbb{R}$ STR $\mathbb{R}$ Yfiler $\mathbb{R}$ un multiplex de 17 marqueurs STR distribué par Applied Biosystems (life technologies). Cependant, ce produit ne répond pas correctement aux attentes des différents clients ciblés car il contient peu de marqueurs ayant

5 un taux de mutation élevé, indispensables en médecine légale pour discriminer des profils génétiques très proches, ainsi qu'en généalogie moléculaire et recherche fondamentale. De plus, parmi les quelques marqueurs ayant un taux de mutation élevé qu'il contient, deux d'entre eux (DYS385a et b) sont dupliqués et de ce fait inutilisables sans une connaissance approfondie des mécanismes moléculaires impliqués dans leur mutation. Les marqueurs inclus

10 dans ce kit, ayant des taux et pouvoir discriminant très variables, ne permettent ni de correctes études exploratoires à large échelle (faible apparemment : génétique évolutive à l'échelle continentale), ni de correctes études à fine échelle (ex. fort apparemment en généalogie moléculaire ou médecine légale). Enfin, les caractéristiques intrinsèques de 5 des 15 marqueurs restants, ne permettent pas d'envisager des études de modélisation afin de fournir

15 des statistiques fiables sur les taux de mutation.

Deux outils similaires ont été développés par des laboratoires publics: le 20-plex (Butler et al. 2002, Forensic Sci. Int) et le 14-plex (Parkin et al. 2006, Forensic Sci. Int) : ces 2 multiplex bien que publiés, il y a 10 et 6 ans respectivement, ne se sont pas imposés dans la communauté scientifique car utiliser ces outils dans un laboratoire demanderait un lourd investissement en

20 temps, expertise et finances afin de mettre en place le protocole dans un laboratoire. L'investissement se justifie d'autant moins que 70% des marqueurs sont déjà inclus dans l'AmpF $\mathbb{R}$ STR $\mathbb{R}$ Yfiler $\mathbb{R}$; il n'existe donc aucune réelle plus-value à les utiliser. En 2014 est apparu sur le marché le PPY23 (Promega) qui comprend de très nombreux marqueurs déjà présents dans l'AmpF $\mathbb{R}$ STR $\mathbb{R}$ Yfiler $\mathbb{R}$, et comporte les mêmes limites. Il est à noter que tous ces

25 outils sont humains –spécifiques, et qu'il n'existe aucun équivalent de ce type d'outil pour les chimpanzés, dont la gestion et la conservation dans les parcs et réserve, nécessite une connaissance pointue des relations généalogiques entre individus.

RESUME DE L'INVENTION:

30 L'inventeur a réussi à concevoir un procédé pour caractériser un échantillon d'ADN reposant sur un ensemble de marqueurs génomiques du même type, qui permet de déterminer l'empreinte génétique à haute résolution d'un sujet sans présenter les inconvénients précités. L'ensemble des marqueurs selon l'invention est utilisable non seulement sur des ADN parfaits, mais aussi sur des ADN de moyenne qualité (ADN ancien ou sérum).

35 En effet, ces marqueurs permettent de travailler sur des fragments de taille relativement courte. Ainsi, ces marqueurs peuvent être amplifiés avec des tailles toujours inférieures à 350bp. De plus, les marqueurs selon l'invention sont fiables/simples, *i.e.* qu'ils peuvent être utilisés sans une connaissance approfondie des structures moléculaires. En effet, il n'y a pas de duplications, de faux allèle, et peu de structure complexe, qui soient à considérer dans

40 l'utilisation des taux ou mécanismes de mutation associés à ces marqueurs.

Un premier aspect de l'invention concerne, par conséquent, un procédé pour caractériser un échantillon d'ADN humain ou de chimpanzé comprenant une étape de :

- détermination des allèles d'au moins 10 loci STR de l'échantillon d'ADN, les loci étant choisis dans le groupe M2, dans lequel :

5

-le groupe M2 consiste en :

Y-GATA-A10, DYS570, DYS549, DYS460, DYS442, DYS510, DYS541, DYS576, DYS513, DYS458, DYS481, DYS612, DYS444 et DYS533.

10 La présente invention concerne également un kit comprenant des moyens pour déterminer les allèles d'au moins 10 loci STR un échantillon d'ADN humain ou de chimpanzé, les loci étant choisis dans le groupe M2, dans lequel:

-le groupe M2 consiste en:

Y-GATA-A10, DYS570, DYS549, DYS460, DYS442, DYS510, DYS541, DYS576, DYS513, 15 DYS458, DYS481, DYS612, DYS444 et DYS533.

DESCRIPTION DETAILLEE DE L'INVENTION

Définitions

20 Le terme « allèle » désigne une des différentes formes d'une séquence d'ADN occupant le même locus.

Le terme « locus » désigne une position spécifique sur un chromosome.

Le terme « STR » ou « Short Tandem Repeat » ou « séquences répétées en tandem » ou microsatellite désigne toutes les séquences entre 2 et 7 nucléotides qui sont répétées en tandem.

25

Détermination du profil génétique d'un sujet

La présente invention concerne un procédé pour caractériser un échantillon d'ADN humain ou de chimpanzé comprenant une étape de :

30 - détermination des allèles d'au moins 10 loci STR de l'échantillon d'ADN, les loci étant choisis dans le groupe M1 et/ou le groupe M2, dans lequel :

-le groupe M1 consiste en :

DYS485, DYS588, DYS502, DYS461, DYS638, DYS643, DYS587, DYS575, DYS578, DYS632, DYS508, DYS640, DYS511, DYS577, DYS556, DYS517, DYS565 et DYS538

35 et

-le groupe M2 consiste en :

Y-GATA-A10, DYS570, DYS549, DYS460, DYS442, DYS510, DYS541, DYS576, DYS513, DYS458, DYS481, DYS612, DYS444 et DYS533.

40 La présente invention concerne un procédé pour caractériser un échantillon d'ADN humain ou de chimpanzé comprenant une étape de :

- détermination des allèles d'au moins 10 loci STR de l'échantillon d'ADN, les loci étant choisis dans le groupe M2,
dans lequel :

-le groupe M2 consiste en :

- 5 Y-GATA-A10, DYS570, DYS549, DYS460, DYS442, DYS510, DYS541, DYS576, DYS513, DYS458, DYS481, DYS612, DYS444 et DYS533.

Le procédé selon l'invention permet de déterminer le profil génétique d'un sujet.

Ce procédé présente l'avantage d'être à la fois utilisable pour déterminer le profil génétique d'un homme et celui d'un chimpanzé.

- 10 Il permet de discriminer les profils d'homme et de chimpanzé, ce dernier n'ayant ni les STRs DYS481 et ni DYS533. Les STRs du groupe M2 ont des taux de mutation élevés, compris entre $3,32 \times 10^{-03}$ mut/locus/génération et $1,45 \times 10^{-02}$ mut/locus/génération (cf. tableau 1). Du fait de leur taux de mutation élevé, ces marqueurs permettent une discrimination de profils relativement similaires, c.à.d. d'individus ayant un ancêtre commun proche dans le passé c.à.d. possédant des profils que l'on retrouve à fine échelle géographique (régionale, nationale), et/ou
- 15 généalogiquement lié.

Selon un mode de réalisation préféré, le procédé selon l'invention comprend, en outre, l'étape de détermination des allèles d'au moins 10 loci STR de l'échantillon d'ADN, les loci étant choisis dans le groupe M1,

- 20 dans lequel :

-le groupe M1 consiste en :

DYS485, DYS588, DYS502, DYS461, DYS638, DYS643, DYS587, DYS575, DYS578, DYS632, DYS508, DYS640, DYS511, DYS577, DYS556, DYS517, DYS565 et DYS538.

- 25 Les STR du groupe M1 ont un taux de mutation intermédiaire compris entre $3,85 \times 10^{-04}$ mut/locus/génération et $3,21 \times 10^{-03}$ mut/locus/génération (cf. tableau 1). Du fait de leur taux de mutation plus faible, comparés aux marqueurs existants inclus dans l'AmpFISTR®Yfiler, ces marqueurs permettent une discrimination de profils relativement divergents, c.à.d. que l'on retrouve à large échelle géographique (nationale, continentale).

- 30 La détermination des allèles des loci STR du groupe M1 permet donc de caractériser des individus sans lien de parenté direct ou de parenté très éloignée dans le temps (échelle évolutive).

- 35 La combinaison de la détermination des allèles du groupe M2 avec celle du groupe M1 permet de discriminer à la fois des individus ayant des profils génétiques très proches ce qui est indispensable en médecine légale mais aussi de donner une information phylogénétique sur sur l'origine phylogéographique d'un individu.

Afin d'éviter des analyses lourdes et coûteuses, il est préférable de déterminer un nombre

- 40 limité d'allèles de loci STRs.

Ainsi, selon un mode de réalisation préféré, le procédé selon l'invention comprend la détermination des allèles de 10 à 50 loci STR, préférablement les allèles de 10 à 40 loci STR, plus préférablement les allèles de 10 à 32 loci STR.

Typiquement, les allèles de 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31 ou 32 loci peuvent être déterminés.

Le choix du nombre de loci est fonction de l'utilisation souhaitée.

Si le procédé est utilisé pour discriminer des individus très fortement apparentés, 14 marqueurs dans M2 pourront être utilisés pour caractériser un échantillon d'ADN provenant de chacun de ces individus.

10 Si la méthode est utilisée pour discriminer des individus provenant de continents différents ou pour étudier l'origine phylo-géographique d'individus 10 marqueurs de M1 et 10 de M2 pourront être utilisés pour caractériser un échantillon d'ADN provenant de chacun de ces individus.

Dans un mode de réalisation préféré, les allèles des 32 loci sont déterminés.

15 De même le choix des loci STR est fonction de l'utilisation souhaitée.

De manière générale, on privilégiera les loci STR présentant un taux de mutation élevé qui présente donc un pouvoir discriminant plus important.

Les taux de mutations des différents loci sont décrits dans le tableau 1 ci-dessous et classés par ordre croissant de leur taux de mutation chez l'homme. La description moléculaire des STR
20 correspondant à ces loci sont donnés dans Kayser et al. 2004 et Ballantyne et al. 2010.

GBD ID	Groupe	Locus ID (Kayser et al. 2004)	Localisation de bande chromosomique	Détails de localisation details (rétrotransposition, gène...)	Taux de mutation médian bayésien
DYS502	M1	Y3S60	Yq11.221	LINE1 L NLGN4Y mRNA	3,85E-04
DYS575	M1	Y4S49	Yp11.2	Alu L	3,91E-04
DYS588	M1	Y5C23	Yq11.221	Alu R	3,92E-04
DYS538	M1	Y4C32	Yq11.221	Aucune retransposition	3,94E-04
DYS632	M1	BV005731	Yq11.221	Alu R	3,97E-04
DYS640	M1	Y4S38	Yq11.221	Alu L et LINE1 R	3,98E-04
DYS485	M1	Y3S1	Yq11.222	Alu R et LINE1 L	4,04E-04
DYS577	M1	Y4S54	Yq11.221	Alu R	4,11E-04
DYS461/ Y-GATA-A7.2	M1	-	Yq11.222	L1 L famille LINE	9,89E-04
DYS578	M1	Y4S56	Yq11.223	Alu L, LINE ERV1 R	9,95E-04
DYS638	M1	Y4S26	Yq11.221	Alu R	1,04E-03

DYS511	M1	Y4C114	Yq11.221	Aucune (mais proche d'une autre simple répétition)	1,52E-03
DYS556	M1	Y4C75	Yq11.223	LINE1 L et R	1,59E-03
DYS565	M1	Y4S18	Yq11.221	Alu L	2,09E-03
DYS587	M1	Y5C22	Yq11.221	Aucune retransposition	2,62E-03
DYS508	M1	Y4C109	Yq11.221	Aucune	3,03E-03
DYS517	M1	Y4C126	Yq11.221	Aucune	3,21E-03
DYS643	M1	Y5C20	Yq11.221	LINE1 R	1,50E-03
Y-GATA-A10	M2	-	Yq11.221	Aucune	3,32E-03
DYS541	M2	Y4C36	Yq11.221	LINE1 R	3,92E-03
DYS549	M2	Y4C52	Yq11.222	LINE1 L et R	4,55E-03
DYS481	M2	Y3C59	Yp11.2	Aucune	4,97E-03
DYS533	M2	Y4C215	Yq11.221	Aucune (proche d'un autre Y-STR)	5,01E-03
DYS444	M2	Y4C37	Yq11.221	Tigger2a DNA R	5,45E-03
DYS510	M2	Y4C113	Yq11.221	Aucune (mais proche d'une autre simple répétition)	5,99E-03
DYS513	M2	Y4C116	Yq11.221	Aucune	6,09E-03
DYS460/ Y-GATA-A7.1	M2	-	Yq11.222	(L1 R famille LINE)	6,22E-03
DYS458	M2	-	Yp11.2	Alu L et R	8,36E-03
DYS442	M2	-	Y11q21	LINE1 L et R	9,78E-03
DYS570	M2	Y4S4	Yp11.2	5'UTR du gène TBL1Y (codant pour une protéine)	1,24E-02
DYS576	M2	Y4S5	Yp11.2	Alu L	1,43E-02
DYS612	M2	Y3C22	Yq11.221	Aucune	1,45E-02

Tableau 1

Dans un second temps, un autre critère permettant le choix des loci STR est la gamme allélique. Ces gammes sont décrites aux tableaux 8A, 8B, 9A et 9B. Plus les gammes alléliques sont grandes plus le loci STR a potentiellement un pouvoir discriminant important.

5

Enfin, on privilégiera les motifs 'purs' (ex. (CA)_n) aux motifs 'composés' c'est-à-dire aux motifs répétés interrompus (ex. CA3TGCT(CA)_n).

Les marqueurs selon l'invention sont des marqueurs masculins. En effet, les loci sont situés sur le chromosome Y, permettant de générer un profil génétique spécifiquement masculin.

L'obtention d'un profil génétique masculin optimal représente un réel enjeu dans de nombreux domaines non seulement en médecine légale car plus de 97% des agressions sont perpétrées par des hommes mais également dans le cadre de test de paternité, en généalogie génétique et en histoire du peuplement afin de retracer l'histoire des lignées masculines d'homo-sapiens.

5 Le procédé pour caractériser un échantillon d'ADN peut être réalisé sur un échantillon dont le sexe n'a pas été déterminé au préalable. Dans ce cas, étant donné que ce procédé est basé sur des marqueurs masculins, il ne donnera des résultats que si l'échantillon provient d'un mâle. Néanmoins, la présence de marqueurs de sexage inclus permettra de dire si cette non amplification est due à la présence d'un individu féminin (marqueur X amplifié uniquement), ou d'un ADN très dégradé (aucun marqueur n'est amplifié).

10 Dans un mode de réalisation préféré, l'échantillon d'ADN est un échantillon d'ADN humain. Le profil génétique d'un être humain, en particulier d'un homme, est déterminé par exemple à des fins de médecine légale mais aussi à des fins de recherche pour des études de généalogie moléculaire et d'histoire du peuplement.

15 Dans un autre mode de réalisation, l'échantillon d'ADN est un échantillon d'ADN de chimpanzé, en particulier un chimpanzé mâle. Pour le chimpanzé, l'obtention d'un profil génétique peut notamment être utilisée afin de déterminer les relations de parentés des individus en milieu naturel et comprendre l'organisation sociale de cette espèce. Elle peut également permettre d'optimiser les stratégies d'accouplement, éviter la consanguinité et assurer le bon devenir de l'espèce lorsque le chimpanzé est en semi-captivité ou captivité.

Selon un mode de réalisation, le procédé selon l'invention comprend une étape de fourniture d'un échantillon d'ADN.

25 L'échantillon d'ADN peut provenir de différentes sources. Des exemples de sources d'ADN, en particulier d'ADN génomique, sont le sang, le sperme, les cheveux, les poils, les tissus, la salive, les urines, les fèces et des mélanges de fluides biologiques. L'échantillon d'ADN peut être frais, ancien, sec ou partiellement dégradé.

30 Les procédés de préparation d'un échantillon d'ADN en vue de déterminer les allèles de loci STR sont connus. Par exemple, de tels procédés sont décrits dans Patel, P. I., et al. (1984) "Organization of the HPRT gene and related sequences in the human genome," Somat Cell Mol Genet 10: 483-493, and Gill, P., et al. (1985) "Forensic application of DNA 'fingerprints'," Nature 318: 577-579.

A partir de l'échantillon d'ADN, les allèles d'intérêt sont déterminés.

35 Différents procédés de détermination des allèles de loci STR sont connus. Des exemples de telles technologies comprennent le séquençage d'ADN ou des techniques d'amplification d'ADN telles que la PCR (« polymerase chain reaction » ou « réaction de polymérisation en chaîne »). Ces techniques qui peuvent être utilisées en combinaison avec des technologies de détection telles que l'électrophorèse, la spectrométrie de masse, etc.

40 Selon un mode de réalisation préféré, l'étape de détermination des allèles comprend une étape d'amplification telle qu'une amplification par PCR. Les allèles de loci peuvent être déterminés

individuellement ou simultanément. De préférence, cette amplification est réalisée simultanément pour plusieurs loci. Ce type d'amplification est appelée amplification multiplex.

L'amplification multiplex est un procédé pour amplifier simultanément plusieurs loci dans une seule réaction. Ces amplifications multiplex ont largement été décrites dans la littérature
5 (Duchenne Muscular Dystrophy (Chamberlain, J. S., et al. (1988) "Deletion screening of the Duchenne muscular dystrophy locus via multiplex DNA amplification"; Morral, N. and Estivill, X. (1992) "Multiplex PCR amplification of three STR within the CFTR gene," Genomics 51: 1362-1364); Kimpton, C. P., et al. (1993) "Automated DNA profiling employing multiplex amplification of short tandem repeat loci," PCR Methods and Applications 3: 13-22; Hammond; Schumm, J.
10 W. et al. (1994) "Development of nonisotopic multiplex amplification sets for analysis of polymorphic STR loci," in "The Fourth International Symposium on Human Identification 1993," pp. 177-187).

Les amplifications multiplex sont généralement réalisées par PCR. On parle alors de PCR multiplex.

15 L'étape d'amplification peut généralement comprendre une ou plusieurs des étapes suivantes :
-la dénaturation de l'ADN afin qu'il soit sous forme simple brin,
-l'ajout de paires d'amorces spécifiques pour chacun des STR, une amorce de chaque paire étant substantiellement complémentaire d'une partie de la séquence dans le brin sens et l'autre amorce de chaque paire étant substantiellement complémentaire d'une partie différente de la
20 même séquence sur le brin anti-sens complémentaire,
-l'hybridation des paires d'amorces à leur séquence complémentaire,
-l'élongation simultanée des amorces hybridées à partir de l'extrémité 3' de chaque amorce pour synthétiser un produit d'élongation complémentaire du brin hybridé à chaque amorce, dit produit d'élongation, lesdits produits d'élongation, après séparation de leur complément
25 servent de matrices pour la synthèse d'un produit d'élongation pour l'autre amorce de chaque paire,
-la séparation des produits d'élongation des matrices pour produire des molécules simples brins,
-l'amplification des molécules simple brin en répétant au moins une fois les étapes
30 d'hybridation, d'élongation et de séparation.

Dans un mode de réalisation, l'étape d'amplification comprend l'ajout d'au moins 10 paires d'amorces adaptées pour amplifier les loci STR selon l'invention.

Dans un mode de réalisation, l'étape d'amplification comprend l'ajout de 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31 ou 32 paires d'amorces adaptées
35 pour amplifier les loci STR selon l'invention.

Dans un mode de réalisation, les paires d'amorces ont les séquences nucléiques choisies dans le groupe consistant en:

SEQ ID NO : 1 et SEQ ID NO : 2 pour le locus DYS485,
SEQ ID NO : 3 et SEQ ID NO : 4 pour le locus DYS588,
40 SEQ ID NO : 5 et SEQ ID NO : 6 pour le locus DYS502,
SEQ ID NO : 7 et SEQ ID NO : 8 pour le locus DYS461,

- 5 SEQ ID NO : 9 et SEQ ID NO : 10 pour le locus DYS638,
 SEQ ID NO : 11 et SEQ ID NO : 12 pour le locus DYS643,
 SEQ ID NO : 13 et SEQ ID NO : 14 pour le locus DYS587,
 SEQ ID NO : 15 et SEQ ID NO : 16 pour le locus DYS575,
 SEQ ID NO : 17 et SEQ ID NO : 18 pour le locus DYS578,
 SEQ ID NO : 19 et SEQ ID NO : 20 pour le locus DYS632,
 SEQ ID NO : 21 et SEQ ID NO : 22 pour le locus DYS508,
 SEQ ID NO : 23 et SEQ ID NO : 24 pour le locus DYS640,
 SEQ ID NO : 25 et SEQ ID NO : 26 pour le locus DYS511,
 10 SEQ ID NO : 27 et SEQ ID NO : 28 pour le locus DYS577,
 SEQ ID NO : 29 et SEQ ID NO : 30 pour le locus DYS556,
 SEQ ID NO : 31 et SEQ ID NO : 32 pour le locus DYS517,
 SEQ ID NO : 33 et SEQ ID NO : 34 pour le locus DYS565,
 SEQ ID NO : 35 et SEQ ID NO : 36 pour le locus DYS538,
 15 SEQ ID NO : 37 et SEQ ID NO : 38 pour le locus Y-GATA-A10
 SEQ ID NO : 39 et SEQ ID NO : 40 pour le locus DYS570,
 SEQ ID NO : 41 et SEQ ID NO : 42 pour le locus DYS549,
 SEQ ID NO : 43 et SEQ ID NO : 44 pour le locus DYS460,
 SEQ ID NO : 45 et SEQ ID NO : 46 pour le locus DYS442
 20 SEQ ID NO : 47 et SEQ ID NO : 48 pour le locus DYS510,
 SEQ ID NO : 49 et SEQ ID NO : 50 pour le locus DYS541,
 SEQ ID NO : 51 et SEQ ID NO : 52 pour le locus DYS576,
 SEQ ID NO : 53 et SEQ ID NO : 54 pour le locus DYS513,
 SEQ ID NO : 55 et SEQ ID NO : 56 pour le locus DYS458,
 25 SEQ ID NO : 57 et SEQ ID NO : 58 pour le locus DYS481
 SEQ ID NO : 59 et SEQ ID NO : 60 pour le locus DYS612,
 SEQ ID NO : 61 et SEQ ID NO : 62 pour le locus DYS444 et
 SEQ ID NO : 63 et SEQ ID NO : 64 pour le locus DYS533.

- 30 Les séquences des amorces des différents modes de réalisation de l'invention dans lesquels
 l'échantillon d'ADN est un échantillon d'ADN humain ou de chimpanzé sont données dans le
 tableau 2 ci-dessous.

Marqueur	Amorce sens		Amorce anti-sens	
	SEQ ID NO	Séquence (5'-3')	SEQ ID NO	Séquence (5'-3')
DYS485	1	catataacaaaattgaatgtgtactc c	2	agcctgggtgacaagagttatac
DYS588	3	gaatgcagaaccctcaagga	4	agcctgggtgacagaaacac
DYS502	5	cagcaagccaccataccata	6	Tgtgctttggagtttgag

DYS461 / Y-GATA- A7.2	7	aatacataataaatgataggcagagga	8	gagagctgaataagttgtatcaggtaa
DYS638	9	ttctaatttcagtgctttcaatttc	10	Aggtgggtcatgaggtcagt
DYS643	11	aagccatgcctggttaaactac	12	accaaaccaccaccattcc
DYS587	13	cttcttggaaagtagcatttcat	14	aaagtctgacaatgagaagggtttctaagttcagg
DYS575	15	cagaggttccagtaagcttagatca	16	Cattgatgggctttaggttga
DYS578	17	gaggcgggaacttccagttag	18	cagaagtcctctgtgttcaa
DYS632	19	cacagtttcagtcctgcatgg	20	tctgggcaacagaaggagac
DYS508	21	acaatggcaatcccaaattc	22	gaacaaataaggtgggatggat
DYS640	23	ggaaaaacatgagatcctgtc	24	aagcccgttcatattttaaagac
DYS511	25	tggtgtggtgtaggttaga	26	Tctggttgccttagatttga
DYS577	27	ttttctacgtgtgtatccactaacc	28	Ggtccccagccctgtta
DYS556	29	tcaccaatgacattttacagca	30	ttggttagtgaatgcatccag
DYS517	31	aactgaccagcaaaaatgtttaa	32	tgtctgagacctacaagattgc
DYS565	33	ccaggaagcagtggtgcat	34	Gcagttctctgcctgtatgg
DYS538	35	ttggggaaaacagatggtgt	36	ccaaataccatcataggaagaa
Y-GATA- A10	37	cctgccatctctatttattctgcatata	38	ataaatggagatagtggttgatt
DYS570	39	tgtgacatcaagggtatgaaacg	40	gggtgaaattattcagcatagtcaag
DYS549	41	gaaaagaaaagtgtgaagccaaac c	42	tttggtggcataagtggtaatg
DYS460	43	atcctctgcctatcatttattatgtat	44	gaataccagaggaatctgacacc
DYS442	45	tgcaaaatcacggaaccaa	46	Caagccactgcaaatgtca
DYS510	47	ttttcctcccttaccacaga	48	tctggagaagacagaactgtca
DYS541	49	catcataattctatctgttcatccat	50	tgataaagaacaccttaagaagc
DYS576	51	ccaagcaacatagcaagacct	52	Aagcgtattgtcttggtttt
DYS513	53	tgttgtaaaaatgactactgtggtat g	54	ccacatcagcactattacttaactca
DYS458	55	tggtgtggtggaggttactgt	56	cccaaagttctggcattacaa
DYS481	57	aggaatgtggctaacgctgt	58	accagaaggttgcaagactca
DYS612	59	ccccatgccagtaagaata	60	tgagggaaggcaaaagaaaa
DYS444	61	catagaatgaaaggtgtgaacca	62	Tgccattcaaaactcacgttg
DYS533	63	attcatctaacatcttgcattacc	64	Ttaactgccttttgcattcc

Tableau 2

Notons cependant que le locus DYS481 est absent chez le chimpanzé, et que le locus DYS533, même s'il est théoriquement présent sur le génome assemblé du chimpanzé (XXX), il n'a jamais pu être amplifié en phase de test – il est donc considéré comme non amplifié en M2.

Par conséquent, dans un mode réalisation, l'échantillon d'ADN est un échantillon d'ADN de chimpanzé et les paires d'amorces ont les séquences nucléiques choisies dans le groupe

- 5 consistant en:
- SEQ ID NO : 1 et SEQ ID NO : 2 pour le locus DYS485,
 - SEQ ID NO : 3 et SEQ ID NO : 4 pour le locus DYS588,
 - SEQ ID NO : 5 et SEQ ID NO : 6 pour le locus DYS502,
 - 10 SEQ ID NO : 7 et SEQ ID NO : 8 pour le locus DYS461,
 - SEQ ID NO : 9 et SEQ ID NO : 10 pour le locus DYS638,
 - SEQ ID NO : 11 et SEQ ID NO : 12 pour le locus DYS643,
 - SEQ ID NO : 13 et SEQ ID NO : 14 pour le locus DYS587,
 - SEQ ID NO : 15 et SEQ ID NO : 16 pour le locus DYS575,
 - 15 SEQ ID NO : 17 et SEQ ID NO : 18 pour le locus DYS578,
 - SEQ ID NO : 19 et SEQ ID NO : 20 pour le locus DYS632,
 - SEQ ID NO : 21 et SEQ ID NO : 22 pour le locus DYS508,
 - SEQ ID NO : 23 et SEQ ID NO : 24 pour le locus DYS640,
 - SEQ ID NO : 25 et SEQ ID NO : 26 pour le locus DYS511,
 - 20 SEQ ID NO : 27 et SEQ ID NO : 28 pour le locus DYS577,
 - SEQ ID NO : 29 et SEQ ID NO : 30 pour le locus DYS556,
 - SEQ ID NO : 31 et SEQ ID NO : 32 pour le locus DYS517,
 - SEQ ID NO : 33 et SEQ ID NO : 34 pour le locus DYS565,
 - SEQ ID NO : 35 et SEQ ID NO : 36 pour le locus DYS538,
 - 25 SEQ ID NO : 37 et SEQ ID NO : 38 pour le locus Y-GATA-A10
 - SEQ ID NO : 39 et SEQ ID NO : 40 pour le locus DYS570,
 - SEQ ID NO : 41 et SEQ ID NO : 42 pour le locus DYS549,
 - SEQ ID NO : 43 et SEQ ID NO : 44 pour le locus DYS460,
 - SEQ ID NO : 45 et SEQ ID NO : 46 pour le locus DYS442
 - 30 SEQ ID NO : 47 et SEQ ID NO : 48 pour le locus DYS510,
 - SEQ ID NO : 49 et SEQ ID NO : 50 pour le locus DYS541,
 - SEQ ID NO : 51 et SEQ ID NO : 52 pour le locus DYS576,
 - SEQ ID NO : 53 et SEQ ID NO : 54 pour le locus DYS513,
 - SEQ ID NO : 55 et SEQ ID NO : 56 pour le locus DYS458,
 - 35 SEQ ID NO : 59 et SEQ ID NO : 60 pour le locus DYS612 et
 - SEQ ID NO : 61 et SEQ ID NO : 62 pour le locus DYS444.

Dans certains modes de réalisation, les produits d'élongation de la PCR peuvent être détectés grâce à des marqueurs fluorescents conjugués aux amorces d'amplification de la PCR (voir par exemple WO2009/059049).

Les produits de PCR peuvent également être détectés par d'autres techniques comme par exemple la coloration des produits d'amplification telles que la coloration à l'argent, les radio-isotopes, par chimioluminescence.

Des exemples de marqueurs fluorescents sont FAM (5-carboxyfluorescéine, fluorescent dans le bleu), VIC® (fluorescent dans le vert, disponible auprès de Life Technologies), NED™ (fluorescent dans le jaune disponible auprès de Life Technologies) et PET® (fluorescent dans le rouge disponible auprès de Life Technologies), TET (tétrachlorofluorescéine, fluorescent dans le vert), et HEX (6-carboxy 2,4,7,4,7-hexachlorofluorescéine, fluorescent dans le jaune).

Dans un mode de réalisation, le procédé pour caractériser un échantillon d'ADN comprend l'étape de détermination des allèles d'au moins 15 loci STR choisis dans le groupe M1.

Les STR du groupe M1 ont un taux de mutation bas à intermédiaire. Leur taux de mutation est compris entre $3,85 \times 10^{-04}$ mut/locus/génération et $3,21 \times 10^{-03}$ mut/locus/génération (cf. tableau 1).

Du fait de leur taux de mutation relativement faible, par rapport aux principaux marqueurs existants comme ceux de l'AmpFISTR®Yfiler, ces marqueurs permettent une discrimination de profils relativement divergeant, c.à.d. que l'on retrouve à large échelle géographique, par exemple à l'échelle de pays ou de continents.

Dans un mode de réalisation, le procédé pour caractériser un échantillon d'ADN comprend l'étape de détermination des allèles de 15, 16, 17 ou 18 loci STR choisis dans le groupe M1.

Dans un mode de réalisation préféré, le procédé pour caractériser un échantillon d'ADN comprend l'étape de détermination des allèles des 18 loci STR du groupe M1.

Dans un mode de réalisation, le procédé pour caractériser un échantillon comprend l'étape de détermination des allèles d'au moins 11 loci STR choisis dans le groupe M2

Les STR du groupe M2 ont un taux de mutation élevé. Leur taux de mutation est compris entre $3,32 \times 10^{-03}$ mut/locus/génération et $1,45 \times 10^{-02}$ mut/locus/génération (cf. tableau 1). Du fait de leur taux de mutation élevé, ces marqueurs permettent une discrimination de profils relativement similaires, c.à.d. que l'on retrouve à fine échelle géographique, par exemple à l'échelle d'une région.

Dans un mode de réalisation, le procédé pour caractériser un échantillon d'ADN comprend l'étape de détermination des allèles de 11, 12, 13 ou 14 loci STR choisis dans le groupe M2.

Dans un autre mode de réalisation préféré, le procédé pour caractériser un échantillon d'ADN comprend l'étape de détermination des allèles des 14 loci STR du groupe M2.

Dans un autre mode de réalisation, le procédé pour caractériser un échantillon d'ADN comprend l'étape de détermination des allèles des 14 loci STR du groupe M2 seulement. Dans ce mode de réalisation, le procédé ne comprend pas la détermination d'allèles de loci STR autres que ceux du groupe M2.

Dans un mode de réalisation, le procédé pour caractériser un échantillon d'ADN comprend une étape de détermination des allèles :

-d'au moins 10 loci STR choisis dans le groupe M1,
et/ou

-d'au moins 10 loci STR choisis dans le groupe M2.

Dans un mode de réalisation préféré, les loci dont les allèles sont déterminés sont au moins DYS485, DYS588, DYS461, DYS638, DYS643, DYS587, DYS517, DYS508, DYS511 et DYS565 pour le groupe M1 et/ou au moins DYS570, DYS510, DYS541, DYS576, DYS458, DYS481, DYS612, DYS460, DYS442, DYS513 et DYS444 pour le groupe M2.

- 5 Plus préférablement, les loci dont les allèles sont déterminés sont au moins DYS485, DYS588, DYS461, DYS638, DYS643, DYS587, DYS517, DYS508, DYS511, DYS565, DYS578, DYS556 et DYS538 pour le groupe M1 et/ou au moins DYS570, DYS510, DYS541, DYS576, DYS458, DYS481, DYS612, DYS460, DYS442, DYS513 et DYS444 pour le groupe M2.

- 10 Dans un mode de réalisation, le procédé pour caractériser un échantillon d'ADN comprend une étape de détermination des allèles :

-de 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 ou 18 loci STR choisis dans le groupe M1,
et/ou

-de 10, 11, 12, 13 ou 14 loci STR choisis dans le groupe M2.

- 15 Dans un mode de réalisation préféré, le procédé pour caractériser un échantillon d'ADN comprend une étape de détermination des allèles des 18 loci STR du groupe M1 et des 14 loci STR du groupe M2.

- 20 Dans un autre mode de réalisation, le procédé pour caractériser un échantillon d'ADN comprend l'étape de détermination des allèles des 18 loci STR du groupe M1 et des 14 loci STR du groupe M2 seulement. Dans ce mode de réalisation le procédé ne comprend pas la détermination d'allèles de loci STR autres que ceux des groupes M1 et M2.

La combinaison des loci STR des deux ensembles M1 et M2 permet d'obtenir des profils génétiques très informatifs, renseignant aussi bien sur les liens existants entre individus peu comme fortement apparentés.

- 25 Il est également intéressant d'utiliser l'ensemble des loci des groupes M1 et M2 dans des populations à faible diversité génétique.

Par exemple, chez les chimpanzés, cette espèce ayant subi d'importantes réductions d'effectifs, sa diversité génétique s'est grandement affaiblie. Par conséquent, l'utilisation de l'ensemble des marqueurs permettra une discrimination maximale très utile sur ce type de population à faible diversité génétique.

- 30 Le procédé pour caractériser un échantillon d'ADN peut être réalisé sur un échantillon dont le sexe n'a pas été déterminé au préalable. Dans ce cas, étant donné que ce procédé est basé sur des marqueurs masculins, il ne donnera des résultats que si l'échantillon provient d'un mâle.

- 35 De préférence, le procédé pour caractériser un échantillon d'ADN est utilisé sur un échantillon dont il est connu qu'il provient d'un mâle.

Selon un mode de réalisation, le procédé pour caractériser un échantillon d'ADN peut comprendre en outre une étape de détermination du sexe du sujet dont provient l'échantillon d'ADN.

- 40 Des procédés de détermination du sexe d'un sujet sont connus. La plupart de ces procédés reposent sur l'amplification du gène de l'amélogénine sur X et Y (cf. Sullivan et al. 1993, Ensminger et Hoffman 2002). De tels procédés sont disponibles dans le commerce via des kits

tels que le PowerPlex16 (Promega) et l'AmpF/STR Identifier (Life technologies). Plus rares, il existe également des procédés de détermination du sexe reposant sur l'amplification de deux loci distincts sur les chromosomes sexuels (i.e. DXS8378, DXS6803 sur le chromosome X et SRY sur le chromosome Y).

- 5 Selon un mode de réalisation, l'étape de détermination du sexe d'un échantillon d'ADN qui comprend une étape d'amplification des gènes SRY, UTY et UTX de l'échantillon d'ADN. Ce procédé pour déterminer le sexe d'un sujet permet, outre l'identification du sexe, d'évaluer indirectement le profil de dégradation de l'échantillon d'ADN masculin étudié.

- 10 En effet, les 3 marqueurs ayant des tailles de 81 (SRY), 91 (UTY) et 120 (UTX) bp lorsque l'échantillon provient d'un homme ou d'un chimpanzé, l'amplification décroissante de ces 3 marqueurs nous renseigne sur le degré de fragmentation de l'échantillon. Ceci est particulièrement intéressant lorsqu'on utilise ce procédé de détermination du sexe avant de déterminer le profil génétique d'un sujet de manière plus poussée.

- 15 Ainsi, en procédant au préalable à cette étape, on peut rapidement évaluer si l'échantillon est apte à être analysé ou pas.

- De plus, parfois, le sexage d'un échantillon préalable à la détermination d'un profil génétique d'un individu échoue. Ainsi, certains échantillons identifiés comme féminins, sont, en fait, des échantillons masculins pour lesquels le sexage a échoué. Combiner la détermination d'un profil génétique d'un individu avec un outil de sexage permet de valider le sexage effectué
- 20 préalablement à la détermination de l'empreinte génétique.

Dans un mode de réalisation, l'étape d'amplification des gènes SRY, UTY et UTX comprend l'ajout de paires d'amorces ayant les séquences nucléiques:

- 25 SEQ ID NO: 65 et SEQ ID NO: 66 pour SRY,
SEQ ID NO: 67 et SEQ ID NO: 68 pour UTY
et
SEQ ID NO: 67 et SEQ ID NO: 69 pour UTX.

Marqueur	Amorce sens		Amorce anti-sens		Longueur amplifiée (bp)
	SEQ ID NO	Séquence (5'-3')	SEQ ID NO	Séquence (5'-3')	
SRY	65	gcgaaactcagagatcagcaag	66	tgtgcctcctggaagaatgg	81
UTY	67	cagtgttaccagccttaacag	68	ggcaggtctactttttagag	91
UTX			69	tctgtggactagggttggt	120

Tableau 3

30 **Kit pour caractériser un échantillon d'ADN**

La présente invention concerne également un kit comprenant des moyens pour déterminer les allèles d'au moins 10 loci STR d'un échantillon d'ADN humain ou de chimpanzé, les loci étant choisis dans le groupe M1 et/ou le groupe M2, dans lequel :

-le groupe M1 consiste en :

DYS485, DYS588, DYS502, DYS461, DYS638, DYS643, DYS587, DYS575, DYS578, DYS632, DYS508, DYS640, DYS511, DYS577, DYS556, DYS517, DYS565 et DYS538

et

5 -le groupe M2 consiste en :

Y-GATA-A10, DYS570, DYS549, DYS460, DYS442, DYS510, DYS541, DYS576, DYS513, DYS458, DYS481, DYS612, DYS444 et DYS533.

La présente invention concerne également un kit comprenant des moyens pour déterminer les allèles d'au moins 10 loci STR d'un échantillon d'ADN humain ou de chimpanzé, les loci étant

10 choisis dans le groupe M2, dans lequel :

-le groupe M2 consiste en :

Y-GATA-A10, DYS570, DYS549, DYS460, DYS442, DYS510, DYS541, DYS576, DYS513, DYS458, DYS481, DYS612, DYS444 et DYS533.

Le kit peut comprendre des moyens pour déterminer les allèles de loci STR autre que ceux du groupe M2.

15

Pour des raisons de coûts et de facilité d'utilisation, il est préférable que les allèles à déterminer soient limités.

Ainsi, le kit peut comprendre des moyens pour déterminer les allèles de 10 à 50 loci STR, préférablement les allèles de 10 à 40 loci STR, plus préférablement les allèles de 10 à 32 loci STR.

20

Typiquement, le kit comprend les moyens pour déterminer les allèles de 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31 ou 32 loci STR.

Dans un mode de réalisation préféré, le kit comprend au moins 10 paires d'amorces adaptées pour amplifier les loci STR, les loci étant choisis dans le groupe M1 et/ou le groupe M2.

25 Typiquement, le kit comprend 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31 ou 32 paires d'amorces.

Dans un mode de réalisation, l'échantillon d'ADN est un échantillon d'ADN humain ou de chimpanzé et les au moins 10 paires d'amorces ont les séquences nucléiques choisies dans le groupe consistant en :

30 SEQ ID NO : 1 et SEQ ID NO : 2 pour le locus DYS485,

SEQ ID NO : 3 et SEQ ID NO : 4 pour le locus DYS588,

SEQ ID NO : 5 et SEQ ID NO : 6 pour le locus DYS502,

SEQ ID NO : 7 et SEQ ID NO : 8 pour le locus DYS461,

SEQ ID NO : 9 et SEQ ID NO : 10 pour le locus DYS638,

35 SEQ ID NO : 11 et SEQ ID NO : 12 pour le locus DYS643,

SEQ ID NO : 13 et SEQ ID NO : 14 pour le locus DYS587,

SEQ ID NO : 15 et SEQ ID NO : 16 pour le locus DYS575,

SEQ ID NO : 17 et SEQ ID NO : 18 pour le locus DYS578,

SEQ ID NO : 19 et SEQ ID NO : 20 pour le locus DYS632,

40 SEQ ID NO : 21 et SEQ ID NO : 22 pour le locus DYS508,

SEQ ID NO : 23 et SEQ ID NO : 24 pour le locus DYS640,

- 5 SEQ ID NO : 25 et SEQ ID NO : 26 pour le locus DYS511,
 SEQ ID NO : 27 et SEQ ID NO : 28 pour le locus DYS577,
 SEQ ID NO : 29 et SEQ ID NO : 30 pour le locus DYS556,
 SEQ ID NO : 31 et SEQ ID NO : 32 pour le locus DYS517,
 SEQ ID NO : 33 et SEQ ID NO : 34 pour le locus DYS565,
 SEQ ID NO : 35 et SEQ ID NO : 36 pour le locus DYS538,
 SEQ ID NO : 37 et SEQ ID NO : 38 pour le locus Y-GATA-A10
 SEQ ID NO : 39 et SEQ ID NO : 40 pour le locus DYS570,
 SEQ ID NO : 41 et SEQ ID NO : 42 pour le locus DYS549,
 10 SEQ ID NO : 43 et SEQ ID NO : 44 pour le locus DYS460,
 SEQ ID NO : 45 et SEQ ID NO : 46 pour le locus DYS442
 SEQ ID NO : 47 et SEQ ID NO : 48 pour le locus DYS510,
 SEQ ID NO : 49 et SEQ ID NO : 50 pour le locus DYS541,
 SEQ ID NO : 51 et SEQ ID NO : 52 pour le locus DYS576,
 15 SEQ ID NO : 53 et SEQ ID NO : 54 pour le locus DYS513,
 SEQ ID NO : 55 et SEQ ID NO : 56 pour le locus DYS458,
 SEQ ID NO : 57 et SEQ ID NO : 58 pour le locus DYS481
 SEQ ID NO : 59 et SEQ ID NO : 60 pour le locus DYS612,
 SEQ ID NO : 61 et SEQ ID NO : 62 pour le locus DYS444 et
 20 SEQ ID NO : 63 et SEQ ID NO : 64 pour le locus DYS533.

Dans un mode de réalisation, l'échantillon d'ADN est un échantillon d'ADN de chimpanzé et les au moins 10 paires d'amorces ont les séquences nucléiques choisies dans le groupe consistant en :

- 25 SEQ ID NO : 1 et SEQ ID NO : 2 pour le locus DYS485,
 SEQ ID NO : 3 et SEQ ID NO : 4 pour le locus DYS588,
 SEQ ID NO : 5 et SEQ ID NO : 6 pour le locus DYS502,
 SEQ ID NO : 7 et SEQ ID NO : 8 pour le locus DYS461,
 SEQ ID NO : 9 et SEQ ID NO : 10 pour le locus DYS638,
 SEQ ID NO : 11 et SEQ ID NO : 12 pour le locus DYS643,
 30 SEQ ID NO : 13 et SEQ ID NO : 14 pour le locus DYS587,
 SEQ ID NO : 15 et SEQ ID NO : 16 pour le locus DYS575,
 SEQ ID NO : 17 et SEQ ID NO : 18 pour le locus DYS578,
 SEQ ID NO : 19 et SEQ ID NO : 20 pour le locus DYS632,
 SEQ ID NO : 21 et SEQ ID NO : 22 pour le locus DYS508,
 35 SEQ ID NO : 23 et SEQ ID NO : 24 pour le locus DYS640,
 SEQ ID NO : 25 et SEQ ID NO : 26 pour le locus DYS511,
 SEQ ID NO : 27 et SEQ ID NO : 28 pour le locus DYS577,
 SEQ ID NO : 29 et SEQ ID NO : 30 pour le locus DYS556,
 SEQ ID NO : 31 et SEQ ID NO : 32 pour le locus DYS517,
 40 SEQ ID NO : 33 et SEQ ID NO : 34 pour le locus DYS565,
 SEQ ID NO : 35 et SEQ ID NO : 36 pour le locus DYS538,

- 5 SEQ ID NO : 37 et SEQ ID NO : 38 pour le locus Y-GATA-A10
 SEQ ID NO : 39 et SEQ ID NO : 40 pour le locus DYS570,
 SEQ ID NO : 41 et SEQ ID NO : 42 pour le locus DYS549,
 SEQ ID NO : 43 et SEQ ID NO : 44 pour le locus DYS460,
 SEQ ID NO : 45 et SEQ ID NO : 46 pour le locus DYS442
 SEQ ID NO : 47 et SEQ ID NO : 48 pour le locus DYS510,
 SEQ ID NO : 49 et SEQ ID NO : 50 pour le locus DYS541,
 SEQ ID NO : 51 et SEQ ID NO : 52 pour le locus DYS576,
 SEQ ID NO : 53 et SEQ ID NO : 54 pour le locus DYS513,
 10 SEQ ID NO : 55 et SEQ ID NO : 56 pour le locus DYS458,
 SEQ ID NO : 59 et SEQ ID NO : 60 pour le locus DYS612 et
 SEQ ID NO : 61 et SEQ ID NO : 62 pour le locus DYS444.

- 15 Dans un mode de réalisation préféré, l'échantillon d'ADN est un échantillon d'ADN humain ou de chimpanzé et le kit comprend les paires d'amorces ayant des séquences nucléiques choisies dans le groupe consistant en:

- 20 SEQ ID NO : 37 et SEQ ID NO : 38 pour le locus Y-GATA-A10
 SEQ ID NO : 39 et SEQ ID NO : 40 pour le locus DYS570,
 SEQ ID NO : 41 et SEQ ID NO : 42 pour le locus DYS549,
 SEQ ID NO : 43 et SEQ ID NO : 44 pour le locus DYS460,
 SEQ ID NO : 45 et SEQ ID NO : 46 pour le locus DYS442
 SEQ ID NO : 47 et SEQ ID NO : 48 pour le locus DYS510,
 SEQ ID NO : 49 et SEQ ID NO : 50 pour le locus DYS541,
 SEQ ID NO : 51 et SEQ ID NO : 52 pour le locus DYS576,
 SEQ ID NO : 53 et SEQ ID NO : 54 pour le locus DYS513,
 25 SEQ ID NO : 55 et SEQ ID NO : 56 pour le locus DYS458,
 SEQ ID NO : 57 et SEQ ID NO : 58 pour le locus DYS481
 SEQ ID NO : 59 et SEQ ID NO : 60 pour le locus DYS612,
 SEQ ID NO : 61 et SEQ ID NO : 62 pour le locus DYS444 et
 SEQ ID NO : 63 et SEQ ID NO : 64 pour le locus DYS533.

- 30 Dans un mode de réalisation préféré, le kit comprend, en outre, des moyens pour déterminer les allèles d'au moins 10 loci STR choisis dans le groupe M1, dans lequel :

- le groupe M1 consiste en :
 35 DYS485, DYS588, DYS502, DYS461, DYS638, DYS643, DYS587, DYS575, DYS578,
 DYS632, DYS508, DYS640, DYS511, DYS577, DYS556, DYS517, DYS565 et DYS538.

- Selon ce mode de réalisation préféré, le kit peut comprendre au moins 10 paires d'amorces adaptées pour amplifier les loci STR et dans lequel les paires d'amorces ont des séquences nucléiques choisies dans le groupe consistant en :

- 40 SEQ ID NO : 1 et SEQ ID NO : 2 pour le locus DYS485,
 SEQ ID NO : 3 et SEQ ID NO : 4 pour le locus DYS588,

- 5 SEQ ID NO : 5 et SEQ ID NO : 6 pour le locus DYS502,
 SEQ ID NO : 7 et SEQ ID NO : 8 pour le locus DYS461,
 SEQ ID NO : 9 et SEQ ID NO : 10 pour le locus DYS638,
 SEQ ID NO : 11 et SEQ ID NO : 12 pour le locus DYS643,
 SEQ ID NO : 13 et SEQ ID NO : 14 pour le locus DYS587,
 SEQ ID NO : 15 et SEQ ID NO : 16 pour le locus DYS575,
 SEQ ID NO : 17 et SEQ ID NO : 18 pour le locus DYS578,
 SEQ ID NO : 19 et SEQ ID NO : 20 pour le locus DYS632,
 SEQ ID NO : 21 et SEQ ID NO : 22 pour le locus DYS508,
 10 SEQ ID NO : 23 et SEQ ID NO : 24 pour le locus DYS640,
 SEQ ID NO : 25 et SEQ ID NO : 26 pour le locus DYS511,
 SEQ ID NO : 27 et SEQ ID NO : 28 pour le locus DYS577,
 SEQ ID NO : 29 et SEQ ID NO : 30 pour le locus DYS556,
 SEQ ID NO : 31 et SEQ ID NO : 32 pour le locus DYS517,
 15 SEQ ID NO : 33 et SEQ ID NO : 34 pour le locus DYS565,
 SEQ ID NO : 35 et SEQ ID NO : 36 pour le locus DYS538,

SECTION M1

- 20 Dans un mode de réalisation, le kit comprend des moyens pour déterminer les allèles d'au moins 15 loci STR choisis dans le groupe M1.

Dans ce mode de réalisation, le kit comprend des moyens pour déterminer les allèles de 15, 16, 17 ou 18 loci choisis dans le groupe M1.

- 25 Dans un mode de réalisation préféré, le kit comprend des moyens pour déterminer les allèles des 18 loci du groupe M1.

- Dans un mode de réalisation préféré, le kit comprend des moyens pour déterminer les allèles d'au moins les loci DYS485, DYS588, DYS461, DYS638, DYS643, DYS587, DYS517, DYS508, DYS511 et DYS565, plus préférentiellement d'au moins les loci DYS485, DYS588, 30 DYS461, DYS638, DYS643, DYS587, DYS517, DYS508, DYS511, DYS565, DYS578, DYS556 et DYS538.

Dans un mode de réalisation préféré, le kit comprend les paires d'amorces ayant les séquences nucléiques :

- 35 SEQ ID NO : 1 et SEQ ID NO : 2 pour le locus DYS485,
 SEQ ID NO : 3 et SEQ ID NO : 4 pour le locus DYS588,
 SEQ ID NO : 5 et SEQ ID NO : 6 pour le locus DYS502,
 SEQ ID NO : 7 et SEQ ID NO : 8 pour le locus DYS461,
 SEQ ID NO : 9 et SEQ ID NO : 10 pour le locus DYS638,
 SEQ ID NO : 11 et SEQ ID NO : 12 pour le locus DYS643,
 40 SEQ ID NO : 13 et SEQ ID NO : 14 pour le locus DYS587,
 SEQ ID NO : 15 et SEQ ID NO : 16 pour le locus DYS575,

- 5 SEQ ID NO : 17 et SEQ ID NO : 18 pour le locus DYS578,
 SEQ ID NO : 19 et SEQ ID NO : 20 pour le locus DYS632,
 SEQ ID NO : 21 et SEQ ID NO : 22 pour le locus DYS508,
 SEQ ID NO : 23 et SEQ ID NO : 24 pour le locus DYS640,
 SEQ ID NO : 25 et SEQ ID NO : 26 pour le locus DYS511,
 SEQ ID NO : 27 et SEQ ID NO : 28 pour le locus DYS577,
 SEQ ID NO : 29 et SEQ ID NO : 30 pour le locus DYS556,
 SEQ ID NO : 31 et SEQ ID NO : 32 pour le locus DYS517,
 SEQ ID NO : 33 et SEQ ID NO : 34 pour le locus DYS565 et
 10 SEQ ID NO : 35 et SEQ ID NO : 36 pour le locus DYS538.

15 Ces paires d'amorces correspondent aux paires d'amorces adaptées pour amplifier les loci STR du groupe M1. Elles peuvent être utilisées tant pour un échantillon d'ADN humain que pour un échantillon d'ADN de chimpanzé. Les STR du groupe M1 ont un taux de mutation bas à intermédiaire. Ces marqueurs permettent une discrimination de profils relativement

SECTION M2

- Dans un mode de réalisation, le kit comprend des moyens pour déterminer les allèles d'au moins 11 loci STR choisis dans le groupe M2.
- 20 Dans ce mode de réalisation, le kit comprend des moyens pour déterminer les allèles de 11, 12, 13 ou 14 loci choisis dans le groupe M2.
- Dans un autre mode de réalisation préféré, le kit comprend des moyens pour déterminer les allèles des 14 loci du groupe M2.
- 25 Dans un autre mode de réalisation, le kit comprend des moyens pour déterminer les allèles des 14 loci du groupe M2 seulement. Dans ce mode de réalisation, le procédé ne comprend pas la détermination d'allèles de loci STR autres que ceux du groupe M2.
- Dans un mode de réalisation préféré, le kit comprend des moyens pour déterminer les allèles d'au moins les loci DYS570, DYS510, DYS541, DYS576, DYS458, DYS481, DYS612, DYS460, DYS442, DYS513 et DYS444.
- 30 Dans un mode de réalisation préféré, l'échantillon d'ADN est un échantillon d'ADN humain ou de chimpanzé et le kit comprend les paires d'amorces ayant les séquences nucléiques:
- SEQ ID NO : 37 et SEQ ID NO : 38 pour le locus Y-GATA-A10
- SEQ ID NO : 39 et SEQ ID NO : 40 pour le locus DYS570,
- SEQ ID NO : 41 et SEQ ID NO : 42 pour le locus DYS549,
- 35 SEQ ID NO : 43 et SEQ ID NO : 44 pour le locus DYS460,
- SEQ ID NO : 45 et SEQ ID NO : 46 pour le locus DYS442
- SEQ ID NO : 47 et SEQ ID NO : 48 pour le locus DYS510,
- SEQ ID NO : 49 et SEQ ID NO : 50 pour le locus DYS541,
- SEQ ID NO : 51 et SEQ ID NO : 52 pour le locus DYS576,
- 40 SEQ ID NO : 53 et SEQ ID NO : 54 pour le locus DYS513,
- SEQ ID NO : 55 et SEQ ID NO : 56 pour le locus DYS458,

SEQ ID NO : 57 et SEQ ID NO : 58 pour le locus DYS481
 SEQ ID NO : 59 et SEQ ID NO : 60 pour le locus DYS612,
 SEQ ID NO : 61 et SEQ ID NO : 62 pour le locus DYS444 et
 SEQ ID NO : 63 et SEQ ID NO : 64 pour le locus DYS533.

5

Les STRs du groupe M2 ont un taux de mutation élevé. Ces marqueurs permettent une discrimination de profils à plus fine échelle, par exemple à l'échelle d'une région.

Dans un autre mode de réalisation, l'échantillon d'ADN est un échantillon d'ADN de chimpanzé et le kit comprend les paires d'amorces ayant les séquences nucléiques:

10

SEQ ID NO : 37 et SEQ ID NO : 38 pour le locus Y-GATA-A10

SEQ ID NO : 39 et SEQ ID NO : 40 pour le locus DYS570,

SEQ ID NO : 41 et SEQ ID NO : 42 pour le locus DYS549,

SEQ ID NO : 43 et SEQ ID NO : 44 pour le locus DYS460,

SEQ ID NO : 45 et SEQ ID NO : 46 pour le locus DYS442

15

SEQ ID NO : 47 et SEQ ID NO : 48 pour le locus DYS510,

SEQ ID NO : 49 et SEQ ID NO : 50 pour le locus DYS541,

SEQ ID NO : 51 et SEQ ID NO : 52 pour le locus DYS576,

SEQ ID NO : 53 et SEQ ID NO : 54 pour le locus DYS513,

SEQ ID NO : 55 et SEQ ID NO : 56 pour le locus DYS458,

20

SEQ ID NO : 59 et SEQ ID NO : 60 pour le locus DYS612 et

SEQ ID NO : 61 et SEQ ID NO : 62 pour le locus DYS444.

SECTION M1 et M2

Dans un mode de réalisation, le kit comprend des moyens pour déterminer les allèles :

25

- d'au moins 10 loci STR choisis dans le groupe M1

et

- d'au moins 10 loci STR choisis dans le groupe M2.

Dans ce mode de réalisation, le kit comprend des moyens pour déterminer les allèles:

- de 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 ou 18 loci STR choisis dans le groupe M1

30

et

- de 10, 11, 12, 13 ou 14 loci STR choisis dans le groupe M2.

Dans un mode de réalisation préféré, le kit comprend des moyens pour déterminer les 18 loci STR du groupe M1 et les 14 loci STR du groupe M2.

Dans un mode de réalisation préféré, l'échantillon d'ADN est un échantillon d'ADN humain ou de chimpanzé et le kit comprend les paires d'amorces ayant les séquences nucléiques:

35

SEQ ID NO : 1 et SEQ ID NO : 2 pour le locus DYS485,

SEQ ID NO : 3 et SEQ ID NO : 4 pour le locus DYS588,

SEQ ID NO : 5 et SEQ ID NO : 6 pour le locus DYS502,

SEQ ID NO : 7 et SEQ ID NO : 8 pour le locus DYS461,

40

SEQ ID NO : 9 et SEQ ID NO : 10 pour le locus DYS638,

SEQ ID NO : 11 et SEQ ID NO : 12 pour le locus DYS643,

- 5 SEQ ID NO : 13 et SEQ ID NO : 14 pour le locus DYS587,
 SEQ ID NO : 15 et SEQ ID NO : 16 pour le locus DYS575,
 SEQ ID NO : 17 et SEQ ID NO : 18 pour le locus DYS578,
 SEQ ID NO : 19 et SEQ ID NO : 20 pour le locus DYS632,
 SEQ ID NO : 21 et SEQ ID NO : 22 pour le locus DYS508,
 SEQ ID NO : 23 et SEQ ID NO : 24 pour le locus DYS640,
 SEQ ID NO : 25 et SEQ ID NO : 26 pour le locus DYS511,
 SEQ ID NO : 27 et SEQ ID NO : 28 pour le locus DYS577,
 SEQ ID NO : 29 et SEQ ID NO : 30 pour le locus DYS556,
 10 SEQ ID NO : 31 et SEQ ID NO : 32 pour le locus DYS517,
 SEQ ID NO : 33 et SEQ ID NO : 34 pour le locus DYS565,
 SEQ ID NO : 35 et SEQ ID NO : 36 pour le locus DYS538,
- 15 SEQ ID NO : 37 et SEQ ID NO : 38 pour le locus Y-GATA-A10
 SEQ ID NO : 39 et SEQ ID NO : 40 pour le locus DYS570,
 SEQ ID NO : 41 et SEQ ID NO : 42 pour le locus DYS549,
 SEQ ID NO : 43 et SEQ ID NO : 44 pour le locus DYS460,
 SEQ ID NO : 45 et SEQ ID NO : 46 pour le locus DYS442
 20 SEQ ID NO : 47 et SEQ ID NO : 48 pour le locus DYS510,
 SEQ ID NO : 49 et SEQ ID NO : 50 pour le locus DYS541,
 SEQ ID NO : 51 et SEQ ID NO : 52 pour le locus DYS576,
 SEQ ID NO : 53 et SEQ ID NO : 54 pour le locus DYS513,
 SEQ ID NO : 55 et SEQ ID NO : 56 pour le locus DYS458,
 SEQ ID NO : 57 et SEQ ID NO : 58 pour le locus DYS481
 25 SEQ ID NO : 59 et SEQ ID NO : 60 pour le locus DYS612,
 SEQ ID NO : 61 et SEQ ID NO : 62 pour le locus DYS444 et
 SEQ ID NO : 63 et SEQ ID NO : 64 pour le locus DYS533.

- 30 Dans un autre mode de réalisation, l'échantillon d'ADN est un échantillon d'ADN de chimpanzé
 et le kit comprend les paires d'amorces ayant les séquences nucléiques:

- 35 SEQ ID NO : 1 et SEQ ID NO : 2 pour le locus DYS485,
 SEQ ID NO : 3 et SEQ ID NO : 4 pour le locus DYS588,
 SEQ ID NO : 5 et SEQ ID NO : 6 pour le locus DYS502,
 SEQ ID NO : 7 et SEQ ID NO : 8 pour le locus DYS461,
 SEQ ID NO : 9 et SEQ ID NO : 10 pour le locus DYS638,
 SEQ ID NO : 11 et SEQ ID NO : 12 pour le locus DYS643,
 SEQ ID NO : 13 et SEQ ID NO : 14 pour le locus DYS587,
 SEQ ID NO : 15 et SEQ ID NO : 16 pour le locus DYS575,
 SEQ ID NO : 17 et SEQ ID NO : 18 pour le locus DYS578,
 40 SEQ ID NO : 19 et SEQ ID NO : 20 pour le locus DYS632,
 SEQ ID NO : 21 et SEQ ID NO : 22 pour le locus DYS508,

- 5 SEQ ID NO : 23 et SEQ ID NO : 24 pour le locus DYS640,
 SEQ ID NO : 25 et SEQ ID NO : 26 pour le locus DYS511,
 SEQ ID NO : 27 et SEQ ID NO : 28 pour le locus DYS577,
 SEQ ID NO : 29 et SEQ ID NO : 30 pour le locus DYS556,
 SEQ ID NO : 31 et SEQ ID NO : 32 pour le locus DYS517,
 SEQ ID NO : 33 et SEQ ID NO : 34 pour le locus DYS565,
 SEQ ID NO : 35 et SEQ ID NO : 36 pour le locus DYS538,
- 10 SEQ ID NO : 37 et SEQ ID NO : 38 pour le locus Y-GATA-A10
 SEQ ID NO : 39 et SEQ ID NO : 40 pour le locus DYS570,
 SEQ ID NO : 41 et SEQ ID NO : 42 pour le locus DYS549,
 SEQ ID NO : 43 et SEQ ID NO : 44 pour le locus DYS460,
 SEQ ID NO : 45 et SEQ ID NO : 46 pour le locus DYS442
 SEQ ID NO : 47 et SEQ ID NO : 48 pour le locus DYS510,
 15 SEQ ID NO : 49 et SEQ ID NO : 50 pour le locus DYS541,
 SEQ ID NO : 51 et SEQ ID NO : 52 pour le locus DYS576,
 SEQ ID NO : 53 et SEQ ID NO : 54 pour le locus DYS513,
 SEQ ID NO : 55 et SEQ ID NO : 56 pour le locus DYS458,
 SEQ ID NO : 59 et SEQ ID NO : 60 pour le locus DYS612 et
 20 SEQ ID NO : 61 et SEQ ID NO : 62 pour le locus DYS444.

Dans un mode réalisation, le kit comprend, en outre, des moyens de détermination du sexe, dans lequel les moyens de détermination du sexe consistent en des moyens d'amplification des gènes SRY, UTY et UTX.

25

Dans un mode de réalisation, les moyens d'amplification des gènes SRY, UTY et UTX comprennent les paires d'amorces ayant les séquences nucléiques :

- SEQ ID NO: 65 et SEQ ID NO: 66 pour SRY,
 SEQ ID NO: 67 et SEQ ID NO: 68 pour UTY
 30 et
 SEQ ID NO: 67 et SEQ ID NO: 69 pour UTX.

La présente invention concerne également l'utilisation d'un kit tel que défini précédemment pour la réalisation du procédé selon l'invention.

35

Outil de sexage:

La présente invention concerne également un procédé pour déterminer le sexe d'un échantillon d'ADN.

- 40 Le 1^{er} outil moléculaire développé chez les humains pour l'identification du sexe est le test de l'amélogénine. Ce test repose sur l'utilisation d'une seule paire d'amorces PCR capable de

- co-amplifier des fragments d'ADN à la fois sur les gènes d'amélogénine des chromosomes X et Y, qui chez les humains diffèrent de 6 bp dans l'intron 1. Cette différence de taille est généralement résolue par électrophorèse capillaire, révélant un seul pic pour les femelles (XX) et un double pic pour les mâles (XY). Cette méthode est aujourd'hui le standard utilisé pour la
- 5 détermination du sexe en médecine légale et en génétique des populations ; ce test est inclus dans 2 kits notamment PowerPlex16 (Promega) et l'AmpF/STR Indentifiler (Life technologies). Néanmoins, malgré son utilisation sur le long terme, cet essai de typage du sexe n'est pas entièrement fiable. Beaucoup d'études ont reporté une détermination du sexe erronée car le
- 10 locus AMELY n'a pas pu être amplifié. Deux causes sont impliquées : une mutation dans le site de liaison de l'amorce et/ou la délétion du locus, spécialement chez les populations chinoises. Le système AMELX/AMELY a aussi été modifié pour réaliser une détermination du sexe chez des primates non humains. Il a été appliqué avec succès chez des primates de parenté proche de l'humain mais ne fonctionne pas sur des espèces de parenté lointaine comme les orangs outangs ou les babouins. A cause de l'impossibilité de généraliser l'utilisation d'amélogénine
- 15 chez les primates non humains, plusieurs méthodes alternatives ont été développées. Pour la plupart d'entre elles des fragments liés au X et Y ont été inclus en plus du test AMELX/AMELY. Cependant la plupart de ces procédés de typage ont été basés sur des références humaines et malgré une amplification positive chez les grands singes grâce leur proche parenté, ils ne fonctionnent pas chez des espèces de primates plus éloignées.
- 20 En dehors des essais AMELX/AMELY, une récente étude a identifié le locus UTX/UTY comme un meilleur système candidat pour un marqueur de sexage universel des primates en comparant les données génomiques de plusieurs mammifères. Ce test de sexage donne des résultats positifs sur les babouins et les orangs-outans. Cependant, il présente un risque d'erreur dû aux importantes variations structurales existant sur le chromosome Y et à la
- 25 probabilité associée d'une amplification nulle de l'allèle Y. Lorsque un locus cible Y ne peut pas être amplifié, cela peut entraîner une mauvaise identification du sexe.
- La présente invention concerne également un procédé pour déterminer le sexe d'un échantillon d'ADN qui comprend une étape d'amplification des gènes SRY, UTY et UTX de l'échantillon d'ADN.
- 30 L'amplification d'UTX uniquement, en l'absence de SRY et UTY indique que l'échantillon d'ADN provient d'un sujet de sexe féminin.
- L'amplification des 3 marqueurs, UTY, SRY et UTX indique que l'échantillon d'ADN provient d'un sujet de sexe masculin.
- L'amplification de 2 marqueurs, UTY, et UTX, en l'absence de SRY, indique que l'échantillon
- 35 d'ADN provient d'un sujet de sexe masculin, mais qu'il existe une mutation sur le site d'hybridation des amorces SRY, ou une délétion de ce gène, ne permettant pas son amplification (cas fréquent qui est souvent population spécifique').
- L'amplification de 2 marqueurs, SRY, et UTX, en l'absence de UTY, indique que l'échantillon d'ADN provient d'un sujet de sexe masculin, mais qu'il existe une mutation sur le site
- 40 d'hybridation des amorces UTY, ou une délétion de ce gène, ne permettant pas son amplification (cas fréquent qui est souvent population spécifique').

Le procédé de typage du sexe selon l'invention, est applicable permet d'empêcher les mauvaises identifications du sexe. De plus, il est facilement applicable pour un large spectre de qualité d'ADN.

5 Ce procédé pour déterminer le sexe d'un sujet permet, outre l'identification du sexe, d'évaluer indirectement le profil de dégradation de l'échantillon d'ADN masculin étudié.

En effet, les 3 marqueurs ayant des tailles respectives de 81 (SRY), 91 (UTY) et 120 (UTX) bp pour l'outil de sexage humains et chimpanzés et de 91(UTY), 120 (UTX) et 165 (SRY) pour l'outil de sexage tous primates, l'amplification décroissante (voire nulle) de ces 3 marqueurs nous renseigne sur le degré de fragmentation de l'échantillon. Ceci est particulièrement
10 intéressant lorsqu'on utilise ce procédé de détermination du sexe avant de déterminer le profil génétique d'un sujet de manière plus poussée.

Ainsi, en procédant au préalable à cette étape, on peut rapidement évaluer si l'échantillon est apte à être analysé ou pas.

Dans un mode de réalisation préféré, l'étape d'amplification des gènes SRY, UTY et UTX est
15 l'amplification de fragments de 80 à 250 paires de bases d'un exon de SRY, de UTX et de UTY.

Les exons étant des parties codantes, il y a plus de chance qu'elles restent conservées à travers le temps chez la même espèce mais aussi entre espèces.

Le fragment amplifié peut notamment être compris entre 80 et 250 paires de bases, 80 et 200
20 paires de bases ou 80 et 150 paires de bases.

La présente invention concerne également un kit pour déterminer le sexe d'un échantillon d'ADN dans lequel les moyens de détermination du sexe comprennent des moyens d'amplification des gènes SRY, UTY et UTX.

25 Outil de sexage de 'Tous Primates':

Selon un mode de réalisation de ce procédé, l'échantillon d'ADN est un échantillon d'ADN appartenant à l'ordre des primates.

L'échantillon d'ADN peut par exemple provenir d'un humain (*Homo sapiens*), de *Pan* sp., *Gorilla* sp., *Pongo* sp. *Hylobates* sp., *Cercopithecus* sp., *Erythrocebus* *patas*, *Cercocebus*
30 *torquatus*, *Mandrillus* *sphinx*, *Lophocebus* *albigena*, *Papio* sp., *Macaca* sp., *Alouatta* *caraya*, *Saïmiri* *sciureus*, *Cebus* *apella*, *Aotus* *trivirgatus*, *Callithrix* *jacchus*, *Hapalemur* sp., *Eulemur* sp., *Microcebus* sp., *Lepilemur* sp., *Avahi* sp., *Propithecus* sp., *Lemur* sp., *Indri* *indri*.

En particulier, l'échantillon d'ADN peut provenir de *Homo sapiens*, *Pan troglodytes* *troglodytes*, *Pan paniscus*, *Gorilla gorilla*, *Pongo pygmaeus pygmaeus*, *Hylobates* *lar*,
35 *Cercopithecus* *cephus*, *Cercopithecus* *nictitans*, *Erythrocebus* *patas*, *Cercocebus* *torquatus*, *Mandrillus* *sphinx*, *Lophocebus* *albigena*, *Macaca mulatta*, *Macaca sylvanus*, *Alouatta* *caraya*, *Aotus* *trivirgatus*, *Saïmiri* *sciureus*, *Cebus* *apella*, *Callithrix* *jacchus*, *Lepilemur dorsalis*, *Lepilemur sahamalazensis*, *Lepilemur ankaranensis*, *Lepilemur mittermeieri*, *Lepilemur ruficaudatus*, *Lepilemur aeeclis*, *Microcebus murinus*, *Hapalemur griseus ranomafanensis*,
40 *Hapalemur griseus meridionalis*, *Hapalemur griseus occidentalis*, *Hapalemur griseus griseus*, *Hapalemur aureus*, *Hapalemur simus*, *Eulemur macaco macaco*, *Eulemur macaco flavifrons*,

Lemur catta, Propithecus diademata edwardsi, Propithecus tattersalli, Propithecus verreauxi coquerelli, Propithecus verreauxi verreauxi, Propithecus verreauxi deckeni, Propithecus diademata diademata, Avahi laniger, Avahi occidentalis, Avahi cleesei, Indri indri.

5 Dans un mode de réalisation, l'étape d'amplification des gènes SRY, UTY et UTX est l'amplification de fragments de 100 à 250 paires de bases d'un exon de SRY, de UTX et de UTY.

Dans un mode de réalisation, l'étape d'amplification des gènes comprend l'ajout de paires d'amorces ayant les séquences nucléiques:

10 SEQ ID NO: 70 et SEQ ID NO: 66 pour SRY,
SEQ ID NO: 67 et SEQ ID NO: 68 pour UTY
et
SEQ ID NO: 67 et SEQ ID NO: 69 pour UTX.

Les séquences des amorces des différents modes de réalisation préférés du procédé de détermination du sexe sont données dans le tableau 4 ci-dessous.

Marqueur	Amorce sens		Amorce anti-sens		Longueur amplifiée (bp)
	SEQ ID NO	Séquence (5'-3')	SEQ ID NO	Séquence (5'-3')	
SRY	70	agtgaagcgacccatgaacg	66	tgtgcctcctgaagaatgg	165
UTY	67	cagtgtaccagccttaacag	68	ggcagggtctactttttagag	91
UTX			69	tctgtggactaggtttggt	120

15 Tableau 4

Dans un mode de réalisation, le kit est un kit pour déterminer le sexe d'un échantillon d'ADN de primate et les moyens d'amplification des gènes SRY, UTY et UTX comprennent les paires d'amorces ayant les séquences nucléiques:

20 SEQ ID NO: 70 et SEQ ID NO: 66 pour SRY,
SEQ ID NO: 67 et SEQ ID NO: 68 pour UTY
et
SEQ ID NO: 67 et SEQ ID NO: 69 pour UTX.

25 Typiquement, les amorces s'hybrident dans des conditions stringentes. Par exemple, pour des amorces de 15 à 25 bp, des conditions stringentes sont une température de 55°C dans du tampon ou de 51°C dans ce même tampon pour des échantillons de prosimiens. Le tampon peut par exemple être composé de Multiplex PCR Master mix 2X comprenant des concentrations optimisées (c'est eux qui le disent !!) de HotStarTaq® Plus DNA Polymerase, MgCl₂, et dNTPs Mix (dATP, dCTP, dGTP, dTTP ultrapure quality) et Multiplex PCR Plus Buffer (contains 6 mM MgCl₂; pH 8.7), Q-solution 5X, CoralLoad Dye 10X, RNase-free water

30

ultra-pure quality, PCR-grade comme dans le kit QIAGEN Multiplex PCR Plus Kit (réf : 206152).

Outil de sexage humains et chimpanzés :

- 5 Selon un mode de réalisation de ce procédé, l'échantillon d'ADN est un échantillon d'ADN humain ou de chimpanzé.

Selon un mode de réalisation de ce procédé pour déterminer le sexe d'un échantillon d'ADN, l'échantillon d'ADN provient d'un humain ou d'un chimpanzé et l'étape d'amplification des gènes comprend l'ajout de paires d'amorces choisies dans le groupe consistant en:

- 10 - pour SRY :
- une amorce sens entre 15 et 25 paires de bases s'hybridant entre les bases 2 655 350 et 2 655 400, de préférence entre les bases 2 655 365 et 2 655 395, de manière plus préférée entre les bases 2 655 369 et 2 655 390 du brin négatif du chromosome Y humain et
 - 15 -une amorce anti-sens entre 15 et 25 paires de bases s'hybridant entre les bases 2655 295 et 2 655 340 de préférence entre les bases 2655 300 et 2 655 325, de manière plus préférée entre les bases 2655 304 et 2 655 323 du brin positif du chromosome Y humain,
 - une amorce sens entre 15 et 25 paires de bases s'hybridant entre les bases 26 202 990 et 26 203 035, de préférence entre les bases 26 202 995 et 26 203 030, de manière plus préférée entre les bases 26 203 002 et 26 203 023 du brin positif du chromosome Y de chimpanzé et
 - 20 -une amorce anti-sens entre 15 et 25 paires de bases s'hybridant entre les bases 26 203 055 et 26 203 105 de préférence entre les bases 26 203 060 et 26 203 095, de manière plus préférée entre les bases 26 203 069 et 26 203 088 du brin négatif du chromosome Y de chimpanzé,

-pour UTX :

- une amorce sens entre 15 et 25 paires de bases s'hybridant entre les bases 44 929 400 et 44 929 450, de préférence entre les bases 44 929 415 et 44 929 440, de manière plus préférée entre les bases 44 929 417 et 44 929 437 du brin positif du chromosome X humain et
- 30 -une amorce anti-sens entre 15 et 25 paires de bases s'hybridant entre les bases 44 929 505 et 44 929 555, de préférence entre les bases 44 929 515 et 44 929 550, de manière plus préférée entre les bases 44 929 521 et 44 929 541 du brin négatif du chromosome X humain,
- 35 -une amorce sens entre 15 et 25 paires de bases s'hybridant entre les bases 45 534 530 et 45 534 580, de préférence entre les bases 45 534 535 et 45 534 570, de manière plus préférée entre les bases 45 534 544 et 45 534 564 du brin positif du chromosome X de chimpanzé et
- 40

- 5 et
- une amorce anti-sens entre 15 et 25 paires de bases s'hybridant entre les bases 45 534 630 et 45 534 800, de préférence entre les bases 45 534 535 et 45 534 575, de manière plus préférée entre les bases 45 534 648 et 45 534 668 du brin négatif du chromosome X de chimpanzé,
 - pour UTY :
 - une amorce sens entre 15 et 25 paires de bases s'hybridant entre les bases 15 447 590 et 15 447 645, de préférence entre les bases 15 447 600 et 15 447 635, de manière plus préférée entre les bases 15 447 608 et 15 447 628 du brin négatif du chromosome Y humain et
 - une amorce anti-sens entre 15 et 25 paires de bases s'hybridant entre les bases 15 447 520 et 15 44 7 560, de préférence entre les bases 15 447 530 et 15 44 7 550, de manière plus préférée entre les bases 15 447 533 et 15 447 553 du brin positif du chromosome Y humain
 - une amorce sens entre 15 et 25 paires de bases s'hybridant entre les bases 20 860 260 et 20 860 310, de préférence entre les bases 20 860 270 et 20 860 300, de manière plus préférée entre les bases 20 860 275 et 20 860 295 du brin négatif du chromosome Y de chimpanzé et
 - une amorce anti-sens entre 15 et 25 paires de bases s'hybridant entre les bases 20 860 185 et 20 860 235, de préférence entre les bases 20 860 195 et 20 860 225, de manière plus préférée entre les bases 20 860 200 et 20 860 220 du brin positif du chromosome Y de chimpanzé.

25 Typiquement, les amorces s'hybrident dans des conditions stringentes. Par exemple, pour des amorces de 15 à 25 bp, des conditions stringentes sont une température de 55°C dans du tampon ou de 51°C dans ce même tampon pour des échantillons de prosimiens. Le tampon peut par exemple être composé de Multiplex PCR Master mix 2X comprenant des concentrations optimisées de HotStarTaq® Plus DNA Polymerase, MgCl₂, et dNTPs Mix (dATP, dCTP, dGTP, dTTP ultrapure quality) et Multiplex PCR Plus Buffer (contains 6 mM MgCl₂; pH 8.7), Q-solution 5X, CoralLoad Dye 10X, RNase-free water ultra-pure quality, PCR-grade comme dans le kit QIAGEN Multiplex PCR Plus Kit (réf : 206152).

30 Dans un mode de réalisation, l'étape d'amplification des gènes comprend l'ajout de paires d'amorces ayant les séquences nucléiques:

35 SEQ ID NO: 70 et SEQ ID NO: 66 pour SRY,
 SEQ ID NO: 67 et SEQ ID NO: 68 pour UTY
 et
 SEQ ID NO: 67 et SEQ ID NO: 69 pour UTX.

ou

40 SEQ ID NO: 65 et SEQ ID NO: 66 pour SRY,
 SEQ ID NO: 67 et SEQ ID NO: 68 pour UTY
 et

SEQ ID NO: 67 et SEQ ID NO: 69 pour UTX.

Dans un mode de réalisation préféré, l'étape d'amplification des gènes comprend l'ajout de paires d'amorces ayant les séquences nucléiques:

SEQ ID NO: 65 et SEQ ID NO: 66 pour SRY,

5

SEQ ID NO: 67 et SEQ ID NO: 68 pour UTY et

SEQ ID NO: 67 et SEQ ID NO: 69 pour UTX.

Les séquences des amorces de ce mode de réalisation préféré sont données dans le tableau 5 ci-dessous.

Marqueur	Amorce sens		Amorce anti-sens		Longueur amplifiée (bp)
	SEQ ID NO	Séquence (5'-3')	SEQ ID NO	Séquence (5'-3')	
SRY	65	gcgaaactcagagatcagcaag	66	tgtgcctcctggaagaatgg	81
UTY	67	cagtgttaccagccttaacag	68	ggcaggtctactttttagag	91
UTX			69	tctgtggactaggtttgtggt	120

Tableau 5

Ce dernier mode de réalisation du procédé de typage du sexe n'est applicable qu'à un nombre limité de primates mais elle permet d'utiliser des amplicons de très petites tailles (entre 80 et 120 bp) et donc de travailler sur de l'ADN est hautement dégradé.

L'invention sera illustrée par les figures et exemples suivants. Cependant, étant présentés à titre illustratif, ces exemples et figures ne devraient pas être interprétés de manière à limiter la portée de la présente invention.

FIGURES

La Figure 1 montre une comparaison entre la mutabilité et le pouvoir discriminant des multiplex existants et ceux de l'invention (CombYplex).

La Figure 2 montre un exemple de profil d'homme obtenu à partir du multiplex M1.

Pour chacun des profils, l'axe horizontal représente la taille des fragments d'ADN: à gauche les petites tailles, à droite les plus larges tailles. Chaque pic correspond à un marqueur STR. Chaque ligne correspond à un fluorochrome. La barre grise au-dessus de chaque pic porte le nom du marqueur situé au-dessous, et sa longueur reflète le spectre de tous les allèles attendus (polymorphisme). La place de chaque allèle potentiellement amplifié est représentée sous forme de barre grisée.

La Figure 3 montre un exemple de profil d'homme obtenu à partir du multiplex M2 combiné à un outil de sexage. Les codes de lecture sont les mêmes que précédemment.

La Figure 4 montre un exemple de profil de chimpanzé obtenu à partir du multiplex M1. Les codes de lecture sont les mêmes que précédemment.

La Figure 5 montre un exemple de profil de chimpanzé obtenu à partir du multiplex M2 combiné à un outil de sexage. Les codes de lecture sont les mêmes que précédemment

La Figure 6 représente un exemple de profil mâle avec un pic UTY, un pic UTX et un pic SRY (profil A).

- 5 La Figure 7 représente un exemple de profil mâle avec un pic UTY, un pic UTX mais pas de pic SRY (profil B).

La Figure 8 représente un exemple de profil mâle avec un pic UTX et un pic SRY mais pas de pic SRY (profil C).

La Figure 9 représente un exemple de profil femelle avec uniquement un pic UTX (profil D).

- 10 La Figure 10 représente les résultats des tests comparatifs hommes/chimpanzés sous forme de dendogramme.

La Figure 11 représente la PCA des tests comparatifs hommes/chimpanzés.

La Figure 12 représente un dendogramme des résultats obtenus lors de l'analyse des groupes patronymiques Feakes et ses dérivés, Attenborough, Starbuck et Revis.

15

EXEMPLES

EXEMPLE 1 : Détermination du profil génétique d'un sujet

Développement de séquences de référence

- 20 Une liste exhaustive des marqueurs STR du chromosome Y humain a été établie sur la base des publications disponibles à ce sujet (Goedbloed et al. 2009 ; Hanson et al. 2007 ; Ballantyne et al. 2010 ; Vermeulen et al. 2009 ; Maybruck et al. 2009 ; Hanson et al. 2012 ; Kayser et al. 2004). et complété d'un travail avec utilisation des banques de données types ncbi, ucsc, ensembl.

- 25 A partir de cette liste, une étude a été menée afin de recueillir l'ensemble des informations relatives à chaque marqueur listé, qui seraient susceptibles de renseigner sur leur potentiel discriminant (structure moléculaire, taux de mutation, localisation dans le génome, évidence de duplications, etc.).

Ces mêmes informations ont été collectées pour le chimpanzé et les marqueurs absents chez cette espèce, ou qui ne convenaient pas pour le chimpanzé, ont été éliminés.

- 30 Un classement des marqueurs en fonction de leurs taux de mutation, structure moléculaire, qualité des régions flanquantes, et autres, a été réalisé. Les marqueurs sélectionnés ont été répartis en 2 multiplexes : le M1, comprenant les marqueurs ayant un taux de mutation moyen (cf. Tableau 6A et 6B), et le M2, comprenant les marqueurs ayant un taux de mutation élevé
- 35 (cf. Tableau 7A et 7B).

GBD ID	Locus ID (Kayser et al. 2004)	Position de la bande chromosomique	Détails de localisation (rétrotransposition, gène...)	SNP dbSNP	Duplications >1000 bases (item)	Base de données de variants génomiques: variation structurelle	Nombre de copies d'après les informations sur la position chromosomique en Y (UCSC)	Nombre de copies (Kayser et al. 2004)	Complexité de l'amplicon (Kayser et al. 2004)
DYS502	Y3S60	Yq11.221	LINE1 L NLGN4Y ARNm	Pas de SNP	Pas de duplication	Pas de variant génomique	simple copie	unique	complexe
DYS575	Y4S49	Yp11.2	Alu L	Pas de SNP	Pas de duplication	Pas de variant génomique	simple copie	simple	simple
DYS588	Y5C23	Yq11.221	Alu R	Pas de SNP	Pas de duplication	Pas de variant génomique	simple copie	simple	complexe
DYS538	Y4C32	Yq11.221	aucune retransposition	rs3049738	Pas de duplication	Pas de variant génomique	simple copie	simple	complexe
DYS632	BV005731	Yq11.221	Alu R	rs112755533 rs60182015	Pas de duplication	Pas de variant génomique	simple copie	simple	simple
DYS640	Y4S38	Yq11.221	Alu L et LINE1 R	Pas de SNP	Pas de duplication	Pas de variant génomique	simple copie	simple	simple
DYS485	Y3S1	Yq11.222	Alu R et LINE1 L	rs73626958	Pas de duplication	CNV chrY 31588	simple copie	simple	simple
DYS577	Y4S54	Yq11.221	Alu R	Pas de SNP	Pas de duplication	Pas de variant génomique	simple copie	simple	complexe
DYS461/ Y-GATA-	-	Yq11.222	L1 L famille LINE	Pas de SNP	Pas de duplication	Pas de variant génomique	simple copie	simple	Simple

[illegible]

Tableau 6A

GBD ID	Type de répétition	Taux de mutation médian bayésien	Intervalle de crédibilité de bayésien à 95%	Gains/ Pertes	Total Mut.	Total Méioses
DYS502	3	3,85E-04	1.43×10^{-5} – 2.05×10^{-3}	0/0	0	1 792
DYS575	4	3,91E-04	1.47×10^{-5} – 2.09×10^{-3}	0/0	0	1 764
DYS588	5	3,92E-04	1.47×10^{-5} – 2.10×10^{-3}	0/0	0	1 747
DYS538	4	3,94E-04	1.47×10^{-5} – 2.10×10^{-3}	0/0	0	1 765
DYS632	4	3,97E-04	1.47×10^{-5} – 2.13×10^{-3}	0/0	0	1 745
DYS640	4	3,98E-04	1.41×10^{-5} – 2.16×10^{-3}	0/0	0	1 716
DYS485	3	4,04E-04	1.53×10^{-5} – 2.13×10^{-3}	0/0	0	1 730
DYS577	4	4,11E-04	1.51×10^{-5} – 2.19×10^{-3}	0/0	0	1 691

DYS461/ Y-GATA-A7.2	4	9,89E-04	1.40×10^{-4} – 3.29×10^{-3}	0/1	1	1 695
DYS578	4	9,95E-04	1.43×10^{-4} – 3.30×10^{-3}	1/0	1	1 686
DYS638	4	1,04E-03	1.47×10^{-4} – 3.45×10^{-3}	1/0	1	1 617
DYS511	4	1,52E-03	3.51×10^{-4} – 4.11×10^{-3}	1/1	2	1 760
DYS556	4	1,59E-03	3.70×10^{-4} – 4.30×10^{-3}	1/1	2	1 683
DYS565	4	2,09E-03	6.20×10^{-4} – 4.95×10^{-3}	1/2	3	1 757
DYS587	5	2,62E-03	9.16×10^{-4} – 5.75×10^{-3}	2/2	4	1 782
DYS508	4	3,03E-03	1.05×10^{-3} – 6.63×10^{-3}	2/2	4	1 544
DYS517	4	3,21E-03	1.25×10^{-3} – 6.62×10^{-3}	3/2	5	1 766
DYS643	5	1,50E-03	3.49×10^{-4} – 4.05×10^{-3}	2/0	2	1 773

Tableau 6B

GBD ID	Locus ID (Kayser et al. 2004)	Position de la bande chromosomique	Détails de localisation (rétrotransposition, gène...)	SNP dbSNP	Duplications >1000 bases (item)	Base de données de variants génomiques: variation structurale	Nombre de copies d'après les informations sur la position chromosomique en Y (UCSC)	Nombre de copies (Kayser et al. 2004)	Complexité de l'amplicon (Kayser et al. 2004)
Y-GATA-A10	-	Yq11.221	aucun	rs10551136 rs34876041	Pas de duplication	Pas de variant génomique	simple copie	simple	Complexe
DYS541	Y4C36	Yq11.221	LINE1 R	rs72289870 rs149616794 rs13303915	Pas de duplication	Pas de variant génomique	simple copie	simple	Complexe
DYS549	Y4C52	Yq11.222	LINE1 L and R	rs72132766 rs35436436	Pas de duplication	CNV chrY 31588	simple copie	simple	Simple
DYS481	Y3C59	Yp11.2	aucun	rs34406695	Pas de duplication	Pas de variant génomique	simple copie	simple	Simple
DYS533	Y4C215	Yq11.221	aucun (near another Y-STR)	rs72167351 rs10546066 rs59597498 rs72017788	Pas de duplication	Pas de variant génomique	simple copie	simple	Simple

DYS444	Y4C37	Yq11.221	Tigger2a DNA R	rs78310168 rs3052654	Pas de duplication	Pas de variant génomique	simple copie	simple	Complexe
DYS510	Y4C113	Yq11.221	aucun (mais près d'une autre répétition simple)	Pas de SNP	Pas de duplication	Pas de variant génomique	simple copie	simple	Complexe
DYS513	Y4C116	Yq11.221	aucun	rs35947421 rs35984406 rs34990939	Pas de duplication	Pas de variant génomique	simple copie	simple	Complexe
DYS460/ Y-GATA- A7.1	-	Yq11.222	(L1 R famille LINE)	rs72164979	Pas de duplication	Pas de variant génomique	simple copie	simple	Simple
DYS458	-	Yp11.2	Alu L et R	Pas de SNP	Pas de duplication	CNV chrY 4180	simple copie but variants reported STRbase and YHRD	-	-
DYS442	-	Y11q21	LINE1 L et R	rs34353940	Pas de duplication	Pas de variant génomique	simple copie	-	-
DYS570	Y4S4	Yp11.2	5'UTR du gène TBL1Y (codant pour une protéine)	Pas de SNP	Pas de duplication	Pas de variant génomique	simple copie	simple	Simple
DYS576	Y4S5	Yp11.2	Alu L	Pas de SNP	Pas de duplication	Pas de variant génomique	simple copie	simple	Simple

DYS612	Y3C22	Yq11.221	aucun	Pas de SNP	Pas de duplication	Pas de variant génomique	simple copie	simple	Complexe
--------	-------	----------	-------	------------	--------------------	--------------------------	--------------	--------	----------

Tableau 7A

GBD ID	Type de répétition	Taux de mutation médian bayésien	Intervalle de crédibilité de bayésien à 95%	Gains/ Pertes	Total Mut.	Total Métoses
Y-GATA-A10	4	3,32E-03	1.25×10^{-3} – 6.80×10^{-3}	3/2	5	1 713
DYS541	4	3,92E-03	1.65×10^{-3} – 7.68×10^{-3}	2/4	6	1 700
DYS549	4	4,55E-03	2.05×10^{-3} – 8.58×10^{-3}	1/6	7	1 684
DYS481	3	4,97E-03	2.36×10^{-3} – 9.03×10^{-3}	3/5	8	1 744
DYS533	4	5,01E-03	2.39×10^{-3} – 9.11×10^{-3}	4/4	8	1 730
DYS444	4	5,45E-03	2.68×10^{-3} – 9.65×10^{-3}	3/6	9	1 775
DYS510	4	5,99E-03	3.09×10^{-3} – 1.03×10^{-2}	4/6	10	1 779

DYS513	4	6,09E-03	3.14×10^{-3} – $1.05\text{E-}02$	6/4	10	1 751
DYS460/ Y-GATA-A7.1	4	6,22E-03	3.19×10^{-3} – $1.07\text{E-}02$	2/8	10	1 717
DYS458	4	8,36E-03	4.80×10^{-3} – $1.34\text{E-}02$	7/7	14	1 756
DYS442	4	9,78E-03	5.59×10^{-3} – $1.57\text{E-}02$	2/12	14	1 497
DYS570	4	1,24E-02	7.52×10^{-3} – $1.91\text{E-}02$	8/9	17	1 426
DYS576	4	1,43E-02	9.41×10^{-3} – $2.07\text{E-}02$	12/12	24	1 727
DYS612	3	1,45E-02	9.61×10^{-3} – $2.09\text{E-}02$	11/14	25	1 767

Tableau 7B

Conception des amorces des multiplexes.

- Le schéma théorique des 2 multiplexes a été réalisé, en organisant les marqueurs par ligne (1 ligne = 1 fluorochrome) en fonction de leurs tailles afin d'assurer une bonne distribution des marqueurs sur le range de taille fixé (de 80 à 350 bp).
- 5 L'alignement des séquences d'environ 500 bp autour du marqueur homme-chimpanzé a été réalisé pour chaque marqueur. Un couple d'amorces capables d'amplifier le marqueur STR pour les 2 espèces, et pour une taille donnée (proche) a été sélectionné. Les amorces ont été modifiées jusqu'à ce que le schéma théorique désigné soit atteint/obtenu, et dans le cas où ce
- 10 n'était pas possible, le schéma théorique a été modifié jusqu'à obtenir satisfaction.
- Pour chaque marqueur, une amplification a été réalisée en utilisant les amorces froides pour un individu mâle et un individu femelle, pour l'homme et le chimpanzé, afin de voir si une bande à la taille attendue était obtenue, et surtout si celle-ci était unique afin d'éviter les a-spécificités et duplications qui n'auraient pas été reportées ou détectées jusque-là. Les
- 15 amorces ont été remodifiées jusqu'à atteindre satisfaction.
- Une fois tous les marqueurs testés indépendamment, ils ont été multiplexés par ligne (c.à.d. par fluorochrome) afin de détecter des interactions potentielles.
- Les marqueurs ont ensuite été testés marqués ('chauds'), et à nouveau une amplification a été réalisée en utilisant les amorces chaudes pour un individu mâle et un individu femelle, pour
- 20 l'homme et le chimpanzé, afin de voir si nous obtenions une bande à la taille attendue, et surtout si celle-ci était unique afin d'éviter les a-spécificités et duplications. Les amorces ont été remodifiées jusqu'à atteindre satisfaction.
- Un multiplexage final a été réalisé, incluant la totalité des marqueurs et les concentrations ont été ajustées jusqu'à obtenir un multiplex équilibré.
- 25 La même opération a été répétée pour le deuxième multiplex.
- En parallèle, chaque marqueur a été séquencé afin d'établir une correspondance entre taille de l'amplicon par génotypage et le nombre réel de répétitions correspondant à cette taille.
- Le tableau 8A ci-dessous récapitule les informations sur les 18 marqueurs du 1^{er} multiplex M1 pour des échantillons humains.
- 30 Le tableau 8B ci-dessous récapitule les informations sur les 18 marqueurs du 1^{er} multiplex M1 pour des échantillons de chimpanzés.
- Le tableau 9A ci-dessous récapitule les informations sur les 14 marqueurs du 2nd multiplex M2 et pour les marqueurs de sexage (SRY, UTY et UTX) pour des échantillons humains.
- Le tableau 9B ci-dessous récapitule les informations sur les 14 marqueurs du 2nd multiplex M2 et pour les marqueurs de sexage (SRY, UTY et UTX) pour des échantillons de chimpanzés.
- 35

Marqueur	Fluorochrome					ADN humain control (fx)			Dédit de la littérature uniquement		
		Séquence (5'-3')	Tm (°C)	[μM] ^o	Séquence (5'-3')	Tm (°C)	[μM] ^o	Allèle (nb unités répétées)	Taille amplicon (bp)	Gamme allélique (nb unités répétées)	Gamme de taille ampliconique attendue (bp)
DYS485	FAM	catataacaaaattgaatgtgtactcc SEQ ID NO : 1	57,3	0,5	agcctgggtgacaagagtgtatac SEQ ID NO : 2	58,7	0,5	16	121	12-22	109-139
DYS588	FAM	Gaatgcagaacccctcaagga SEQ ID NO : 3	60,2	0,18	agcctgggtgacagaaacac SEQ ID NO : 4	60,2	0,18	12	151	9-16	136-171
DYS502	FAM	Cagcaagccaccataccata SEQ ID NO : 5	59,6	0,25	tgtgctttggagtttgag SEQ ID NO : 6	58,9	0,25	8	206	6-9	200-209
DYS461	FAM	aatacataataaatgataggcagagga SEQ ID NO : 7	57,9	0,6	gagagctgaataagttgtatcaggtaa SEQ ID NO : 8	58,6	0,6	11	257	8-13	245-265
DYS638	FAM	Ttctaatttcagtgcttcaatttc SEQ ID NO : 9	59,3	1,2	aggtagggtcatgaggctcagt SEQ ID NO : 10	59,4	1,2	11	312	8-13	300-320
DYS643	VIC	Aagccatgcctgggttaactac SEQ ID NO : 11	59,6	0,1	accaaaccaccaccattcc SEQ ID NO : 12	60,5	0,1	10	136	8-13	126-151
DYS587	VIC	Cttcttggaagtagcatttc SEQ ID NO : 13	58,1	0,8	aaagtctgacaatgagaagggtttcaagttcagg SEQ ID NO : 14	68,9	0,8	11	198	8-16	183-223
DYS575	VIC	cagaggttcagtaagcttagatca SEQ ID NO : 15	60,3	0,3	catgatgggttaggttga SEQ ID NO : 16	59,9	0,3	10	263	8-12	255-271
DYS578	VIC	Gagggcgaacttcagtgag SEQ ID NO : 17	60,0	0,5	cagaagtcacctgtgttcaa SEQ ID NO : 18	60,1	0,5	9	313	7-10	305-317
DYS632	NED	Cacagtttcagttgtcatgg SEQ ID NO : 19	59,3	0,09	tctgggcaacaagaaggagac SEQ ID NO : 20	60,4	0,09	9	107	8-10	103-111

DYS508	NED	Acaatggcaatcccaaatc SEQ ID NO : 21	59,6	0,4	gaacaataagtggtgatgat SEQ ID NO : 22	59,1	0,4	11	174	8-15	162-190
DYS640	NED	Ggaataaacatgagatcctgic SEQ ID NO : 23	59,8	0,2	aagccggttcataatttaagac SEQ ID NO : 24	57,9	0,2	11	258	9-13	250-266
DYS511	NED	Tgggtggatgtgtaggtaga SEQ ID NO : 25	60,2	0,3	tcgtgtgtgcttagatttga SEQ ID NO : 26	59,7	0,3	10	308	9-14	304-324
DYS577	PET	Ttttctacgtgtgtatccacaaacc SEQ ID NO : 27	59,8	0,15	gtgtcccccagccctgtta SEQ ID NO : 28	59,5	0,15	9	103	8-11	99-111
DYS556	PET	Tcaccaatgacattttacagca SEQ ID NO : 29	59,1	0,6	tgtgttagtgaatgcacccag SEQ ID NO : 30	57,7	0,6	11	168	8-12	156-172
DYS517	PET	Aactgaccagcaaaaaatgttaaa SEQ ID NO : 31	57,9	0,5	tgctgagacctacacagattgc SEQ ID NO : 32	57,1	0,5	13	219	10-18	207-239
DYS565	PET	Ccaggaagcagtggtgcat SEQ ID NO : 33	59,8	0,3	gcagttctgcctgtatgg SEQ ID NO : 34	58,5	0,3	12	290	9-14	278-298
DYS538	PET	Tggggaaacacagatgggt SEQ ID NO : 35	60,2	1,7	ccaaataccatcataggaaaga SEQ ID NO : 36	59,2	1,7	10	343	9-13	339-355

Tableau 8A : informations sur les 18 marqueurs du Multiplex M1 pour des échantillons humains.

Marqueur	Fluorochrome				Chimpanzé DNA control (301)			Dédit de la littérature uniquement			
		Séquence (5'-3')	Tm (°C)	[μM]	Séquence (5'-3')	Tm (°C)	[μM]	Allèle (en nb unités répétées)	Taille amplicon (bp)	Gamme de taille amplicon attendue (bp)	
DYS485	FAM	catatacaaaaattgaatgtactcc	57,3	0,5	agcctgggtgacaagagtattac	58,7	0,5	14	115	8-15	97-118

		SEQ ID NO : 1		SEQ ID NO : 2							
DYS588	FAM	gaatgcagaacctcaagga SEQ ID NO : 3	60,2	0,18	agcctgggtgacagaaacac SEQ ID NO : 4	60,2	0,18	13	173	12-15	168-183
DYS502	FAM	cagcaagccaccataccata SEQ ID NO : 5	59,6	0,25	tgtgctttggagttggag SEQ ID NO : 6	58,9	0,25	13	227	9-14	215-230
DYS461 / Y-GATA- A7.2	FAM	aatacataataaatgataggcagagga SEQ ID NO : 7	57,9	0,6	gagagctgaataagttgtatcaggtaa SEQ ID NO : 8	58,6	0,6	10	257	9-12	253-265
DYS638	FAM	ttctaatttcagtgcttcaatttc SEQ ID NO : 9	59,3	1,2	aggtaggtcatgagggtcagt SEQ ID NO : 10	59,4	1,2	10	308	8-12	300-316
DYS643	VIC	aagccatgacctggttaactac SEQ ID NO : 11	59,6	0,1	accaaacaccaccattcc SEQ ID NO : 12	60,5	0,1	3	91	3-6	91-106
DYS587	VIC	ctcttggaaagtagcatttc SEQ ID NO : 13	58,1	0,8	aaagtctgacaatgagaagggttctaagttcagg SEQ ID NO : 14	68,9	0,8	9	161	6-16	146-196
DYS575	VIC	cagaggttcagtaagcttagatca SEQ ID NO : 15	60,3	0,3	catgatgggttaggtga SEQ ID NO : 16	59,9	0,3	7	264	7-8	264-268
DYS578	VIC	gaggcggaaacttcagtga SEQ ID NO : 17	60,0	0,5	cagaagtcctcctgtgttcaa SEQ ID NO : 18	60,1	0,5	9	305	7-10	297-309
DYS632	NED	cacagtttcagttctgtatgg SEQ ID NO : 19	59,3	0,09	tcctgggcaacagaaggagac SEQ ID NO : 20	60,4	0,09	10	103	8-11	95-107
DYS508	NED	acaatggcaatcccaattc SEQ ID NO : 21	59,6	0,4	gaacaataaagggtgggaaggat SEQ ID NO : 22	59,1	0,4	11	212	9-14	204-224
DYS640	NED	ggaaaaaccatgagatcctgtc SEQ ID NO : 23	59,8	0,2	aagcccggtcataatttaagac SEQ ID NO : 24	57,9	0,2	6	262	6-7	262-266
DYS511	NED	tgggtggatgttaggtaga SEQ ID NO : 25	60,2	0,3	tcctggttgaccttagattga SEQ ID NO : 26	59,7	0,3	9	316	5-10	300-320

DYS577	PET	ttttctacgtgtgtatccactaac SEQ ID NO : 27	59,8	0,15	gtgtccaccagccctgtta SEQ ID NO : 28	59,5	0,15	8	91	6-11	83-103
DYS556	PET	tcaccaatgacattttacagca SEQ ID NO : 29	59,1	0,6	ttggttagtgaatgcattccag SEQ ID NO : 30	57,7	0,6	4	136	4-5	136-140
DYS517	PET	aactgaccagcaaaaatgttaaa SEQ ID NO : 31	57,9	0,5	tgtctgagaccctacaagattgc SEQ ID NO : 32	57,1	0,5	11	182	10-18	178-210
DYS565	PET	ccagggaagcagttgtgcat SEQ ID NO : 33	59,8	0,3	gcagttctctgcctgtatgg SEQ ID NO : 34	58,5	0,3	6	266	5-9	262-278
DYS538	PET	tggggaacacagatgggtg SEQ ID NO : 35	60,2	1,7	ccaaataccatcataggaagaa SEQ ID NO : 36	59,2	1,7	6	327	5-8	323-335

Tableau 8B : Informations sur les 18 marqueurs du Multiplex M1 pour des échantillons de chimpanzés.

Marqueur						ADN humain control (fx)			Déduit de la littérature uniquement	
	Fluorochrome	Séquence (5'-3')	Tm (°C)	[μM] [°]	Séquence (5'-3')	Allèle (nb unités répétées)	Taille amplicon (bp)	Gamme allélique (nb unités répétés)	Gamme de taille ampliconique attendue (bp)	
SRY	FAM	gcgaacacagagatcagcaag SEQ ID NO : 65	60,1	0,08	tgtagcctctcggagaatgg SEQ ID NO : 66		81			
UTY	FAM	cagtgtaaccagccttaacag SEQ ID NO : 67	53,7	0,2	ggcaggctctactttgttagag SEQ ID NO : 68		91			
UTX	FAM				tctgtggactaggtttgtgtg SEQ ID NO : 69		120			

Y-GATA-A10	FAM	cctgccatctctatttattcttgcata SEQ ID NO : 37	61,9	0,26	ataaatggagatagtggtggatt SEQ ID NO : 38	59,1	0,26	13	163	9-16	147-175
DYS570	FAM	tgtgacatcaagggtatgaacg SEQ ID NO : 39	59,9	0,29	gggaaaattattcagcatagcaag SEQ ID NO : 40	59,5	0,29	18	229	14-24	213-253
DYS549	FAM	gaaagaaaagtgaagccaaacc SEQ ID NO : 41	59,6	0,95	tftgggcataagtggttaag SEQ ID NO : 42	59,8	0,95	12	299	9-15	287-311
DYS460	VIC	atctctgcctatcatttattatgt SEQ ID NO : 43	57,1	0,4	gaataccagaggaaatctgacacc SEQ ID NO : 44	59,0	0,4	12	113	8-13	97-117
DYS442	VIC	tgcataatcacggaaaccaa SEQ ID NO : 45	61	0,15	caagccacitgcaaaigtca SEQ ID NO : 46	59,4	0,15	12	181	9-16	169-197
DYS510	VIC	ttttctcccttaccacaga SEQ ID NO : 47	58,7	0,48	tcggagaagacagaaactgtca SEQ ID NO : 48	59,1	0,48	11	250	9-15	242-266
DYS541	VIC	catcataattctctgttcatccat SEQ ID NO : 49	58,8	0,45	tggataaagaacaccttaagaagc SEQ ID NO : 50	59,3	0,45	12	318	10-15	310-330
DYS576	NED	ccaagcaacatagcaagacct SEQ ID NO : 51	59,4	0,13	aagcgtattgtctgtgcttt SEQ ID NO : 52	59,4	0,13	19	123	13-22	99-135
DYS513	NED	tgtgtaaaaatgactactgtgtatg SEQ ID NO : 53	58,6	0,22	ccacatcagcacatctactactca SEQ ID NO : 54	58,9	0,22	12	306	9-15	294-318
DYS458	NED	tgggtgtgagaggtactgt SEQ ID NO : 55	60,3	0,12	cccaagttctggcattacaa SEQ ID NO : 56	60,0	0,12	18	205	11-24	177-229
DYS481	PET	aggaatgtgctaacgctgt SEQ ID NO : 57	59,8	0,2	accagaaggtgtcaagactca SEQ ID NO : 58	59,9	0,2	22	122	18-32	110-152
DYS612	PET	ccccatgccagtaagaata SEQ ID NO : 59	59,8	1,25	tggaggaaaggcaaaagaaaa SEQ ID NO : 60	59,8	1,25	26	208	19-31	187-223
DYS444	PET	catagaatgaaagggtgaacca SEQ ID NO : 61	59,0	0,45	tgcattcaaacactcaagttg SEQ ID NO : 62	60,7	0,45	12	265	9-16	253-281

DYS533	PET	attcatctaacatcttctgcatctacc SEQ ID NO : 63	58,2	0,95	tttaacttgcccttttgcattcc SEQ ID NO : 64	59,2	0,95	12	347	9-14	335-355
--------	-----	---	------	------	---	------	------	----	-----	------	---------

Tableau 9A : Informations sur les 14 marqueurs du multiplex M2 et pour SRY, UTY et UTX pour des échantillons humains.

Marqueur	Fluorochrome							Réf. Chimpanzé NC_00024.9 (UCSC)		Dérivé de la littérature uniquement	
		Séquence (5'-3')	T _m (°C)	[μM] [°]	Séquence (5'-3')	T _m (°C)	[μM] [°]	Allèle (nb unités répétées)	Taille amplicon (bp)	Gamme allélique (nb unités répétées)	Gamme de taille ampliconique attendue (bp)
SRY	FAM	gcgaactcagagatcagaag SEQ ID NO : 65	60,1	0,08	tgtgcctctggaagaatgg SEQ ID NO : 66	61,9	0,08		81		
UTY	FAM	cagtgtaaccagccttaacag SEQ ID NO : 67	53,7	0,2	ggcaggctactctttagag SEQ ID NO : 68	52	0,1		91		
UTX	FAM				tctgtggactaggtttggt SEQ ID NO : 69	55,6	0,11		120		
Y-GATA- A10	FAM	cctgccatctctatttcttgcata SEQ ID NO : 37	61,9	0,26	alaaatggagatagtggtgatt SEQ ID NO : 38	59,1	0,26	4	130	NA	NA
DYS570	FAM	tgtgacatcaagggtatgaaaag SEQ ID NO : 39	59,8	0,29	ggtgaaaattatcagcatagtcagg SEQ ID NO : 40	60,5	0,29	4	176	4	176
DYS549	FAM	gaaagaaaagtgtgaagccaaaacc SEQ ID NO : 41	59,6	0,95	tttggggcataagtgtgaatg SEQ ID NO : 42	59,8	0,95	8	283	NA	NA
DYS460	VIC	atctctgcctatcatttatgtat SEQ ID NO : 43	57,1	0,4	gaataccagaggaaatctgacacc SEQ ID NO : 44	59,0	0,4	10	105	NA	NA
DYS442	VIC	tgcataatcacggaaccaa	59,7	0,15	caagccactgcaaatgtca	60,1	0,15	11	189	NA	NA

DYS510	VIC	SEQ ID NO : 45 ttttctccttaaccacaga SEQ ID NO : 47	58,7	0,48	SEQ ID NO : 46 tctggaagaacagaaacttgta SEQ ID NO : 48	59,1	0,48	11	236	9-11	-228-236
DYS541	VIC	catcataattctctgttcatcat SEQ ID NO : 49	58,8	0,45	tggataaagaacaccttaagaagc SEQ ID NO : 50	59,3	0,45	11	354	10-11	350-354
DYS576	NED	ccaagcaacatagcaagaact SEQ ID NO : 51	59,4	0,13	aagcgatttctgtgctttt SEQ ID NO : 52	59,4	0,13	3	73	3	73
DYS513	NED	tgttgtaaaatgactactgtgtatg SEQ ID NO : 53	59,4	0,22	ccacatcagcactattacttaactca SEQ ID NO : 54	60,9	0,22	25	351	NA	NA
DYS458	NED	tgggtggagggttactgt SEQ ID NO : 55	60,3	0,12	cccaaaagttcggcattacaa SEQ ID NO : 56	60,0	0,12	25	275	NA	NA
DYS481	PET	aggaaatgggtaacgctgt SEQ ID NO : 57	59,8	0,2	accagaaggttgcaagactca SEQ ID NO : 58	59,9	0,2	-	-	-	-
DYS612	PET	cccccagccagtaagaata SEQ ID NO : 59	59,8	1,25	tgggggaaggcacaagaata SEQ ID NO : 60	59,8	1,25	21	209	7-26	182-223
DYS444	PET	catagaatgaagggtgaacca SEQ ID NO : 61	59,0	0,45	tgcattcaaacctcagcttg SEQ ID NO : 62	60,7	0,45	14	262	NA	NA
DYS533	PET	attcatcaacatcttgcatacc SEQ ID NO : 63	58,2	0,95	ttaactgccttttgcatacc SEQ ID NO : 64	59,2	0,95	-	-	-	-

Tableau 9B : Informations sur les 14 marqueurs du multiplex M2 pour des échantillons de chimpanzés (NA pour non disponible)

Test des multiplexes M1 et M2 sur hommes et chimpanzés: choix des échantillons afin de maximiser la variabilité génétique observée.

Un panel d'échantillons de 13 hommes et de 11 chimpanzés ont été testés. Ils ont été génotypés avec les 2 multiplexes afin d'obtenir une idée de la variabilité génétique détectée (i.e. allèles) pour les multiplexes M1 et M2, pour les hommes et les chimpanzés.

Les hommes proviennent de différents pays et sont donc susceptibles de présenter profils génétiques très différents – ceci devrait permettre d'obtenir une variabilité génétique maximale et d'avoir une idée des gammes d'allèles attendus. Les chimpanzés proviennent eux de divers zoos et collections, afin d'éviter les effets de consanguinité, et de la même façon, de maximiser nos chances d'obtenir des profils différents.

Résultats:

Le degré de polymorphisme (variabilité) des marqueurs inclus dans les 2 multiplexes, a été estimé pour le panel. Les résultats sont donnés dans le tableau 10 pour M1, dans le tableau 11 pour M2 et dans le tableau 12 pour l'outil de sexage. On observe bien que le nombre d'allèles et la variance est en accord avec les taux de mutations prédits pour M1 et M2, à savoir une variance plus importante pour M2 (fort taux de mutation) que pour M1.

M1	DYS485		DYS588		DYS502		DYS461		DYS638		DYS643		DYS587		DYS575		DYS578	
	Allèle	Taille	Allèle	Taille	Allèle	Taille	Allèle	Taille	Allèle	Taille	Allèle	Taille	Allèle	Taille	Allèle	Taille	Allèle	Taille
Echantillons																		
Hum_FX	16	121,56	12	151,22	8	206,23	11	257,67	11	312,5	10	136,35	11	198	10	263,88	9	313,79
Hum_20FT	16	121,65	13	156,31	8	206,26	11	257,64	9	304,39	11	141,46	11	198,05	10	263,84	8	309,61
Hum_21PF	16	121,57	12	151,26	8	206,25	10	253,69	11	312,48	10	136,4	12	203,01	10	263,9	8	309,61
Hum_28IT	18	127,69	15	166,37	8	206,27	12	261,59	11	312,49	10	136,39	14	212,9	10	263,83	7	305,57
Hum_29AH	16	121,71	13	156,29	8	206,24	10	253,71	11	312,5	9	131,43	11	198,01	10	263,87	8	309,65
Hum_31OL	16	121,55	12	151,18	8	206,19	11	257,68	11	312,5	10	136,36	11	198,01	10	263,87	9	313,71
Hum_34AHB	15	118,58	12	151,25	8	206,24	11	257,62	11	312,44	11	141,58	15	218,03	10	263,86	8	309,61
Hum_35JN	16	121,68	13	156,25	8	206,25	11	257,64	9	304,34	9	131,35	11	198,04	10	263,8	8	309,61
Hum_38ME	16	121,58	18	181,44	8	206,26	10	253,69	9	304,39	11	141,46	11	198,13	10	263,85	8	309,61
Hum_39TB	13	112,51	13	156,37	8	206,3	11	257,77	12	316,7	12	146,72	11	198,12	10	263,93	8	309,58
Hum_40EH	17	124,61	12	151,27	8	206,29	11	257,71	11	312,54	10	136,38	11	198,12	10	263,86	9	313,71
Hum_43PF	14	115,63	13	156,34	8	206,3	11	257,7	11	312,46	12	146,61	11	198,03	10	263,89	8	309,55
Hum_45AMB	16	121,67	13	156,36	8	206,25	12	261,62	11	312,54	12	146,67	16	222,87	10	263,82	8	309,63
Hum_Cesar	16	121,78	13	156,08	8	206,27	11	257,59	11	312,46	12	146,8	11	198,02	10	263,73	8	309,67
Chimp_103	14	115,66	13	173,92	13	227,35	10	257,61	10	308,6	3	91,2	9	161,12	7	264,66	9	305,08
Chimp_211	14	115,55	13	173,96	13	227,34	10	257,7	10	308,7	3	91,19	9	161,14	7	264,74	10	309,21
Chimp_253	14	115,6	13	173,93	13	227,41	11	261,61	10	308,65	3	91,14	9	161,21	7	264,75	9	305,06
Chimp_273	15	118,64	12	168,77	13	227,39	11	261,61	10	308,69	3	91,18	9	161,07	7	264,7	10	309,13
Chimp_295	14	115,62	13	173,99	13	227,37	10	257,62	10	308,7	3	91,18	9	161,14	7	264,68	9	305,09
Chimp_301	14	115,62	13	173,96	12	224,42	11	261,62	10	308,69	3	91,19	9	161,14	7	264,7	10	309,12
Chimp_367	13	112,49	13	173,94	13	227,33	10	257,68	10	308,61	3	91,18	9	161,15	7	264,71	9	305,07
Chimp_61A	14	115,62	13	173,99	12	224,31	10	257,64	10	308,65	3	91,27	9	161,06	7	264,65	9	305,13
Chimp_Sg229	14	115,62	13	173,94	13	227,33	10	257,68	10	308,65	3	91,15	9	161,15	7	264,65	9	305,07
Chimp_Sg369	14	115,63	13	173,94	13	227,32	10	257,75	10	308,67	3	91,18	9	161,15	7	264,78	10	309,17
Chimp_SgC1	15	118,64	15	184,3	13	227,39	11	261,6	10	308,59	3	91,21	9	161,13	7	264,72	9	305,02
Chimp_202	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

[illegible]

M1	DYS632		DYS508		DYS640		DYS511		DYS577		DYS556		DYS517		DYS565		DYS538	
	Allèle	Taille	Allèle	Taille	Allèle	Taille	Allèle	Taille	Allèle	Taille	Allèle	Taille	Allèle	Taille	Allèle	Taille	Allèle	Taille
Echantillons																		
Hum_FX	9	107,53	11	174,67	11	258,38	10	308,66	9	103,35	11	168,36	13	219,11	12	290,16	10	343,69
Hum_20FT	8	103,44	12	178,73	11	258,43	10	308,67	9	103,28	10	164,36	12	215,2	11	286,25	9	339,72
Hum_21PF	9	107,57	11	174,7	11	258,43	10	308,67	9	103,28	11	168,34	16	230,56	13	293,99	10	343,73
Hum_28IT	8	103,45	11	174,72	12	262,31	11	312,63	9	103,37	10	164,42	15	226,61	12	290,06	9	339,72
Hum_29AH	8	103,47	11	174,74	12	262,29	9	304,63	9	103,31	11	168,28	12	215,17	11	286,19	10	343,71
Hum_31OL	9	107,56	11	174,69	12	262,29	10	308,66	9	103,33	10	164,39	15	226,7	12	290,12	10	343,71
Hum_34AHB	9	107,6	12	178,83	11	258,39	10	308,62	8	99,22	12	172,28	15	226,66	12	290,05	10	343,68
Hum_35JN	8	103,5	12	178,83	12	262,32	9	304,61	9	103,35	11	168,31	16	230,39	11	286,15	10	343,64
Hum_38ME	8	103,44	11	174,66	12	262,25	9	304,75	9	103,36	10	164,4	13	219,18	11	286,33	9	339,72
Hum_39TB	8	103,41	10	170,59	11	258,42	10	308,71	9	103,33	10	164,39	13	219,18	11	286,3	10	343,76
Hum_40EH	9	107,52	11	174,74	11	258,43	10	308,7	9	103,29	10	164,47	14	223,02	12	290,16	10	343,76
Hum_43PF	8	103,42	11	174,7	12	262,28	9	304,71	9	103,34	10	164,43	14	222,96	11	286,28	10	343,71
Hum_45AMB	8	103,48	11	174,79	11	258,42	11	312,69	9	103,32	11	168,36	16	230,6	11	286,33	11	347,71
Hum_Cesar	8	103,51	12	178,98	11	258,42	10	308,56	9	103,43	11	168,27	12	215,9	11	285,99	10	343,69
Chimp_103	10	103,27	11	212,03	6	262,29	9	316,52	8	90,88	4	136,8	11	182,24	6	266,52	6	327,79
Chimp_211	10	103,22	10	207,97	6	262,26	9	316,59	8	90,95	4	136,82	14	193,89	6	266,57	6	327,79
Chimp_253	11	107,38	10	207,97	6	262,27	10	320,73	8	90,9	4	136,82	12	186,13	6	266,65	6	327,77
Chimp_273	10	103,27	10	207,96	6	262,28	9	316,62	8	90,94	4	136,79	11	182,29	6	266,53	6	327,77
Chimp_295	10	103,21	11	212	6	262,34	9	316,59	8	90,94	4	136,83	11	182,28	6	266,57	6	327,77
Chimp_301	10	103,24	12	216,13	6	262,28	10	320,74	8	90,95	4	136,8	10	178,42	6	266,62	6	327,77
Chimp_367	10	103,26	11	212,06	6	262,21	11	324,86	8	90,86	4	136,82	11	182,29	6	266,62	6	327,86
Chimp_61A	11	107,4	10	207,98	6	262,33	7	308,51	8	90,95	4	136,78	13	189,94	6	266,54	6	327,7

[illegible]

Tableau 10

M2	Y_GATA_A10		DYS570		DYS549		DYS460		DYS442	
Echantillons	Allèle	Taille	Allèle	Taille	Allèle	Taille	Allèle	Taille	Allèle	Taille
Hum_FX	13	163,55	18	229,95	12	299,49	12	113,52	12	181,39
Hum_20FT	12	159,45	15	217,57	12	299,49	10	105,19	11	177,4
Hum_21PF	14	167,59	20	238,12	12	299,56	11	109,41	13	185,44
Hum_28IT	12	159,45	18	229,93	12	299,56	10	105,18	13	185,48
Hum_29AH	13	163,56	18	229,88	13	303,43	10	105,23	11	177,4
Hum_31OL	13	163,6	17	225,85	13	303,47	10	105,28	12	181,45
Hum_34AHB	13	163,53	16	221,7	12	299,49	11	109,39	13	185,44
Hum_35JN	12	159,46	18	229,83	13	303,47	10	105,29	11	177,27
Hum_38ME	12	159,46	16	221,77	12	299,42	11	109,42	11	177,36
Hum_39TB	13	163,52	18	229,84	12	299,63	11	109,29	12	181,41
Hum_40EH	12	159,44	17	225,8	12	299,63	11	109,33	12	181,42
Hum_43PF	12	159,36	19	233,99	12	299,7	11	109,36	12	181,49
Hum_45AMB	12	159,44	22	246,47	11	295,64	11	109,34	12	181,42
Hum_César	13	163,63	18	229,95	13	303,46	10	105,17	12	181,43
Chimp_103	4	130,85	4	176,18	8	283,6	10	105,08	11	189,51
Chimp_211	4	130,8	4	176,06	10	291,54	10	105,05	11	189,48
Chimp_253	4	130,79	4	176,11	8	283,53	9	100,82	11	189,53
Chimp_273	4	130,75	4	176,16	8	283,55	11	109,15	11	189,47
Chimp_295	4	130,83	4	176,17	8	283,56	10	105,01	11	189,54
Chimp_367	4	130,84	4	176,19	9	287,58	10	104,98	11	189,47
Chimp_61A	4	130,84	4	176,11	8	283,61	11	109,18	10	185,5
Chimp_Sg229	4	130,73	4	176,18	8	283,62	10	105,03	11	189,51
Chimp_Sg369	4	130,82	4	176,19	10	291,66	10	104,99	11	189,55
Chimp_SgC1	4	130,85	4	176,19	8	283,59	11	109,13	12	193,61
Chimp_202 (femelle/contrôle)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Nb allèles Ho Gamme allélique	3 12-14		7 15-22		3 11-13		3 10-12		3 11-13	
Nb allèles Chz Gamme allélique	1 (4)		1 (4)		2 8-10		3 9-11		3 10-12	

M2	DYS510		DYS541		DYS576		DYS458		DYS513		DYS481		DYS612		DYS444		DYS533	
	Allèle	Taille	Allèle	Taille	Allèle	Taille	Allèle	Taille	Allèle	Taille	Allèle	Taille	Allèle	Taille	Allèle	Taille	Allèle	Taille
Hum_FX	11	250,07	12	318,17	19	123,6	18	205,06	12	306,37	22	122,76	26	208,39	12	265,52	12	347,68
Hum_20FT	11	250,15	11	314	17	116,01	16	197,55	13	310,36	19	113,84	26	208,38	12	265,59	11	343,7
Hum_21PF	13	258,09	12	318,15	18	119,85	15	193,74	12	306,29	23	125,7	25	205,33	14	273,63	12	347,74
Hum_28IT	11	250,15	13	322,24	15	108,19	15	193,79	13	310,36	22	122,77	27	211,41	12	265,59	12	347,74
Hum_29AH	12	254,09	11	314	18	119,85	18,2	207,01	12	306,3	26	134,69	25	205,26	12	265,6	12	347,75
Hum_31OL	11	250,15	12	318,2	19	123,65	16	197,5	12	306,31	22	122,81	24	202,26	12	265,62	12	347,7
Hum_34AHB	10	246,05	12	318,2	16	112,1	16	197,49	12	306,31	26	134,65	25	205,34	13	269,59	11	343,67
Hum_35JN	12	254,04	12	318,12	17	116,01	16,2	199,32	11	302,24	25	131,7	29	217,6	12	265,61	11	343,67
Hum_38ME	12	254,08	12	318,2	18	119,77	16	197,44	13	310,36	23	125,74	25	205,32	12	265,57	13	351,81
Hum_39TB	11	250,15	13	322,26	16	112,14	15	193,8	12	306,25	26	134,66	23	199,15	13	269,66	11	343,66
Hum_40EH	11	250,23	12	318,13	18	119,92	17	201,54	13	310,29	22	122,73	25	205,23	12	265,62	12	347,67
Hum_43PF	11	250,23	11	313,92	16	112,21	15	193,77	11	302,28	27	137,65	28	214,47	13	269,69	11	343,69
Hum_45AMB	11	250,23	10	309,91	18	119,92	17	201,47	12	306,3	26	134,67	26	208,34	12	265,64	11	343,7
Hum_César	11	250,14	11	314	18	119,85	15	193,68	13	310,32	22	122,72	26	208,33	12	265,65	12	347,69
Chimp_103	11	236,96	11	354,82	3	73,36	25	275,3	25	351,36	NA	NA	21	209,38	14	262,73	NA	NA
Chimp_211	10	232,99	12	358,88	3	73,26	26	279,02	25	351,42	NA	NA	23	215,62	13	258,67	NA	NA
Chimp_253	10	232,96	11,2	356,85	3	73,23	27	282,79	24	347,33	NA	NA	22	212,49	13	258,7	NA	NA
Chimp_273	9	229,07	10	350,68	3	73,32	24,1	272,37	23	343,18	NA	NA	20	206,29	13	258,72	NA	NA
Chimp_295	11	236,93	11	354,86	3	73,4	25	275,26	25	351,37	NA	NA	21	209,42	14	262,67	NA	NA
Chimp_367	10	232,93	11	354,82	3	73,35	26	279,17	24	347,3	NA	NA	20	206,34	13	258,81	NA	NA
Chimp_61A	10	233,01	11	354,82	3	73,27	27	282,93	23	343,24	NA	NA	23	215,56	12	254,83	NA	NA
Chimp_Sg229	11	236,96	11	354,77	3	73,43	25	275,35	25	351,29	NA	NA	21	209,35	14	262,75	NA	NA
Chimp_Sg369	10	232,91	12	358,87	3	73,37	26	279,24	25	351,36	NA	NA	23	215,54	13	258,74	NA	NA
Chimp_SgC1	11	236,96	10	350,68	3	73,45	26	279,16	23	343,16	NA	NA	22	212,46	14	262,66	NA	NA
Chimp_202 (femelle/contrôle)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	NA	NA	0	0	0	0	NA	NA
Nb allèles Ho Gamme allélique	4 10-12		4 10-13		5 15-19		5 15-18		3 11-13		6 19-27		7 23-29		3 12-14		2	

Nb allèles Chz	3 9-11		4 10-12		1 (3)		4 24.1- 27		3 23-25		NA		4 20-23		3 12-14		NA	

Tableau 11

M2	SRY		UTX		UTY	
Samples	Allèle	Taille	Allèle	Taille	Allèle	Taille
Hum_FX	1	81,56	1	120,61	1	91,36
Hum_20FT	1	81,57	1	120,61	1	91,4
Hum_21PF	1	81,67	1	120,62	1	91,44
Hum_28IT	1	81,57	1	120,61	1	91,4
Hum_29AH	1	81,56	1	120,62	1	91,36
Hum_31OL	1	81,63	1	120,68	1	91,43
Hum_34AHB	1	81,57	1	120,61	1	91,45
Hum_35JN	1	81,56	1	120,61	1	91,4
Hum_38ME	1	81,54	1	120,6	1	91,38
Hum_39TB	1	81,58	1	120,62	1	91,42
Hum_40EH	1	81,67	1	120,62	1	91,38
Hum_43PF	1	81,6	1	120,62	1	91,43
Hum_45AMB	1	81,6	1	120,63	1	91,4
Hum_Cesar	1	81,64	1	120,61	1	91,45
Chimp_103	1	81,59	1	120,7	1	91,34
Chimp_211	1	81,57	1	120,62	1	91,28
Chimp_253	1	81,56	1	120,61	1	91,36
Chimp_273	1	81,68	1	120,63	1	91,35
Chimp_295	1	81,6	1	120,71	1	91,31
Chimp_367	1	81,59	1	120,7	1	91,3
Chimp_61A	1	81,59	1	120,7	1	91,34
Chimp_Sg229	1	81,59	1	120,63	1	91,34
Chimp_Sg369	1	81,59	1	120,62	1	91,3
Chimp_SgC1	1	81,67	1	120,62	1	91,39
Chimp_202_Fem	0	0	1	120,7	0	0
Nb allèles Ho	1		1		1	
Nb allèles Chz	1		1		1	

Tableau 12

Ces tableaux résument l'ensemble des variations génétiques (appelées aussi allèles) observées chez les individus, et pour chaque marqueur. On voit rapidement que chaque marqueur présente plusieurs allèles chez l'homme et un peu moins chez le chimpanzé – résultat parfaitement compatible avec l'histoire démographique de ces 2 espèces. Ces résultats qui portent uniquement sur 13 et 11 individus, se révèlent déjà plus efficace que ce qui est publié jusque-là chez le chimpanzé. C'est donc très révélateur du pouvoir de discrimination de cet outil.

Ces résultats représentés sous forme de dendrogramme à la figure 10 et analysés par PCA à la figure 11 montrent que Combyplex permet une discrimination sans ambiguïté des deux espèces.

L'ensemble Combyplex qui comprend les multiplex M1 et M2 montre une très bonne reproductibilité et robustesse, à la fois chez l'homme et chez le chimpanzé. Il permet d'amplifier 30/31 marqueurs avec des tailles toujours inférieures à 350 bp, il permet de faire de l'ADN moyennement dégradé, comme testé sur des individus datant du 16ème siècle.

Capacité discriminante du CombYplex comparée à l'AmplYfiler : individus même noms de famille :

CombYplex a été utilisé sur des individus ayant le même nom de famille ou des dérivés de ce nom (Feakes et dérivés, Attenborough, Starbuck et Revis) afin de tester si cet outil permet de discriminer des individus ayant a priori une origine commune récente (établissement des noms de famille vers 15sc). Les résultats de cette étude sont présentés sous forme de dendrogramme à la figure 12.

Ces résultats montrent que les empreintes CombYplex, permettent sans ambiguïté de discriminer les individus portant les mêmes patronymes: les individus se distribuent distinctement en 4 groupes (4 branches du dendrogramme) correspondant aux 4 patronymes étudiés. Ceci indique un lien direct entre chromosome Y et patronyme; Dans ce cas précis, cela indique également que les variants patronymiques des 4 patronymes choisis, sont récents et d'origines multiples puisqu'ils sont distribués aléatoirement au sein des groupes patronymiques, mais ne forment pas de sous-groupes distincts qui auraient pu suggérer une origine commune. Deux individus sont exclus de l'arbre indiquant clairement une incompatibilité entre le nom et le chromosome Y en question, puisqu'ils ne se placent dans aucune des 4 branches probable – ceci est le cas entre un nom paternité ou un cas d'adoption ; le taux variant de 2 à 4% en Angleterre, cette observation est parfaitement compatible avec les statistiques sur le sujet.

L'outil CombYplex permet donc de regrouper les individus portant un patronyme commun et ayant une origine commune, mais également de détecter une non-congruence entre nom de famille et chromosome Y et se trouve être un allié précieux dans les analyses généalogiques/patronymiques.

Statistiques descriptives :

Les formules suivantes ont été utilisées : (1) capacité discriminante = no. d'individus/no. des différents haplotypes observés; (2) diversité des gènes (h), équivalent à la fréquence attendue des fréquences hétérozygotes avec des loci diploïdes autosomiques a été calculé ainsi $(n/(n-1)) \cdot (1 - \sum p_i^2)$, où p_i = fréquence de l'allèle au ième .

EXEMPLE 2: Outil de sexage

Matériels et méthodes

Echantillons de primates humains et non humains.

Un panel de 177 échantillons d'ADN a été utilisé, incluant 116 échantillons humains, et 61 échantillons de primates non humains à partir de 45 espèces distinctes. Des échantillons humains ont été obtenus à partir de volontaires en bonne santé et les échantillons de primates non humains provenaient d'une collection.

Une liste de ces échantillons, incluant le groupe taxonomique, le nom commun de l'espèce et mes informations sur le sexe obtenues préalablement est donné au tableau 13. Les échantillons d'ADN

utilisés ont été extraits de différents substrats incluant la salive, le sérum, le sang total, du tissu et une culture cellulaire.

Groupe Taxonomique/ordre	Genre et espèce	Nom commun	Type d'échantillon biologique	ID de l'échantillon	Sexe rapporté	Sexe génétique
	Homo sapiens	Humain	Salive	1	Mâle	Mâle
	<i>Homo sapiens</i>	Humain	Sérum	2	Mâle	Mâle
	<i>Homo sapiens</i>	Humain	Salive	3	Femelle	Femelle
	<i>Homo sapiens</i>	Humain	Sérum	4	Femelle	Femelle
1	Pan troglodytes troglodytes	Chimpanzé d'Afrique Centrale	Sang	5	Mâle	Mâle
	<i>Pan troglodytes troglodytes</i>	Chimpanzé d'Afrique Centrale	Sérum	6	Mâle	Mâle
	<i>Pan troglodytes troglodytes</i>	Chimpanzé d'Afrique Centrale	Sang	7	Femelle	Femelle
	<i>Pan troglodytes troglodytes</i>	Chimpanzé d'Afrique Centrale	Sérum	8	Femelle	Femelle
2	Pan paniscus	Bonobo	Sérum	9	Mâle	Mâle
3	Gorilla gorilla	Gorille de l'Ouest	Sang	10	Mâle	Mâle
	<i>Gorilla gorilla</i>	Gorille de l'Ouest	Sang	11	Femelle	Femelle
	<i>Gorilla sp.</i>	Gorille	Sérum	12	Mâle	Mâle
4	Pongo pygmaeus pygmaeus	Orang-Outan de Bornéo	Sérum	13	Mâle	Mâle
	<i>Pongo sp.</i>	Orang-Outan	Sang	14	Mâle	Mâle
	<i>Pongo sp.</i>	Orang-Outan	Sang	15	Femelle	Femelle
5	Hylobates lar	Gibbon à mains blanches	Sang	16	Mâle	Mâle
	<i>Hylobates lar</i>	Gibbon à mains blanches	Sérum	17	Mâle	Mâle
	<i>Hylobates lar</i>	Gibbon à mains blanches	Sang	18	Femelle	Femelle
	<i>Hylobates sp.</i>	Gibbon	Sérum	19	Femelle	Femelle
6	Cercopithecus cephus	Guenon à moustache	Sérum	20	Femelle?	Femelle
7	Cercopithecus nictitans	Hocheur	Sérum	21	Mâle	Mâle
8	Erythrocebus patas	Singe rouge	Sérum	22	Femelle?	Femelle
9	Cercocebus torquatus	Mangabey couronné	Sérum	23	Mâle	Mâle
10	Mandrillus sphinx	Mandrill	Sérum	24	Mâle	Mâle
11	Lophocebus albigena	Mangabey à joues blanches	Sérum	25	Femelle	Femelle
12	Papio sp.	Babouin	Sang	26	Femelle	Femelle

	<i>Papio</i> sp.	Babouin	Sang	27	Mâle	Mâle
13	<i>Macaca mulatta</i>	Macaque rhésus	Sang	28	Mâle	Mâle
14	<i>Macaca sylvanus</i>	Macaque berbère	Sang	29	Femelle	Femelle
15	<i>Alouatta caraya</i>	Macaque berbère	Sang	30	Mâle	Mâle
	<i>Alouatta caraya</i>	Singe Hurlleur noir	Sérum	31	Mâle	Mâle
16	<i>Aotus trivirgatus</i>	Singe Hurlleur noir			Inconnu	Mâle
17	<i>Saimiri sciureus</i>	Aotus	Sérum	32	Mâle	Mâle
	<i>Saimiri sciureus</i>	Saimiri commun	Sérum	33	Mâle?	Mâle
	<i>Saimiri sciureus</i>	Saimiri commun	Sérum	34	Mâle?	Mâle
	<i>Saimiri sciureus</i>	Saimiri commun	Sérum	35	Mâle?	Mâle
18	<i>Cebus apella</i>	Apelle	Sérum	36	Femelle	Femelle
	<i>Cebus apella</i>	Apelle	Sérum	37	Mâle	Mâle
19	<i>Callithrix jacchus</i>	Ouistiti à toupets blancs	Sérum	38	Mâle	Mâle
20	<i>Lepilemur dorsalis</i>	Lépilémur à dos gris	Tissu (dans alcool)	39	Inconnu	Mâle
	<i>Lepilemur dorsalis</i>	Lépilémur à dos gris	Culture cellulaire	40	Inconnu	Mâle
21	<i>Lepilemur sahamalazensis</i>	Lépilémur de Sahamalaza	Culture cellulaire	41	Inconnu	Femelle
22	<i>Lepilemur ankaranensis</i>	Lépilémur ankaranensis	Sang	42	Inconnu	Mâle
	<i>Lepilemur ankaranensis</i>	Lépilémur ankaranensis	Tissu sec	43	Inconnu	Mâle
23	<i>Lepilemur mittermeieri</i>	Lépilémur mittermeieri	Sang	44	Femelle	Femelle
24	<i>Lepilemur ruficaudatus</i>	Lépilémur à queue rousse	Sang	45	Mâle	Mâle
25	<i>Lepilemur aecelis</i>	Lépilémur d'Antafia	Sang	46	Mâle	Mâle
26	<i>Microcebus murinus</i>	Microcèbe mignon	Tissu sec	47	Femelle	Femelle
27	<i>Hapalemur griseus ranomafanensis</i>	Hapalémur gris	Tissu sec	48	Inconnu	Femelle
28	<i>Hapalemur griseus meridionalis</i>	Hapalémur bambou gris du Sud	Tissu sec	49	Inconnu	Femelle
29	<i>Hapalemur griseus occidentalis</i>	Hapalémur occidental gris	Tissu sec	50	Mâle	Mâle
30	<i>Hapalemur aureus</i>	Hapalémur doré	Tissu sec	51	Inconnu	Femelle
31	<i>Hapalemur simus</i>	Grand Hapalémur	Tissu sec	52	Femelle	Femelle
	<i>Hapalemur simus</i>	Grand Hapalémur	Tissu sec	53	Mâle	Mâle

	<i>Hapalemur simus</i>	Grand Hapalémur	Tissu sec		Femelle	Femelle
32	<i>Hapalemur griseus griseus</i>	Hapalémur gris	Tissu sec	54	Femelle	Femelle
33	<i>Eulemur macaco macaco</i>	Lémur noir	na	55	Inconnu	Mâle
	<i>Eulemur macaco macaco</i>	Lémur noir	na	56	Inconnu	Mâle
	<i>Eulemur macaco macaco</i>	Lémur noir	Sérum	57	Inconnu	Mâle
34	<i>Eulemur macaco flavifrons</i>	Lémur aux yeux turquoise	Tissu sec	58	Inconnu	Mâle
	<i>Eulemur macaco flavifrons</i>	Lémur aux yeux turquoise	Tissu sec	59	Inconnu	Mâle
35	<i>Lemur catta</i>	Lémur catta	Sérum	60	Inconnu	Mâle
	<i>Lemur catta</i>	Lémur catta	Sérum	61	Inconnu	Mâle
36	<i>Propithecus diadema edwardsi</i>	Propithecus de Milne-Edwards	Tissu sec	62	Inconnu	Femelle
37	<i>Propithecus tattersalli</i>	Sifaka de Tattersall	Tissu sec	63	Femelle	Femelle
38	<i>Propithecus verreauxi coquerelli</i>	Propithecus de Coquerel	Culture cellulaire	64	Mâle	Mâle
39	<i>Propithecus verreauxi verreauxi</i>	Propithecus de Verreaux	Tissu sec	65	Mâle	Mâle
40	<i>Propithecus verreauxi deckeni</i>	Propithecus de Verreaux Deckeni	Tissu sec	66	Femelle	Femelle
41	<i>Propithecus diadema diadema</i>	Propithecus à diadème	Sang	67	Femelle	Femelle
42	<i>Avahi laniger</i>	Avahi laineux	Sang	68	Mâle	Mâle
	<i>Avahi laniger</i>	Avahi laineux	Tissu sec	69	Femelle	Femelle
43	<i>Avahi occidentalis</i>	Avahi occidental	Sang	70	Mâle	Mâle
	<i>Avahi occidentalis</i>	Avahi occidental	Sang	71	Femelle	Femelle
44	<i>Avahi cleesei</i>	Avahi de John Cleese	Culture cellulaire	72	Femelle	Femelle
	<i>Avahi cleesei</i>	Avahi de John Cleese	Dry tissue	73	Inconnu	Mâle
45	<i>Indri indri</i>	Indri	Culture cellulaire	74	Inconnu	Mâle

Tableau 13

Extraction d'ADN

Le procédé d'extraction d'ADN dépend du type d'échantillon.

L'ADN a été extrait de :

- 5 -(i) sang total en utilisant le mini-kit QiaAmp DNA Blood mini-kit (Qiagen),
 - (ii) sérum en utilisant le mini-kit i-genomic DNA Blood mini-kit (Euromedex)
 - (iii) salive en utilisant le kit OG-300 Oragene DNA Self-Collection Kit (DNA Genotek),
 - (iv) culture cellulaire en utilisant le mini kit Blood & Cell Culture DNA (Qiagen), selon les
 instructions du fabricant pour chacun des kits utilisés.
- 10 La quantité et la qualité de l'ADN extrait ont été estimées en utilisant un spectrophotomètre
 NanoDrop.

Conception des amorces de PCR

- 15 Les amorces de PCR pour l'amplification du fragment SRY ont été publiées précédemment
 (Fiore et al. 2005). Les amorces de PCR pour la co-amplification des régions homologues de
 UTX et UTY ont été conçues à partir de régions conservées UTX/UTY. Les séquences
 disponibles dans les banques pour les différentes espèces de primates ont été alignées à l'aide
 de BioEdit v.7.0.5.3. Les régions conservées pour chaque gène ont été utilisées pour le design
 d'amorces en utilisant le logiciel Primer3 v.0.4.0 afin de permettre la co-amplification des
 20 fragments d'UTX et d'UTY de tailles relativement petites, à partir d'échantillon comprenant
 probablement de l'ADN dégradé. Des amorces sens marquées en 5' avec un fluorochrome
 FAM fluorescent (Invitrogen) ont été utilisées pour permettre la détection par électrophorèse
 capillaire. Les séquences des amorces et les tailles des amplicons sont montrées au tableau 6.

Marqueur	Amorce sens		Amorce anti-sens		Longueur amplifiée (bp)
	SEQ ID NO	Séquence (5'-3')	SEQ ID NO	Séquence (5'-3')	
SRY	70	agtgaagcgacccatgaacg	66	tgtagcctcctggaagaatgg	165
UTY	67	cagtgttaccagccttaacag	68	ggcaggtctactttttagag	91
UTX			69	tctgtggactaggtttgtggt	120

Séquence (5'-3') des amorces sens de PCR	Conc. (μ M)	Séquence (5'-3') des amorces anti- sens de PCR	Conc. (μ M)	Taille amplicon (bp)
Amorces test				
UTXUTY_F1 (FAM-) ¹ CAGTGTACCGACCTTAACAG (SEQ ID NO 67)	0,4	UTX_R1 5'TCTGTGGACTAGGTTTGTGGT 3' (SEQ ID NO 69)	0,2	120
		UTY_R1 5'GGCAGGTCCTACTTTTGTAGAG 3' (SEQ ID NO 68)	0,2	91
SRY_F1 (FAM-) ² 5' AGTGAAGCGACCCATGAACG 3' (SEQ ID NO : 70)	0,2	SRY_R1 5' TGTGCCCTCCTGGAAGAATGG 3' (SEQ ID NO 66)	0,2	165

Tableau 6

Amplification par PCR multiplex

Des régions d'UTX, UTY et/ou SRY ont été amplifiées simultanément dans un volume final de 12,5 µl consistant à 1X du tampon B de PCR (Fisher Bioblock), 1,5mM de MgCl₂, 200µM de chaque dNTP, 0,2 à 0,4 µM d'amorces, 1U d'ADN polymérase *Taq* (Fisher Bioblock) et 15 à 25 ng d'échantillon d'ADN. Les concentrations des amorces pour chaque amorce sont données dans le tableau 6. Les conditions du cycle de PCR sont une première étape de dénaturation à 94°C pendant 5 min suivie de 40 cycles de dénaturation à 94°C pendant 30s, l'hybridation à 55°C pendant 30s et une élongation à 72°C pendant 30s avec une étape d'élongation finale à 72°C pendant 5min. Il est important de noter la température d'hybridation a été diminuée à 51°C pour les échantillons prosimiens.

Détection par électrophorèse

Les produits de PCR ont été d'abord testés visuellement par électrophorèse sur gel d'agarose (140V, 40min) sur des gels à 2% d'agarose en utilisant une coloration SYBR Safe (Invitrogen). Pour la préparation des échantillons pour la détection par électrophorèse capillaire, 1µl de produits de PCR dilué 100 fois a été alors mélangé avec 0,2µl de standard interne de taille GeneScan-600LIZ et 8,8µl formamide Hi-Di. Après dénaturation à 95°C pendant 5 min, les échantillons ont été séparés sur un Genetic Analyzer ABI 3730 en utilisant POP-7. Les données ont été analysées en utilisant un logiciel GeneMapper v. 4.0.

Séquençage

UTX, UTY et SRY ont été amplifiés séparément en utilisant les paires d'amorces dans le tableau 6, comme précédemment décrit. Chaque produit de PCR a été séquençé dans deux réactions en utilisant les amorces PCR sens et anti-sens. La réaction de séquençage a été réalisée avec un kit de séquençage Big Dye Terminator v3.1 (Applied Biosystems). Les produits de PCR ont été séparés sur un Genetic Analyzer ABI 3730 (Applied Biosystems). Les séquences ont été analysées et assemblées en utilisant le logiciel Sequence Scanner v1.0 (Applied Biosystems) et l'éditeur d'alignement de séquence BioEdit.

Résultats

Les PCR multiplexs développés incluant à la fois les amorces UTX/UTY et SRY permettent une détermination du sexe pour chaque échantillon d'ADN testé. Les résultats sont donnés au tableau 7.

		Femelle	Mâle		
		Profil F	Profil A	Profil B	Profil C
Hominidae	<i>Homo sapiens</i>	2	2	0	0

	<i>Pan sp.</i>	2	3	0	0
	<i>Gorilla sp.</i>	1	2	0	0
	<i>Pongo sp.</i>	1	2	0	0
Hylobatidae	<i>Hylobates sp.</i>	2	2	0	0
Cercopithecidae	<i>Cercopithecus sp.</i>	1	1	0	0
	<i>Erythrocebus patas</i>	1	0	0	0
	<i>Cercocebus torquatus</i>	0	1	0	0
	<i>Mandrillus sphinx</i>	0	1	0	0
	<i>Lophocebus albigena</i>	1	0	0	0
	<i>Papio sp.</i>	1	1	0	0
	<i>Macaca sp.</i>	1	2	0	0
Atelidae	<i>Alouatta caraya</i>	0	1	0	0
Cebidae	<i>Saïmiri sciureus</i>	0	0	0	3
	<i>Cebus apella</i>	1	0	0	1
	<i>Aotus trivirgatus</i>	0	1	0	0
	<i>Callithrix jacchus</i>	0	1	0	0
Lemuridae	<i>Hapalemur sp.</i>	6	7	0	0
	<i>Eulemur sp.</i>	0	3	0	1
Lepilemuridae	<i>Lepilemur sp.</i>	2	4	2	0
Indriidae	<i>Avahi sp.</i>	3	1	1	0
	<i>Propithecus sp.</i>	4	2	0	0
	<i>Indri indri</i>	0	0	0	1

Tableau 7

Des échantillons femelles ont été identifiés par un seul signal correspondant à des fragments spécifiques d'UTX de 125 bp (profil F, figure 9). Au contraire, trois profils différents ont été observés pour des échantillons mâles comme illustré aux figures 6 à 8. En effet, les échantillons mâles ont été identifiés soit par trois signaux, qui correspondaient au fragment spécifique de X et aux deux fragments spécifiques d'Y (profil A) ou occasionnellement par deux signaux qui correspondaient au fragment spécifique de X et seulement à un des deux fragments du chromosome Y c'est-à-dire soit à SRY (profil C) soit à UTY (profil B). Les

- résultats obtenus pour chaque échantillon sont donnés au tableau 5. Un profil typique de mâle (profil A) présentant à la fois des fragments SRY et UTY a été observé pour la plupart des échantillons. Les six échantillons qui ne présentaient pas de fragments UTY mais qui montraient clairement un signal spécifique de SRY appartiennent aux espèces de singes du
- 5 Nouveau Monde (*Saimiri sciureus* (n=3) et *Cebus apella* (n=1)) et aux deux espèces de prosimiens (*Indri Indri* (n=1) et *Eulemur macaco flavifrons* (n=1)) Les cinq échantillons qui ne présentaient pas de fragment SRY mais montraient un signal spécifique d'UTY clair appartenaient aux espèces de singes de l'ancien Monde (*Lophocebus albigena*) et quatre espèces de prosimiens.
- 10 Pour les 54 échantillons testés dont le sexe était déjà connu, le sexe déterminé avec le nouveau test a toujours été concordant avec le sexe morphologique. Afin de chercher si un échec de l'amplification du locus UTY ou SRY était dû à une mutation dans le site de liaison de l'amorce ou à une délétion de nouveaux sets d'amorces UTRY et SRY ont été conçus. Les amplifications avec les seconds sets d'amorces ont été réussies pour tous les échantillons et le
- 15 séquençage des amplicons en résultant a révélé que l'impossibilité d'amplifier le locus avec le premier set d'amorces était dû à des mutations dans les sites de liaison des amorces. Ainsi, le nouveau procédé développé permet de manière non ambiguë de déterminer le genre de tous les échantillons testés même en présence d'une mutation dans la région de l'amorce. Le premier et principal avantage de ce procédé est qu'il combine deux tests de sexage
- 20 indépendant UTX/UTY et SRY dans un essai permettant une détermination exacte du sexe. En effet, 11 échantillons mâles qui n'avaient pas de fragments UTY ou SRY qui auraient été précédemment considérés comme des échantillons femelles sur la base de la seule analyse du locus UTX/TUY ou SRY, ont été identifiés comme étant des mâles par la présente approche. Ceci montre le besoin d'un test de détermination du sexe qui inclut au moins 2 marqueurs Y
- 25 pour les primates, empêchant alors une mauvaise identification du sexe dues à un polymorphisme structurel élevé sur le chromosome Y ou à une mutation sur le site de liaison de l'amorce. En utilisant deux fragments spécifiques de Y, l'effet négatif d'une mutation sur le site de liaison de l'amorce ou d'une délétion sur une amplification peut être minimisée étant donné qu'une
- 30 mutation et/ou une délétion sur les deux loci a peu de risque de se produire. Le second avantage de ce procédé est son large spectre d'application chez le primate. En effet, il fonctionne sur toutes les espèces testées notamment grâce au travail sur la conception des amorces. Le même procédé fonctionne sur toutes les espèces testées mais une légère optimisation en réduisant la température d'hybridation est préférable pour sexer les espèces
- 35 prosimiennes éloignées. Ce procédé est accessible aux laboratoires de biologie moléculaire avec un équipement basique étant donné que la différence de taille entre les trois produits d'amplification possibles est suffisamment importante pour être discernée par simple électrophorèse sur gel d'agarose et qu'un séquenceur automatique n'est pas nécessaire. Finalement, la petite taille des produits d'amplification (<200bp) les rend utile pour

l'identification du sexe d'échantillons potentiellement dégradés tels que les échantillons de sérum et également les échantillons non invasifs tels que les cheveux ou les fèces.

REFERENCES

- 5 Au cours de cette demande, différentes références décrivent l'état de la technique de l'invention. Les descriptions de ces références sont ici incorporées par référence dans la présente description.
- 10 Butler JM, Schoske R, Vallone PM, Kline MC, Redd AJ, Hammer MF. A novel multiplex for simultaneous amplification of 20 Y chromosome STR markers. *Forensic Sci Int.* 2002 Sep 10;129(1):10-24.
- Parkin EJ, Kraayenbrink T, Opgenort JR, van Driem GL, Tuladhar NM, de Knijff P, Jobling MA. Diversity of 26-locus Y-STR haplotypes in a Nepalese population sample: isolation and drift in the Himalayas. *Forensic Sci Int.* 2007 Mar 2;166(2-3):176-81. Epub 2006 Jun 15.
- 15 Patel, P. I., et al. (1984) "Organization of the HPRT gene and related sequences in the human genome," *Somat Cell Mol Genet* 10: 483-493, and Gill, P., et al. (1985) "Forensic application of DNA 'fingerprints'," *Nature* 318: 577-579.
- Chamberlain JS, Gibbs RA, Ranier JE, Nguyen PN, Caskey CT. *Nucleic Acids Res.* 1988 Dec 9;16(23):11141-56. Deletion screening of the Duchenne muscular dystrophy locus via multiplex
- 20 DNA amplification.
- Morral N, Estivill X. Multiplex PCR amplification of three microsatellites within the CFTR gene. *Genomics.* 1992 Aug;13(4):1362-4.
- Ensminger AL, Hoffman SM. Sex identification assay useful in great apes is not diagnostic in a range of other primate species. *Am J Primatol.* 2002 Feb;56(2):129-34.
- 25 Kimpton CP, Gill P, Walton A, Urquhart A, Millican ES, Adams M. Automated DNA profiling employing multiplex amplification of short tandem repeat loci. *PCR Methods Appl.* 1993 Aug;3(1):13-22.
- Hammond; Schumm, J. W. et al. (1994) "Development of nonisotopic multiplex amplification sets for analysis of polymorphic STR loci," in "The Fourth International Symposium on Human
- 30 Identification 1993," pp. 177-187
- Goedbloed M, Vermeulen M, Fang RN, Lembring M, Wollstein A, Ballantyne K, Lao O, Brauer S, Krüger C, Roewer L, Lessig R, Ploski R, Dobosz T, Henke L, Henke J, Furtado MR, Kayser M. Comprehensive mutation analysis of 17 Y-chromosomal short tandem repeat polymorphisms included in the AmpFISTR Yfiler PCR amplification kit. *Int J Legal Med.* 2009
- 35 Nov;123(6):471-
- Hanson EK, Ballantyne J. An ultra-high discrimination Y chromosome short tandem repeat multiplex DNA typing system. *PLoS One.* 2007 Aug 1;2(8):e688.
- Ballantyne KN, Goedbloed M, Fang R, Schaap O, Lao O, Wollstein A, Choi Y, van Duijn K, Vermeulen M, Brauer S, Decorte R, Poetsch M, von Wurmb-Schwark N, de Knijff P, Labuda D,

- Vézina H, Knoblauch H, Lessig R, Roewer L, Ploski R, Dobosz T, Henke L, Henke J, Furtado MR, Kayser M.
Mutability of Y-chromosomal microsatellites: rates, characteristics, molecular bases, and forensic implications. *Am J Hum Genet.* 2010 Sep 10;87(3):341-53. doi: 10.1016/j.ajhg.2010.08.006.
- 5 Vermeulen M, Wollstein A, van der Gaag K, Lao O, Xue Y, Wang Q, Roewer L, Knoblauch H, Tyler-Smith C, de Knijff P, Kayser M. Improving global and regional resolution of male lineage differentiation by simple single-copy Y-chromosomal short tandem repeat polymorphisms. *Forensic Sci Int Genet.* 2009 Sep;3(4):205-13. doi: 10.1016/j.fsigen.2009.01.009. Epub 2009
- 10 Feb 23.
- Maybruck JL, Hanson E, Ballantyne J, Budowle B, Fuerst PA. A comparative analysis of two different sets of Y-chromosome short tandem repeats (Y-STRs) on a common population panel. *Forensic Sci Int Genet.* 2009 Dec;4(1):11-20. doi: 10.1016/j.fsigen.2009.03.004. Epub 2009 May 17.
- 15 Hanson E, Maybruck JL, Ballantyne J, Fuerst PA. Performance evaluation and optimization of multiplex PCRs for the highly discriminating OSU 10-locus set Y-STRs. *J Forensic Sci.* 2012 Jan;57(1):52-9. doi: 10.1111/j.1556-4029.2011.01910.x. Epub 2011 Sep 21.
- Kayser M, Kittler R, Erler A, Hedman M, Lee AC, Mohyuddin A, Mehdi SQ, Rosser Z, Stoneking M, Jobling MA, Sajantila A, Tyler-Smith C. A comprehensive survey of human Y-chromosomal microsatellites. *Am J Hum Genet.* 2004 Jun;74(6):1183-97.
- 20 SULLIVAN KM, MANNUCCI A, KIMPTON CP, GILL P. A rapid and quantitative dna sex test: fluorescence-based pcr analysis of x-y homologous gene amelogenin. *Biotechniques.* 1993 oct;15(4):636-8, 640-1.

REVENDICATIONS

1. Procédé pour caractériser un échantillon d'ADN humain ou de chimpanzé comprenant une étape de :
- 5 -détermination des allèles d'au moins 10 loci STR de l'échantillon d'ADN, les loci étant choisis dans le groupe M2,
dans lequel :
-le groupe M2 consiste en :
Y-GATA-A10, DYS570, DYS549, DYS460, DYS442, DYS510, DYS541, DYS576, DYS513,
10 DYS458, DYS481, DYS612, DYS444 et DYS533.
2. Procédé pour caractériser un échantillon d'ADN selon la revendication 1 comprenant en outre l'étape de détermination des allèles d'au moins 10 loci STR choisis dans le groupe M1,
15 dans lequel :
-le groupe M1 consiste en :
DYS485, DYS588, DYS502, DYS461, DYS638, DYS643, DYS587, DYS575, DYS578,
DYS632, DYS508, DYS640, DYS511, DYS577, DYS556, DYS517, DYS565 et DYS538.
- 20 3. Procédé pour caractériser un échantillon d'ADN selon la revendication 1 ou 2 comprenant la détermination des allèles de 10 à 50 loci STR, préférablement les allèles de 10 à 40 loci STR, plus préférablement les allèles de 10 à 32 loci STR.
4. Procédé pour caractériser un échantillon d'ADN selon l'une quelconque des
25 revendications 1 à 3 comprenant l'étape de détermination des allèles de 14 loci STR choisis dans le groupe M2.
5. Procédé pour caractériser un échantillon d'ADN selon l'une quelconque des revendications 1 à 4 comprenant la détermination des allèles :
30 -de 18 loci STR choisis dans le groupe M1
et
-de 14 loci STR choisis dans le groupe M2.
6. Procédé pour caractériser un échantillon d'ADN selon l'une quelconque des
35 revendications 1 à 5 comprenant une étape de détermination du sexe dans lequel la détermination du sexe comprend l'étape d'amplification des gènes SRY, UTY et UTX de l'échantillon d'ADN.

7. Procédé pour caractériser un échantillon d'ADN selon la revendication 6 dans lequel l'étape d'amplification des gènes SRY, UTY et UTX comprend l'ajout de paires d'amorces ayant les séquences nucléiques :
- SEQ ID NO: 65 et SEQ ID NO: 66 pour SRY,
- 5 SEQ ID NO: 67 et SEQ ID NO: 68 pour UTY
- et
- SEQ ID NO: 67 et SEQ ID NO: 69 pour UTX.
8. Kit comprenant des moyens pour déterminer les allèles d'au moins 10 loci STR d'un échantillon d'ADN humain ou de chimpanzé, les loci étant choisis dans le groupe M2, dans lequel :
- le groupe M2 consiste en :
- Y-GATA-A10, DYS570, DYS549, DYS460, DYS442, DYS510, DYS541, DYS576, DYS513, DYS458, DYS481, DYS612, DYS444 et DYS533.
- 15
9. Kit selon la revendication 8 comprenant au moins 10 paires d'amorces adaptées pour amplifier les loci STR et dans lequel les paires d'amorces ont des séquences nucléiques choisies dans le groupe consistant en :
- 20 SEQ ID NO : 37 et SEQ ID NO : 38 pour le locus Y-GATA-A10
- SEQ ID NO : 39 et SEQ ID NO : 40 pour le locus DYS570,
- SEQ ID NO : 41 et SEQ ID NO : 42 pour le locus DYS549,
- SEQ ID NO : 43 et SEQ ID NO : 44 pour le locus DYS460,
- SEQ ID NO : 45 et SEQ ID NO : 46 pour le locus DYS442
- 25 SEQ ID NO : 47 et SEQ ID NO : 48 pour le locus DYS510,
- SEQ ID NO : 49 et SEQ ID NO : 50 pour le locus DYS541,
- SEQ ID NO : 51 et SEQ ID NO : 52 pour le locus DYS576,
- SEQ ID NO : 53 et SEQ ID NO : 54 pour le locus DYS513,
- SEQ ID NO : 55 et SEQ ID NO : 56 pour le locus DYS458,
- 30 SEQ ID NO : 57 et SEQ ID NO : 58 pour le locus DYS481
- SEQ ID NO : 59 et SEQ ID NO : 60 pour le locus DYS612,
- SEQ ID NO : 61 et SEQ ID NO : 62 pour le locus DYS444 et
- SEQ ID NO : 63 et SEQ ID NO : 64 pour le locus DYS533.
- 35
10. Kit selon la revendication 8 ou 9 comprenant, en outre, des moyens pour déterminer les allèles d'au moins 10 loci STR choisis dans le groupe M1, dans lequel :
- le groupe M1 consiste en :
- DYS485, DYS588, DYS502, DYS461, DYS638, DYS643, DYS587, DYS575, DYS578,
- 40 DYS632, DYS508, DYS640, DYS511, DYS577, DYS556, DYS517, DYS565 et DYS538.

11. Kit selon la revendication 10 comprenant au moins 10 paires d'amorces adaptées pour amplifier les loci STR et
dans lequel les paires d'amorces ont des séquences nucléiques choisies dans le groupe
5 consistant en :
- SEQ ID NO : 1 et SEQ ID NO : 2 pour le locus DYS485,
SEQ ID NO : 3 et SEQ ID NO : 4 pour le locus DYS588,
SEQ ID NO : 5 et SEQ ID NO : 6 pour le locus DYS502,
SEQ ID NO : 7 et SEQ ID NO : 8 pour le locus DYS461,
10 SEQ ID NO : 9 et SEQ ID NO : 10 pour le locus DYS638,
SEQ ID NO : 11 et SEQ ID NO : 12 pour le locus DYS643,
SEQ ID NO : 13 et SEQ ID NO : 14 pour le locus DYS587,
SEQ ID NO : 15 et SEQ ID NO : 16 pour le locus DYS575,
SEQ ID NO : 17 et SEQ ID NO : 18 pour le locus DYS578,
15 SEQ ID NO : 19 et SEQ ID NO : 20 pour le locus DYS632,
SEQ ID NO : 21 et SEQ ID NO : 22 pour le locus DYS508,
SEQ ID NO : 23 et SEQ ID NO : 24 pour le locus DYS640,
SEQ ID NO : 25 et SEQ ID NO : 26 pour le locus DYS511,
SEQ ID NO : 27 et SEQ ID NO : 28 pour le locus DYS577,
20 SEQ ID NO : 29 et SEQ ID NO : 30 pour le locus DYS556,
SEQ ID NO : 31 et SEQ ID NO : 32 pour le locus DYS517,
SEQ ID NO : 33 et SEQ ID NO : 34 pour le locus DYS565,
SEQ ID NO : 35 et SEQ ID NO : 36 pour le locus DYS538.
- 25 12. Kit selon l'une quelconque des revendications 8 à 11 comprenant des moyens pour déterminer les allèles de 10 à 50 loci STR, préférablement les allèles de 10 à 40 loci STR, plus préférablement les allèles de 10 à 32 loci STR.
- 13 Kit selon l'une quelconque des revendications 8 à 12 comprenant des moyens pour
30 déterminer les allèles d'au moins 14 loci STR choisis dans le groupe M2.
14. Kit selon l'une quelconque des revendications 8 à 13 comprenant des moyens pour déterminer les allèles :
-de 18 loci STR choisis dans le groupe M1
35 et
-de 14 loci STR choisis dans le groupe M2.
15. Kit selon l'une quelconque des revendications 8 à 14 comprenant des moyens de détermination du sexe, dans lequel les moyens de détermination du sexe consistent en des
40 moyens d'amplification des gènes SRY, UTY et UTX.

16. Kit selon la revendication 15 dans lequel les moyens d'amplification des gènes SRY, UTY et UTX comprennent les paires d'amorces ayant les séquences nucléiques :
- SEQ ID NO: 65 et SEQ ID NO: 66 pour SRY,
- 5 SEQ ID NO: 67 et SEQ ID NO: 68 pour UTY
- et
- SEQ ID NO: 67 et SEQ ID NO: 69 pour UTX.

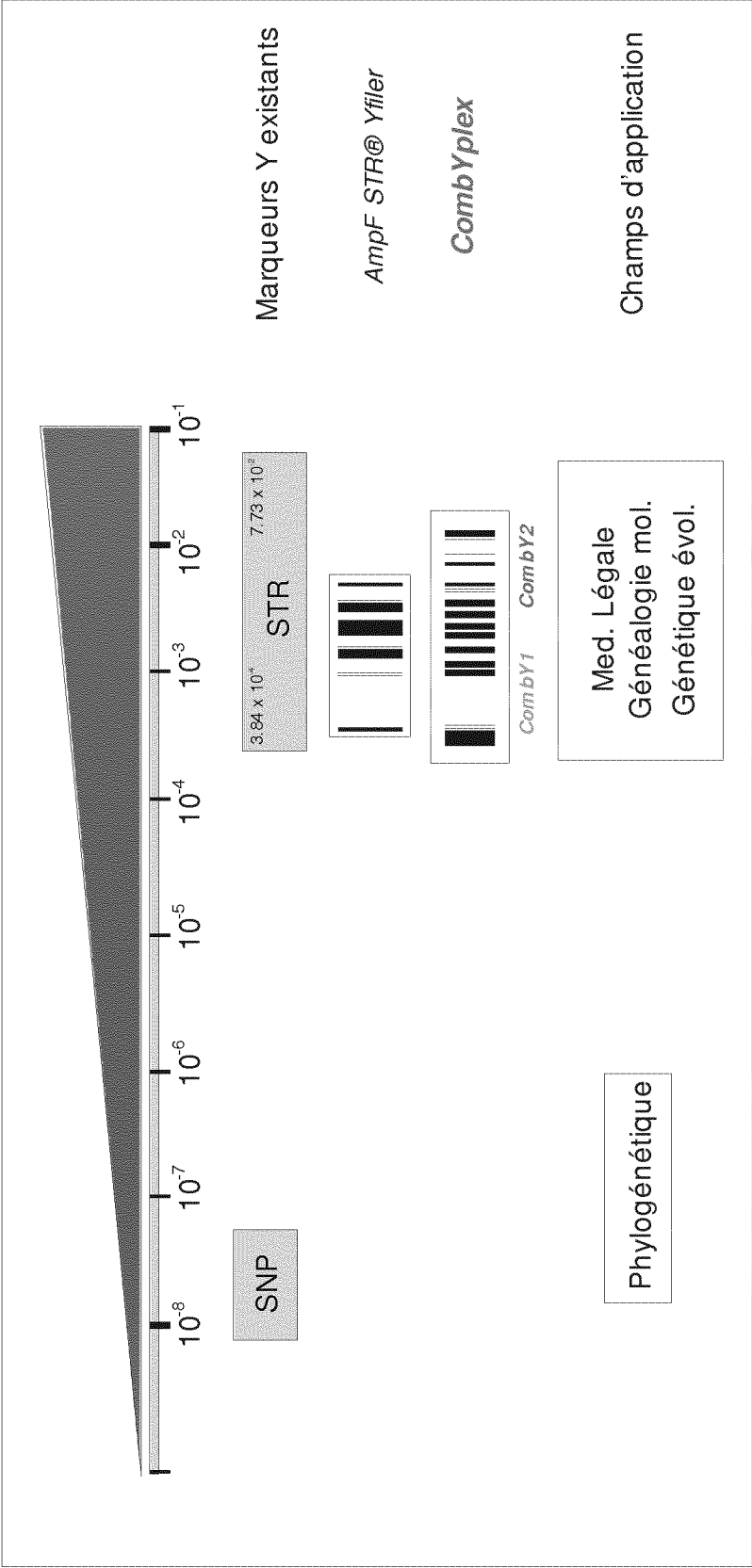


Fig. 1

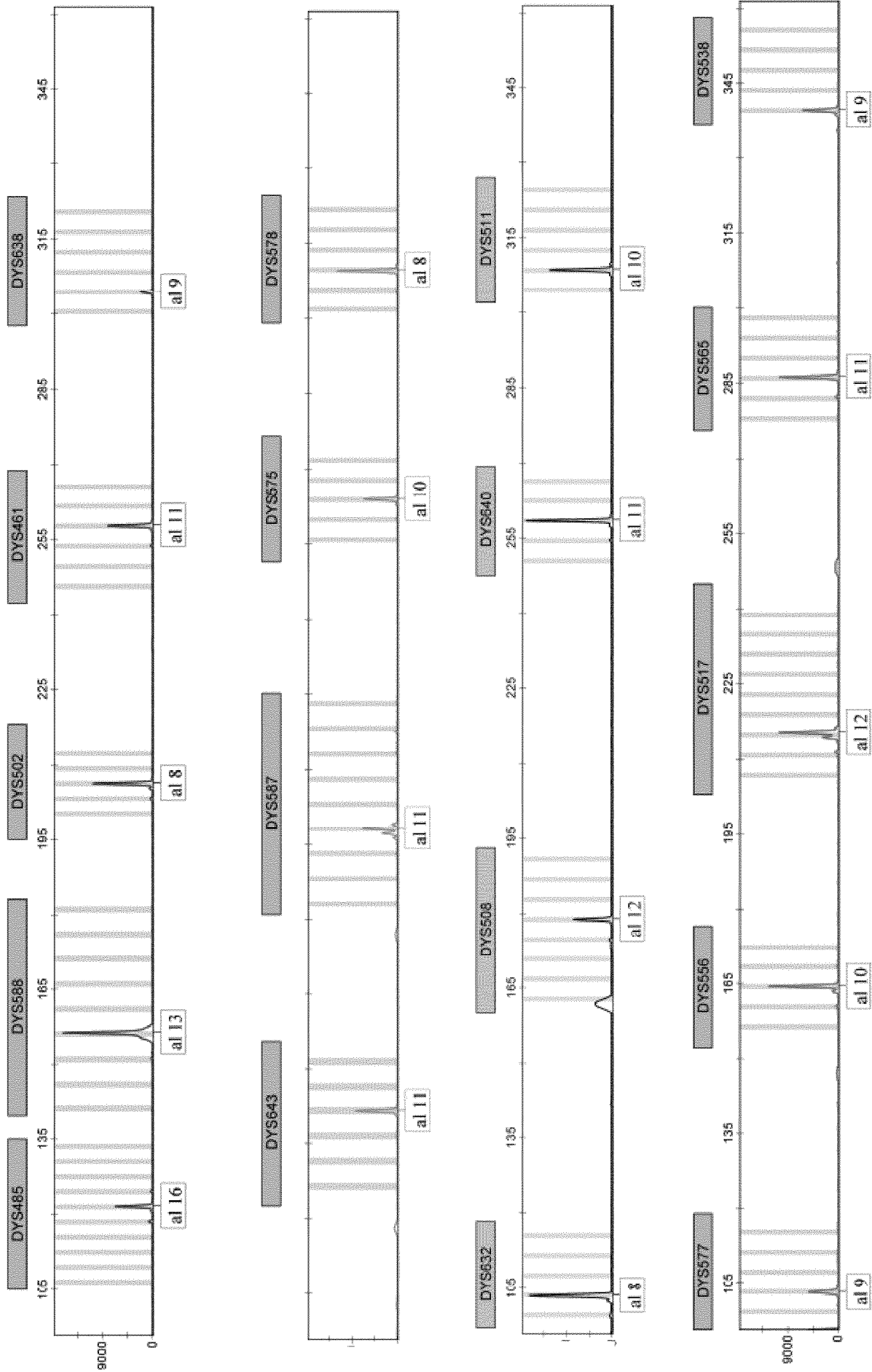


Fig. 2

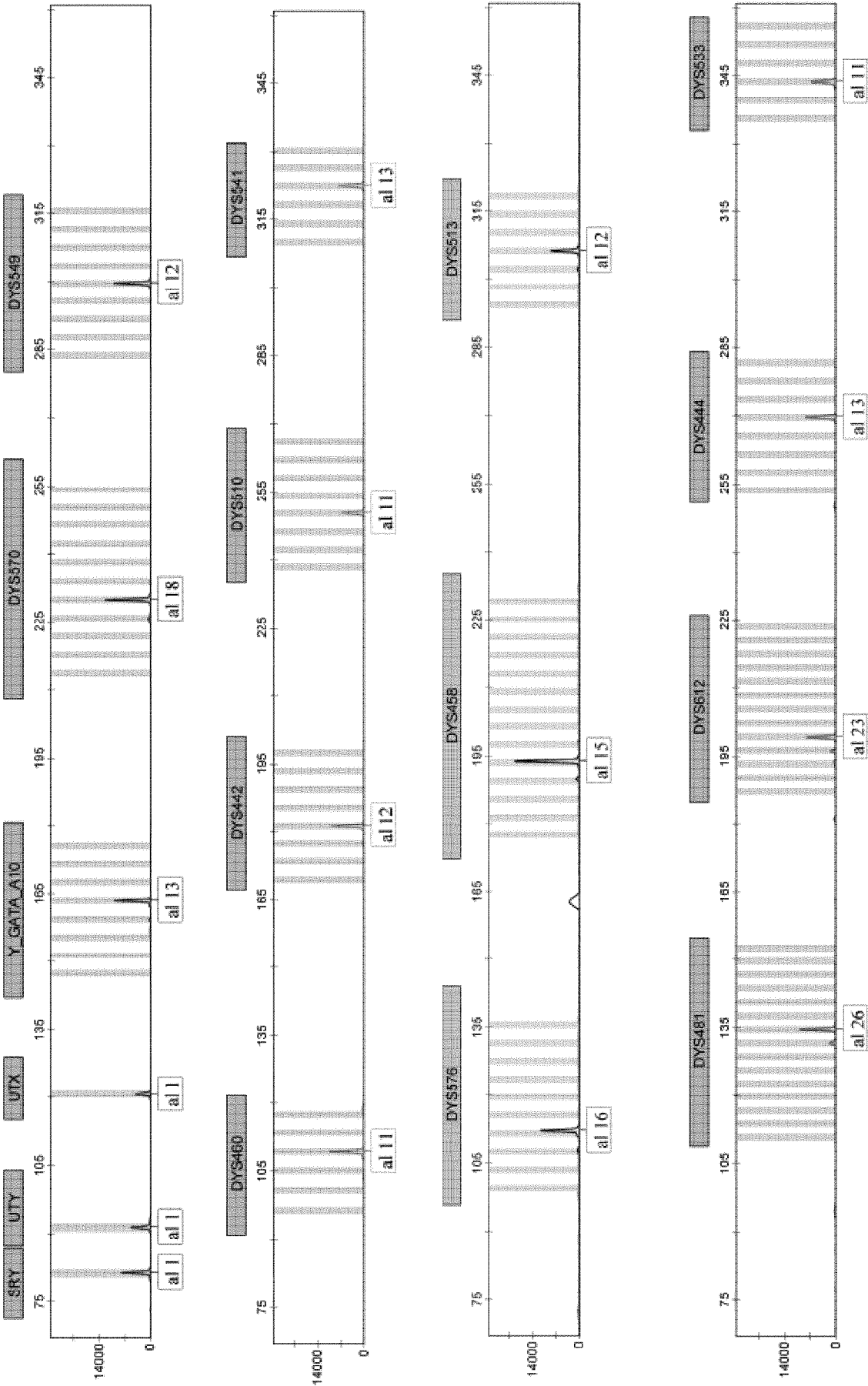


Fig. 3

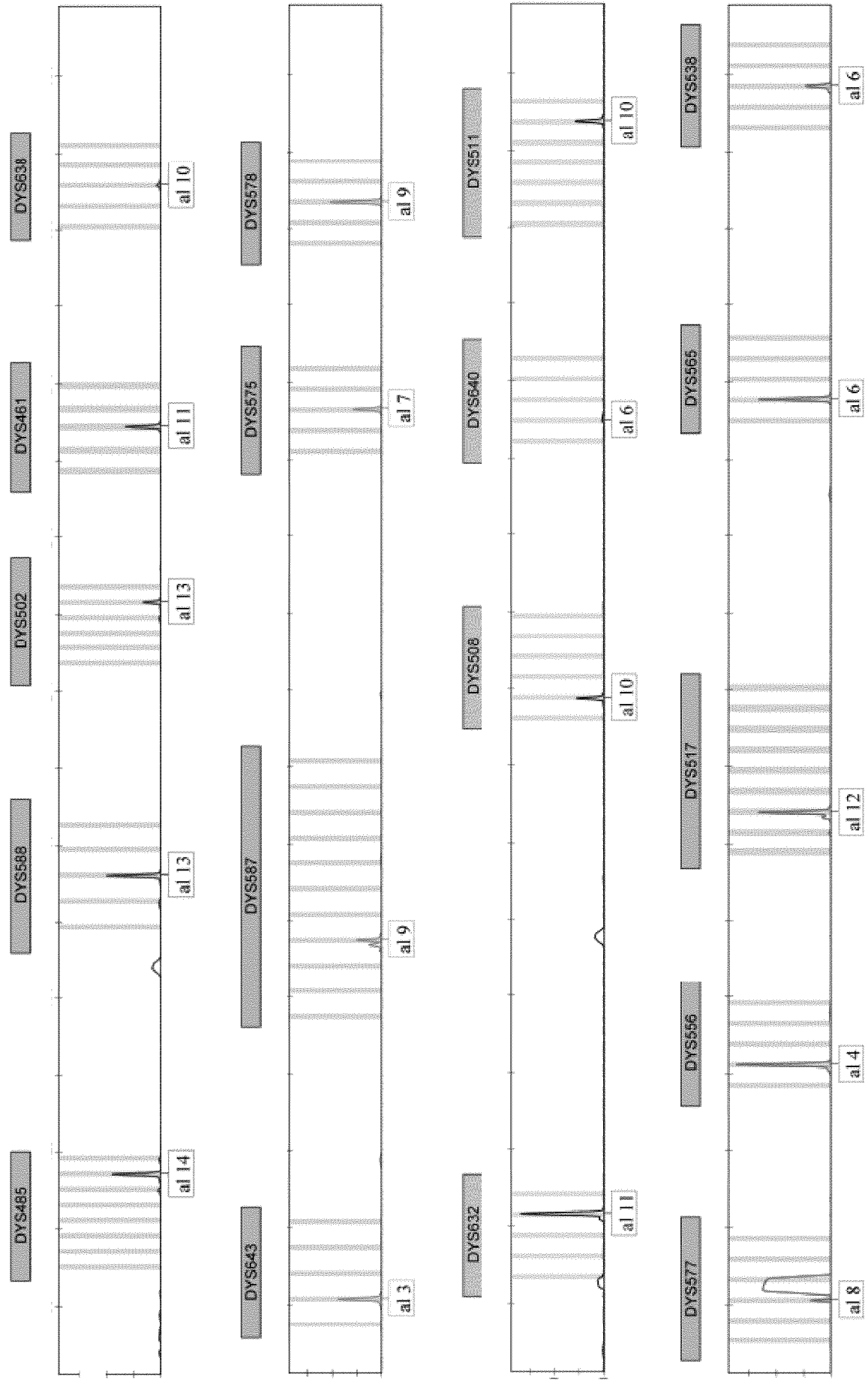


Fig. 4

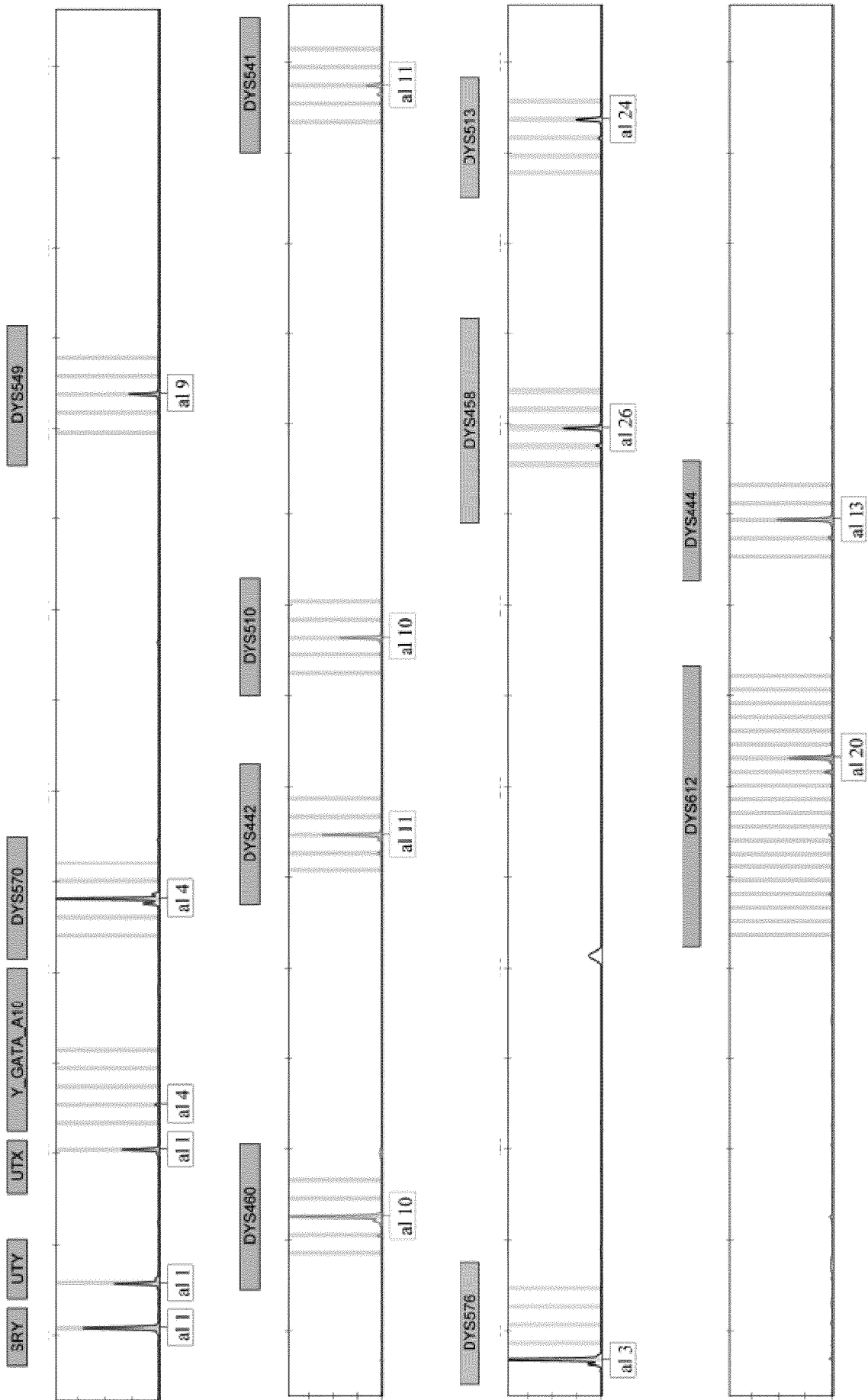


Fig. 5

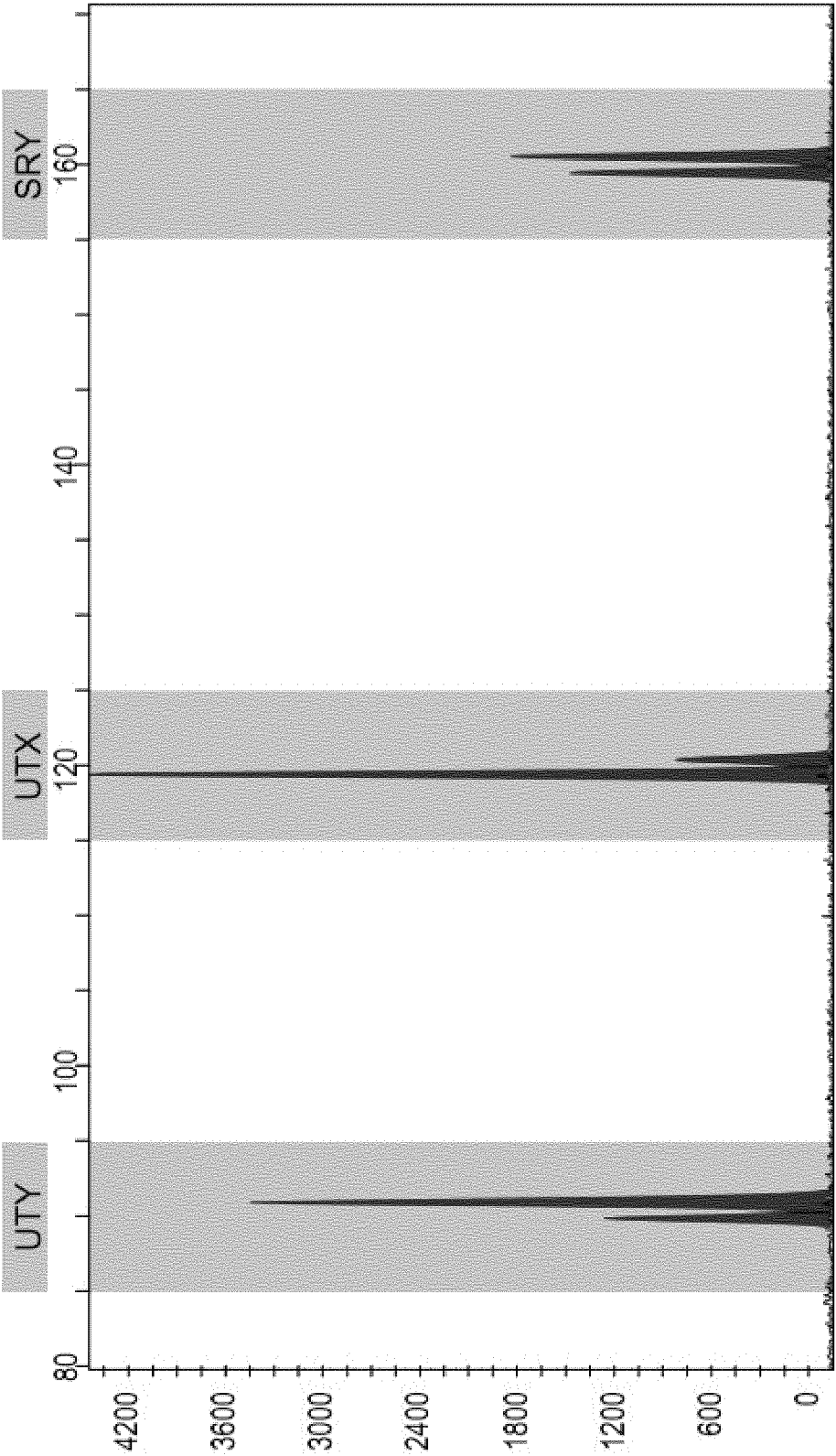


Fig. 6

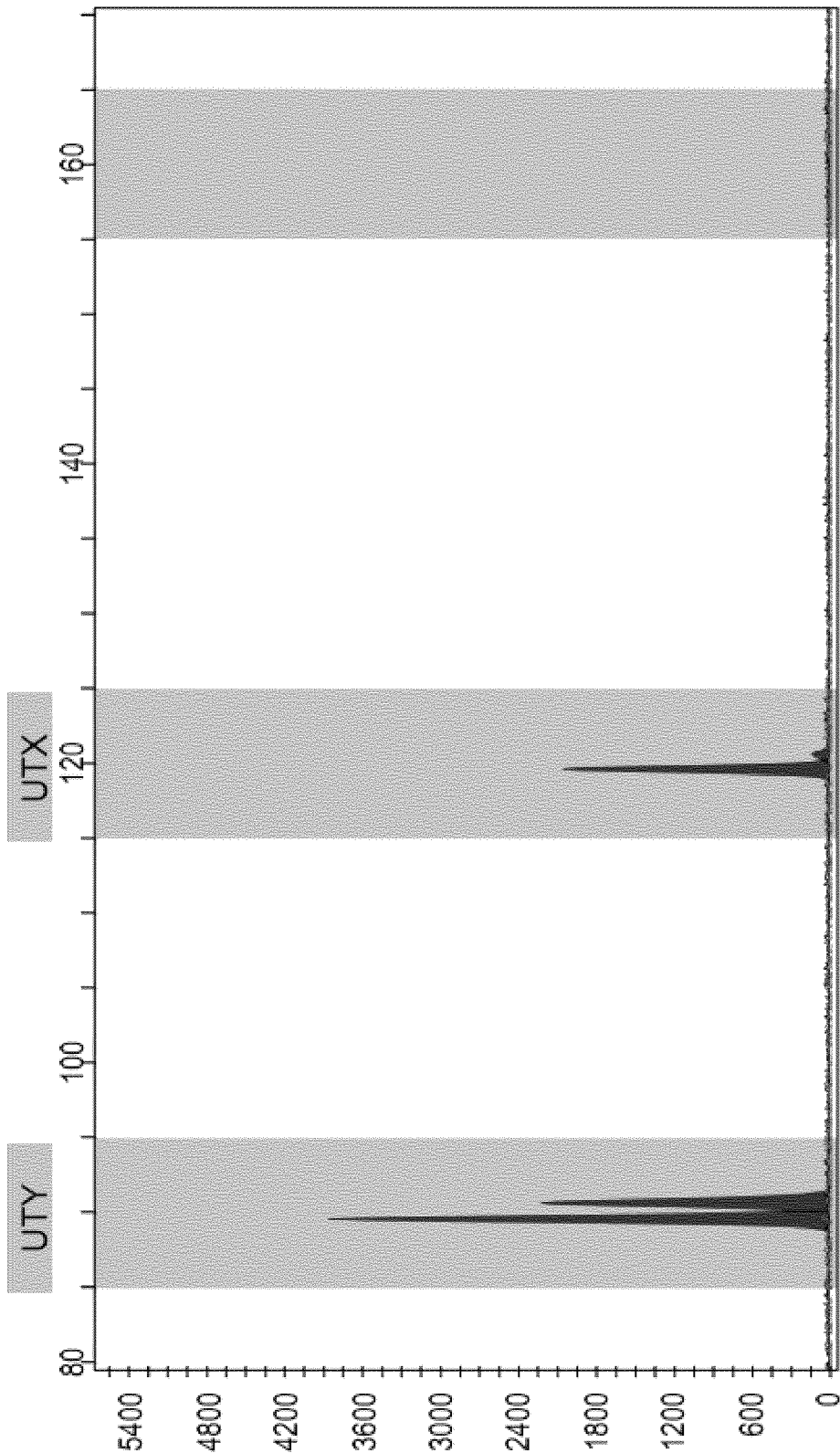


Fig. 7

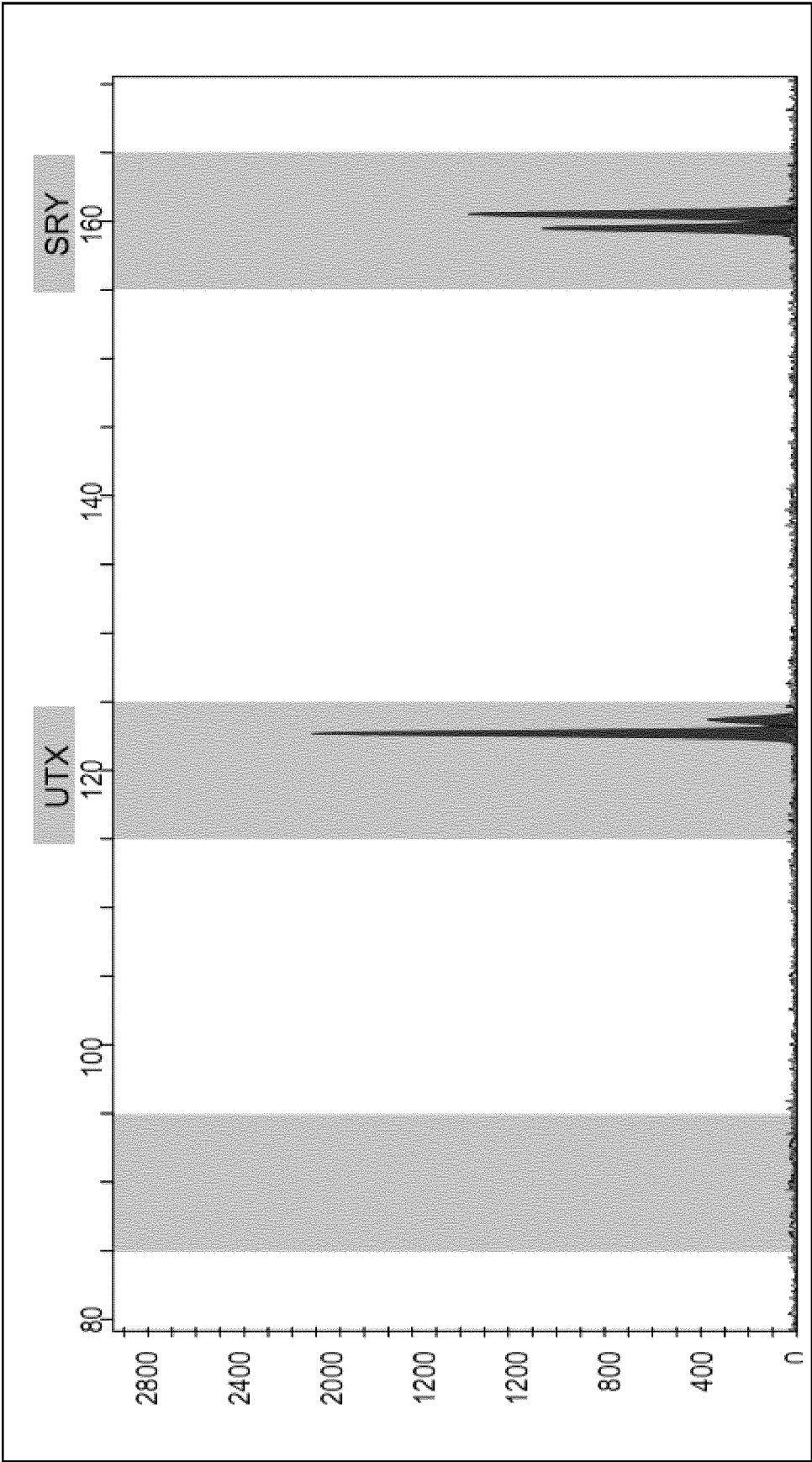


Fig. 8

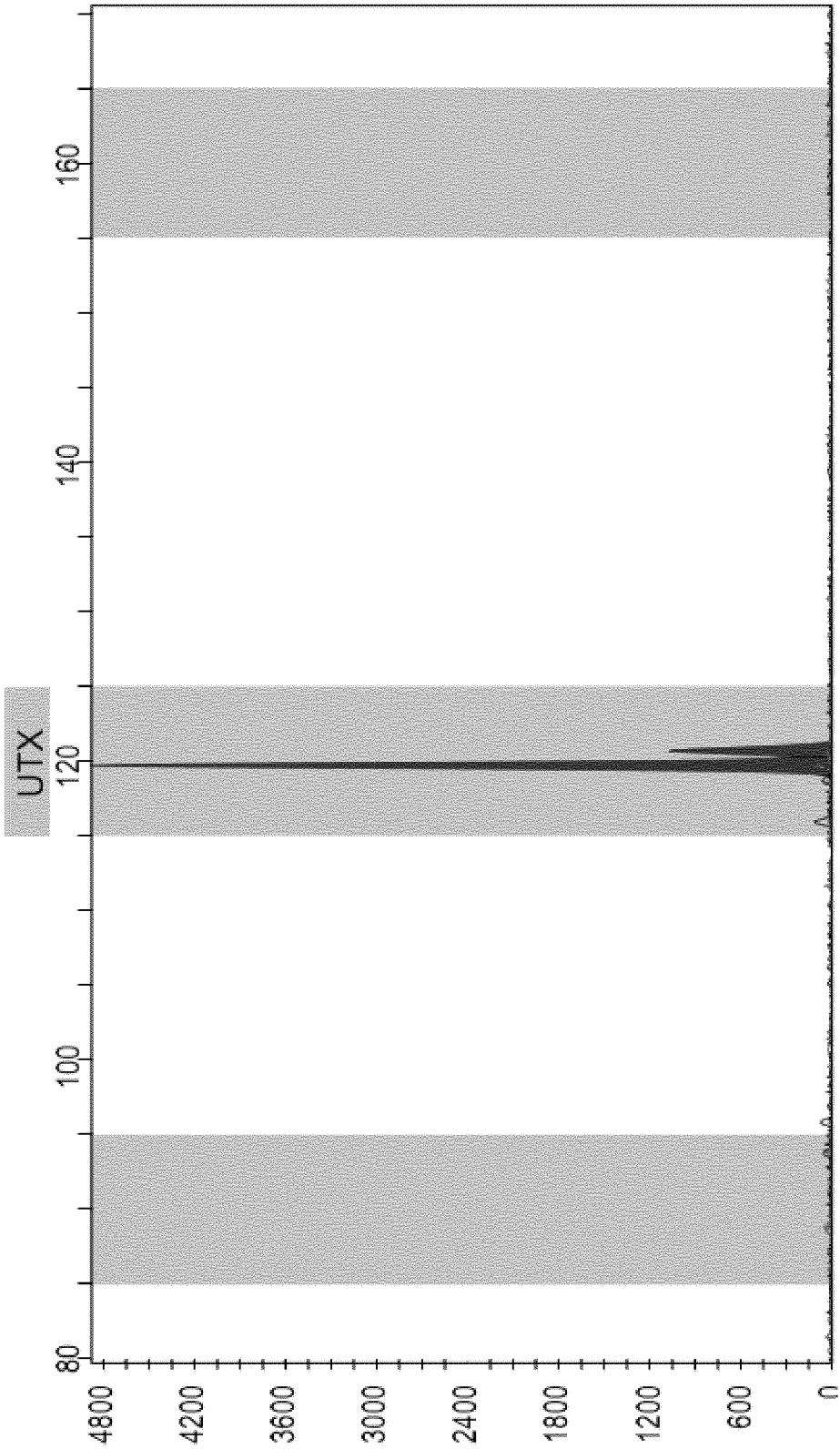


Fig. 9

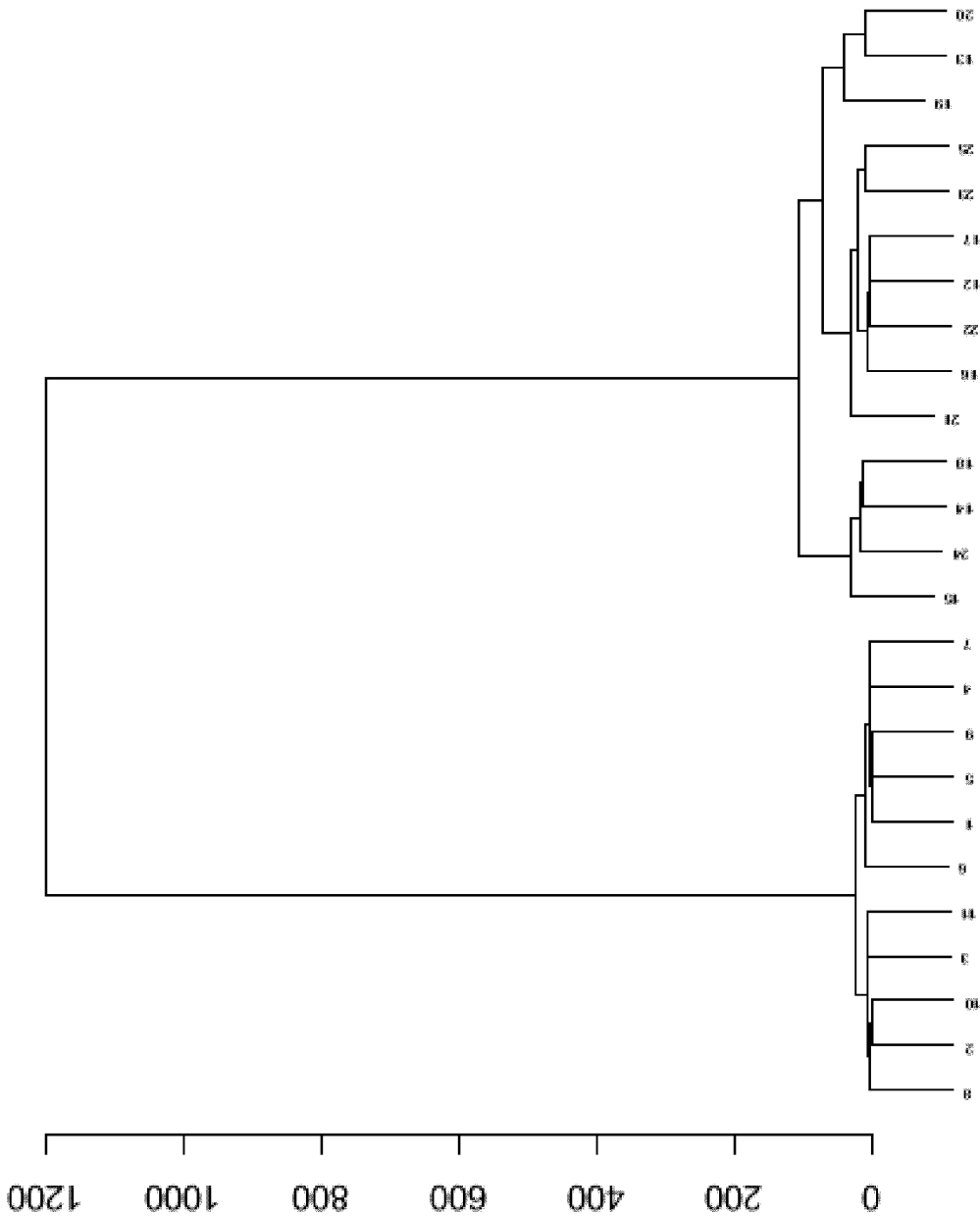


Fig. 10

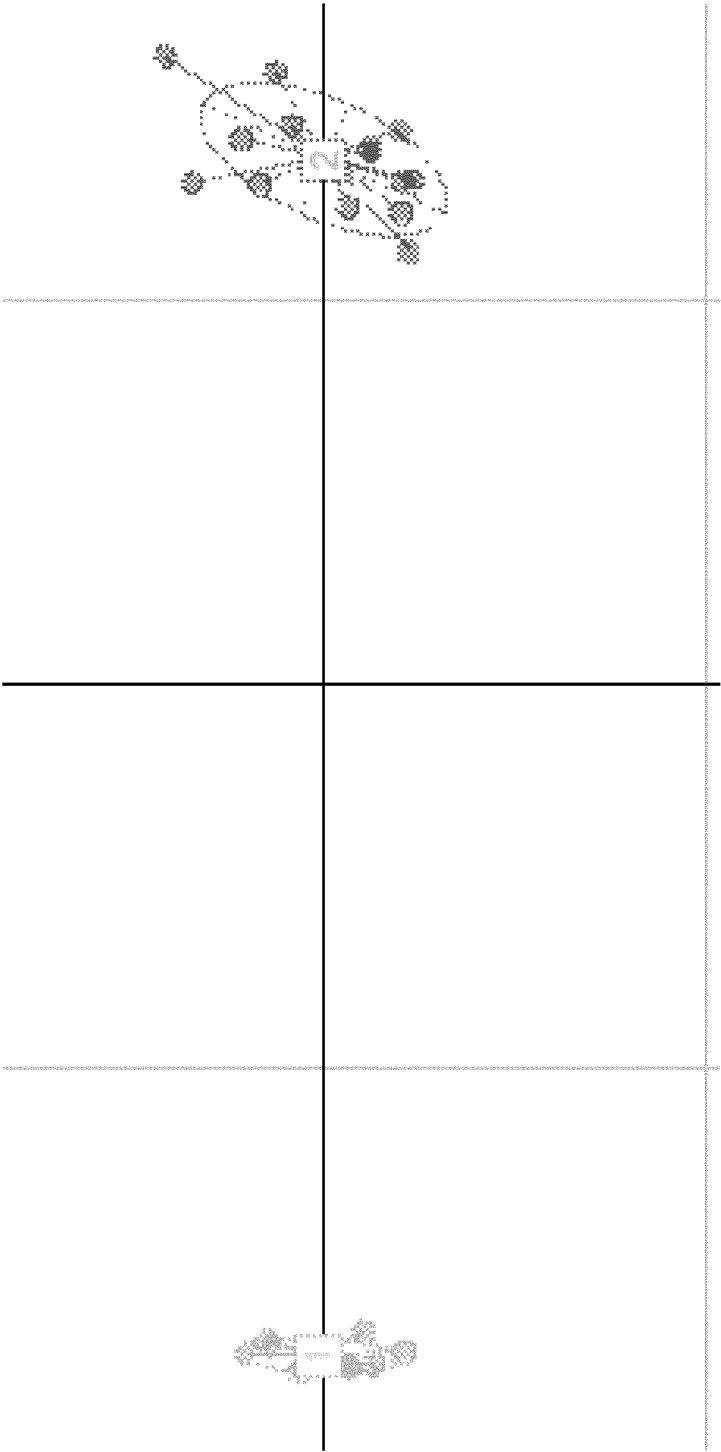


Fig. 11

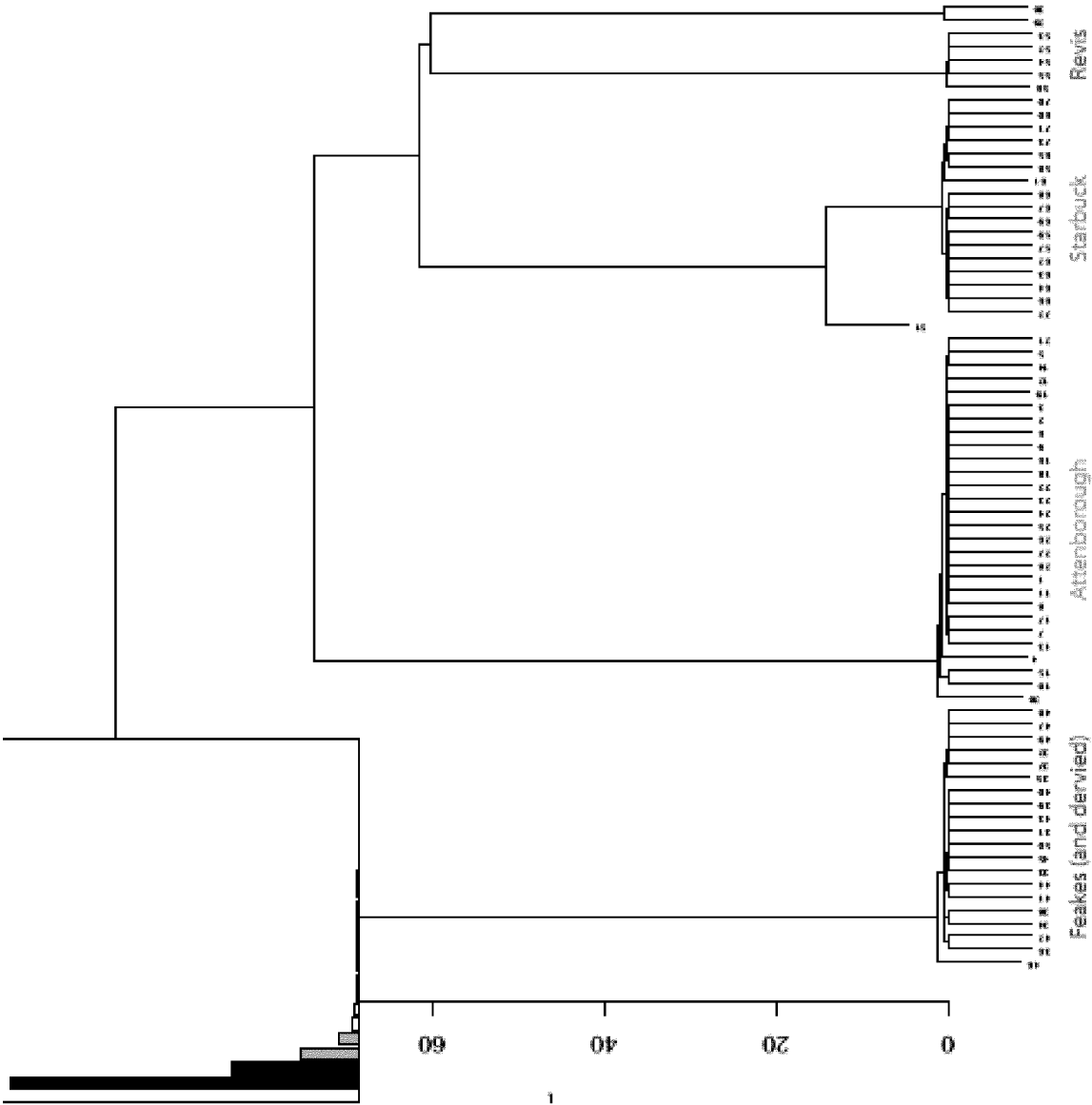


Fig. 12

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/EP2014/075866

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing filed or furnished:

a. (means)

☐

on paper

☒

in electronic form

b. (time)

☒

in the international application as filed

☐

together with the international application in electronic form

☐

subsequently to this Authority for the purposes of search

2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2014/075866

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C12Q1/68
ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C12Q

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, Sequence Search, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	GUSMAO L ET AL: "DNA Commission of the International Society of Forensic Genetics (ISFG): An update of the recommendations on the use of Y-STRs in forensic analysis", FORENSIC SCIENCE INTERNATIONAL, ELSEVIER SCIENTIFIC PUBLISHERS IRELAND LTD, IE, vol. 157, no. 2-3, 10 March 2006 (2006-03-10), pages 187-197, XP027939835, ISSN: 0379-0738 [retrieved on 2006-03-10] table 2 abstract the whole document ----- -/--	1-16



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

18 February 2015

Date of mailing of the international search report

03/03/2015

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Helliot, Bertrand

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2014/075866

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	KAYSER ET AL: "Relating two deep-rooted pedigrees from Central Germany by high-resolution Y-STR haplotyping", 20070601, vol. 1, no. 2, 1 June 2007 (2007-06-01), pages 125-128, XP022122482, table 1 abstract the whole document	1-16
A	----- WO 2012/155084 A1 (NETBIO INC [US]; SCHUMM JAMES W [US]; SELDEN RICHARD F [US]; TAN EUGEN) 15 November 2012 (2012-11-15) claim 18 abstract the whole document	1-16
A	----- HANSON E K ET AL: "Population data for 48 'Non-Core' Y chromosome STR loci", LEGAL MEDICINE, JAPANESE SOCIETY OF LEGAL MEDICINE, TOKYO, JP, vol. 9, no. 4, 1 July 2007 (2007-07-01), pages 221-231, XP025321576, ISSN: 1344-6223, DOI: 10.1016/J.LEGALMED.2006.12.002 [retrieved on 2007-05-30] abstract the whole document	1-16
A	----- AXEL ERLER ET AL: "Development of Y-chromosomal microsatellite markers for nonhuman primates", MOLECULAR ECOLOGY, vol. 13, no. 10, 14 October 2004 (2004-10-14), pages 2921-2930, XP055127332, ISSN: 0962-1083, DOI: 10.1111/j.1365-294X.2004.02304.x table 1 abstract the whole document	1-16
A	----- BUTLER J M ET AL: "Allele frequencies for 27 Y-STR loci with U.S. Caucasian, African American, and Hispanic samples", FORENSIC SCIENCE INTERNATIONAL, ELSEVIER SCIENTIFIC PUBLISHERS IRELAND LTD, IE, vol. 156, no. 2-3, 27 January 2006 (2006-01-27), pages 250-260, XP027939878, ISSN: 0379-0738 [retrieved on 2006-01-27] abstract the whole document ----- -/--	1-16

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2014/075866

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	RODIG ET AL: "Evaluation of haplotype discrimination capacity of 35 Y-chromosomal short tandem repeat loci", FORENSIC SCIENCE INTERNATIONAL, ELSEVIER SCIENTIFIC PUBLISHERS IRELAND LTD, IE, vol. 174, no. 2-3, 8 January 2008 (2008-01-08), pages 182-188, XP022413310, ISSN: 0379-0738, DOI: 10.1016/J.FORSCIINT.2007.04.223 table 1 abstract the whole document -----	1-16
A	MIRIAM GOEDBLOED ET AL: "Comprehensive mutation analysis of 17 Y-chromosomal short tandem repeat polymorphisms included in the AmpFISTRTM YfilerTM PCR amplification kit", INTERNATIONAL JOURNAL OF LEGAL MEDICINE, SPRINGER, BERLIN, DE, vol. 123, no. 6, 26 March 2009 (2009-03-26), pages 471-482, XP019760116, ISSN: 1437-1596, DOI: 10.1007/S00414-009-0342-Y tables 1-2 abstract the whole document -----	1-16
A	ERIN K. HANSON ET AL: "An Ultra-High Discrimination Y Chromosome Short Tandem Repeat Multiplex DNA Typing System", PLOS ONE, vol. 2, no. 8, 1 August 2007 (2007-08-01), page e688, XP055062352, DOI: 10.1371/journal.pone.0000688 table 1 abstract the whole document -----	1-16
A	KAYE N. BALLANTYNE ET AL: "Mutability of Y-Chromosomal Microsatellites: Rates, Characteristics, Molecular Bases, and Forensic Implications", THE AMERICAN JOURNAL OF HUMAN GENETICS, vol. 87, no. 3, 1 September 2010 (2010-09-01), pages 341-353, XP055079876, ISSN: 0002-9297, DOI: 10.1016/j.ajhg.2010.08.006 abstract the whole document ----- -/--	1-16

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2014/075866

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	VERMEULEN M ET AL: "Improving global and regional resolution of male lineage differentiation by simple single-copy Y-chromosomal short tandem repeat polymorphisms", FORENSIC SCIENCE INTERNATIONAL: GENETICS, ELSEVIER BV, NETHERLANDS, vol. 3, no. 4, 1 September 2009 (2009-09-01), pages 205-213, XP026396384, ISSN: 1872-4973, DOI: 10.1016/J.FSIGEN.2009.01.009 [retrieved on 2009-02-23] table 2 abstract the whole document	1-16
A	MAYBRUCK J L ET AL: "A comparative analysis of two different sets of Y-chromosome short tandem repeats (Y-STRs) on a common population panel", FORENSIC SCIENCE INTERNATIONAL: GENETICS, ELSEVIER BV, NETHERLANDS, vol. 4, no. 1, 1 December 2009 (2009-12-01), pages 11-20, XP026789909, ISSN: 1872-4973, DOI: 10.1016/J.FSIGEN.2009.03.004 [retrieved on 2009-05-17] table 2 abstract the whole document	1-16
A	ERIN HANSON ET AL: "Performance Evaluation and Optimization of Multiplex PCRs for the Highly Discriminating OSU 10-Locus Set Y-STRs*,+", JOURNAL OF FORENSIC SCIENCES, vol. 57, no. 1, 21 September 2011 (2011-09-21), pages 52-59, XP055127616, ISSN: 0022-1198, DOI: 10.1111/j.1556-4029.2011.01910.x abstract the whole document	1-16

-/--

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2014/075866

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	VILLESEN PALLE ET AL: "Fast and non-invasive PCR sexing of primates: apes, Old World monkeys, New World monkeys and Strepsirrhines", BMC ECOLOGY, BIOMED CENTRAL LTD., LONDON, GB, vol. 6, no. 1, 8 June 2006 (2006-06-08), page 8, XP021017110, ISSN: 1472-6785, DOI: 10.1186/1472-6785-6-8 abstract the whole document	1-16
A	----- A GREENFIELD ET AL: "The UTX gene escapes X inactivation in mice and humans", HUMAN MOLECULAR GENETICS, vol. 7, no. 4, 1 April 1998 (1998-04-01), pages 737-742, XP055127629, DOI: 10.1093/hmg/7.4.737 abstract the whole document -----	1-16

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2014/075866

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2012155084 A1	15-11-2012	AU 2012253271 A1	09-01-2014
		CA 2835620 A1	15-11-2012
		CN 103917661 A	09-07-2014
		EP 2707509 A1	19-03-2014
		JP 2014515926 A	07-07-2014
		KR 20140071967 A	12-06-2014
		TW 201311952 A	16-03-2013
		US 2012309637 A1	06-12-2012
		US 2013184176 A1	18-07-2013
		WO 2012155084 A1	15-11-2012

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°

PCT/EP2014/075866

Cadre N° I Séquence(s) de nucléotides ou d'acides aminés (suite du point 1.c de la première feuille)

1. En ce qui concerne la ou les séquences de nucléotides ou d'acides aminés divulguées dans la demande internationale, le cas échéant, la recherche internationale a été effectuée sur la base des éléments suivants:
 - a. (support)
☐ sur papier
☒ sous forme électronique
 - b. (moment)
☒ dans la demande internationale telle que déposée
☐ avec la demande internationale, sous forme électronique
☐ ultérieurement à la présente administration aux fins de la recherche
2. ☐ De plus, lorsque plus d'une version ou d'une copie d'un listage des séquences ou d'un ou plusieurs tableaux y relatifs a été déposée, la déclarations requises selon lesquelles les informations fournies ultérieurement ou au titre de copies supplémentaires sont identiques à celles initialement fournies et ne vont pas au-delà de la divulgation faite dans la demande internationale telle que déposée initialement, selon le cas, ont été remises.
3. Commentaire complémentaires:

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°

PCT/EP2014/075866

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE INV. C12Q1/68 ADD.		
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB		
B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE		
Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement) C12Q		
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche		
Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés) EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, Sequence Search, EMBASE		
C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	GUSMAO L ET AL: "DNA Commission of the International Society of Forensic Genetics (ISFG): An update of the recommendations on the use of Y-STRs in forensic analysis", FORENSIC SCIENCE INTERNATIONAL, ELSEVIER SCIENTIFIC PUBLISHERS IRELAND LTD, IE, vol. 157, no. 2-3, 10 mars 2006 (2006-03-10), pages 187-197, XP027939835, ISSN: 0379-0738 [extrait le 2006-03-10] tableau 2 abrégé le document en entier ----- -/-	1-16
☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents ☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe		
* Catégories spéciales de documents cités: "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée) "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée "T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention "X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément "Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier "&" document qui fait partie de la même famille de brevets		
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée 18 février 2015		Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale 03/03/2015
Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Fonctionnaire autorisé Helliot, Bertrand

C(suite). DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	KAYSER ET AL: "Relating two deep-rooted pedigrees from Central Germany by high-resolution Y-STR haplotyping", 20070601, vol. 1, no. 2, 1 juin 2007 (2007-06-01), pages 125-128, XP022122482, tableau 1 abrégé le document en entier -----	1-16
A	WO 2012/155084 A1 (NETBIO INC [US]; SCHUMM JAMES W [US]; SELDEN RICHARD F [US]; TAN EUGEN) 15 novembre 2012 (2012-11-15) revendication 18 abrégé le document en entier -----	1-16
A	HANSON E K ET AL: "Population data for 48 'Non-Core' Y chromosome STR loci", LEGAL MEDICINE, JAPANESE SOCIETY OF LEGAL MEDICINE, TOKYO, JP, vol. 9, no. 4, 1 juillet 2007 (2007-07-01), pages 221-231, XP025321576, ISSN: 1344-6223, DOI: 10.1016/J.LEGALMED.2006.12.002 [extrait le 2007-05-30] abrégé le document en entier -----	1-16
A	AXEL ERLER ET AL: "Development of Y-chromosomal microsatellite markers for nonhuman primates", MOLECULAR ECOLOGY, vol. 13, no. 10, 14 octobre 2004 (2004-10-14), pages 2921-2930, XP055127332, ISSN: 0962-1083, DOI: 10.1111/j.1365-294X.2004.02304.x tableau 1 abrégé le document en entier -----	1-16
A	BUTLER J M ET AL: "Allele frequencies for 27 Y-STR loci with U.S. Caucasian, African American, and Hispanic samples", FORENSIC SCIENCE INTERNATIONAL, ELSEVIER SCIENTIFIC PUBLISHERS IRELAND LTD, IE, vol. 156, no. 2-3, 27 janvier 2006 (2006-01-27), pages 250-260, XP027939878, ISSN: 0379-0738 [extrait le 2006-01-27] abrégé le document en entier -----	1-16
	-/--	

C(suite). DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	RODIG ET AL: "Evaluation of haplotype discrimination capacity of 35 Y-chromosomal short tandem repeat loci", FORENSIC SCIENCE INTERNATIONAL, ELSEVIER SCIENTIFIC PUBLISHERS IRELAND LTD, IE, vol. 174, no. 2-3, 8 janvier 2008 (2008-01-08), pages 182-188, XP022413310, ISSN: 0379-0738, DOI: 10.1016/J.FORSCIINT.2007.04.223 tableau 1 abrégé le document en entier -----	1-16
A	MIRIAM GOEDBLOED ET AL: "Comprehensive mutation analysis of 17 Y-chromosomal short tandem repeat polymorphisms included in the AmpFISTRÂ™ YfilerÂ™ PCR amplification kit", INTERNATIONAL JOURNAL OF LEGAL MEDICINE, SPRINGER, BERLIN, DE, vol. 123, no. 6, 26 mars 2009 (2009-03-26), pages 471-482, XP019760116, ISSN: 1437-1596, DOI: 10.1007/S00414-009-0342-Y tableaux 1-2 abrégé le document en entier -----	1-16
A	ERIN K. HANSON ET AL: "An Ultra-High Discrimination Y Chromosome Short Tandem Repeat Multiplex DNA Typing System", PLOS ONE, vol. 2, no. 8, 1 août 2007 (2007-08-01), page e688, XP055062352, DOI: 10.1371/journal.pone.0000688 tableau 1 abrégé le document en entier -----	1-16
A	KAYE N. BALLANTYNE ET AL: "Mutability of Y-Chromosomal Microsatellites: Rates, Characteristics, Molecular Bases, and Forensic Implications", THE AMERICAN JOURNAL OF HUMAN GENETICS, vol. 87, no. 3, 1 septembre 2010 (2010-09-01), pages 341-353, XP055079876, ISSN: 0002-9297, DOI: 10.1016/j.ajhg.2010.08.006 abrégé le document en entier ----- -/--	1-16

C(suite). DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	VERMEULEN M ET AL: "Improving global and regional resolution of male lineage differentiation by simple single-copy Y-chromosomal short tandem repeat polymorphisms", FORENSIC SCIENCE INTERNATIONAL: GENETICS, ELSEVIER BV, NETHERLANDS, vol. 3, no. 4, 1 septembre 2009 (2009-09-01), pages 205-213, XP026396384, ISSN: 1872-4973, DOI: 10.1016/J.FSIGEN.2009.01.009 [extrait le 2009-02-23] tableau 2 abrégé le document en entier -----	1-16
A	MAYBRUCK J L ET AL: "A comparative analysis of two different sets of Y-chromosome short tandem repeats (Y-STRs) on a common population panel", FORENSIC SCIENCE INTERNATIONAL: GENETICS, ELSEVIER BV, NETHERLANDS, vol. 4, no. 1, 1 décembre 2009 (2009-12-01), pages 11-20, XP026789909, ISSN: 1872-4973, DOI: 10.1016/J.FSIGEN.2009.03.004 [extrait le 2009-05-17] tableau 2 abrégé le document en entier -----	1-16
A	ERIN HANSON ET AL: "Performance Evaluation and Optimization of Multiplex PCRs for the Highly Discriminating OSU 10-Locus Set Y-STRs*,+", JOURNAL OF FORENSIC SCIENCES, vol. 57, no. 1, 21 septembre 2011 (2011-09-21), pages 52-59, XP055127616, ISSN: 0022-1198, DOI: 10.1111/j.1556-4029.2011.01910.x abrégé le document en entier ----- -/--	1-16

C(suite). DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	VILLESEN PALLE ET AL: "Fast and non-invasive PCR sexing of primates: apes, Old World monkeys, New World monkeys and Strepsirrhines", BMC ECOLOGY, BIOMED CENTRAL LTD., LONDON, GB, vol. 6, no. 1, 8 juin 2006 (2006-06-08), page 8, XP021017110, ISSN: 1472-6785, DOI: 10.1186/1472-6785-6-8 abrégé le document en entier -----	1-16
A	A GREENFIELD ET AL: "The UTX gene escapes X inactivation in mice and humans", HUMAN MOLECULAR GENETICS, vol. 7, no. 4, 1 avril 1998 (1998-04-01), pages 737-742, XP055127629, DOI: 10.1093/hmg/7.4.737 abrégé le document en entier -----	1-16

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande internationale n°

PCT/EP2014/075866

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 2012155084 A1	15-11-2012	AU 2012253271 A1	09-01-2014
		CA 2835620 A1	15-11-2012
		CN 103917661 A	09-07-2014
		EP 2707509 A1	19-03-2014
		JP 2014515926 A	07-07-2014
		KR 20140071967 A	12-06-2014
		TW 201311952 A	16-03-2013
		US 2012309637 A1	06-12-2012
		US 2013184176 A1	18-07-2013
		WO 2012155084 A1	15-11-2012
