Office de la Propriété Intellectuelle du Canada
Un organisme d'Industrie Canada

Canadian Intellectual Property Office
An agency of Industry Canada

CA 2769558 C 2017/11/28

(11)(21) 2 769 558

(12) BREVET CANADIEN
CANADIAN PATENT

(13) C

(86) Date de dépôt PCT/PCT Filing Date: 2010/07/20
(87) Date publication PCT/PCT Publication Date: 2011/02/03
(45) Date de délivrance/Issue Date: 2017/11/28
(85) Entrée phase nationale/National Entry: 2012/01/27
(86) N° demande PCT/PCT Application No.: FR 2010/000522
(87) N° publication PCT/PCT Publication No.: 2011/012779
(30) Priorité/Priority: 2009/07/28 (FR09/03694)

(51) Cl.Int./Int.Cl. *C12N 9/04* (2006.01), *C12N 15/52* (2006.01), *C12N 15/53* (2006.01)

(72) Inventeurs/Inventors:
MANO, NICOLAS, FR;
STINES-CHAUMEIL, CLAIRE, FR;
DURAND, FABIEN, FR

(73) Propriétaire/Owner:
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE, FR

(74) Agent: ROBIC

(54) Titre : MUTANTS DE LA PYRROLOQUINOLINE QUINONE GLUCOSE DESHYDROGENASE SOLUBLE
(54) Title: MUTANTS OF PYRROLOQUINOLINE QUININE-DEPENDENT SOLUBLE GLUCOSE DEHYDROGENASE

(57) Abrégé/Abstract:
La présente invention se rapporte à de nouveaux mutants de la PQQ s-GDH comprenant une substitution de l'acide aminé situé en position 428, en référence à la séquence protéique de la PQQ s-GDH sauvage d'Acinetobacter calcoaceticus (SEQ. ID. NO : 2). L'invention se rapporte également à l'utilisation de ces mutants PQQ s-GDH pour 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 →uvre 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
3 février 2011 (03.02.2011)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 2011/012779 A1

(51) Classification internationale des brevets :
C12N 9/04 (2006.01) *C12N 15/52* (2006.01)
C12N 15/53 (2006.01)

(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/FR2010/000522

(22) Date de dépôt international :
20 juillet 2010 (20.07.2010)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :
09/03694 28 juillet 2009 (28.07.2009) FR

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

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants *(pour US seulement)* : **MANO, Nicolas** [FR/FR]; 88, rue de la République, F-33400 Talence (FR). **STINES-CHAUMEIL, Claire** [FR/FR]; 8, rue Armand Fallières, F-33400 Talence (FR). **DURAND, Fabien** [FR/FR]; 6, rue Tustal, F-33000 Bordeaux (FR).

(74) Mandataire : **CABINET ORÈS**; 36 Rue De St Petersbourg, 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, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, 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, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), européen (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, 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))*

WO 2011/012779 A1

(54) Title : MUTANTS OF PYRROLOQUINOLINE QUININE-DEPENDENT SOLUBLE GLUCOSE DEHYDROGENASE

(54) Titre : MUTANTS DE LA PYRROLOQUINOLINE QUINONE GLUCOSE DÉSHYDROGÉNASE SOLUBLE

(57) Abstract : The present invention relates to novel mutants of PQQ-sGDH containing an amino acid substitution in position 428 of the protein sequence of the wild-type PQQ-sGDH of Acinetobacter calcoaceticus (SEQ. ID. NO: 2). The invention also relates to the use of said PQQ-sGDH mutants for the development of glucose electrodes of interest in the assay of glucose, in particular of blood glucose in diabetic subjects, and for implementing biofuel cells that utilize glucose as fuel.

(57) Abrégé : La présente invention se rapporte à de nouveaux mutants de la PQQ s-GDH comprenant une substitution de l'acide aminé situé en position 428, en référence à la séquence protéique de la PQQ s-GDH sauvage d'*Acinetobacter calcoaceticus* (SEQ. ID. NO : 2). L'invention se rapporte également à l'utilisation de ces mutants PQQ s-GDH pour 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.

Mutants de la pyrroloquinoline quinone glucose déshydrogénase soluble

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 pyrroloquinoline quinone glucose déshydrogénase soluble (aussi appelée PQQ s-GDH) qui présentent des propriétés avantageuses par rapport à l'enzyme sauvage.

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.

Les pyrroloquinoline quinone glucose déshydrogénases appartiennent à la famille des quinoprotéines qui ont été identifiées chez *Acinetobacter calcoaceticus* ; il en existe deux types, l'un est une enzyme membranaire et l'autre est une enzyme soluble. Elles catalysent l'oxydation du glucose en D-gluconolactone et peuvent être utilisées comme fournisseur d'électrons.

La PQQ s-GDH d'*Acinetobacter calcoaceticus* est composée d'un homodimère constitué de deux sous-unités d'environ 50 kDa (apoenzyme) et d'un cofacteur pyrroloquinoline quinone (PQQ) (Oubrié *et al.*, J. Mol. Biol; 289, 319-333 (1999)). Cette enzyme comporte un site actif au sein duquel l'oxydation du glucose est catalysée en présence de PQQ ; ce site actif est composé des acides aminés situés aux positions 76, 144, 169, 343, 346 et 428.

La PQQ s-GDH présente un grand intérêt au niveau industriel car elle est facile à obtenir en grande quantité ; elle est ainsi devenue la principale enzyme utilisée dans les capteurs à glucose pour l'auto-surveillance glycémique. L'avantage des

quinoprotéines est leur indépendance vis-à-vis de l'oxygène, contrairement à la glucose oxydase qui utilise l'O_2 comme accepteur d'électrons.

Sur la base de ses propriétés physico-chimiques, il est également envisageable d'utiliser la PQQ s-GDH pour la préparation de pile à biocombustibles dont le principe repose sur l'oxydation du glucose pour produire un courant électrique.

L'inconvénient de la PQQ s-GDH est sa faible stabilité en température, sa faible stabilité aux pH physiologiques et son activité modérée.

Plusieurs auteurs ont cherché à mettre au point des variants de la PQQ s-GDH afin d'améliorer ses propriétés.

Par mutant ou variant, on entend une PQQ s-GDH 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 PQQ s-GDH sauvage ; par la suite, les séquences nucléotidique et protéique de référence de la PQQ s-GDH sont celles de la PQQ s-GDH sauvage d'*Acinetobacter calcoaceticus* (respectivement SEQ. ID. N°1 et 2).

- <u>Mutations visant à améliorer la stabilité de la PQQ s-GDH</u>

Le Brevet US 7,244,600 décrit une PQQ s-GDH mutée de telle sorte que les deux sous-unités sont reliées entre elles par un pont disulfure. La mutation consiste à remplacer au moins un acide aminé aux positions 415 et 414 et/ou simultanément les deux acides aminés situés aux positions 340 et 418 par un résidu cystéine. Ces modifications confèrent à l'enzyme une meilleure stabilité thermique.

- <u>Mutation visant à rendre la PQQ s-GDH moins sensible à l'inhibition par son substrat</u>

Le Brevet US 7,244,581 décrit une PQQ s-GDH dans laquelle au moins un acide aminé de la région 349-377 est remplacé par un acide aminé différent. Cette modification conduit à une enzyme qui est moins sensible à l'inhibition par le substrat et peut ainsi être utilisée en présence de fortes concentrations en glucose.

- <u>Mutations visant à rendre la PQQ s-GDH plus spécifique à son substrat naturel (le glucose)</u>

Il est également possible de modifier la PQQ s-GDH sauvage pour la rendre plus spécifique au substrat. Une enzyme spécifique à un substrat ne catalysera que la réaction impliquant ledit substrat, a contrario, une enzyme peu spécifique au substrat est susceptible de catalyser des réactions à partir de substrats structurellement proches du substrat naturel. Le substrat naturel de la PQQ s-GDH est le glucose mais la PQQ s-GDH

sauvage est peu spécifique et est également susceptible de catalyser l'oxydation d'autres monosaccharides et de disaccharides.

Plusieurs auteurs ont proposé de modifier la PQQ s-GDH sauvage afin de la rendre plus spécifique au glucose :

- ainsi, la Demande de Brevet US 2007/0105173 propose de modifier la PQQ s-GDH en substituant au moins un des acides aminés situés aux positions 49, 67 à 69, 76, 89, 129 à 131, 167 à 170, 174, 188, 189, 207, 215, 245, 249, 300, 341 à 343, 349, 351 et 429 et/ou en introduisant un acide aminé entre les positions 428 et 429 ;
- la Demande de Brevet EP 1 367 120 propose de modifier la PQQ s-GDH en insérant une leucine, une lysine ou une alanine entre les positions 428 et 429 ;
- le Brevet US 7,037,698 décrit une substitution de l'acide aminé à l'une des positions 75, 326 à 354, 278 à 320 et 162 à 197 de la PQQ s-GDH ;
- la Demande de Brevet US 2007/0243566 recommande d'insérer un acide aminé entre les positions 428 et 429 et, optionnellement, de substituer l'acide aminé en position 428 par une leucine, proline ou valine de la PQQ s-GDH ;
- la Demande Internationale WO 2006/085509 décrit des mutants de la PQQ s-GDH d'*Acinetobacter* comportant une ou plusieurs substitutions aux positions 125, 128, 142, 168, 169, 170, 224, 230, 236, 345, 351, 416 ou 428 ; ce document liste ensuite des mutants spécifiques comportant de nombreux sites mutés ;
- la Demande de Brevet EP 1 666 586 cite des mutants de la PQQ s-GDH d'*Acinetobacter baumanii* portant l'insertion d'une leucine, d'une alanine ou d'une lysine entre les positions 428 et 429 ou encore des mutants pour lesquels l'acide aminé de la position 429 est substituée par une phénylalanine, une proline, une leucine ou une tyrosine ;
- le Brevet US 7,132,270 propose de substituer les acides aminés de la position 348 par une alanine, une glycine ou une sérine et de la position 428 par une leucine, une proline ou une valine.

Pour leur utilisation dans des capteurs à glucose, il est nécessaire de disposer de mutants PQQ s-GDH plus actifs, c'est-à-dire qui permettent une réaction de transformation de glucose en D-gluconolactone plus rapide ce qui n'est pas possible avec les mutants existants.

Il demeure ainsi nécessaire de mettre au point une PQQ s-GDH qui présenterait une meilleure activité que la PQQ s-GDH sauvage tout en gardant une stabilité à la température et au pH satisfaisante voire améliorée.

Pour répondre à ce besoin, les Inventeurs ont mis au point des nouveaux mutants de la PQQ s-GDH sauvage d'*Acinetobacter calcoaceticus* ; ces mutants sont tels que l'asparagine située en position 428 est substituée par une cystéine, une tyrosine, une alanine, un aspartate ou un glutamate.

Ainsi, un premier objet de l'invention se rapporte à un mutant PQQ s-GDH présentant un pourcentage d'identité d'au moins 80% par rapport à la PQQ s-GDH sauvage d'*Acinetobacter calcoaceticus*, caractérisé en ce que son acide aminé situé en position 428, en référence à la séquence protéique de la PQQ s-GDH sauvage d'*Acinetobacter calcoaceticus* (SEQ. ID. N°2), est substitué par un acide aminé sélectionné dans le groupe constitué par une cystéine, une tyrosine, une alanine, un aspartate ou un glutamate.

Un autre objet de l'invention se rapporte à un mutant de la PQQ s-GDH d'*Acinetobacter calcoaceticus* de SEQ. ID. N°2, caractérisé en ce que son acide aminé situé en position 428 est substitué et qu'il a une séquence en acides aminés sélectionnée dans le groupe constitué par les SEQ. ID. N°4, 6, 8, 12 et 14.

Un autre objet de l'invention se rapporte à une molécule d'acide nucléique, caractérisée en ce qu'elle code pour le mutant PQQ s-GDH ci-défini.

Un autre objet de l'invention se rapporte à un vecteur d'expression, caractérisé en ce qu'il comprend la molécule d'acide nucléique ci-définie.

Un autre objet de l'invention se rapporte à une cellule hôte exprimant le mutant de la PQQ s-GDH ci-défini, caractérisée en ce qu'elle est transformée avec le vecteur d'expression ci-défini.

Un autre objet de l'invention se rapporte à l'utilisation du mutant PQQ s-GDH ci-défini pour mesurer la concentration en glucose dans un échantillon.

Un autre objet de l'invention se rapporte à un kit de dosage du glucose caractérisé en ce qu'il comprend le mutant de la PQQ s-GDH ci-défini, les réactifs nécessaires à la mise en œuvre du test de dosage du glucose et les instructions d'utilisation nécessaires pour effectuer le test de dosage.

Un autre objet de l'invention se rapporte à une électrode à glucose, caractérisée en ce qu'elle comprend un matériau conducteur recouvert d'un dépôt comprenant au moins le mutant de la PQQ s-GDH ci-défini.

Un autre objet de l'invention se rapporte à un capteur de glucose, caractérisé en ce qu'il est constitué de l'électrode ci-définie.

Un autre objet de l'invention se rapporte à une biopile à glucose, caractérisée en ce qu'elle comprend une première électrode ci-définie à titre d'anode et une seconde électrode à titre de cathode.

Un autre objet de l'invention se rapporte à un 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 conduit à un changement de couleur et du mutant PQQ s-GDH ci-défini;
b) mesure de l'intensité de la coloration dudit réactif d'oxydoréduction dans l'échantillon ;
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.

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

a) introduction dans ledit échantillon de l'électrode à glucose ci-définie;
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.

Dans le cadre de l'étude ayant conduit à la présente invention, les Inventeurs ont également préparé un mutant PQQ s-GDH caractérisé en ce que son acide aminé situé en position 428, en référence à la séquence protéique de la PQQ s-GDH sauvage d'*Acinetobacter calcoaceticus* (SEQ. ID. N°2), est substitué par une lysine (voir les exemples, partie 4) ; ce mutant a pour séquence protéique la SEQ. ID. N°10 et est codé par la molécule d'acide

nucléique de SEQ. ID. N°9. Ce mutant peut être préparé avec les oligonucléotides de SEQ. ID. N°17 et 18 présentés dans le Tableau I ci-après.

La numérotation des acides aminés se réfère à la séquence de la PQQ s-GDH sauvage d'*Acinetobacter calcoaceticus* ; les mutants PQQ s-GDH selon la présente invention ne sont cependant pas limités aux mutants de la PQQ s-GDH sauvage d'*Acinetobacter calcoaceticus*, la présente invention se rapporte également aux mutants de PQQ s-GDH présentant un pourcentage d'identité d'au moins 90% par rapport à la PQQ s-GDH sauvage d'*Acinetobacter calcoaceticus*.

L'identité d'une séquence par rapport à la séquence de la PQQ s-GDH sauvage d'*Acinetobacter calcoaceticus* (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 jusque 100-X altérations pour 100 acides aminés de la séquence de référence, tout en conservant les propriétés fonctionnelles dudit peptide de référence, en l'occurence 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 428 de la PQQ s-GDH d'*Acinetobacter calcoaceticus* est identifié par alignement de la séquence de ladite enzyme homologue avec la PQQ s-GDH d'*Acinetobacter calcoaceticus*.

Un objet particulier de l'invention se rapporte à un mutant PQQ s-GDH ayant une séquence en acides aminés choisie parmi les SEQ. ID. N° 4, 6, 8, 12 et 14, correspondants respectivement aux séquences en acides aminés des mutants cystéine, tyrosine, alanine, aspartate et glutamate de la PQQ s-GDH ; ces enzymes mutées sont codées par des fragments nucléotidiques obtenus par mutation du gène de la PQQ s-GDH d'*Acinetobacter calcoaceticus* avec des paires d'oligonucléotides adaptées.

Ces nouveaux mutants PQQ s-GDH selon l'invention présentent des performances améliorées par rapport à l'enzyme sauvage d'*Acinetobacter calcoaceticus* qui est l'enzyme utilisée dans les capteurs de glucose du commerce :

- leur activité est supérieure à celle de l'enzyme sauvage, en particulier, à des concentrations physiologiques en glucose, soit entre 1 et 10 mM ;

L'activité de l'enzyme peut être quantifiée en suivant la coloration de réactifs d'oxydoréduction survenant au cours de la réaction d'oxydation du glucose en gluconolactone par la PQQ s-GDH ; les réactifs d'oxydoréduction sont par exemple le phénazine méthosulfate (PMS) en combinaison avec le 2,6-dichlorophénolindophénol (DCIP), le ferricyanure de potassium, et le ferrocène.

- ils sont moins sensibles à l'effet inhibiteur du glucose à concentration élevée.

L'évaluation de la spécificité d'un mutant PQQ s-GDH pour un substrat peut être réalisée en comparant l'activité enzymatique dudit mutant sur le glucose et sur plusieurs autres sucres tels que des disaccharides en tant que substrat.

Les propriétés avantageuses des mutants PQQ s-GDH selon l'invention rendent 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 PQQ s-GDH selon l'invention ; ladite molécule d'acide nucléique étant obtenue par modification d'une PQQ s-GDH sauvage, telle que celle d'*Acinetobacter calcoaceticus*, 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 PQQ s-GDH selon l'invention.

Oligonucléotides	séquences
Paire d'oligonucléotides utilisés pour la préparation du mutant alanine (N428A)	
N428A_Sens	gAT ACT gCC ggA gCT gTC CAA AAA gAT (SEQ. ID. N°15)
N428A_Antisens	ATC TTT TTg gAC AgC TCC ggC AgT ATC (SEQ. ID. N°16)
Paire d'oligonucléotides utilisés pour la préparation du mutant lysine (N428K)	
N428K_Sens	gAT ACT gCC ggA AAG gTC CAA AAA gAT (SEQ. ID. N°17)
N428K_Antisens	ATC TTT TTg gAC CTT TCC ggC AgT ATC (SEQ. ID. N°18)
Paire d'oligonucléotides utilisés pour la préparation du mutant tyrosine (N428Y)	
N428Y_Sens	gAT ACT gCC ggA TAT gTC CAA AAA gAT (SEQ. ID. N°19)
N428Y_Antisens	ATC TTT TTg gAC ATA TCC ggC AgT ATC (SEQ. ID. N°20)
Paire d'oligonucléotides utilisés pour la préparation du mutant aspartate (N428D)	
N428D_Sens	gAT ACT gCC ggA gAC gTC CAA AAA gAT (SEQ. ID. N°21)
N428D_Antisens	ATC TTT TTg gAC gTC TCC ggC AgT ATC (SEQ. ID. N°22)
Paire d'oligonucléotides utilisés pour la préparation du mutant glutamate (N428E)	
N428E_Sens	gAT ACT gCC ggA gAA gTC CAA AAA gAT (SEQ. ID. N°23)
N428E_Antisens	ATC TTT TTg gAC TTC TCC ggC AgT ATC (SEQ. ID. N°24)
Paire d'oligonucléotides utilisés pour la préparation du mutant cystéine (N428C)	
N428C_Sens	gAT ACT gCC ggA TgT gTC CAA AAA gAT (SEQ. ID. N°25)
N428C_Antisens	ATC TTT TTg gAC ACA TCC ggC AgT ATC (SEQ. ID. N°26)

Les molécules d'acide nucléique codant pour les mutants PQQ s-GDH 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 *Acinetobacter calcoaceticus*. 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 Biophysocs 428 (2004) 52-63). Selon un mode particulier de préparation, les molécules d'acide nucléique codant pour les mutants PQQ s-GDH selon l'invention sont préparées par mutagénèse par PCR en présence d'un oligonucléotide portant la mutation à introduire (voir l'exemple ci-après).

Selon un mode de réalisation particulier, la présente invention se rapporte à une molécule d'acide nucléique codant pour un mutant PQQ s-GDH selon l'invention dont la séquence est sélectionnée dans le groupe constitué des séquences SEQ. ID. N°3, 5, 7, 11 et 13. Les molécules d'acide nucléique codant pour les mutants PQQ s-GDH 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 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, 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 PQQ s-GDH selon l'invention.

L'introduction du vecteur d'expression dans la cellule hôte peut être 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 PQQ s-GDH selon l'invention, lesdites cellules peuvent être récupérées par centrifugation, lysées afin de libérer les enzymes dont ledit mutant PQQ s-GDH selon l'invention.

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

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

De préférence, les mutants PQQ s-GDH selon l'invention sont produits dans une souche d'*Escherichia coli* JM101 ; la molécule d'acide nucléique qui les code est obtenue par modification du gène de la PQQ s-GDH d'*Acinetobacter calcoaceticus* et clonée dans le vecteur pUC18 (Cleton-Jansen *et al.*, Mol. Gen. Genet. 217 (1989) 430-436). Les mutants ainsi produits sont exportés dans le périplasme de la bactérie grâce à la séquence signal de la PQQ s-GDH. Les mutants sont ensuite purifiés après rupture des bactéries par sonication.

L'invention se rapporte également à l'utilisation d'un mutant PQQ s-GDH 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.

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 PQQ s-GDH selon l'invention puis en comparant l'intensité de la coloration obtenue avec des solutions standards ayant une teneur en glucose connue.

La présente invention se rapporte également à un kit de dosage en solution du glucose caractérisé en ce qu'il comprend un mutant PQQ s-GDH 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 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 PQQ s-GDH, ils peuvent être sélectionnés dans le groupe constitué par phénazine méthosulfate (PMS) en combinaison avec le 2,6-dichlorophénolindophénol (DCIP) ; du 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 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 PQQ s-GDH selon l'invention ; ledit dépôt pouvant en outre comprendre un polymère redox pour 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 polyananilline.

Les méthodes d'immobilisation du mutant PQQ s-GDH 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 PQQ s-GDH dans une matrice polymérique, l'adsorption du mutant PQQ s-GDH à la surface de la membrane polymérique, la fixation par liaison covalente ou encore l'électrodéposition (Gao *et al.*, Chem. Int. ED. 2002, 41, N°5, 810-813).

De préférence, le mutant PQQ s-GDH immobilisé est constitué de l'apoenzyme assemblée au cofacteur PQQ ; mais il est également possible d'immobiliser l'apoenzyme seule et de fournir par ailleurs, par exemple en solution dans le milieu réactionnel, le cofacteur PQQ.

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 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 (ampérométrique, potentiométrique, conductimétrique,...) accolé à l'électrode ; dans le cas présent le biorécepteur est un mutant PQQ s-GDH 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 PQQ s-GDH est également recouverte d'une membrane qui évite le détachement dudit 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.

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 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.

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 PQQ s-GDH 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.

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.

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 exemples de mise en œuvre de la présente invention, ainsi qu'aux figures annexées dans lesquelles :

Figures

Les **Figures 1A et 1B** sont des schémas représentant le site actif de la PQQ s-GDH d'*Acinetobacter calcoaceticus* sauvage (**Figure 1A**) ou mutée en position Asn428Cys (**Figure 1B**). La figure a été créée avec le logiciel PyMol (édité par DeLano Scientific LLC, version de 2006) d'après les coordonnées pdb 1cq1 décrites par Oubrie et *al.* (1999). « G » désigne le glucose et « PQQ », le coenzyme PQQ. La numérotation des résidus acides aminés du site actif correspond à la SEQ. ID. N°2.

Les **Figures 2A** à **2F** sont des graphes représentant les paramètres cinétiques à l'état stationnaire en présence de glucose ou de maltose :

- de la PQQ s-GDH d'*Acinetobacter calcoaceticus* sauvage (WT) et mutée en position 428 par une cystéine (N428C, **Figure 2A**) ;
- de la PQQ s-GDH d'*Acinetobacter calcoaceticus* mutée en position 428 par une tyrosine (N428Y, **Figure 2B**) ;
- de la PQQ s-GDH d'*Acinetobacter calcoaceticus* mutée en position 428 par une alanine (N428A, **Figure 2C**) ;
- de la PQQ s-GDH d'*Acinetobacter calcoaceticus* mutée en position 428 par une lysine (N428K, **Figure 2D**) ;
- de la PQQ s-GDH d'*Acinetobacter calcoaceticus* mutée en position 428 par un aspartate (N428D, **Figure 2E**) ;
- de la PQQ s-GDH d'*Acinetobacter calcoaceticus* mutée en position 428 par un glutamate (N428E, **Figure 2F**).

Les **Figures 3A et 3B** représentent l'activité en fonction du pH de la PQQ s-GDH d'*Acinetobacter calcoaceticus* sauvage (WT) et mutée en position 428 par une cystéine (N428C).

La **Figure 4** représente la courbe d'activité de la PQQ s-GDH sauvage (WT) et mutée par une cystéine en position 428 (N428C) en fonction de la température.

La **Figure 5** est un graphe représentant l'activité de PQQ s-GDH mutée en position 428 par une cystéine (N428C) en fonction de différents substrats.

EXEMPLES

1. Matériels

1.1. Souches bactériennes d'*Escherichia coli*

$DH_{5\alpha}$: *sup*E44, Δ*lac*U169, (Φ80 *lac*ZDM15), *hsd*R17, *rec*A1, *end*A1, *gyr*A96, *thi*-1, *rel*A1 (Hanahan, 1983). Cette souche est utilisée pour la préparation de plasmide et la mutagenèse dirigée.

JM101 : F'*traD36 proA*$^+$*B*$^+$ *lac*I^q Δ(*lacZ)M15*/Δ(*lac-proAB*) *glnV thi*. Cette souche est utilisée pour la production en batch de la PQQ glucose déshydrogénase d'*Acinetobacter calcoaceticus*. Cette souche porte le plasmide F-pro-lacI qui inhibe l'expression du promoteur lac.

1.2. Plasmide

pgp492 : don de Nora Goosen, plasmide recombinant obtenu par clonage de la séquence codante du gène de la PQQ glucose déshydrogénase soluble d'*Acinetobacter calcoaceticus* (Cleton-Jansen *et al.*, Mol. Gen. Genet. 217 (1989) 430-436).

1.3. Milieu de culture

Milieu riche LB : Tryptone 10 g/L ; Extrait de levure 5 g/L ; NaCl 5 g/L ; H_2O distillée qsp 1L ; pH non ajusté, autoclavé pendant 50 min à 1 bar.

2. Techniques de génie génétique

2.1. Transformation des bactéries supercompétentes

Les bactéries *$DH_{5\alpha}$* supercompétentes sont préparées à l'aide de la méthode d'Inoue (Sambrook and Russell (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (3rd ed.). Cold Spring Harbor Laboratory Press).

2.2. Préparation de l'ADN

Un kit de purification d'ADN plasmidique (Quiagen) est utilisé pour les préparations d'ADN en petite et grande quantité.

2.3. Séquençage de l'ADN double brin

L'ADN double brin est séquencé 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.

2.4. Mutagenèse dirigée par PCR

Dans le protocole de mutagenèse, la PCR est réalisée avec l'ADN polymérase *Pfu* de *Pyrococcus furiosus*, six fois plus fidèle que la polymérase *Taq* pour répliquer les deux brins du plasmide. Les oligodésoxyribonucléotides listés dans le Tableau I, chacun complémentaire d'un brin du plasmide, vont servir d'amorces pour la synthèse de l'ADN par l'ADN polymérase *Pfu*, ce qui conduit à un plasmide muté aux extrémités non religuées.

Le produit amplifié est ensuite traité avec l'endonucléase *Dpn* I (séquence cible 5'G^{m6}ATC-3'), spécifique de l'ADN parental et permet ainsi de sélectionner l'ADN néosynthétisé contenant la mutation. L'ADN isolé de la plupart des souches d'*E. coli* est « DAM méthylé » (DAM pour DNA adenine methylase ; indique la présence d'un méthyle sur les adénines des séquences GATC) et donc susceptible d'être digéré par *Dpn* I. Une fraction du mélange de digestion est utilisée pour transformer des bactéries $DH_{5\alpha}$ supercompétentes qui vont religuer les extrémités du plasmide muté.

3. Production, purification et caractérisation de la PQQ s-GDH d'*Acinetobacter calcoaceticus*

3.1. Production des PQQ s-GDH de type sauvage et mutées

L'apoenzyme s-GDH est produite dans la souche *E. coli* JM101 par le plasmide recombinant pgp492 portant la séquence codant le s-GDH sauvage ou mutée. Une préculture de 50 mL de milieu LB supplémenté en ampicilline (200 mg/L) (LBA) est ensemencée par un clone isolé sur boîte LB agar supplémenté en ampicilline (100 mg/mL) et laissée sous agitation, à 220 rpm, sur la nuit à 37°C. Les cultures sont ensemencées au 1/100ème en milieu LBA. Elles sont incubées à 37°C sous agitation (220 rpm) jusqu'à une DO_{600nm} comprise entre 0.4 et 1 DO_{600nm} /mL. Les cultures sont ensuite induites par 400 µM d'IPTG puis laissées sous agitation (180-220 rpm) à 25°C pendant 20H. Les cellules récoltées par centrifugation (5285 g, 4°C) sont lavées dans un tampon Tris 20 mM, $CaCl_2$ 3 mM pH 7.5 et stockées à -20°C ou à -80°C sans additif.

3.2. Purification des enzymes PQQ s-GDH de type sauvage et mutées

3.2.1. Eclatement des cellules et traitement à la DNase I

Le culot cellulaire, issu d'un litre de culture, est repris dans 20 mL de tampon Tris 20 mM, $CaCl_2$ 3 mM, pH 7.5 et soniqué sous une puissance de sonication de 40 W pendant 3 minutes par période d'une seconde d'ultrasons et d'une seconde d'arrêt. L'échantillon obtenu appelé extrait brut est complémenté par 2 mM final $MgCl_2$ et traité 30 minutes à température ambiante à la DNase I (1 U/mL d'extrait brut). L'extrait brut est ensuite débarrassé des débris cellulaires insolubles par 45 minutes de centrifugation à 20000 g.

3.2.2. Chromatographie échangeuse de cations

Le surnageant de sonication filtré sur filtre ayant un seuil de coupure de 0,22 µm (Millex-GS 0,22 µm, Millipore) et dilué à une DO_{280nm} de 10 est injectée sur une colonne échangeuse de cations source 30S (GE Healthcare®), couplée au système AKTA purifier (GE Healthcare®), équilibrée dans un tampon Tris 20 mM, $CaCl_2$ 3 mM, pH 7.5. L'élution est réalisée par un gradient de NaCl de 0 à 1 M dans le même tampon sous un débit de 5 mL/min. Les fractions contenant la protéine s-GDH sont rassemblées et concentrées par filtration par centrifugation sur membrane Amicon™ YM10. A ce stade, la protéine s-GDH est pure et peut être conservée à -20°C sous forme précipitée en présence de sulfate d'ammonium (90% de saturation).

3.2.3 Caractérisation des enzymes s-GDH de type sauvage et mutées

3.2.3.1. Détermination de la masse moléculaire

La masse moléculaire du monomère de la s-GDH après purification est déterminée par spectrométrie de masse MALDI. La protéine est dessalée sur colonne PD10 (GE Healthcare) et éluée dans un tampon bicarbonate d'ammonium 50 mM pH 7.5. L'échantillon lyophilisé est ensuite analysé par MALDI-TOF et une masse de 50234,83 Da est trouvée ; cette masse correspond à la masse théorique de la PQQ s-GDH sans le peptide signal.

3.2.3.2. Reconstitution de la s-GDH avec le cofacteur PQQ

En sortie de purification (tampon Tris 20 mM, $CaCl_2$ 3 mM pH 7.5), la solution d'enzyme est préincubée 15 minutes avec du PQQ à température ambiante. Le PQQ ajouté correspond à une concentration finale équivalente à deux fois en molarité la concentration en enzyme. L'excès de PQQ est ensuite éliminé par dessalage sur une

colonne PD10 (GE Healthcare) équilibrée dans un tampon Pipes 20 mM, $CaCl_2$ 3 mM pH 7.

3.2.3.3. Mesure de la concentration

La concentration en enzyme d'une solution est calculée à partir de la DO mesurée à 280 nm en utilisant pour l'enzyme (dimérique ou monomérique) avec ou sans cofacteur PQQ un coefficient d'extinction de 1,28 ou 1,67 $l.g^{-1}.cm^{-1}$ respectivement (Olsthoorn et *al*, 1997).

3.2.3.4. Test enzymatique

Les tests enzymatiques sont effectués à l'aide d'un spectrophotomètre Varian dans un tampon phosphate de sodium 20 mM pH 7 à 37°C dans un volume de 3 mL en suivant la disparition par réduction du DCIP par l'intermédiaire du PMS, qui intervient comme accepteur d'électrons, à 600 nm en fonction du temps. L'activité spécifique de l'enzyme est exprimée en µmoles de DCIP disparu par minute et par mg de protéine. Les concentrations en PMS et DCIP sont de 0,6 et de 0,06 mM respectivement. L'enzyme est diluée de façon à mesurer une pente comprise entre - 0,05 et - 0,2 DO_{600nm}/min.

4. Techniques d'étude des propriétés enzymatiques des PQQ s-GDH de type sauvage et mutées

4.1. Détermination des constantes cinétiques (k_{cat}) et de Michaelis (K_M) à l'état stationnaire

Les expériences sont réalisées à 37°C sur un spectrophotomètre Varian dans un tampon phosphate de sodium 20 mM pH 7. La concentration en substrat (glucose et maltose) dans le test varie entre 0 et 800 mM.

Le PMS est utilisé comme premier accepteur d'électron et l'activité enzymatique est suivie à 600 nm par la réduction du DCIP utilisé comme deuxième accepteur d'électrons. Les concentrations initiales de PMS et de DCIP sont respectivement de 0,6 et de 0,06 mM. Le test est déclenché par l'ajout d'enzyme. Les points expérimentaux sont analysés par régression non linéaire aux équations 1, 2 ou 3 à l'aide du logiciel Sigma-plot 6.0 selon les équations suivantes :

(1) Modèle de Michaelis-Menten

$$k_{ss} = k_{cat} * [S] / (K_M + [S])$$

(2) Double hyperbole

$$k_{ss} = k_{cat1} * [S] / (K_{M1} + [S]) + k_{cat2} * [S] / K_{M2} + [S])$$

(3) Modèle de Michaelis-Menten avec inhibition compétitive

$$v/v_{max} = [S] / K_S * (1+ [S] / K_S + [I] / K_I)$$

Résultats

Les graphes des **Figures 2A, 2B, 2C, 2D, 2E et 2F** représentent les paramètres cinétiques à l'état stationnaire de la PQQ glucose déshydrogénase soluble d'*Acinetobacter calcoaceticus* sauvage (WT) et mutée en position 428 (N428C, N428Y, N428A, N428K, N428D et N428E) en présence de glucose ou de maltose.

Ces résultats montrent que, pour les deux substrats, maltose et glucose, les enzymes mutées selon l'invention présentent une activité supérieure à celle de l'enzyme sauvage ; certains de ces mutants sont deux fois plus actifs que l'enzyme sauvage.

4.2. Etude en fonction du pH

4.2.1. Activité en fonction du pH

L'étude de la variation de la constante de vitesse de la réaction en fonction du pH est réalisée sur une gamme de pH allant de 5 à 9 par incubation des enzymes sauvages et mutées soit dans un tampon mixte composé de Tris 120 mM, imidazole 30 mM, acide acétique 30 mM (TIA), dont la force ionique est ajustée à 190 mM avec du NaCl, soit dans un tampon sodium phosphate 20 mM allant de pH 6 à 8 (NaPi). Les expériences sont réalisées à 37°C à l'aide d'un spectrophotomètre Varian. Le PMS est utilisé comme premier accepteur d'électrons à une concentration de 0.6 mM. L'activité est suivie par la disparition du DCIP à 600 nm utilisé comme deuxième accepteur d'électrons à une concentration de 0,06 mM. Le test est déclenché par ajout de l'enzyme. L'activité optimale pour l'enzyme sauvage ou mutée correspond à 100% et l'activité relative à chaque pH est représentée.

Résultats

Les **Figures 3A et 3B** sont des graphes représentant l'activité en fonction du pH de la PQQ s-GDH d'*Acinetobacter calcoaceticus* sauvage (WT) et mutée en position 428 par une cystéine (N428C). Ces résultats montrent que le mutant cystéine de la PQQ s-GDH (N428C) présente une activité relative comparable à celle de l'enzyme sauvage démontrant que la mutation ne conduit pas à une perte d'activité relative quel que soit le pH.

4.2.2. Stabilité en fonction du pH

La stabilité en fonction du pH de la PQQ s-GDH sauvage ou mutée est déterminée par dilution de l'enzyme purifiée à homogénéité dans un tampon mixte allant

de pH 5 à 9. Ce tampon mixte est composé de Tris 120 mM, imidazole 30 mM, acide acétique 30 mM, dont la force ionique est ajustée à 190 mM avec du NaCl. La solution d'enzyme diluée, entre 1 et 6 µg/ml, est préincubée à 37°C. Différents prélèvements sont effectués en fonction du temps. L'activité résiduelle est mesurée à 37°C à l'aide d'un spectrophotomètre Varian dans un tampon phosphate de sodium 20 mM pH 7 en présence de 0,06 mM DCIP, 0,6 mM PMS. La concentration en glucose est de 75 mM pour tester l'enzyme sauvage et de 150 mM pour tester le mutant N428C.

Résultats

L'enzyme mutée selon l'invention présente une meilleure stabilité que l'enzyme sauvage quel que soit le pH et que cette stabilité est constante sur la gamme de pH testée, en particulier, l'enzyme mutée reste stable même à des pH supérieurs à 7.

4.3. Etude en fonction de la température

4.3.1. Activité en fonction de la température

L'étude de la variation de la constante de vitesse de la réaction en fonction du pH est réalisée dans un tampon phosphate de sodium 20 mM pH 7, en présence de 0,06 mM de DCIP et de 0,6 mM de PMS. La concentration en glucose est de 75 mM pour tester l'enzyme sauvage et de 150 mM pour tester le mutant N428C. La température varie de 10 à 60°C. Le suivi de l'activité s'effectue sur un spectrophotomètre Varian CARY UV Biomelt régulé en température. Le test est déclenché par ajout de l'enzyme.

Résultats

La **Figure 4** représente la courbe d'activité de la PQQ s-GDH sauvage (WT) et mutée (N428) en fonction de la température.

Cette courbe montre qu'entre 30 et 50°C, l'enzyme mutée présente une meilleure activité que l'enzyme sauvage.

4.3.2. Stabilité de l'enzyme en fonction de la température

L'étude est réalisée dans un tampon phosphate de sodium 20 mM pH 7, en présence de 0,06 mM de DCIP et de 0,6 mM de PMS. La concentration en glucose est de 75 mM pour tester l'enzyme sauvage et de 150 mM pour tester le mutant N428C. La température varie de 10 à 60°C. Le suivi de l'activité s'effectue à 37°C sur un spectrophotomètre Varian CARY UV Biomelt régulé en température. Le test est déclenché par ajout de l'enzyme.

Résultats

On constate que pendant un temps d'incubation inférieur à 200 minutes, l'enzyme mutée N428C présente une meilleure activité à 40 et 50°C que l'enzyme sauvage démontrant ainsi son intérêt pour des kits de dosage du glucose sanguin.

4.4. Etude en fonction du substrat

La spécificité du mutant cystéine (N428C) par rapport à différents substrats a été évaluée.

Le protocole mis en œuvre pour cette mesure de spécificité est identique à celui décrit au point 4.1. en utilisant des substrats différents.

Les résultats obtenus sont représentés dans le Tableau II ci-dessous et à la **Figure 5**.

Tableau II : Comparaison de la spécificité de substrat de la PQQ s-GDH d'*Acinetobacter calcoaceticus* sauvage et mutée comprenant une cystéine en position 428 (mutant N428C).

	WT		**N428C**		
Substrat	***k*ss s^{-1} à 4 mM substrat**	**%Activité relative / WT Glucose**	***k*ss s^{-1} à 4 mM substrat**	**% Activité relative / WT**	**% Activité relative / N428C Glucose**
Glucose	806	100	1396	173	100
Maltose	660	81	861	130	61
Ribose	86	10	67	77	4
Xylose	148	18	159	107	11
Galactose			357	26	25

Résultats

Même si les valeurs brutes des k_{ss} du mutant N428C pour la plupart des substrats sont plus élevées que celles de l'enzyme sauvage, l'activité relative, qui caractérise la spécificité d'une enzyme pour un substrat par rapport à un autre substrat, montre que le mutant N428C est plus spécifique au glucose. Ainsi, à 4 mM de substrat, avec le maltose comme substrat, on mesure une activité relative par rapport au glucose de 81% pour l'enzyme sauvage alors que le mutant N428C présente une activité relative du maltose par rapport au glucose de 61%.

Ce même protocole a été mis en œuvre pour évaluer la spécificité au glucose et au maltose des mutants aspartate (N428D), glutamate (N428E), alanine (N428A), Tyrosine (N428Y) et lysine (N428K).

Les résultats sont présentés dans le Tableau III ci-dessous :

	N428D			N428E		
substrat	kss (s-1) à **5mM** substrat	activité relative / N428D glucose (%)	Activité relative / WT (%)	kss (s-1) à **5mM** substrat	Activité relative / N428E glucose (%)	Activité relative / WT (%)
glucose	1214	100	150	1380	100	171
maltose	1103	91	167	1182	85	179

	N428A			N428Y		
substrat	kss (s^{-1}) à **5mM** substrat	Activité relative / N428A glucose (%)	Activité relative / WT (%)	kss (s^{-1}) à **5mM** substrat	Activité relative / N428Y glucose (%)	Activité relative / WT (%)
glucose	1058	100	131	1353	100	167
maltose	638	60	97	716	52	108

	N428K		
substrat	kss (s^{-1}) à **5mM** substrat	Activité relative / N428Y glucose (%)	Activité relative / WT (%)
glucose	940	100	116
maltose	625	66	94

REVENDICATIONS

1. Mutant de la PQQ s-GDH d'*Acinetobacter calcoaceticus* de SEQ. ID. N°2, caractérisé en ce que son acide aminé situé en position 428 est substitué et qu'il a une séquence en acides aminés sélectionnée dans le groupe constitué par les SEQ. ID. N°4, 6, 8, 12 et 14.

2. Molécule d'acide nucléique, caractérisée en ce qu'elle code pour le mutant PQQ s-GDH défini selon la revendication 1.

3. La molécule d'acide nucléique selon la revendication 2, 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° 15 et 16 ; 19 et 20 ; 21 et 22 ; 23 et 24 et 25 et 26.

4. La molécule d'acide nucléique selon la revendication 3, caractérisée en ce qu'elle a une séquence sélectionnée dans le groupe constitué par les SEQ. ID. N°3, 5, 7, 11 et 13.

5. Vecteur d'expression, caractérisé en ce qu'il comprend la molécule d'acide nucléique définie selon l'une quelconque des revendications 2 à 4.

6. Cellule hôte exprimant le mutant de la PQQ s-GDH défini selon la revendication 1, caractérisée en ce qu'elle est transformée avec le vecteur d'expression défini selon la revendication 5.

7. Utilisation du mutant PQQ s-GDH défini selon la revendication 1 pour mesurer la concentration en glucose dans un échantillon.

8. L'utilisation selon la revendication 7, caractérisée en ce que l'échantillon est biologique.

9. L'utilisation selon la revendication 8, caractérisée en ce que l'échantillon est du sang.

10. Kit de dosage du glucose caractérisé en ce qu'il comprend le mutant de la PQQ s-GDH défini selon la revendication 1, les réactifs nécessaires à la mise en œuvre du test de dosage du glucose et les instructions d'utilisation nécessaires pour effectuer le test de dosage.

11. Electrode à glucose, caractérisée en ce qu'elle comprend un matériau conducteur recouvert d'un dépôt comprenant au moins le mutant de la PQQ s-GDH défini selon la revendication 1.

12. Capteur de glucose, caractérisé en ce qu'il est constitué de l'électrode définie selon la revendication 11.

13. Biopile à glucose, caractérisée en ce qu'elle comprend une première électrode définie selon la revendication 11 à titre d'anode et une seconde électrode à titre de cathode.

14. 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 conduit à un changement de couleur et du mutant PQQ s-GDH défini selon la revendication 1;
b) mesure de l'intensité de la coloration dudit réactif d'oxydoréduction dans l'échantillon ;
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.

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

a) introduction dans ledit échantillon de l'électrode à glucose définie selon la revendication 11 ;
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.

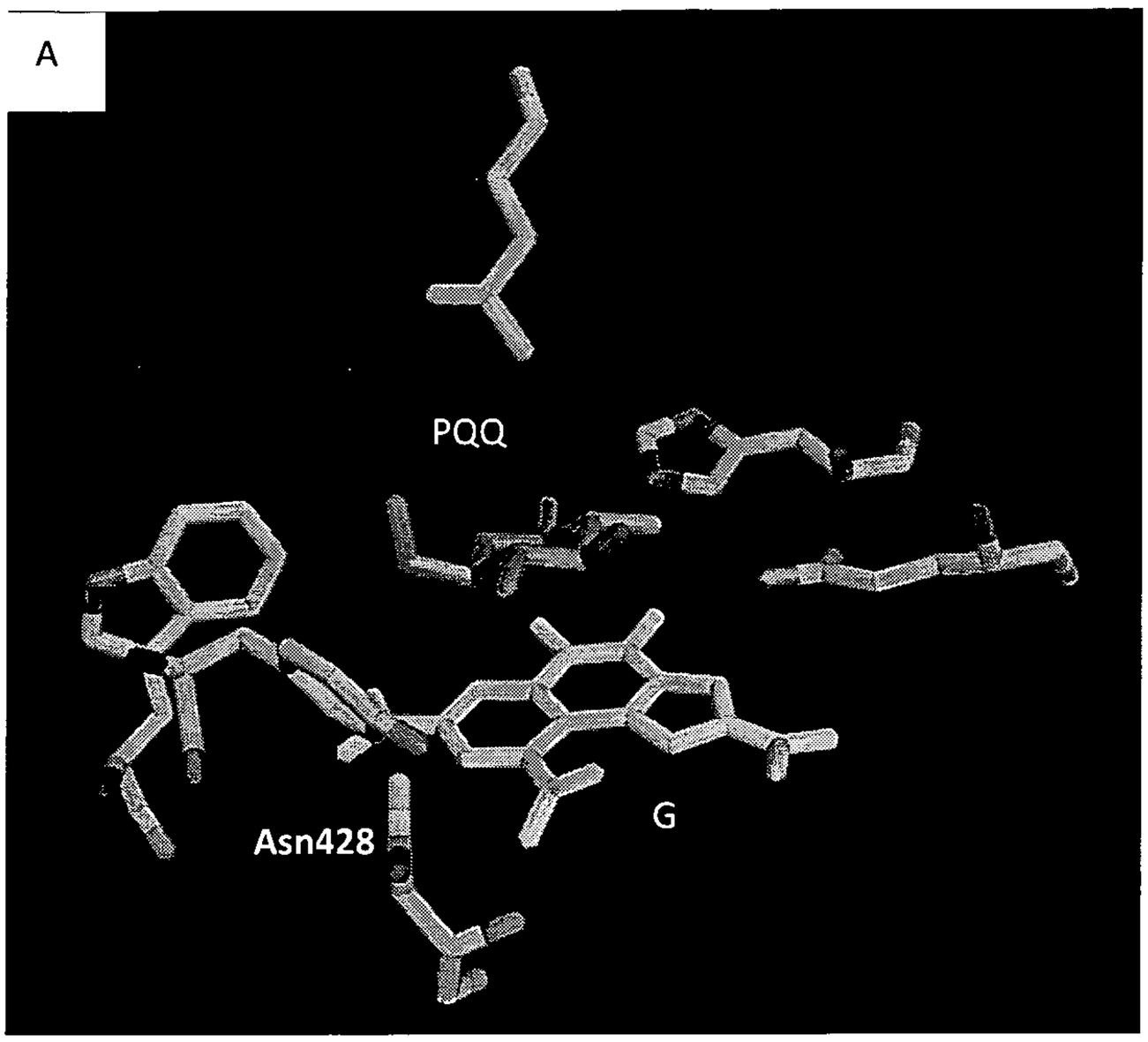


Figure 1A

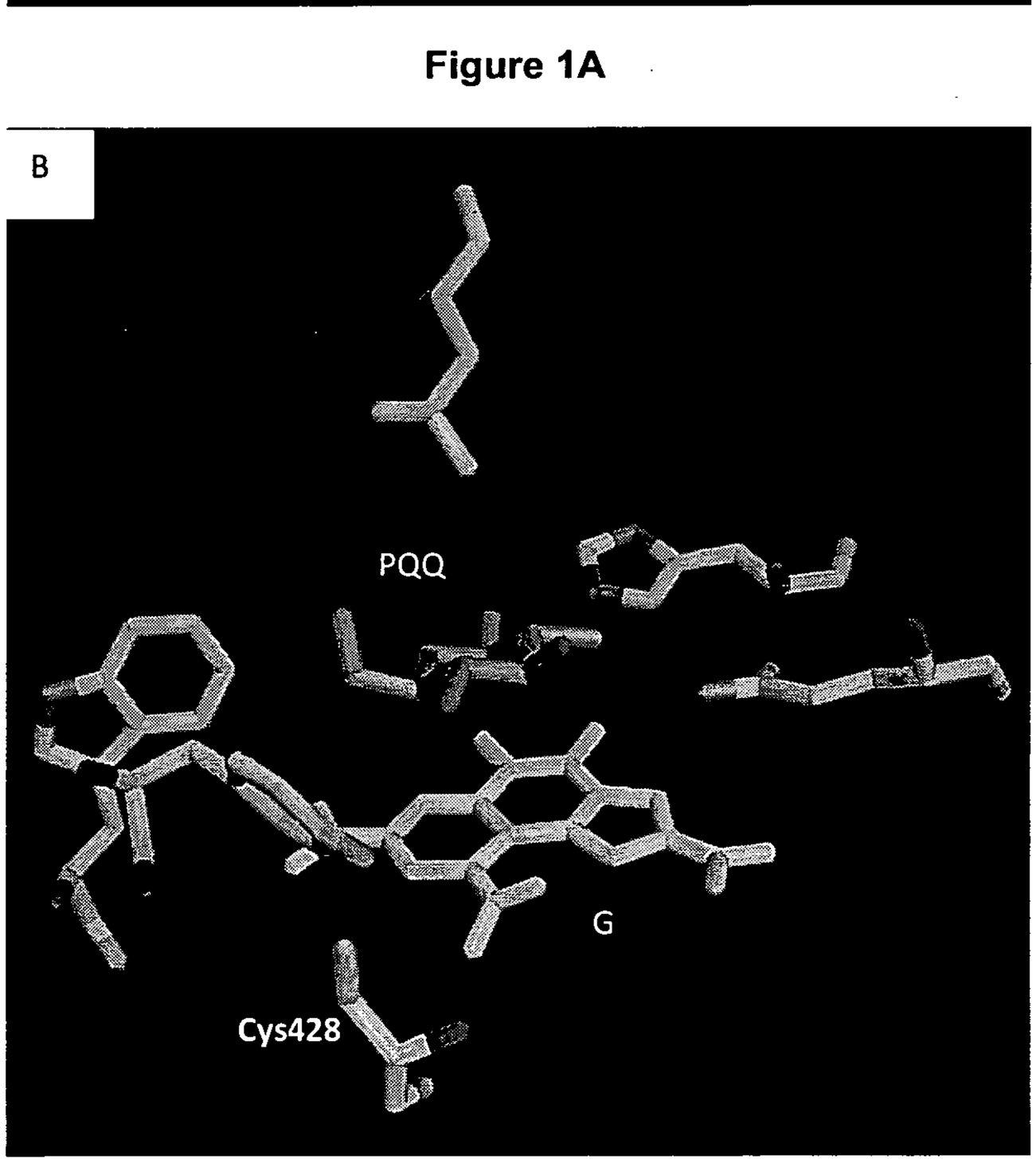


Figure 1B

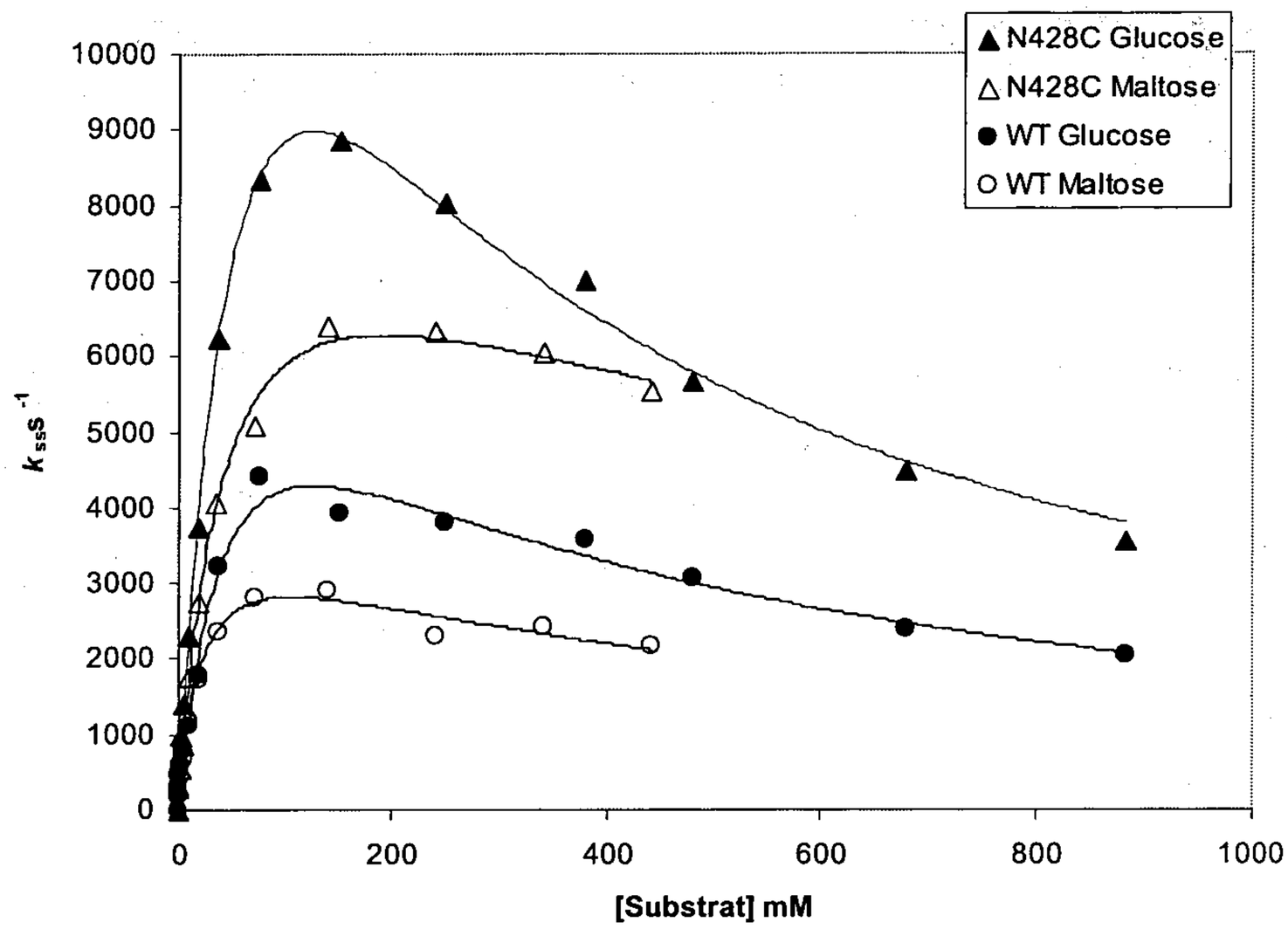


Figure 2A

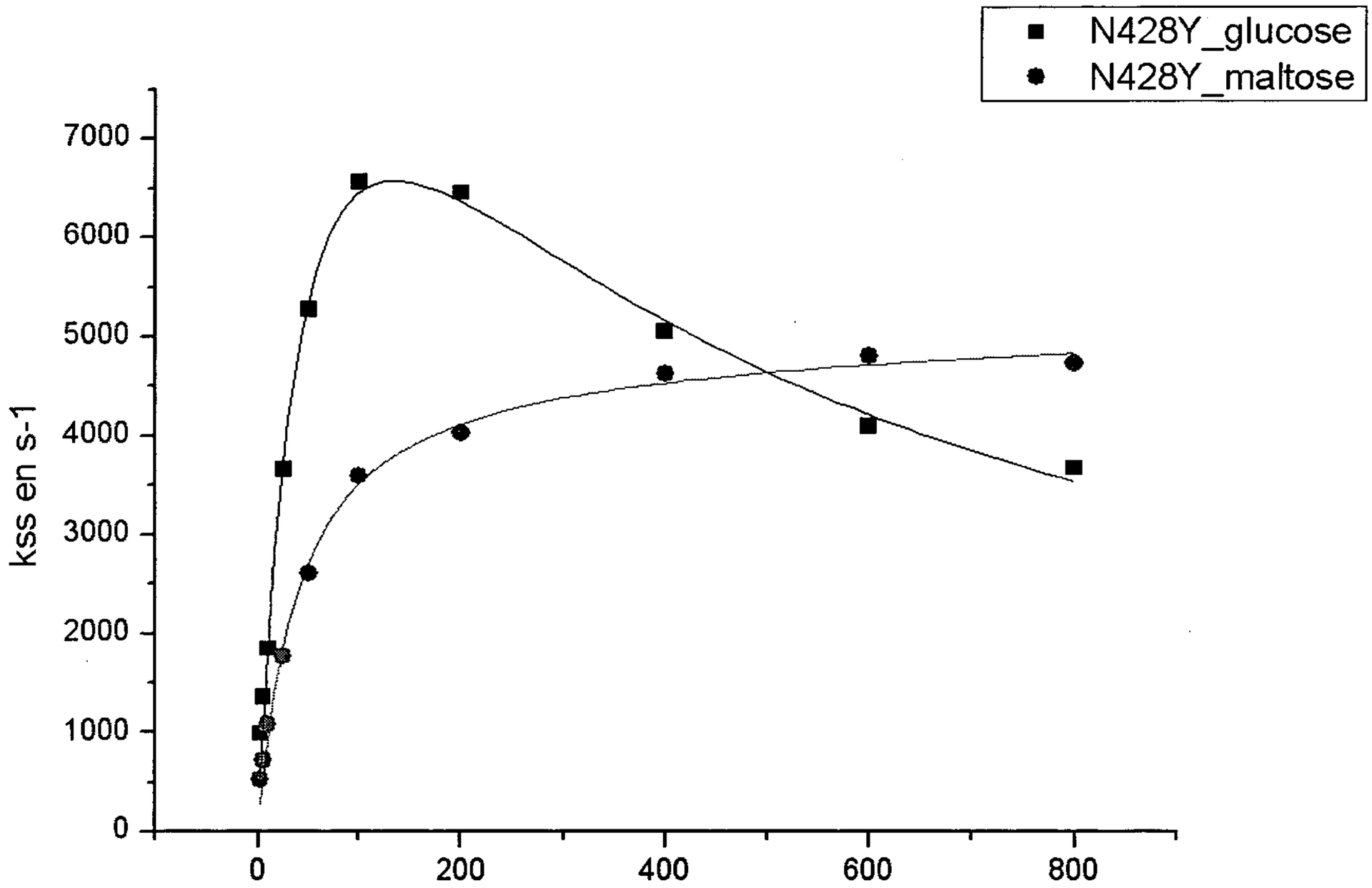


Figure 2B

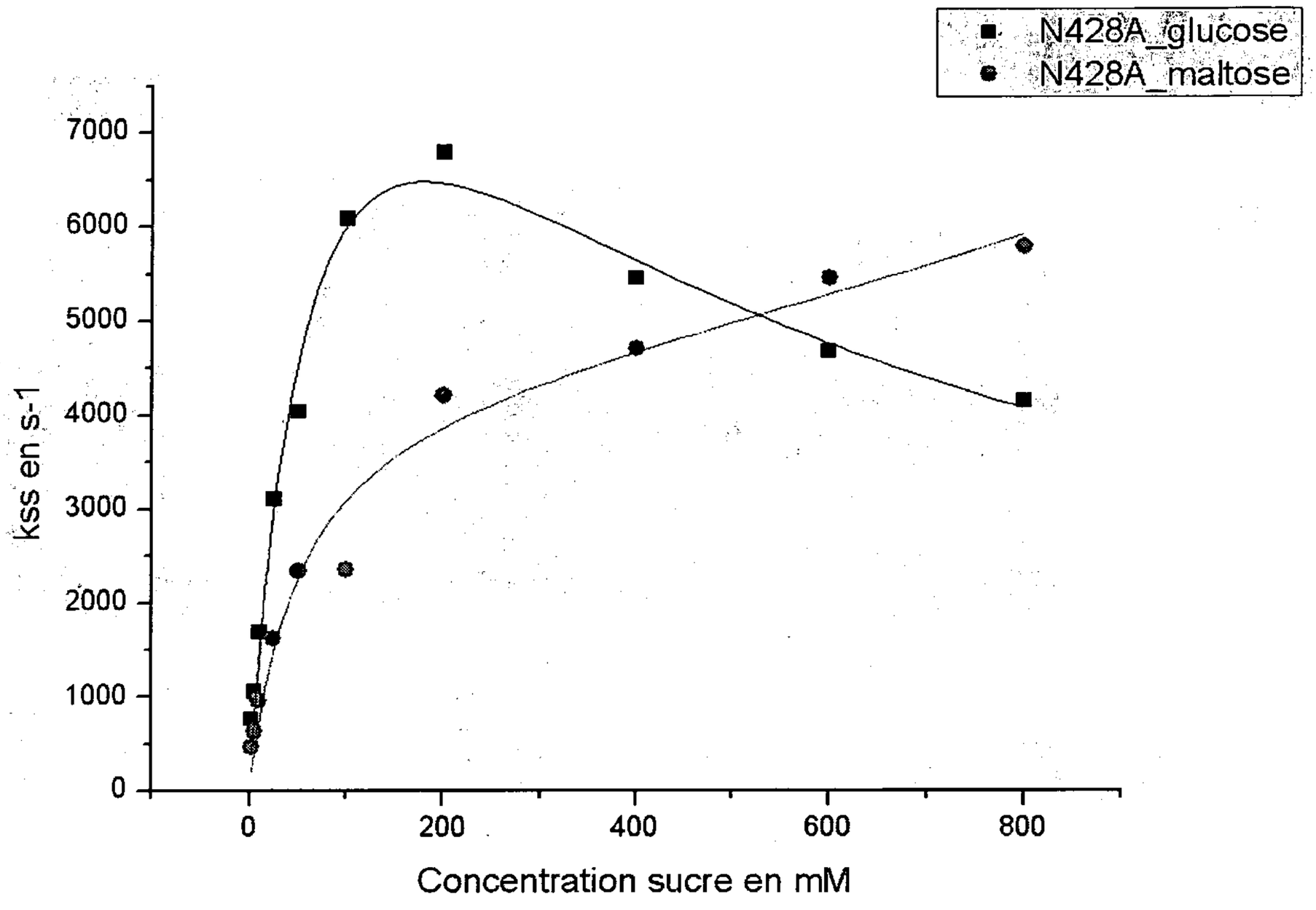


Figure 2C

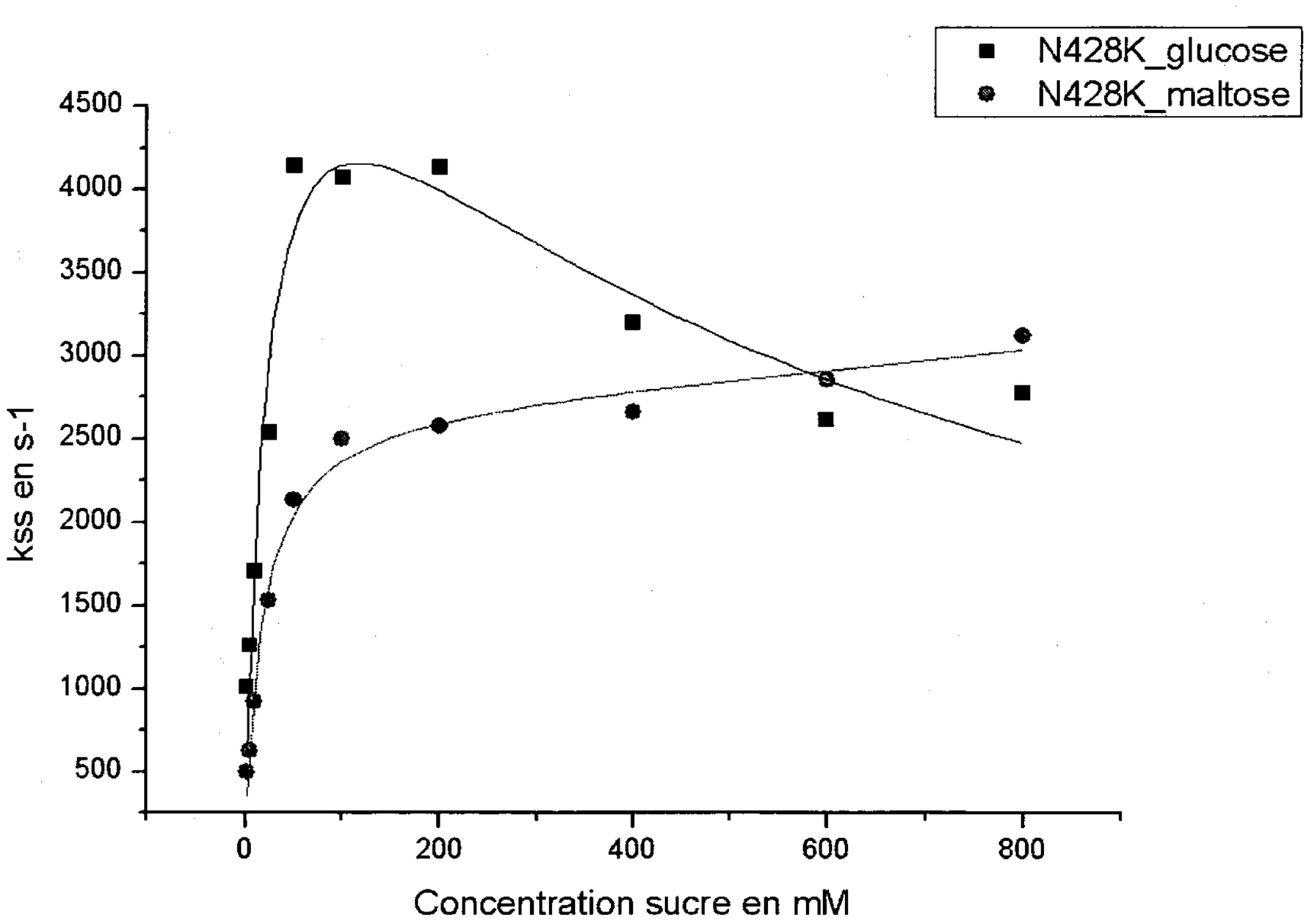


Figure 2D

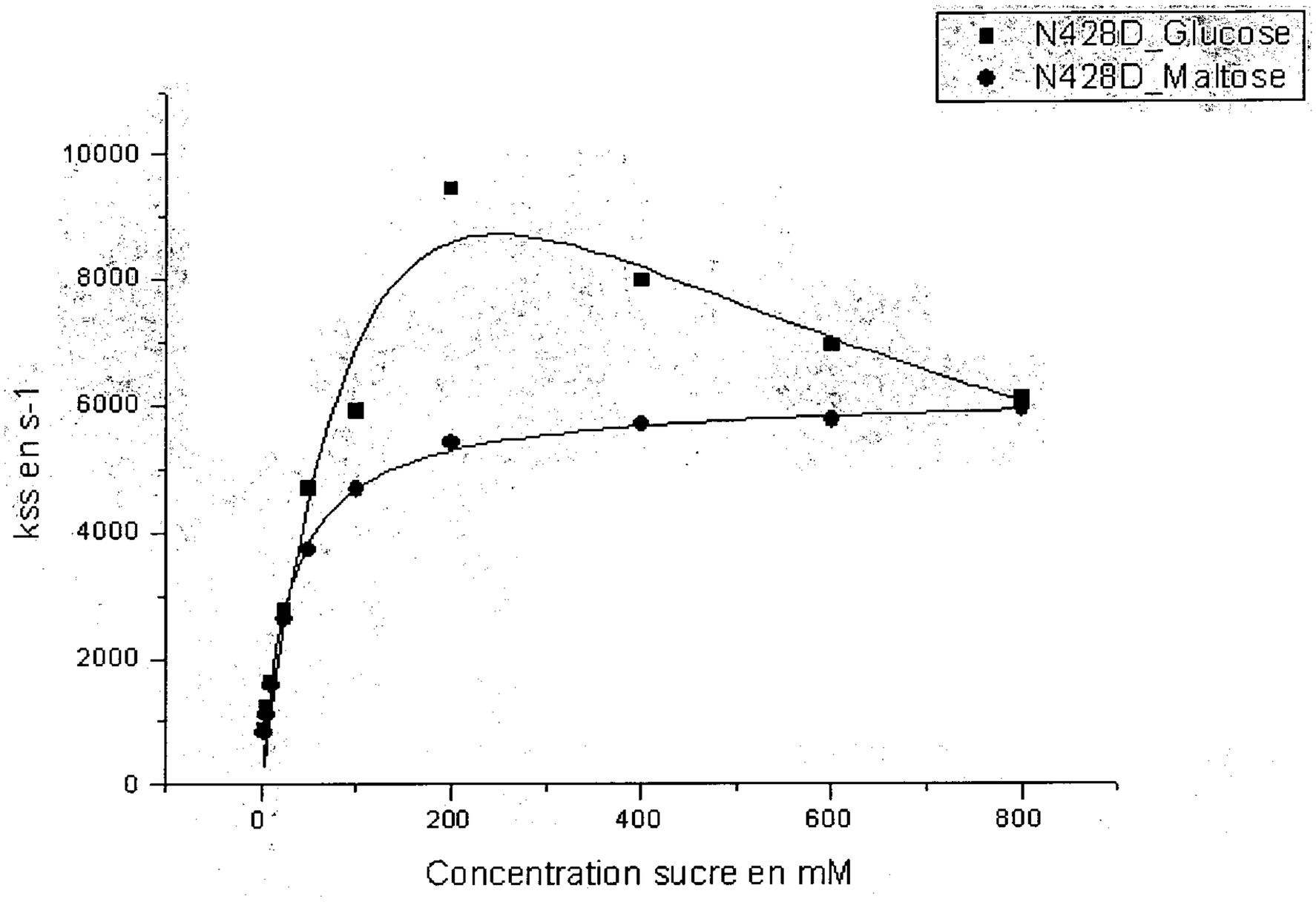


Figure 2E

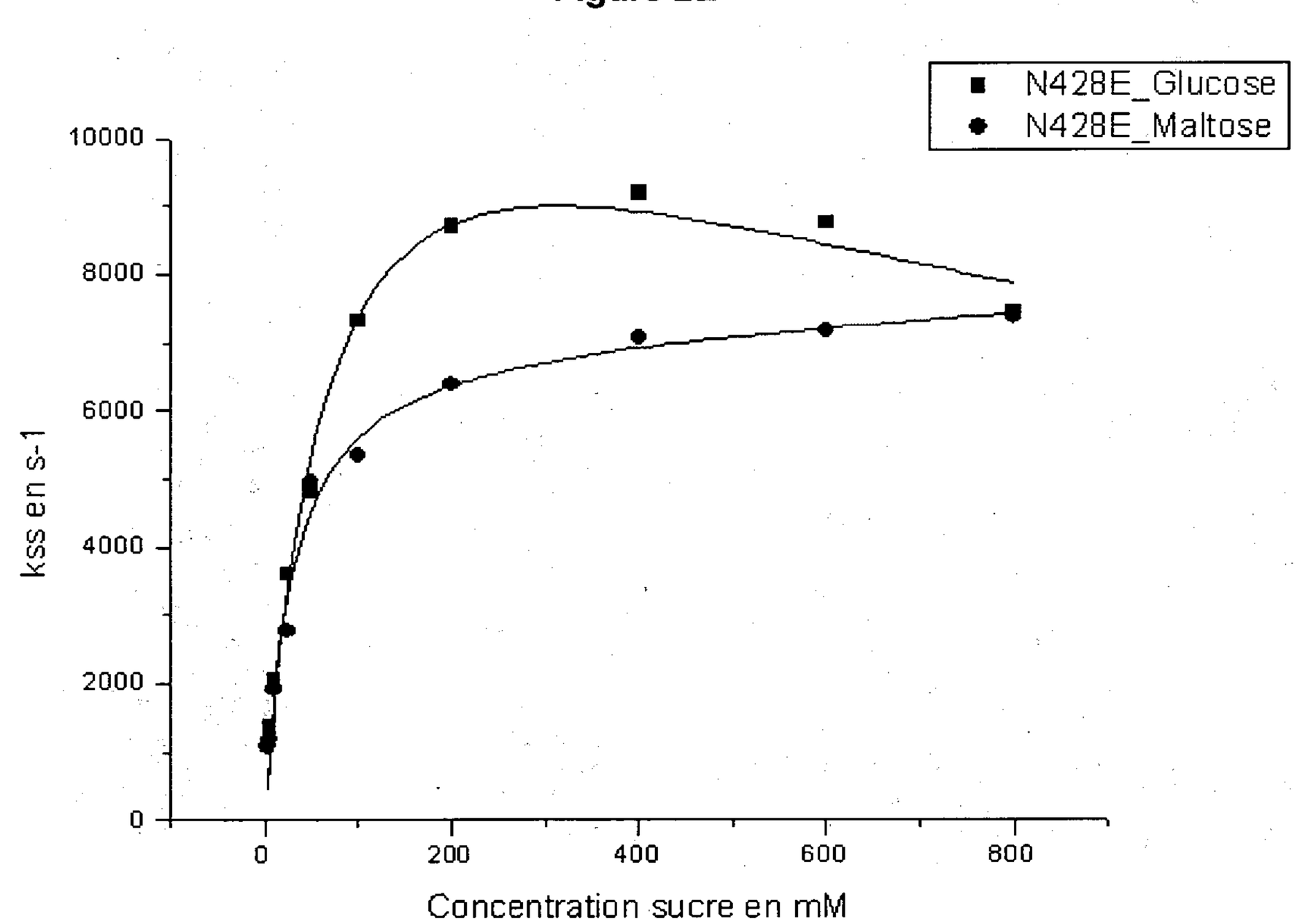


Figure 2F

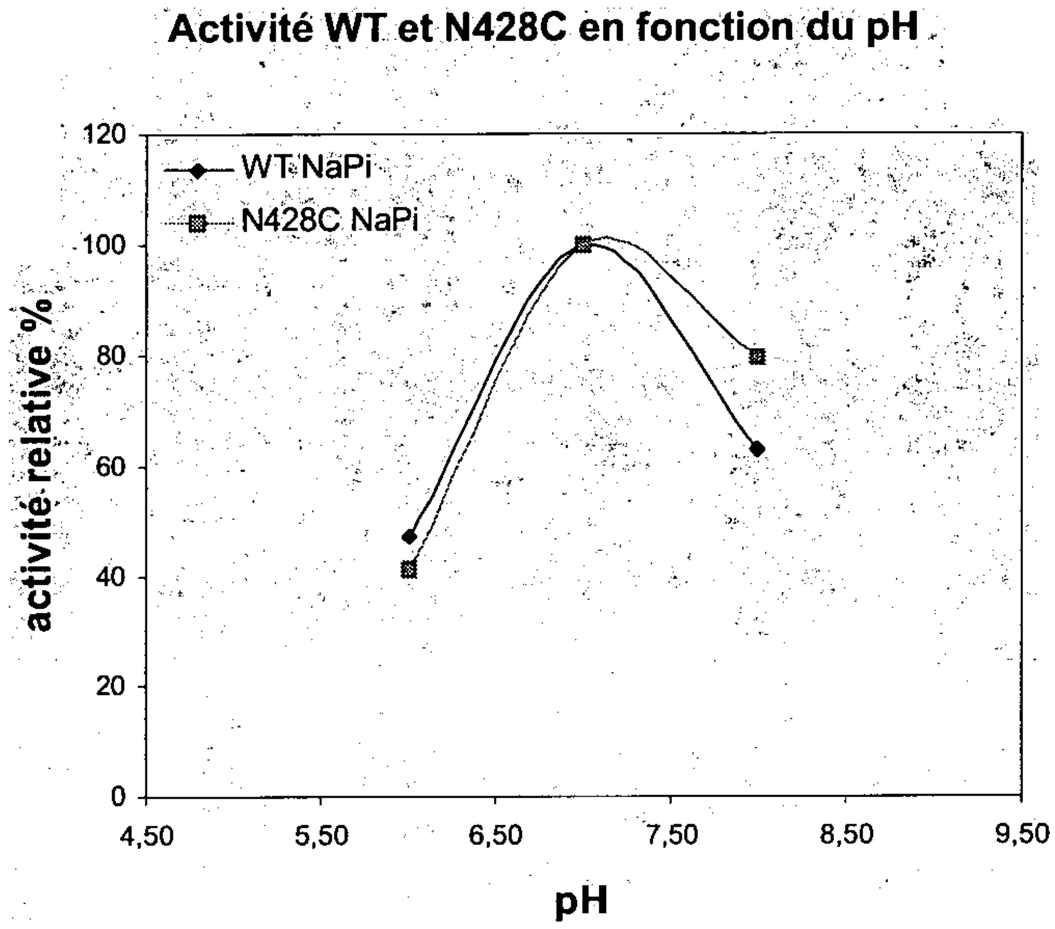


Figure 3A

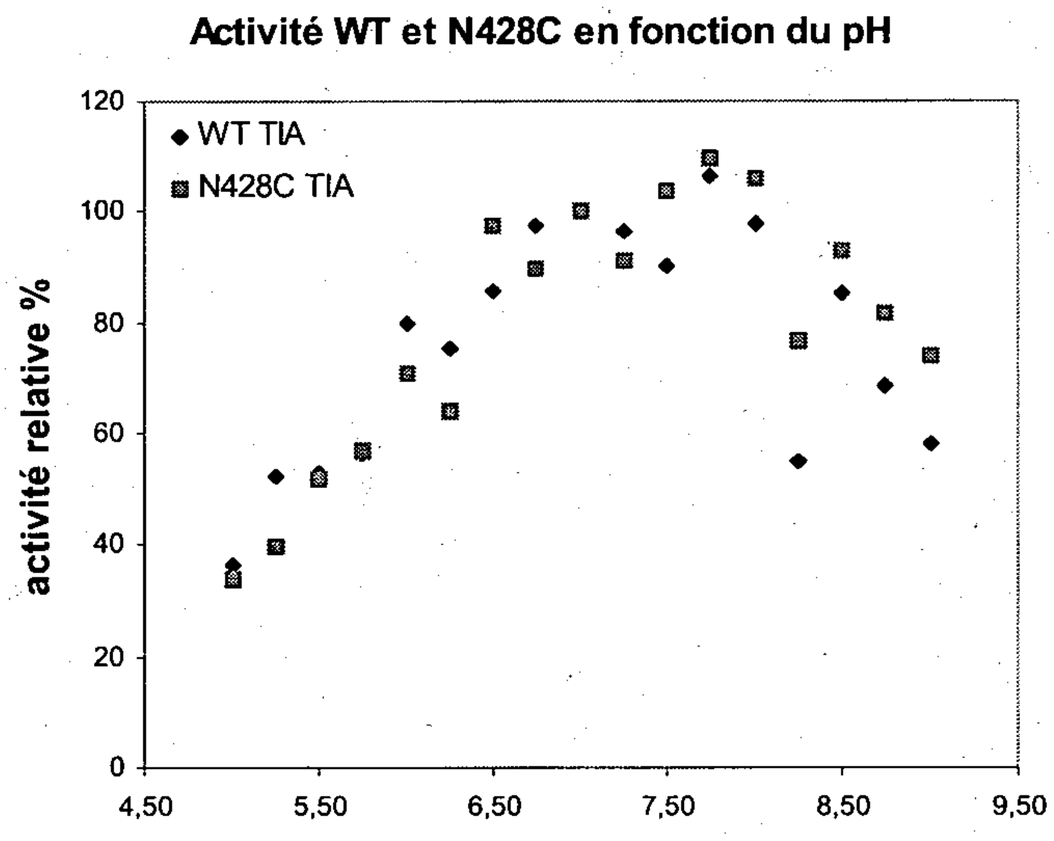


Figure 3B

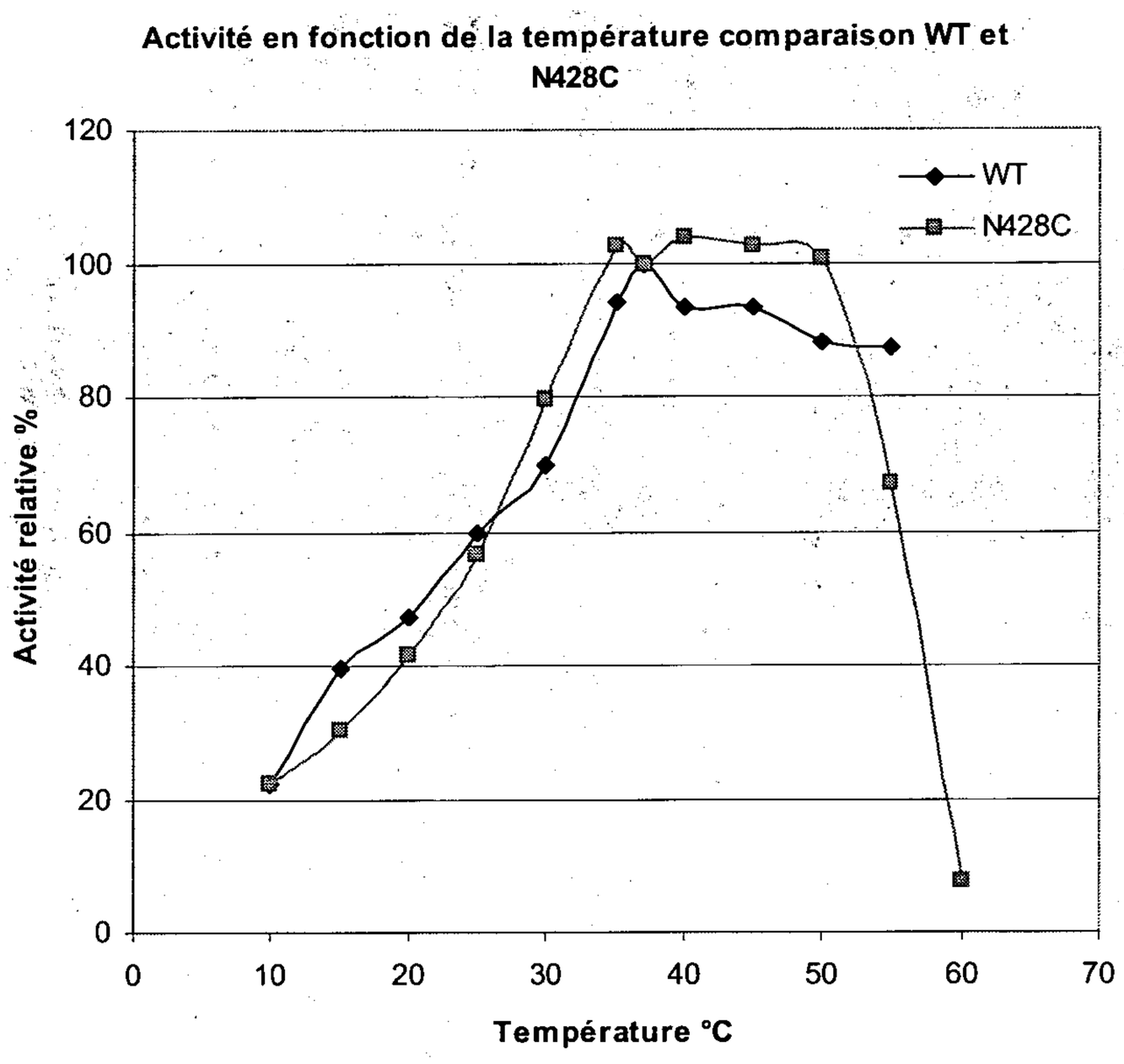


Figure 4

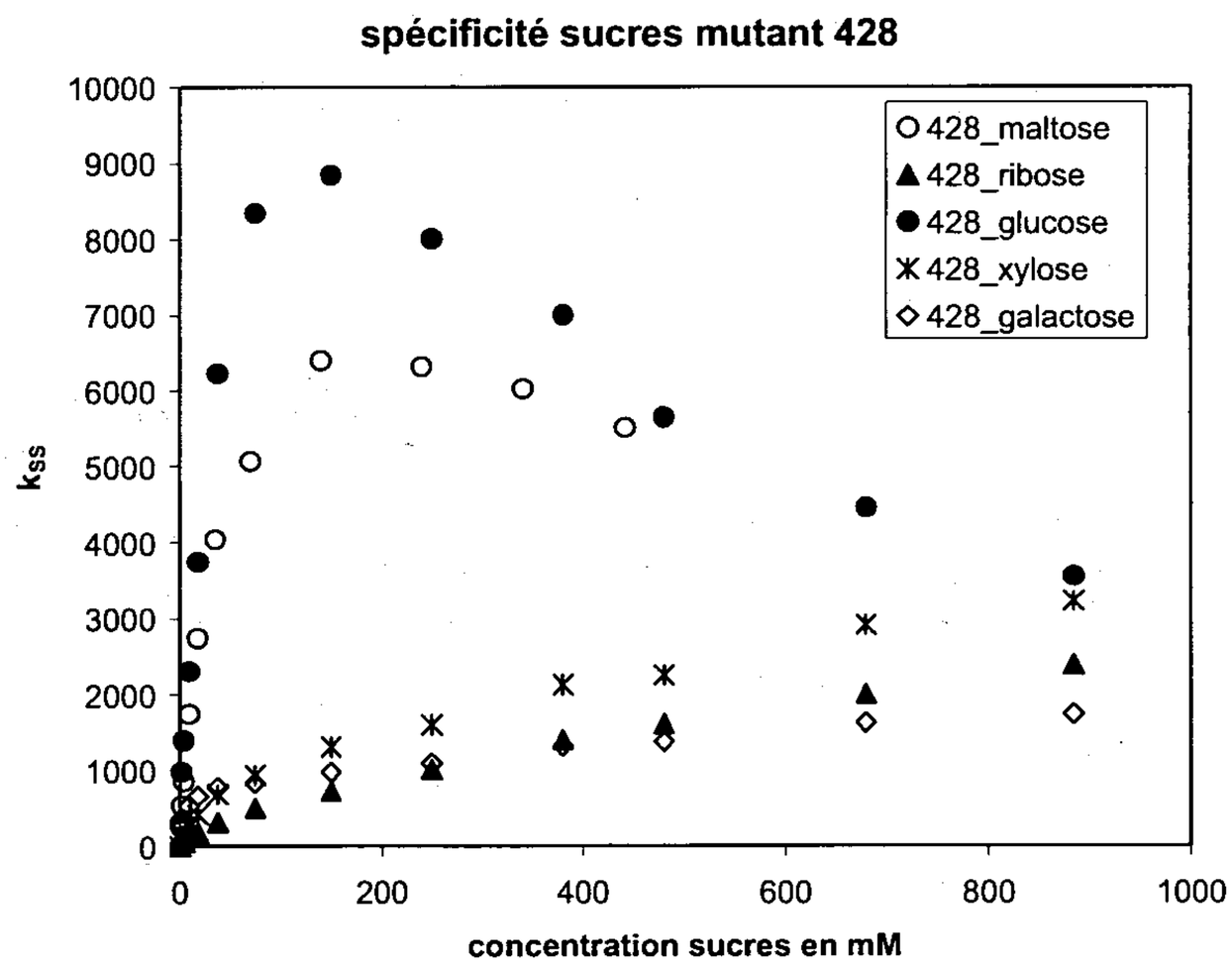


Figure 5