



(86) **Date de dépôt PCT/PCT Filing Date:** 2012/09/07
(87) **Date publication PCT/PCT Publication Date:** 2013/03/14
(45) **Date de délivrance/Issue Date:** 2020/05/12
(85) **Entrée phase nationale/National Entry:** 2014/03/04
(86) **N° demande PCT/PCT Application No.:** IB 2012/054650
(87) **N° publication PCT/PCT Publication No.:** 2013/035080
(30) **Priorité/Priority:** 2011/09/08 (FR11 57979)

(51) **Cl.Int./Int.Cl.** **C12N 9/04** (2006.01),
C12N 15/52 (2006.01), **C12N 9/00** (2006.01),
C12N 9/02 (2006.01)
(72) **Inventeurs/Inventors:**
MANO, NICOLAS, FR;
COURJEAN, OLIVIER, FR;
TREMEY, EMILIE, FR;
GOUNEL, SEBASTIEN, FR
(73) **Propriétaire/Owner:**
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE, FR
(74) **Agent:** ROBIC

(54) **Titre : MUTANTS DE LA GLUCOSE OXYDASE DE PENICILLIUM AMAGASAKIENSE**
(54) **Title: PENICILLIUM AMAGASAKIENSE GLUCOSE OXIDASE MUTANTS**

(57) **Abrégé/Abstract:**

La présente invention se rapporte à des mutants de l'enzyme glucose oxydase (GOx) de *Penicillium amagasakiense* utiles pour le dosage du glucose et à la mise au point notamment d'électrodes à glucose et de biopiles utilisant le glucose comme combustible.

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

(19) Organisation Mondiale de la
Propriété Intellectuelle
Bureau international



(43) Date de la publication internationale
14 mars 2013 (14.03.2013)

WIPO | PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 2013/035080 A1

(51) Classification internationale des brevets :

C12N 9/04 (2006.01) C12N 9/02 (2006.01)
C12N 15/52 (2006.01) C12N 9/00 (2006.01)

(21) Numéro de la demande internationale :

PCT/IB2012/054650

(22) Date de dépôt international :

7 septembre 2012 (07.09.2012)

(25) Langue de dépôt :

français

(26) Langue de publication :

français

(30) Données relatives à la priorité :

11 57979 8 septembre 2011 (08.09.2011) FR

(71) Déposant (pour tous les États désignés sauf US) :
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE [—/FR]; 3, rue Michel Ange, F-75016 Paris (FR).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement) : **MANO, Nicolas** [FR/FR]; 32, rue Sicard, F-33400 Talence (FR). **COURJEAN, Olivier** [FR/FR]; 45 rue Sainte Lucie, F-33000 Bordeaux (FR). **TREMEY, Emilie** [FR/FR]; 97 rue Roustaing, F-33400 Talence (FR). **GOUNEL, Sébastien** [FR/FR]; 7 lieu dit Bidaouat, F-33124 Berthez (FR).

(74) Mandataires : **BERNSTEIN, Claire** et al.; 36 rue de St Pétersbourg, F-75008 Paris (FR).

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

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

Publiée :

- avec rapport de recherche internationale (Art. 21(3))
- avec la partie de la description réservée au listage des séquences (règle 5.2.a))

(54) Title : *PENICILLIUM AMAGASAKIENSE* GLUCOSE OXIDASE MUTANTS

(54) Titre : MUTANTS DE LA GLUCOSE OXYDASE DE *PENICILLIUM AMAGASAKIENSE*

(57) Abstract : The present invention relates to mutants of the *Penicillium amagasakiense* glucose oxidase (GOx) enzyme which are of use for assaying glucose and to the development in particular of glucose electrodes and of biocells which use glucose as fuel.

(57) Abrégé : La présente invention se rapporte à des mutants de l'enzyme glucose oxydase (GOx) de *Penicillium amagasakiense* utiles pour le dosage du glucose et à la mise au point notamment d'électrodes à glucose et de biopiles utilisant le glucose comme combustible.



WO 2013/035080 A1

MUTANTS DE LA GLUCOSE OXYDASE DE *PENICILLIUM AMAGASAKIENSE*

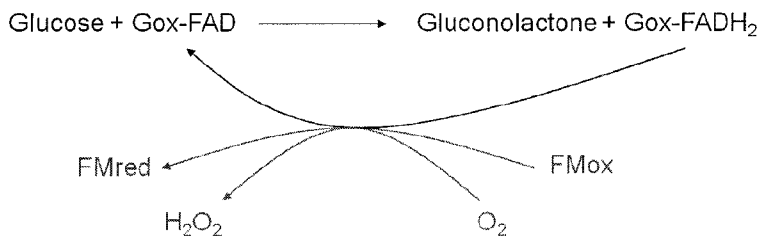
La présente invention se rapporte au domaine de la mise au point d'électrodes à glucose qui présentent un intérêt dans le dosage du glucose, en particulier du glucose sanguin de sujets diabétiques, et pour la mise en œuvre de biopiles utilisant le glucose comme combustible.

La présente invention vise plus particulièrement des mutants de l'enzyme glucose oxydase (aussi appelée GOx dans ce qui suit) de *Penicillium amagasakiense* qui présentent des propriétés avantageuses par rapport aux enzymes sauvages, en particulier celles commercialisées.

Le diabète de type 2 touche près de deux millions de personnes en France, auxquels s'ajoutent 600 000 qui ignorent leur maladie. Aux Etats-Unis, la situation est encore plus critique. Dans les pays développés, le diabète est la première cause de cécité chez les 20-65 ans.

Le suivi et la surveillance de la maladie repose, entre autres, sur le dosage quotidien du glucose sanguin et l'injection d'insuline. Différentes compagnies proposent des capteurs à glucose permettant aux patients de mesurer chez eux leur glycémie. Ces capteurs peuvent être ampérométriques, potentiométriques ou coulométriques ; ils reposent tous sur l'utilisation d'une enzyme capable d'oxyder le glucose ; les deux principales enzymes étant la glucose oxydase et la PQQ s-GDH.

La glucose oxydase (également dénommée GOx dans ce qui suit) est une enzyme oxydo-réductase (EC 1.1.3.4) qui catalyse l'oxydation du glucose en peroxyde d'hydrogène et en D-glucono-δ-lactone selon le schéma réactionnel suivant :



La glucose oxydase a été isolée pour la première fois chez *Aspergillus niger* ; les GOx les plus classiquement produites sont celles de *Penicillium chrysogenum*, *Penicillium glaucum*, *Penicillium purpurogenum*, *Penicillium amagasakiense*, *Aspergillus niger* et *Aspergillus fumigatus*.

Les GOx commercialisées sont le plus souvent celles d'*Aspergillus niger* et de *Penicillium amagasakiense* ; elles sont principalement utilisées dans l'industrie

alimentaire, notamment à des fins de conservation comme source de peroxyde d'hydrogène. Elles sont également utilisées pour le dosage du glucose ou dans des biopiles à glucose. Ces deux enzymes ont notamment été étudiées et comparées dans l'article de Wohlfahrt *et al.* (Acta. Cryst (1999) D55, 969-977).

5 S'agissant de la GOx de *Penicillium amagasakiense*, Witt *et al.* ont décrit son clonage et son expression par *Escherichia coli* (Applied and Environmental Microbiology (1998) vol. 64, n°4, 1405-1411).

L'inconvénient des glucose oxydases actuellement disponibles est leur sensibilité à l'O₂ qui intervient comme accepteur d'électrons dans la réaction catalysée par la GOx. En effet, l'oxygène est le co-facteur naturel des GOx et permet leur réoxydation après l'oxydation du glucose. Lors de l'utilisation de ces enzymes dans des capteurs à glucose, il existe donc une compétition pour récupérer les électrons de l'enzyme entre l'oxygène et les médiateurs redox qui assurent la connexion électrique de l'enzyme à la surface des électrodes.

15 En outre, pour leur utilisation dans des capteurs à glucose, il est nécessaire de disposer de mutants GOx plus actifs, c'est-à-dire qui permettent une réaction de transformation de glucose en D-gluconolactone plus rapide qu'avec les enzymes existantes.

Il demeure ainsi nécessaire d'améliorer les propriétés des GOx existantes.

C'est ce à quoi sont parvenus les Inventeurs en mettant au point de nouveaux mutants de la GOx sauvage de *Penicillium amagasakiense*.

Par mutant ou variant, on entend une GOx dont la séquence protéique comprend l'insertion, la délétion et/ou la substitution d'au moins un acide aminé par rapport à la séquence protéique de la GOx sauvage ; par la suite, les séquences nucléotidique et protéique de référence de la GOx sont celles de la GOx sauvage de *Penicillium amagasakiense* (respectivement SEQ. ID. N°1 et 2).

Les mutants selon la présente invention sont tels que la valine située en position 564 est substituée par une sérine (mutant dit V564S), une thréonine (mutant dit V564T) ou une isoleucine (mutant dit V564I) ; lorsque ladite valine est substituée par une sérine, les mutants tels que la lysine en position 424 est substitué par un acide glutamique, la glutamine, la méthionine et la leucine sont également des objets de la présente invention

(mutants dits respectivement V564S+K424E, V564S+K424Q, V564S+K424M et V564S+K424L).

Ainsi, un premier objet de l'invention se rapporte à un mutant GOx présentant un pourcentage d'identité d'au moins 95%, et par ordre de préférence croissant au moins 85%, 90%, 95%, 97%, 98% et 99%, par rapport à la GOx sauvage de *Penicillium amagasakiense*, caractérisé en ce que son acide aminé situé en position 564, en référence à la séquence protéique de la GOx sauvage de *Penicillium amagasakiense* (SEQ. ID. N°2), est substitué par un acide aminé sélectionné dans le groupe constitué par une sérine (mutant dit V564S), une thréonine (mutant dit V564T) et une isoleucine (mutant dit V564I) , et en ce qu'il présente une sensibilité à l'oxygène réduite par rapport à la GOx de SEQ. ID. N°2.

Selon une variante particulière, le mutant V564S comporte également une substitution de la lysine en position 424 par un acide glutamique, la glutamine, la méthionine ou la leucine (mutants dits respectivement V564S+K424E, V564S+K424Q, V564S+K424M et V564S+K424L).

La numérotation des acides aminés se réfère à la séquence de la GOx sauvage de *Penicillium amagasakiense*.

L'identité d'une séquence par rapport à la séquence de la GOx sauvage de *Penicillium amagasakiense* (SEQ. ID. N°2) comme séquence de référence s'apprécie en fonction du pourcentage de résidus d'acides aminés qui sont identiques, lorsque les deux séquences sont alignées, de manière à obtenir le maximum de correspondance entre elles.

Le pourcentage d'identité peut être calculé par l'homme du métier en utilisant un programme informatique de comparaison de séquences tel que, par exemple celui de la suite BLAST (Altschul *et al* , NAR, 25, 3389-3402). Les programmes BLAST sont mis en œuvre sur la fenêtre de comparaison constituée de la totalité de la SEQ. ID. N°2 indiquée comme séquence de référence.

Un peptide ayant une séquence en acides aminés ayant au moins X% d'identité avec une séquence de référence est défini, dans la présente invention comme un peptide dont la séquence peut inclure jusqu'à 100-X altérations pour 100 acides aminés de la séquence de référence, tout en conservant les propriétés fonctionnelles dudit peptide de référence, en l'occurrence son activité enzymatique d'oxydation du glucose. Au sens de la présente invention, le terme altération inclut les délétions, les substitutions ou les insertions consécutives ou dispersées d'acides aminés dans la séquence de référence.

L'acide aminé correspondant à l'acide aminé situé en position 564 de la GOx sauvage de *Penicillium amagasakiense* est identifié par alignement de la séquence de ladite enzyme homologue avec la GOx de *Penicillium amagasakiense*.

Un objet particulier de l'invention se rapporte à un mutant GOx ayant
 5 une séquence en acides aminés choisie parmi les SEQ. ID. N° 4, 6, 8, 10, 22, 24 et 26, correspondants respectivement aux séquences en acides aminés des mutants V564S, V564T, V564I, V564S+K424E, V564S+K424Q, V564S+K424M et V564S+K424L de la GOx ; ces enzymes mutées sont codées par des fragments nucléotidiques obtenus par mutation du gène de la GOx sauvage de *Penicillium amagasakiense* avec des paires
 10 d'oligonucléotides adaptées.

Ces nouveaux mutants GOx selon l'invention présentent des performances améliorées par rapport à l'enzyme sauvage d'*Aspergillus niger* qui est l'enzyme utilisée dans les capteurs de glucose du commerce.

Plus particulièrement, les propriétés améliorées des mutants selon
 15 l'invention résident dans une moindre sensibilité à l'oxygène : en solution en présence de 1 mM de glucose et sous air, les mutants sont 17 fois moins sensibles à l'oxygène que la GOx d'*A. niger*. Une fois adsorbés à la surface d'électrodes, sous 1 atm O₂ et à 1 mM de glucose, les mutants sont 70% moins sensibles à l'O₂.

Les propriétés avantageuses des mutants GOx selon l'invention rendent
 20 leur utilisation particulièrement adaptée à des systèmes bioélectriques tels que des biopiles utilisant le glucose comme source d'énergie et des biocapteurs de glucose.

La présente invention se rapporte également à une molécule d'acide nucléique codant pour un mutant GOx selon l'invention ; ladite molécule d'acide nucléique étant obtenue par modification d'une GOx sauvage, telle que celle de *Penicillium*
 25 *amagasakiense*, avec une paire d'oligonucléotides sélectionnée dans le groupe constitué des paires d'oligonucléotides représentées dans le Tableau I.

Tableau I: liste et séquence des oligonucléotides utilisés pour la préparation des mutants GOx selon l'invention.

Oligonucléotides	séquences
Paire d'oligonucléotides correspondant à l'enzyme sauvage	
Sens	5'-g gtg tct tcc cat gtc atg acc att ttc tac gg-3' (SEQ. ID. N°11)
Anti-sens	5'- cc gta gaa aat ggt cat gac atg gga aga cac c-3' (SEQ. ID. N°12)

Paire d'oligonucléotides utilisés pour la préparation du mutant V564S	
Sens	5'- g gtg tct tcc cat tcc atg acc att ttc tac gg-3' (SEQ. ID. N°13)
Anti-sens	5'- cc gta gaa aat ggt cat gga atg gga aga cac c-3' (SEQ. ID. N°14)
Paire d'oligonucléotides utilisés pour la préparation du mutant V564T	
Sens	5'- g gtg tct tcc cat acc atg acc att ttc tac gg-3' (SEQ. ID. N°15)
Anti-sens	5'- cc gta gaa aat ggt cat ggt atg gga aga cac c-3' (SEQ. ID. N°16)
Paire d'oligonucléotides utilisés pour la préparation du mutant V564I	
Sens	5'- g gtg tct tcc cat att atg acc att ttc tac gg-3' (SEQ. ID. N°17)
Anti-sens	5'- cc gta gaa aat ggt cat aat atg gga aga cac c-3' (SEQ. ID. N°18)
Paire d'oligonucléotides utilisés pour la préparation de la mutation K424E du mutant V564S-K424E (cette mutation est réalisée après la mutation V564S)	
Sens	5'- ggacaccgagggcgagatcaactcg-3' (SEQ. ID. N°19)
Anti-sens	5'- cgaagttgatctcgccctcggtgcc-3' (SEQ. ID. N°20)
Paire d'oligonucléotides utilisés pour la préparation de la mutation K424Q du mutant V564S-K424Q (cette mutation est réalisée après la mutation V564S)	
Sens	5'-ggacaccgagggccagatcaactcgatttatg-3' (SEQ. ID. N°27)
Anti-sens	5'-cataaatcgaagttgatctggccctcggtgtcc-3' (SEQ. ID. N°28)
Paire d'oligonucléotides utilisés pour la préparation de la mutation K424M du mutant V564S-K424M (cette mutation est réalisée après la mutation V564S)	
Sens	5'-ggacaccgagggcatgatcaactcgatttatg-3' (SEQ. ID. N°29)
Anti-sens	5'-cataaatcgaagttgatcatgccctcggtgtcc-3' (SEQ. ID. N°30)
Paire d'oligonucléotides utilisés pour la préparation de la mutation K424L du mutant V564S-K424L (cette mutation est réalisée après la mutation V564S)	
Sens	5'-ggacaccgagggccttgatcaactcgatttatg-3' (SEQ. ID. N°31)
Anti-sens	5'-cataaatcgaagttgatcaagccctcggtgtcc-3' (SEQ. ID. N°32)

Les molécules d'acide nucléique codant pour les mutants GOx selon l'invention peuvent être notamment préparées en modifiant la séquence nucléotidique du gène codant pour l'enzyme sauvage de séquence SEQ. ID. N°1 produite par *Penicillium amagasakiense*. Plusieurs techniques permettant la modification de la séquence du gène sont connues de l'homme du métier (voir la revue de Igarashi *et al.*, Archives of Biochemistry and Biophysics 428 (2004) 52-63). Selon un mode particulier de préparation, les molécules d'acide nucléique codant pour les mutants GOx selon l'invention sont préparées par mutagenèse par PCR en présence d'un oligonucléotide portant la mutation à introduire (voir la partie expérimentale, point 2.5 ci-après).

Selon un mode de réalisation particulier, la présente invention se rapporte à une molécule d'acide nucléique codant pour un mutant GOx selon l'invention dont la

séquence est sélectionnée dans le groupe constitué des séquences SEQ. ID. N°3, 5, 7, 9, 21, 23 et 25. Les molécules d'acide nucléique codant pour les mutants GOx selon l'invention peuvent alors être clonées dans un vecteur d'expression tel qu'un plasmide, puis transformé dans un hôte approprié tel qu'une bactérie, une levure ou encore une culture
5 cellulaire.

Par vecteur d'expression, on entend un vecteur possédant une région permettant l'insertion d'une séquence nucléotidique codante entre les signaux indispensables à son expression, notamment, un promoteur (constitutif ou inductible), un site de fixation des ribosomes, un signal de terminaison de transcription et, éventuellement,
10 un marqueur de sélection tel qu'un gène de résistance à un antibiotique.

La présente invention se rapporte encore à un vecteur d'expression comprenant ladite molécule d'acide nucléique et à une cellule hôte transformée avec ledit vecteur d'expression et exprimant un mutant GOx selon l'invention.

L'introduction du vecteur d'expression dans la cellule hôte peut être
15 réalisée par toute méthode connue de l'homme du métier, en particulier, par modification de la perméabilité membranaire de la cellule hôte, par exemple en présence d'ions calcium, ou par électroporation.

Après culture des cellules hôtes transformées pour exprimer un mutant GOx selon l'invention, lesdites cellules peuvent être récupérées par centrifugation, lysées
20 afin de libérer les enzymes dont ledit mutant GOx selon l'invention.

Si *Escherichia coli* est le micro-organisme hôte, les plasmides qui peuvent être utilisés sont notamment les plasmides pET24a, pBluescript, pUC18 ou similaires.

A titre d'exemple, les cellules hôtes qui peuvent être utilisées
25 comprennent d'*Escherichia coli* BL₂₁, *Escherichia coli* W3110, *Escherichia coli* C600, *Escherichia coli* JM109, *Escherichia coli* JM101, *Escherichia coli* DH5α...

De préférence, les mutants GOx selon l'invention sont produits dans une souche d'*Escherichia coli* BL₂₁ ; la molécule d'acide nucléique qui les code est obtenue par modification du gène de la GOx de *Penicillium amagasakiense* et clonée dans le
30 vecteur pET24a. Les mutants ainsi produits sont exportés dans le périplasme de la bactérie grâce à la séquence signal de la GOx. Les mutants ainsi produits sont exportés dans les corps d'inclusion de la bactérie. Les mutants sont ensuite purifiés après rupture des bactéries par lyse cellulaire en présence d'urée 8M.

L'invention se rapporte également à l'utilisation d'un mutant GOx selon l'invention pour doser le glucose en solution, c'est-à-dire mesurer la concentration en glucose dans un échantillon, notamment un échantillon biologique, en particulier, dans du sang.

5 Le dosage en solution du glucose dans un échantillon biologique donné peut être réalisé en introduisant dans ledit échantillon un réactif d'oxydoréduction et un mutant GOx selon l'invention puis en comparant l'intensité de la coloration obtenue avec des solutions standards ayant une teneur en glucose connue.

10 La présente invention se rapporte également à un kit de dosage en solution du glucose caractérisé en ce qu'il comprend un mutant GOx selon l'invention.

Typiquement, ledit kit de dosage contient en outre les réactifs nécessaires à la mise en œuvre du test de dosage du glucose, en particulier, les tampons ; tout tampon peut être utilisé dans le kit selon l'invention, on peut citer sans caractère limitatif les tampons phosphates, actétates, tampon au trishydroxyméthylaminométhane (TRIS), à 15 l'acide N-morpholino-3-propane sulfonique (MPOS), à l'acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique (HEPES), tampon comprenant un mélange de tampons tel que TRIS-acétate..., les réactifs d'oxydoréduction peuvent être tout réactif permettant d'oxyder le mutant GOx, ils peuvent être sélectionnés dans le groupe constitué par du méthosulfate de phénazine (PMS) en combinaison avec le 2,6-dichlorophénolindophénol (DCIP) ; du 20 ferricyanure de potassium ; du ferrocène et des complexes dérivés du ferrocène tels que ferrocèneméthanol, ferrocène carboxylique acide ; et des complexes d'osmium et de ruthénium, les solutions standard de glucose permettant la réalisation de courbes d'étalonnage, et les instructions d'utilisation nécessaires pour effectuer le dosage.

La présente invention se rapporte encore à des électrodes à glucose 25 comprenant un matériau conducteur tel qu'un métal conducteur, notamment, du platine, du cuivre, de l'argent, de l'aluminium, de l'or ou de l'acier ou du carbone, comme du carbone vitreux, des fibres de carbone, des fibres de nanotubes de carbone ou encore en diamant... ledit matériau conducteur est recouvert d'un dépôt comprenant au moins un mutant GOx selon l'invention ; ledit dépôt pouvant en outre comprendre un polymère redox pour 30 améliorer les propriétés conductrices du matériau conducteur.

Le polymère redox est choisi parmi les polymères à base de ferrocène, d'osmium et de ruthénium et les polymères conducteurs tels que le polypyrrole et la polyananiline.

Les méthodes d'immobilisation du mutant GOx sur ledit matériau conducteur peuvent être choisies parmi les méthodes classiques à la disposition de l'homme du métier qui comprennent notamment l'inclusion du mutant GOx dans une matrice polymérique, l'adsorption du mutant GOx à la surface de la membrane polymérique, la fixation par liaison covalente ou encore l'électrodéposition (Gao *et al.*,
5 Chem. Int. ED. 2002, 41, N°5, 810-813).

De telles électrodes sont avantageusement utilisées dans des systèmes bioélectriques tels que des biopiles à glucose ou des biocapteurs de glucose.

La présente invention se rapporte ainsi également à un biocapteur de
10 glucose comprenant une électrode selon l'invention.

Un biocapteur de glucose est constitué d'une électrode sur laquelle est immobilisé un biorécepteur capable de reconnaître une cible biologique ; la fixation de la cible biologique sur le biorécepteur conduit à des modifications physico-chimiques de la membrane et la production d'un signal électrique par un transducteur électrochimique
15 (ampérométrique, potentiométrique, conductimétrique,...) accolé à l'électrode ; dans le cas présent le biorécepteur est un mutant GOx selon l'invention et la cible biologique est son substrat : le glucose.

Selon une variante de réalisation, l'électrode sur laquelle est immobilisée le mutant GOx est également recouverte d'une membrane qui évite le détachement dudit
20 mutant de l'électrode. Ladite membrane peut être constituée de nafion, de cellulose ou de tout matériau biocompatible, c'est-à-dire compatible avec un environnement physiologique.

Selon une variante de l'invention, le biocapteur de glucose est implanté sous la peau et permet d'enregistrer la concentration en glucose du sang.

25 La présente invention se rapporte également à des biopiles utilisant du glucose comme source d'énergie et comprenant une première électrode selon l'invention à titre d'anode et une seconde électrode à titre de cathode. La cathode peut être, par exemple, une électrode enzymatique qui permet de réduire l'oxygène portant une enzyme choisie dans la classe des enzymes à base de cuivre (multi coppers oxydases) et particulièrement la
30 bilirubine oxydase et la laccase. Il peut également s'agir d'une électrode métallique, par exemple en platine, en or ou en un alliage de platine ou d'or.

La **Figure 1** illustre plus spécifiquement une biopile enzymatique à glucose ; une telle biopile enzymatique consiste en deux électrodes modifiées par

l'immobilisation d'enzymes. Une glucose oxydase (GOx) est fixée sur l'anode (1) par l'intermédiaire d'un polymère conducteur « I » et une bilirubine oxydase (BOD) est fixée sur la cathode (2) par l'intermédiaire d'un polymère conducteur « II ». En fonctionnement, à l'anode, les électrons sont transférés du glucose présent dans le fluide physiologique vers la GOx, puis de la GOx au polymère conducteur « I » et du polymère conducteur « I » vers l'anode. A la cathode, les électrons sont transférés de la cathode vers le polymère conducteur « II », puis vers la BOD et enfin de la BOD à l'oxygène présent dans le fluide physiologique.

Il est à noter qu'une biopile peut aussi éventuellement fonctionner en modifiant les électrodes avec leurs enzymes respectives et en rajoutant des médiateurs solubles, tels que le ferrocène-méthanol pour l'anode et le ferricyanure de potassium pour la cathode, et en rajoutant le cas échéant une membrane séparant l'anode et la cathode.

L'invention se rapporte encore à un procédé de dosage en solution du glucose dans un échantillon comprenant les étapes suivantes :

- a) introduction dans ledit échantillon d'un réactif d'oxydoréduction dont la réduction conduit à un changement de couleur et d'un mutant GOx selon l'invention ;
- b) mesure de l'intensité de la coloration de l'échantillon après réaction enzymatique ;
- c) comparaison de l'intensité de coloration mesurée à l'étape b) avec l'intensité mesurée pour des solutions standards ayant une teneur en glucose connue ;
- d) détermination de la concentration en glucose dudit échantillon basée sur la comparaison faite à l'étape c).

Le réactif d'oxydoréduction dont la réduction conduit à un changement de couleur est choisi parmi le phénazine méthosulfate (PMS) en combinaison avec le 2,6-dichlorophénolindophénol (DCIP), le ferricyanure de potassium, et le ferrocène.

L'invention se rapporte également à un procédé de dosage du glucose d'un échantillon, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

- a) introduction dans ledit échantillon d'une électrode à glucose selon l'invention ;
- b) mesure de l'intensité du courant dans l'échantillon ;
- c) comparaison de l'intensité du courant mesurée à l'étape b) avec l'intensité mesurée pour des solutions standards ayant une teneur en glucose connue ;

d) détermination de la concentration en glucose dudit échantillon basée sur la comparaison faite à l'étape c).

Outre les dispositions qui précèdent, l'invention comprend encore d'autres dispositions qui ressortiront de la description qui va suivre, qui se réfèrent à des
 5 exemples de mise en œuvre de la présente invention, ainsi qu'aux figures annexées dans lesquelles :

Figures

La **Figure 1** représente schématiquement une biopile.

La **Figure 2** représente la carte plasmidique du vecteur pET24a-GOx-
 10 penag-wt-His.

La **Figure 3** est un graphe illustrant l'activité spécifique en U/mg des GOx sauvage et mutantes de *Penicillium amagasakiense*.

La **Figure 4** est un graphe représentant le rapport Activité Ferrocéneméthanol / Activité Oxygène.

La **Figure 5** montre une comparaison de l'activité spécifique des GOx
 15 sauvage et mutantes avec le glucose et le xylose.

La **Figure 6** est un graphe représentant l'évolution du courant d'oxydation du glucose en fonction de la concentration de glucose.

La **Figure 7** est un graphe représentant l'évolution du ratio courant
 20 d'oxydation du glucose sous oxygène divisé par le courant sous Argon en fonction de la concentration en glucose.

1. Matériels

1.1 Souches bactériennes d'*Escherichia coli*

DH5 α : *supE44*, Δ *lacU169*, (Φ 80 *lacZ*M15), *hsdR17*, *recA1*, *endA1*,
 25 *gyrA96*, *thi-1*, *relA1* (Hanahan, 1983). Cette souche est utilisée pour l'amplification de plasmide lors des étapes de construction des vecteurs d'expression protéiques.

BL21 : F- *ompT hsdSB*(rB-, mB-) *gal dcm* (DE3) (Invitrogen). Cette souche est utilisée pour la production en flacon Erlenmeyers de la GOx de *Penicillium Amagasakiense* (*penag*). Cette souche est alors transformée par le plasmide pET24a qui
 30 contient la séquence d'ADN codant pour la GOx de *Penicilium Amagasakiense* sous la dépendance du promoteur T7 dans le vecteur pET24a.

1.2 Vecteur

pET24a : Plasmide pET24a contenant la séquence ADN codant pour la GOx de *Penicillium Amagasakiense* clonée en phase avec l'étiquette 6xHis en C-terminal (la carte de ce plasmide est représentée à la **Figure 2**).

5 1.3 Milieu de culture

Milieu riche LB :

Tryptone 10 g/l

Extrait de levure 5 g/l

NaCl 5 g/l

10 H₂O distillée qsp 1L

pH non ajusté, autoclavé pendant 50 min à 1 bar.

2. Techniques de génie génétique

2.1 Préparation des bactéries électrocompétentes

5 ml de préculture de cellule DH5 α sont inoculées dans 1 L de LB et sont
15 mises en culture à 37°C jusqu'en phase exponentielle (DO entre 0,6 et 0,8). Les cellules ainsi récoltées par centrifugation à 4000 g sont lavées successivement avec de l'eau froide milliQ® jusqu'à obtenir 2 ml de cellule devenues électrocompétentes.

2.2 Transformation des bactéries électrocompétentes

1 μ l d'ADN plasmidique est incorporé dans 40 μ l de cellules
20 électrocompétentes, placé dans une cuve d'électroporation et immédiatement transformé par l'électroporateur. 500 μ l de SOC (milieu de culture contenant 2 % tryptone, 0,5 % yeast extract, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄) sont rajoutés, incubés 5 minutes dans la glace et mis en culture 1h à 37°C. Les 500 μ L de cultures sont ensuite déposés sur boîte LB-agar et incubés sur la nuit à 37°C.

25 2.3 Préparation de l'ADN

Cette étape est réalisée à l'aide du kit QIAprep® Miniprep (Qiagen) qui permet d'extraire et de purifier l'ADN plasmidique à partir de 10 ml de culture de cellules DH5 α transformées avec le plasmide désiré. Après la collecte des cellules par centrifugation, celles-ci subissent une lyse alcaline, en présence de RNase, ainsi qu'une
30 précipitation de l'ADN génomique par l'acide acétique. L'ADN est alors éliminé par centrifugation et le surnageant déposé sur une colonne comportant une matrice de silice, permettant une adsorption sélective de l'ADN plasmidique en présence d'une forte concentration en sel. Après un lavage à l'éthanol pour éliminer les sels, l'ARN et les

protéines, l'ADN plasmidique est élué avec un tampon de faible force ionique (eau ou tampon: Tris-HCl 10 mM pH 8,5). L'ADN ainsi purifié peut être quantifié par spectrométrie UV-visible à 260 nm. Une absorbance de 1 correspond à une concentration d'ADN de 50 ng.µl⁻¹. L'ADN plasmidique purifié est stocké à -20°C.

5 2.4 Digestion de l'ADN

Pour une digestion totale, 200 à 500 ng d'ADN plasmidique sont digérés avec 0,5 µl de l'enzyme de restriction XbaI dans le tampon de réaction approprié, dans un volume final de 15 µl. La réaction se fait à 37°C pendant 1 heure.

2.5 Mutagenèse dirigée par PCR

- 10 Les mutants de la GOx V564I, V564S, V564T et V564S+K424E sont obtenus par mutagenèse dirigée. Cette méthode nécessite l'utilisation d'un plasmide double brin (le plasmide pET24a) portant le gène d'intérêt (*GOx*) ainsi que 2 oligonucléotides synthétiques dont la séquence est complémentaire au brin d'ADN à modifier, à l'exception de la mutation désirée. Ces oligonucléotides contiennent entre 25 et 45 bases, avec une
- 15 température de fusion (*T_m*) supérieure ou égale à 70°C.

$$T_m = 81,5 + 0,41 (\% \text{ GC}) - 675/N - \% (\text{non appariement})$$

- Avec *N* le nombre de bases de la séquence, % GC le pourcentage de bases G et C dans la séquence et % (non appariement) le nombre de bases mutées (valeur nulle en cas de délétion ou d'insertion de base). La séquence choisie doit contenir au moins
- 20 40 % de bases GC et se terminer par un C ou un G.

Les séquences des oligonucléotides utilisés sont présentées dans le Tableau I ci-avant.

- Dans un flacon Eppendorf® stérile, sont mélangés 10 ng de plasmide parental, 12,5 ng de chacune des amorces, 1 µl de mélange de dNTP concentrés à 10 mM,
- 25 5 µl de tampon de réaction, 1 µl de ADN polymérase *Pfu Turbo* (2,5 U.µl⁻¹) et 50 µl q.s.p d'eau stérile.

- La mutagenèse s'effectue par un enchaînement de cycles de température réalisés de manière automatique par un thermocycleur. Chaque cycle comporte 3 étapes. Dans un premier temps les 2 brins de l'ADN matrice sont séparés par dénaturation
- 30 thermique, puis les oligonucléotides s'apparient à leur séquence complémentaire sur l'ADN matrice. Ils servent d'amorces pour l'étape d'élongation, au cours de laquelle la *PfuTurbo* polymérase (une ADN polymérase thermorésistante) synthétise l'ADN complémentaire au brin parental.

Une fois cet enchaînement de cycles terminé, le produit de la réaction est traité par la *Dpn I*, une endonucléase qui digère spécifiquement l'ADN méthylé et hémiméthylé du plasmide parental. L'ADN muté est finalement introduit dans des cellules compétentes qui relient les extrémités du plasmide encore libres après la synthèse de l'ADN.

2.6 Séquençage de l'ADN double brin

L'ADN double brin est séquençé à la plateforme génomique de l'université Victor Segalen. Les réactions de séquences sont effectuées avec le kit de séquençage BigDye Terminator™ v1.1 ou v3.1. Le réactif contient les 4 ddNTPs avec différents marqueurs fluorescents (BigDyeTerminators), l'AmpliTaq® DNA Polymerase, et tous les autres composants nécessaires à la réaction. Les produits d'extension doivent être purifiés avant le passage sur séquenceur ABI 3130xl™, pour éliminer les marqueurs non incorporés, sels et autres contaminants.

3. Production et purification de l'enzyme Glucose oxydase de *Penicillium amagasakiense*

3.1 Production des enzymes GOx de type sauvage et mutées

L'enzyme GOx est produite dans la souche *E. coli* BL21 par le plasmide recombinant pET24a portant la séquence codant la GOx sauvage ou mutée. Une préculture de 2 ml de milieu LB supplémenté en kanamycine (1 X) estensemencée par un clone isolé sur boîte LB agar supplémenté en kanamycine (1 X) et laissée sous agitation, à 220 rpm, sur la nuit à 37°C. Une culture de 50 ml est alorsensemencée au 1/25^{ème} en milieu LB supplémenté en kanamycine (1 X) dans un Erlenmeyer de 250 ml. Celui-ci est incubée à 37°C sous agitation (220 rpm) jusqu'à une DO_{600nm} comprise entre 0.8 et 1 DO_{600nm} /ml. La culture est ensuite induite par 500 µM d'IPTG puis laissée sous agitation (220 rpm) à 37°C pendant 2 heures.

3.2 Préparation des extrait solubles

Les cellules récoltées par centrifugation (4500g, 4°C) sont tout d'abord lavées dans 5 ml de tampon Tris/HCl 20 mM; NaCl 100 mM; EDTA 1 mM. Les cellules récoltées par centrifugation (4500g, 4°C) sont ensuite lavées dans 5 ml de tampon Tris/HCl 20 mM; NaCl 100 mM; EDTA 1 mM contenant de l'urée à 3M afin de fragiliser la membrane des cellules. Les cellules récoltées (4500g, 4°C) sont incubées 1 heure sur la glace en présence de 5 ml de tampon Tris/HCl 20 mM; NaCl 100 mM; EDTA 1 mM

contenant de l'urée 8M permettant la lyse complète des cellules. Le surnageant est récolté après centrifugation à 4500g à 4°C puis stockées à -20°C.

3.3 Reconstitution de la GOx

Dans la bactérie *E. coli* BL21, la Glucose oxydase de *Penicillium amagasakiense* est surexprimée sous sa forme Apo, c'est-à-dire en absence de son cofacteur la Flavine Adénine Dinucléotide (FAD). Il est donc nécessaire de la reconstituer chimiquement. Pour cela les 5 ml d'extrait soluble obtenu sont ajoutés goutte à goutte sous agitation forte, afin d'éviter la précipitation des protéines, dans 500 ml d'une solution de reconstitution contenant 10% de glycérol, 1 mM de glutathion réduit, 1 mM de glutathion oxydé, 100 µM de FAD dans du tampon Tris/HCl 20 mM pH 8. Cette solution est stockée pendant 5 jours à 4°C à l'abri de la lumière.

3.4 Purification de la GOx

Chromatographie échangeuse d'anions

La solution de reconstitution, dialysée dans du tampon Acétate 20 mM pH 6 pour permettre la précipitation de la forme Apo restante, et concentrée jusqu'à 5 ml sur membrane Amicon YM10™ puis filtré sur un filtre de 0,22 µm. Cette solution est injectée sur une colonne échangeuse d'anion QFF (GE Healthcare®), couplée au système AKTA purifier (GE Healthcare®), équilibrée dans un tampon sodium acétate 20 mM pH 6. L'élution est réalisée par un gradient de 0 % à 30 % d'un tampon sodium acétate 50 mM, NaCl 250 mM, pH 3 sous un débit de 1 ml/min. Les fractions contenant la protéine GOx sont identifiées par un test d'activité à l'ABTS et sont rassemblées, concentrées et dessalées avec un tampon phosphate 100 mM pH5 par centrifugation sur membrane Amicon YM10. A ce stade, la protéine GOx est pure et peut être conservée à 4°C sous forme soluble.

4. Caractérisation des enzymes GOx de type sauvage et mutées

4.1 Mesure de la concentration

La détermination de la concentration des protéines se fait par spectroscopie UV-Visible à l'aide d'un spectrophotomètre Varian® dans un tampon phosphate 100 mM pH 5 à 25°C. Les protéines GOx purifiées présentent un spectre caractéristique entre 200 et 800 nm. La première bande à 280 nm est caractéristique de l'absorption des acides aminés aromatiques et permet d'obtenir la concentration en enzyme ($\epsilon = 263 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$). Les deux autres bandes à 380 et 461 nm sont caractéristiques du FAD intégré dans la protéine. La valeur de l'absorbance à 461 nm, permet d'obtenir la

concentration en cofacteur présent dans la protéine ($\epsilon = 12,83 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$). Le rapport entre la concentration en GOx et la concentration en FAD est égal à 2 lorsque la protéine est complètement reconstituée.

4.2 Test enzymatique

5 Les tests enzymatiques sont effectués par spectroscopie UV-Visible à l'aide d'un spectrophotomètre Varian sous air.

Les tests enzymatiques sont réalisés en présence d'un fort excès de glucose (150 mM) afin de pouvoir observer uniquement la réoxydation de la GOx par les médiateurs.

10 Deux tests enzymatiques sont réalisés. Le premier avec un mélange ABTS-HRP (Acide 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonique) – Horse radish peroxidase) pour pouvoir observer la réoxydation par l'oxygène. L'ABTS est oxydé en présence d'HRP et d' H_2O_2 . Et le second avec du Ferrocèneméthanol oxydé, afin de pouvoir observer la réoxydation de la GOx par un médiateur redox ayant un potentiel
15 redox proche de celui utilisé en électrochimie.

4.2.1 Test enzymatique ABTS-HRP

Les tests sont réalisés dans un tampon phosphate 100 mM pH 5 à 37°C dans un volume de 3 ml contenant 100 μl de HRP (60 U/ml), 24 μL d'ABTS (11,5 mg/ml) et 150 mM glucose. L'oxydation de l'ABTS est suivie à 405 nm en fonction du temps ($\epsilon =$
20 $36,8 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$). L'activité spécifique de l'enzyme est exprimée en micromole de produit apparu par mg d'enzyme (U/mg). L'enzyme est diluée à 50 nM de façon à mesurer une pente comprise entre 0,05 et 0,3 $\text{DO}_{405\text{nm}}/\text{min}$.

4.2.2 Test enzymatique Ferrocèneméthanol (FMox)

4.2.2.1 Préparation du ferrocèneméthanol

25 Dans le commerce le ferrocèneméthanol est sous forme réduite, il est donc nécessaire de l'oxyder pour pouvoir l'utiliser dans les tests enzymatiques. Pour cela 100 mg de ferrocèneméthanol réduit sont dissous dans 50 ml de tampon phosphate 50 mM pH 7,5 et placé dans une cellule d'électrolyse comprenant une électrode de travail (électrode de carbone), une électrode de référence Ag/AgCl, une contre-électrode de
30 platine placée dans un fritté contenant du tampon phosphate 50 mM pH 7,5. Le système est sous argon. L'électrolyse se fait à 0,5 V pendant 4 heures.

4.2.2.2 Test enzymatique

Les tests sont réalisés dans un tampon phosphate 50 mM pH 7,5 à 37°C dans un volume de 3 ml contenant 1 mM de FMox et 150 mM glucose. La réduction du ferrocéméthanol est suivi à 625 nm en fonction du temps ($\varepsilon = 0.413 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$). L'activité spécifique de l'enzyme est exprimée en micromole de produit apparu par mg d'enzyme (U/mg) (**Figure 3**). L'enzyme est diluée à 50 nM de façon à mesurer une pente comprise entre 0,001 et 0,1 $\text{DO}_{625\text{nm}}/\text{min}$.

On note que les quatre mutants montrent une nette diminution de l'activité vis-à-vis de l'oxygène par rapport à la GOx sauvage.

L'activité vis à vis du ferrocéneméthanol est différente selon les mutants. Ainsi le mutant V564S présente une activité plus faible, le mutant V564I présente une activité similaire, alors que le mutant V564T montre une forte augmentation de l'activité par rapport à la GOx sauvage.

Le rapport Activité FM ox / Activité ABTS permet d'obtenir la spécificité de l'enzyme vis-à-vis du substrat (ABTS ou FM ox). Plus le rapport est grand, moins l'enzyme est sensible à l'oxygène (**Figure 4**).

On remarque que les mutants V564S et V564T sont très peu sensibles à l'oxygène, ce qui en fait des bons candidats pour leur utilisation dans les systèmes électrochimiques.

Les mêmes tests enzymatiques ont été réalisés en présence de xylose (**Figure 5**) : les activités ABTS et FM ox pour le xylose sont très faibles par rapport aux activités pour le glucose. Le xylose ne rentre pas en compétition avec le glucose comme substrat pour les Glucose oxydases de *Penicillium amagasakiense* sauvage et mutantes.

5. Tests électrochimiques

A titre d'exemple, la **Figure 6** représente l'évolution du courant d'oxydation du glucose en fonction de la concentration de glucose dans un tampon PBS sous Argon et à 37°C. Chaque électrode est composée de 5% en masse de glucose oxydase, 10% en masse de réticulant et 75 % en masse de polymère rédox. La **Figure 7** représente l'évolution du ratio courant d'oxydation du glucose sous oxygène divisé par le courant sous Argon en fonction de la concentration en glucose. Cette figure montre bien une diminution de l'effet de l'oxygène sur l'oxydation du glucose lorsqu'on utilise les enzymes mutées.

REVENDICATIONS

1. Mutant de la Glucose Oxydase (GOx) présentant un pourcentage d'identité d'au moins 95%, par rapport à la GOx sauvage de *Penicillium amagasakiense*, caractérisé en ce que son acide aminé situé en position 564, en référence à la séquence protéique de la GOx sauvage de *Penicillium amagasakiense* de SEQ. ID. N°2, est substitué par un acide aminé sélectionné dans le groupe constitué par une sérine (mutant dit V564S), une thréonine (mutant dit V564T) et une isoleucine (mutant dit V564I), et en ce qu'il présente une sensibilité à l'oxygène réduite par rapport à la GOx de SEQ. ID. N°2.
2. Mutant de la GOx selon la revendication 1, caractérisé en ce que le mutant V564S comporte également une substitution de la lysine en position 424 par un acide glutamique (mutant dit V564S+K424E), la glutamine (mutant dit V564S+K424Q), la méthionine (mutant dit V564S+K424M) ou la leucine (mutant dit V564S+K424L).
3. Mutant de la GOx selon la revendication 1 ou 2, caractérisée en ce qu'il a une séquence en acides aminés sélectionnée dans le groupe constitué par les SEQ. ID. N°4, 6, 8, 10, 22, 24 et 26.
4. Molécule d'acide nucléique, caractérisée en ce qu'elle code pour le mutant GOx tel que défini selon l'une quelconque des revendications 1 à 3.
5. Molécule d'acide nucléique selon la revendication 4, caractérisée en ce qu'elle est obtenue par mutation de la molécule d'acide nucléique de séquence SEQ. ID. N°1 avec une paire d'oligonucléotides sélectionnée dans le groupe constitué par les paires de SEQ. ID. N° 13 et 14 ; 15 et 16 ; 17 et 18 ; 19 et 20 ; 27 et 28 ; 29 et 30 et 31 et 32.
6. Molécule d'acide nucléique selon la revendication 4 ou 5, caractérisée en ce qu'elle a une séquence sélectionnée dans le groupe constitué par les SEQ. ID. N°3, 5, 7, 9, 21, 23 et 25.
7. Vecteur d'expression, caractérisé en ce qu'il comprend une molécule d'acide nucléique selon l'une quelconque des revendications 4 à 6.
8. Cellule hôte exprimant le mutant de la glucose oxydase tel que défini selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisée en ce qu'elle est transformée avec un vecteur d'expression selon la revendication 7.
9. Utilisation d'un mutant GOx selon l'une quelconque des revendications 1 à 3 pour mesurer la concentration en glucose dans un échantillon.
10. Utilisation selon la revendication 9, caractérisée en ce que l'échantillon est biologique.

11. Utilisation selon la revendication 10, caractérisée en ce que l'échantillon biologique est du sang.

12. Kit de dosage du glucose caractérisé en ce qu'il comprend un mutant de la GOx selon l'une quelconque des revendications 1 à 3.

5 13. Electrode à glucose, caractérisée en ce qu'elle comprend un matériau conducteur recouvert d'un dépôt comprenant au moins un mutant de la GOx selon l'une quelconque des revendications 1 à 3.

14. Capteur de glucose, caractérisé en ce qu'il est constitué d'une électrode selon la revendication 13.

10 15. Biopile à glucose, caractérisée en ce qu'elle comprend une première électrode selon la revendication 13 à titre d'anode et une seconde électrode à titre de cathode.

16. Procédé de dosage en solution du glucose d'un échantillon, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

a) introduction dans ledit échantillon d'un réactif d'oxydoréduction dont la réduction
15 conduit à un changement de couleur et d'un mutant GOx selon l'une quelconque des revendications 1 à 3 ;

b) mesure de l'intensité de la coloration de l'échantillon après réaction enzymatique ;

c) comparaison de l'intensité de coloration mesurée à l'étape b) avec l'intensité mesurée pour des solutions standards ayant une teneur en glucose connue ;

20 d) détermination de la concentration en glucose dudit échantillon basée sur la comparaison faite à l'étape c).

17. Procédé de dosage du glucose d'un échantillon, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

a) introduction dans ledit échantillon d'une électrode à glucose selon la revendication
25 13 ;

b) mesure de l'intensité du courant dans l'échantillon ;

c) comparaison de l'intensité du courant mesurée à l'étape b) avec l'intensité mesurée pour des solutions standards ayant une teneur en glucose connue ;

d) détermination de la concentration en glucose dudit échantillon basée sur la
30 comparaison faite à l'étape c).

1/4

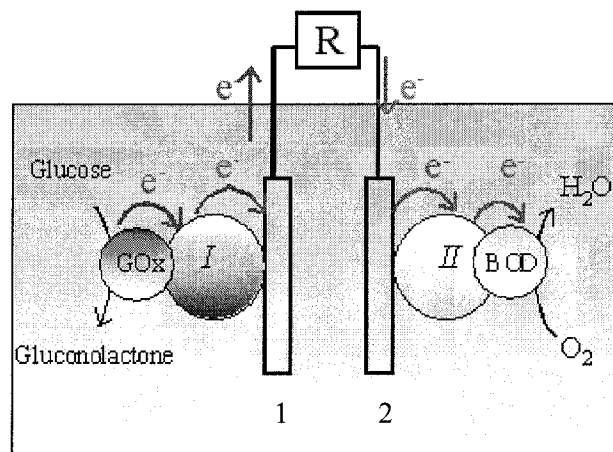


Figure 1

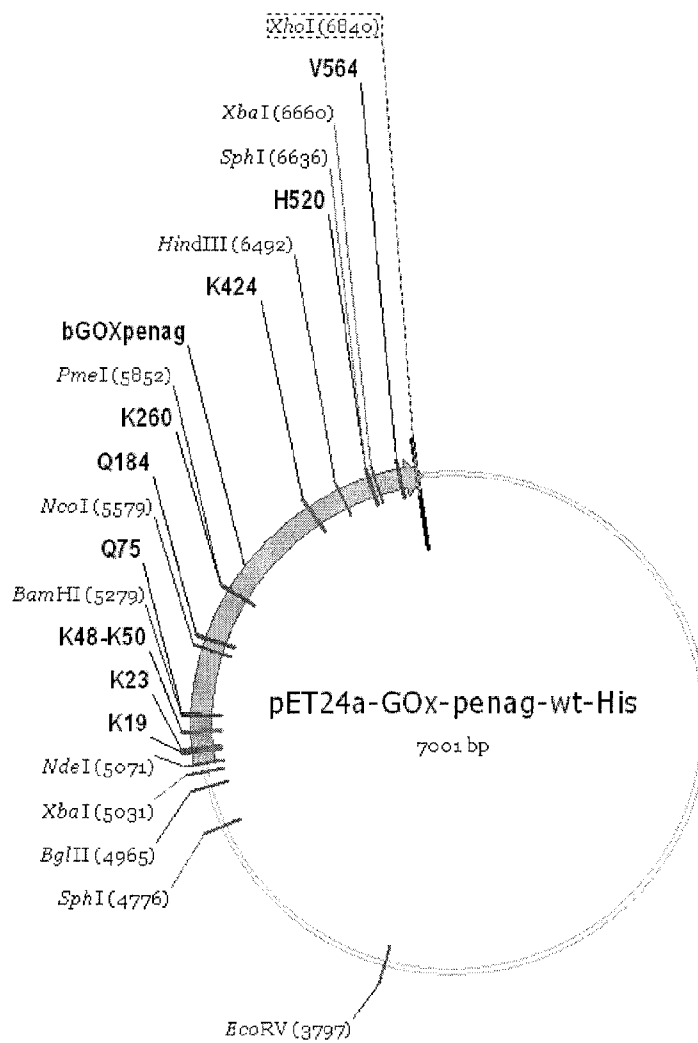
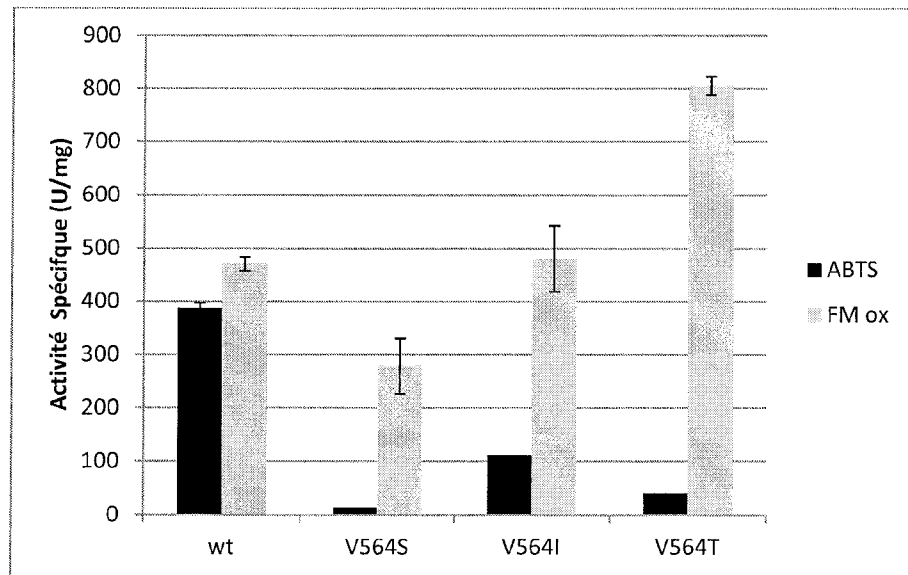
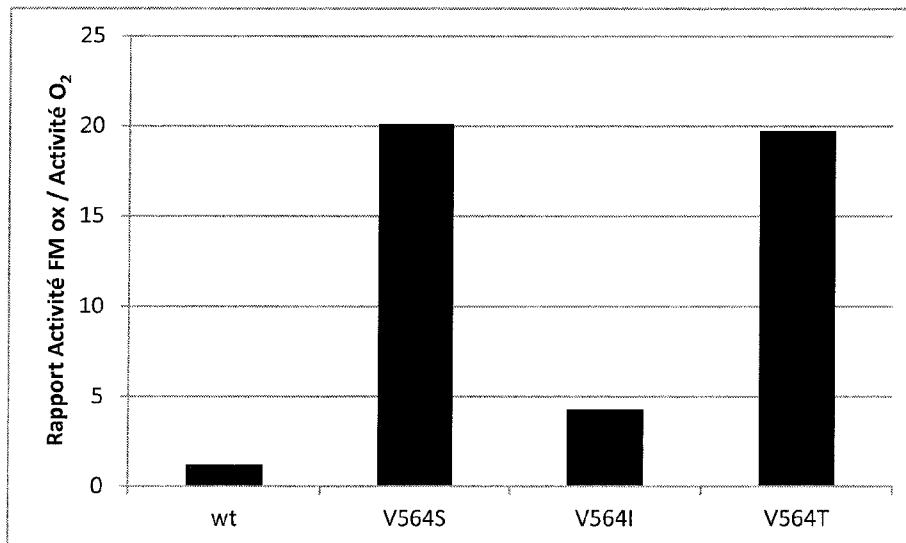


Figure 2

**Figure 3****Figure 4**

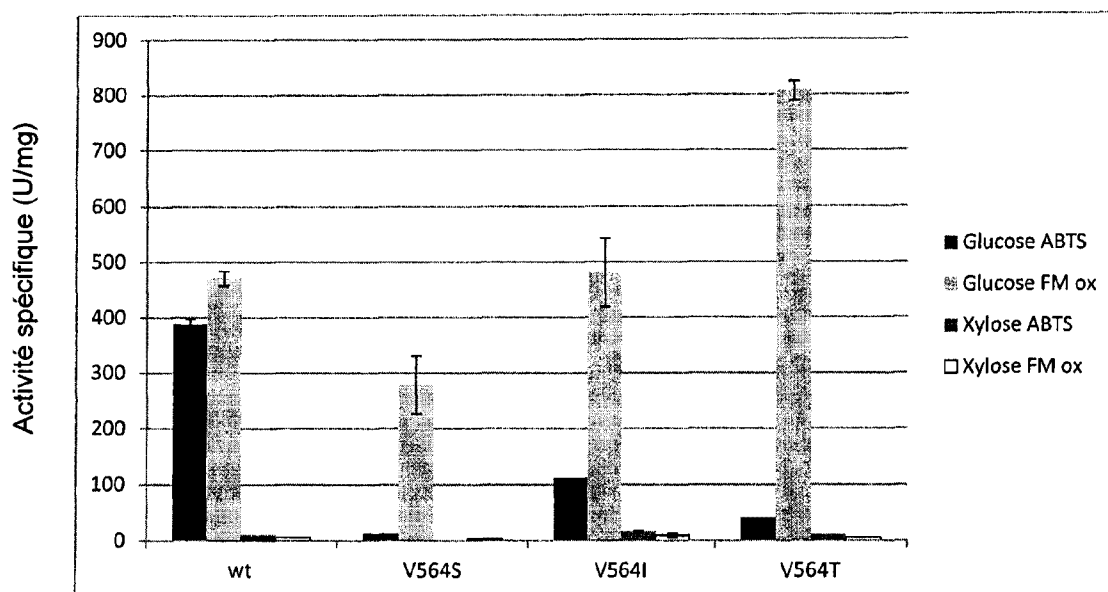


Figure 5

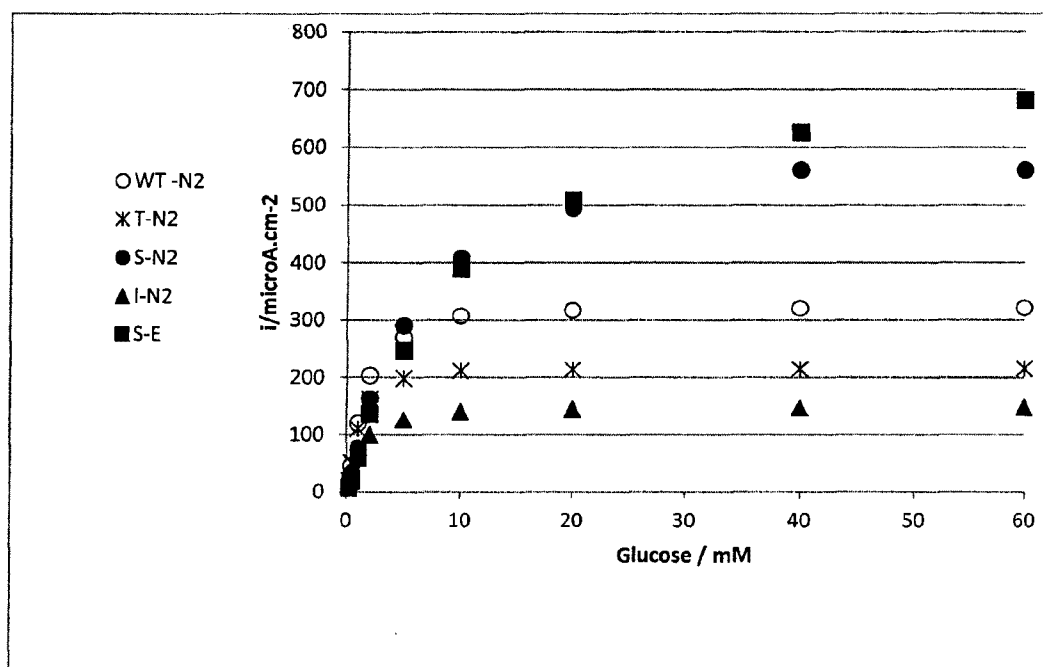


Figure 6

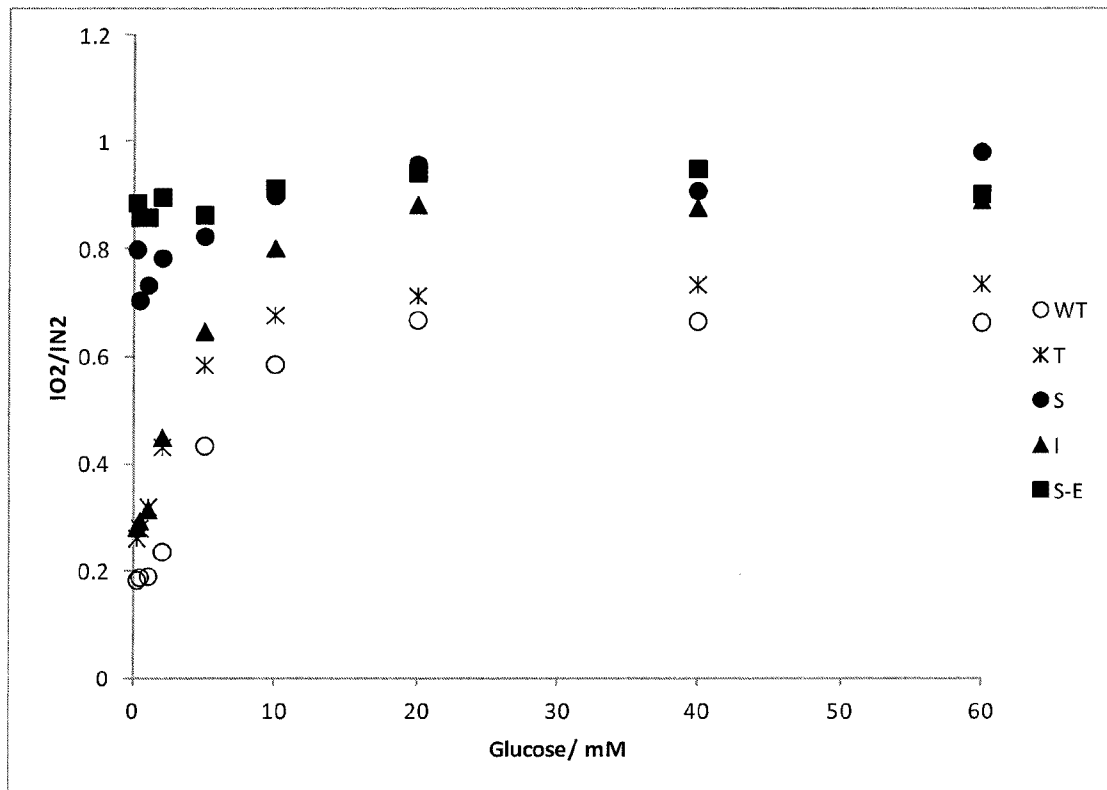


Figure 7