**EXERCICE** (J-P. Mahy) : Les D-amino-acide oxydases

La D-amino-acide oxydase (**DAAO,** E.C. 1.4.3.3) est une enzyme ubiquitaire chez les eucaryotes de poids moléculaire 45,5 kDa. Elle est responsable, dans les cellules, de la désamination des D-amino-acides pour conduire aux acides -cétoniques correspondants. Elle appartient à la classe des oxydases qui utilisent comme cofacteur redox le FAD (Flavine Adénine Dinucléotide) :



**I-** Pour étudier l’activité de la **DAAO**, la transformation de la D-phénylglycine **1** en acide formylbenzoïque **2** a été étudiée par spectrophotométrie UV-visible.



**I-1a.** Ecrivez l’équation stoechiométrique correspondant à cette réaction.

**I-1b.** Quels sont les produits secondaires formés ?

**I-1c.** Comment FAD est-il régénéré ?

**I-2a.** Décrivez le mécanisme de fonctionnement des **DAAO** tel qu’il a été proposé en cours.

**I-2b.** Quel intermédiaire clé est formé ?

**I-2c.** Expliquez succinctement les faits expérimentaux en faveur de ce mécanisme.

**II-** Des D-amino-acide oxydases ont également été trouvées chez des microorganismes tels que *Trigonopsis variabilis* (**TvDAAO**). Ces enzymes ont ainsi pu être obtenues en plus grosses quantités, ce qui a facilité l’étude de leur mécanisme d’action et leur utilisation en bioconversions.

Des études cinétiques ont été effectuées sur ces enzymes, avec des dérivés de la D-phénylglycine **1** provenant, soit de la deutériation du H porté par le carbone  de l’amino-acide (D--2H-phénylglycine), soit de la substitution en para du noyau phényle par divers groupes (tableau 1)

Tableau l

# *Apparent steady state kinetic parameters for the oxidation of p-substituted phenylglycines*

Measurements at 25 oC, polarographic assay using 90 mM Tris/HCl buffer, pH8.3; [O2] = 0.253 mM.

Numbers in italics are the isotope effects, *i.e.* the ratio ofthe values for the [-1H]- and [-2H]- forms of phenylglycine.

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| para-Substituent | V max | | Km(A) | Vmax/Km |
|  | *s-1* | *mM* | | *mM/s* |
| [-1H]- | 11.8 | 0.5 | | 23.6 |
| [-2H]- | 1.7 | 0.4 | | 4.2 |
| Isotope effect (1H/2H) | 6.9 | 1.2 | | 5.7 |
| Cl- | 1.4 | 0.17 | | 8.2 |
| Br- | 0.9 | 0.05 | | 17.0 |
| Me- | 4.3 | 0.2 | | 21.5 |
| MeO- | 3.2 | 0.15 | | 21.3 |
| HO- | 13.7 | 0.6 | | 22.8 |
| NO2- | 2.7 | 0.09 | | 31.8 |

**II-a.** Observe t’on un effet isotopique sur *KM*? expliquez.

**II-b.** Sur quel paramètre porte l’effet isotopique ? Cet effet peut-il être compatible avec l’intermédiaire proposé dans le mécanisme de la question II?

**II-c.** Les variations de *Vmax* en fonction des effets électroniques des substituants des noyaux phényle sont-elles compatibles avec la formation de cet intermédiaire?

**III.** En fait, dans le cas de la **TvDAAO**, on pense que le mécanisme passe plutôt par un transfert d’hydrure sur le FAD, avec formation d’un intermédiaire iminium.

**III-a.** Expliquez pourquoi les faits expérimentaux ci-dessus sont en accord avec un tel mécanisme.

**III-b.** Ecrivez le mécanisme correspondant