

(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
29 novembre 2012 (29.11.2012)

WIPO | PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 2012/160277 A1

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

(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/FR2012/000212

(22) Date de dépôt international :
25 mai 2012 (25.05.2012)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :
11/54606 26 mai 2011 (26.05.2011) FR

(71) Déposants (pour tous les États désignés sauf US) : **UNIVERSITE JOSEPH FOURIER (GRENOBLE 1)** [FR/FR]; Domaine Universitaire St Martin d'Hères, F-38041 Grenoble (FR). **CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE** [FR/FR]; 3, rue Michel Ange, F-75016 Paris (FR).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement) : **TABERLET, Pierre** [FR/FR]; 2, rue de Belledonne, F-38660 La Terrasse (FR). **COISSAC, Eric** [FR/FR]; Sous le Château, F-73110 Arvillard (FR). **RIAZ, Tiayyba** [FR/FR]; 2 rue des Beaux Tailleurs, F-38000 Grenoble (FR).

(74) Mandataire : **CABINET GERMAIN & MAUREAU**; BIP 6153, F-69466 Lyon Cedex 06 (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, 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, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, 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, 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, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publiée :

- avec rapport de recherche internationale (Art. 21(3))
- avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si des modifications sont reçues (règle 48.2.h))
- avec la partie de la description réservée au listage des séquences (règle 5.2.a))

(54) Title : UNIVERSAL PRIMERS AND THE USE THEREOF FOR THE DETECTION AND IDENTIFICATION OF VERTEBRATE SPECIES

(54) Titre : AMORCES UNIVERSELLES ET LEUR UTILISATION POUR LA DÉTECTION ET L'IDENTIFICATION D'ESPÈCES DE VERTÉBRÉS

(57) Abstract : The invention relates to oligonucleotides and to the use thereof as universal primers for the detection and identification of vertebrate species, especially in complex and deteriorated substrates. The invention also relates to a method for detecting and identifying vertebrate species in samples collected from the environment (ground, water, faeces) or from industry (transformed products, flours). The invention further relates to a kit for said detection.

(57) Abrégé : La présente invention concerne des oligonucléotides et leur utilisation comme amorces universelles pour la détection et l'identification d'espèces de vertébrés, notamment dans des substrats complexes et dégradés. La présente invention concerne également un procédé de détection et d'identification des espèces de vertébrés dans des échantillons collectés dans l'environnement (sol, eau, fèces) ou dans l'industrie (produits transformés, farines). La présente invention propose également un kit en vue de cette détection.



WO 2012/160277 A1

Amorces universelles et leur utilisation pour la détection et l'identification d'espèces de vertébrés

La présente invention concerne des oligonucléotides et leur utilisation comme amorces universelles pour la détection et l'identification d'espèces de vertébrés, notamment dans des substrats complexes et dégradés.

5 L'identification taxonomique basée sur l'analyse de l'ADN est une approche couramment utilisée aujourd'hui pour identifier des espèces au sein d'un mélange. Un consortium international nommé Barcode for Life a été créé avec comme objectif de permettre la détection d'espèces animales ou végétales à partir d'une séquence d'ADN. Pour identifier les animaux,
10 l'approche consiste à amplifier puis à séquencer une séquence de 648 paires de base du gène mitochondrial cytochrome c oxidase 1 ("CO1"). CO1 s'est montré efficace pour l'identification des oiseaux, papillons, poissons, mouches et autres groupes animaux (Hebert *et al.*, 2003). Pour les végétaux, la situation est plus complexe et deux autres séquences d'ADN chloroplastiques, *matK*
15 and *rbcL*, ont été proposées (Hollingsworth *et al.*, 2009). Il s'avère néanmoins que les fragments choisis selon cette méthode sont de longueur trop longue (supérieure à 500 nucléotides) pour être utilisés dans des substrats dégradés. Or, dans de très nombreuses situations, les substrats à analyser contiennent de l'ADN dégradé, avec souvent des fragments de moins de 100 nucléotides.
20 C'est le cas notamment des échantillons collectés dans l'environnement (sol, eau, fèces) ou des matrices utilisées dans l'industrie, par exemple les farines animales ou les plats industriels de l'industrie alimentaire.

Une solution pour la détection et l'identification spécifique consiste à analyser des fragments d'ADN informatifs de petite taille (Poinar *et al.*, 1998;
25 Willersley *et al.*, 2003 ; Willersley *et al.*, 2007). Des amorces ont ainsi été définies afin d'amplifier des fragments d'ADN végétaux plus courts dans des échantillons de sols gelés. Néanmoins, les amorces permettent d'identifier les familles mais pas les espèces végétales. En outre, les amorces n'ont pas été choisies de manière à amplifier des séquences suffisamment conservées dans
30 le règne végétal pour permettre l'amplification de toute espèce végétale. En d'autres mots, ces amorces ne sont pas véritablement universelles.

WO 2006/024751 décrit un procédé permettant de détecter simultanément dans un échantillon de matière biologique la présence éventuelle de matières biologiques par réaction de polymérisation en chaîne
35 (PCR) puis hybridation avec des sondes. Les amorces décrites sont très dégénérées (presque chaque codon comporte un nucléotide dégénéré) et

manquent par conséquent de spécificité pour l'amplification de l'ADN de vertébrés.

Le brevet EP1797201 propose des oligonucléotides permettant la détection et l'identification de végétaux dans des substrats complexes ou dégradés car la région amplifiée est à la fois courte et très variable. Plus
5 précisément, la région amplifiée correspond à une région variable de l'intron du gène chloroplastique *trnL* du tabac. A cet égard, référence est faite également à l'article de Taberlet *et al.*, 2007.

Les amorces décrites dans ce brevet sont spécifiques des espèces
10 végétales et elles ne permettent pas l'identification et la détection des espèces de vertébrés dans des substrats complexes ou dégradés.

La présente invention propose de nouveaux oligonucléotides et leurs utilisations comme amorces universelles pour l'identification et la détection des espèces vertébrés. Ces amorces permettent à la fois d'amplifier
15 une région courte (moins de 120 paires de base), une région très variable entre les espèces vertébrées et une région présentant dans le même temps des régions flanquantes très conservées permettant l'amplification à l'aide une seule et unique paire d'amorces. Ainsi ces amorces peuvent être utilisées dans des mélanges complexes et dégradés, par exemple des échantillons de sols,
20 de fèces et d'eau. De telles amorces trouvent notamment des applications dans l'analyse des plats industriels susceptibles de contenir des mélanges de viandes ou de poissons, mais également pour l'analyse des régimes alimentaires des carnivores à partir des fèces.

Plus précisément, ces amorces permettent d'amplifier une région
25 12S de l'ADN mitochondrial. Il est particulièrement intéressant de disposer d'amorces permettant l'amplification d'ADN mitochondrial car celui-ci représente une cible très accessible dans le cas de substrats dégradés. De plus, l'ADN mitochondrial est présent de manière répétée dans chaque cellule.

Les amorces universelles objet de la présente invention sont
30 particulièrement avantageuses car elles sont extrêmement spécifiques des vertébrés et n'amplifient aucun autre groupe taxonomique.

Description de l'invention

La présente concerne une paire d'oligonucléotides, selon laquelle le premier oligonucélotide s'hybride de manière sélective à la séquence SEQ ID NO. 3 et le deuxième nucléotide s'hybride de manière sélective à la séquence SEQ ID NO. 4 dans des conditions de stringences suffisantes pour l'amplification d'une région variable du gène mitochondrial 12S des vertébrés par réaction de polymérisation en chaîne (PCR).

Selon un aspect de l'invention, la région amplifiée du gène mitochondrial 12S comporte moins de 120 nucléotides (amorces non comprises).

Selon un autre aspect de l'invention, le premier oligonucléotide présente une séquence nucléotidique SEQ ID NO. 1 ou SEQ ID NO. 6-8 et le deuxième oligonucléotide présente une séquence nucléotidique sélectionnés dans le groupe consistant en SEQ ID NO. 2 et SEQ ID NO. 5.

Selon un autre aspect encore de l'invention, la région amplifiée par réaction de polymérisation en chaîne présente une séquence nucléotidique sélectionnée dans le groupe consistant SEQ ID NO. 9-100.

La présente invention concerne également un procédé d'amplification d'une région du gène mitochondrial 12S, comprenant les étapes suivantes :

a) on dispose d'un échantillon susceptible de contenir de l'ADN d'espèces vertébrés ;

b) on réalise une réaction d'amplification en chaîne en utilisant une paire d'oligonucléotides selon l'invention.

La présente invention propose également un procédé de détection d'une espèce vertébrée dans un échantillon, comprenant les étapes suivantes :

a) on dispose d'un échantillon susceptible de contenir de l'ADN d'espèces vertébrés ;

b) on isole l'ADN total contenu dans l'échantillon ;

c) on réalise une réaction d'amplification en chaîne en utilisant une paire d'oligonucléotides selon l'invention ; et

d) on détecte l'éventuelle présence d'un produit d'amplification.

La présente invention concerne également un procédé de détection et d'identification d'une espèce vertébrée dans un échantillon, comprenant les étapes suivantes :

a) on dispose d'un échantillon susceptible de contenir de l'ADN d'espèces vertébrés ;

b) on isole l'ADN total contenu dans l'échantillon ;

c) on réalise une réaction d'amplification en chaîne en utilisant une
5 paire d'oligonucléotides selon l'invention;

d) on détecte la présence d'un produit d'amplification ; et

e) on détermine la séquence du produit d'amplification pour identifier l'espèce de vertébré contenue dans l'échantillon.

Un autre objet de la présente invention concerne également un kit
10 pour la détection d'une espèce de vertébré dans un échantillon, comprenant une paire d'oligonucléotides selon l'une quelconque des revendications 1 à 4 et au moins un réactif additionnel.

Selon un aspect de l'invention, le kit comprend une amorce de blocage selon SEQ ID NO. 101.

15 Selon un autre aspect de l'invention, le kit comprend en outre au moins au moins une autre paire d'oligonucléotides choisis parmi les paires d'amorces :

- amorces d'amplification selon SEQ ID NO.102 et SEQ ID NO.103;

- amorces d'amplification selon SEQ ID NO.104 et SEQ ID NO.105;

20 - amorces d'amplification selon SEQ ID NO.106 et SEQ ID NO.107, éventuellement avec amorce de blocage selon SEQ ID NO.108 ;

- amorces d'amplification selon SEQ ID NO.109 et SEQ ID NO.110;

- amorces d'amplification selon SEQ ID NO.111 et SEQ ID NO.112;

- amorces d'amplification selon SEQ ID NO.113 et SEQ ID NO.114;

25 - amorces d'amplification selon SEQ ID NO.115 et SEQ ID NO.116;

- amorces d'amplification selon SEQ ID NO.117 et SEQ ID NO.118;

- amorces d'amplification selon SEQ ID NO.119 et SEQ ID NO.120;

- amorces d'amplification selon SEQ ID NO.121 et SEQ ID NO.122,

éventuellement avec amorce de blocage selon SEQ ID NO.123 ;

30 - amorces d'amplification selon SEQ ID NO.124 et SEQ ID NO.125, éventuellement avec amorce de blocage selon SEQ ID NO.126 ;

- amorces d'amplification selon SEQ ID NO.127 et SEQ ID NO.128,

éventuellement avec amorce de blocage selon SEQ ID NO.129 ;

- amorces d'amplification selon SEQ ID NO.130 et SEQ ID NO.131,

35 éventuellement avec amorce de blocage selon SEQ ID NO.132 ;

- amorces d'amplification selon SEQ ID NO.133 et SEQ ID NO.134, éventuellement avec amorce de blocage selon SEQ ID NO.135 et/ou SEQ ID NO.136; et

- 5 - amorces d'amplification selon SEQ ID NO.137 et SEQ ID NO.138, éventuellement avec amorce de blocage selon SEQ ID NO.139.

L'invention concerne aussi l'utilisation de la région variable du gène mitochondrial 12S des vertébrés correspondant aux positions 1094 à 1193 du gène mitochondrial de l'Homme pour détecter des espèces de vertébrés.

- 10 Selon un aspect de l'invention, la région variable est sélectionnée dans le groupe consistant en SEQ ID NO.9-100 en vue de cette utilisation.

Description du listage de séquences

SEQ ID NO.1 : amorce 12S-V05_F

SEQ ID NO.2 : amorce 12S-V05_R

- 15 SEQ ID NO.3 : séquence de la région complémentaire de l'amorce 12S-V05_F

SEQ ID NO.4 : séquence de la région complémentaire de l'amorce 12S-V05_R

SEQ ID NO.5 : variant de l'amorce 12S-V05_R

SEQ ID NOS.6-8 : variants de l'amorce 12S-V05_F

- 20 SEQ ID NOS.9-100 : exemples de séquences variables amplifiées de différentes espèces de vertébrés (11 séquences d'amphibiens ; 28 séquences d'oiseaux ; 5 séquences de poissons chondrichthyens ; 27 séquences de mammifères ; 9 séquences de reptiles ; 12 séquences de poissons téléostéens)

- 25 SEQ ID NOS.101, 108, 123, 126, 129, 132, 135, 136, 139-142 : amorces de blocage

SEQ ID NOS. 102-103, 104-105, 106-107, 109-110, 111-112, 113-114, 115-116, 117-118, 119-120, 121-122, 124-125, 127-128, 130-131, 133-134, 137-138 : paires d'amorces d'amplification additionnelles pouvant être ajoutées au kit de détection selon l'invention (15 paires d'amorces)

30

Paire d'oligonucléotides

- La présente invention concerne donc des oligonucléotides dérivés de deux régions conservées d'un gène 12S mitochondrial présent chez les vertébrés. Ces oligonucléotides peuvent être utilisés comme amorces pour
35 l'amplification et donc la détection de l'ADN de vertébrés dans un échantillon susceptible de contenir un tel ADN. En effet, les régions conservées dont sont

dérivés les polynucléotides de la présente invention flanquent une région à la fois courte et très variable de l'ADN des vertébrés, plus précisément une région courte et variable dans le gène 12S mitochondrial des vertébrés. La variabilité de cette région entre espèces de vertébrés peut donc être utilisée pour
5 détecter et identifier les espèces de vertébrés.

Selon la présente invention, on entend par « oligonucléotide » une chaîne nucléotidique simple brin ou son complémentaire pouvant être de type ADN ou ARN, ou une chaîne nucléotidique double brin pouvant être de type ADN complémentaire ou génomique. Selon un mode réalisation, les
10 oligonucléotides de l'invention sont de type ADN, notamment ADN double brin. Le terme « oligonucléotide » désigne également les polynucléotides modifiés. Les oligonucléotides modifiés sont par exemple des oligonucléotides conjugués à des réactifs de liaison (biotine par exemple) ou à des réactifs marqués (marqueurs fluorescents par exemple). Classiquement, les réactifs de liaison
15 ou les réactifs marqués conjugués aux oligonucléotides facilitent la purification ou la détection de ces oligonucléotides.

Les oligonucléotides de la présente invention peuvent être préparés par synthèse chimique ou par des techniques classiques de biologie moléculaire telles que décrites par Sambrook, Fritsch et Maniatis, dans leur
20 ouvrage intitulé "Molecular cloning: a laboratory manual", édition : Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989. Les oligonucléotides de la présente invention peuvent également être isolés ou purifiés de leur environnement naturel.

Le terme « polynucléotide » peut ici être utilisé en remplacement du
25 terme « oligonucléotide » avec une signification équivalente.

On entend par « amorce » une courte séquence d'oligonucléotides qui, hybridée avec une matrice d'acide nucléique, permet à une polymérase d'entamer la synthèse d'un nouveau brin de l'ADN. Le brin produit à partir de l'amorce est complémentaire au brin utilisé comme matrice. Les amorces sont
30 notamment utilisées dans les réactions de polymérisation en chaîne (PCR).

On entend par « espèce de vertébré » ou « espèce vertébrée » tout organisme faisant partie du sous-embranchement vertébré du règne animal.

La présente invention concerne donc une paire d'oligonucléotides selon laquelle le premier oligonucléotide s'hybride de manière sélective à une
35 région très conservée du gène mitochondrial 12S des vertébrés et le deuxième nucléotide s'hybride de manière sélective à une autre région très conservée du

gène mitochondrial 12S des vertébrés dans des conditions de stringences suffisantes pour l'amplification de la région variable du gène mitochondrial 12S des vertébrés par réaction de polymérisation en chaîne (PCR), par exemple dans des conditions de forte stringence. La séquence de la première région conservée correspond à la séquence de l'amorce 12S-V05_F (SEQ ID NO. 1) et de sa séquence complémentaire (SEQ ID NO. 3). La séquence de la deuxième région conservée correspond à la séquence de l'amorce 12S-V05_R (SEQ ID NO.2) et de sa séquence complémentaire (SEQ ID NO. 4).

A titre d'exemple, chez l'Homme, le premier oligonucléotide de la présente invention se trouve à la position 1194 de la séquence NC_012920, Homo sapiens mitochondrion et le second oligonucléotide de l'invention se trouve à la position 1093 de cette même séquence.

L'homme du métier connaît les réactions d'amplification d'ADN et les conditions de stringence permettant une amplification sélective d'une séquence. L'homme du métier connaît en particulier les conditions de température d'hybridation et les conditions de composition du tampon d'hybridation.

L'homme du métier pourra donc facilement définir différentes variantes des amorces 12S-V05_F (SEQ ID NO. 1) et 12S-V05_R (SEQ ID NO. 2) en utilisant des techniques de routine. Ces variantes s'hybrident aux séquences de référence et permettent l'amplification sélective de la région variable d'intérêt de l'ADN mitochondrial 12S.

Une variante possible de l'amorce 12S-V05_R (SEQ ID NO.2) est représentée à la SEQ ID NO. 5. Certaines variantes possibles de l'amorce 12S-V05_F (SEQ ID NO. 1) sont représentées aux SEQ ID Nos. 6-8. Habituellement, les variations de séquence sont plutôt introduites à l'extrémité 5' des oligonucléotides pour ne pas compromettre la réaction d'amplification. Classiquement, on peut par exemple introduire des nucléotides supplémentaires à l'extrémité 5' des oligonucléotides.

Par « séquence capable de s'hybrider de manière sélective » ou « oligonucléotide capable de s'hybrider de manière sélective », on entend selon l'invention les séquences qui s'hybrident avec la séquence de référence à un niveau supérieur au bruit de fond de manière significative. Le niveau du signal généré par l'interaction entre la séquence capable de s'hybrider de manière sélective et les séquences de référence est généralement 10 fois, de préférence 100 fois plus intense que celui de l'interaction des autres

séquences d'ADN générant le bruit de fond. Les conditions d'hybridation stringentes permettant une hybridation sélective sont connues de l'homme du métier. En général, la température d'hybridation et de lavage est inférieure d'au moins 5°C, par exemple 10°C, au T_m de la séquence de référence à un pH donné et pour une force ionique donnée. Typiquement, la température d'hybridation est d'au moins 30°C pour un polynucléotide de 15 à 50 nucléotides et d'au moins 60°C pour un polynucléotide de plus de 50 nucléotides. A titre d'exemple, l'hybridation est réalisée dans le tampon suivant : 6X SSC, 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 1 mM EDTA, 0.02% PVP, 0.02% Ficoll, 0.02% BSA, 500 µg/ml sperme de saumon dénaturé DNA. Les lavages sont par exemple réalisés successivement à faible stringence dans un tampon 2X SSC, 0,1% SDS, à moyenne stringence dans un tampon 0,5X SSC, 01% SDS et à forte stringence dans un tampon 0,1X SSC, 0,1%SDS. L'hybridation peut bien entendu être effectuée selon d'autres méthodes usuelles connues de l'homme du métier (voir notamment Sambrook, Fritsch et Maniatis, dans leur ouvrage intitulé "Molecular cloning: a laboratory manual", édition : Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989).

Par « stringence », on entend la rigueur des conditions opératoires (notamment la température et la force ionique) dans lesquelles se déroule une hybridation moléculaire.

Le paramètre déterminant dans la spécificité et la réversibilité de l'hybridation moléculaire est le T_m ou température de fusion (melting temperature). C'est la température à laquelle la moitié de l'ADN est sous forme monobrin et l'autre moitié sous forme double brin. Le T_m dépend de nombreux facteurs tels que la longueur du fragment d'ADN considéré, sa richesse en cytosines et guanines et la concentration en sels, notamment en ion Na du milieu réactionnel. En pratique, l'expérimentateur peut créer ou supprimer l'hybridation moléculaire en choisissant une température du milieu réactionnel inférieure, égale ou supérieure au T_m. Les conditions de forte stringence sont celles pour lesquelles la température d'hybridation et de lavage est inférieure d'au moins 5°C et jusqu'à moins 10°C au T_m de la séquence de référence à un pH donné et pour une force ionique donnée.

Par « amplification », on entend toute amplification enzymatique *in vitro* d'une séquence définie d'ADN, notamment du type réaction de polymérisation en chaîne (ou Polymerase Chain Reaction, PCR).

Les amorces selon l'invention peuvent en outre comporter des étiquettes qui vont permettre d'identifier rapidement l'appartenance de chaque séquence amplifiée à un échantillon de départ. Le terme « queue » peut être utilisée de manière équivalente, à la place du terme « étiquette » (« tags » en anglais). Les étiquettes sont de courtes séquences nucléotidiques, généralement de longueur inférieure à 10 nucléotides. Ces étiquettes sont particulièrement utiles lorsqu'il s'agit d'utiliser des séquenceurs de nouvelle génération qui permettent de séquencer près de 100 000 séquences à la fois. En effet, chaque étiquette correspondant à un échantillon de départ à analyser, on peut ainsi mélanger plusieurs produits d'amplification avant de procéder au séquençage. Ceci est avantageux car mettre en œuvre un séquençage via un séquenceur de nouvelle génération peut s'avérer être une opération coûteuse. Dans la pratique, les amorces selon l'invention peuvent comporter un fragment nucléotidique additionnel du côté 5' spécifique de chaque échantillon. Après amplification de plusieurs échantillons, mélange des différents produits d'amplification ainsi obtenus, et séquençage, chaque séquence amplifiée est ainsi facilement assignée à un échantillon de départ. Les étiquettes constituent donc un outil particulièrement avantageux lorsqu'il s'agit de séquencer à haut débit (Binladen *et al.*, 2007).

Habituellement, l'amplification comporte des cycles successifs (généralement de 20 à 40) d'amplification, eux-mêmes composés de trois phases: après une étape de dénaturation (séparation des deux brins de la double hélice) de l'ADN, le positionnement des amorces (courtes séquences d'oligonucléotides spécifiquement choisies) en face de leurs séquences complémentaires, sur les brins d'ADN, et leur fixation sur ces cibles constitue la deuxième phase du procédé (hybridation). La phase d'extension fait intervenir une enzyme, l'ADN polymérase, qui synthétise, à partir des amorces, le brin complémentaire de celui ayant servi de matrice. La répétition de ce cycle conduit à l'amplification exponentielle du fragment d'ADN, également appelé produit d'amplification ou ADN amplifié. Selon un aspect de l'invention, l'hybridation s'effectue à une température comprise entre 45 et 65°C. Notamment, l'hybridation peut s'effectuer à une température comprise entre 45 et 60°C lorsque les amorces ne comportent pas d'étiquette. Alternativement, l'hybridation peut s'effectuer à une température comprise entre 50 et 65°C lorsque les amorces comportent une étiquette.

Selon un autre aspect, l'invention concerne une paire d'oligonucléotides, selon laquelle le premier oligonucéotide s'hybride de manière sélective à la séquence SEQ ID NO. 3 et le deuxième nucléotide s'hybride de manière sélective à la séquence SEQ ID NO. 4 dans des conditions de stringences suffisantes pour l'amplification d'une région variable du gène mitochondrial 12S de l'Homme dont la séquence est représentée à la SEQ ID NO.66 et qui peut être utilisée comme séquence de référence.

Selon un aspect de l'invention, la paire d'oligonucléotides permet l'amplification d'une région du gène mitochondrial 12S qui comporte moins de 120 nucléotides, en particulier moins de 110 ou moins de 100 nucléotides, amorces non comprises (c'est-à-dire sans compter la longueur des amorces). Disposer d'une paire d'amorce universelle qui permette l'amplification d'une région variable courte est très avantageuse car l'utilisation de telles amorces dans des substrats complexes ou dégradés permet la détection et si besoin l'identification des espèces dans de tels substrats.

Les amorces de la présente invention permettent de détecter et identifier plus de 7700 espèces dans le sous-embranchement du règne animal. Parmi ces espèces figurent notamment les amphibiens, les oiseaux, les poissons chondrichthyens, les mammifères, les reptiles et les poissons téléostéens. Les tableaux 1 à 6 donnés dans la partie expérimentale représentent une partie des séquences susceptibles d'être amplifiées avec les amorces de la présente invention. Selon un aspect de la présente invention, la région amplifiée par réaction de polymérisation en chaîne présente une séquence nucléotidique sélectionnée dans le groupe consistant en l'une quelconque des SEQ ID NOS. 9-100.

La présente invention concerne également un mélange d'amorces pour l'amplification d'une région variable du gène mitochondrial 12S des vertébrés par réaction de polymérisation en chaîne (PCR) comprenant les amorces d'amplification 12S-V05_F, 12S-V05_R et l'amorce de blocage selon SEQ ID 101. Alternativement, l'invention concerne également un mélange d'amorces pour l'amplification d'une région variable du gène mitochondrial 12S des vertébrés par réaction de polymérisation en chaîne (PCR) comprenant les amorces d'amplification 12S-V05_F et 12S-V05_R et au moins une autre paire d'oligonucléotides choisies parmi les paires d'amorces :

- amorces d'amplification selon SEQ ID NO.102 et SEQ ID NO.103;
- amorces d'amplification selon SEQ ID NO.104 et SEQ ID NO.105;

- amorces d'amplification selon SEQ ID NO.106 et SEQ ID NO.107, éventuellement avec amorce de blocage selon SEQ ID NO.108 ;
- amorces d'amplification selon SEQ ID NO.109 et SEQ ID NO.110;
- amorces d'amplification selon SEQ ID NO.111 et SEQ ID NO.112;
- 5 - amorces d'amplification selon SEQ ID NO.113 et SEQ ID NO.114;
- amorces d'amplification selon SEQ ID NO.115 et SEQ ID NO.116;
- amorces d'amplification selon SEQ ID NO.117 et SEQ ID NO.118;
- amorces d'amplification selon SEQ ID NO.119 et SEQ ID NO.120;
- amorces d'amplification selon SEQ ID NO.121 et SEQ ID NO.122,
- 10 éventuellement avec amorce de blocage selon SEQ ID NO.123 ;
- amorces d'amplification selon SEQ ID NO.124 et SEQ ID NO.125, éventuellement avec amorce de blocage selon SEQ ID NO.126 ;
- amorces d'amplification selon SEQ ID NO.127 et SEQ ID NO.128, éventuellement avec amorce de blocage selon SEQ ID NO.129 ;
- 15 - amorces d'amplification selon SEQ ID NO.130 et SEQ ID NO.131, éventuellement avec amorce de blocage selon SEQ ID NO.132 ;
- amorces d'amplification selon SEQ ID NO.133 et SEQ ID NO.134, éventuellement avec amorce de blocage selon SEQ ID NO.135 et/ou SEQ ID NO.136; et
- 20 - amorces d'amplification selon SEQ ID NO.137 et SEQ ID NO.138, éventuellement avec amorce de blocage selon SEQ ID NO.139.

Procédés mettant en œuvre la paire d'oligonucléotides

- 25 La présente invention concerne également un procédé d'amplification d'une région du gène mitochondrial 12S des vertébrés, comprenant les étapes suivantes :

- a) on dispose d'un échantillon contenant de l'ADN de vertébrés ;
- b) on réalise une réaction d'amplification en chaîne en utilisant une
- 30 paire d'oligonucléotides selon l'invention.

L'échantillon à partir duquel la réaction d'amplification est réalisée peut être collecté dans l'environnement. Dans ce cas, il peut par exemple s'agir d'un échantillon de sol, eau ou fèces. L'échantillon peut également provenir de l'industrie, par exemple des farines animales ou des plats industriels (aliments

35 transformés) de l'industrie alimentaire. L'échantillon en question peut par exemple provenir d'un produit qui a été congelé, lyophilisé ou chauffé. Un

avantage du procédé selon l'invention utilisant les amorces ci-dessus décrites est que l'ADN contenu dans l'échantillon peut se trouver sous forme dégradée. Cela est principalement dû au fait que les amorces ont été choisies de manière à ce que la région amplifiée soit courte, par exemple de longueur inférieure à 5 120 paires de bases.

Selon un aspect de l'invention, l'hybridation s'effectue à une température comprise entre 45 et 65°C. En fonction du fait que les paires d'oligonucléotides de l'invention comporte ou non une étiquette tel que cela est décrit précédemment, les conditions de l'amplification, en particulier la 10 température d'hybridation, peut ou non varier. Notamment, l'hybridation peut s'effectuer à une température comprise entre 45 et 60°C lorsque les amorces ne comportent pas d'étiquette. Par exemple, on peut utiliser une température de 51-53°C. Alternativement, l'hybridation peut s'effectuer à une température comprise entre 50 et 65°C lorsque les amorces comportent une étiquette. Par 15 exemple, on peut utiliser une température de 57-58°C. L'homme du métier sait adapter la température d'hybridation aux amorces utilisées.

Le procédé d'amplification selon l'invention peut nécessiter une étape d'extraction de l'ADN avant d'effectuer l'amplification. On utilise alors par exemple pour cela un kit d'extraction disponible dans le commerce.

20 La présente invention propose également un procédé de détection d'une espèce de vertébrés dans un échantillon. Ce procédé de détection selon l'invention comprend les étapes suivantes :

- a) on dispose d'un échantillon susceptible de contenir de l'ADN d'espèces vertébrés ;
- 25 b) on isole l'ADN total contenu dans l'échantillon ;
- c) on réalise une réaction d'amplification en chaîne en utilisant une paire d'oligonucléotides selon l'invention ; et
- d) on détecte l'éventuelle présence d'un produit d'amplification.

L'invention se rapporte aussi à un procédé de détection et 30 d'identification d'une espèce de vertébré dans un échantillon, comprenant les étapes suivantes :

- a) on dispose d'un échantillon susceptible de contenir de l'ADN d'espèces vertébrés ;
- b) on isole l'ADN total contenu dans l'échantillon ;
- 35 c) on réalise une réaction d'amplification en chaîne en utilisant une paire d'oligonucléotides selon l'invention ;

d) on détecte la présence d'un produit d'amplification ; et

e) on détermine la séquence du produit d'amplification pour identifier l'espèce de vertébré contenue dans l'échantillon.

L'étape de détermination de la séquence correspond au séquençage de celle-ci. Les méthodes et outils de séquençage sont connus de l'homme du métier et un exemple de ce qui peut être utilisé dans la présente invention est donné dans la partie expérimentale.

Kit de détection

10 L'invention a également trait à un kit pour la détection d'une espèce de vertébré dans un échantillon, ledit kit comprenant une paire d'oligonucléotides selon l'invention.

Selon un aspect de l'invention, le kit comprend en outre une amorce de blocage selon l'une quelconque des séquences SEQ ID NOS.101, 15 108, 123, 126, 129, 132, 135, 136, 139-142. Utiliser une amorce de blocage est utile lorsqu'il s'agit d'éviter l'amplification d'une espèce déterminée, par exemple l'homme ou la vache. Ces amorces sont choisies à partir de l'extrémité la plus variable du fragment amplifié, et de manière à ce que l'amorce de blocage se chevauche avec l'amorce d'amplification sur au moins 20 6 nucléotides, par exemple sur 8 nucléotides. Enfin, il est nécessaire que le Tm de l'amorce de blocage soit nettement supérieur à celui des amorces d'amplification (au moins 5°C, par exemple 10°C).

Selon un autre aspect encore de l'invention, le kit comprend au moins une autre paire d'oligonucléotides. Cette au moins une autre paire 25 d'oligonucléotides peut être alors utilisée à titre de vérification du contenu de l'échantillon ou à titre d'alternatives, par exemple si la paire d'oligonucléotides 12S-V05_F (SEQ ID NO. 1) et 12S-V05_R (SEQ ID NO. 2) ne permettait pas l'amplification.

Selon un autre aspect encore de l'invention, le kit comprend en 30 outre une étiquette de moins de 10 nucléotides pour l'identification de l'échantillon de départ après séquençage du produit PCR.

Le kit selon l'invention peut également en outre contenir de manière non limitative des réactifs additionnels, par exemple une enzyme DNA polymerase, des dNTP, du Tris-HCl, du KCl, du MgCl₂ ou du Bovine Serum 35 Albumin (BSA).

Utilisations

- La présente invention concerne également l'utilisation de la région variable du gène mitochondrial 12S des vertébrés correspondant aux positions 1094 à 1193 du gène mitochondrial de l'Homme pour détecter et/ou identifier
- 5 des espèces de vertébrés. Par exemple, cette région variable est sélectionnée dans le groupe consistant en SEQ ID NO.9-100. A partir de la séquence du gène 12S de l'Homme et des positions indiquées, l'homme du métier sait comment identifier les séquences correspondantes dans d'autres espèces vertébrés.

Exemple 1**Matériels et méthodes**5 PCR

Les amorces 12S-V05 ont été testées pour l'analyse du régime alimentaire de trois espèces de félinés :

- i) le léopard commun, *Panthera pardus* : un échantillon;
 - ii) le léopard des neiges, *Uncia uncia* : un échantillon;
 - 10 iii) le chat-léopard, *Prionailurus bengalensis* : deux échantillons,
- en utilisant des fèces comme source d'ADN.

Les extractions d'ADN ont été effectuées à partir de 15 mg de matière, en utilisant un kit d'extraction classique et en suivant les instructions du fabricant (DNeasy Blood and Tissue Kit, QIAgen GmbH, Hilden, Germany).

- 15 Les extraits d'ADN ont été récupérés dans un volume de 250 µL.

Les amplifications d'ADN ont été faites dans un volume de 25 µL, en utilisant 2 µL d'extrait par réaction.

- Le mélange d'amplification contenait 1 U d'AmpliTaq® Gold DNA Polymerase (Applied Biosystems, Foster City, CA), 10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, 2 mM
- 20 MgCl₂, 0,2 mM de chaque dNTP, 0,1 µM de chaque amorce (12SV05F/R + une étiquette ou fragment additionnel de 9 nucléotides du côté 5' spécifique de chaque échantillon), et 5 µg de "bovine serum albumin" (BSA, Roche Diagnostic, Basel, Switzerland).

- Le mélange PCR a été dénaturé pendant 10 min à 95°C, suivi de 45 cycles de
- 25 30 s à 95°C (dénaturation) et 30 s à 60°C (hybridation).

Comme les séquences cibles sont plus courtes que 120 paires de bases, l'étape d'élongation a été supprimée de manière à réduire la production de l'artefact +A (Brownstein *et al.*, 1996; Magnuson *et al.*, 1996) qui réduit l'efficacité de la première étape de séquençage (ligation à bouts francs).

30

Séquençage

- Le séquençage a été effectué sur un séquenceur Illumina/Solexa Genome Analyzer IIx (Illumina Inc., San Diego, CA 92121 USA), en utilisant le Paired-End Cluster Generation Kit V4 et le Sequencing Kit V4 (Illumina Inc., San
- 35 Diego, CA 92121 USA), en suivant les instructions du fabricant.

108 nucléotides ont été séquencés à chaque extrémité des fragments d'ADN.

Les lectures ont été analysées avec les OBITools (<http://www.grenoble.prabi.fr/trac/OBITools>):

- (i) les deux lectures (dans les deux sens) d'un même fragment ont été alignées et fusionnées avec le programme solexaPairEnd, prenant en compte les données de qualité;
- (ii) les amorces et les fragments additionnels pour identifier les échantillons ont été identifiés avec le programme ngsfilter;
- (iii) seules les régions amplifiées, sans les amorces, ont été conservées pour les analyses ultérieures;
- (iv) les séquences strictement identiques ont été regroupées avec le programme obiuniq;
- (v) les séquences plus courtes que 10 paires de bases, ou contenant des ambiguïtés, ou présentes moins de 10 fois ont été retirées avec le programme obigrep;
- (vi) l'assignation à un taxon a été réalisée avec le programme ecoTag (Pégaré *et al.*, 2009); ce programme est basé sur FASTA35 (Pearson et Lipman, 1988) pour trouver des séquences hautement similaires dans une base de référence qui a été construite à partir des données EMBL en utilisant le programme ecoPCR (Ficetola *et al.*, 2010).

20

Résultats

Lors de cette expérimentation, les séquences suivantes ont pu être identifiées:

Léopard commun (*Panthera pardus*) : numéro d'accèsion EF551002

Léopard des neiges (*Uncia uncia*)

25 Chat-léopard (*Prionailurus bengalensis*)

Chèvre (*Capra hircus*) : numéro d'accèsion AF533441 (SEQ ID NO.56)

Bouquetin de Sibérie (*Capra sibirica*)

Musaraigne (*Crocidura pullata*)

Perdrix chukar (*Alectoris chukar*)

30 Grenouille (*Nanorana vicina*)

Le tableau ci-dessous présente les nombre de chaque séquence obtenue pour les quatre échantillons.

35

fèces		
Léopard	Léopard	Chat-léopard

17

		commun	des neiges	1	2
prédateur	Léopard commun (<i>Panthera pardus</i>)	2460	-		
	Léopard des neiges (<i>Uncia uncia</i>)	-	10807		
	Chat-léopard (<i>Prionailurus bengalensis</i>)	-	-	1982	9765
proie	Chèvre (<i>Capra hircus</i>)	2969			
	Bouquetin de Sibérie (<i>Capra sibirica</i>)		1256		
	Musaraigne (<i>Crocidura pullata</i>)				964
	Perdrix chukar (<i>Alectoris chukar</i>)			1711	
	Grenouille (<i>Nanorana vicina</i>)				910

PCR réalisée dans les mêmes conditions avec en outre des amorces de blocage

- 5 Les mêmes échantillons sont soumis au même protocole pour l'amplification, mais avec l'amorce de blocage à une concentration de 2 μ M; toutes les autres concentrations restent identiques.

Les amorces de blocage suivantes ont été utilisées :

Léopard commun :

- 10 SEQ ID NO.140

Léopard des neiges :

SEQ ID NO.141

Chat-léopard :

SEQ ID NO.142

- 15

Le tableau ci-dessous présente les nombre de chaque séquence obtenue pour les quatre échantillons, mais en utilisant les amorces de blocage pour l'amplification.

		fèces			
		Léopard commun	Léopard des neiges	Chat-léopard	
				1	2
prédateur	Léopard commun (<i>Panthera pardus</i>)	10	-		
	Léopard des neiges (<i>Uncia uncia</i>)	-	318		
	Chat-léopard (<i>Prionailurus bengalensis</i>)	-	-	0	0
proie	Chèvre (<i>Capra hircus</i>)	5951			
	Bouquetin de Sibérie (<i>Capra</i>		6225		

<i>sibirica</i>)		
Musaraigne (<i>Crocidura pullata</i>)		1522
Perdrix chukar (<i>Alectoris chukar</i>)	741	
Grenouille (<i>Nanorana vicina</i>)		1141
Rat noir (<i>Rattus rattus</i>)		784

Il est à noter que les amorces étant universelles, les proportions obtenues après séquençage reflètent relativement bien les proportions initiales dans les extraits. Il s'agit d'un autre avantage des amorces utilisées.

5

Discussion

Ces résultats démontrent clairement que le système fonctionne, même pour l'analyse d'ADN très dégradé comme celui issu de fèces de carnivores. Dans cet exemple, des séquences de mammifères, d'oiseaux, et de batraciens ont
10 été amplifiées. L'utilisation d'amorces de blocage permet de limiter l'amplification des séquences du prédateur dans le cas présenté ci-dessus, et permet également de bloquer l'amplification de contaminants potentiels.

Variabilité de la séquence amplifiée

15 Les tableaux 1 à 6 ci-dessous montrent les variations de la zone amplifiée par les amorces 12S-V05_F et 12S-V05_R de la présente invention pour la détection et l'identification d'espèces de vertébrés. Ces tableaux ont été élaborés à partir de la version 103 de la base de données EMBL.

Il est à noter que ces tableaux ne représentent qu'une partie des espèces
20 pouvant être identifiées en utilisant les amorces de la présente invention. En effet, 24759 séquences sont susceptibles d'être amplifiées en utilisant ces amorces (amplification électronique avec le logiciel ecoPCR, Filetola *et al.*, 2010), en tolérant trois mismatches (mais aucun mismatch sur le deux derniers nucléotides du côté 3' des amorces). Ces 24759 séquences sont toutes
25 relatives à des vertébrés dans la mesure où les amorces sont très spécifiques des vertébrés. Plus précisément ces 24759 séquences correspondent à 7726 espèces différentes et à 8264 séquences uniques (deux espèces proches peuvent avoir la même séquence, et une même espèce peut avoir plusieurs variants).

30 Les tableaux ci-dessous mettent en évidence le fait que deux régions très conservées encadrent une partie variable d'une longueur d'environ 100 nucléotides (voir listage de séquences). Une telle région représente donc une

très bonne cible en vue de la détection et de l'identification des espèces de vertébrés à partir d'extraits d'ADN complexes et dégradés.

5 Exemple 2

Comparaison des amorces de la présente invention (12S-V05_F selon SEQ ID NO.1 et 12S-V05_R selon SEQ ID NO.2) avec les amorces décrites dans WO 2006/024751

- 10 La comparaison a été effectuée sur l'ensemble des ADN mitochondriaux d'animaux téléchargés le 15 Mars 2011 à partir d'EMBL. Cette base contient un total de 2424 séquences, dont 1496 vertébrés et 928 non-vertébrés.

Les amplifications ont été simulées à l'aide du logiciel ecoPCR (Ficetola *et al.*

- 15 2010; Bellemain *et al.* 2010), en tolérant un maximum de trois mésappariement par amorce, mais en fixant les deux derniers nucléotides du côté 3' (pas de mésappariement possible sur les deux derniers nucléotides du côté 3').

Les amorces suivantes ont été testées:

- 20 (i) L15162/H15392 (amplifiant un fragment de 129 nucléotides)
 (ii) L15411/H15497 (amplifiant un fragment de 85 nucléotides)
 (iii) 12S_V5_F/12_V5_R (amplifiant un fragment d'environ 100 nucléotides)

- 25 Les résultats obtenus sont les suivants (nombre d'amplification positives):

Amorces utilisées	Séquences de vertébrés amplifiées		Séquences de non-vertébrés amplifiées	
	nombre	%	nombre	%
L15162/H15392	1488	99,47	396	42,67
L15411/H15497	1354	90,51	331	35,67
12S-V05_F/12-V05_R	1388	92,78	0	0

Nous avons observé que les amorces L15162/H15392 amplifient deux séquences cibles pour les ADN mitochondriaux avec les numéros d'accension

- 30 NC_010292 et NC_008290. De même les amorces L15411/H15497 amplifient sept séquences cibles pour NC_006331, et deux séquences cibles pour

NC_015087, NC_015085, NC_014681, NC_014679, NC_014280, NC_011598, NC_011597, NC_008360, NC_008290, NC_007782 et NC_006992.

Les amorces de la présente invention n'amplifient jamais deux séquences cibles sur le même ADN mitochondrial.

- 5 D'autre part, en testant les amorces sur la version 107 d'EMBL comprenant l'ensemble des séquences déposées dans les bases de données publiques, nous avons constaté que L15162/H15392 et L15411/H15497 amplifient également quelques bactéries, et quelques végétaux, ce qui n'est jamais le cas pour les amorces la présente invention. Les émorces de la présente invention
10 sont beaucoup plus spécifiques.

- L'extrême dégénérescence des amorces L15162/H15392 et L15411/H15497 explique qu'elles amplifient une bonne proportion de l'ensemble des vertébrés. En revanche, cette dégénérescence explique aussi les artéfacts produits
15 (plusieurs séquences cibles amplifiées sur un même ADN mitochondrial) et le manque de spécificité pour les vertébrés (L15162/H15392 amplifient plus de 40% de non-vertébrés, et L15411/H15497 plus de 35%).

Tableau 1 - Amphibiens

Nom scientifique	Numéro d'accession	Séquence correspondant à 12S-V05_F	Séquence amplifiée	Séquence correspondant à 12S-V05_F
<i>Alytes obstetricans</i>	AJ440759	TTAGATACCCCACTATGC	CTAGCCTTAAACATTGACAACTTACATTATTTTCATCCGCCGGGAACTACGAGC CGCAGCTTAAACACCCAAAGGACTTGGCGGTGCCCCAAACCCAC (SEQ ID NO. 9)	TAGAACAGGCTCCTCTAG
<i>Bombina variegata</i>	AJ440764	TTAGATACCCCACTATGC	CTAACCTCAAACTATGACTCAATACAAAACACCATCCGCCGGGAACTACGAGC CCTAGCTTAAACACCCAAAGGACTTGGCGGTGCCCCACCCAC (SEQ ID NO. 10)	TAGAACAGGCTCCTCTAG
<i>Bufo bufo</i>	AY325988	TTAGATACCCCACTATGC	CCAGCGTAAACTTTTACTTACATCAAAATCGCCAGGGAACCTACGAGCCAAGCTT AAACCCAAAGGACTTGACGGTACCCCACTATCCCC (SEQ ID NO. 11)	TAGGACAGGCTCCTCTAG
<i>Bufo viridis</i>	AY680267	TTAGATACCCCACTATGC	CCAGCGTAAACTTTTATTTTACATCCAAATCGCCCGGGAACCTACGAGCTAAGCT TAAACCCAAAGGACTTGACGGTACCCCACTATCCCC (SEQ ID NO. 12)	TAGGACAGGCTCCTCTAG
<i>Dendrobates tinctorius</i>	DQ502123	TTAGATACCCCACTATGC	TCAGTCGTAAACTTTAAATTTACTTCCTACTCGCCCGGGAACCTACGAGCTATGCT TAAACCCAAAGGACTTGACGGTACCCCACTATCCCC (SEQ ID NO. 13)	TAGGACAGGCTCCTCTAG
<i>Hyla arborea</i>	AY843601	TTAGATACCCCACTATGC	TCAGCGTAAACTTTAAATTTACATTCGTATCGCCTGGGAACCTACGAGCCAAGCT TAAACCCAAAGGACTTGACGGTACCCCACTATCCCC (SEQ ID NO. 14)	CAGGACAGGCTCCTCTAG
<i>Hyla meridionalis</i>	AY819370	TTAGATACCCCACTATGC	TCAGCGTAAACTTTAAATTTACACCAATATCGCCAGGGAACCTACGAGCTAAGCT TAAACCCAAAGGACTTGACGGTACCCCACTATCCCC (SEQ ID NO. 15)	TAGGACAGGCTCCTCTAG
<i>Rana pipiens</i>	DQ283123	TTAGATACCCCACTATGC	CTAGCGTAAACAAATTAATTTACACCCCATCAGCGCCAGGGAACCTACGAGCAATG CTTAAACCCAAAGGATTTGACGGTGTCCCCACCCAG (SEQ ID NO. 16)	AAGAACAGGCTCCTCTAG
<i>Rana temporaria</i>	AY326063	TTAGATACCCCACTATGC	CTAGCGTAAACAAATTAATTCACATCCACACCGCCAGGGAATACGAGCAATGC TTAAACCCAAAGGATTTGACGGTGTCCCCACCCCA (SEQ ID NO. 17)	TAGAACAGGCTCCTCTAG

22

<i>Salamandra atra</i>	AY928616	TTAGATACCCCACTATGC	CTAGACATAAACTTTGATTATCCGCCAGAGTACTACGAGCTACAGCTTAAACT CAAAGGACTTGGCGGTGCTTTTACACCCCC (SEQ ID NO.18)	TAGAACAGGCTCCTCTAG
<i>Salamandra lanzai</i>	AY928617	TTAGATACCCCACTATGC	CTAAACATAAACTTTGATTATCCGCCAGAGTACTACGAGCCACAGCTTAAACT CAAAGGACTTGGCGGTGCTTTTACACCCCC (SEQ ID NO.19)	TAGAACAGGCTCCTCTAG

Tableau 2 - Oiseaux

Nom scientifique	Numéro d'accession	Séquence correspondant à 12S-V05_F	Séquence amplifiée	Séquence correspondant à 12S-V05_F
<i>Accipiter gentilis</i>	AB219551	TTAGATACCCCACTATGC	CTGGCCCTAAATCTTGATACCTTACAAAAGTATCCGCGCCGAGAACTACGA GCACAAACGCTTAAAACTCTAAGGACTTGGCGGTGCCCCAAACCCAC (SEQ ID NO.20)	TAGAACAGGCTCCTCTAG
<i>Acrocephalus arundinaceus</i>	AB492871	TTAGATACCCCACTATGC	CTGGCCCTAAATCTTGATGCTCAACCTTACCGAAGCATCCGCGCCGAGAACTACG AGCGCAACGCTTAAAACTCTAAGGACTTGGCGGTGCCCCAAACCCAC (SEQ ID NO.21)	CAGAACAGGCTCCTCTAG
<i>Alectoris rufa</i>	AM902517	TTAGATACCCCACTATGC	CTGGCCCTAAATCTTGATACCCCCCATTTACCAATATATCCGCGCCGAGAACTA CGAGCACAAACGCTTAAAACTCTAAGGACTTGGCGGTGCCCCAAACCCAC (SEQ ID NO.22)	TAGAACAGGCTCCTCTAG
<i>Anser anser</i>	AY164530	TTAGATACCCCACTATGC	CTGGCCCTAAATCTTGATACCTTACTTTACCGAAGTATCCGCGCCGAGAACTACGA GCACAAACGCTTAAAACTCTAAGGACTTGGCGGTGCCCCAAACCCAC (SEQ ID NO.23)	TAGAACAGGCTCCTCTAG
<i>Aquila chrysaetos</i>	AB219549	TTAGATACCCCACTATGC	CTGGCCCTAAATCTTAATACTTCCCCCACTAAAGTATTCGCGCGAGTACTACGA GCACAAACGCTTAAAACTCTAAGGACTTGGCGGTGCCCCATACCCAC (SEQ ID NO.24)	CAGAACAGGCTCCTCTAG
<i>Ardea cinerea</i>	AF407136	TTAGATACCCCACTATGC	TCAGCCTTAAATCTTGATACCTTAACTTAAAGTATCCGCGCTGAGAACTACGA GCACAAACGCTTAAAACTCTAAGGACTTGGCGGTGCCCCAAACCCAC (SEQ ID NO.25)	TAGAACAGGCTCCTCTAG
<i>Asio flammeus</i>	AF406881	TTAGATACCCCACTATGC	CAGGCCCTAAATCTTAATGTCCTCCCACTACCAAGAGCATTCGCGAGGCACTACGA GCACAAACGCTTAAAACTCTAAGGACTTGGCGGTACCTTAAACCCAC (SEQ ID NO.26)	TAGGACAGGCTCCTCTAG
<i>Asio otus</i>	AY274022	TTAGATACCCCACTATGC	CAGGCCCTAAATCTTAATGTCCTTTCACAGAGCATTCGCGAGGCTACTACGA GCACAAACGCTTAAAACTCTAAGGACTTGGCGGTACCTTAAACCCAC (SEQ ID NO.27)	CAGGACAGGCTCCTCTAG
<i>Bubo bubo</i>	AY513589	TTAGATACCCCACTATGC	CCGGCCCTAAATCCAGATGCCACAGTCACTAAGCATCCGCGAGGCTACTACG AGCACAAACGCTTAAAACTCTAAGGACTTGGCGGTGCCCCAAACCCAC (SEQ ID NO.28)	TAGGACAGGCTCCTCTAG

24

<i>Buteo buteo</i>	AF380305	TTAGATACCCCACTATGC	CTGGCCCTAAATCTTGATGCTTATCTTACCAAGTATCCGCCCGAGAACTACGA GCACAAACGCTTAAAACTCTAAGGACTTGGCGGTGCCCAAAACCCAC (SEQ ID NO. 29)	TAGAACAGGCTCCTCTAG
<i>Cardinalis cardinalis</i>	AF447215	TTAGATACCCCACTATGC	CTGGCCCTAAATCTTGATGCTTACACCTACTAAAGCATCCGCCCGAGAACTACG AGCACTAACGCTTAAAACTCTAAGGACTTGGCGGTGCTCCAAACCCAC (SEQ ID NO. 30)	CAGAACAGGCTCCTCTAG
<i>Ciconia ciconia</i>	AB026818	TTAGATACCCCACTATGC	TTAGCCCTAAATCTTGATGCTTACCCCTACTAAAGTACCCGCCCGAGAACTACGA GCACAAACGCTTAAAACTCTAAGGACTTGGCGGTGCCCAAAACCCAC (SEQ ID NO. 31)	CAGAACAGGCTCCTCTAG
<i>Columba livia</i>	AF173585	TTAGATACCCCACTATGC	CTGGCCCTAAATCTAGATGCTTATGTTACTAAAGCATCCGCCCGAGGACTACGA GCACAAACGCTTAAAACTCTAAGGACTTGGCGGTGCCCTAAACCCAC (SEQ ID NO. 32)	TAGAACAGGCTCCTCTAG
<i>Corvus corone</i>	AF386463	TTAGATACCCCACTATGC	CTGGCCCTAAATCTTGATGCTCTATGCTACCTGAGCATCCGCCCGAGAACTACG AGCACAAACGCTTAAAACTCTAAGGACTTGGCGGTGTCCCAAAACCCAC (SEQ ID NO. 33)	CAGAACAGGCTCCTCTAG
<i>Cygnus cygnus</i>	AY164523	TTAGATACCCCACTATGC	CTGGCCCTAAATCTTGATGCTTACTTTACCGAAGTATCCGCCCGAGAACTACGA GCACAAACGCTTAAAACTCTAAGGACTTGGCGGTGCCCAAAACCCAC (SEQ ID NO. 34)	TAGAACAGGCTCCTCTAG
<i>Falco peregrinus</i>	AB219556	TTAGATACCCCACTATGC	CTAGCCCTAAATCTTGATGCTTTATTGTACCATAGACATCCGCCCGAGAACTAC GAGCACAAACGCTTGAAGTCTAAGGACTTGGCGGTGCCCAAAACCCAC (SEQ ID NO. 35)	CAGAACAGGCTCCTCTAG
<i>Fringilla coelebs</i>	AF407088	TTAGATACCCCACTATGC	CTGGCCCTAAATCTTGATGCTTACCCCTACTAAAGCATCCGCCCGAGAACTACG AGCACCAACGCTTAAAACTCTAAGGACCTGGCGGTGCCCAAAACCCAC (SEQ ID NO. 36)	CAGAACAGGCTCCTCTAG
<i>Gallus gallus</i>	AB086102	TTAGATACCCCACTATGC	CTAGCCCTAAATCTAGATACCTCCCATCACATGTATCCGCTGAGAACTACG AGCACAAACGCTTAAAACTCTAAGGACTTGGCGGTGCCCAAAACCCAC (SEQ ID NO. 37)	TAGAACAGGCTCCTCTAG
<i>Lagopus muta</i>	AF222585	TTAGATACCCCACTATGC	CTGGCCCTTAATCCAGATACCCCATATACCCCTGTATCCGCCCGAGAACTACGAG CACAAACGCTTAAAACTCTAAGGACTTGGCGGTGCCCTAAACCCAC (SEQ ID NO. 38)	TAGAACAGGCTCCTCTAG
<i>Motacilla alba</i>	AF407083	TTAGATACCCCACTATGC	CTGGCCCTAAATCTTGATGCTTACCCCTACTAAAGCATCCGCCCGAGAACTACG AGCACCAACGCTTAAAACTCTAAGGACTTGGCGGTGCCCAAAACCCAC (SEQ ID NO. 39)	CAGAACAGGCTCCTCTAG

<i>Parus major</i>	AY136557	TTAGATACCCCACTATGC	CTGGCCCTAAATCTTGATGCTCGATATTACCTGAGCATCCGCCTGAGAACTACG AGCACAACGCTTAAAACTCTAAGGACTTGGCGGTGCCCCAAACCCAC (SEQ ID NO. 40)	TAGAACAGGCTCCTCTAG
<i>Passer domesticus</i>	AF407085	TTAGATACCCCACTATGC	CTGGCCCTAAATCTTGATGCTTAAACCTACTAAAGCATCCGCCCGAGAACTACG AGCATAACGCTTAAAACTCTAAGGACTTGGCGGTGCCCCAAACCCAC (SEQ ID NO. 41)	CAGAACAGGCTCCTCTAG
<i>Perdix perdix</i>	AF222590	TTAGATACCCCACTATGC	CTGGCCCTAAATCTAGACACCCGACACCCGAGTGTCCGCCTGAGAACTACGAG CACAAACGCTTAAAACTCTAAGGACTTGGCGGTGCCCTTAAACCCAC (SEQ ID NO. 42)	CAGAACAGGCTCCTCTAG
<i>Phasianus colchicus</i>	AM902515	TTAGATACCCCACTATGC	CTGGCCCTAAATCTAGATGCCCTACATACCCATGCCATCCGCCCGAGAACTACGAG CACAAACGCTTAAAACTCTAAGGACTTGGCGGTGCCCTTAAACCCAC (SEQ ID NO. 43)	TAGAACAGGCTCCTCTAG
<i>Sylvia atricapilla</i>	AM889140	TTAGATACCCCACTATGC	CTGGCCCTAAATCTTGATGCTCGATCTTACTGGAGCATCCGCCCGAGAACTACG AGCACAACGCTTAAAACTCTAAGGACTTGGCGGTGCCCTTAAACCCAC (SEQ ID NO. 44)	CAGAACAGGCTCCTCTAG
<i>Tetrao urogallus</i>	AF222594	TTAGATACCCCACTATGC	CTGGCCCTTAATCTAGATACCTATATACCCCTTGTATCCGCCTGAGAACTACGAG CACAAACGCTTAAAACTCTAAGGACTTGGCGGTGCCCTTAAACCCAC (SEQ ID NO. 45)	TAGAACAGGCTCCTCTAG
<i>Turdus philomelos</i>	AF484935	TTAGATACCCCACTATGC	CTGGCCCTAAATCTTGATGCTCGATATTACCTGAGCATCCGCCCGAGAACTACG AGCACAACGCTTAAAACTCTAAGGACTTGGCGGTGCCCTTAAACCCAC (SEQ ID NO. 46)	CAGAACAGGCTCCTCTAG
<i>Zosterops pallidus</i>	AY136570	TTAGATACCCCACTATGC	CTGGCCCTAAATCTTGATGCTCGATCTAACCGGAGCATCCGCCCGAGAACTACG AGCACAACGCTTAAAACTCTAAGGACTTGGCGGTGCTCCAAATCCAC (SEQ ID NO. 47)	CAGAACAGGCTCCTCTAG

Tableau 3 - Poissons chondrichthyens

Nom scientifique	Numéro d'accession	Séquence correspondant à 12S-V05 F	Séquence amplifiée	Séquence correspondant à 12S-V05 F
<i>Chimaera monstrosa</i>	AJ310140	TTAGATACCCCTACTATGT	TTAGCCCTAAACCTAGGTGCTTAATTACCTAAACACCCGCCAGAGAACTACAAG CGCCAGCTTGAAACCCCAAGGACTTGGCGGTGCTTAGATCCCC (SEQ ID NO. 48)	TAGAACAGGCTCCTCTAG
<i>Manta birostris</i>	AF448000	TTAGATACCCCTACTATGC	TTAACCATAAACACATTGTTTATTAATGATATACCTTAATAACCCGCTGAGTACTAC AAGCGCTAGCTTAAACCCCAAGGACTTGGCGGTGCTCCAAATCCAC (SEQ ID NO. 49)	TAGAACAGGCTCCTCTAG
<i>Raja brachyura</i>	EF081263	TTAGATACCCCTACTATGC	TTAACCATAAATAGACCTTTACTACCACCTTACTTTGTTTAAGTCCGCGCTGAGTA CTACAAGCGCTAGCTTAAACCCCAAGGACTTGGCGGTGCTCCAGACCCCC (SEQ ID NO. 50)	TAGAACAGGCTCCTCTAG
<i>Squatina nebulosa</i>	AF448031	TTAGATACCCCTACTATGC	CCATCTACAAACTTAGACATAAATCTACCATAATTGTCGCCAGAGTACTACAAG CGCTAGCTTAAACCCCAAGGACTTGGCGGTGCTCAGACCCCTC (SEQ ID NO. 51)	CAGAACAGGCTCCTCTAG
<i>Torpedo tokionis</i>	AF448026	TTAGATACCCCTACTATGT	TTAATTATAAATAGATAAATATTCACTAACTCATTCGCCCGAGAACTACAAGCG CTAGCTTAAACCCCAAGGACTTGGCGGCACCTCAGATCTAC (SEQ ID NO. 52)	CAGAACAGGCTCCTCTAG

Tableau 4 - Mammifères

Nom scientifique	Numéro d'accession	Séquence correspondant à 12S-V05 F	Séquence amplifiée	Séquence correspondant à 12S-V05 F
<i>Bison bison</i>	AF091687	TTAGATACCCCACTATGC	TTAGCCCTAAACACACAGATAATTACATAAAACAAAATTAATTTGCCAGAGTACTACC AGCAACAGCTTAAAACTCAAAGGACTTGGCGGTGCTTTATATCCTT (SEQ ID NO. 53)	TAGAACAGGCTCCTCTAG
<i>Bos taurus</i>	AB074962	TTAGATACCCCACTATGC	TTAGCCCTAAACACACAGATAATTACATAAAACAAAATTAATTTGCCAGAGTACTACT AGCAACAGCTTAAAACTCAAAGGACTTGGCGGTGCTTTATATCCTT (SEQ ID NO. 54)	TAGAACAGGCTCCTCTAG
<i>Canis lupus</i>	AB048585	TTAGATACCCCACTATGC	TTAGCCCTAAACACATAAACCAATTTCTATACAAAATTAATTTGCCAGAGAACTACTA GCAACAGCTTAAAACTCAAAGGACTTGGCGGTGCTTTATATCCCT (SEQ ID NO. 55)	TAGAACAGGCTCCTCTAG
<i>Capra hircus</i>	AF533441	TTAGATACCCCACTATGC	TTAGCCCTAAACACACAAATTAATACAGAAACAAAATTAATTTGCCAGAGTACTACC GGCAACAGCCCGAAACTCAAAGGACTTGGCGGTGCTTTATACCCCTT (SEQ ID NO. 56)	TAGAACAGGCTCCTCTAG
<i>Capra ibex</i>	AY846815	TTAGATACCCCACTATGC	TTAGCCCTAAACACACAGTAGTACACAAAACAAAGATTAATTTGCCAGAGTACTACC GGCAACAGCCCGAAACTCAAAGGACTTGGCGGTGCTTTATATACCCCTT (SEQ ID NO. 57)	TAGAACAGGCTCCTCTAG
<i>Capreolus capreolus</i>	AJ885202	TTAGATACCCCACTATGC	TTAGCCCTAAACACACAGTAATTAATATAACAAAATTAATTTGCCAGAGTACTACC GGCAATAGCTTAAAACTCAAAGGACTTGGCGGTGCTTTATATACCCCTT (SEQ ID NO. 58)	TAGAACAGGCTCCTCTAG
<i>Castor fiber</i>	AJ389542	TTAGATACCCCACTATGC	TTAGCCGTAAACCCCAATATGTAAACCAACAAACATAATTTGCCAGAGAACTACT AGCAACAGCTTAAAACTCAAAGGACTTGGCGGTGCTTTATATCCGT (SEQ ID NO. 59)	TAGAACAGGCTCCTCTAG
<i>Cervus elaphus</i>	AB245427	TTAGATACCCCACTATGC	CTAGCCCTAAACACACAAATAGTTATGCAACAAAACATAATTTGCCAGAGTACTACC GGCAATAGCTTAAAACTCAAAGGACTTGGCGGTGCTTTATATACCCCTT (SEQ ID NO. 60)	TAGAACAGGCTCCTCTAG
<i>Elomys quercinus</i>	Y16896	TTAGATACCCCACTATGC	TCAGCCCTAAACACACAAAATTAATTCACAACAAAATTTGTTGCCAGAGAACTACGAG CCACAGCTCAAACCTCAAAGGACTTGGCGGTGCTTTATATCCCT (SEQ ID NO. 61)	TAGAACAGGCTCCTCTAG

<i>Eptesicus serotinus</i>	AY495467	TTAGATACCCCACTATGC	TTAGCCCTAAACATGGAATATATAACAAATTTATTCGCCAGAGTACTACCAG CAAGAGCTAGAACTCAAGGACTTGGCGGTGCCCTTAAGTCCTT (SEQ ID NO. 62)	TAGAACAGGCTCCTCTAG
<i>Erinaceus europaeus</i>	X88898	TTAGATACCCCTATTATGC	TTAGCCCTAAACCTTAGACAGTTACTTAACAAACTGTACGCCAGAGAACTACGA GCTACAGCTTAAACTCAAGGACTTGGCGGTGCTTTATACCCC (SEQ ID NO. 63)	CAGAACAGGCTCCTCTAG
<i>Felis catus</i>	AY012149	TTAGATACCCCACTATGC	TTAGCCCTAAACCTTAGATAGTTATCTTAACAAACTATCCGCCAGAGAACTAC TAGCAATAGCTTAAACTCAAGGACTTGGCGGTGCTTTATATCCCT (SEQ ID NO. 64)	TAGAACAGGCTCCTCTAG
<i>Glis glis</i>	AJ001562	TTAGATACCCCACTATGC	TTAGCCCTAAACATAAACCTTACTTAACGCAACCGTTCCGCCAGAGTACTACAAG CCACAGCTCAAACTCAAGGACTTGGCGGTGCTTTATATCCCT (SEQ ID NO. 65)	TAGAACAGGCTCCTCTAG
<i>Homo sapiens</i>	AB055387	TTAGATACCCCACTATGC	TTAGCCCTAAACCTCAACAGTTAAATCAACAAACTGCTGCCAGAACACTACG AGCCACAGCTTAAACTCAAGGACTTGGCGGTGCTTCATATCCCT (SEQ ID NO. 66)	CAGAACAGGCTCCTCTAG
<i>Lepus europaeus</i>	AJ421471	TTAGATACCCCACTATGC	TTAGCCCTAAACCTTAAATTAATTCCTTAACAAATTTATTCGCCAGAGAACTACAA GCCAGAGCTTAAACTCAAGGACTTGGCGGTGCTTTATACCCCG (SEQ ID NO. 67)	TAGAACAGGCTCCTCTAG
<i>Lutra lutra</i>	FJ236015	TTAGATACCCCACTATGC	TCAGCCCTAAACATAGATAGTTACATAACAAACTATCTGCCAGAGAACTACT AGCAACAGCTTAAACCTCAAGGACTTGGCGGTGCTTTATATCCCT (SEQ ID NO. 68)	TAGAACAGGCTCCTCTAG
<i>Meles meles</i>	AB119077	TTAGATACCCCACTATGC	TCAGCCCTAAACATAGATAATTCATAGAACAAATTTATCTGCCAGAGAACTACT AGCAACAGCTTAAACTCAAGGACTTGGCGGTGCTTTATATCCCT (SEQ ID NO. 69)	TAGAACAGGCTCCTCTAG
<i>Mus musculus</i>	AB042432	TTAGATACCCCACTATGC	TTAGCCATAAACCTTAAATTAATTAACAAACTATTTGCCAGAGAACTAC TAGCCATAGCTTAAACTCAAGGACTTGGCGGTACTTTATATCCAT (SEQ ID NO. 70)	TAGAACAGGCTCCTCTAG
<i>Mustela erminea</i>	AB119066	TTAGATACCCCACTATGC	TCAGCCCTAAACATAATAGTTCTTAACAACTATCTGCCAGAGAACTACT AGCAACAGCTTAAACTCAAGGACTTGGCGGTGCTTTATATCCCT (SEQ ID NO. 71)	TAGAACAGGCTCCTCTAG
<i>Myodes glareolus</i>	AJ005781	TTAGATACCCCACTATGC	TTAGCCCTAAACCTTCAATATATAAACTAAAGTATTTGCCTGAGAACTACTAG CCACAGCTTAAACTCAAGGACTTGGCGGTACTTTATATCCAT (SEQ ID NO. 72)	TAGAACAGGCTCCTCTAG
<i>Oryctolagus cuniculus</i>	AJ001588	TTAGATACCCCACTATGC	TTAGCCCTAAACCTTGTATAATTCATAACAAATTTATTCGCCAGAGAACTACAA GCCAAGCTTAAACTCAAGGACTTGGCGGTGCTTTATACCCAC (SEQ ID NO. 73)	CGAACAGGCTCCTCTAG

29

<i>Ovis aries</i>	AF010406	TTAGATACCCCACTATGC	TTAGCCCTAAACACAAATAATTATATAAAACAAATAATTTCGCCAGAGTACTACC GCAACAGCCCGAAACTCAAAGGACTTGGCGGTGCTTTATATACCCCTT (SEQ ID NO. 74)	TAGAACAGGCTCCTCTAG
<i>Rattus norvegicus</i>	AB183258	TTAGATACCCCACTATGC	TTAGCCCTAAACCTTAAATTAACCTACAAAAATTATTGCCAGAGAACTACT AGCTACAGCTTAAAACTCAAAGGACTTGGCGGTACTTTATATCCAT (SEQ ID NO. 75)	TAGAACAGGCTCCTCTAG
<i>Sciurus vulgaris</i>	AJ238588	TTAGATACCCCACTATGC	TTAGCCCTAAACATAGACACTCAATTAAACAAGACTGTTGCCAGAGGACTACTA GCTACTGCTTAAAACTCAAAGGACTTGGCGGTGCTTTACATCCCT (SEQ ID NO. 76)	TAGAACAGGCTCCTCTAG
<i>Sorex araneus</i>	AY012102	TTAGATACCCCACTATGC	TTAGCCCTAAACCTCAGGTATTTAACCTAACAAAAATACCCGCCAGAGAACTACT AGCAATAGCTTAAAACTCAAAGGACTTGGCGGTGCTTTATATCCCT (SEQ ID NO. 77)	CAGAACAGGCTCCTCTAG
<i>Sus scrofa</i>	AB292606	TTAGATACCCCACTATGC	CTAGCCCTAAACCCCAATAGTTACATAACAATACTATTCGCCAGAGTACTATC GCAACTGCCTAAAACTCAAAGGACTTGGCGGTGCTTCACATCCAC (SEQ ID NO. 78)	TAGAACAGGCTCCTCTAG
<i>Ursus arctos</i>	AF303110	TTAGATACCCCACTATGC	TTAGCCCTAAACATATAATAATTATTAAACAAAAATTATTGCCAGAGAACTACT AGCAACAGCTTAAAACTCAAAGGACTTGGCGGTGCTTTAAACCCCC (SEQ ID NO. 79)	TAGAACAGGCTCCTCTAG

Tableau 5 - Reptiles

Nom scientifique	Numéro d'accession	Séquence correspondant à 12S-V05 F	Séquence amplifiée	Séquence correspondant à 12S-V05 F
<i>Coronella austriaca</i>	AY122836	TTAGATACCTTACTATGC	CTAACCATACACACAACAAATTAAATCACTTATTGTTCCGCAAAATAACTACGAGTA AAAACCTTAAAAATTTAAAAGACTTGACGGTACCTCAAAACAAC (SEQ ID NO. 80)	TTAGACAGGCTCCTCTAG
<i>Coronella girondica</i>	AY122835	TTAGATACCTTACTATGC	CTAACCATACACACAACAAATCAATAACCCATTGTTCCGCAAAATAACTACGAGTA AAAACCTTAAAAATTTAAAAGACTTGACGGTACCTCAAAACAAC (SEQ ID NO. 81)	TTAGACAGGCTCCTCTAG
<i>Gekko gekko</i>	AY282753	TTAGATACCTTACTATGC	CCAGACGTAACACTTTGATAGAACCAATCACAAATCTATCCGCCAGGGGACTAC TAGTAACCTAACTTAAAACTCCAAAGACTTGACGGTGTTCATATCATC (SEQ ID NO. 82)	TAGGACAGGCTCCTCTAG
<i>Lacerta schreiberi</i>	AF206591	TTAGATACCTTACTATGC	TAAGCCATAAACATTTAGTACCACTATACAACTTCTCCGCCAGAGAAATTACAA GTGAAAAAATTTAAAACCTCAAAAGACTTGACGGTGTCCCATATCGAC (SEQ ID NO. 83)	TAGGACAGGCTCCTCTAG
<i>Naja naja</i>	AF236683	TTAGATACCTTACTATGC	CTAGCCGTAACACAAAACAAATTAAATAACTAAATTGTTCCGCAAAATAACTACGAGTG AAAACCTTAAAAATTTAAAAGACTTGACGGTGTTCACATCAAC (SEQ ID NO. 84)	TTAGACAGGCTCCTCTAG
<i>Natrix maura</i>	AF402623	TTAGATACCTTACTATGC	CTAACCTAACACACACAATAAATTACCAATTGTTCCGCCAAACAACACTACGAGTAAA ACTTAAAAATTTAAAAGACTTGACGGTACTTCACACCACC (SEQ ID NO. 85)	TTAGACAGGCTCCTCTAG
<i>Natrix natrix</i>	AY122682	TTAGATACCTTACTATGC	CTAACCTAACACACAATAAATACTACCAATTGTTCCGCCAAACAACACTACGAGTAAA ACTTAAAAATTTAAAAGACTTGACGGTACTTCACACCACC (SEQ ID NO. 86)	TTAGACAGGCTCCTCTAG
<i>Podarcis muralis</i>	AF206600	TTAGATACCTTACTATGC	TAAGCCCTGAACATTTGATAGTACTAATAACAATACTTTCCGCCAGAGAACTACA AGTGAATAAATTTAAAACCTCAAAAGACTTGACGGTGTCCCATATCGGC (SEQ ID NO. 87)	TAGGACAGGCTCCTCTAG
<i>Vipera ursinii</i>	AF236687	TTAGATACCTTACTATAC	CCAACCAACAACCCACAATTTAAAATACTAATTGTTCCGCCAAACAACACTACGAGTAG TAACTTAAAAATTTAAAAGACTTGACGGTACTTTATATCAAC (SEQ ID NO. 88)	TTAGACAGGCTCCTCTAG

Tableau 6 - Poissons téléostéens

Nom scientifique	Numéro d'accession	Séquence correspondant à 12S-V05 F	Séquence amplifiée	Séquence correspondant à 12S-V05 F
<i>Acipenser persicus</i>	AY544139	TTAGATACCCCACTATGC	TCAGTCATAAACTTTGGTGATAAAATTACACATATTGCCCGCCAGGGTACTACGA GCCCTAGCTTAAACCCCAAGGACTTGGCGGTGCCCGCAGACCCAC (SEQ ID NO. 89)	TAGAACAGGCTCCTCTAG
<i>Anguilla anguilla</i>	AB021887	TTAGATACCCCACTATGC	TCAACCTTAAACAACGATGACAACATACAAATATCATCCGCCAGGGGACTACGA GCGTTAGCTTAAACCCCAAGGACTTGGCGGTGCCTCAAAACCCAC (SEQ ID NO. 90)	TAGAACAGGCTCCTCTAG
<i>Barbus barbus</i>	AB238965	TTAGATACCCCACTATGC	TCAGCCGTAAACTTTAGACATCCAAATACAAATTAGATGTCCGCCAGGGTACTACG AGCACGAGCTTAAACCCCAAGGACTTGGCGGTGCTCAGACCCCC (SEQ ID NO. 91)	TAGAACAGGCTCCTCTAG
<i>Coregonus lavaretus</i>	AB034824	TTAGATACCCCACTATGC	CTAGCCGTAAACTTTGATGAAACATACAACTAACATCCGCCAGGGAACATCAA GCGCCAGCTTAAACCCCAAGGACTTGGCGGTGCCTCAGACCCAC (SEQ ID NO. 92)	TAGAACAGGCTCCTCTAG
<i>Cottus gobio</i>	AB188189	TTAGATACCCCACTATGC	CTAGCCCTAAACATTGATAGTACAAATACACCCACTATCCGCCCGGGTACTACGA GCAATAGCTTAAACCCCAAGGACTTGGCGGTGCTTTAGATCCAC (SEQ ID NO. 93)	TAGAACAGGCTCCTCTAG
<i>Gadus morhua</i>	AM489716	TTAGATACCCCACTATGT	ATGGTCGTAAACATTGATGGTTTATACCCAAACCGTCCGCCTGGGAACATACGA GCAATAGCTTAAACCCCAAGGACTTGGCGGTGCTTTAGACCCCC (SEQ ID NO. 94)	TAGAACAGGCTCCTCTAG
<i>Gasterosteus aculeatus</i>	AP002944	TTAGATACCCCACTATGC	CTAGCCCTAAACATTGATAGTAAATTTACAAACCACTATCCGCCCGGGGACTACAA GCATCAGCTTGAACCCCAAGGACTTGGCGGTGCTTTAGATCCAC (SEQ ID NO. 95)	TAGAACAGGCTCCTCTAG
<i>Labrus merula</i>	AJ810141	TTAGATACCCCACTATGC	TTAGCCGTAAACATTGATAGTACAGTACATCTACTATCCGCCCGGGTACTACGA GCACGAGCTTAAACCCCAAGGACTTGGCGGTGCTTTAGATCCAC (SEQ ID NO. 96)	TAGAACAGGCTCCTCTAG
<i>Lota lota</i>	AP004412	TTAGATACCCCACTATGT	ATGGTTGTTAAACATTGATGGTTTATACTTAAACCACTCCGCCCTGGGTACTACGA GCATTAGCTTAAACCCCAAGGACTTGGCGGTGCTTTAGACCCCC (SEQ ID NO. 97)	TAGAACAGGCTCCTCTAG

32

<i>Oncorhynchus mykiss</i>	DQ288268	TTAGATACCCCACTATGC	CTAGCCGTAAACCTTGATAGAAATATACAAATTGATATCCGCCAGGGAACATAA GCGCAGCTTAAACCCCAAGGACTTGGCGGTGCCTCAGACCCAC (SEQ ID NO. 98)	TAGAACAGGCTCCTCTAG
<i>Salvelinus fontinalis</i>	AF154850	TTAGATACCCCACTATGC	CTAGCCGTAAACCTTGATAGAAATATACAAACTGATATCCGCCAGGGAACATAA GCGCAGCTTAAACCCCAAGGACTTGGCGGTGCCTCAGACCCAC (SEQ ID NO. 99)	TAGAACAGGCTCCTCTAG
<i>Solea solea</i>	AF488492	TTAGATACCCCACTATGC	TTAGCCATAAACATCGATCTTACACAAAAATCCGCCCGGGAACATAAACACG AGTTAAACCCCAAGGACTTGGCGGTGCTTAACATCCAC (SEQ ID NO. 100)	TAGAACAGGCTCCTCTAG

REVENDICATIONS

5

1. Paire d'oligonucléotides, selon laquelle le premier oligonucélotide s'hybride de manière sélective à la séquence SEQ ID NO. 3 et le deuxième nucléotide s'hybride de manière sélective à la séquence SEQ ID NO. 4 dans des conditions de stringences suffisantes pour l'amplification d'une
10 région variable du gène mitochondrial 12S des vertébrés par réaction de polymérisation en chaîne (PCR).

2. Paire d'oligonucléotides selon la revendication 1, selon laquelle la région amplifiée du gène mitochondrial 12S comporte moins de 110 nucléotides.

15

3. Paire d'oligonucléotides selon la revendication 1 ou 2, selon laquelle le premier oligonucléotide présente une séquence nucléotidique sélectionnée dans le groupe consistant en SEQ ID NO. 1 et SEQ ID NO. 6-8 et le deuxième oligonucléotide présente une séquence nucléotidique sélectionnée dans le groupe consistant en SEQ ID NO. 2 et SEQ ID NO. 5.

20

4. Paire d'oligonucléotides selon l'une quelconque des revendications précédentes, selon laquelle la région amplifiée par réaction de polymérisation en chaîne présente une séquence nucléotidique sélectionnée dans le groupe consistant en SEQ ID NO. 9-100.

5. Procédé d'amplification d'une région du gène mitochondrial 12S,
25 comprenant les étapes suivantes :

a) on dispose d'un échantillon susceptible de contenir de l'ADN d'espèces vertébrés ;

b) on réalise une réaction d'amplification en chaîne en utilisant une paire d'oligonucléotides selon l'une quelconque des revendications 1 à 4.

30

6. Procédé de détection d'une espèce vertébrée dans un échantillon, comprenant les étapes suivantes :

a) on dispose d'un échantillon susceptible de contenir de l'ADN d'espèces vertébrés ;

b) on isole l'ADN total contenu dans l'échantillon ;

35

c) on réalise une réaction d'amplification en chaîne en utilisant une paire d'oligonucléotides selon l'une quelconque des revendications 1 à 4 ; et

d) on détecte l'éventuelle présence d'un produit d'amplification.

7. Procédé de détection et d'identification d'une espèce vertébrée dans un échantillon, comprenant les étapes suivantes :

5 a) on dispose d'un échantillon susceptible de contenir de l'ADN d'espèces vertébrés ;

b) on isole l'ADN total contenu dans l'échantillon ;

c) on réalise une réaction d'amplification en chaîne en utilisant une paire d'oligonucléotides selon l'une quelconque des revendications 1 à 4 ;

d) on détecte la présence d'un produit d'amplification ; et

10 e) on détermine la séquence du produit d'amplification pour identifier l'espèce de vertébré contenue dans l'échantillon.

8. Kit pour la détection d'une espèce de vertébré dans un échantillon, comprenant une paire d'oligonucléotides selon l'une quelconque des revendications 1 à 4 et au moins un réactif additionnel.

15 9. Kit selon la revendication 8, comprenant en outre une amorce de blocage selon SEQ ID NO. 101.

10. Kit selon la revendication 8 ou 9, comprenant en outre au moins une autre paire d'oligonucléotides choisis parmi les paires d'amorces :

- amorces d'amplification selon SEQ ID NO.102 et SEQ ID NO.103;

20 - amorces d'amplification selon SEQ ID NO.104 et SEQ ID NO.105;

- amorces d'amplification selon SEQ ID NO.106 et SEQ ID NO.107,

éventuellement avec amorce de blocage selon SEQ ID NO.108 ;

- amorces d'amplification selon SEQ ID NO.109 et SEQ ID NO.110;

- amorces d'amplification selon SEQ ID NO.111 et SEQ ID NO.112;

25 - amorces d'amplification selon SEQ ID NO.113 et SEQ ID NO.114;

- amorces d'amplification selon SEQ ID NO.115 et SEQ ID NO.116;

- amorces d'amplification selon SEQ ID NO.117 et SEQ ID NO.118;

- amorces d'amplification selon SEQ ID NO.119 et SEQ ID NO.120;

- amorces d'amplification selon SEQ ID NO.121 et SEQ ID NO.122,

30 éventuellement avec amorce de blocage selon SEQ ID NO.123 ;

- amorces d'amplification selon SEQ ID NO.124 et SEQ ID NO.125,

éventuellement avec amorce de blocage selon SEQ ID NO.126 ;

- amorces d'amplification selon SEQ ID NO.127 et SEQ ID NO.128,

éventuellement avec amorce de blocage selon SEQ ID NO.129 ;

35 - amorces d'amplification selon SEQ ID NO.130 et SEQ ID NO.131,

éventuellement avec amorce de blocage selon SEQ ID NO.132 ;

- amorces d'amplification selon SEQ ID NO.133 et SEQ ID NO.134, éventuellement avec amorce de blocage selon SEQ ID NO.135 et/ou SEQ ID NO.136; et

- 5 - amorces d'amplification selon SEQ ID NO.137 et SEQ ID NO.138, éventuellement avec amorce de blocage selon SEQ ID NO.139.

11. Utilisation d'au moins une partie de la région variable du gène mitochondrial 12S des vertébrés correspondant aux positions 1078 à 1211 du gène mitochondrial de l'Homme *Homo sapiens* (AB055387) pour détecter des espèces de vertébrés.

- 10 12. Utilisation selon la revendication 11, selon laquelle ladite partie de ladite région correspond à la région variable correspondant aux positions aux positions 1094 à 1193 du gène mitochondrial de l'Homme *Homo sapiens* (AB055387) et est sélectionnée dans le groupe consistant en SEQ ID NO.9-100.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/FR2012/000212

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, BIOSIS, EMBASE, WPI Data, Sequence Search

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	TAKASHI KITANO ET AL: "Two universal primer sets for species identification among vertebrates", INTERNATIONAL JOURNAL OF LEGAL MEDICINE, SPRINGER, BERLIN, DE, vol. 121, no. 5, 15 July 2006 (2006-07-15) , pages 423-427, XP019541912, ISSN: 1437-1596 abstract page 423, right-hand column, paragraph 2 ----- -/--	1-12



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

10 September 2012

Date of mailing of the international search report

19/09/2012

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

Surdej, Patrick

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/FR2012/000212

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	PEREIRA F ET AL: "Analysis of inter-specific mitochondrial DNA diversity for accurate species identification", INTERNATIONAL CONGRESS SERIES, EXCERPTA MEDICA, AMSTERDAM, NL, vol. 1288, 1 April 2006 (2006-04-01), pages 103-105, XP025082698, ISSN: 0531-5131, DOI: 10.1016/J.ICS.2005.09.125 [retrieved on 2006-04-01] abstract page 105, paragraph 2 - paragraph 4 -----	1-12
X	MITANI T ET AL: "Identification of animal species using the partial sequences in the mitochondrial 16S rRNA gene", LEGAL MEDICINE, JAPANESE SOCIETY OF LEGAL MEDICINE, TOKYO, JP, vol. 11, 1 April 2009 (2009-04-01), pages S449-S450, XP026134658, ISSN: 1344-6223, DOI: 10.1016/J.LEGALMED.2009.02.002 [retrieved on 2009-03-16] abstract -----	1-12
Y	RODRIGUEZ M A ET AL: "TaqMan real-time PCR for the detection and quantitation of pork in meat mixtures", MEAT SCIENCE, ELSEVIER SCIENCE, GB, vol. 70, no. 1, 1 May 2005 (2005-05-01), pages 113-120, XP025283296, ISSN: 0309-1740, DOI: 10.1016/J.MEATSCI.2004.12.005 [retrieved on 2005-05-01] abstract page 114, right-hand column, last paragraph - page 115, left-hand column, paragraph 1 -----	1-12
Y	LOPEZ-CALLEJA ET AL: "Quantitative detection of goats' milk in sheep's milk by real-time PCR", FOOD CONTROL, BUTTERWORTH, LONDON, GB, vol. 18, no. 11, 5 May 2007 (2007-05-05), pages 1466-1473, XP022060160, ISSN: 0956-7135, DOI: 10.1016/J.FOODCONT.2006.11.006 abstract page 1467, right-hand column, paragraph 5 - paragraph 6 ----- -/--	1-12

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/FR2012/000212

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	MARTIN ET AL: "Mitochondrial markers for the detection of four duck species and the specific identification of Muscovy duck in meat mixtures using the polymerase chain reaction", MEAT SCIENCE, ELSEVIER SCIENCE, GB, vol. 76, no. 4, 27 April 2007 (2007-04-27) , pages 721-729, XP022050651, ISSN: 0309-1740, DOI: 10.1016/J.MEATSCI.2007.02.013 abstract	1-12
Y	----- LOPEZ-CALLEJA ET AL: "Real-time TaqMan PCR for quantitative detection of cows' milk in ewes' milk mixtures", INTERNATIONAL DAIRY JOURNAL, ELSEVIER APPLIED SCIENCE, BARKING, GB, vol. 17, no. 7, 31 March 2007 (2007-03-31) , pages 729-736, XP022011491, ISSN: 0958-6946, DOI: 10.1016/J.IDAIRYJ.2006.09.005 abstract page 730, right-hand column, paragraph 5	1-12
Y	----- BERRY N ET AL: "Mitochondrial DNA and retroviral RNA analyses of archival oral polio vaccine (OPV CHAT) materials: evidence of macaque nuclear sequences confirms substrate identity", VACCINE, ELSEVIER LTD, GB, vol. 23, no. 14, 25 February 2005 (2005-02-25), pages 1639-1648, XP004739795, ISSN: 0264-410X, DOI: 10.1016/J.VACCINE.2004.10.038 page 1641, right-hand column, paragraph 3	1-12
Y	----- EP 2 113 573 A2 (ENVIRONMENT AGENCY [GB]) 4 November 2009 (2009-11-04) paragraph [0044]; table 1	1-12
Y	----- GB 2 374 597 A (COUNCIL SCIENT IND RES [IN]) 23 October 2002 (2002-10-23) page 1, paragraph 1 page 12, paragraph 2 page 16 - page 17, paragraph 1	1-12
Y	----- US 2003/143534 A1 (GOSWAMI USHA [IN] ET AL) 31 July 2003 (2003-07-31) paragraph [0083] -----	1-12

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/FR2012/000212

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 2113573	A2	04-11-2009	NONE

GB 2374597	A	23-10-2002	NONE

US 2003143534	A1	31-07-2003	US 2003143534 A1 31-07-2003
			US 2005132970 A1 23-06-2005

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°

PCT/FR2012/000212

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, BIOSIS, EMBASE, WPI Data, Sequence Search

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	TAKASHI KITANO ET AL: "Two universal primer sets for species identification among vertebrates", INTERNATIONAL JOURNAL OF LEGAL MEDICINE, SPRINGER, BERLIN, DE, vol. 121, no. 5, 15 juillet 2006 (2006-07-15), pages 423-427, XP019541912, ISSN: 1437-1596 abrégé page 423, colonne de droite, alinéa 2 ----- -/--	1-12



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

10 septembre 2012

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

19/09/2012

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

Surdej, Patrick

C(suite). DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	PEREIRA F ET AL: "Analysis of inter-specific mitochondrial DNA diversity for accurate species identification", INTERNATIONAL CONGRESS SERIES, EXCERPTA MEDICA, AMSTERDAM, NL, vol. 1288, 1 avril 2006 (2006-04-01), pages 103-105, XP025082698, ISSN: 0531-5131, DOI: 10.1016/J.ICS.2005.09.125 [extrait le 2006-04-01] abrégé page 105, alinéa 2 - alinéa 4 -----	1-12
X	MITANI T ET AL: "Identification of animal species using the partial sequences in the mitochondrial 16S rRNA gene", LEGAL MEDICINE, JAPANESE SOCIETY OF LEGAL MEDICINE, TOKYO, JP, vol. 11, 1 avril 2009 (2009-04-01), pages S449-S450, XP026134658, ISSN: 1344-6223, DOI: 10.1016/J.LEGALMED.2009.02.002 [extrait le 2009-03-16] abrégé -----	1-12
Y	RODRIGUEZ M A ET AL: "TaqMan real-time PCR for the detection and quantitation of pork in meat mixtures", MEAT SCIENCE, ELSEVIER SCIENCE, GB, vol. 70, no. 1, 1 mai 2005 (2005-05-01), pages 113-120, XP025283296, ISSN: 0309-1740, DOI: 10.1016/J.MEATSCI.2004.12.005 [extrait le 2005-05-01] abrégé page 114, colonne de droite, dernier alinéa - page 115, colonne de gauche, alinéa 1 -----	1-12
Y	LOPEZ-CALLEJA ET AL: "Quantitative detection of goats' milk in sheep's milk by real-time PCR", FOOD CONTROL, BUTTERWORTH, LONDON, GB, vol. 18, no. 11, 5 mai 2007 (2007-05-05), pages 1466-1473, XP022060160, ISSN: 0956-7135, DOI: 10.1016/J.FOODCONT.2006.11.006 abrégé page 1467, colonne de droite, alinéa 5 - alinéa 6 ----- -/--	1-12

C(suite). DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
Y	MARTIN ET AL: "Mitochondrial markers for the detection of four duck species and the specific identification of Muscovy duck in meat mixtures using the polymerase chain reaction", MEAT SCIENCE, ELSEVIER SCIENCE, GB, vol. 76, no. 4, 27 avril 2007 (2007-04-27) , pages 721-729, XP022050651, ISSN: 0309-1740, DOI: 10.1016/J.MEATSCI.2007.02.013 abrégé	1-12
Y	----- LOPEZ-CALLEJA ET AL: "Real-time TaqMan PCR for quantitative detection of cows' milk in ewes' milk mixtures", INTERNATIONAL DAIRY JOURNAL, ELSEVIER APPLIED SCIENCE, BARKING, GB, vol. 17, no. 7, 31 mars 2007 (2007-03-31), pages 729-736, XP022011491, ISSN: 0958-6946, DOI: 10.1016/J.IDAIRYJ.2006.09.005 abrégé page 730, colonne de droite, alinéa 5	1-12
Y	----- BERRY N ET AL: "Mitochondrial DNA and retroviral RNA analyses of archival oral polio vaccine (OPV CHAT) materials: evidence of macaque nuclear sequences confirms substrate identity", VACCINE, ELSEVIER LTD, GB, vol. 23, no. 14, 25 février 2005 (2005-02-25), pages 1639-1648, XP004739795, ISSN: 0264-410X, DOI: 10.1016/J.VACCINE.2004.10.038 page 1641, colonne de droite, alinéa 3	1-12
Y	----- EP 2 113 573 A2 (ENVIRONMENT AGENCY [GB]) 4 novembre 2009 (2009-11-04) alinéa [0044]; tableau 1	1-12
Y	----- GB 2 374 597 A (COUNCIL SCIENT IND RES [IN]) 23 octobre 2002 (2002-10-23) page 1, alinéa 1 page 12, alinéa 2 page 16 - page 17, alinéa 1	1-12
Y	----- US 2003/143534 A1 (GOSWAMI USHA [IN] ET AL) 31 juillet 2003 (2003-07-31) alinéa [0083]	1-12

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande internationale n°

PCT/FR2012/000212

Document brevet cité au rapport de recherche		Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
EP 2113573	A2	04-11-2009	AUCUN	
GB 2374597	A	23-10-2002	AUCUN	
US 2003143534	A1	31-07-2003	US 2003143534 A1	31-07-2003
			US 2005132970 A1	23-06-2005