

(12) BREVET D'INVENTION BELGE

(47) Date de publication : 16/11/2017

(21) Numéro de demande : BE2017/5090

(22) Date de dépôt : 13/02/2017

(62) Divisé de la demande de base :

(62) Date de dépôt demande de base :

(51) Classification internationale : G01N 33/53, C07K 7/06

(30) Données de priorité :

(73) Titulaire(s) :

Symbiose Biomaterials
4000, LIEGE
Belgique

(72) Inventeur(s) :

BEBRONE Carine
4802 HEUSY
Belgique

ALEXANDRE Michael
4102 OUGREE
Belgique

VANDEGAART Hélène
4654 CHARNEUX
Belgique

DUYSENS Guérin
4121 NEUVILLE-EN-CONDROZ
Belgique

NICAISE Dominique
1040 ETTERBEEK
Belgique

(54) Composition principalement peptidique pour la détection de l'amiante

(57) La présente invention porte sur une composition principalement peptidique pour détecter l'amiante dans un échantillon comprenant un premier fragment peptidique P1 agencé pour reconnaître et se lier aux fibres d'amiante de la famille des amphiboles et présentant un pourcentage d'identité d'au moins 70% avec une séquence X3X1X2X1X4X2X4, dans laquelle X1 représente un acide aminé polaire, X2 représente un acide aminé apolaire, X3 représente un acide aminé acide et X4 représente un acide aminé basique, un deuxième fragment peptidique P2 agencé pour reconnaître et se lier au moins aux fibres d'amiante de la famille des serpentines conjointement audit premier fragment peptidique P1, et au moins un moyen de détection agencé pour détecter la reconnaissance et la liaison desdits premier et deuxième fragments peptidiques P1 et P2.

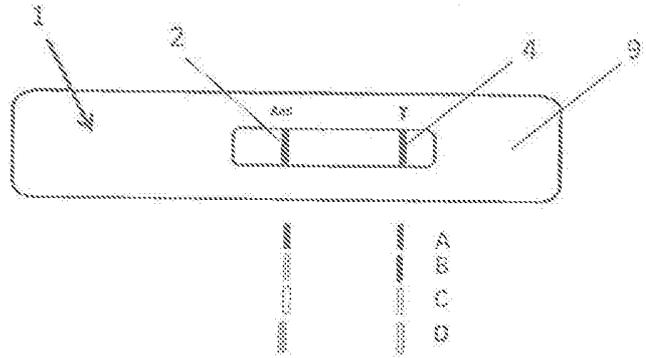


Fig. 9A

BREVET D'INVENTION BELGE

SPF Economie, PME, Classes
Moyennes & Energie

Numéro de publication : 1024123
Numéro de dépôt : BE2017/5090

Office de la Propriété intellectuelle

Classification Internationale : G01N 33/53 C07K 7/06
Date de délivrance : 16/11/2017

Le Ministre de l'Economie,

Vu la Convention de Paris du 20 mars 1883 pour la Protection de la propriété industrielle ;

Vu la loi du 28 mars 1984 sur les brevets d'invention, l'article 22, pour les demandes de brevet introduites avant le 22 septembre 2014 ;

Vu le Titre Ier "Brevets d'invention" du Livre XI du Code de droit économique, l'article XI.24, pour les demandes de brevet introduites à partir du 22 septembre 2014 ;

Vu l'arrêté royal du 2 décembre 1986 relatif à la demande, à la délivrance et au maintien en vigueur des brevets d'invention, l'article 28 ;

Vu la demande de brevet d'invention reçue par l'Office de la Propriété intellectuelle en date du 13/02/2017.

Considérant que pour les demandes de brevet tombant dans le champ d'application du Titre Ier, du Livre XI du Code de Droit économique (ci-après CDE), conformément à l'article XI. 19, §4, alinéa 2, du CDE, si la demande de brevet a fait l'objet d'un rapport de recherche mentionnant un défaut d'unité d'invention au sens du §1er de l'article XI.19 précité et dans le cas où le demandeur n'effectue ni une limitation de sa demande ni un dépôt d'une demande divisionnaire conformément aux résultats du rapport de recherche, le brevet délivré sera limité aux revendications pour lesquelles le rapport de recherche a été établi.

Arrête :

Article premier. - Il est délivré à

Symbiose Biomaterials , Avenue de l'Hôpital 1 (Bât. B34, +3) , 4000 LIEGE Belgique;

représenté par

GEVERS PATENTS, Holidaystraat 5, 1831, DIEGEM;

un brevet d'invention belge d'une durée de 20 ans, sous réserve du paiement des taxes annuelles visées à l'article XI.48, §1 du Code de droit économique, pour : Composition principalement peptidique pour la détection de l'amiante.

INVENTEUR(S) :

BEBRONE Carine, Chemin du Rouheid 196, 4802, HEUSY;

ALEXANDRE Michael, Rue de la Jacinthe 10, 4102, OUGREE;

VANDEGAART Hélène, Renouprez 891, 4654, CHARNEUX;

DUYSENS Guérin, Chaussée de Marche 32, 4121, NEUVILLE-EN-CONDROZ;

NICAISE Dominique, Rue de Gerlache 53, 1040, ETTERBEEK;

PRIORITE(S) :

DIVISION :

divisé de la demande de base :

date de dépôt de la demande de base :

Article 2. – Ce brevet est délivré sans examen préalable de la brevetabilité de l'invention, sans garantie du mérite de l'invention ou de l'exactitude de la description de celle-ci et aux risques et périls du (des) demandeur(s).

Bruxelles, le 16/11/2017,

Par délégation spéciale :

effet, les fibres d'amiante sont fines (certains diamètres sont 2000 fois plus petits que celui d'un cheveu), de longueur variable et se retrouvent facilement dans l'air. Une fois inhalées, elles se déposent dans les poumons et peuvent provoquer une inflammation, des maladies bénignes ou des cancers tels que le

5 mésothéliome et le cancer des poumons. En effet, il est reconnu que les fibres d'amiante engendrent des anomalies des chromosomes conduisant à une transformation cancéreuse des cellules.

Cependant, malgré leur interdiction, de nombreuses constructions contiennent encore des matériaux comprenant de l'amiante, ce qui

10 représente un risque pour les résidents et les professionnels de la construction, plus particulièrement dans le cas de travaux de rénovation d'anciens bâtiments. Dans le cas où la présence d'amiante est suspectée, le site est mis à l'arrêt jusqu'à la réception des résultats des analyses des échantillons prélevés permettant de détecter la présence ou non de fibres d'amiante. Une fois les

15 résultats obtenus, une décision peut être prise sur la manière de procéder afin de réduire le risque d'exposition aux fibres d'amiante.

Il y a donc un réel besoin de développer des moyens de détection fiables et efficaces qui sont capables de fournir des résultats rapidement afin de confirmer la présence ou non de fibres d'amiante.

20 Différents moyens de détection de l'amiante sont connus de l'état de la technique. En effet, il existe actuellement des tests qui sont basés sur la microscopie optique et la microscopie électronique. De tels tests doivent cependant être réalisés en laboratoire, ce qui engendre de longs délais avant d'obtenir un résultat.

25 Par ailleurs, un dispositif de détection (PhazIRTM, Polychromix, USA) utilisant la spectroscopie à infrarouge a récemment été développé pour permettre la détection *in situ* de la présence ou non de fibres d'amiante. Néanmoins, l'utilisation de ce dispositif nécessite un personnel spécifiquement entraîné pour espérer la réalisation d'un test pertinent. De plus, des études

montrent un manque de sensibilité de tels dispositifs sur certains matériaux avec un risque de faux négatifs. Ces réponses erronées ont principalement été constatées pour des taux d'amiante faibles et pour certains matériaux comme les joints et colles à carrelages. Des faux positifs ont également été rapportés dans le cas de matériaux analysés contenant des minéraux silicatés ou des carbonates qui ont un spectre similaire à celui de l'amiante, ce qui traduit un manque de spécificité d'un tel dispositif de détection selon l'état de la technique.

Il y a donc un intérêt grandissant pour le développement de moyens de détection faciles à mettre en œuvre et permettant l'obtention d'un résultat rapide et fiable.

Dans cette optique, le document US2014/0170773 divulgue une méthode de détection de l'amiante comprenant une première étape de mise en contact, avec l'échantillon à tester, d'une protéine liant l'amiante et couplée à une molécule fluorescente. Ensuite, une étape de détection est réalisée à l'aide d'un microscope à fluorescence : détection de la protéine liant l'amiante (marquée d'une molécule fluorescente) qui est effectivement liée à des fibres d'amiante. Ce document antérieur décrit en outre que les protéines liant l'amiante sont, d'une part, la protéine H-NS qui reconnaît les fibres d'amiante de type amosite de la famille des amphiboles et, d'autre part, la protéine Dksa qui reconnaît, quant à elle, les fibres d'amiante de type chrysotile de la famille des serpentines. Afin de pouvoir distinguer ces deux types de fibres d'amiante, des molécules fluorescentes qui émettent à différentes longueurs d'ondes sont utilisées pour marquer les protéines H-NS et Dksa. Malheureusement, il apparaît qu'un tel moyen de détection de l'amiante limite considérablement le type de fibres d'amiante détecté et peut conduire à des conclusions erronées, qui peuvent se révéler être dangereuses pour la santé.

Les inventeurs de la présente demande de brevet ont par ailleurs développé une méthode qui permet de détecter la présence de fibres d'amiante,

cette méthode faisant l'objet d'une demande de brevet n° PCT/EP2016/069126 encore non publiée à ce jour.

L'invention a pour but de pallier les inconvénients de l'état de la technique en procurant une composition principalement peptidique qui permet
5 de détecter directement et rapidement, dans un échantillon, la présence ou non des six types de fibres d'amiante de la famille des amphiboles et de la famille des serpentines de manière plus fiable (plus sensible), ceci permettant de réduire le risque, d'une part, d'être exposé à des fibres d'amiante et, d'autre part, d'obtenir des résultats faussement négatifs, pour finalement minimiser le risque
10 d'effets néfastes sur la santé. En effet, la présente invention, en procurant une composition permettant de détecter immédiatement la présence des six types de fibres d'amiante sur un site (*in situ*), permet de rapidement isoler les personnes de ces fibres dans le cas d'une détection positive, et ce sans devoir attendre de longues périodes pour obtenir les résultats du test de détection de la présence
15 ou non de fibres d'amiante.

Pour résoudre ce problème, il est prévu suivant l'invention une composition principalement peptidique pour la détection de l'amiante telle qu'indiquée au début, caractérisée en ce que ledit premier fragment peptidique P1 présente un pourcentage d'identité d'au moins 70%, préférentiellement d'au
20 moins 85%, avec une séquence $X_3X_1X_2X_1X_4X_2X_4$, où X_1 représente un acide aminé polaire, X_2 représente un acide aminé apolaire, X_3 représente un acide aminé acide et X_4 représente un acide aminé basique. Préférentiellement, X_1 est T ou S ; X_2 est L ou M ; X_3 est E ; X_4 est R.

Au sens de la présente invention, les termes « acide aminé
25 polaire » englobent les acides aminés suivants : S (Ser), T (Thr), Y (Tyr), C (Cys), Q (Gln) ou N (Asn), les termes « acide aminé apolaire » comprennent les acides aminés suivants : W (Trp), G (Gly), A (Ala), P (Pro), F (Phe), L (Leu), I (Ile), M (Met) ou V (Val), les termes « acide aminé acide » de la présente invention reprennent

les acides aminés suivants : D (Asp) ou E (Glu), tandis que les termes « acide aminé basique » englobent les acides aminés suivants : H (His), R (Arg) ou K (Lys).

Dans le cadre de la présente invention, contrairement au document US2014/0170773, il a été mis en évidence que la composition
5 principalement peptidique selon l'invention permet de détecter, dans un échantillon, la présence non seulement de fibres de type amosite et chrysotile mais également des quatre autres types de fibres d'amiante, la détection suivant l'invention étant simple, rapide et efficace mais aussi fiable et sensible.

En effet, la méthode de détection selon le document
10 US2014/0170773 permet de mettre en évidence les fibres d'amiante appartenant à la famille des serpentines (le type chrysotile) mais permet de détecter un type unique de fibres de la famille des amphiboles à savoir l'amosite. Une telle méthode de détection manque donc de sensibilité envers les fibres de la famille des amphiboles et présente par conséquent un réel risque d'obtenir un
15 résultat faussement négatif. En d'autres termes, la méthode selon ce document antérieur conduirait à un résultat négatif alors que des fibres d'amiante de type amphiboles, différentes de l'amosite, sont bien présentes dans l'échantillon. Une telle méthode peut donc être responsable d'une exposition non protégée et engendrer par conséquent des problèmes de santé allant de maladies bénignes
20 jusqu'aux cancers des poumons et de la plèvre.

Dans le cadre de la présente invention, il est en effet apparu, de manière surprenante, que les deux fragments peptidiques P_1 et P_2 de la composition selon l'invention suffisent pour détecter les six types de fibres d'amiante. La composition selon l'invention permet donc d'améliorer la
25 sensibilité de détection des fibres d'amiante dans un échantillon en mettant en évidence les fibres d'amiante de type chrysotile, amosite, actinolite, anthophyllite, trémolite et crocidolite. De cette manière, le risque d'obtenir un résultat faussement négatif est réduit voire éliminé, ceci permettant de

minimiser l'exposition des personnes à tous les types de fibres d'amiante et par conséquent les effets néfastes de celles-ci sur la santé.

Avantageusement, ledit premier fragment peptidique P_1 présente la séquence SEQ ID NO :1, comme mentionnée ci-dessous :

5 SEQ ID NO :1 : ETLSRMR (Glu Thr Leu Ser Arg Met Arg).

De préférence, ledit premier fragment peptidique P_1 et ledit deuxième fragment peptidique P_2 sont fusionnés, dans un ordre quelconque, et forment un peptide hybride.

De préférence, ledit premier fragment peptidique P_1 et/ou ledit
10 deuxième fragment peptidique P_2 et/ou ledit au moins un moyen de détection sont fusionnés, éventuellement sous forme de répétitions, via au moins un domaine de liaison sélectionné parmi les domaines de liaison poly-G ou riches en G, la longueur de ceux-ci pouvant varier, incluant GGG, GGS, GGGS et GGSSG. Selon l'invention, ledit au moins un moyen de détection est ajouté à l'extrémité
15 N-terminale ou C-terminale dudit peptide hybride formé par ledit premier fragment peptidique P_1 et ledit deuxième fragment peptidique P_2 fusionnés.

Avantageusement, ledit premier fragment peptidique P_1 et ledit deuxième fragment peptidique P_2 sont chacun indépendant l'un de l'autre, sous forme d'un mélange. Ledit au moins un moyen de détection est ajouté à
20 l'extrémité N-terminale ou C-terminale dudit premier fragment peptidique P_1 et dudit deuxième fragment peptidique P_2 et peut être identique ou différent. Si les moyens de détection couplés audit premier fragment peptidique P_1 et audit deuxième fragment peptidique P_2 sont différents l'un de l'autre, il est alors possible de distinguer visuellement les fibres d'amiante détectées par ledit
25 premier fragment peptidique P_1 , des fibres d'amiante détectées par ledit fragment peptidique P_2 .

Dans une forme de réalisation particulière, ledit deuxième fragment peptidique P_2 présente un pourcentage d'identité d'au moins 50%, préférentiellement d'au moins 65%, de préférence d'au moins 80%, avec une

séquence choisie dans le groupe constitué de $X_1X_2X_3X_4X_2X_4X_1$ et $X_2X_1X_4X_1X_2X_2X_1X_4X_1X_4$, où X_1 représente un acide aminé polaire, X_2 représente un acide aminé apolaire, X_3 représente un acide aminé acide et X_4 représente un acide aminé basique. Préférentiellement, X_1 est C, Q, N, Y, S ou T ; X_2 est F, P, G, W, A ou L ; X_3 est D ; X_4 est H ou R.

Avantageusement, ledit deuxième fragment peptidique P_2 a pour séquence SEQ ID NO :2 ou SEQ ID NO :3 ou SEQ ID NO :4, telles qu'illustrées ci-dessous :

SEQ ID NO :2 : FYSHSALYRTH (Phe Tyr Ser His Ser Ala Leu Tyr Arg Thr His),

SEQ ID NO :3 : QFDHWRN (Gln Phe Asp His Trp Arg Asn),

SEQ ID NO :4 : GHCSHPT (Gly His Cys Ser His Pro Thr).

Dans une forme de réalisation particulière, ledit premier fragment peptidique P_1 est agencé pour reconnaître et se lier aux fibres d'amiante de types amosite, trémolite, actinolite et crocidolite et ledit deuxième fragment peptidique P_2 est agencé pour reconnaître et se lier aux fibres d'amiante de types chrysotile, anthophyllite, amosite et trémolite, conjointement audit premier fragment peptidique P_1 .

Ainsi, la composition selon l'invention comprenant la SEQ ID NO :1 et la SEQ ID NO :2 ou la SEQ ID NO :3 ou la SEQ ID NO :4 permet de détecter, dans ledit échantillon, la présence ou non des six types d'amiante à savoir les types amosite, trémolite, actinolite, crocidolite, anthophyllite et chrysotile, ceci contrairement à la technique de détection selon le document antérieur US2014/0170773. En effet, comme indiqué plus haut, les protéines utilisées dans ce document antérieur pour détecter la présence ou non de fibres d'amiante sont des protéines qui reconnaissent uniquement les types chrysotile et amosite. Ainsi, avec une méthode de détection selon ce document US2014/0170773, les types crocidolite, trémolite, actinolite et anthophyllite ne sont pas mis en évidence, ce qui engendre un résultat de détection de l'amiante qui peut être

faussement négatif. En d'autres termes, selon ce document antérieur, les fibres d'amiante de types crocidolite, trémolite, actinolite et anthophyllite ne sont pas détectées, ce qui entraîne par conséquent un risque non négligeable d'exposition à ces fibres cancérogènes.

5 Contrairement à ce document US2014/0170773, la composition selon l'invention détecte l'ensemble des fibres d'amiante de la famille des serpentines mais également l'ensemble des fibres d'amiante de la famille des amphiboles. Une telle composition, selon l'invention, améliore donc la sensibilité de détection de l'amiante, permettant ainsi d'obtenir des résultats avec une
10 meilleure fiabilité en réduisant le nombre de résultats faussement négatifs. Le risque d'exposition non protégée à l'amiante est par conséquent plus faible et le risque de lourdes conséquences sur la santé est ainsi moins important.

 De préférence, la composition principalement peptidique selon l'invention comprend en outre un troisième fragment peptidique P_3 agencé pour
15 reconnaître et se lier auxdites fibres d'amiante de ladite famille des amphiboles et/ou auxdites fibres d'amiante de ladite famille des serpentines et présentant un pourcentage d'identité d'au moins 50%, préférentiellement d'au moins 65%, de préférence d'au moins 80%, avec une séquence choisie dans le groupe constitué de $X_1X_2X_3X_4X_2X_4X_1$ et $X_2X_1X_1X_4X_1X_2X_2X_1X_4X_2X_4$, où X_1 représente un acide aminé
20 polaire, X_2 représente un acide aminé apolaire, X_3 représente un acide aminé acide et X_4 représente un acide aminé basique. Préférentiellement, X_1 est C, Q, N, Y, S ou T ; X_2 est F, P, G, W, A ou L ; X_3 est D ; X_4 est H ou R.

 La reconnaissance et la liaison dudit troisième fragment peptidique P_3 auxdites fibres d'amiante de ladite famille des amphiboles et/ou
25 auxdites fibres d'amiante de ladite famille des serpentines est détectées par ledit au moins un moyen de détection.

 Avantagemement, ledit troisième fragment peptidique P_3 a pour séquence SEQ ID NO :2 ou SEQ ID NO :3 ou SEQ ID NO :4.

Dans une forme de réalisation particulièrement avantageuse, ledit troisième fragment peptidique P_3 et ledit deuxième fragment peptidique P_2 sont différents l'un de l'autre.

Selon l'invention, ledit troisième fragment peptidique P_3 est un peptide spécifique des fibres d'amiante de types chrysotile, amosite, anthophyllite et trémolite. Il est donc agencé pour reconnaître et se lier aux fibres d'amiante de types chrysotile, amosite, anthophyllite et trémolite.

Une telle composition comprenant en outre ledit troisième fragment peptidique P_3 présente une spécificité améliorée pour les fibres d'amiante. En effet, il a été mis en évidence que la composition suivant l'invention comprenant ledit troisième fragment peptidique P_3 et ledit deuxième fragment peptidique P_2 qui ont des séquences différentes, réduit le risque de détecter d'autres fibres (par exemple des fibres de verre) que les fibres d'amiante et permet par conséquent de minimiser le risque d'obtenir un résultat faussement positif.

De préférence, ledit troisième fragment peptidique P_3 et ledit deuxième fragment peptidique P_2 sont fusionnés, dans un ordre quelconque, et forment un peptide hybride, ledit premier fragment peptidique P_1 étant indépendant, ledit peptide hybride et ledit premier fragment peptidique P_1 étant sous forme d'un mélange. Lesdits troisième et deuxième fragments peptidiques P_3 et P_2 sont fusionnés éventuellement sous forme de répétitions, via au moins un domaine de liaison choisi parmi les domaines de liaison poly-G ou riches en G, la longueur de ceux-ci pouvant varier, incluant GGG, GGS, GGGS et GGSSG. Ledit au moins un moyen de détection est ajouté à l'extrémité N-terminale ou C-terminale dudit peptide hybride formé par ledit troisième fragment peptidique P_3 et ledit deuxième fragment peptidique P_2 fusionnés et à l'extrémité N-terminale ou C-terminale dudit premier fragment peptidique P_1 .

Avantageusement, ledit troisième fragment peptidique P_3 et ledit premier fragment peptidique P_1 sont fusionnés, dans un ordre quelconque, et

forment un peptide hybride, ledit deuxième fragment peptidique P_2 étant indépendant, ledit peptide hybride et ledit deuxième fragment peptidique P_2 étant sous forme d'un mélange. Lesdits troisième et premier fragments peptidiques P_3 et P_1 sont fusionnés éventuellement sous forme de répétitions, via
5 au moins un domaine de liaison choisi parmi les domaines de liaison poly-G ou riches en G, la longueur de ceux-ci pouvant varier, incluant GGG, GGS, GGGG et GGSSG. Ledit au moins un moyen de détection est ajouté à l'extrémité N-terminale ou C-terminale dudit peptide hybride formé par ledit troisième fragment peptidique P_3 et ledit premier fragment peptidique P_1 fusionnés et à
10 l'extrémité N-terminale ou C-terminale dudit deuxième fragment peptidique P_2 .

De préférence, ledit premier fragment peptidique P_1 et ledit deuxième fragment peptidique P_2 sont fusionnés, dans un ordre quelconque, et forment un peptide hybride, ledit troisième fragment peptidique P_3 étant indépendant, ledit peptide hybride et ledit troisième fragment peptidique P_3
15 étant sous forme d'un mélange. Lesdits premier et deuxième fragments peptidiques P_1 et P_2 sont fusionnés éventuellement sous forme de répétitions, via au moins un domaine de liaison choisi parmi les domaines de liaison poly-G ou riches en G, la longueur de ceux-ci pouvant varier, incluant GGG, GGS, GGGG et GGSSG. Ledit au moins un moyen de détection est ajouté à l'extrémité N-terminale ou C-terminale dudit peptide hybride formé par ledit premier fragment
20 peptidique P_1 et ledit deuxième fragment peptidique P_2 fusionnés et à l'extrémité N-terminale ou C-terminale dudit troisième fragment peptidique P_3 .

Dans une forme de réalisation particulière, ledit deuxième fragment peptidique P_2 , ledit troisième fragment peptidique P_3 et ledit premier
25 fragment peptidique P_1 sont chacun indépendant l'un de l'autre, sous forme d'un mélange. Ledit au moins un moyen de détection est ajouté à l'extrémité N-terminale ou C-terminale dudit premier fragment peptidique P_1 , dudit deuxième fragment peptidique P_2 et dudit troisième fragment peptidique P_3 .

De préférence, ledit troisième fragment peptidique P₃, ledit deuxième fragment peptidique P₂ et ledit premier fragment peptidique P₁ sont fusionnés, dans un ordre quelconque, et forment un peptide hybride. Lesdits troisième, deuxième et premier fragments peptidiques P₃, P₂ et P₁ sont fusionnés éventuellement sous forme de répétitions, via au moins un domaine de liaison choisi parmi les domaines de liaison poly-G ou riches en G, la longueur de ceux-ci pouvant varier, incluant GGG, GGS, GGGG et GGSSG. Ledit au moins un moyen de détection est ajouté à l'extrémité N-terminale ou C-terminale dudit premier fragment peptidique P₁, dudit deuxième fragment peptidique P₂ et dudit troisième fragment peptidique P₃ fusionnés.

De manière avantageuse, ledit premier fragment peptidique P₁ et/ou ledit deuxième fragment peptidique P₂ et/ou ledit troisième fragment peptidique P₃ et/ou ledit au moins un moyen de détection sont fusionnés, éventuellement sous forme de répétitions, via au moins un domaine de liaison sélectionné parmi les domaines de liaison poly-G ou riches en G, la longueur de ceux-ci pouvant varier, incluant GGG, GGS, GGGG et GGSSG.

Avantageusement, ledit troisième fragment peptidique P₃, ledit deuxième fragment peptidique P₂ et ledit premier fragment peptidique P₁ sont fusionnés et forment un peptide hybride ayant pour séquence X₃X₁X₂X₁X₄X₂X₄GGGX₂X₁X₁X₄X₁X₂X₂GGGX₁X₄X₁X₄X₁X₂ X₃X₄X₂X₄X₁, où X₁ représente un acide aminé polaire, X₂ représente un acide aminé apolaire, X₃ représente un acide aminé acide et X₄ représente un acide aminé basique. Préférentiellement, X₁ est Q, N, T, S, C ou Y ; X₂ est F, W, L, M, A, P ou G ; X₃ est D ou E ; X₄ est H ou R.

Avantageusement, ledit peptide hybride a pour séquence SEQ ID NO :5 formée de SEQ ID NO :3 – GGG – SEQ ID NO :1 – GGG – SEQ ID NO : 2 ou SEQ ID NO :6 formée de SEQ ID NO :3 – GGG – SEQ ID NO :1 – GGG – SEQ ID NO : 4.

De préférence, ledit premier fragment peptidique P₁, ledit deuxième fragment peptidique P₂ et ledit troisième fragment peptidique P₃,

seuls, en mélange ou fusionnés, sont des GEPIs. Les GEPIs (Genetically engineered peptide or polypeptide for inorganics) sont de petits peptides qui ont une grande affinité pour les matériaux inorganiques. Ils sont définis comme présentant une séquence d'acides aminés qui lient spécifiquement et
5 sélectivement une surface inorganique. Les mécanismes moléculaires relatifs à cette reconnaissance peptidique et cette liaison à des matériaux solides sont peu connus à ce jour, mais plusieurs études semblent démontrer que cette liaison est largement gouvernée par la combinaison d'interactions électrostatiques et de liaisons hydrogènes et hydrophobes.

10 Dans une forme de réalisation particulièrement avantageuse, ledit au moins un moyen de détection est choisi parmi la luciférase, la phosphatase alcaline, les protéines fluorescentes, la bêta-galactosidase, la bêta-lactamase, la diphorase, la peroxydase, la protéine de liaison du maltose, la laccase, la lipase, la glycosyl hydrolase, la sérum albumine bovine, l'or colloïdal, les billes colorées, de
15 préférence les billes de latex colorées, ou la biotine et leurs mélanges. Grâce aux techniques colorimétriques, la détection de la présence ou non de fibres d'amiante dans un échantillon à l'aide de la composition peptidique selon l'invention peut être mise en œuvre directement sur site et permet par conséquent d'obtenir les résultats de la présence ou non de fibres d'amiante plus
20 rapidement, ceci permettant de réduire le temps d'exposition et donc le risque d'effets néfastes sur la santé.

Dans le cas de la mise en évidence dudit au moins un moyen de détection à l'aide d'une technique de fluorescence, un dispositif d'analyse peut en outre être utilisé pour étudier les images obtenues à l'aide d'un microscope à
25 fluorescence.

De préférence, la composition principalement peptidique selon l'invention est sous forme d'une solution, dans un solvant tel qu'une solution aqueuse, un solvant organique polaire, et de manière préférentielle dans de l'eau.

De manière avantageuse, ledit échantillon est un échantillon de matériau de construction, des fibres d'amiante pures, un échantillon d'air et/ou un échantillon de matériel biologique. Par exemple, ledit échantillon peut être un échantillon de plaquettes de frein de voitures, couvertures anti-feu, de matériaux
5 de construction, d'appuis de fenêtre, de tuiles, de panneaux de plafonds, de plâtre ou encore d'un matériau isolant. Ledit échantillon peut également être des fibres d'amiante pures. Dans une autre alternative, ledit échantillon peut être de l'air qui a été prélevé de l'endroit où de l'air contaminé par des fibres d'amiante est suspecté, par exemple, des endroits proches de sites en construction ou en
10 rénovation. Selon un autre aspect, ledit échantillon est du matériel biologique, tel qu'une biopsie ou un prélèvement corporel post-mortem. Dans le cas de la présente invention, ledit échantillon est de préférence sous la forme d'une suspension dans un milieu liquide, par exemple un tampon bloquant.

D'autres formes de réalisation d'une composition suivant
15 l'invention sont indiquées dans les revendications annexées.

La présente invention se rapporte également à un procédé de détection de l'amiante dans un échantillon comprenant :

- une préparation de l'échantillon par mise en suspension d'un échantillon à tester pour la présence d'amiante,
- 20 - une mise en contact dudit échantillon avec au moins une composition principalement peptidique selon l'invention, pendant un intervalle de temps suffisant pour permettre la liaison des peptides de la composition principalement peptidique selon l'invention à l'échantillon,
- une révélation de la présence de fragments
25 peptidiques de la composition selon l'invention, liés aux fibres d'amiante de la famille des serpentines et/ou de la famille des amphiboles.

Ce procédé selon l'invention est avantageux puisqu'il permet d'améliorer la sensibilité de détection des fibres d'amiante dans un échantillon en mettant en évidence les fibres d'amiante de type chrysotile, amosite,

actinolite, anthophyllite, trémolite et crocidolite. De cette manière, le risque d'obtenir un résultat faussement négatif est réduit voire éliminé, ceci permettant de minimiser l'exposition des personnes à tous les types de fibres d'amiante et par conséquent les effets néfastes de celles-ci sur la santé.

5 De préférence, le procédé selon l'invention comprend en outre au moins une étape de séparation desdits fragments peptidiques liés des fragments peptidiques non liés aux fibres d'amiante, telle qu'une étape d'élimination desdits fragments peptidiques non liés, par exemple par percolation au travers d'une paroi filtrante ou par exemple, par une étape de séparation par lavage.

10 L'étape de séparation selon l'invention peut être réalisée à l'aide d'un moyen de séparation, tel qu'un filtre ou un fritté, permettant de retenir les fibres d'amiante mais de laisser passer au travers de celui-ci la composition selon l'invention qui n'aurait pas été liée aux fibres de l'échantillon à tester, une fois le soutirage de celle-ci effectué. Ce soutirage peut être réalisé par
15 aspiration, par ajout d'une solution de lavage ou par tout autre moyen équivalent, comme par exemple en pratiquant une ouverture permettant au fluide de s'écouler sous l'effet de la gravité ou par capillarité.

D'autres formes de réalisation du procédé de détection de l'amiante suivant l'invention sont indiquées dans les revendications annexées.

20 La présente invention se rapporte également à une trousse de détection de l'amiante comprenant

- au moins un support muni d'au moins une première zone de réception d'un échantillon à tester, et
- au moins une composition peptidique selon la
25 présente invention, dans laquelle au moins lesdits fragments peptidiques P_1 , P_2 et éventuellement des fragments peptidiques additionnels tels que P_3 sont conditionnés ensemble ou chacun séparément, de préférence dans une seringue ou dans une cartouche comprenant plusieurs compartiments.

Il est en effet prévu selon la présente invention de procurer une trousse de détection de l'amiante comprenant une première zone de réception dans laquelle un échantillon à tester quant à la présence d'amiante est placé.

La trousse comprend donc une composition principalement
5 peptidique selon la présente invention, comprenant :

- un premier fragment peptidique P_1 spécifique des fibres d'amiante, agencé pour reconnaître et se lier aux fibres d'amiante de la famille des amphiboles et présentant un pourcentage d'identité d'au moins 70%,
10 préférentiellement d'au moins 85%, avec une séquence $X_3X_1X_2X_1X_4X_2X_4$, où X_1 représente un acide aminé polaire, X_2 représente un acide aminé apolaire, X_3 représente un acide aminé acide et X_4 représente un acide aminé basique,

- un deuxième fragment peptidique P_2 spécifique des fibres d'amiante, agencé pour reconnaître et se lier au moins aux fibres d'amiante de la famille des serpentines conjointement audit premier fragment
15 peptidique P_1 , et

- au moins un moyen de détection agencé pour détecter la reconnaissance et la liaison dudit premier fragment peptidique P_1 auxdites fibres d'amiante et la reconnaissance et la liaison dudit deuxième
20 fragment peptidique P_2 auxdites fibres d'amiante.

La composition selon l'invention est de préférence conditionnée dans une seringue ou dans une cartouche comprenant plusieurs compartiments. De cette manière, lorsque l'échantillon est placé dans la zone de réception, la composition principalement peptidique de détection de l'amiante est ajoutée sur l'échantillon pour lequel on veut détecter s'il contient de l'amiante pendant un
25 intervalle de temps suffisant pour permettre la liaison des peptides de la composition selon l'invention à l'échantillon. Une fois l'intervalle de temps écoulé, l'excès de composition principalement peptidique selon la présente invention est éliminé et l'analyse est effectuée.

Avantageusement, la trousse de détection selon la présente invention comprend au moins un moyen de révélation, de préférence conditionné dans une seringue ou dans une cartouche comprenant plusieurs compartiments, agencé pour visualiser ledit au moins un moyen de détection de
5 la composition peptidique, ledit au moins un moyen de révélation étant un moyen de révélation en visible, tel que par exemple un moyen de révélation par colorimétrie, par exemple la nitrocéfine ou tout autre composé permettant une révélation par colorimétrie.

Dans une forme de réalisation préférée de la présente invention,
10 ledit au moins un moyen de détection est choisi dans le groupe constitué de la luciférase, la bêta-galactosidase, la bêta-lactamase, la laccase, la lipase, la glycosyl hydrolase, la phosphatase alcaline, la diphorase, la peroxydase et de leurs mélanges et est plus particulièrement la bêta-lactamase. Dans ces cas de figure, ledit au moins un moyen de détection est une protéine ayant une activité
15 enzymatique. Lorsque le moyen de détection est présent, et donc qu'il a été lié à l'échantillon à tester, l'activité enzymatique est révélée de manière visible, comme par exemple, lorsque le moyen de détection est une bêta-lactamase dont l'activité enzymatique sur un substrat chromogène, tel que la nitrocéfine, UW154, UW57, UW58 (Ghavami *et al.*, Assay for drug discovery : synthesis and
20 testing of nitrocefin analogues for use as beta-lactamase substrates, Anal. Biochem. octobre 2015, vol 486, pages 7-75), Chromacef©, Cefesone (S1), HMRZ-86 (Hanaki *et al.*, Characterization of HMRZ-86 : a novel chromogenic cephalosporin for the detection of extended-spectrum beta-lactamases, J Antimicrob Chemother. may 2004, vol 53(5), pages 9-888), CLS405 (Makena *et al.*, Chromophore-linked substrate (CLS405) : probing metallo-beta-lactamase
25 activity and inhibition, ChemMedChem. december 2013, vol 8(12), pages 9-1923), CENTA© ou PADAC (Jorgensen *et al.*, Pyridinium-2-azo-p-dimethylaniline chromophore, a new chromogenic cephalosporin for rapid beta-lactamase

testing, Antimicrobial Agents and Chemotherapy 1982, vol 22(1), pages 4-162) (moyens de révélation) permet une révélation visible par changement de couleur.

Dans une autre forme de réalisation préférée de la présente invention, la trousse de détection selon la présente invention comprend en outre
5 au moins un moyen de révélation, de préférence conditionné dans une seringue ou dans une cartouche comprenant plusieurs compartiments, agencé pour visualiser ledit au moins un moyen de détection de la composition peptidique, ledit au moins un moyen de révélation étant un moyen de révélation en
10 fluorescence. Par exemple, ledit au moins un moyen de détection est la bêta-lactamase, la peroxydase ou la phosphatase alcaline et ledit au moins un moyen de révélation est la Fluorocillin Green 495-525, l'Ampliflu™ Red ou le 4-methylumbelliferyl phosphate disodium, respectivement.

Selon encore une autre forme de réalisation préférée de la présente invention, ledit au moins un moyen de détection est une molécule
15 fluorescente, révélée par excitation au moyen d'une onde.

Avantageusement, la trousse de détection de l'amiante selon la présente invention comprend en outre une solution de lavage, de préférence conditionnée dans une seringue ou dans une cartouche comprenant plusieurs
20 compartiments.

De préférence, dans la trousse de détection de l'amiante selon la présente invention, ledit support comprend en outre une deuxième zone de
25 réception agencée pour recevoir un contrôle négatif ou un contrôle positif.

Plus particulièrement, dans la trousse de détection selon la présente invention, ledit support comprend en outre une deuxième et une
25 troisième zone de réception agencées respectivement pour recevoir un contrôle négatif et un contrôle positif ou inversement.

Dans une variante de la trousse de détection de l'amiante selon la présente invention, ladite trousse comprend en outre au moins un moyen de
révélation et ledit support comprenant ladite première zone de réception d'un

échantillon en suspension à tester est une tigette sur laquelle la première zone de réception dudit échantillon à tester est positionnée à une extrémité de celle-ci, ladite tigette comprenant également au moins deux bandes d'arrêt dans la direction opposée à ladite première zone de réception dans lesquelles sont

5 immobilisées des protéines de liaison primaires ou secondaires dudit au moins un moyen de détection ou dudit moyen de révélation, par exemple des anticorps, de la streptavidine, ou analogues. De telles tigettes sans molécules immobilisées sont commercialement disponibles. Ensuite, des protéines de liaison primaires ou secondaires dudit au moins un moyen de détection ou dudit au moins un moyen

10 de révélation sont immobilisées dans les bandes d'arrêt.

L'échantillon est préparé par mise en suspension d'un échantillon à tester pour la présence d'amiante. L'échantillon est ensuite mis en contact avec la composition principalement peptidique selon la présente invention pendant un intervalle de temps suffisant pour permettre la liaison des peptides de la

15 composition selon l'invention à l'échantillon. La quantité de composition suivant l'invention est mise en relativement faible quantité par rapport à la quantité d'échantillon à tester afin d'assurer que s'il y a des fibres d'amiante dans l'échantillon, l'intégralité du ou des peptides soient liés aux fibres d'amiante.

Une fois l'intervalle de temps écoulé, l'échantillon en suspension ainsi préparé est mis en contact avec la zone de réception, par exemple par

20 trempage de ladite tigette dans l'échantillon en suspension. S'il y a des fibres d'amiante dans l'échantillon en suspension, les peptides qui y sont liés ne migrent pas le long de la tigette et leur présence n'est donc pas détectée sur la tigette. La bande la plus éloignée de la zone de réception de l'échantillon à tester

25 comprend quant à elle un témoin (contrôle de migration) permettant de visualiser que le test a fonctionné correctement. Si les bandes, localisées entre la bande témoin et la zone de réception de l'échantillon à tester et la bande témoin sont colorées, cela signifie que le test a fonctionné et que les peptides de la composition selon l'invention ont migré vers les bandes. Ils ne sont donc pas liés

aux fibres d'amiante. On peut donc conclure à l'absence de fibres d'amiante. Si la bande la plus éloignée ne se colore pas, dans ce cas, le test n'a pas fonctionné et il y a lieu de le reproduire.

Dans une forme de réalisation préférée de la trousse de détection d'amiante, ledit au moins un moyen de détection comprend au moins une molécule fluorescente, par exemple l'isothiocyanate de fluorescéine, ou au moins une protéine porteuse telle que la sérum albumine bovine, la protéine de liaison au maltose, la biotine, une enzyme telle que la bêta-galactosidase, la bêta-lactamase, la laccase, la lipase, la glycosyl hydrolase, la phosphatase alcaline, la diphorase, la peroxydase et est plus particulièrement la bêta-lactamase, ladite au moins une molécule fluorescente ou ladite au moins une protéine porteuse étant couplée audit au moins un moyen de révélation tel que de l'or colloïdal ou à des billes colorées, de préférence des billes de latex colorées et dans laquelle les protéines de liaison immobilisées dans les bandes d'arrêt sont des protéines de liaison primaires choisies parmi les anticorps dirigés contre ladite au moins une protéine porteuse, ou les anticorps dirigés contre ladite au moins une molécule fluorescente, ou l'avidine (ou analogues), ou la streptavidine.

Dans une variante également préférée de la trousse de détection d'amiante selon l'invention, ledit au moins un moyen de détection comprend au moins une protéine porteuse ou au moins une molécule fluorescente, telle qu'un isothiocyanate de fluorescéine, reconnue par au moins un moyen de révélation tel qu'un anticorps dirigé contre ladite au moins une molécule fluorescence, par exemple un anticorps dirigé contre l'isothiocyanate de fluorescéine, ou un anticorps dirigé contre ladite au moins une protéine porteuse, lesdits anticorps étant couplés à de l'or colloïdal, des billes colorées, telles que des billes de latex colorées et dans laquelle les protéines de liaison immobilisées dans les bandes d'arrêt sont des protéines de liaison secondaires choisies parmi les anticorps secondaires dirigés contre lesdits anticorps dirigés contre ladite au moins une molécule fluorescente et ladite au moins une protéine porteuse.

La trousse de détection selon l'invention est particulièrement facile à employer, même par du personnel peu qualifié, et permet de fournir des résultats dans un court délai. Il a été établi que les résultats peuvent être obtenus en approximativement 1 h, de préférence en moins de 30 min, 5
préférentiellement en moins de 15 min, plus préférentiellement en environ 10 min.

De préférence, dans la trousse selon l'invention, ledit premier fragment peptidique P_1 est fusionné à un premier moyen de détection et ledit 10
deuxième fragment peptidique P_2 ou ledit troisième fragment peptidique P_3 est fusionné à un deuxième moyen de détection, différent dudit premier moyen de détection, lesdits premier, deuxième ou troisième fragments peptidiques P_1 , P_2 ou P_3 étant sous forme d'un mélange.

D'autres formes de réalisation d'une trousse suivant l'invention sont indiquées dans les revendications annexées.

15 L'invention porte également sur une utilisation d'une composition principalement peptidique selon l'invention pour la détection de l'amiante dans un échantillon.

L'invention a aussi pour objet une utilisation d'un procédé selon l'invention pour la détection de l'amiante dans un échantillon.

20 Enfin, l'invention a aussi pour objet une utilisation d'une trousse selon l'invention pour la détection de l'amiante dans un échantillon.

D'autres formes d'utilisation d'une composition, d'un procédé ou d'une trousse suivant l'invention sont indiquées dans les revendications annexées.

25 D'autres caractéristiques, détails et avantages de l'invention ressortiront de la description, des exemples et des figures donnés ci-après, à titre non limitatif.

La figure 1 représente les résultats d'un exemple comparatif de détection de l'amiante par le peptide SEQ ID NO :1 fusionné au moyen de détection, à savoir TEM-1.

5 La figure 2 représente les résultats d'un exemple comparatif de détection de l'amiante par le peptide SEQ ID NO :4 fusionné au moyen de détection, à savoir TEM-1.

La figure 3 représente les résultats d'un exemple selon l'invention de détection de l'amiante par le peptide SEQ ID NO :1 fusionné au moyen de détection, à savoir TEM-1 et le peptide SEQ ID NO :4 fusionné au
10 moyen de détection, à savoir TEM-1, sous forme d'un mélange.

La figure 4 représente les résultats d'un exemple selon l'invention de détection de l'amiante par un peptide hybride contenant les SEQ ID NO :1, SEQ ID NO :2 et SEQ ID NO :3 fusionné au moyen de détection, à savoir TEM-1.

15 La figure 5 représente les résultats d'un exemple selon l'invention de détection de l'amiante par un peptide hybride contenant les SEQ ID NO :1, SEQ ID NO :2 et SEQ ID NO :3 fusionné au moyen de détection, à savoir l'isothiocyanate de fluorescéine.

20 La figure 6 représente les résultats d'un exemple selon l'invention de détection de l'amiante par un peptide hybride contenant les SEQ ID NO :1 et SEQ ID NO :3 fusionné au moyen de détection, à savoir l'isothiocyanate de fluorescéine.

25 La figure 7 représente les résultats d'un exemple selon l'invention de détection de l'amiante par un peptide hybride contenant les SEQ ID NO :1 et SEQ ID NO :2 fusionné au moyen de détection, à savoir l'isothiocyanate de fluorescéine.

La figure 8 représente une trousse de détection de l'amiante selon l'invention. La Figure 8A reprend un premier mode de réalisation et la

figure 8B un second mode de réalisation d'une trousse de détection de l'amiante selon l'invention.

La figure 9 représente une variante de la trousse de détection de l'amiante selon l'invention. La figure 9A reprend un premier mode de réalisation et la figure 9B un second mode de réalisation d'une variante de la trousse de détection de l'amiante selon l'invention.

Exemples

Sélection des peptides par la méthode de « Phage Display »

L'approche utilisée pour isoler les peptides reconnaissant l'amiante est la méthode « Phage display ». Différentes librairies exprimant des peptides aléatoires ont été sélectionnées : Ph.D.TM-7 phage display peptide library (NEB), Ph.D.TM-12 phage display peptide library (NEB), Ph.D.TM-C7C phage display peptide library (NEB).

Séquencage des acides aminés

Le séquencage des phages (bactériophages M13) (après trois étapes de sélection) a été réalisé avec le primer CCC TCA TAG TTA GCG TAA CG. Les séquences ont été examinées avec le Logiciel Chromas Lite (Technelysium Pty Ltd) et le programme Expasy tools Translate disponible en ligne. L'alignement des séquences a été réalisé via le programme ClustalW disponible en ligne.

Suite à la réalisation de ce protocole et à partir de ces librairies, les peptides suivant ont été générés :

- ETLSRMR (SEQ ID NO :1),
- FYSHALYRHT (SEQ ID NO :2),
- QFDHWRN (SEQ ID NO :3),
- GHCSHPT (SEQ ID NO :4).

Exemple comparatif 1.- Détection de l'amiante par le peptide

SEQ ID NO :1 fusionné à la TEM-1 :

Le peptide SEQ ID NO :1 a été cloné en 6 répétitions en amont d'un gène codant pour la TEM-1 β -lactamase (P62593-BLAT_ECOLX). Une séquence codant pour le domaine de liaison GGG a été introduite entre la séquence d'intérêt SEQ ID NO :1 et la TEM-1. Les sites de restriction *NcoI* et *BamHI* ont été utilisés pour cloner le peptide fusionné à la TEM-1 dans le vecteur pET28a (pour obtenir le vecteur pET28a/peptide-TEM-1).

La bactérie *E. coli* exprimant le vecteur pET28a/peptide-TEM-1 a été cultivée à 37°C durant la nuit (durée : 16 h) sous agitation dans 50 ml de milieu LB enrichi avec 50 μ g/ml de kanamycine. La suspension bactérienne a été diluée 100 fois dans un volume total de 1 L de milieu LB frais enrichi avec de la kanamycine (50 μ g/ml) et l'expression du peptide-TEM-1 a été induite avec de l'isopropyl- β -thiogalactopyranoside (concentration finale de 1mM) dès que la culture avait atteint une absorbance à 600 nm de 0,6. La culture induite a alors été incubée à 18°C pendant 16 h sous agitation. Le peptide-TEM-1 a été purifié par chromatographie d'affinité au zinc (HiTrap Chelating HP 2 x 5 ml (GE Healthcare, Machelen, Belgique)).

50 μ l de la solution contenant le peptide (4 mg/ml) ont été ajoutés à 1 mg de fibres d'amiante pures. La solution résultante a été incubée pendant 10 min à température ambiante et sous légère agitation.

Les fibres ont alors été précipitées par centrifugation (10000 g, 3 min) et le surnageant a été éliminé. Les fibres ont alors été suspendues dans 1 ml de tampon phosphate 10 mM à pH 8.0 et ont été collectées par une autre centrifugation (10000 g, 3 min).

Les fibres collectées ont enfin été suspendues dans 100 μ l d'agent révélateur (UW154, 200 mM) et incubées à température ambiante pendant 5 min.

Une coloration rouge foncé est induite dans les conditions où des fibres d'amiante sont détectées, alors que la coloration reste jaune clair en cas de détection négative.

Différents échantillons d'amiante ont été testés selon le protocole de détection mentionné précédemment et selon le tableau 1. Les résultats issus de cette analyse sont représentés à la figure 1.

Tableau 1.-

N° de l'échantillon	Nature des fibres testées	Quantité de fibres (mg)	Volume de solution contenant le peptide à 4mg/ml
A	Actinolite	1	50 µl (SEQ ID NO :1 – TEM-1)
B	Amosite	1	50 µl (SEQ ID NO :1 – TEM-1)
C	Anthophyllite	1	50 µl (SEQ ID NO :1 – TEM-1)
D	Chrysotile	1	50 µl (SEQ ID NO :1 – TEM-1)
E	Crocidolite	1	50 µl (SEQ ID NO :1 – TEM-1)
F	Trémolite	1	50 µl (SEQ ID NO :1 – TEM-1)
G	Fibres de verre	1	50 µl (SEQ ID NO :1 – TEM-1)
H	UW154 seul	1	/

5

Comme on peut le voir à la figure 1, le peptide SEQ ID NO :1 reconnaît et se lie aux fibres d'amiante de type crocidolite. Le peptide SEQ ID NO :1 reconnaît également, mais de façon moins sensible, le type actinolite, amosite, anthophyllite, trémolite et chrysotile. Les contrôles négatifs ont été validés sur la fibre de verre (G) mais aussi sur la viscose, le polyester, les fibres Cerawool®, SAFIL™, Nicalon™, le carbure de silicium, Kevlar® en encore sur l'acrylique (données non présentées). Un contrôle (H) a aussi été réalisé en incubant la solution de révélation (UW154) avec les fibres d'amiante sans ajouter le peptide SEQ ID NO :1 fusionné à la TEM-1.

15

Exemple comparatif 2.- Détection de l'amiante par le peptide SEQ ID NO :4 fusionné à la TEM-1 :

Le protocole de production du peptide SEQ ID NO :4 fusionné à la TEM-1 est identique à celui décrit dans l'exemple comparatif 1, à la différence que le peptide SEQ ID NO :4 a été cloné en cinq répétitions.

Le protocole de détection des fibres d'amiante est identique à celui décrit dans l'exemple comparatif 1.

Différents échantillons d'amiante ont été testés selon le protocole de détection mentionné précédemment et selon le tableau 2. Les résultats issus de cette

5 analyse sont représentés à la figure 2.

Tableau 2.-

N° de l'échantillon	Nature des fibres testées	Quantité de fibres (mg)	Volume de solution contenant le peptide à 4mg/ml
1	Nitrocéfine seule	1	/
2	Actinolite	1	50 µl (SEQ ID NO :4 – TEM-1)
3	Amosite	1	50 µl (SEQ ID NO :4 – TEM-1)
4	Anthophyllite	1	50 µl (SEQ ID NO :4 – TEM-1)
5	Chrysotile Zimbabwe	1	50 µl (SEQ ID NO :4 – TEM-1)
6	Chrysotile Canada	1	50 µl (SEQ ID NO :4 – TEM-1)
7	Crocidolite	1	50 µl (SEQ ID NO :4 – TEM-1)
8	Trémolite	1	50 µl (SEQ ID NO :4 – TEM-1)
9	Fibre de verre	1	50 µl (SEQ ID NO :4 – TEM-1)

Le peptide SEQ ID NO :4 reconnaît et se lie aux fibres d'amiante de type anthophyllite, chrysotile (Zimbabwe et Canada) et crocidolite. Le peptide SEQ ID NO :4 reconnaît également, mais de façon moins sensible, le type actinolite. Ce peptide ne se lie cependant pas au type amosite et trémolite. Les contrôles négatifs ont été validés sur la fibre de verre (9) mais aussi sur la viscose, le polyester, les fibres Cerawool®, SAFIL™, Nicalon™, le carbure de silicium, Kevlar®, en encore sur l'acrylique (données non représentées). Un contrôle (1) a aussi été réalisé en incubant la solution de révélation (nitrocéfine) avec les fibres d'amiante sans ajouter le peptide SEQ ID NO :1 fusionné à la TEM-1.

10

15

Exemple 1.- Détection de l'amiante par le peptide SEQ ID NO :1 fusionné à la TEM-1 et le peptide SEQ ID NO :4 fusionné à la TEM-1, sous forme d'un mélange :

Le protocole de production du peptide SEQ ID NO :4 fusionné à la TEM-1 et du peptide SEQ ID NO :1 fusionné à la TEM-1 est identique à celui décrit dans les exemples comparatif 1 et 2.

Le protocole de détection des fibres d'amiante est identique à celui décrit dans l'exemple comparatif 1.

Différents échantillons d'amiante ont été testés selon le protocole de détection mentionné précédemment et selon le tableau 3. Les résultats issus de cette analyse sont représentés à la figure 3.

Tableau 3.-

N° de l'échantillon	Nature des fibres testées	Quantité de fibres (mg)	Volume de solution contenant les peptides à 4mg/ml
A	Crocidolite	1	50 µl (SEQ ID NO :1 et 4 – TEM-1)
B	Trémolite	1	50 µl (SEQ ID NO :1 et 4 – TEM-1)
C	Anthophyllite	1	50 µl (SEQ ID NO :1 et 4 – TEM-1)
D	Chrysotile	1	50 µl (SEQ ID NO :1 et 4 – TEM-1)
E	Actinolite	1	50 µl (SEQ ID NO :1 et 4 – TEM-1)
F	Amosite	1	50 µl (SEQ ID NO :1 et 4 – TEM-1)
G	UW154 seul	1	/

Le mélange comprenant le peptide SEQ ID NO :4 et le peptide SEQ ID NO :1 reconnaît et se lie aux fibres d'amiante de la famille des serpentines et de la famille des amphiboles. En effet, suite à cette analyse, il a été mis en évidence que le mélange de ces deux peptides lie les fibres d'amiante de type crocidolite, trémolite, anthophyllite, actinolite, amosite et chrysotile. Un contrôle (G) a été réalisé en incubant la solution de révélation

(UW154) avec les fibres d'amiante sans ajouter le mélange comprenant les peptide SEQ ID NO :1 et SEQ ID NO :4 fusionnés à la TEM-1.

Exemple 2.- Détection de l'amiante par un peptide hybride contenant les SEQ ID NO :1, SEQ ID NO :2 et SEQ ID NO :3 fusionné à la TEM-

5 1:

Le protocole de production du peptide hybride contenant les SEQ ID NO :1, SEQ ID NO :2 et SEQ ID NO :3 fusionné à la TEM-1 est identique à celui décrit dans l'exemple comparatif 1, à la différence qu'une séquence codant pour le domaine de liaison GGG a en outre été introduite entre les
10 séquences d'intérêts SEQ ID NO :1, SEQ ID NO :2 et SEQ ID NO :3 et que le peptide SEQ ID NO :1 a été cloné en une répétition.

Le protocole de détection des fibres d'amiante est identique à celui décrit dans l'exemple comparatif 1.

Différents échantillons d'amiante ont été testés selon le protocole de détection
15 mentionné précédemment et selon le tableau 4. Les résultats issus de cette analyse sont représentés à la figure 4.

Tableau 4.-

N° de l'échantillon	Nature des fibres testées	Quantité de fibres (mg)	Volume de solution contenant les peptides à 4mg/ml
A	UW154 seul	1	/
B	Actinolite	1	50 µl (SEQ ID NO :1, 2 et 3 – TEM-1)
C	Amosite	1	50 µl (SEQ ID NO :1, 2 et 3 – TEM-1)
D	Anthophyllite	1	50 µl (SEQ ID NO :1, 2 et 3 – TEM-1)
E	UW154 seul	1	/
F	Chrysotile	1	50 µl (SEQ ID NO :1, 2 et 3 – TEM-1)
G	Crocidolite	1	50 µl (SEQ ID NO :1, 2 et 3 – TEM-1)
H	Trémolite	1	50 µl (SEQ ID NO :1, 2 et 3 – TEM-1)

Le peptide hybride contenant les SEQ ID NO :1, SEQ ID NO :2 et SEQ ID NO :3 fusionné à la TEM-1 reconnaît et se lie aux fibres d'amiante de la famille des serpentines et de la famille des amphiboles. En effet, suite à cette analyse, il a été mis en évidence que ce peptide hybride lie les fibres d'amiante de type crocidolite, trémolite, anthophyllite, actinolite, amosite et chrysotile. Un contrôle (A) a été réalisé en incubant la solution de révélation (nitrocéfine) avec les fibres d'amiante sans ajouter le mélange comprenant les peptide SEQ ID NO :1 et SEQ ID NO :4 fusionnés à la TEM-1.

Exemple 3.- Détection de l'amiante par un peptide hybride contenant les SEQ ID NO :1, SEQ ID NO :2 et SEQ ID NO :3 fusionné à l'isothiocyanate de fluorescéine :

Le peptide hybride reconnaissant l'amiante contenant les SEQ ID NO :1, SEQ ID NO :2 et SEQ ID NO :3 fusionné à la fluorescéine a été synthétisé par Biomatik (Cambridge, Ontario, Canada) en ajoutant de la fluorescéine à la partie N-terminale et une amidation à la partie C-terminale du peptide.

Le peptide hybride fluorescent synthétisé a alors été solubilisé dans l'eau à une concentration de 10 mg/ml et la solution a été stockée à -20°C.

Un tampon a été utilisé pour la détection des fibres d'amiante en fluorescence. Ce tampon est un tampon phosphate 50 mM pH 7.0, NaCl 150 mM, Tween-20 2%. 500 µl d'une solution de suspension (40 µg/ml, fibres d'amiante dans un tampon) ont été centrifugés (13000 rpm, 10 min, 4°C). Après avoir éliminé le surnageant, 1 ml d'une solution tampon a été ajouté au culot et l'ensemble a ensuite été mélangé vigoureusement durant 20 secondes. Le surnageant a été éliminé après la centrifugation (13000 rpm, 10 min, 4°C) et 1 ml d'une solution tampon contenant le peptide fluorescent reconnaissant l'amiante (50 µg/ml) a ensuite été ajouté. Après 10 min d'incubation à température ambiante et à l'abri de la lumière, la solution a alors été centrifugée (13000 rpm, 10 min, 4 °C) et le surnageant a été éliminé. Le culot a

ensuite subi deux étapes de lavage avant que 30 µl de tampon de montage n'y soit ajouté pour enfin être étalé sur une lame en verre. L'analyse des fibres a été réalisée par microscopie à fluorescence (Olympus BX60). La fluorescéine a été détectée en utilisant une longueur d'onde d'excitation de 488 nm et une

5 longueur d'onde d'émission de 535 nm.

Différents échantillons d'amiante ont été testés selon le protocole de détection mentionné précédemment et selon le tableau 5. Les résultats issus de cette analyse sont représentés à la figure 5.

Tableau 5.-

N° de l'échantillon	Nature des fibres testées	Quantité de fibres (µg)	Volume de solution contenant les peptides à 50µg/ml
A	Actinolite	20	1 ml (SEQ ID NO :1, 2 et 3 – FITC)
B	Amosite	20	1 ml (SEQ ID NO :1, 2 et 3 – FITC)
C	Anthophyllite	20	1 ml (SEQ ID NO :1, 2 et 3 – FITC)
D	Chrysotile	20	1 ml (SEQ ID NO :1, 2 et 3 – FITC)
E	Crocidolite	20	1 ml (SEQ ID NO :1, 2 et 3 – FITC)
F	Trémolite	20	1 ml (SEQ ID NO :1, 2 et 3 – FITC)
G	Fibre de verre	20	1 ml (SEQ ID NO :1, 2 et 3 – FITC)

10

Le peptide hybride contenant les SEQ ID NO :1, SEQ ID NO :2 et SEQ ID NO :3 fusionné à la fluorescéine reconnaît et se lie aux fibres d'amiante de la famille des serpentines et de la famille des amphiboles. En effet, suite à cette analyse, il a été mis en évidence que ce peptide hybride lie les fibres

15 d'amiante de type crocidolite, trémolite, anthophyllite, actinolite, amosite et chrysotile. Un contrôle négatif a été validé sur la fibre de verre (G).

Exemple 4.- Détection de l'amiante par un peptide hybride contenant les SEQ ID NO :1 et SEQ ID NO : 3 fusionné à la fluorescéine :

Le protocole de production du peptide hybride contenant les SEQ ID NO :1 et SEQ ID NO : 3 fusionné à la fluorescéine est identique à celui décrit dans l'exemple 3.

Le protocole de détection des fibres d'amiante avec l'hybride
5 contenant les SEQ ID NO :1 et SEQ ID NO : 3 fusionné à la fluorescéine est identique à celui décrit dans l'exemple 3.

Différents échantillons d'amiante ont été testés selon le protocole de détection mentionné précédemment et selon le tableau 6. Les résultats issus de cette analyse sont représentés à la figure 6.

10

Tableau 6.-

N° de l'échantillon	Nature des fibres testées	Quantité de fibres (µg)	Volume de solution contenant les peptides à 50µg/ml
A	Actinolite	20	1 ml (SEQ ID NO :1 et 3 – FITC)
B	Amosite	20	1 ml (SEQ ID NO :1 et 3 – FITC)
C	Anthophyllite	20	1 ml (SEQ ID NO :1 et 3 – FITC)
D	Chrysotile	20	1 ml (SEQ ID NO :1 et 3 – FITC)
E	Crocidolite	20	1 ml (SEQ ID NO :1 et 3 – FITC)
F	Trémolite	20	1 ml (SEQ ID NO :1 et 3 – FITC)

Le peptide hybride contenant les SEQ ID NO :1 et SEQ ID NO :3 fusionné à la fluorescéine reconnaît et se lie aux fibres d'amiante de la famille des serpentines et de la famille des amphiboles. En effet, suite à cette analyse,
15 il a été mis en évidence que ce peptide hybride lie les fibres d'amiante de type crocidolite, trémolite, anthophyllite, actinolite, amosite et chrysotile.

Exemple 5.- Détection de l'amiante par un peptide hybride contenant les SEQ ID NO : 1 et SEQ ID NO : 2 fusionné à la fluorescéine :

Le protocole de production du peptide hybride contenant les
20 SEQ ID NO :1 et SEQ ID NO : 2 fusionné à la fluorescéine est identique à celui décrit dans l'exemple 3.

Le protocole de détection des fibres d'amiante avec l'hybride contenant les SEQ ID NO :1 et SEQ ID NO : 2 fusionné à la fluorescéine est identique à celui décrit dans l'exemple 3.

Différents échantillons d'amiante ont été testés selon le protocole de détection mentionné précédemment et selon le tableau 7. Les résultats issus de cette analyse sont représentés à la figure 7.

Tableau 7.-

N° de l'échantillon	Nature des fibres testées	Quantité de fibres (µg)	Volume de solution contenant les peptides à 50µg/ml
A	Actinolite	20	1 ml (SEQ ID NO :1 et 2 – FITC)
B	Amosite	20	1 ml (SEQ ID NO :1 et 2 – FITC)
C	Anthophyllite	20	1 ml (SEQ ID NO :1 et 2 – FITC)
D	Chrysotile	20	1 ml (SEQ ID NO :1 et 2 – FITC)
E	Crocidolite	20	1 ml (SEQ ID NO :1 et 2 – FITC)
F	Trémolite	20	1 ml (SEQ ID NO :1 et 2 – FITC)

Le peptide hybride contenant les SEQ ID NO :1 et SEQ ID NO :2 fusionné à la fluorescéine reconnaît et se lie aux fibres d'amiante de la famille des serpentines et de la famille des amphiboles. En effet, suite à cette analyse, il a été mis en évidence que ce peptide hybride lie les fibres d'amiante de type crocidolite, trémolite, anthophyllite, actinolite, amosite et chrysotile.

Conclusion

Ces différentes analyses ont permis de mettre en évidence que la mise en contact de fibres d'amiante avec les peptides SEQ ID NO :1 et SEQ ID NO :2 et/ou SEQ ID NO :3 permet de détecter la présence ou non de tous les types de fibres d'amiante de la famille des serpentines et de la famille des amphiboles. Cette mise en évidence est observée tant avec un mélange comprenant le peptide SEQ ID NO :1 et SEQ ID NO :2 et/ou SEQ ID NO :3, qu'avec un peptide hybride contenant les SEQ ID NO :1 et SEQ ID NO :2 et/ou SEQ ID NO :3. De plus, cette détection est valide non seulement en colorimétrie

mais aussi en fluorescence. En effet, les analyses réalisées en colorimétrie et en fluorescence sont complémentaires et aboutissent à un résultat similaire. Ceci permet de conclure que les résultats obtenus en fluorescence sont transposables aux techniques colorimétriques et inversement.

5 Comme on peut le voir à la figure 8A et à la figure 8B, la présente invention se rapporte également à une trousse de détection de l'amiante qui comprend, dans la forme préférentielle illustrée, un support comprenant une première zone de réception B d'un échantillon à tester, une deuxième zone de réception C agencée pour recevoir un contrôle négatif et une troisième zone de
10 réception A agencée pour recevoir un contrôle positif. Les première, deuxième et troisième zone de réception A, B et C forment trois colonnes aboutissant, d'un côté, dans un récipient D pour collecter les déchets et sont prolongées à l'opposé chacune d'un tube E, F, G qui relie la colonne à une entrée H pour un fluide.

15 La deuxième zone de réception C agencée pour recevoir un contrôle négatif est idéalement pré-remplie par un contrôle négatif, par exemple des fibres de verre vierges, ne contenant pas d'amiante. La troisième zone de réception A agencée pour recevoir un contrôle positif A est idéalement pré-remplie par un contrôle positif, par exemple un analogue non asbestiforme
20 de l'amiante. L'échantillon à tester, par exemple des fibres d'amiante pures ou un matériau ($< 1 \text{ cm}^3$), lequel est préférentiellement mis en suspension dans un volume de tampon bloquant, est déposé dans la zone de réception B pour l'échantillon à tester dans la colonne appropriée.

25 Une fois l'échantillon à tester introduit dans la première zone de réception A, une première seringue, dans laquelle est conditionnée la composition selon l'invention, est reliée au moyen d'un connecteur rapide (LUER LOCK ®) à l'entrée H pour introduire un fluide de la trousse de détection selon l'invention.

La composition selon l'invention comprend dans cette forme de réalisation préférée ledit peptide hybride ayant pour séquence SEQ ID NO :3 – GGG – SEQ ID NO :1 – GGG SEQ ID NO : 2 couplé à la bêta-lactamase TEM-1. La composition selon l'invention est donc introduite de la même manière dans les

5 trois zones de réception A, B et C (première, deuxième et troisième zone de réception). Ensuite, la composition selon l'invention de la seringue 1 est incubée avec l'échantillon à tester ainsi qu'avec les deux contrôles (positif et négatif) pendant un intervalle de temps prédéterminé, comme par exemple 10 minutes. Pendant cet intervalle de temps, la composition selon l'invention

10 reste en contact avec l'échantillon à tester, le contrôle positif et le contrôle négatif.

Chaque zone de réception comprend à son extrémité orientée vers le récipient D un moyen de séparation, tel qu'un filtre, ou un fritté permettant de retenir les fibres d'amiante, le contrôle positif et le contrôle

15 négatif dans la colonne, mais de laisser passer au travers la composition selon l'invention qui n'aurait pas été liée aux fibres de l'échantillon à tester, aux fibres du contrôle positif et aux fibres du contrôle négatif une fois le soutirage de celle-ci effectué. Ce soutirage peut être réalisé par aspiration, par ajout d'une solution de lavage ou par tout autre moyen équivalent, comme par

20 exemple en pratiquant une ouverture permettant au fluide de s'écouler sous l'effet de la gravité ou par capillarité.

Après l'incubation de la composition selon la présente invention, une solution de lavage se trouvant conditionnée dans la seringue 2 est injectée de la même manière dans les trois colonnes contenant les première, deuxième

25 et troisième zones de réception. La solution de lavage est par exemple de l'eau et son injection permet d'éliminer la composition selon l'invention non liée aux fibres d'amiante, aux fibres du contrôle positif et aux fibres du contrôle négatif.

Une fois le lavage terminé (après ajout de 6 ml de solution de lavage), une solution de révélation à base de nitrocéfine, de couleur jaune, ou

analogues, contenue dans une troisième seringue 3 (concentration 200 μM , volume appliqué 500 μl) est mise en contact avec l'échantillon à tester et les deux contrôles. Si le peptide hybride a été lié aux fibres, la bêta-lactamase hydrolyse la nitrocéfine et forme son dérivé qui devient alors de couleur rouge.

- 5 La coloration rouge dans la colonne contenant la zone de réception B pour l'échantillon à tester signifie que le test est positif pour la présence de fibres d'amiante, tandis qu'une coloration jaune signifie qu'il n'y a pas de fibres d'amiante présentes.

Comme on peut le voir à la figure 9A, la présente invention se
10 rapporte également à une trousse de détection d'amiante qui comporte une première zone de réception d'un échantillon à tester 1 qui est positionnée sur une tige 9 à une extrémité de celle-ci. La tige 9 comprend également deux bandes d'arrêt 2 (Ami) et 4 (T) dans lesquelles sont immobilisées des protéines de liaison primaires ou secondaires des moyens de détection couplés aux
15 fragments peptidiques de la composition selon la présente invention. L'échantillon est préparé par mise en suspension d'un échantillon à tester pour la présence d'amiante dans un tampon bloquant ($< 1 \text{ cm}^3$ d'échantillon pour un volume de 1 ml).

L'échantillon est ensuite mis en contact, dans un contenant
20 séparé, avec la composition principalement peptidique selon la présente invention pendant un intervalle de temps suffisant pour permettre la liaison des peptides de la composition selon l'invention à l'échantillon.

La quantité de composition suivant l'invention comprend, dans une forme de réalisation préférée, ledit peptide hybride ayant pour séquence
25 SEQ ID NO :3 – GGG – SEQ ID NO :1 – GGG SEQ ID NO : 2 couplé à la bêta-lactamase TEM-1, et est mise en relativement faible quantité par rapport à la quantité d'échantillon à tester afin d'assurer que s'il y a des fibres d'amiante dans l'échantillon, l'intégralité du ou des peptides soient liés aux fibres d'amiante.

Dans une autre forme de réalisation préférée, la trousse selon l'invention comprend deux tiges 9 et deux compositions selon l'invention. La première tige 9 selon l'invention pour la reconnaissance des fibres d'amiante de type chrysotile est trempée dans une première solution comprenant ledit échantillon en suspension et une composition selon l'invention comprenant SEQ ID NO :2 (ou SEQ ID NO :3) est couplée à une protéine porteuse (par exemple TEM-1) conjuguée à de l'or colloïdal. La bande 2 (Ami) a des anticorps dirigés contre ladite protéine porteuse. La deuxième tige 9 selon l'invention pour la reconnaissance des fibres d'amiante de type amphibole est trempée dans une deuxième solution comprenant ledit échantillon en suspension et une composition selon l'invention comprenant SEQ ID NO :1 couplée à une protéine porteuse (par exemple TEM-1) conjuguée à de l'or colloïdal, la bande 2 (Ami) ayant des anticorps dirigés contre ladite protéine porteuse.

Dans une autre forme de réalisation, la trousse selon l'invention comprend une tige 9 et une composition selon l'invention. La tige 9 selon l'invention pour la reconnaissance des fibres d'amiante de type chrysotile et de type amphibole est trempée dans une solution comprenant ledit échantillon en suspension et une composition selon l'invention comprenant SEQ ID NO :3 – GGG – SEQ ID NO :1 – GGG – SEQ ID NO :2 couplée à l'isothiocyanate de fluorescéine et un anticorps dirigé contre l'isothiocyanate conjugué à de l'or colloïdal, la bande 2 (Ami) ayant des anticorps dirigés contre l'isothiocyanate de fluorescéine.

Dans une autre forme de réalisation, la trousse selon l'invention comprend une tige 9 et une composition selon l'invention. La tige 9 selon l'invention pour la reconnaissance des fibres d'amiante de type chrysotile et de type amphibole est trempée dans une solution comprenant ledit échantillon en suspension et une composition selon l'invention comprenant SEQ ID NO :1 et SEQ ID NO :2 (ou SEQ ID NO :3) couplés à l'isothiocyanate de fluorescéine et un anticorps dirigé contre l'isothiocyanate conjugué à de l'or colloïdal, la bande 2

(Ami) ayant des anticorps dirigé l'anticorps dirigé contre l'isothiocyanate de fluorescéine. Dans une autre forme de réalisation, la trousse selon l'invention peut contenir deux tiges 9 et deux compositions selon l'invention pour détecter séparément les fibres d'amiante de type chrysotile et de type
5 amphibole.

Une fois l'intervalle de temps écoulé (au minimum 2 min), l'échantillon en suspension ainsi préparé est mis en contact avec la zone de réception 1, par exemple par trempage de la tige 9 dans l'échantillon en suspension.

10 S'il y a des fibres d'amiante dans l'échantillon en suspension, les peptides qui y sont liés ne migrent pas le long de la tige 9 et leur présence n'est donc pas détectée (B).

Par contre, la bande la plus éloignée de la zone de réception 1 de l'échantillon en suspension à tester comprend quant à elle un témoin T
15 permettant de visualiser que le test a fonctionné correctement. Ce témoin T peut par exemple être la sérum albumine bovine couplée à de l'or colloïdal et révélée par un anticorps dirigé contre la sérum albumine bovine. Si cette bande est colorée, et que la première bande 2 (Ami), localisée près de la zone de réception 1 de l'échantillon à tester, est également colorée, cela signifie qu'il
20 n'y a pas d'amiante (A). Si les deux bandes sont colorées, cela signifie que le test a fonctionné et que les peptides de la composition selon l'invention ont migré vers les bandes. Ils ne sont donc pas liés aux fibres d'amiante (A). On peut donc conclure à l'absence de fibres d'amiante. Si la bande la plus éloignée ne se colore pas, dans ce cas, le test n'a pas fonctionné et il y a lieu de le
25 reproduire (C et D).

Comme on peut le voir à la figure 9B, la présente invention se rapporte également à une trousse de détection d'amiante qui comporte une première zone de réception d'un échantillon à tester 1 qui est positionnée sur une tige 9 à une extrémité de celle-ci et qui comprend également trois

bandes d'arrêt 2, 3 et 4 dans lesquelles sont immobilisés des protéines de liaison primaires ou secondaires des moyens de détection couplés aux fragments peptidiques de la composition selon la présente invention. L'échantillon est préparé par mise en suspension d'un échantillon à tester pour
5 la présence d'amiante dans un tampon bloquant ($< 1 \text{ cm}^3$ d'échantillon pour un volume de 1 ml).

L'échantillon est ensuite mis en contact, au préalable dans un contenant séparé, avec la composition principalement peptidique selon la présente invention pendant un intervalle de temps (au minimum 2 min)
10 suffisant pour permettre la liaison des peptides de la composition selon l'invention à l'échantillon.

La quantité de composition suivant l'invention comprend, dans cette forme de réalisation préférée, un mélange comprenant le peptide ayant pour séquence SEQ ID NO :1 couplé à la bêta-lactamase TEM-1 conjuguée à de
15 l'or colloïdal et le peptide ayant pour séquence SEQ ID NO :2 couplé à la protéine liant le maltose (MBP) conjugué à de l'or colloïdal. La bande 2 (Am) a des anticorps dirigés contre la bêta-lactamase TEM-1 et la bande 3 (Ch) a des anticorps dirigés contre la protéine liant le maltose (MBP).

Ce mélange est mis en relativement faible quantité par rapport à
20 la quantité d'échantillon à tester afin d'assurer que s'il y a des fibres d'amiante dans l'échantillon, l'intégralité du ou des peptides soient liés aux fibres d'amiante. Une fois l'intervalle de temps écoulé (au minimum 2 min), l'échantillon en suspension ainsi préparé est mis en contact avec la zone de
réception 1, par exemple par trempage de la tige 9 dans l'échantillon en
25 suspension.

S'il y a des fibres d'amiante de type amphibole et serpentine dans l'échantillon en suspension, les peptides qui y sont liés ne migrent pas le long de la tige 9 et leur présence n'est donc pas détectée (B). S'il y a uniquement des fibres de type amphibole, les peptides qui y sont liés ne

migrent pas le long de la tigette 9 et leur présence n'est donc pas détectée (D).
S'il y a uniquement des fibres de type serpentine, les peptides qui y sont liés ne migrent pas le long de la tigette 9 et leur présence n'est donc pas détectée (C).

La bande la plus éloignée de la zone de réception 1 de
5 l'échantillon en suspension à tester comprend quant à elle un témoin T permettant de visualiser que le test a fonctionné correctement. Ce témoin T peut par exemple être la sérum albumine bovine couplée à de l'or colloïdal et révélée par un anticorps dirigé contre la sérum albumine bovine.

Si la bande témoin 4 est colorée et que la première bande 2
10 (Am), localisée près de la zone de réception A de l'échantillon à tester, est également colorée, cela signifie qu'il n'y a pas d'amiante de type amphibole (C).

Si la bande témoin 4 est colorée et que la deuxième bande 3 (Ch) est également colorée, cela signifie qu'il n'y a pas d'amiante de type serpentine (D).

15 Si les trois bandes 2 (Am), 3 (Ch) et 4 (T) sont colorées, cela signifie que le test a fonctionné et que les peptides de la composition selon l'invention ont migré vers les bandes. Ils ne sont donc pas liés aux fibres d'amiante (A). On peut donc conclure à l'absence de fibres d'amiante.

Si la bande la plus éloignée ne se colore pas, dans ce cas, le test
20 n'a pas fonctionné et il y a lieu de le reproduire (E, F, G et H).

Il est bien entendu que la présente invention n'est en aucune façon limitée aux formes de réalisations décrites ci-dessus et que bien des modifications peuvent y être apportées sans sortir du cadre des revendications annexées.

LISTAGE DE SEQUENCES

BE2017/5090

<110> Symbiose Biomaterials

<120> Composition principalement peptidique pour la détection de l'amiante

<130> PAT2524407BE00/MAWL

5 <160> 6

<170> Patent-In version 3.5

<210> 1

<211> 7

10 <212> PRT

<213> Bacteriophage M13

<221> Peptide

<223> Peptide liant et reconnaissant l'amiante

15

<400> SEQ ID NO :1

Glu Thr Leu Ser Arg Met Arg

1

5

20

<210> 2

<211> 11

<212> PRT

<213> Bacteriophage M13

25

<221> Peptide

<223> Peptide liant et reconnaissant l'amiante

<400> SEQ ID NO :2

Phe Tyr Ser His Ser Ala Leu Tyr Arg Thr His

1

5

10

30

<210> 3

<211> 7

<212> PRT

<213> Bacteriophage M13

35

<221> Peptide

<223> Peptide liant et reconnaissant l'amiante

40

<400> SEQ ID NO :3

Gln Phe Asp His Trp Arg Asn

1

5

45

<210> 4

<211> 7

<212> PRT

<213> Bacteriophage M13

50

<221> Peptide

<223> Peptide liant et reconnaissant l'amiante

<400> SEQ ID NO :4

Gly His Cys Ser His Pro Thr

1

5

55

<210> 5
 <211> 31
 <212> PRT
 <213> Bacteriophage M13

5

<221> Peptide
 <223> Peptide liant et reconnaissant l'amiante

<400> SEQ ID NO :5

10

Gln Phe Asp His Trp Arg Asn Gly Gly Gly Glu Thr Leu Ser Arg Met Arg Gly Gly Gly
 Phe Tyr Ser His Ser Ala Leu Tyr Arg Thr His

1 5 10 15 20
 25 30

15

<210> 6
 <211> 27
 <212> PRT
 <213> Bacteriophage M13

20

<221> Peptide
 <223> Peptide liant et reconnaissant l'amiante

<400> SEQ ID NO :6

25

Gln Phe Asp His Trp Arg Asn Gly Gly Gly Glu Thr Leu Ser Arg Met Arg Gly Gly Gly
 Gly His Cys Ser His Pro Thr

1 5 10 15 20
 25

30

P_1 et ledit deuxième fragment peptidique P_2 sont chacun indépendant l'un de l'autre, sous forme d'un mélange.

5 5. Composition principalement peptidique selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisée en ce que ledit premier fragment peptidique P_1 et/ou ledit deuxième fragment peptidique P_2 et/ou ledit au moins un moyen de détection sont fusionnés, éventuellement sous forme de répétitions, via au moins un domaine de liaison sélectionné parmi les domaines de liaison poly-G ou riches en G, la longueur de ceux-ci pouvant varier, incluant GGG, GGS, GGGG et GGSSG.

10 6. Composition principalement peptidique selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, caractérisée en ce que ledit deuxième fragment peptidique P_2 présente un pourcentage d'identité d'au moins 50%, préférentiellement d'au moins 65%, de préférence d'au moins 80%, avec une séquence choisie dans le groupe constitué de $X_1X_2X_3X_4X_2X_4X_1$ et
15 $X_2X_1X_1X_4X_1X_2X_2X_1X_4X_1X_4$, où X_1 représente un acide aminé polaire, X_2 représente un acide aminé apolaire, X_3 représente un acide aminé acide et X_4 représente un acide aminé basique.

7. Composition principalement peptidique selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, caractérisée en ce que ledit deuxième
20 fragment peptidique P_2 a pour séquence SEQ ID NO :2 ou SEQ ID NO :3 ou SEQ ID NO :4.

8. Composition principalement peptidique selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, caractérisée en ce qu'elle comprend en
25 outre un troisième fragment peptidique P_3 agencé pour reconnaître et se lier auxdites fibres d'amiante de ladite famille des amphiboles et/ou auxdites fibres d'amiante de ladite famille des serpentines et présentant un pourcentage d'identité d'au moins 50%, préférentiellement d'au moins 65%, de préférence d'au moins 80%, avec une séquence choisie dans le groupe constitué de $X_1X_2X_3X_4X_2X_4X_1$ et $X_2X_1X_1X_4X_1X_2X_2X_1X_4X_1X_4$, où X_1 représente un acide aminé

polaire, X_2 représente un acide aminé apolaire, X_3 représente un acide aminé acide et X_4 représente un acide aminé basique.

5 9. Composition principalement peptidique selon la revendication 8, caractérisée en ce que ledit troisième fragment peptidique P_3 a pour séquence SEQ ID NO :2 ou SEQ ID NO :3 ou SEQ ID NO :4.

10 10. Composition principalement peptidique selon les revendications 8 ou 9, caractérisée en ce que ledit troisième fragment peptidique P_3 et ledit deuxième fragment peptidique P_2 sont différents l'un de l'autre.

15 11. Composition principalement peptidique selon l'une quelconque des revendications 8 à 10, caractérisée en ce que ledit troisième fragment peptidique P_3 et ledit deuxième fragment peptidique P_2 sont fusionnés, dans un ordre quelconque, et forment un peptide hybride, ledit premier fragment peptidique P_1 étant indépendant, ledit peptide hybride et ledit premier fragment peptidique P_1 étant sous forme d'un mélange.

20 12. Composition principalement peptidique selon l'une quelconque des revendications 8 à 10, caractérisée en ce que ledit troisième fragment peptidique P_3 et ledit premier fragment peptidique P_1 sont fusionnés, dans un ordre quelconque, et forment un peptide hybride, ledit deuxième fragment peptidique P_2 étant indépendant, ledit peptide hybride et ledit deuxième fragment peptidique P_2 étant sous forme d'un mélange.

25 13. Composition principalement peptidique selon l'une quelconque des revendications 8 à 10, caractérisée en ce que ledit premier fragment peptidique P_1 et ledit deuxième fragment peptidique P_2 sont fusionnés, dans un ordre quelconque, et forment un peptide hybride, ledit troisième fragment peptidique P_3 étant indépendant, ledit peptide hybride et ledit troisième fragment peptidique P_3 étant sous forme d'un mélange.

14. Composition principalement peptidique selon l'une quelconque des revendications 8 à 10, caractérisée en ce que ledit deuxième fragment peptidique P_2 , ledit troisième fragment peptidique P_3 et ledit premier

fragment peptidique P₁ sont chacun indépendant l'un de l'autre, sous forme d'un mélange.

15 15. Composition principalement peptidique selon l'une quelconque des revendications 8 à 10, caractérisée en ce que ledit troisième fragment peptidique P₃, ledit deuxième fragment peptidique P₂ et ledit premier fragment peptidique P₁ sont fusionnés, dans un ordre quelconque, et forment un peptide hybride.

10 16. Composition principalement peptidique selon l'une quelconque des revendications 8 à 15, caractérisée en ce que ledit premier fragment peptidique P₁ et/ou ledit deuxième fragment peptidique P₂ et/ou ledit troisième fragment peptidique P₃ et/ou ledit au moins un moyen de détection sont fusionnés, éventuellement sous forme de répétitions, via au moins un domaine de liaison sélectionné parmi les domaines de liaison poly-G ou riches en G, la longueur de ceux-ci pouvant varier, incluant GGG, GGS, GGGG et GGSSG.

15 17. Composition principalement peptidique selon les revendications 15 et 16, caractérisée en ce que ledit troisième fragment peptidique P₃, ledit deuxième fragment peptidique P₂ et ledit premier fragment peptidique P₁ sont fusionnés et forment un peptide hybride ayant pour séquence X₃X₁X₂X₁X₄X₂X₄GGGX₂X₁X₄X₁X₂X₂GGGX₄X₁X₄X₁X₂X₃X₄X₂X₄X₁ où X₁ représente
20 un acide aminé polaire, X₂ représente un acide aminé apolaire, X₃ représente un acide aminé acide et X₄ représente un acide aminé basique.

18. Composition principalement peptidique selon la revendication 17, caractérisée en ce que ledit peptide hybride a pour séquence la séquence SEQ ID NO :5 formée de SEQ ID NO :3 – GGG – SEQ ID NO :1 – GGG –
25 SEQ ID NO :2 ou SEQ ID NO :6 formée de SEQ ID NO :3 – GGG – SEQ ID NO :1 – GGG – SEQ ID NO :4.

19. Composition principalement peptidique selon l'une quelconque des revendications 8 à 18, caractérisée en ce que ledit premier

fragment peptidique P_1 , ledit deuxième fragment peptidique P_2 et ledit troisième fragment peptidique P_3 , seuls, en mélange ou fusionnés sont des GEPs.

20. Composition principalement peptidique selon l'une quelconque des revendications 1 à 19, caractérisée en ce que ledit au moins un
5 moyen de détection est choisi parmi la luciférase, la phosphatase alcaline, les protéines fluorescentes, la bêta-galactosidase, la bêta-lactamase, la diphorase, la peroxydase, la protéine de liaison du maltose, la laccase, la lipase, la glycosyl hydrolase, la sérum albumine bovine, l'or colloïdal, les billes colorées, de préférence les billes de latex colorées, ou la biotine et leurs mélanges.

10 21. Composition principalement peptidique selon l'une quelconque des revendications 1 à 20, caractérisée en ce qu'elle est sous forme d'une solution, dans un solvant tel qu'une solution aqueuse, un solvant organique polaire, et de manière préférentielle dans de l'eau.

15 22. Composition principalement peptidique selon l'une quelconque des revendications 1 à 21, caractérisée en ce que ledit échantillon est un échantillon de matériau de construction, des fibres d'amiante pures, un échantillon d'air et/ou un échantillon de matériel biologique.

23. Procédé de détection de l'amiante dans un échantillon comprenant :

- 20
- une préparation de l'échantillon par mise en suspension d'un échantillon à tester pour la présence d'amiante,
 - une mise en contact dudit échantillon avec au moins une composition principalement peptidique selon l'une quelconque des revendications 1 à 22, pendant un intervalle de temps
25 suffisant pour permettre la liaison des peptides de la composition principalement peptidique selon l'une quelconque des revendications 1 à 22 à l'échantillon,
 - une révélation de la présence de fragments peptidiques de la composition selon l'une quelconque des revendications

1 à 22, liés aux fibres d'amiante de la famille des serpentines et/ou de la famille des amphiboles.

24. Procédé selon la revendication 23, caractérisé en ce qu'elle comprend en outre au moins une étape de séparation desdits fragments peptidiques liés des fragments peptidiques non liés aux fibres d'amiante, telle
5 qu'une étape d'élimination desdits fragments peptidiques non liés, par exemple par percolation au travers d'une paroi filtrante ou par exemple, par une étape de séparation par lavage.

25. Trousse de détection de l'amiante comprenant :
10 - au moins un support muni d'au moins une première zone de réception d'un échantillon à tester, et
- au moins une composition peptidique selon l'une quelconque des revendications 1 à 22, dans laquelle au moins lesdits fragments peptidiques P_1 , P_2 et éventuellement des fragments peptidiques additionnels
15 tels que P_3 sont conditionnés ensemble ou chacun séparément, de préférence dans une seringue ou dans une cartouche comprenant plusieurs compartiments.

26. Trousse de détection selon la revendication 25, comprenant en outre au moins un moyen de révélation, de préférence
20 conditionné dans une seringue ou dans une cartouche comprenant plusieurs compartiments, agencé pour visualiser ledit au moins un moyen de détection de la composition peptidique, ledit au moins un moyen de révélation étant un moyen de révélation en visible, tel que par exemple un moyen de révélation par colorimétrie, par exemple la nitrocéfine ou tout autre composé permettant
25 une révélation par colorimétrie.

27. Trousse de détection selon la revendication 26, dans laquelle ledit au moins un moyen de détection est choisi dans le groupe constitué de la luciférase, la bêta-galactosidase, la bêta-lactamase, la laccase, la lipase, la glycosyl hydrolase, la phosphatase alcaline, la diphorase, la

peroxydase et de leurs mélanges et est plus particulièrement la bêta-lactamase.

28. Trousse de détection selon la revendication 25, comprenant en outre au moins un moyen de révélation, de préférence conditionné dans une seringue ou dans une cartouche comprenant plusieurs compartiments, agencé pour visualiser ledit au moins un moyen de détection de la composition peptidique, ledit au moins un moyen de révélation étant un moyen de révélation en fluorescence.

29. Trousse de détection de l'amiante selon la revendication 28, dans lequel ledit au moins un moyen de détection est une molécule fluorescente, révélée par excitation au moyen d'une onde.

30. Trousse de détection de l'amiante selon l'une quelconque des revendications 25 à 29, comprenant en outre une solution de lavage, de préférence conditionnée dans une seringue ou dans une cartouche comprenant plusieurs compartiments.

31. Trousse de détection de l'amiante selon l'une quelconque des revendications 25 à 30, dans laquelle ledit support comprend en outre une deuxième zone de réception agencée pour recevoir un contrôle négatif ou un contrôle positif.

32. Trousse de détection de l'amiante selon l'une quelconque des revendications 25 à 30, dans laquelle ledit support comprend en outre une deuxième et une troisième zone de réception agencées respectivement pour recevoir un contrôle négatif et un contrôle positif ou inversement.

33. Trousse de détection de l'amiante selon la revendication 25, comprenant en outre au moins un moyen de révélation et dans laquelle ledit support comprenant ladite première zone de réception d'un échantillon en suspension à tester est une tige sur laquelle la première zone de réception dudit échantillon à tester est positionnée à une extrémité de celle-ci,

ladite tigelette comprenant également au moins deux bandes d'arrêt dans la direction opposée à ladite première zone de réception dans lesquelles sont immobilisées des protéines de liaison primaires ou secondaires dudit au moins un moyen de détection ou dudit moyen de révélation.

- 5 34. Trousse de détection de l'amiante selon la revendication 33, dans laquelle ledit au moins un moyen de détection comprend au moins une molécule fluorescente, par exemple l'isothiocyanate de fluorescéine, ou au moins une protéine porteuse telle que la sérum albumine bovine, la protéine de liaison au maltose, la biotine, une enzyme telle que la bêta-galactosidase, la
- 10 bêta-lactamase, la laccase, la lipase, la glycosyl hydrolase, la phosphatase alcaline, la diphorase, la peroxydase et est plus particulièrement la bêta-lactamase, ladite au moins une molécule fluorescente et ladite au moins une protéine porteuse étant couplée audit au moins un moyen de révélation tel que de l'or colloïdal ou à des billes colorées, de préférence des billes de latex
- 15 colorées et dans laquelle les protéines de liaison immobilisées dans les bandes d'arrêt sont des protéines de liaison primaires choisies parmi les anticorps dirigés contre ladite au moins une protéine porteuse, les anticorps dirigés contre ladite au moins une molécule fluorescente, ou l'avidine (ou analogues), ou la streptavidine.
- 20 35. Trousse de détection de l'amiante selon la revendication 33, dans laquelle ledit au moins un moyen de détection comprend au moins une protéine porteuse ou au moins une molécule fluorescente, telle qu'un isothiocyanate de fluorescéine, reconnue par au moins un moyen de révélation tel qu'un anticorps dirigé contre ladite au moins une protéine fluorescente, par
- 25 exemple un anticorps dirigé contre l'isothiocyanate de fluorescéine, ou un anticorps dirigé contre ladite au moins une protéine porteuse, lesdits anticorps étant couplés à de l'or colloïdal, des billes colorées, telles que des billes de latex colorées et dans laquelle les protéines de liaison immobilisées dans les bandes d'arrêt sont des protéines de liaison secondaires choisies parmi les anticorps

secondaires dirigés contre lesdits anticorps dirigés contre ladite au moins une molécule fluorescente et ladite au moins une protéine porteuse.

5 36. Trousse de détection selon l'une quelconque des revendications 25 à 35, caractérisée en ce que ledit premier fragment peptidique P_1 est fusionné à un premier moyen de détection et ledit deuxième fragment peptidique P_2 ou ledit troisième fragment peptidique P_3 est fusionné à un deuxième moyen de détection, différent dudit premier moyen de détection, lesdits premier, deuxième ou troisième fragments peptidiques P_1 , P_2 ou P_3 étant sous forme d'un mélange.

10 37. Utilisation d'une composition principalement peptidique selon l'une quelconque des revendications 1 à 22 pour la détection de l'amiante dans un échantillon.

38. Utilisation d'un procédé selon les revendications 23 ou 24 pour la détection de l'amiante dans un échantillon.

15 39. Utilisation d'une trousse selon l'une quelconque des revendications 25 à 36, pour la détection de l'amiante dans un échantillon.

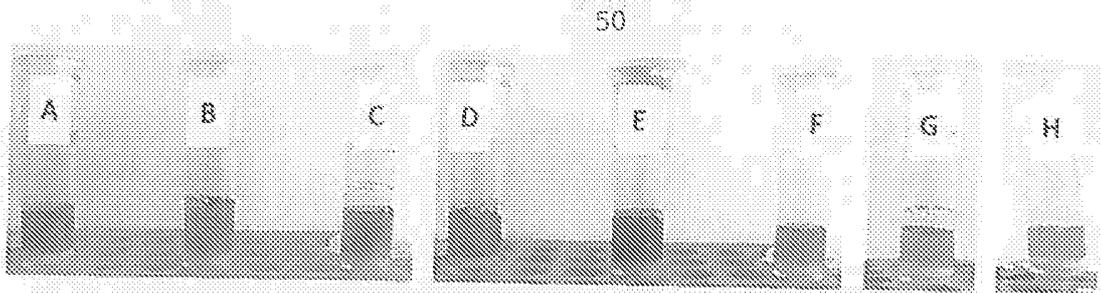


Fig. 1

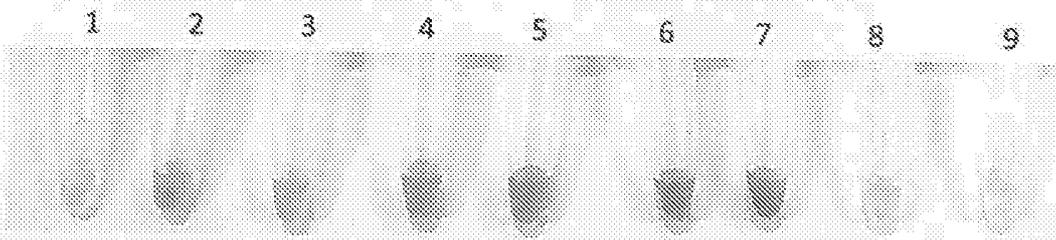


Fig. 2

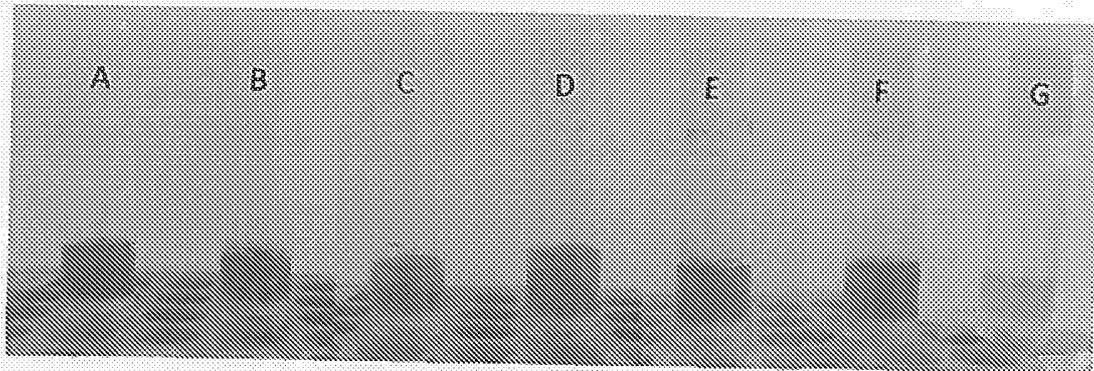


Fig. 3

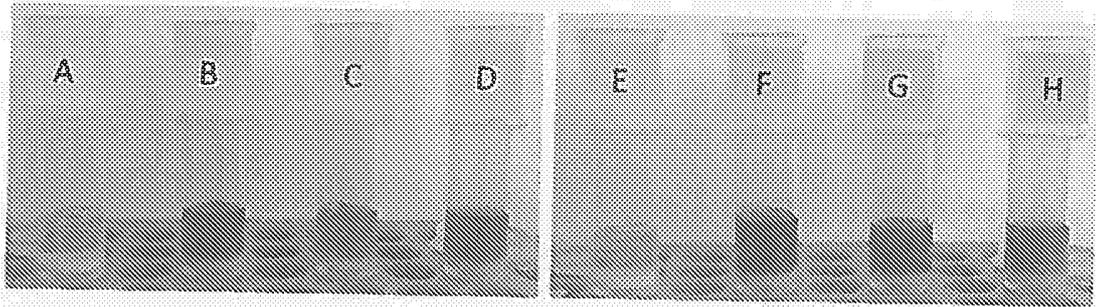


Fig. 4



Fig. 5

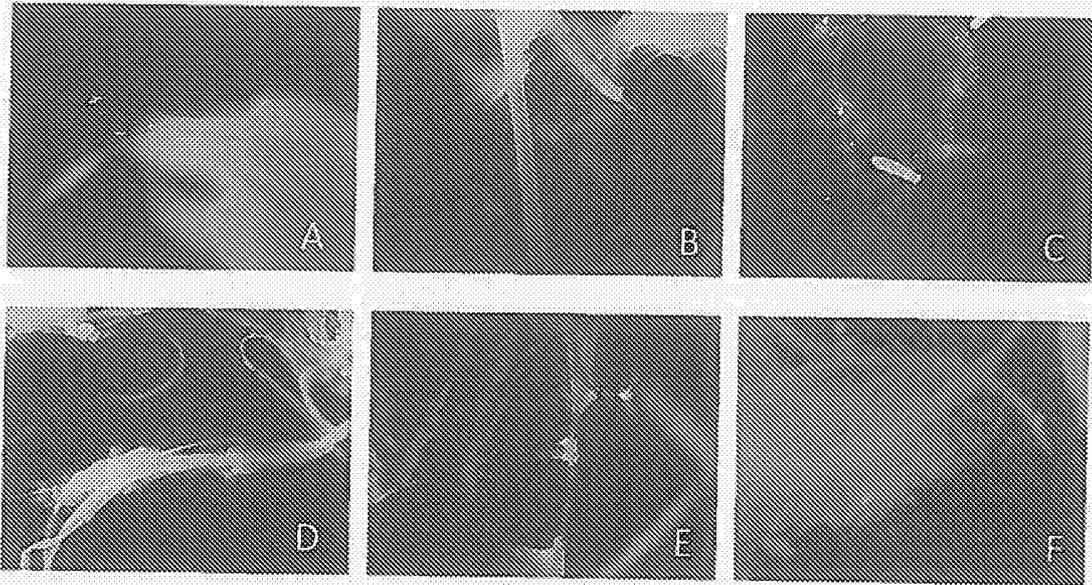


Fig. 6

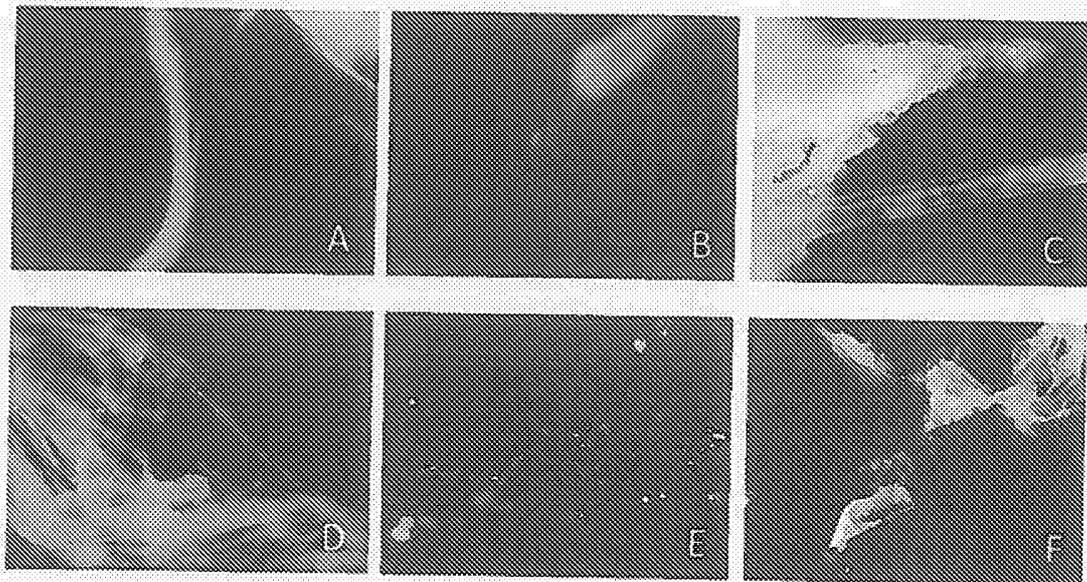


Fig. 7

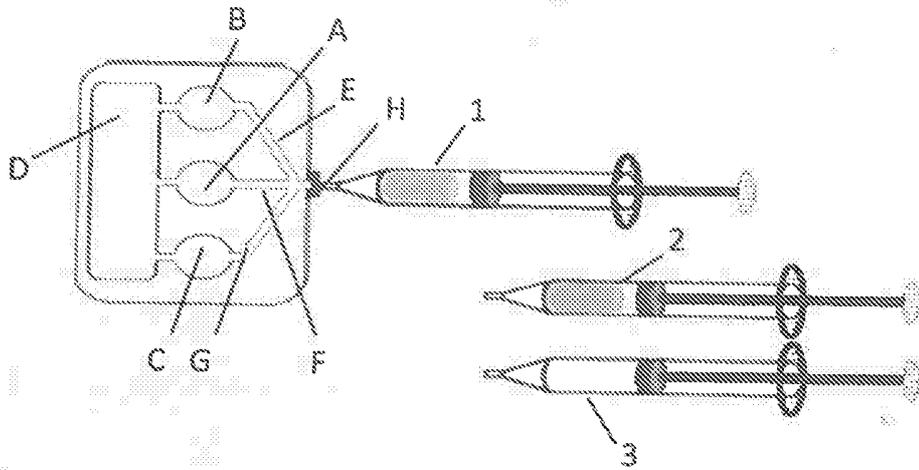


Fig. 8A

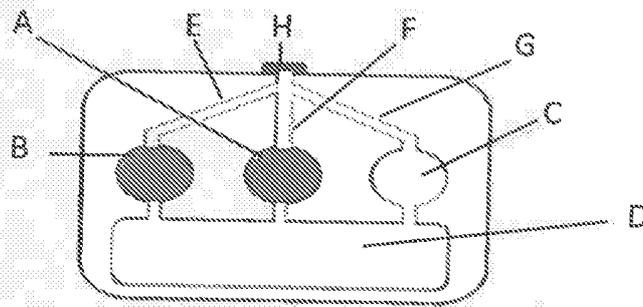


Fig. 8B

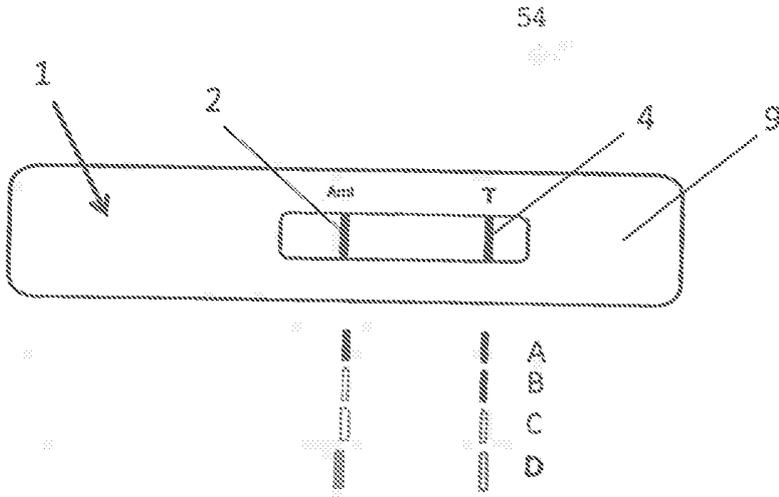


Fig. 9A

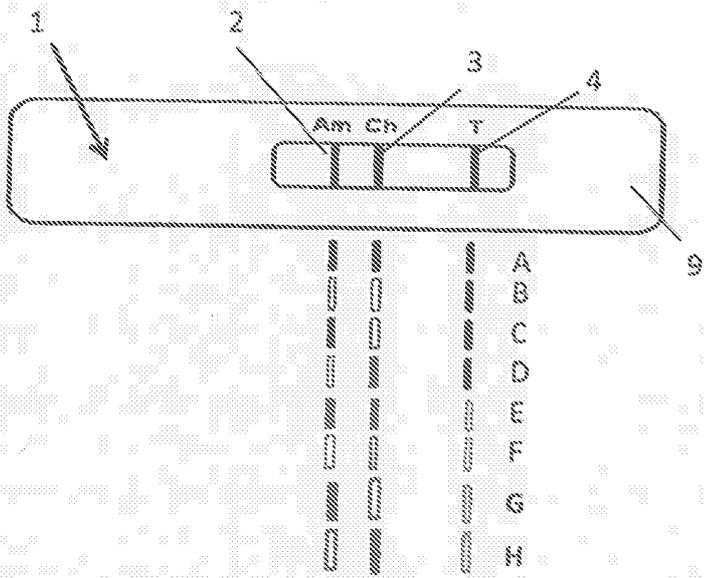


Fig. 9B

ABREGÉ**Composition principalement peptidique pour la détection de l'amiante**

5 La présente invention porte sur une composition principalement peptidique pour détecter l'amiante dans un échantillon comprenant un premier fragment peptidique P_1 agencé pour reconnaître et se lier aux fibres d'amiante de la famille des amphiboles et présentant un pourcentage d'identité d'au moins 70% avec une séquence $X_3X_1X_2X_1X_4X_2X_4$, dans laquelle X_1 représente un acide aminé polaire, X_2 représente un acide aminé apolaire, X_3 représente un acide aminé acide et X_4 représente un acide aminé basique, un deuxième fragment peptidique P_2 agencé pour reconnaître et se lier au moins aux fibres d'amiante de la famille des serpentines conjointement audit premier fragment peptidique P_1 , et au moins un moyen de détection agencé pour détecter la reconnaissance et la liaison desdits premier et deuxième fragments peptidiques P_1 et P_2 .

Fig. 9A

TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

RAPPORT DE RECHERCHE DE TYPE INTERNATIONAL ETABLI EN VERTU DE L'ARTICLE 21 § 9 DE LA LOI BELGE SUR LES BREVETS D'INVENTION DU 28 MARS 1984

IDENTIFICATION DE LA DEMANDE INTERNATIONALE	REFERENCE DU DEPOSANT OU DU MANDATAIRE PAT2524407BE00
Demande nationale belge n° 201705090	Date du dépôt 13-02-2017
	Date de priorité revendiquée
Déposant (Nom) Symbiose Biomaterials	
Date de la requête d'une recherche de type international 25-02-2017	Numéro attribué par l'administration chargée de la recherche internationale à la requête d'une recherche de type international SN68468
I. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE (en cas de plusieurs symboles de la classification, les indiquer tous) Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB G01N33/53;C07K7/06	
II. DOMAINES RECHERCHES	
Documentation minimale consultée	
Système de classification	Symboles de la classification
IPC	C07K;G01N
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents font partie des domaines consultés	
III. <input type="checkbox"/> IL A ETE ESTIME QUE CERTAINES REVENDEICATIONS NE POUVAIENT FAIRE L'OBJET D'UNE RECHERCHE (Observations sur la feuille supplémentaire)	
IV. <input type="checkbox"/> ABSENCE D'UNITE DE L'INVENTION ET/OU CONSTATATION RELATIVE A L'ETENDUE DE LA RECHERCHE (Observations sur la feuille supplémentaire)	

RAPPORT DE RECHERCHE DE TYPE INTERNATIONAL

Demande de recherche No

BE 201705090

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
 INV. G01N33/53 C07K7/06
 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)

C07K G01N

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 réalisable, termes de recherche utilisés)

EPO-Internal, BIOSIS, CHEM ABS Data, EMBASE, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X,D	US 2014/170773 A1 (KURODA AKIO [JP] ET AL) 19 juin 2014 (2014-06-19) cité dans la demande * alinéa [0073] * * alinéa [0186] * * séquence 8 *	1,3-6,8, 10-17, 19,21-39
A	XIAOYING CHEN ET AL: "Fusion protein linkers: Property, design and functionality", ADVANCED DRUG DELIVERY REVIEWS, vol. 65, no. 10, 1 octobre 2013 (2013-10-01), pages 1357-1369, XP055341428, AMSTERDAM, NL ISSN: 0169-409X, DOI: 10.1016/j.addr.2012.09.039 * page 1, alinéa 1 - page 2, alinéa 2 * * tableau 2 *	1-39

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 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, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- *T* document ultérieur publié après la date de dépôt 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
- *Z* document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche de type international a été effectivement achevée

12 mai 2017

Date d'expédition du rapport de recherche de type international

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale

Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
 NL - 2260 HV Rijswijk
 Tel. (+31-70) 340-2040,
 Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Schwachtgen, J

RAPPORT DE RECHERCHE DE TYPE INTERNATIONAL

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande de recherche n°

BE 201705090

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication	
US 2014170773	A1	19-06-2014	CN 103733048 A	16-04-2014
			JP 6086494 B2	01-03-2017
			JP W02013024881 A1	05-03-2015
			KR 20140043152 A	08-04-2014
			US 2014170773 A1	19-06-2014
			WO 2013024881 A1	21-02-2013



OPINION ÉCRITE

Dossier N° SN68468	Date du dépôt (jour/mois/année) 13.02.2017	Date de priorité (jour/mois/année)	Demande n° BE201705090
Classification internationale des brevets (CIB) INV. G01N33/53 G07K7/06			
Déposant Symbiose Biomaterials			

La présente opinion contient des indications et les pages correspondantes relatives aux points suivants :

- Cadre n° I Base de l'opinion
- Cadre n° II Priorité
- Cadre n° III Absence de formulation d'opinion quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle
- Cadre n° IV Absence d'unité de l'invention
- Cadre n° V Déclaration motivée quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle: citations et explications à l'appui de cette déclaration
- Cadre n° VI Certains documents cités
- Cadre n° VII Irrégularités dans la demande
- Cadre n° VIII Observations relatives à la demande

Formulaire BE237A (feuille de couverture) (Janvier 2007)	Examineur Schwachtgen, J
--	-----------------------------

OPINION ÉCRITE

Demande n°
BE201705090

Cadre n° I Base de l'opinion

1. Cette opinion a été établie sur la base des revendications déposées avant le commencement de la recherche.
2. En ce qui concerne **la ou les séquences de nucléotides ou d'acides aminés** divulguées dans la demande, le cas échéant, cette opinion a été effectuée sur la base des éléments suivants :
 - a. Nature de l'élément :
 - un listage de la ou des séquences
 - un ou des tableaux relatifs au listage de la ou des séquences
 - b. Type de support :
 - sur papier
 - sous forme électronique
 - c. Moment du dépôt ou de la remise :
 - contenu(s) dans la demande telle que déposée
 - déposé(s) avec la demande, sous forme électronique
 - remis ultérieurement
3. De plus, lorsque plus d'une version ou d'une copie d'un listage des séquences ou d'un ou plusieurs tableaux y relatifs a été déposée, les déclarations requises selon lesquelles les informations fournies ultérieurement ou au titre de copies supplémentaires sont identiques à celles initialement fournies et ne vont pas au-delà de la divulgation faite dans la demande internationale telle que déposée initialement, selon le cas, ont été remises.
4. Commentaires complémentaires :

OPINION ÉCRITE

Demande n°
BE201705090

Cadre n° V Opinion motivée quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration

1. Déclaration

Nouveauté	Oui :	Revendications	2, 3, 7, 9-13, 15-18, 20, 27, 30-35
	Non :	Revendications	1, 4-6, 8, 14, 19, 21-26, 28, 29, 36-39
Activité inventive	Oui :	Revendications	2, 7, 9, 18, 20
	Non :	Revendications	1, 3-6, 8, 10-17, 19, 21-39
Possibilité d'application industrielle	Oui :	Revendications	1-39
	Non :	Revendications	

2. Citations et explications

voir feuille séparée

Cadre n° VIII Observations relatives à la demande

voir feuille séparée

Ad point V

Déclaration motivée quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle ; citations et explications à l'appui de cette déclaration

1 Il est fait référence au document suivant :

D1 US 2014/170773 A1 (KURODA AKIO [JP] ET AL) 19 juin 2014
(2014-06-19) cité dans la demande

2 La présente demande ne remplit pas les conditions de brevetabilité, l'objet de les revendications 1, 4-6, 8, 14, 19-26, 28, 29, 36-39 n'étant pas nouveau.

D1 décrit une composition fluorescente pour la détection de l'amiante comprenant un premier peptide capable de se lier aux fibres d'amiante de la famille des amphiboles et un deuxième peptide de séquence capable de se lier au moins aux fibres d'amiante de la famille des serpentines (alinéa [0073]; alinéa [0186]; séquence 8).

Le document D1 anticipe donc directement tous les caractéristiques techniques de la revendication 1, 4-6, 8, 14, 19, 21-26, 28, 29, 36-39.

3 Les revendications 3, 10-13, 15-17, 20, 27, 30, 31-35 ne contiennent pas de caractéristiques qui satisfassent aux exigences d'activité inventive en étant combinées aux caractéristiques de l'une quelconque des revendications auxquelles lesdites revendications sont liées. En effet la fusion de différents peptides à l'aide d'un domaine de liaison riche en G (revendications 3, 10-13, 15-17) et la détection à l'aide moyens colorimétriques (revendications 20, 27, 30, 31-35) sont des mesures routinières dans le domaine de la détection que la personne du métier aurait pris sans intervention d'activité inventive.

Ad point VIII

Certaines observations relatives à la demande

4 Les revendications 1-17 concernent une grande classe de peptides ayant la propriété fonctionnelle de se lier à l'amiante. La description, cependant, fournit seulement des exemples très limités de peptides courts multimérisés spécifiques se liant l'amiante (voir exemples). La personne du métier serait

confrontée à une tâche indument difficile et complexe pour tester tous les peptides possibles pour l'activité requise, contrairement aux exigences de clarté, de soutien et de divulgation suffisante.