

(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
26 avril 2012 (26.04.2012)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 2012/052684 A1

(51) Classification internationale des brevets :
C12Q 1/37 (2006.01) *C02F 1/00* (2006.01)
G01N 33/50 (2006.01) *G01N 1/00* (2006.01)

(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/FR2011/052443

(22) Date de dépôt international :
19 octobre 2011 (19.10.2011)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :
10 58505 19 octobre 2010 (19.10.2010) FR

(71) Déposants (pour tous les États désignés sauf US) :
ATOXIGEN R [FR/FR]; Hôpital Haut Lévêque Ptib, F-
PESSAC 33600 (FR). **UNIVERSITE BORDEAUX 1**
[FR/FR]; 351 cours de la libération, F-33405 Talence
(FR). **CNRS (Centre National de la Recherche**
Scientifique) [FR/FR]; 3 rue Michel Ange, F-75794 Paris
(FR).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement) :
BERRADA, Saadia [FR/FR]; 57 avenue Georges
Clémenceau, F-33400 Talence (FR). **MORIN, Bénédicte**
[FR/FR]; 35 rue César Franck, F-33400 Talence (FR).
CACHOT, Jérôme [—/FR]; 12 rue Pierre de Ladime,
F-33800 Bordeaux (FR).

(74) Mandataire : **AQUINOV, CENATIEMPO, Julie**; Allée
de la Forestière, F-33750 Beychac et Caillau (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, MD,
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).

Déclarations en vertu de la règle 4.17 :

- relative au droit du déposant de revendiquer la priorité
de la demande antérieure (règle 4.17.iii))
- relative à la qualité d'inventeur (règle 4.17.iv))

Publiée :

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

(54) Title : METHOD FOR DETECTION OF IRREVERSIBLE DNA DAMAGE AND MEASUREMENT OF THE GENOTOXIC EFFECTS OF AGENTS ON EARLY DEVELOPMENTAL STAGES OF WHOLE ORGANISMS

(54) Titre : PROCEDE DE DETECTION DE DOMMAGES IRREVERSIBLES DE L'ADN ET MESURE DES EFFETS GENOTOXIQUES D'AGENTS SUR DES STADES PRECOCES DE DEVELOPPEMENT D'ORGANISMES ENTIERES

(57) Abstract : The subject matter of the invention is a method for the detection of irreversible DNA damage, characterized in that it comprises the following steps: obtaining a suspension of isolated cells by dissociation of a pluricellular system, recovering and treating the cells, and measuring the amount of micronuclei formed in the cells. The invention relates more particularly to a method for the measurement of the genotoxic effects of compounds, and also to the uses thereof in particular for detecting, analysing and/or studying the toxicity of compounds on humans or the environment, or for evaluating the therapeutic efficacy of compounds, in particular for evaluating the efficacy of chemotherapeutic or anticancer substances or else for evaluating the efficacy of water or sludge treatment methods.

(57) Abrégé : L'objet de l'invention est un procédé de détection de dommages irréversibles de l'ADN, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes : - obtention d'une suspension de cellules isolées par dissociation d'un système pluricellulaire, - récupération et traitement des cellules, et - mesure du taux de micronoyaux formés dans les cellules. L'invention concerne plus particulièrement un procédé de mesure des effets génotoxiques de composés, ainsi que ses utilisations notamment pour la détection, l'analyse et/ou l'étude de la toxicité de composés sur l'homme ou l'environnement, ou pour l'évaluation de l'efficacité thérapeutique de composés, en particulier pour l'évaluation de l'efficacité de substances chimiothérapeutiques ou de substances ant\-cancéreuses ou encore pour l'évaluation de l'efficacité de procédés de traitement de l'eau ou des boues.

WO 2012/052684 A1

**PROCEDE DE DETECTION DE DOMMAGES IRREVERSIBLES DE L'ADN ET
MESURE DES EFFETS GENOTOXIQUES D'AGENTS SUR DES STADES
PRECOCES DE DEVELOPPEMENT D'ORGANISMES ENTIERS**

La présente invention se rapporte à un procédé permettant de détecter des lésions de l'ADN ainsi qu'à un procédé de mesure des effets génotoxiques induits par des agents chimiques, biologiques ou physiques.

L'invention vise également l'utilisation de ces procédés notamment pour la
5 détection, l'analyse et/ou l'étude de la génotoxicité de composés pour l'homme ou l'environnement, ou pour l'évaluation de l'efficacité thérapeutique de composés, en particulier pour l'évaluation de l'efficacité de substances chimiothérapeutiques ou de substances anti-cancéreuses, ou encore pour l'évaluation de l'efficacité de procédés de traitement de l'eau et des boues.

10 L'identification et la surveillance de substances et facteurs environnementaux susceptibles d'interagir avec le patrimoine génétique des cellules est devenue essentielle.

Dans cette perspective, plusieurs tests de génotoxicité ont été établis en vue de détecter de nouveaux agents génotoxiques, caractériser leurs propriétés et
15 prévenir les conséquences des altérations de l'ADN qu'ils induisent.

Parmi ces tests, on connaît notamment le test du micronoyau, décrit pour la première fois par *Fenech et Morley* (1985).

Les micronoyaux se définissent comme des fragments de chromosomes ou des chromosomes entiers perdus par le noyau cellulaire au cours de la mitose et
20 formant de petites entités bien individualisées dans le cytoplasme des cellules en

interphase. Ils sont générés au cours d'une division cellulaire et proviennent de cassures chromosomiques induites par des agents dits clastogènes, ou d'anomalies du fuseau mitotique induites par des agents dits aneugènes. Ils résultent d'un effet génotoxique direct ou de modifications épigénétiques qui aboutissent à l'apparition de mutations chromosomiques stables.

La formation de micronoyaux est donc une empreinte de dommages irréversibles de l'ADN, dommages qui peuvent déclencher une cascade d'effets biologiques néfastes pour les cellules, les organes, les organismes entiers, voire les populations.

- 10 Le test de numération des micronoyaux ou test du micronoyau est utilisé depuis de nombreuses années pour évaluer la génotoxicité de composés chez les organismes supérieurs. C'est un test de mutagénécité qui permet d'identifier les agents physiques ou chimiques clastogènes ou aneugènes. Il est largement validé et fait l'objet d'une ligne directrice OCDE (N°487).
- 15 La présence de micronoyaux est notamment considérée comme un biomarqueur d'effets génotoxiques. Des études sur des poissons ou des amphibiens ont mis en évidence la présence de micronoyaux dans des cas de pollution avérée aux métaux lourds ou aux hydrocarbures. Chez l'homme on sait que les micronoyaux peuvent permettre de mettre en évidence des dommages chromosomiques induits
- 20 par des agents mutagènes ou cancérogènes.

Les tests in vitro de génotoxicité existants consistent à mettre un seul type de cellules isolées en présence de composés potentiellement génotoxiques de manière directe ou indirecte, leur faire subir au moins une division cellulaire, et comparer le nombre de micronoyaux dans les cellules à celui obtenu avec des

25 cellules contrôles n'ayant pas été exposées aux composés. On peut citer à titre d'exemple la demande de brevet WO-02/14859 qui décrit notamment un tel procédé. Toutefois ce type de procédé, s'il peut être un bon indicateur, ne reflète pas la réalité, car dans la nature les composés ne sont pas directement

mis en contact avec les cellules isolées. Ces tests in vitro ne prennent pas en compte le devenir de la substances dans l'organisme entier. Ils donnent donc une indication du potentiel génotoxique de la substance mais ne prennent pas en compte la toxico-cinétique de ladite substance.

- 5 En outre, ces tests in vitro ne sont pas adaptés pour tester la génotoxicité de substances hydrophobes telles que les HAP, PCB, pesticides organochlorés, solvants, etc., et extraits organiques, en raison de la faible solubilité de ces substances dans l'eau

Pour éviter ces limites, des tests de génotoxicité ont également été développés
10 sur des cellules d'organismes pluricellulaires. Ces tests sont mis en œuvre à partir de cellules isolées prélevées sur des organismes entiers après exposition à la substance étudiée. Il s'agit généralement de cellules provenant de tissus conjonctifs, en particulier des lymphocytes ou des érythrocytes.

La demande de brevet WO-2007/038664 par exemple décrit l'application du
15 test des micronoyaux pour l'analyse de cellules de moelle osseuse ou du sang périphérique de souris. Le test a également été appliqué à des érythrocytes d'amphibiens pleurodèles (Jaylet et al., « A new micronucleus test using peripheral blood erythrocytes of to newt *Pleurodeles waiti* to detect mutagens in fresh-water pollution » *Mutation Research* vol.164 issue 4 (august1986) p245-257), de poissons
20 (Bahari et al., « Micronucleated erythrocytes as an assay to assess actions by physical and chemical genotoxic agents in *Clarias gariepinus* » *Mutation Research* , 313 :1-5 (1994)), ou sur l'hémolymphe des bivalves tels que des huîtres (Burgeot et al., « The micronucleus assay in *Crassostrea gigas* for the detection of seawater genotoxicity » *Mutation Res. - Genetic Toxicology* 342: 125-140 (1995)).

- 25 Toutefois ces procédés présentent eux aussi plusieurs inconvénients.

Tout d'abord ces tests ont recours à des animaux. Or, la sensibilité du public et la réglementation actuelle, notamment européenne, imposent que l'on limite l'expérimentation sur animaux juvéniles ou adultes dans le cadre des tests de toxicologie.

En outre, ces procédés sont très coûteux et ne permettent pas toujours de réaliser des études d'innocuité. La quantification des micronoyaux est le plus souvent réalisée sur des cellules isolées accessibles au prélèvement et non sur l'organe ou le tissu cible susceptible de subir des dommages d'où une tendance à
5 minimiser les effets produits par la substance.

Il subsiste donc un besoin pour un outil complet de détection d'altérations irréversibles de l'ADN, palliant les inconvénients des procédés de l'art antérieur.

Pour y répondre, l'invention propose d'utiliser des organismes pluricellulaires, à savoir des organismes entiers à des stades précoces de développement. En

10 particulier l'invention vise un procédé de détection de dommages irréversibles de l'ADN à partir d'embryons ou de larves d'amphibiens, de mollusques, de poissons ou d'annélides, ou à partir d'embryons de mammifères animaux, comprenant notamment les étapes suivantes :

- obtention d'une suspension de cellules isolées par dissociation
15 physique et enzymatique dudit système pluricellulaire,
- récupération et traitement des cellules, et
- mesure du taux de micronoyaux formés dans les cellules.

Par « système pluricellulaire » au sens de l'invention, on entend donc tout système constitué d'au moins deux types cellulaires, système choisi parmi :

- 20 - tout amphibien, tout mollusque, tout poisson ou tout annélide, à un stade embryo-larvaire ou larvaire,
- tout embryon de mammifère animal, par exemple des embryons de rats ou de souris.

Par mammifère animal on entend tout mammifère à l'exception des êtres
25 humains.

Préférentiellement on choisira le système pluricellulaire parmi les embryons ou les larves d'amphibiens, de poissons, de mollusques ou d'annélides.

Par « stade embryo-larvaire » ou « embryo-larve », on entend toute pro-larve ou embryon c'est à dire tout embryon destiné à donner une larve, avant éclosion de ladite larve.

L'invention vise aussi un procédé de mesure du potentiel génotoxique d'agents
5 chimiques, biologiques ou physiques, comprenant notamment les étapes suivantes :

- mise en contact d'au moins un organisme entier d'amphibien, de mollusque, d'annélide ou de poisson à un stade embryo-larvaire, avec au moins un agent dont la génotoxicité doit être évaluée,

- 10 - récupération de l'organisme entier à un stade embryonnaire plus avancé ou après éclosion à un stade larvaire, et

- dissociation physique et enzymatique de l'organisme récupéré de façon à obtenir une suspension de cellules isolées,

- récupération et traitement des cellules, et

- 15 - mesure du taux de micronoyaux formés.

Par « agent » au sens de l'invention, on entend tout agent chimique et/ou biologique, pur ou au sein d'une composition, ou tout agent physique dont on souhaite évaluer les effets génotoxiques. Cela peut être par exemple :

- des polluants progénotoxiques que l'on est susceptible de trouver dans
20 l'environnement, comme les hydrocarbures aromatiques polycycliques, certains pesticides et solvants organochlorés, les amines aromatiques,

- des polluants génotoxiques directs que l'on est susceptible de trouver dans l'environnement, comme des hydrocarbures aromatiques polycycliques nitrés, des nitrosoalkylurée, certains métaux,

- 25 - des anticancéreux (bléomycine, cisplatine, carboplatine, etc.), ou encore

- des radiations, ionisantes ou non ionisantes.

Avantageusement, le procédé de détection d'altérations irréversibles de l'ADN selon l'invention est économique et permet d'analyser un grand nombre de

molécules en un minimum de temps. Il permet de renseigner sur des effets à plus long terme comme l'instabilité génétique et le cancer. Il présente une grande spécificité et sensibilité de réponse.

L'exposition à un stade très précoce du développement des organismes, le stade embryonnaire, permet d'évaluer les effets génotoxiques de polluants au moment où la croissance cellulaire est à son maximum et les systèmes de réparation de l'ADN sont inopérants.

Le procédé selon l'invention peut être utilisé dans différents domaines, en particulier pour l'évaluation de l'efficacité thérapeutique de composés ou pour la détection, l'évaluation de la génotoxicité et/ou l'étude de contaminants environnementaux ou encore l'évaluation de l'impact potentiel de ces polluants pour la santé humaine ou l'environnement.

D'autres caractéristiques et avantages de l'invention ressortiront de la description détaillée qui va suivre.

Selon un premier objet, l'invention vise donc un procédé de détection de dommages irréversibles de l'ADN à partir d'un système ou organisme pluricellulaire choisi parmi les organismes entiers d'amphibiens, de mollusques, d'annélides ou de poissons, à un stade larvaire ou embryo-larvaire, et les embryons de mammifères animaux, comprenant les étapes suivantes :

- obtention d'une suspension de cellules isolées par dissociation physique et enzymatique dudit système pluricellulaire,
- récupération et traitement des cellules, et
- mesure du taux de micronoyaux formés dans les cellules.

Préférentiellement, la suspension de cellules est obtenue en réalisant sur le système pluricellulaire, au moins deux dissociations successives : une dissociation mécanique (dissociation physique) suivie d'au moins une dissociation enzymatique.

Encore plus préférentiellement la suspension de cellules est obtenue en réalisant sur le système pluricellulaire, trois dissociations successives : une dissociation mécanique suivie de deux dissociations enzymatiques.

Par dissociation enzymatique, on entend une dissociation comprenant l'utilisation d'au moins une enzyme. La dissociation enzymatique peut éventuellement comprendre des sous-étapes de traitement mécanique.

Selon un mode de réalisation particulièrement adapté, l'obtention de la suspension de cellules isolées est réalisée par la mise en œuvre des étapes suivantes :

- 10 - dissociation mécanique du système pluricellulaire,
- dissociation par digestion enzymatique à la collagénase, et
- dissociation des amas cellulaires non dissociés par la collagénase, avec de la trypsine.

Préférentiellement, l'étape de dissociation mécanique comprend au moins la mise en œuvre des sous-étapes suivantes :

- découper le système pluricellulaire (embryon ou larve) à l'aide de lames, par exemple des lames de rasoir ou un scalpel à lames très fines,
- placer le matériel découpé dans un milieu de culture adapté en fonction du système pluricellulaire utilisé,
- 20 - centrifuger entre 5 et 30 minutes, et
- enlever le milieu de culture.

La dissociation enzymatique réalisée ensuite comprend préférentiellement la mise en œuvre des sous-étapes suivantes :

- placer le matériel issu de la dissociation mécanique dans un milieu contenant de la collagénase,
- 25 - incuber, préférentiellement à 37°C sous agitation douce, puis centrifuger, préférentiellement entre 5 et 30 minutes, et
- enlever le milieu de culture avec la collagénase.

La collagénase est la collagénase IV. De façon préférée la collagénase est issue de *Clostridium histolyticum*. Pour un meilleur résultat, la collagénase est utilisée à une concentration comprise entre 0,2 et 2 mg/ml de milieu de culture, en particulier entre 0,5 et 1,8 mg/ml.

5 Cette dissociation à la collagénase est préférentiellement suivie d'une seconde dissociation enzymatique. Cette seconde dissociation enzymatique est réalisée lors de la présence d'amas cellulaires. Elle comprend préférentiellement au moins la mise en œuvre des sous-étapes suivantes :

- placer le matériel issu de la première dissociation enzymatique en
10 contact avec de la trypsine,
- incuber, préférentiellement à 37°C sous agitation douce,
- rincer avec du milieu de culture et dissocier mécaniquement le culot cellulaire, notamment avec un mouvement de va et vient,
- éventuellement filtrer la suspension cellulaire sur un tamis de
15 diamètre compris entre 50 et 200 microns, dans un but d'automatisation du test,
- centrifuger, préférentiellement entre 5 et 30 minutes, et
- renouveler l'opération une fois.

On obtient ainsi une suspension de cellules hétérogènes isolées.

Avantageusement, ce procédé permet d'obtenir un grand nombre de cellules
20 dissociées pour une petite quantité d'embryons, de pro-larves ou de larves. De plus la suspension de cellules comporte plusieurs types cellulaires.

Les cellules isolées sont ensuite récupérées et traitées. De façon particulièrement adaptée, cette étape peut comprendre au moins la mise en œuvre des sous-étapes suivantes :

- 25 - faire subir aux cellules un choc hypotonique, afin de faire gonfler les cellules pour augmenter la détection des micronoyaux ultérieurement dans le cas d'une coloration de Wright,

- centrifuger au moins une fois la suspension cellulaire et la mettre en contact avec un fixateur,

- prélever le surnageant,

- procéder à une coloration des cellules.

- 5 Pour réaliser le choc hypotonique, les cellules peuvent être baignées dans une solution de Chlorure de Potassium. Le potassium joue un rôle dans la régulation du volume cellulaire : lors d'une augmentation du volume d'une cellule, les canaux potassiques sont ouverts permettant alors le passage d'eau contenant ces ions du milieu le plus concentré vers le moins concentré. Une plus grande concentration
- 10 en ion potassium dans le milieu extérieur permet une absorption d'eau et d'ions par la cellule, et donc l'augmentation du volume de celle-ci.

Après le choc hypotonique, les cellules sont centrifugées et fixées. Il peut y avoir alternativement plusieurs répétitions : centrifugation de la suspension cellulaire puis fixation.

- 15 Le fixateur est préférentiellement une solution de Carnoy ou une solution de Carnoy modifiée, contenant notamment de l'acide acétique et du méthanol. Le ratio acide acétique/méthanol est préférentiellement compris entre 2/1 et 5/1. L'acide acétique crée des liaisons hydrogènes avec les têtes polaires des phospholipides, permettant ainsi une stabilisation de la structure cellulaire. Le
- 20 méthanol quant à lui permet aux molécules d'eau du milieu de solubiliser les protéines, en faisant gonfler les structures tridimensionnelles de ces protéines.
- Après la dernière centrifugation, le surnageant est prélevé et on dispose les cellules par spot sur des lames dégraissées. Les lames sont ensuite séchées puis colorées.

- 25 En effet, avant de pouvoir mesurer le taux de micronoyaux formés notamment par acquisition et analyse d'images au microscope, les cellules sont colorées. Elles peuvent notamment être colorées par une coloration Wright stain ou May-Grünwald Giemsa, ou une coloration Wright stain ou May-Grünwald Giemsa

modifiée. La révélation des micronoyaux peut également s'opérer par marquage fluorescent (acridine orange, DAPI, etc.) et lecture sous microscope à épifluorescence.

Après coloration, on procède à la détection qualitative et/ou quantitative de la
5 présence de micronoyaux dans les cellules.

La population cellulaire est composée de différentes sortes de cellules, le système de départ étant multicellulaire. Toutes les cellules présentes sur les lames sont au stade mononuclée. La procédure de lecture des cellules et de recherche des micronoyaux tient compte de trois types d'objets distincts : les
10 cellules, les noyaux et les micronoyaux.

Les lames sont préférentiellement lues au microscope à l'œil nu ou grâce à un dispositif automatisé. Les lames peuvent être lues avec un microscope optique.

Il convient ensuite de comptabiliser le nombre de cellules mononuclées avec un ou plusieurs micronoyaux.

15 Les critères de reconnaissance des noyaux sont notamment les suivants :

- le noyau doit être contenu dans le cytoplasme,
- le noyau doit avoir une forme ronde ou ovale,
- les courbures maximales admissibles pour les noyaux en forme de haricot doivent être nettes.

20 Les critères de reconnaissance des micronoyaux sont notamment les suivants :

- le micronoyau doit être rond ou ovale avec des bords lisses,
- le micronoyau peut être légèrement connecté au noyau principal et le chevaucher,
- le micronoyau n'est pas réfringent et peut se distinguer

25 d'artéfacts,

- le micronoyau doit avoir la même coloration que les noyaux principaux,

- le micronoyau doit avoir approximativement la même intensité de coloration que les noyaux principaux,

- le diamètre des micronoyaux varie entre 1/10 et 1/3 de l'aire du noyau principal.

5 La présence de micronoyaux indique une altération d'ADN irréversible. Le procédé selon l'invention est ainsi utile comme biomarqueur d'atteintes génotoxiques.

Avantageusement, le procédé selon l'invention peut donc être utilisé pour détecter des lésions irréversibles de l'ADN.

10 D'une manière générale, le procédé de détection de lésions irréversibles de l'ADN selon l'invention peut être utilisé pour mesurer les effets génotoxiques de divers agents ou composés.

C'est pourquoi, l'invention vise donc également un procédé particulier de mesure des effets génotoxiques d'agents chimiques, biologiques ou physiques. Le procédé

15 comprend au moins les étapes suivantes :

- mise en contact d'un organisme entier de type amphibien, mollusque, annélide ou poisson à un stade embryon-larvaire ou mammifère animal à un stade embryonnaire, avec au moins un agent dont la génotoxicité doit être évaluée,

20 - récupération de l'organisme entier à un stade embryonnaire plus avancé ou après éclosion à un stade larvaire, et

- détection de la présence de dommages irréversibles de l'ADN par la mise en œuvre du procédé décrit précédemment, comprenant notamment les étapes suivantes :

25

- obtention d'une suspension de cellules isolées par dissociation physique et enzymatique dudit système pluricellulaire,
- récupération et traitement des cellules, et

- mesure du taux de micronoyaux formés dans les cellules.

Selon l'invention, les embryons sont donc mis en contact avec un composé potentiellement toxique, à un stade très précoce du développement où le taux de division cellulaire est très élevé. Le procédé selon l'invention permet ainsi d'évaluer efficacement si les systèmes de réparation cellulaire sont suffisants pour protéger l'organisme de l'impact sur l'ADN du composé testé. De plus, les embryons de mammifères animaux, de poissons, de mollusques, d'annélides et d'amphibiens respectent les nouvelles règles bioéthiques concernant l'expérimentation animale.

- 10 Parmi les mollusques, on peut notamment choisir parmi les gastéropodes et les bivalves, en particulier l'escargot petit-gris (*Helix aspersa*) et l'Huitre creuse (*Crassostrea gigas*).

Parmi les poissons, on peut notamment choisir parmi les poissons téléostéens, en particulier le Poisson Zèbre (*Danio rerio*) ou le Medaka japonais (*Oryzias latipes*).

- 15 Parmi les annélides on peut notamment choisir parmi les lombrics (*Lombricidae*), en particulier le vers du fumier (*Eisenia fetida*).

Parmi les amphibiens on peut notamment choisir parmi le xénope (*Xenopus laevis*) ou la pleurodèle (*Pleurodeles waltlii*).

- De façon préférée, on utilise des embryo-larves de téléostéens, notamment de Poisson Zèbre (*Danio rerio*) ou de Medaka japonais (*Oryzias latipes*). Très préférentiellement on utilise des embryo-larves de Medaka. Le Medaka est un petit poisson d'eau douce originaire d'Asie du sud-est. Il est utilisé comme modèle en génétique depuis de nombreuses années. C'est un modèle biologique vertébré reconnu au niveau international en toxicologie et fait partie d'une des espèces de poisson d'eau douce préconisée par l'OCDE pour l'évaluation des dangers et des risques des substances chimiques.

Après fertilisation des œufs de poissons, de mollusques, d'annélides ou d'amphibiens, les embryons sont récoltés. Ils sont ensuite maintenus dans un

milieu approprié à leur développement, par exemple un milieu ERS (« Egg Rearing Solution, solution pour l'élevage d'œufs»), ou sur sédiments jusqu'à éclosion. Selon une variante, les embryons peuvent être préalablement déchorionisés, par exemple avec de l'EEE (Enzyme d'Eclosion des Embryons) pour permettre une

5 meilleure pénétration du composé à tester et accroître la sensibilité du test.

Les embryons sont mis en contact avec l'agent dont on souhaite évaluer la génotoxicité, entre 1 heure et 10 jours après fertilisation des oeufs.

Le traitement peut être aigu ou subaigu par balnéation, dépôt topique à la surface de l'œuf, sédiment-contact ou microinjection dans l'œuf.

- 10 De façon préférentielle, si la substance étudiée est hydrosoluble elle est solubilisée dans le milieu de culture des embryons et si la substance est hydrophobe, elle est déposée à la surface de l'embryon, microinjectée dans l'œuf ou enrobée sur un sédiment ou un sol sur lequel sont incubés les œufs.

Pour la première variante, les embryo-larves peuvent par exemple être exposés à

15 différentes concentrations de l'agent ou composé à tester (notamment composés hydrosolubles et certains sels métalliques) dilué dans le milieu de culture. Au bout de 24 à 48 heures d'exposition, les embryons sont rincés et remis dans du milieu propre jusqu'à éclosion. Une autre alternative est une exposition chronique à faibles doses pendant toute la durée du développement embryonnaire.

- 20 Pour la seconde variante, les embryons fécondés sont disposés sur du sédiment ou un sol préalablement enrobé avec le composé à tester (composés hydrophobes et certains métaux lourds) à différentes concentrations. Les embryons restent ensuite en contact avec ce sédiment ou le sol pendant 24h ou pendant toute la durée de leur développement embryonnaire.

- 25 Après éclosion les larves sont placées dans de l'eau de mélange (eau osmosée et eau du robinet) dans des conditions d'élevage appropriées.

On les récolte entre 0 et 15 jours après éclosion, préférentiellement entre 1 et 10 jours après éclosion, quoiqu'il en soit toujours avant que la larve n'ait terminé

son développement (avant métamorphose complète). Au moment de la récolte, préalablement à la phase de dissociation des larves, il est préférable de plonger les larves dans l'eau entre 0 et 4°C, éventuellement à plusieurs reprises, afin de les anesthésier. On peut également les rincer avec un milieu de culture cellulaire
5 stérile contenant des antibiotiques.

Il convient ensuite de mettre en œuvre les étapes de dissociation des larves, de récupération et traitement des cellules isolées obtenues, et enfin de mesure du taux de micronoyaux formés.

L'étape de mesure du taux de micronoyaux formé dans les cellules comprend
10 préférentiellement une étape de comparaison avec les résultats obtenus avec des embryo-larves n'ayant pas été mises en contact avec le composé, l'agent dont la génotoxicité doit être évaluée.

Un tel procédé constitue un bioessai pour la mesure de la génotoxicité d'agents physiques, chimiques ou biologiques seuls ou intégrés dans des compositions,
15 rapide, simple à mettre en œuvre, économique et très efficace.

Le procédé de mesure des effets génotoxiques d'agents chimiques, biologiques ou physiques selon l'invention peut être utilisé en écotoxicologie pour étudier l'impact de contaminants environnementaux contenus dans diverses matrices, par exemple l'eau, les sédiments, les matières en suspension, les sols, etc. Le procédé
20 selon l'invention peut donc être utilisé pour la détection, l'analyse et/ou l'étude de contaminants environnementaux et l'étude de la qualité de l'environnement.

Il peut par exemple être utilisé pour l'évaluation de la toxicité d'effluents urbains ou industriels, de boues de dragage ou de stations d'épuration. A titre d'exemple spécifique, il peut être utilisé pour le contrôle de la qualité de l'eau ou
25 d'une boue après traitement dans les stations d'épuration ou l'évaluation de l'efficacité d'un procédé de potabilisation de l'eau ou d'épuration de l'eau ou des boues ou encore pour contrôler la dépollution des sols.

L'invention vise aussi l'utilisation du procédé de mesure des effets génotoxiques d'agents chimiques, biologiques ou physiques, pour la détection, l'analyse et/ou l'étude de la génotoxicité de composés pour l'homme, notamment en cosmétologie, en agrochimie, agroalimentaire et en pharmacie. Le procédé peut également être utile pour évaluer l'efficacité thérapeutique de composés, en particulier de substances chimiothérapeutiques ou de substances anti-cancéreuses.

D'une manière générale, le procédé selon l'invention peut donc constituer un test prédictif ou diagnostic en biosurveillance sanitaire et/ou environnementale. Son utilisation peut permettre de démontrer la pollution d'un milieu donné.

De façon avantageuse, le procédé selon l'invention est très sensible et permet de démontrer la génotoxicité de composés présents en très faibles concentrations dans un milieu donné. Appliqué sur organisme entier (embryons ou larves), il peut aussi permettre de révéler ou confirmer la bio-disponibilité de substances en démontrant qu'elles sont capables de pénétrer dans les organismes, qu'elles ont été distribuées dans leurs tissus, y ont été métabolisées, transformées et y ont induit des effets biologiques.

L'invention est à présent illustrée par un exemple non limitatif de mise en œuvre de l'invention.

Cet exemple consiste à tester sur des embryo-larves de Medaka, trois agents : le Cadmium et deux hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP), le Benzo[a]pyrène (BaP) et le Fluoranthène.

Le Cadmium est connu pour sa toxicité depuis plus de 50 ans. Il est bioaccumulé dans les organismes et bioamplifié tout au long de la chaîne trophique. Il est toxique sous toutes ses formes (sel, métal, vapeur, composés organiques) et il est reconnu comme étant un CMR (cancérogène, mutagène, reprotoxique).

Le BaP ($C_{20}H_{12}$) est l'un des HAP les plus connus et étudiés. C'est aussi l'un des plus toxiques. Il est mutagène et fortement cancérogène car après bioactivation

en benzo[a]pyrène diol époxyde il forme des interactions covalentes fortes avec certaines bases de l'ADN. Il est formé lors de la combustion incomplète de matières organiques, d'où son importante représentation dans l'environnement.

Le fluoranthène est un hydrocarbure aromatique polycyclique très répandu dans l'environnement. Il est le produit d'une combustion incomplète de la matière organique. Ses effets sont mal connus et de nombreuses études tendent à montrer qu'il n'est pas génotoxique.

L'étude est réalisée sur des embryo-larves de Medaka. Les poissons adultes sont élevés dans des aquariums (2/3 d'eau osmosée et 1/3 d'eau du robinet) avec un ratio de 2 mâles pour une femelle. La température est maintenue à 24°C et la photopériode correspond à la photopériode naturelle. Les poissons sont nourris deux fois par jour et l'eau est renouvelée deux fois par semaine pour au moins 1/5 du volume.

Le protocole opératoire est décrit en suivant.

15 1 - CONTAMINATION

Après fertilisation des œufs, les embryons sont récoltés.

- Pour le BaP ou le Cadmium

Les embryons sont disposés dans un tampon ERS composé de [NaCl (1g), KCl (0,03g), CaCl₂ (0,04g), MgSO₄ (0,163g)].

20 Entre le jour 3 et le jour 4 après fécondation, les embryons sont exposés pendant 24 heures à différentes concentrations de contaminant (0,1 µM, 1 µM et 10 µM) dilué dans l'ERS.

Au bout de 24 heures, les embryons sont rincés et remis dans de l'ERS jusqu'à leur éclosion.

25 - Pour le Fluoranthène

Les embryons sont disposés sur du sédiment préalablement enrobé de fluoranthène à différentes concentrations (0,22µg/g, 0,44µg/g et 1,72µg/g). Afin de calquer les conditions naturelles, les embryons restent en contact avec

ce sédiment jusqu'à leur éclosion. Le sédiment n'est pas renouvelé au cours de l'expérience. Les embryons sont recouverts de milieu de culture (tampon ERS).

Un contrôle négatif sans contaminant est réalisé en parallèle.

Après l'éclosion, quel que soit le type de contamination, les larves sont placées dans de l'eau de mélange pendant 10 jours, afin de permettre la fixation des dommages primaires sous forme de mutations et de pouvoir disposer de suffisamment de cellules.

Les larves sont ensuite placées dans des microtubes qui sont plongés au moins 5 minutes dans l'eau avec de la glace fondue afin de les anesthésier. Les larves sont ensuite rincées avec du milieu de culture cellulaire stérile contenant des antibiotiques. Cette opération est renouvelée une fois.

2 - DISSOCIATION

Les larves sont ensuite dissociées en trois étapes successives : une dissociation mécanique et deux dissociations enzymatiques.

15 a- Dissociation mécanique

La dissociation mécanique est réalisée comme suit :

- une quinzaine de larves sont récupérées à l'aide d'une pipette et sont placées dans une boîte de Pétri,
- les larves sont découpées finement avec une lame de rasoir stérile,
- le matériel est récupéré dans des tubes eppendorf contenant du milieu de culture, qui est ensuite mis dans de la glace,
- le matériel est ensuite centrifugé entre 5 et 30 minutes, puis
- le milieu de culture est enlevé.

25 b- 1^{ère} dissociation enzymatique

De la collagénase issue de *Clostridium histolyticum* type IV est introduite dans du milieu de culture, à une concentration d'environ 1mg/ml.

La dissociation est ensuite réalisée comme suit :

- le milieu de culture contenant de la collagénase est introduit dans les tubes contenant le matériel issu de la dissociation mécanique,

- les tubes sont placés dans un incubateur à 37°C sous agitation douce pendant entre 30 et 60 minutes, puis centrifugés pendant entre 5 et 30 minutes, et

- le milieu de culture contenant la collagénase est enlevé.

c- 2^{nde} dissociation enzymatique

Eventuellement, une seconde dissociation enzymatique peut être mise en œuvre.

Il s'agit d'une désagrégation à la trypsine. Cette étape comprend une sous-étape

de dissociation mécanique. Elle est réalisée par la mise en œuvre des étapes suivantes :

- ajouter de la trypsine dans les tubes,

- placer les tubes dans l'incubateur à 37°C sous agitation douce entre 5 et 20 minutes,

- rincer la suspension cellulaire avec du milieu de culture,

- dissocier mécaniquement le culot cellulaire avec un mouvement de flux et reflux à l'aide d'une micropipette,

- éventuellement filtrer la suspension cellulaire sur un tamis de diamètre compris entre 50 et 200 microns,

- centrifuger pendant entre 5 et 30 minutes, et

- renouveler l'opération une fois en laissant la suspension cellulaire reposer dans ce milieu entre 2 et 10°C.

3 - RECOLTE ET TRAITEMENT DES CELLULES

Après dissociation, les cellules sont baignées dans une solution de KCl.

La suspension cellulaire est ensuite centrifugée entre 5 et 18 minutes, puis le culot est repris dans un fixateur composé de méthanol et d'acide acétique dans

un ratio 4/1 entre 5 et 30 minutes. L'opération est renouvelée une fois et la suspension suit une dernière centrifugation.

Le surnageant est prélevé, et les cellules sont déposées par spot sur des lames.

On procède ensuite à la coloration.

- 5 Les lames sont colorées avec du colorant de Wright stain. Le procédé de coloration est le suivant :

- préparer une solution mère de colorant comprenant du méthanol

dilué avec du PBS et de l'eau distillée,

- plonger les lames dans du colorant dilué pendant quelques minutes,

10 - rincer les lames à l'eau courante, et

- laisser sécher les lames.

4 - LECTURE DES LAMES

Les lames sont lues avec un microscope optique au grossissement X400. Mille cellules sont dénombrées en moyenne sur une lame.

- 15 Les résultats obtenus en nombre moyen de cellules présentant des micronoyaux pour 1000 cellules sont présentés dans le tableau ci-dessous :

		Nombre moyen de micronoyaux pour 1000 cellules
Cadmium	Témoin	10,36
	1µM	18,1
	10µM	24,96
	100µM	33,48
BaP	Témoin	9,73
	0,1µM	18,99
	1µM	30,60
Fluoranthène	Témoin	11,82
	0,22µg/g	11,93
	0,44µg/g	11,35
	1,72µg/g	10,27

Les résultats obtenus pour le Cadmium et le BaP, connus pour leur génotoxicité, révèlent la présence de micronoyaux en plus grand nombre que pour les témoins

non traités. Cela confirme que le procédé selon l'invention permet de révéler de façon dose-dépendante la génotoxicité de composés génotoxiques.

On constate par ailleurs qu'avec le procédé selon l'invention, le Fluoranthène n'induit pas de génotoxicité, ce qui confirme un certain nombre d'autres études

5 menées sur le sujet.

REVENDICATIONS

1. Procédé de détection de dommages irréversibles de l'ADN à partir d'un système pluricellulaire choisi parmi les organismes entiers d'amphibiens, de mollusques, d'annélides ou de poissons, lesdits organismes étant à un stade larvaire ou embryo-larvaire, et les embryons de mammifères animaux à l'exception des êtres humains, comprenant les étapes suivantes :

- obtention d'une suspension de cellules hétérogènes isolées par dissociation physique et enzymatique dudit système pluricellulaire,
- récupération et traitement des cellules, et
- mesure du taux de micronoyaux formés dans les cellules.

2. Procédé de détection de dommages irréversibles de l'ADN selon la revendication 1, caractérisé en ce que l'obtention de la suspension de cellules isolées est réalisée par la mise en œuvre d'au moins deux dissociations successives du système pluricellulaire : une dissociation mécanique suivie d'au moins une dissociation enzymatique.

3. Procédé de détection de dommages irréversibles de l'ADN selon la revendication 1 ou 2, caractérisé en ce que l'obtention de la suspension de cellules isolées est réalisée par la mise en œuvre de trois dissociations successives du système pluricellulaire : une dissociation mécanique suivie de deux dissociations enzymatiques.

4. Procédé de détection de dommages irréversibles de l'ADN selon l'une des précédentes revendications, caractérisé en ce que l'obtention de la suspension de cellules isolées est réalisée par la mise en œuvre des étapes suivantes :

- dissociation mécanique du système pluricellulaire,
- dissociation par digestion enzymatique à la collagénase, et

- éventuellement dissociation des amas cellulaires non dissociés par la collagénase, avec de la trypsine.

5. Procédé de détection de dommages irréversibles de l'ADN selon l'une des revendications 2 à 4, caractérisée en ce que l'étape de dissociation

5 mécanique comprend au moins la mise en œuvre des sous-étapes suivantes :

- découper le système pluricellulaire à l'aide de lames,
- placer le matériel découpé dans un milieu de culture adapté,
- centrifuger, et
- enlever le milieu de culture.

10 6. Procédé de détection de dommages irréversibles de l'ADN selon l'une des revendications 2 à 5, caractérisé en ce que la dissociation enzymatique ou première dissociation enzymatique comprend au moins la mise en œuvre des sous-étapes suivantes :

- placer le matériel issu de la dissociation mécanique dans un milieu
- 15 de culture contenant de la collagénase,
- incuber puis centrifuger, et
- enlever le milieu de culture.

7. Procédé de détection de dommages irréversibles de l'ADN selon l'une des revendications 3 à 6, caractérisé en ce que la seconde dissociation

20 enzymatique comprend au moins la mise en œuvre des sous-étapes suivantes :

- placer le matériel issu de la première dissociation enzymatique en contact avec de la trypsine,
- incuber, rincer avec du milieu de culture et dissocier mécaniquement le culot cellulaire,
- 25 - éventuellement filtrer la suspension cellulaire sur un tamis de diamètre compris entre 50 et 200 microns,
- centrifuger, et
- renouveler l'opération une fois.

8. Procédé de détection de dommages irréversibles de l'ADN selon l'une des précédentes revendications, caractérisé en ce que l'étape de récupération et de traitement des cellules de la suspension comprend au moins la mise en œuvre des sous-étapes suivantes :

- 5 - faire subir aux cellules un choc hypotonique,
- centrifuger au moins une fois la suspension cellulaire et la mettre en contact avec un fixateur,
- prélever le surnageant,
- procéder à une coloration des cellules.

10 9. Procédé de détection de dommages irréversibles de l'ADN selon l'une des précédentes revendications, caractérisé en ce que le traitement des cellules avant mesure du taux de micronoyaux formés, consiste notamment à procéder à une coloration Wright stain ou May-Grünwald Giemsa.

15 10. Procédé de détection de dommages irréversibles de l'ADN selon l'une des précédentes revendications, caractérisé en ce que l'étape de mesure du taux de micronoyaux formés dans les cellules, se fait à l'aide d'un microscope à l'œil nu ou grâce à un dispositif automatisé.

 11. Utilisation d'un procédé selon l'une des revendications 1 à 10, pour mesurer les effets génotoxiques d'agents chimiques, biologiques ou physiques.

20 12. Procédé de mesure des effets génotoxiques d'agents chimiques, biologiques ou physiques, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

- mise en contact d'un organisme entier de type amphibien, mollusque, annélide ou poisson, lesdits organismes étant à un stade embryonnaire, ou mammifère animal à un stade embryonnaire à l'exception des êtres
- 25 humains, avec au moins un agent dont la génotoxicité doit être évaluée,
- récupération de l'organisme entier à un stade embryo-larvaire plus avancé ou après éclosion à un stade larvaire, et

- détection de la présence de dommages irréversibles de l'ADN par la mise en œuvre du procédé selon l'une des revendications 1 à 10.

13. Procédé de mesure des effets génotoxiques d'agents selon la revendication 12, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

5 - après fertilisation d'œufs d'amphibiens, de mollusques, d'annélides ou de poissons, récolte des embryo-larves,

 - mettre les embryo-larves en contact avec l'agent dont la génotoxicité doit être évaluée et maintenir les embryo-larves dans un milieu approprié à leur développement jusqu'à éclosion,

10 - après éclosion utilisation des larves pour la mise en œuvre du procédé selon l'une des revendications 1 à 10.

14. Procédé de mesure des effets génotoxiques d'agents selon la revendication 13, caractérisé en ce que les larves sont utilisées pour la mise en œuvre du procédé selon l'une des revendications 1 à 10, entre 0 et 15 jours après
15 éclosion.

15. Procédé de mesure des effets génotoxiques d'agents selon l'une des revendications 12 à 14, caractérisé en ce que l'étape de mesure du taux de micronoyaux formé dans les cellules comprend une étape de comparaison avec les résultats obtenus avec des embryo-larves n'ayant pas été mises en contact avec
20 l'agent dont la génotoxicité doit être évaluée.

16. Utilisation d'un procédé selon l'une des revendications 12 à 15, pour :

 - la détection, l'analyse et/ou l'étude de la génotoxicité de composés pour l'homme, ou

 - l'évaluation de l'efficacité thérapeutique de composés, l'évaluation
25 de l'efficacité de substances chimiothérapeutiques ou de substances anti-cancéreuses, ou

 - la détection, l'analyse et/ou l'étude de contaminants environnementaux et l'étude de la qualité de l'environnement, ou

- le contrôle de la qualité de l'eau ou d'une boue après traitement dans les stations d'épuration ou l'évaluation de l'efficacité d'un procédé de potabilisation de l'eau ou d'épuration de l'eau ou des boues ou le contrôle de dépollution des sols.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/FR2011/052443

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. C12Q1/37 G01N33/50 C02F1/00 G01N1/00
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)

G01N 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 practical, search terms used)

EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data, INSPEC

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	UYSAL I I ET AL: "Investigation of direct toxic and teratogenic effects of anticoagulants on rat embryonic development using in vitro culture method and genotoxicity assay", ANATOMIA HISTOLOGIA EMBRYOLOGIA, vol. 35, no. 2, April 2006 (2006-04), pages 84-92, XP002634325, ISSN: 0340-2096 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 document 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

12 December 2011

Date of mailing of the international search report

29/12/2011

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

Stricker, J

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/FR2011/052443

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	KOSMEHL THOMAS ET AL: "A novel contact assay for testing genotoxicity of chemicals and whole sediments in zebrafish embryos.", ENVIRONMENTAL TOXICOLOGY AND CHEMISTRY / SETAC AUG 2006 LNKD- PUBMED:16916029, vol. 25, no. 8, August 2006 (2006-08), pages 2097-2106, XP002634326, ISSN: 0730-7268 the whole document	1-16
Y	----- WO 02/14859 A1 (DIATECH PTY LTD [AU]; FENECH MICHAEL FELIX [AU]; HEWISH DEAN RAYMOND []) 21 February 2002 (2002-02-21) cited in the application the whole document	1-16
Y,P	----- MORIN BENEDICTE ET AL: "Detection of DNA damage in yolk-sac larvae of the Japanese Medaka,, by the comet assay", ANALYTICAL AND BIOANALYTICAL CHEMISTRY, SPRINGER, BERLIN, DE, vol. 399, no. 6, 9 January 2011 (2011-01-09), pages 2235-2242, XP019879893, ISSN: 1618-2650, DOI: 10.1007/S00216-010-4602-Y the whole document	1-16

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/FR2011/052443

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0214859	A1	21-02-2002	NONE

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°

PCT/FR2011/052443

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE INV. C12Q1/37 G01N33/50 C02F1/00 G01N1/00 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) G01N 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, INSPEC		
C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
Y	UYSAL I I ET AL: "Investigation of direct toxic and teratogenic effects of anticoagulants on rat embryonic development using in vitro culture method and genotoxicity assay", ANATOMIA HISTOLOGIA EMBRYOLOGIA, vol. 35, no. 2, avril 2006 (2006-04), pages 84-92, XP002634325, ISSN: 0340-2096 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 12 décembre 2011		Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale 29/12/2011
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 Stricker, J

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	KOSMEHL THOMAS ET AL: "A novel contact assay for testing genotoxicity of chemicals and whole sediments in zebrafish embryos.", ENVIRONMENTAL TOXICOLOGY AND CHEMISTRY / SETAC AUG 2006 LNKD- PUBMED:16916029, vol. 25, no. 8, août 2006 (2006-08), pages 2097-2106, XP002634326, ISSN: 0730-7268 le document en entier -----	1-16
Y	WO 02/14859 A1 (DIATECH PTY LTD [AU]; FENECH MICHAEL FELIX [AU]; HEWISH DEAN RAYMOND []) 21 février 2002 (2002-02-21) cité dans la demande le document en entier -----	1-16
Y,P	MORIN BENEDICTE ET AL: "Detection of DNA damage in yolk-sac larvae of the Japanese Medaka,, by the comet assay", ANALYTICAL AND BIOANALYTICAL CHEMISTRY, SPRINGER, BERLIN, DE, vol. 399, no. 6, 9 janvier 2011 (2011-01-09), pages 2235-2242, XP019879893, ISSN: 1618-2650, DOI: 10.1007/S00216-010-4602-Y le document en entier -----	1-16

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

PCT/FR2011/052443

Document brevet cité
au rapport de recherche

Date de publication

Membre(s) de la
famille de brevet(s)

Date de publication

W0 0214859	A1	21-02-2002	AUCUN
------------	----	------------	-------